

Πείραμα 0: Οξέα, βάσεις και ρυθμιστικά διαλύματα – Στοιχεία θεωρίας

I. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Ο όρος pH χρησιμοποιείται για να εκφράσει την ένταση της οξύτητας ή της αλκαλικότητας ενός διαλύματος. Είναι τρόπος έκφρασης της συγκέντρωσης των ιόντων υδρογόνου, ή, για την ακρίβεια, της ενεργότητας των ιόντων υδρογόνου. Ενεργότητα (a) ονομάζεται η ενεργός συγκέντρωση των ιόντων. Το ιοντικό περιβάλλον κάθε ιόντος, ελαττώνει την ταχύτητα και τη δραστηριότητά του, με συνέπεια το διάλυμα να συμπεριφέρεται σαν η συγκέντρωσή του να είναι μικρότερη από τη στοιχειομετρική (πραγματική) συγκέντρωση (C). Η σχέση που συνδέει την ενεργότητα με τη συγκέντρωση είναι $a = \gamma C$ όπου γ είναι ο συντελεστής ενεργότητας ο οποίος προσδιορίζεται πειραματικά.

Όλες οι βιοχημικές αντιδράσεις πραγματοποιούνται κάτω από αυστηρά ελεγχόμενες συνθήκες όσον αφορά τη συγκέντρωση του ιόντος υδρογόνου. Οι ζωντανοί οργανισμοί δεν ανέχονται μεγάλες διακυμάνσεις στη τιμή της την οποία εμείς εκφράζουμε ως pH. Όταν είναι παρούσες χημικές ουσίες που κρατούν το pH σταθερό τότε λέμε ότι το σύστημα ρυθμίζεται. Είτε αναφερόμαστε στο ίδιο το σώμα μας ή σε κάτι που έχουμε σε δοκιμαστικό σωλήνα, είναι κανόνας ότι όλες οι αντιδράσεις που είναι σημαντικές για μας πρέπει να ρυθμίζονται. Η κατάλληλη επιλογή και η σωστή παρασκευή ρυθμιστικών διαλυμάτων αποτελούν κρίσιμες παραμέτρους για την επιτυχία ή όχι των πειραμάτων σας σε ένα βιοχημικό εργαστήριο.

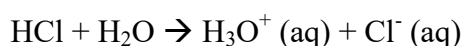
Για την κατανόηση του μηχανισμού δράσης των ρυθμιστικών διαλυμάτων, είναι απαραίτητο να έχετε ήδη κατανοήσει βασικές έννοιες όπως π.χ. τις διαφορές ισχυρών/ασθενών οξέων, pH κ.τ.λ. Στο συγκεκριμένο εργαστήριο θα χρησιμοποιήσουμε τον ορισμό του Bronsted: Οξύ χαρακτηρίζεται μια ουσία που μπορεί να δώσει ένα ιόν υδρογόνου και βάση η ουσία που μπορεί να δεχτεί ένα ιόν υδρογόνου.

II. ΙΣΧΥΡΑ ΟΞΕΑ ΚΑΙ ΒΑΣΕΙΣ

Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, οξύ είναι μια ένωση που έχει ένα ιόν υδρογόνου και μπορεί να το διαθέσει στο διάλυμα. Συνηθισμένα ισχυρά οξέα είναι το υδροχλωρικό οξύ (HCl), το θειικό οξύ (H₂SO₄) και το νιτρικό οξύ (HNO₃). Τα ισχυρά οξέα δίστανται πλήρως σε υδατικά διαλύματα:



Ο παραπάνω τρόπος γραφής της αντίδρασης αυτής δεν είναι απόλυτα σωστός. Τα ιόντα υδρογόνου δεν κυκλοφορούν ελεύθερα στο διάλυμα αλλά συνδέονται με μόρια νερού δίνοντας ιόντα οξωνίου H_3O^+ :



Για λόγους απλότητας και συντομίας θα χρησιμοποιηθεί ο πρώτος τρόπος απεικόνισης των αντιδράσεων.

Ανάλογα, οι ισχυρές βάσεις όπως οι NaOH , KOH , και Ca(OH)_2 δίστανται πλήρως σε ιόντα:



Το πόσο ισχυρό είναι ένα οξύ καθορίζεται από το ποσοστό διάστασης των υδρογονοiónτων σε υδατικά διαλύματα. Αυτό καθορίζεται από την τιμή της σταθεράς διάστασης K_a :

$$K_a = \frac{[\text{H}^+][\text{A}^-]}{[\text{HA}]}$$

Η ολική διάσταση υποδεικνύεται και από το βέλος μονής κατεύθυνσης στην αντίδραση.

Εφόσον τα ισχυρά οξέα και οι ισχυρές βάσεις δίστανται πλήρως στα ιόντα τους είναι εύκολο να υπολογίσουμε το pH. Εάν γνωρίζουμε τον αριθμό των μορίων της ένωσης από την οποία ξεκινάμε, αντίστοιχα γνωρίζουμε και τον αριθμό των ιόντων που προκύπτουν, π.χ.

Ποιο είναι το pH ενός διαλύματος 0,01 M HCl;

Αφού το HCl είναι ισχυρό οξύ δίσταται πλήρως οπότε η συγκέντρωση του H^+ είναι επίσης 0,01 M. Άρα $\text{pH} = -\log[\text{H}^+] = -\log 0,01 = 2$ άρα $\text{pH} = 2$.

III. ΑΣΘΕΝΗ ΟΞΕΑ ΚΑΙ ΒΑΣΕΙΣ

Ο προσδιορισμός του pH σε διαλύματα ασθενών οξέων ή βάσεων απαιτεί λίγο μεγαλύτερη προσοχή. Στις περιπτώσεις αυτές η διάσταση δεν είναι πλήρης οπότε η $[H^+]$ πρέπει να προσδιοριστεί μέσω της K_a . Η σταθερά αυτή μας λέει πόσο ισχυρό είναι το οξύ οπότε μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη μέτρηση των H^+ που απομακρύνονται από το οξύ. Είναι φανερό ότι είναι άβολο να εκφράζουμε τη σταθερά ισορροπίας με αριθμούς όπως π.χ. $4,3 \times 10^{-6}$, γι' αυτό χρησιμοποιούμε τον όρο pK_a όπου το «p» εκφράζει το $-\log$ του αριθμού που ακολουθεί. Επομένως:

$$pK_a = -\log K_a$$

Αν π.χ. $K_a = 10^{-12}$, $pK_a = 12$. Πολύ καλύτερα!

Επειδή οι αντιδράσεις είναι διπλής κατεύθυνσης, είναι σημαντικό να θυμάστε πως όταν γίνεται χρήση του K_a ή του pK_a πρέπει να γράφετε την αντίδραση ως διάσταση οξέος. Ο τρόπος που θα δουλέψετε για να βρείτε το pH εξαρτάται από τα χημικά συστατικά του διαλύματος. Για ένα απλό σύστημα ασθενούς οξέος υπάρχουν οι εξής πιθανότητες: ασθενές οξύ μόνο, ασθενής βάση μόνο, ρυθμιστικό διάλυμα. Παρακάτω, θα δούμε εν συντομία, τις δυο πρώτες περιπτώσεις.

Διάλυμα ασθενούς οξέος μόνο

Εάν έχουμε 0,002 mol οξικού οξέος (HAc) και προσθέσουμε απιονισμένο νερό μέχρι ο όγκος να γίνει 100 ml, θα έχουμε ένα διάλυμα HAc 0,02 M. Ένα μέρος του HAc δίσταται μέσω της παρακάτω αντίδρασης:



Τι ποσοστό του οξέος δίσταται; Δεν γνωρίζουμε επειδή είναι ασθενές οξύ και δεν δίσταται πλήρως. Το pK_a είναι μέτρο της ικανότητας διάστασης του οξέος και έμμεσα μας δείχνει πόσο έχει διασταθεί. Απλουστευμένοι τύποι είναι στη διάθεσή μας για να κάνουμε τους υπολογισμούς μας:

$$pH = \frac{pK_a - \log[HA]}{2}$$

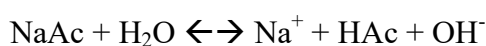
$$\text{pH} = \frac{4,76 - \log[0,02]}{2}$$

$$\text{pH} = 3,23$$

Η εξίσωση αυτή χρησιμοποιείται όταν έχουμε ως δεδομένη την ποσότητα ή τη συγκέντρωση του ασθενούς οξέος. Όπως αναφέρθηκε παραπάνω πρόκειται για απλουστευμένη μορφή της αρχικής εξίσωσης και «λειτουργεί» μόνο για συγκεντρώσεις μέχρι 0,1 M και τιμές pKa μεγαλύτερες ή ίσες του 3.

Διάλυμα ασθενούς βάσης μόνο

Τι θα συμβεί αν στο διάλυμα μας αντί για ασθενές οξύ υπάρχει η ίδια ποσότητα οξικού νατρίου (NaAc); Πρόκειται για μια ασθενή βάση που προκύπτει από το οξικό οξύ, επομένως ένα μέρος της θα αντιδράσει με το νερό:



Τι ποσοστό της βάσης θα αντιδράσει; Όπως και προηγουμένως αυτό προκύπτει έμμεσα από το pKa μέσω ενός άλλου απλουστευμένου τύπου:

$$\text{pH} = \frac{\text{pKa} + 14 + \log[\text{A}^-]}{2}$$

$$\text{pH} = \frac{4,76 + 14 + \log[0,02]}{2}$$

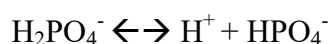
$$\text{pH} = 8,53$$

IV. ΠΟΛΥΠΡΩΤΙΚΑ ΟΞΕΑ

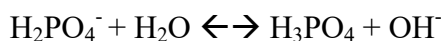
Η χρήση πολυπρωτικών οξέων, δηλαδή οξέων που μπορούν να δώσουν παραπάνω από ένα H^+ σε υδατικό διάλυμα, δημιουργεί επιπλέον επιπλοκές. Η αποδέσμευση κάθε H^+ έχει τη δική της σταθερά διάστασης. Όπως θα δείτε στον πίνακα του πειράματος το φωσφορικό και το κιτρικό οξύ έχουν παραπάνω από ένα pKa. Αυτό σημαίνει ότι είναι πολυπρωτικά οξέα. Όμως δεν υπάρχει λόγος ανησυχίας. Το καλό με τα συστήματα αυτά είναι ότι μας απασχολεί μόνο ένα pKa κάθε φορά. Για παράδειγμα, εάν στο διάλυμα υπάρχει μόνο H_3PO_4 , τότε έχουμε **διάλυμα ασθενούς**

οξέος μόνο και θα χρησιμοποιήσουμε την τιμή $K_a = 2,12$. Εάν στο διάλυμα υπάρχει μόνο Na_3PO_4 , τότε έχουμε **διάλυμα ασθενούς βάσης μόνο** και θα χρησιμοποιήσουμε την τιμή $K_a = 12,32$.

Δυστυχώς, υπάρχει άλλη μια πιθανότητα και ονομάζεται **ενδιάμεσο πολυπρωτικού οξέος**. Εάν προσθέσουμε $0,01 \text{ mol NaH}_2\text{PO}_4$ σε νερό, τι είδους διάλυμα θα προκύψει; Το μέρος της ένωσης που διαθέτει πρωτόνια είναι το H_2PO_4^- , όμως τι είναι; Θα μπορούσε να είναι οξύ σύμφωνα με την παρακάτω αντίδραση:



ή θα μπορούσε να είναι βάση σύμφωνα με την παρακάτω αντίδραση:

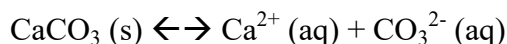


Όπως φαίνεται, όταν έχουμε ένα ενδιάμεσο πολυπρωτικού οξέος, το pH καθορίζεται αποκλειστικά από τα δυο pK_a και είναι ανεξάρτητο από τις συγκεντρώσεις στο διάλυμα. Το pH δίνεται από την παρακάτω σχέση:

$$\text{pH} = \frac{\text{p}K_{a1} + \text{p}K_{a2}}{2}$$

V. ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΚΟΙΝΟΥ ΙΟΝΤΟΣ – ΡΥΘΜΙΣΤΙΚΑ ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ

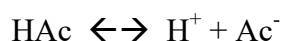
Όπως ήδη γνωρίζετε, μεταβάλλοντας κατάλληλα τη συγκέντρωση ενός από τα αντιδρώντα ή τα προϊόντα μιας χημικής αντίδρασης που βρίσκεται σε ισορροπία μπορεί να μετατοπιστεί το σημείο της χημικής ισορροπίας προς την επιθυμητή κατεύθυνση.



Προσθήκη του πολύ ευδιάλυτου άλατος χλωριούχο ασβέστιο (Ca^{2+}) στο διάλυμα επιφέρει αύξηση της συγκέντρωσης των ιόντων Ca^{2+} , και κατά συνέπεια, μετατοπίζει το σημείο της χημικής ισορροπίας προς τα αριστερά, σύμφωνα με την αρχή του Le Chatelier. Μετατόπιση όμως του σημείου ισορροπίας προς τα αριστερά, δηλαδή παρασκευή στερεού ανθρακικού ασβεστίου επιφέρει μείωση της συγκέντρωσης των ιόντων CO_3^{2-} . Επομένως, στο νέο σημείο χημικής ισορροπίας η συγκέντρωση των

ανθρακικών ιόντων θα είναι μικρότερη από αυτήν πριν την προσθήκη του CaCl₂. Τελικά, στο διάλυμα υπάρχουν δυο πηγές Ca²⁺: το εναπομείναν διαλυμένο CaCO₃ και το CaCl₂ που προστέθηκε. Επειδή το Ca²⁺ υπάρχει και στις δυο ενώσεις ονομάζεται **κοινό ιόν**. Η ελάττωση της διαλυτότητας του CaCO₃ ως αποτέλεσμα της προσθήκης επιπλέον Ca²⁺ (από το CaCl₂) ονομάζεται **επίδραση κοινού ιόντος**.

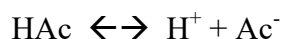
Παρόμοια επίδραση έχει η προσθήκη κοινού ιόντος σε διάλυμα ενός ασθενούς οξέος ή μιας ασθενούς βάσης. Για παράδειγμα, ένα διάλυμα HAc βρίσκεται σε ισορροπία με τα ιόντα του σύμφωνα με την εξίσωση



Εάν προστεθεί ποσότητα του ισχυρού ηλεκτρολύτη οξικό νάτριο (NaAc), τότε εξαιτίας της αύξησης της συγκέντρωσης του κοινού ιόντος Ac⁻, το σημείο της χημικής ισορροπίας μετατοπίζεται προς τα αριστερά, και η διάσταση του οξικού οξέος περιορίζεται ακόμα περισσότερο. Είναι φανερό ότι η συγκέντρωση των ιόντων υδρογόνου ή των ιόντων υδροξυλίου σε διαλύματα ασθενών οξέων ή βάσεων, αντίστοιχα, μπορεί να ελεγχθεί με προσθήκη άλατος που περιέχει κοινό ιόν με το ασθενές οξύ ή την ασθενή βάση. Αυτός είναι ο τρόπος λειτουργίας των **ρυθμιστικών διαλυμάτων**.

Ρυθμιστικά ονομάζονται τα διαλύματα που έχουν την ικανότητα να διατηρούν την συγκέντρωση των ιόντων H⁺ ή OH⁻ σταθερή κατά την προσθήκη μικρών ποσοτήτων οξέων ή βάσεων σε αυτά. Αποτελούνται από διάλυμα ενός ασθενούς οξέος ή μιας ασθενούς βάσης και ενός άλατος του οξέος ή της βάσης, αντίστοιχα. Στο διάλυμα δηλαδή περιέχονται ένα ασθενές οξύ και η συζυγής του βάση ή μια ασθενής βάση και το συζυγές της οξύ.

Για παράδειγμα, ας θεωρηθεί το ρυθμιστικό διάλυμα που αποτελείται από HAc, και NaAc. Ένα μέρος του HAc θα διασπαστεί μέσω της εξίσωσης



και παρόμοια θα είναι και η κατάσταση για το NaAc:



Η εξίσωση Henderson-Hasselbalch μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό του pH ενός ρυθμιστικού διαλύματος όπως το παραπάνω:

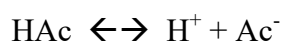
$$\text{pH} = \text{pK}_a + \log \left(\frac{A^-}{\text{HA}} \right)$$

Επομένως, εάν προσθέσουμε 0,001 mol HAc σε 0,002 mol NaAc και συμπληρώσουμε με νερό μέχρι τα 100 ml, το pH του διαλύματος προσδιορίζεται ως εξής:

$$\text{pH} = \text{pK}_a + \log \left(\frac{0,02}{0,01} \right)$$

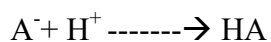
$$\text{pH} = 5,06$$

Ίσως να προσέξατε ότι και στις τρεις περιπτώσεις διαλυμάτων που εξετάσαμε, χρησιμοποιήσαμε το ίδιο pKa. Αυτό έγινε επειδή το pKa είναι στην πραγματικότητα μια σταθερά για την αντίδραση αντί να χαρακτηρίζει κάθε μέλος χωριστά. Σε όλες τις περιπτώσεις είχαμε να κάνουμε με οξικό οξύ και οξικό ανιόν του. Το pKa με τιμή 4,76 είναι το pKa της αντίδρασης:



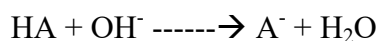
Γιατί ένα ρυθμιστικό διάλυμα είναιρυθμιστικό;

Τα ρυθμιστικά διαλύματα αντιστέκονται στην αλλαγή της τιμής του pH τους γιατί μπορούν να εξουδετερώσουν τα επιπλέον H^+ ή OH^- που προστίθενται σε αυτά. Εάν έχουμε ένα διάλυμα που περιέχει ένα ασθενές οξύ και το αλάτι του (συζυγής βάση), και προσθέσουμε μια ποσότητα H^+ τότε πραγματοποιείται η παρακάτω αντίδραση:



Όπως βλέπετε, η ισορροπία μετατοπίζεται προς τη δημιουργία επιπλέον μορίων ασθενούς οξέος που έτσι κι αλλιώς έχει μικρό βαθμό διάστασης.

Ανάλογα, αν προσθέσουμε OH^- , τότε:



Τα ανιόντα υδροξυλίου δεσμεύονται στη μορφή των μορίων νερού τα οποία είναι πρακτικά αδιάστατα.

Από τα παραπάνω προκύπτει πως για να είναι ικανό ένα ρυθμιστικό διάλυμα να αντιστέκεται σε αλλαγές του pH κατά την προσθήκη τόσο οξέων όσο και βάσεων, οι συγκεντρώσεις του συζυγούς ζεύγους οξέος – βάσης πρέπει να είναι παρόμοιες.

Ρυθμιστική χωρητικότητα ενός ρυθμιστικού διαλύματος ονομάζεται η τελική συγκέντρωση ενός ισχυρού οξέος ή μιας ισχυρής βάσης η οποία προστίθεται σε αυτό το διάλυμα ώστε να μεταβληθεί η τιμή του pH κατά μια μονάδα. Η ρυθμιστική χωρητικότητα είναι μέτρο της αποτελεσματικότητας ενός ρυθμιστικού διαλύματος και εξαρτάται από τις ποσότητες του συζυγούς ζεύγους οξέος – βάσης που χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή του.

VI. ΕΠΙΛΟΓΗ ΡΥΘΜΙΣΤΙΚΟΥ ΔΙΑΛΥΜΑΤΟΣ

Όλες οι βιοχημικές μελέτες πρέπει να πραγματοποιούνται σε υδατικά διαλύματα που ρυθμίζονται επειδή το φυσικό περιβάλλον των βιομορίων και των οργανιδίων του κυττάρου υφίσταται αυστηρή ρύθμιση του pH. Όταν τα διάφορα συστατικά του κυττάρου απομακρύνονται από το φυσικό τους περιβάλλον, είναι σταθερά μόνο κάτω από συνθήκες που πλησιάζουν το αρχικό τους pH, συνήθως μεταξύ 6 και 8. Ένα τεχνητό σύστημα ρύθμισης είναι το καλύτερο υποκατάστατο για το φυσικό περιβάλλον του κυττάρου. Επιπλέον, κάποιες ενζυμικές διεργασίες παράγουν ή καταναλώνουν ιόντα υδρογόνου οπότε το κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα εξουδετερώνει τις αλλαγές αυτές διατηρώντας ένα σταθερό χημικό περιβάλλον.

Παρόλο που τα περισσότερα βιοχημικά συστήματα απαιτούν συστήματα ρύθμισης pH αποτελεσματικά σε εύρος 6 με 8, παρουσιάζεται περιστασιακά η ανάγκη για ρύθμιση σε εύρος από 2 έως 12. Προφανώς δεν είναι δυνατόν, ένα και μοναδικό ζεύγος συζυγούς οξέος – βάσης να είναι αποτελεσματικό σε όλο αυτό το εύρος, αλλά αντίθετα υπάρχουν αρκετά ρυθμιστικά συστήματα που είναι αποτελεσματικά σε τμήματα του παραπάνω εύρους. Η Εικόνα 1 συγκρίνει το εύρος δράσης στα πιο συνηθισμένα ρυθμιστικά βιολογικών συστημάτων. Όπως θα θυμάστε από παραπάνω ορισμένα ρυθμιστικά συστήματα (φωσφορικά, κιτρικά κ.τ.λ.) έχουν περισσότερα από ένα pKa και μπορούν να χρησιμοποιηθούν για παραπάνω από μία περιοχές pH.

Το ρυθμιστικό σύστημα των φωσφορικών είναι ίσως αυτό που χρησιμοποιείται περισσότερο. Έχει υψηλή ρυθμιστική ικανότητα και είναι πολύ αποτελεσματικό σε pH 6,5 έως 7,5. Επιπλέον, τα φωσφορικά είναι φυσικό συστατικό των κυττάρων και των βιολογικών υγρών και η παρουσία τους δημιουργεί περιβάλλον πιο κοντά στο φυσικό, στα *in vitro* συστήματα. Διαλύματα φωσφορικού K ή Na σε όλες τις δυνατές συγκεντρώσεις είναι πολύ εύκολο να παρασκευαστούν. Όμως παρουσιάζουν και αξιοσημείωτα μειονεκτήματα:

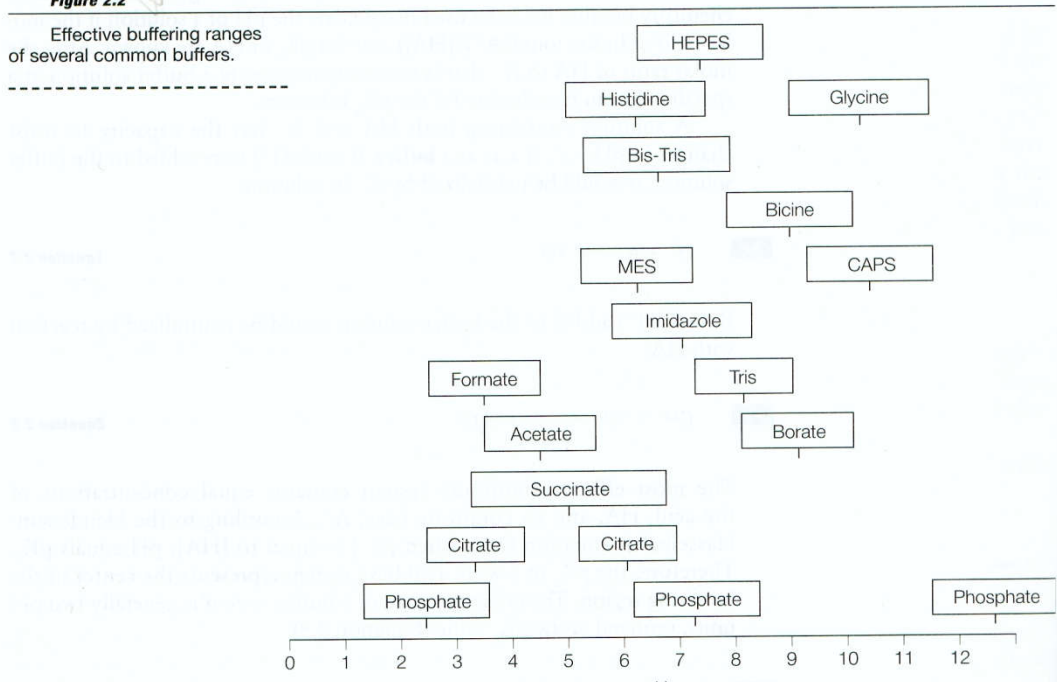
- (1) Κατακρημνίζουν ή δεσμεύουν συνηθισμένα βιολογικά κατιόντα (Ca^{2+} , Mg^{2+}),
- (2) Παρεμποδίζουν κάποιες βιολογικές διεργασίες, μεταξύ των οποίων και ένζυμα και
- (3) Το “χρήσιμο” εύρος pH που ρυθμίζουν αποτελεσματικά είναι περιορισμένο.

ΠΙΝΑΚΑΣ 1. Ιδιότητες ουσιών που χρησιμοποιούνται σε Ρυθμιστικά Διαλύματα

Compound	MW	pK _a at 20°C	ΔpK _a /°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 ₂ HPO ₄)	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

Figure 2.2

Effective buffering ranges of several common buffers.



ΕΙΚΟΝΑ 1. Αποτελεσματικό εύρος ρύθμισης pH για τα πιο συνηθισμένα ρυθμιστικά διαλύματα

Τα ρυθμιστικά διαλύματα του Good





Στα μέσα της δεκαετίας του '60, ο N. E. Good και οι συνεργάτες του, αναγνωρίζοντας την ανάγκη για ρυθμιστικά διαλύματα ειδικά σχεδιασμένα για βιολογικά συστήματα, μελέτησαν ένα μεγάλο αριθμό από επαμφοτερίζοντα, συνθετικά ρυθμιστικά και κατέληξαν σε κάποια που πληρούσαν τα παρακάτω κριτήρια:

1. pKa μεταξύ 6 και 8
2. Ευδιάλυτα σε υδατικά συστήματα
3. Ελάχιστη έως μηδενική διαπερατότητα στις βιολογικές μεμβράνες
4. Τυχόν σύμπλοκα ρυθμιστικού – μεταλλικών ιόντων ανύπαρκτα ή πολύ ευδιάλυτα
5. Σταθερά όσον αφορά τη χημική τους σύσταση
6. Ελάχιστη έως καθόλου απορρόφηση στις περιοχές υπεριώδους-ορατού
7. Άμεσα διαθέσιμα σε καθαρή μορφή.

Τα πιο συνηθισμένα από αυτά τα ρυθμιστικά καθώς και τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά τους αναγράφονται στον Πίνακα 2. Χρησιμοποιούνται ευρύτατα παρόλο που το κόστος τους είναι σχετικά υψηλό.

Από την παραπάνω ομάδα, το ρυθμιστικό Tris [tris (hydroxymethyl) aminomethane] χρησιμοποιείται πλέον περισσότερο από τα φωσφορικά και είναι αποτελεσματικό σε εύρος 7,5 έως 8,5. Είναι διαθέσιμο σε μορφή κρυστάλλων εξαιρετικής καθαρότητας σε βασική μορφή. Για παράδειγμα, αν θέλουμε να παρασκευάσουμε ένα 1 L διάλυμα Tris 0,1 M, ζυγίζουμε 12,11 gr Tris base (0,1 mol) και τα διαλύουμε σε 950 με 975 ml απιονισμένο νερό. Το pH ρυθμίζεται με προσθήκη οξέος (πυκνό HCl, εάν θέλουμε Tris-HCl), υπό ανάδευση, μέχρι να φτάσουμε την τιμή που θέλουμε. Στη συνέχεια συμπληρώνουμε με νερό μέχρι το 1 L και ελέγχουμε το pH ξανά.

ΠΙΝΑΚΑΣ 2. Δομές και ιδιότητες διάφορων αμφιπρωτικών ουσιών που χρησιμοποιούνται ως ρυθμιστικά

Buffer Name	Abbreviation	Structure (All structures shown in salt form)	pK _a (20°C)	Useful pH Range	ΔpK _a /C°	Concentration 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-Acetamidoinodiacetic acid	ADA	$\text{H}_2\text{NCOCH}_2\text{N}^+\begin{matrix} \text{CH}_2\text{COO}^- \\ \text{CH}_2\text{COO}^- \end{matrix}$	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	$(\text{HOCH}_2\text{CH}_2)_2\text{N}^+\text{HCH}_2\text{COO}^-$	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	$\text{HO}(\text{CH}_2)_2\text{N}^+\begin{matrix} \text{CH}_2\text{CH}_2\text{SO}_3^- \\ \text{CH}_2\text{CH}_2\text{SO}_3^- \end{matrix}$	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	$^- \text{O}_3\text{SCH}_2\text{CH}_2\text{N}^+\begin{matrix} \text{CH}_2\text{CH}_2\text{SO}_3^- \\ \text{CH}_2\text{CH}_2\text{SO}_3^- \end{matrix}$	6.8	6.4–7.2	–0.0085	—
<i>N</i> -Tris(hydroxymethyl)methyl-2-aminoethanesulfonic acid	TES	$(\text{HOCH}_2)_3\text{N}^+\text{HCH}_2\text{CH}_2\text{SO}_3^-$	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	$(\text{HOCH}_2)_3\text{CNH}_3^+$	8.3	7.5–9.0	–0.031	2.4

Ρυθμιστικά Καρβοξυλικού Οξέος

Τα πιο συνηθισμένα ρυθμιστικά συστήματα της κατηγορίας αυτής παρασκευάζονται με οξικό, φορμικό, κιτρικό και ηλεκτρικό (succinate) οξύ. Η ομάδα αυτή καλύπτει ένα εύρος pH 3 έως 6, μια περιοχή στην οποία δεν υπάρχουν έτσι κι αλλιώς πολλές επιλογές. Όλα αυτά τα οξέα είναι φυσικοί μεταβολίτες, επομένως πιθανόν να επιδρούν στις υπό μελέτη βιολογικές διεργασίες και να δεσμεύουν μεταλλικά κατιόντα.

Ρυθμιστικά Βορικού Οξέος

Τα ρυθμιστικά αυτά είναι αποτελεσματικά σε εύρος pH 8,5 έως 10. Το κυριότερο μειονέκτημα του βορικού είναι ότι σχηματίζει σύμπλοκα με πολλούς μεταβολίτες, κυρίως υδατάνθρακες.

Ρυθμιστικά Αμινοξέων

Τα πιο συνηθισμένα αμινοξέα για την παρασκευή ρυθμιστικών διαλυμάτων είναι η γλυκίνη (pH 2 έως 3 και 9,5 με 10,5) και η ιστιδίνη (pH 5,5 με 6,5). Αυτά παρέχουν ένα περισσότερο “φυσικό” περιβάλλον για τα κυτταρικά συστατικά και εκχυλίσματα, εν τούτοις και αυτά ενδέχεται να παρεμβαίνουν σε κάποιες βιολογικές διεργασίες όπως οι παραπάνω κατηγορίες.

Επομένως, για να επιλέξουμε το πιο αποτελεσματικό ρυθμιστικό διάλυμα για το πείραμά μας πρέπει να έχουμε υπόψη μας τα εξής:

1. **Για να έχουμε ρυθμιστικό διάλυμα είναι απαραίτητη η ταυτόχρονη παρουσία HA και A⁻.** Μόλις καταναλωθεί το ένα από αυτά τα συστατικά, αυτόματα παύει η ρύθμιση. Αυτό σημαίνει ότι η συγκέντρωση του ρυθμιστικού είναι μια παράμετρος που πρέπει να μας απασχολήσει, ιδιαίτερα αν το αντιδραστήριο είναι ακριβό. Εάν στο παρασκεύασμα η συγκέντρωση του ρυθμιστικού είναι 0,1M, τότε μπορούμε να προσθέσουμε πολύ περισσότερη ποσότητα οξέος ή βάσης πριν η ρύθμιση ανασταλεί, σε σύγκριση με την περίπτωση που το ρυθμιστικό μας θα είχε συγκέντρωση μόλις 0,001M.
2. **Η μέγιστη ικανότητα ρύθμισης πραγματοποιείται σε pH ίσο (ή πολύ κοντά) στο pKa του ρυθμιστικού.** Όταν το pH ταυτίζεται με το pKa, υπάρχουν ίσες ποσότητες του οξέος και της συζυγούς του βάσης στο διάλυμα. Οπότε υπάρχουν ίσες “δυνατότητες” ρύθμισης είτε προστεθεί επιπλέον οξύ, είτε βάση.
3. **Υπάρχει ένα εύρος αποτελεσματικότητας για ένα ρυθμιστικό.** Σε περίπτωση που δεν υπάρχει ή δεν είναι διαθέσιμο ένα ρυθμιστικό με pKa ίδιο

με το pH που θέλετε πρέπει να συμβιβαστείτε. Πόσο όμως μπορείτε να αποκλίνετε από το pKa και παρόλα αυτά να έχετε ρύθμιση; Εάν ο λόγος HA προς A⁻ είναι 10, τότε τα μόρια της ρυθμιστικής ουσίας είναι 91% * στη μορφή του οξέος και 9% * στη μορφή της συζυγούς βάσης. Αυτό συμβαίνει όταν το pH που θέλετε να ρυθμίσετε είναι μια μονάδα χαμηλότερο από το pKa του ρυθμιστικού. Λογικά, εφόσον δεν έχει απομείνει και πολύ βάση, η ρύθμιση ενάντια σε προσθήκη οξέος δεν θα είναι ικανοποιητική. Ανάλογα, εάν ο λόγος HA προς A⁻ είναι 0,1, τότε τα μόρια της ρυθμιστικής ουσίας είναι 91% * στη βασική μορφή και 9% * στην όξινη μορφή. Αυτό συμβαίνει όταν το pH που θέλετε να ρυθμίσετε είναι μια μονάδα υψηλότερο από το pKa του ρυθμιστικού. Λογικά, εφόσον δεν έχει απομείνει πολύ οξύ, η ρύθμιση ενάντια σε προσθήκη βάσης δεν θα είναι ικανοποιητική. Γενικά δεχόμαστε ότι ένα ρυθμιστικό είναι λειτουργικό σε τιμές pH ίσες με pKa \pm 1, αλλά όσο πιο κοντά είναι η τιμή του pH σε αυτή του pKa, τόσο καλύτερα.

VII. ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑΣ ΣΤΑ ΡΥΘΜΙΣΤΙΚΑ ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ

Τα ρυθμιστικά διαλύματα έχουν βέλτιστη απόδοση όταν παρασκευάζονται στη θερμοκρασία που πρόκειται να χρησιμοποιηθούν. Οι πίνακες 1 και 2 δείχνουν την μεταβολή του pKa σε συνάρτηση με τη θερμοκρασία για κάποια ρυθμιστικά διαλύματα, και όπως φαίνεται άλλα επηρεάζονται περισσότερο και άλλα λιγότερο. Εάν για παράδειγμα αυξήσουμε τη θερμοκρασία του HEPES κατά ένα βαθμό Κελσίου, το pH θα ελαττωθεί κατά 0,014 (προσοχή στο πρόσημο!).

VIII. ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ ΣΤΑ ΡΥΘΜΙΣΤΙΚΑ ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ

Τα ρυθμιστικά διαλύματα έχουν βέλτιστη απόδοση όταν παρασκευάζονται εξ αρχής στη συγκέντρωση που συστήνεται ως επαρκής από την εταιρεία παρασκευής τους (ή τη βιβλιογραφία). Παρόλα αυτά σε πολλά ερευνητικά κυρίως εργαστήρια τα ρυθμιστικά διαλύματα παρασκευάζονται συμπυκνωμένα για εξοικονόμηση χρόνου και χώρου. Τα διαλύματα αυτά αραιώνονται στη συνέχεια, στην κατάλληλη συγκέντρωση, λίγο πριν χρησιμοποιηθούν. Για παράδειγμα, πολύ συχνά θα δείτε μπουκάλια με την επιγραφή 10X TAE. Αυτό σημαίνει ότι το διάλυμα είναι TAE ρυθμιστικό (TRIS, Acetate, EDTA) και πρέπει να αραιωθεί σε αναλογία 10 προς 1 πριν χρησιμοποιηθεί. Μέχρι τώρα έχουμε ασχοληθεί με συγκεντρώσεις και όχι με ενεργότητες. Στην πραγματικότητα το pH εξαρτάται από την ενεργότητα, α, η οποία

με τη σειρά της καθορίζεται από την συγκέντρωση, M, και το συντελεστή ενεργότητας, γ . Οι συντελεστές ενεργότητας όμως επηρεάζονται από τις αλλαγές στη συγκέντρωση. Όσο περισσότερα φορτία διαθέτει μια ουσία, τόσο μεγαλύτερη θα είναι η διαφοροποίηση που προκαλείται από την αλλαγή στη συγκέντρωση της ουσίας. Συγκεκριμένα, για ένα ασθενές οξύ θα έχουμε:

$$K_{HA} = \frac{\gamma_{H^+} \gamma_{A^-} [H^+] [A^-]}{\gamma_{HA} [HA]}$$

Επομένως, τα K_a και pK_a θα μεταβάλλονται όταν αλλάζει η συγκέντρωση παρόλο που ο λόγος φαίνεται ότι παραμένει ο ίδιος. Στον πίνακα που ακολουθεί σημειώνονται μερικές τυπικές αλλαγές:

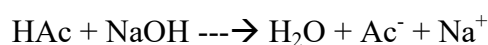
ΠΙΝΑΚΑΣ 3. Συντελεστές ενεργότητας σε διαφορετικές συγκεντρώσεις

Ιόντα	0,001 M	0,01 M	0,1 M
H ⁺	0,98	0,93	0,86
OH ⁻	0,98	0,93	0,81
acetate	0,98	0,93	0,82
H ₂ PO ₄ ⁻	0,98	0,93	0,74
HPO ₄ ²⁻	0,90	0,74	0,45
PO ₄ ³⁻	0,80	0,51	0,16

Οι συνέπειες που έχει η εξάρτηση αυτή στο pH ενός ρυθμιστικού διαλύματος είναι μάλλον περίπλοκη υπόθεση. Σε κάποια ρυθμιστικά το pH αυξάνεται μετά την αραίωση, σε άλλα μειώνεται. Επαμφοτερίζοντα ρυθμιστικά όπως το HEPES, δεν παρουσιάζουν αξιοσημείωτες αλλαγές σε αντίθεση με τα ρυθμιστικά φωσφορικού ή κιτρικού οξέος.

ΙΧ. ΠΩΣ ΠΑΡΑΣΚΕΥΑΖΟΥΜΕ ΡΥΘΜΙΣΤΙΚΑ ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ;

Δεν είναι απαραίτητο να προσθέσουμε HA και A⁻ ταυτόχρονα για να φτιάξουμε ρυθμιστικό διάλυμα. Ο πιο απλός τρόπος είναι να τιτλοδοτήσουμε το HA με μια ισχυρή βάση ή το A⁻ με ένα ισχυρό οξύ. Εάν ξεκινήσουμε με ένα ασθενές οξύ όπως το οξικό και προσθέσουμε ισχυρή βάση, π.χ. NaOH, τότε το σύστημα παράγει και A⁻:



Η παραπάνω εξίσωση δεν εκφράζει την περίπτωση ‘ασθενές οξύ μόνο’. Μια ισχυρή βάση πάντα επιβάλλεται σε ένα ασθενές οξύ. Για κάθε μόριο NaOH που προστίθεται στο διάλυμα, ένα μόριο HA μετατρέπεται σε A⁻.

Μπορούμε να χρησιμοποιήσουμε την εξίσωση Henderson-Hasselbalch για να βρούμε την αναλογία HA/A⁻ που απαιτείται για να παρασκευάσουμε ένα ρυθμιστικό σε συγκεκριμένο pH, εάν δεν υπάρχει διαθέσιμο pHμετρο. Συνήθως όμως κάπου θα βρίσκεται ένα pHμετρο, οπότε τα πράγματα απλοποιούνται. Εξάλλου εφόσον έχουμε την σωστή αναλογία HA/A⁻ δεν έχει σημασία με ποιο τρόπο την παρασκευάσαμε.

Επομένως, εάν θέλουμε ένα ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών με συγκέντρωση 0,1 M και pH 6, αντί να υπολογίσουμε τους λόγους των H₂PO₄⁴⁻ και HPO₄²⁻ που θα πρέπει να προσθέσουμε, μπορούμε να ξεκινήσουμε με συγκεκριμένη ποσότητα H₂PO₄⁴⁻ και να προσθέσουμε NaOH μέχρι να έχουμε το σωστό pH. Πρέπει όμως να προσέξουμε την συγκέντρωση. Στο παραπάνω παράδειγμα, αν θέλουμε π.χ. 100 ml ρυθμιστικού, τότε θα μπορούσαμε να παρασκευάσουμε 50 ml, 0,2 M Na H₂PO₄, να ρυθμίσουμε το pH στο 6 με NaOH, και στη συνέχεια, να συμπληρώσουμε με απιονισμένο νερό μέχρι τα 100 ml.

*ΜΕΤΑΤΡΟΠΗ ΛΟΓΩΝ ΣΕ ΠΟΣΟΣΤΑ %

Εάν έπειτα από χρήση της εξίσωσης Henderson-Hasselbalch (H-H) υπολογίσατε τον λόγο A⁻/HA και τον βρήκατε 1, τότε είναι φανερό ότι το ρυθμιστικό σας θα αποτελείται από 50% A⁻ και 50% HA. Δηλαδή εάν έχετε συνολικά 0.02 mol ρυθμιστικού, 0,01 mol θα είναι στη μορφή HA και 0,01 mol στη μορφή A⁻.

Τι γίνεται όμως όταν ο λόγος δεν είναι τόσο ξεκάθαρος; Έστω ότι από την εξίσωση προκύπτει ο λόγος 2. Αυτό σημαίνει πως για κάθε HA έχουμε 2 A⁻. Οπότε έχουμε ποσοστό 66% για το A⁻ και 33% για το HA. Όποτε έχετε ένα λόγο, όπως 2/1, υπάρχουν συνολικά 3 μέρη στο σύστημα. Ο αριθμητής είναι 2/3 και ο παρανομαστής 1/3. Για να βρείτε τα ποσοστά % , διαιρείτε τον αριθμητή ή τον παρανομαστή με το ολόκληρο.

Εάν η εξίσωση H-H σας δίνει λόγο 4, αυτό σημαίνει ότι A⁻/HA είναι 4/1. Υπάρχουν 5 μέρη στο ολόκληρο, άρα το A⁻ είναι 4/5, δηλαδή 80%.

Πείραμα 0: Παρασκευή ρυθμιστικών διαλυμάτων

Σκοπός του πειράματος είναι να μάθετε πώς να επιλέγετε το κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα και πώς να το παρασκευάζετε σωστά. Στη συνέχεια, θα διαπιστώσετε πως ανταποκρίνεται το pH του ρυθμιστικού στην αραίωση και θα συγκρίνετε τα αποτελέσματα της προσθήκης οξέων και βάσεων σε συστήματα με ή χωρίς ρύθμιση.

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΣΥΣΚΕΥΕΣ

Αντιδραστήρια ρυθμιστικών διαλυμάτων σε στερεή μορφή

Πρότυπα διαλύματα σε pH 4, 7 και 10

NaOH, 1 M

HCl, 1M

pHμετρα

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

- Παρασκευή ρυθμιστικών διαλυμάτων

Στο πρώτο αυτό μέρος του πειράματος θα παρασκευάσετε ένα ρυθμιστικό διάλυμα ξεκινώντας από το αντίστοιχο στερεό αντιδραστήριο. Αυτός είναι και ο πιο συνηθισμένος τρόπος παραγωγής ρυθμιστικών. Θα σας δοθεί το επιθυμητό pH και εσείς πρέπει να αποφασίσετε πιο αντιδραστήριο θα χρησιμοποιήσετε για να φτιάξετε 100 ml ρυθμιστικό διάλυμα με συγκέντρωση 0,1 M.

1. Με τη βοήθεια του παρακάτω πίνακα διαλέξτε το πιο κατάλληλο αντιδραστήριο ανάλογα με το pH σας:

Αντιδραστήριο	pKa ₁	pKa ₂	pKa ₃
Acetate	4,76		
Bis-Tris			
Citrate	3,06	4,74	5,40
Phosphate	2,12	7,21	12,32
Tricine	8,15		
TRIZMA base	8,3		

2. Υπολογίστε το βάρος του στερεού που απαιτείται για να παρασκευάσετε 100 ml ρυθμιστικό διάλυμα με συγκέντρωση 0,1 M. Ζυγίστε τη σωστή ποσότητα στερεού και διαλύστε την σε περίπου 80 ml απιονισμένο νερό.
3. Σιγουρευτείτε ότι το pHμετρό σας δουλεύει σωστά, κάνοντας του βαθμονόμηση (calibration) με πρότυπα ρυθμιστικά διαλύματα (pH standards) τουλάχιστον σε 2 τιμές pH, μια χαμηλότερη και μια υψηλότερη του pH που θέλετε να μετρήσετε. Τοποθετήστε το πρότυπο ρυθμιστικό σε μικρό ποτήρι ζέσεως ή σωλήνα τύπου FALCON και τοποθετήστε το πάνω σε αναδευτήρα. Κατά τη διάρκεια οποιασδήποτε μέτρησης ή ρύθμισης pH το διάλυμα πρέπει να αναδεύεται συνεχώς με ήπιο τρόπο (προσοχή μην χτυπήσει ο μαγνήτης στο ηλεκτρόδιο!). Αν δεν υπάρχει αναδευτήρας διαθέσιμος, στριφογυρίζετε τακτικά το ποτήρι/δοχείο κατά τη διάρκεια της προσθήκης οξέος ή βάσης.
4. Ρυθμίστε το pHμετρό σας με τα πρότυπα διαλύματα που έχετε επιλέξει, ακολουθώντας της οδηγίες της εταιρίας κατασκευής του οργάνου.
5. Στη συνέχεια, τοποθετήστε το ποτήρι ζέσεως με το διάλυμα σας πάνω στον αναδευτήρα. Χρησιμοποιήστε 1 M NaOH ή HCl για να το τιτλοδοτήσετε στο επιθυμητό pH. Η προσθήκη του οξέος ή της βάσης πρέπει να γίνεται σταγόνα–σταγόνα. Με τον τρόπο αυτό, μετατρέπετε σταδιακά ένα μέρος του ασθενούς οξέος στη συζυγή του βάση ή αντίστροφα μέχρι να φτάσετε στην αναλογία που θα αντιστοιχεί στο επιθυμητό pH.
6. Προσθέστε νερό μέχρι ο όγκος του διαλύματος να είναι περίπου 99 ml.
7. Ελέγξτε ξανά το pH. Εάν έχει μεταβληθεί μπορείτε να το διορθώσετε με προσθήκη οξέος ή βάσης. **ΠΡΟΣΟΧΗ!** Ίσως θα πρέπει να χρησιμοποιήσετε αραιότερο διάλυμα οξέος ή βάσης σε σχέση με πριν.
8. Ρυθμίστε τον όγκο στα 100 ml, μεταφέρετε το διάλυμα σε μπουκάλι και σημειώστε τα στοιχεία του στην ετικέτα (όνομα αντιδραστηρίου, συγκέντρωση, pH, ημερομηνία παρασκευής, παρασκευαστής).

-Επίδραση της συγκέντρωσης στο pH

1. Μεταφέρετε 10 ml από το ρυθμιστικό σας διάλυμα σε ένα ποτήρι ζέσεως και αραιώστε το μέχρι η συγκέντρωση να γίνει 0,01 M.
2. Πάρτε 10 ml από το αραιωμένο διάλυμα (στάδιο 1) και αραιώστε το μέχρι η συγκέντρωση να γίνει 0,001 M.

3. Μετρήστε το pH των αραιωμένων διαλυμάτων και συγκρίνετε τις τιμές με αυτή του πυκνού.

-Ρυθμιστικά διαλύματα: Αξίζει τον κόπο τελικά:

1. Τοποθετήστε 50 ml από το αρχικό σας ρυθμιστικό (0,1 M) σε ποτήρι ζέσεως. Εάν το ρυθμιστικό σας έχει pH υψηλότερο από το pKa, προσθέστε 0,5 ml από 1 M HCl. Εάν το ρυθμιστικό σας έχει pH χαμηλότερο από το pKa, προσθέστε 0,5 ml από 1 M NaOH σε αυτό (γιατί πρέπει να λάβετε υπόψη σας τις τιμές pH και pKa;). Σημειώστε το pH που προκύπτει.
2. Επαναλάβετε την παραπάνω διαδικασία χρησιμοποιώντας 50 ml νερό αντί ρυθμιστικού διαλύματος. Σημειώστε το pH πριν και μετά την προσθήκη.
3. Συγκρίνετε τα αποτελέσματα και σχολιάστε.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- N. Λυδάκης-Σημαντήρης, **Γενική Χημεία & Ενόργανη Ανάλυση-Θέματα και Εργαστηριακές Ασκήσεις**, Εκδόσεις Τζιόλα, 2007.
- R. F. Boyer, **Modern Experimental Biochemistry**, Addison-Wesley, 1993.
- P. A. Ciullo, **Bicarb: Buffers, Bubbles, Biscuits, and Earthburbs**, Maradia Press, 1997.
- R. Cecil Jack, **Basic Biochemical Laboratory Procedures and Computing**, Oxford University Press, 1997.
- C. Mohan, **Buffers: A Guide for the Preparation and Use of Buffers in Biological Systems**, Calbiochem Co., 1995.
- J. F. Robyt and B. J. White, **Biochemical Techniques**, Waveland Press, 1990.
- I. H. Segel, **Biochemical Calculations**, 2nd ed. Wiley Interscience, 1976.
- J. Stenesh, **Experimental Biochemistry**, Allyn and Bacon, 1984.