

pH e soluzioni tampone



Corso di Laboratorio di chimica e biochimica

STB

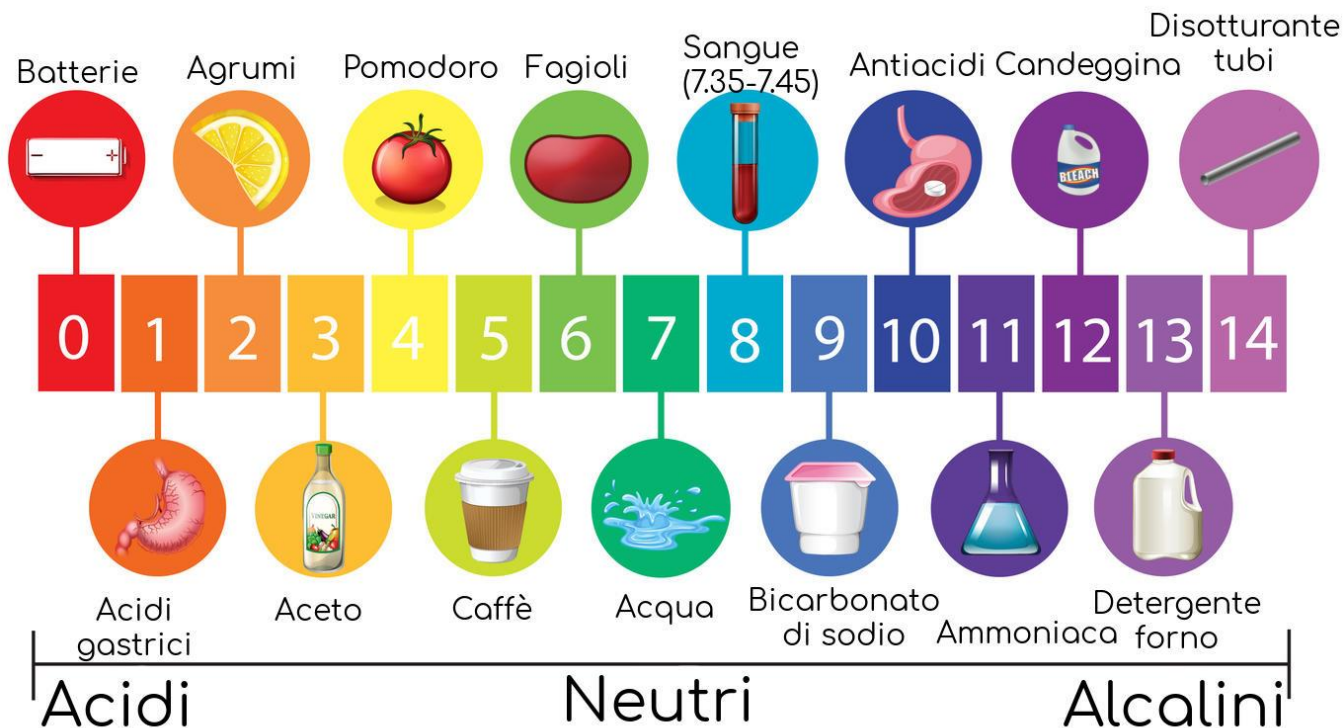
a.a. 2019/2020

Modulo 1: Docente F.Guida

milenaguida@gmail.com

La scala del pH

Valori indicativi





pH =7

DA DOVE DERIVA?????



$$K_c = \frac{[\text{H}_3\text{O}^+][\text{OH}^-]}{[\text{H}_2\text{O}]^2} = 3,264 \times 10^{-18}$$

In soluzioni diluite c'è una ridotta tendenza dell'acqua alla dissociazione (solo 1 molecola ogni 555.000.000 molecole). Quindi $[\text{H}_2\text{O}]$ viene considerata costante. In 1 L a 25°C ci saranno $1000/18=55,5$ moli , quindi $[\text{H}_2\text{O}] = 55,5\text{M}$

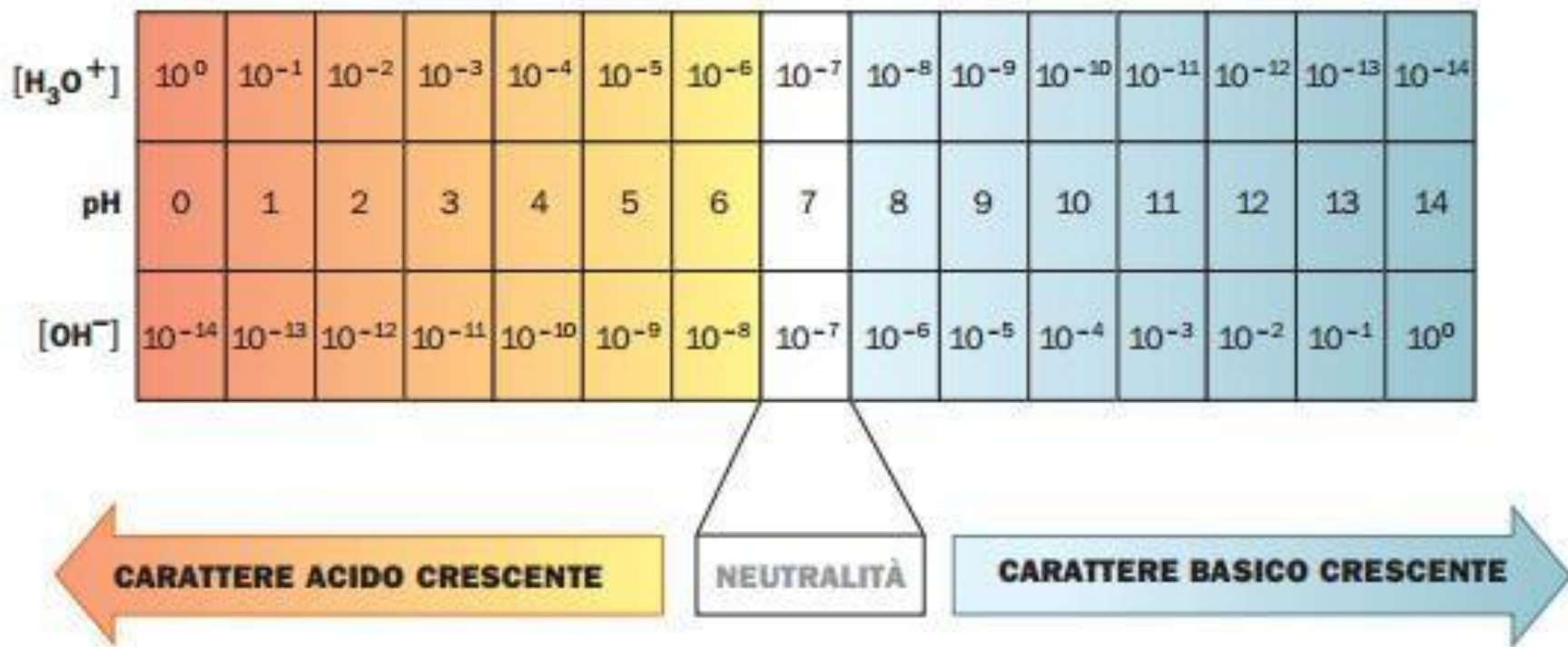
$$K_w = K_c \times [\text{H}_2\text{O}]^2 = [\text{H}_3\text{O}^+] \times [\text{OH}^-] =$$

$$K_w = 3,264 \times 10^{-18} \times (55,5)^2 = 10^{-14} \text{ M}^2$$

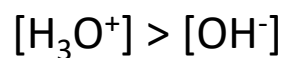
$$[\text{H}_3\text{O}^+] = [\text{OH}^-] = \sqrt{10^{-14}} = 10^{-7} \text{ M}$$

$$\text{pH} = -\text{Log} [\text{H}_3\text{O}^+] = -\text{Log} 10^{-7} = 7$$

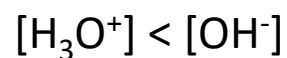
Kw= costante di auto-ionizzazione dell'acqua o prodotto ionico dell'acqua



Una soluzione è ACIDA quando
 $[H_3O^+] > 10^{-7} \text{ M}$ e il pH < 7



Una soluzione è BASICA quando
 $[H_3O^+] < 10^{-7} \text{ M}$ e il pH > 7



$$pK_w = pH + pOH = 14$$

$$pH = 14 - pOH$$

Consideriamo un generico acido HA, in acqua si dissocia :



$$K_a = \frac{[\text{A}^-][\text{H}_3\text{O}^+]}{[\text{HA}]} =$$

K_a viene chiamata **costante di dissociazione acida**

Consideriamo un generica Base B, in acqua si dissocia :



$$K_b = \frac{[\text{BH}^+] [\text{OH}^-]}{[\text{B}]} =$$

K_b viene chiamata **costante di dissociazione basica**

La FORZA relativa di un ACIDO



$$K_a = \frac{[\text{CH}_3\text{COO}^-][\text{H}_3\text{O}^+]}{[\text{CH}_3\text{COOH}]} = 1,8 \times 10^{-5} \text{ M}$$

Cosa vuol dire
questo numero?

4. La forza degli acidi e delle basi /1

Acido	Formula	K_a
acido perclorico	HClO_4	molto grande
acido iodidrico	HI	molto grande
acido bromidrico	HBr	molto grande
acido cloridrico	HCl	molto grande
acido solforico	H_2SO_4	molto grande
acido nitrico	HNO_3	molto grande
acido idronio	H_3O^+	55
acido iodico	HIO_3	$1,7 \cdot 10^{-1}$
acido ossalico	$\text{H}_2\text{C}_2\text{O}_4$	$5,9 \cdot 10^{-2}$
acido solforoso	H_2SO_3	$1,5 \cdot 10^{-2}$
acido fosforico	H_3PO_4	$7,5 \cdot 10^{-3}$
acido lattico	$\text{C}_3\text{H}_5\text{O}_3$	$8,4 \cdot 10^{-4}$
acido citrico	$\text{H}_3\text{C}_5\text{H}_5\text{O}_7$	$7,1 \cdot 10^{-4}$
acido nitroso	HNO_2	$4,6 \cdot 10^{-4}$
acido fluoridrico	HF	$3,5 \cdot 10^{-4}$
acido formico	CH_2O_2	$1,8 \cdot 10^{-4}$
acido benzoico	$\text{C}_6\text{H}_5\text{COOH}$	$6,5 \cdot 10^{-5}$
acido acetico	$\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2$	$1,8 \cdot 10^{-5}$
acido carbonico	H_2CO_3	$4,3 \cdot 10^{-7}$
acido solfidrico	H_2S	$9,1 \cdot 10^{-8}$
ione diidrogenofosfato	H_2PO_4^-	$6,2 \cdot 10^{-8}$
acido ipocloroso	HClO	$3,0 \cdot 10^{-8}$
acido bórico	H_3BO_3	$7,3 \cdot 10^{-10}$
acido cianidrico	HCN	$4,9 \cdot 10^{-10}$
acido idrogenocarbonato	HCO_3^-	$5,6 \cdot 10^{-11}$
acido idrogenosolfuro	HS^-	$1,1 \cdot 10^{-12}$
acido idrogenofosfato	HPO_4^{2-}	$2,2 \cdot 10^{-13}$
acqua	H_2O	$1,8 \cdot 10^{-16}$



forza crescente degli acid

Un acido è tanto più forte quanto più incrementa la concentrazione di ioni H_3O^+ in soluzione.

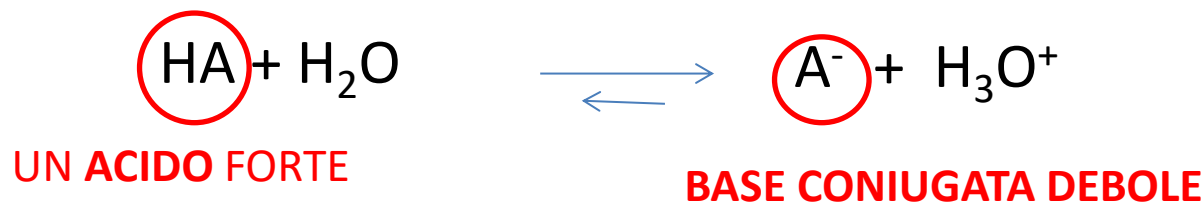
Il valore della **costante di acidità K_a** è tanto più grande quanto più l'acido è forte.

$$K_a = \frac{[\text{H}_3\text{O}^+][\text{A}^-]}{[\text{HA}]}$$

ZANICHELLI

La **forza** di un **acido** dipende dalla **forza** del legame **H-A** . Per **UN ACIDO FORTE**, il legame H-A è **debole** e in soluzioni acquose, tende facilmente a perdere il protone cedendolo all'acqua.

La **forza degli acidi** misura la tendenza a cedere protoni all'acqua. Inoltre la forma **A⁻** è **una specie molto stabile**, che difficilmente tende a riacquistare il protone e quindi viene considerata una **BASE CONIUGATA DEBOLE**

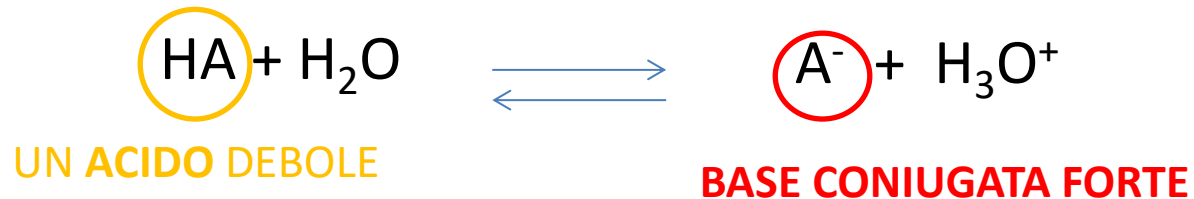


Acido	Formula	K _a
acido perclorico	HClO ₄	molto grande
acido iodidrico	HI	molto grande
acido bromidrico	HBr	molto grande
acido cloridrico	HCl	molto grande
acido solforico	H ₂ SO ₄	molto grande
acido nitrico	HNO ₃	molto grande



Relazione tra la forza di un **ACIDO** e la sua **BASE CONIUGATA**

Acido		Base coniugata		
 Forza acida crescente	Acido perclorico	HClO ₄	Ione perclorato	ClO ₄ ⁻
	Acido iodidrico	HI	Ione ioduro	I ⁻
	Acido bromidrico	HBr	Ione bromuro	Br ⁻
	Acido cloridrico	HCl	Ione cloruro	Cl ⁻
	Acido solforico	H ₂ SO ₄	Ione idrogeno solfato	HSO ₄ ⁻
	Acido nitrico	HNO ₃	Ione nitrato	NO ₃ ⁻
	Ione idrossonio ^a	H ₃ O ⁺	Acqua ^a	H ₂ O
	Ione idrogeno solfato	HSO ₄ ⁻	Ione solfato	SO ₄ ²⁻
	Acido nitroso	HNO ₂	Ione nitrito	NO ₂ ⁻
	Acido acetico	CH ₃ COOH	Ione acetato	CH ₃ COO ⁻
	Acido carbonico	H ₂ CO ₃	Ione idrogeno carbonato	HCO ₃ ⁻
	Ione ammonio	NH ₄ ⁺	Ammoniaca	NH ₃
	Ione idrogeno carbonato	HCO ₃ ⁻	Ione carbonato	CO ₃ ²⁻
	Acqua	H ₂ O	Ione idrossido	OH ⁻
	Metanolo	CH ₃ OH	ione metossido	CH ₃ O ⁻
	Ammoniaca	NH ₃	Ione ammido	NH ₂ ⁻
		 Forza basica crescente		



E' un sistema in equilibrio: sono presenti entrambe le specie HA e A-

A cosa può servire un sistema del genere????

- Se io aggiungo una BASE FORTE come ad es: NaOH la specie HA sarà in grado di neutralizzare gli OH⁻
- Se io aggiungo un ACIDO FORTE come ad es. HCl la Base coniugata A⁻ sarà in grado di neutralizzare gli H⁺

Si dice che ha un POTERE TAMPONANTE cioè è un
SISTEMA TAMPONE !!!!!

SOLUZIONE TAMPONE:

- **Limita le variazioni di pH** che si dovrebbero osservare dopo aggiunta di piccole quantità di Acidi o Basi forti



- **pH viene mantenuto pressoché costante** grazie alla mobilità dell'equilibrio della coppia coniugata HA/A^-



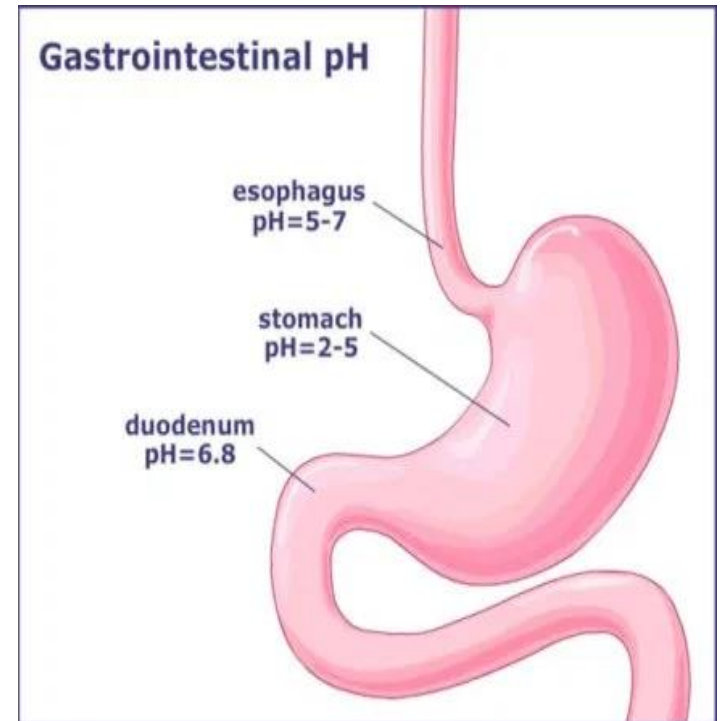
- **contiene** nella stessa soluzione **una concentrazione simile** (paragonabile) di entrambe le specie che formano gli elementi di una **coppia acido/base coniugata**.

Nel nostro organismo è fondamentale mantenere un **pH costante**, o comunque variabile in un range ristretto.

Gli Enzimi digestivi nello **stomaco** lavorano principalmente a **pH ACIDO**.

Nel **duodeno**, e nella prima parte del digiuno, invece gli enzimi digestivi pancreatici hanno bisogno di un **pH ALCALINO**.

In altri distretti come ad es. i **lisosomi** le Idrolasi acide hanno un optimum di **pH acido**.

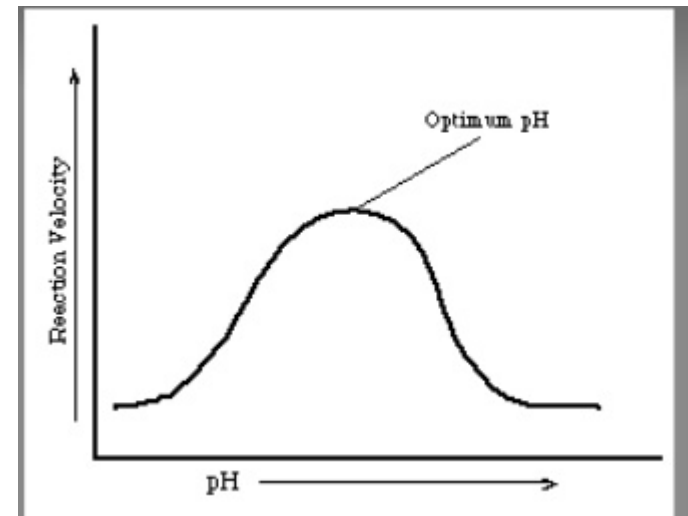
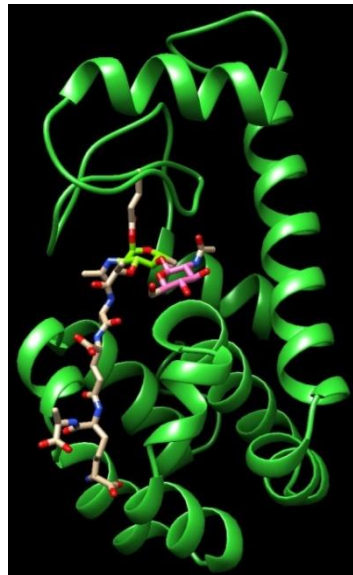


Perché per gli ENZIMI è importante il pH?

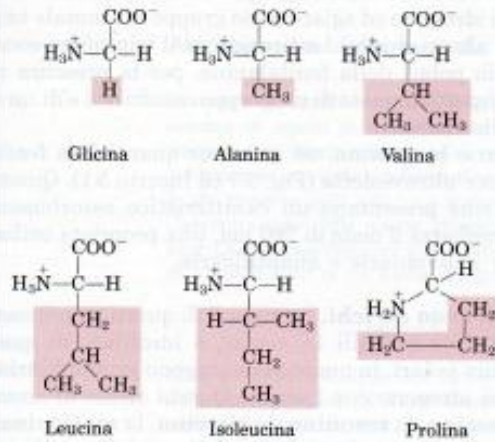
Gli ENZIMI generalmente sono proteine in grado di interagire con una molecola, substrato, in una tasca specifica detta **SITO ATTIVO**.

Un cambiamento di pH può cambiare la ionizzazione degli aminoacidi che fanno parte del sito attivo ed anche dei gruppi chimici del substrato per cui l'interazione ES non avviene, e diminuisce la v della reazione catalizzata.

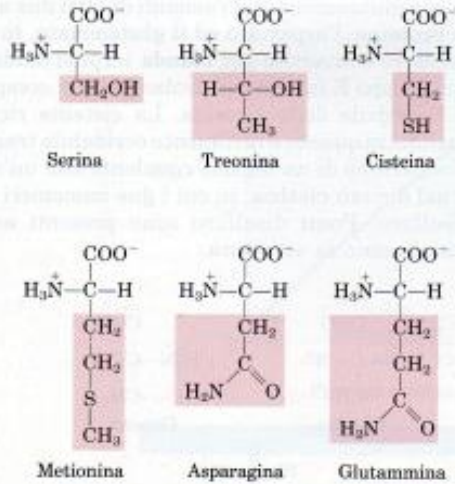
C'è un valore di pH ottimale per ciascun enzima.



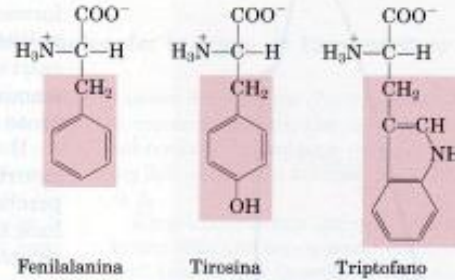
Gruppi R alifatici, non polari



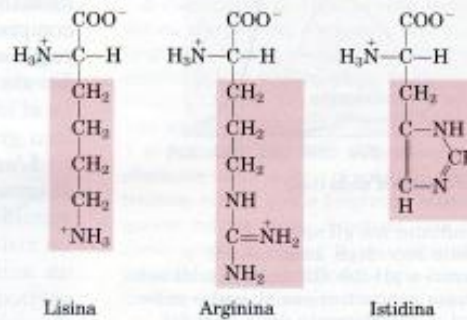
Gruppi R polari, non carichi



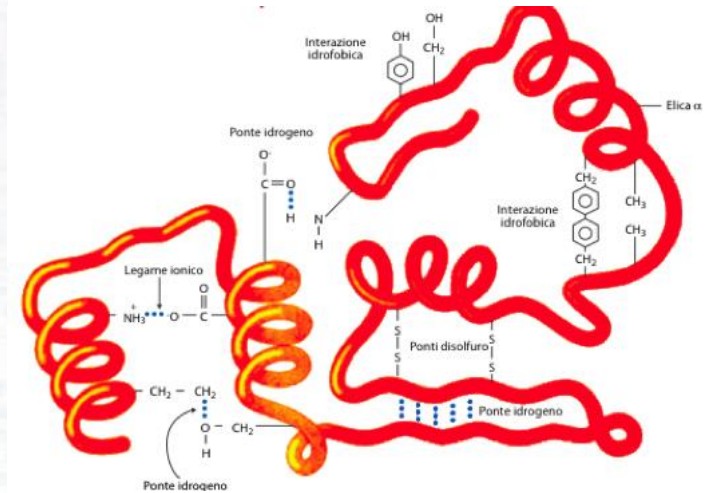
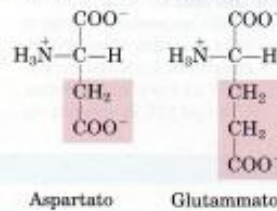
Gruppi R aromatici



Gruppi R carichi positivamente



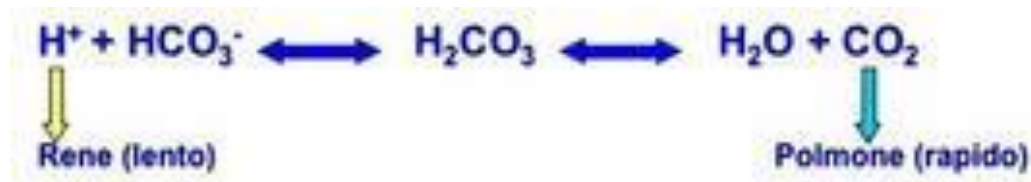
Gruppi R carichi negativamente



Il nostro organismo utilizza dei sistemi tampone per mantenere stabile il pH nei vari distretti corporei. I principali sono tre:

- il sistema del **bicarbonato** (il più importante a livello extracellulare) $\text{H}_2\text{CO}_3/\text{HCO}_3^-$
- il sistema delle **proteine**: proteina/proteinato (albumina, emoglobina, ...)
- il sistema del **fosfato**: $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$

Il più importante è il sistema del bicarbonato che agisce insieme con alcuni organi: Rene e Polmoni.



se la reazione è spostata a sinistra, interviene il rene che tende ad eliminare gli H^+ in eccesso attraverso processi metabolici

se la reazione è spostata a destra interviene il polmone che aumenta la frequenza respiratoria allo scopo di eliminare la CO_2 prodotta in eccesso.

Come si calcola il **pH di una soluzione tampone** costituita da **un acido debole e dalla sua base coniugata**

$$\text{pH} = \text{p}K_a + \log \frac{[A^-]_{\text{iniziale}}}{[HA]_{\text{iniziale}}}$$

Equazione di Henderson Hasselbalch

Quando le concentrazioni di Acido debole HA e di base coniugata A⁻ sono uguali

pH= pKa

Il sistema si dice che ha la **“massima efficienza tamponante”**.

Per le basi :

$$\text{pH} = \text{p}K_a + \log \left(\frac{[B]}{[BH^+]} \right)$$

ESEMPIO:

Una soluzione tampone è costituita da:

[CH₃COOH]: 0,1 M

[CH₃COO⁻]: 0,1M

Sapendo che il pK_a = 4,75 si calcoli il pH iniziale.

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

$$\text{pH} = 4,75 + \text{Log } 0,1/0,1$$

$$\text{pH} = 4,75$$

Verifica del potere tamponante:

Se a 0,5 L di questa soluzione aggiungo 5 ml di HCl 0,5M come varia il pH?

PRIMA dell'aggiunta di HCl:

moli di CH₃COOH: $M \times V = 0,1 \times 0,5 = 0,05 \text{ mol}$

mol di CH₃COO⁻: $M \times V = 0,1 \times 0,5 = 0,05 \text{ mol}$

ESEMPIO: (segue)

Verifica del potere tamponante:

$$\text{pH} = \text{p}K_a + \log \frac{[A^-]_{\text{iniziale}}}{[HA]_{\text{iniziale}}}$$

DOPO l'aggiunta di HCl: $\text{H}^+ + \text{CH}_3\text{COO}^- \rightarrow \text{CH}_3\text{COOH}$



Moli iniz **+** moli HCl

Moli iniz **-** moli HCl

Moli di HCl= $M \times V = 0,5 \times 0,005 = 0,0025 \text{ mol}$

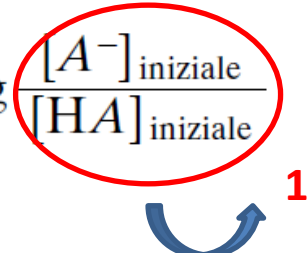
$[\text{CH}_3\text{COOH}] = 0,05 + 0,0025 / (0,5 + 0,005) = 0,0525 / 0,505 = 0,1039$

$[\text{CH}_3\text{COO}^-] = 0,05 - 0,0025 / (0,5 + 0,005) = 0,0475 / 0,505 = 0,0940$

pH = $4,75 + \text{Log } 0,0940 / 0,1039 = 4,70$

COME SI SCEGLIE UN SISTEMA TAMPONE

ES: Ho bisogno di un tampone a pH =5

$$\text{pH} = \text{p}K_a + \log \frac{[A^-]_{\text{iniziale}}}{[HA]_{\text{iniziale}}}$$


$\text{HNO}_2/\text{NO}_2^-$	($\text{p}K_a = 3,34$)
$\text{CH}_3\text{COOH}/\text{CH}_3\text{COO}^-$	($\text{p}K_a = 4,75$)
$\text{H}_2\text{CO}_3/\text{HCO}_3^-$	($\text{p}K_a = 6,37$)
$\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$	($\text{p}K_a = 7,21$)
$\text{NH}_4^+/\text{NH}_3$	($\text{p}K_a = 9,26$)

- Per avere la massima capacità tamponante le concentrazioni di acido e della sua base coniugata devono essere uguali o paragonabili.
- Quindi l'unica cosa che devo andare a cercare è un sistema che abbia il pKa uguale o molto vicino al pH desiderato.

Quindi l'acido acetico ha un pKa= 4,75mi va benissimo!

COME SI PREPARA UNA SOLUZIONE TAMPONE

- soluzione tampone $\text{CH}_3\text{COOH}/\text{CH}_3\text{COO}^-$

si possono usare tre metodi differenti

1. mescolando uguali quantità di ACIDO (CH_3COOH) e della sua BASE CONIUGATA ($\text{CH}_3\text{COO}^-\text{Na}^+$)
2. Partendo da una soluzione di ACIDO (CH_3COOH) e aggiungendo successivamente una base forte (ad esempio NaOH): le moli di NaOH aggiunte devono essere la metà rispetto a quelle di CH_3COOH
3. Partendo da una soluzione del sale dell'Acido, cioè la BASE CONIUGATA ($\text{CH}_3\text{COO}^-\text{Na}^+$) e aggiungendo successivamente un acido forte (ad esempio HCl): le moli di HCl aggiunte devono essere la metà rispetto a quelle di $\text{CH}_3\text{COO}^-\text{Na}^+$

Indipendentemente dal metodo scelto le soluzioni dovranno avere le stesse concentrazioni di CH_3COOH e di CH_3COO^- , solo così avranno lo stesso pH.

MISURA DEL pH



Indicatore universale:
cartina al tornasole



pHmetro

CAPACITA' TAMPONANTE

La capacità tamponante si riferisce alla quantità di acido forte o di base forte che la soluzione tampone riesce a neutralizzare mantenendo il pH entro il limite di variazione di 1 unità di pH.

Da cosa dipende questa capacità?

La capacità tamponante di una soluzione dipende da:

- 1) dalla concentrazione assoluta (ACIDO e BASE CONIUGATA)
- 2) dal rapporto tra le concentrazioni della coppia ACIDO-BASE CONIUGATA

VERIFICA DELLA CAPACITA' TAMPONANTE

Soluzione
tampone a $\text{pH}=7$ a
cui è stato
aggiunto:
Indicatore che
diventa rosa-fucsia
a $\text{pH}>7$
Una piccola
quantità di NaOH



H_2O a cui è stato
aggiunto:
Indicatore che
diventa rosa-fucsia
a $\text{pH}>7$
Una piccola
quantità di NaOH

**La soluzione tampone rimane incolore , perché anche dopo
l'aggiunta della base forte, il pH non cambia e quindi
l'indicatore non cambia colore.**

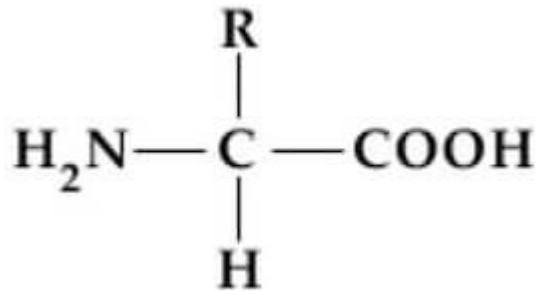
Se una soluzione tampone viene DILUITA :

- Il pH non cambia perché il rapporto A^- / HA (in caso di tampone costituito da acido debole) rimane costante
- cambia la capacità tamponante, cioè la quantità di H^+ o di OH^- che riesce a neutralizzare

ESPERIENZA di LABORATORIO

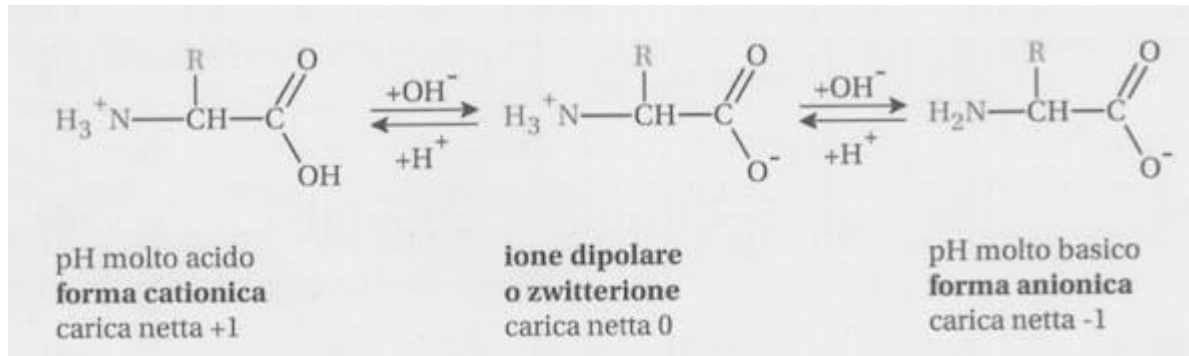
- Preparazione di un tampone glicina
- Preparazione di un tampone fosfato
- Preparazione di un tampone TRIS

TAMPONE GLICINA

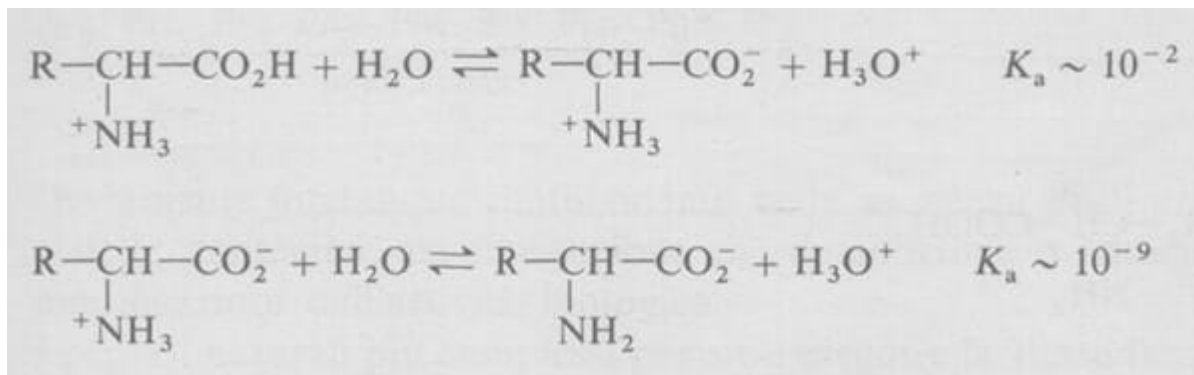


Nella Glicina R=H

Gli aminoacidi sono molecole costituite sia da un gruppo Acido (ac carbossilico) sia un gruppo basico (amminico). Vengono quindi definiti sostanze **anfotere**.



Un aa può quindi esistere in una forma completamente protonata cationica o completamente deprotonata forma anionica a seconda del pH della soluzione. Ad un determinato valore di pH (definito **punto isoelettrico**) l'aa è presente sotto forma di ione dipolare (**zwitterione**).



Gli aminoacidi che **NON** hanno catene ionizzabili (come la glicina), hanno due K_a rispettivamente di circa 2 e 9. Ad es. la Glicina ha $\text{p}K_{a1}=2,34$ e $\text{p}K_{a2}=9,60$

il **PI** è dato dalla media aritmetica dei due valori di $\text{p}K$.

Quindi $\text{PI (Glicina)} = (\text{p}K_{a1} + \text{p}K_{a2})/2 = (2,34 + 9,60)/2 = 5,97$

Il PI varia a seconda della natura del gruppo R.

TAMPONE GLICINA

Preparazione di 200 ml di tampone glicina a pH 2.5 e pH 9.3

- Pesare nel becher 3g di glicina
- Aggiungere acqua distillata (tenenersi leggermente al di sotto dei 200 ml) e lasciare sciogliere bene inserendo l'ancoretta magnetica.
- Verificare il pH di partenza misurando con il pHmetro.
- Aggiustare il pH aggiungendo lentamente, 1 ml alla volta di Acido forte HCl o della Base forte NaOH fino al raggiungimento del pH desiderato
- Prendere nota del Volume totale aggiunto
- Portare la soluzione al volume finale.

glicina (MW= 75, pKa1=2.3; pKa2=9.6)

TAMPONE FOSFATO

È quello maggiormente utilizzato nel campo della ricerca biologica

È un sistema tampone sfruttato dagli organismi pluricellulari per mantenere un pH praticamente costante nella cellula e negli ambienti circostanti.

L'Acido fosforico è un acido triprotico per cui abbiamo tre coppie acido/base coniugata che possiamo utilizzare per formare i tamponi:



Di solito vengono utilizzati NaH_2PO_4 e Na_2HPO_4 in quanto il valore della pKa_2 è più vicino ad un $\text{pH} = 7$ che è quello più ampiamente impiegato.

TAMPONE FOSFATO : metodi di preparazione

Applicando l'[equazione di Henderson-Hasselbalch](#) si ha:

$$7.4 = 7.2 + \log [\text{HPO}_4^{2-}]/[\text{H}_2\text{PO}_4^-]$$

$$0.2 = \log [\text{HPO}_4^{2-}]/[\text{H}_2\text{PO}_4^-]$$

$$10^{0.2} = 1.6 = [\text{HPO}_4^{2-}]/[\text{H}_2\text{PO}_4^-]$$

quindi: 1.6 moli di Na_2HPO_4 (1.6 mol · 141.96 g/mol = 227 g)

1 mole di NaH_2PO_4 (1.0 mol · 119.98 g/mol = 120 g)

1L

	1 Liter of 0.05 M Phosphate Buffer (25°C)	
Desired pH	1 M Monobasic Solution NaH_2PO_4	1 M Dibasic Solution Na_2HPO_4
6.6	32.0 ml	18.0 ml
6.7	29.8 ml	20.2 ml
6.8	26.5 ml	23.5 ml
6.9	24.0 ml	26.0 ml
7.0	21.1 ml	28.9 ml
7.1	18.4 ml	31.6 ml
7.2	16.8 ml	34.2 ml
7.3	13.4 ml	36.6 ml
7.4	11.2 ml	38.8 ml
7.5	9.4 ml	40.6 ml
7.6	7.8 ml	42.2 ml

Oppure.....

TAMPONE FOSFATO : metodi di preparazione

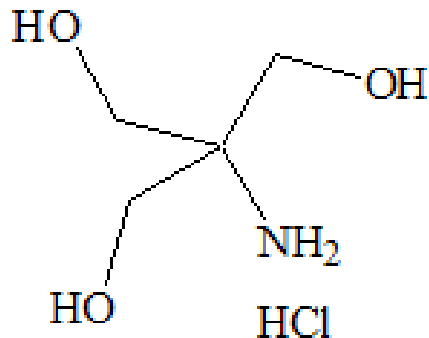
Preparazione di 125 ml di tampone fosfato 0.2M a pH 7

- Pesare nel becker NaH_2PO_4 e scioglierlo in acqua distillata (aggiungere un volume leggermente inferiore a 125ml)
- Verificare il pH di partenza con il pHmetro
- Portare a pH7 utilizzando una soluzione di NaOH 5M.
- Annotare il volume totale di NaOH utilizzato per portare la soluzione a pH desiderato.
- Portare a volume e conservare tutta la soluzione in una bottiglietta.

NaH_2PO_4 (fosfato monobasico di sodio) (MW= 120, $\text{pK}_{\text{a}2}=6.82$)

TAMPONE TRIS/ HCl

È un tampone molto usato soprattutto in biologia per ENZIMI e per soluzioni di DNA
il TRIS viene usato meno in chimica perché ha un [gruppo amminico](#) primario reattivo,
per questo potrebbe interferire con le reazioni



tris-(2-idrossimetil)-amminometano cloridrato (MW= 121,
pKa=8.3)

TAMPONE TRIS/ HCl

Preparazione di 400 ml di tampone Tris/HCl 100mM a pH 8.8

- Pesare nel becker Tris e scioglierlo in un volume inferiore a 400 ml di acqua distillata,
- misurare il pH.
- Portare a pH 8.8 utilizzando la soluzione di HCl 2M.
- Portare a volume e conservare tutta la soluzione in una bottiglia da 500 ml.

Utilizzo del pHmetro:

CALIBRAZIONE con soluzioni a pH 7 e a pH4

- 1) Lavare accuratamente la punta dell'elettrodo
- 2) Inserire l'elettrodo nella soluzione di calibrazione a pH 7.00 fino alla stabilizzazione
- 3) Sollevare l'elettrodo e lavarlo abbondantemente con acqua distillata
- 4) Inserire l'elettrodo nella soluzione di calibrazione a pH 4.00 fino alla stabilizzazione
- 5) Se la calibrazione è OK, risciacquare l'elettrodo con acqua distillata e iniziare le misure



Per ottenere dei risultati precisi:

- Prestare molta attenzione alla calibrazione degli strumenti.
- Assicurarsi della validità delle soluzioni standard.
- Mantenere costante la temperatura.
- Tra una misurazione e l'altra è buona norma lavare l'elettrodo con acqua distillata.
- Nel momento della calibrazione, lasciare l'elettrodo immerso per un tempo sufficiente affinché la lettura si stabilizzi