

Αθανάσιος Α. Παναγιωτόπουλος
Γεωργία Ν. Νικολακάκου

Εργαστηριακές Ασκήσεις Βιοχημείας



ΕΚΔΟΣΕΙΣ
ΖΗΤΗ

ISBN 978-960-456-496-5

© Copyright: Εκδόσεις ΖΗΤΗ, Α. Παναγιωτόπουλος, Γ. Νικολακάκου,
Θεσσαλονίκη, Ιανουάριος 2018

Το παρόν έργο πνευματικής ιδιοκτησίας προστατεύεται κατά τις διατάξεις του ελληνικού νόμου (Ν.2121/1993 όπως έχει τροποποιηθεί και ισχύει σήμερα) και τις διεθνείς συμβάσεις περί πνευματικής ιδιοκτησίας. Απαγορεύεται απολύτως η άνευ γραπτής άδειας του εκδότη κατά οποιοδήποτε τρόπο ή μέσο αντιγραφή, φωτοανατύπωση και εν γένει αναπαραγωγή, εκμίσθωση ή δανεισμός, μετάφραση, διασκευή, αναμετάδοση στο κοινό σε οποιαδήποτε μορφή (ηλεκτρονική, μηχανική ή άλλη) και η εν γένει εκμετάλλευση του συνόλου ή μέρους του έργου.

Φωτοστοιχειοθεσία
Εκτύπωση
Βιβλιοδεσία

Π. ΖΗΤΗ & Σια ΙΚΕ

18ο χλμ Θεσ/νίκης-Περαίας
Τ.Θ. 4171 • Περαία Θεσσαλονίκης • Τ.Κ. 570 19
Τηλ.: 2392.072.222 - Fax: 2392.072.229 • e-mail: info@ziti.gr



www.ziti.gr

ΒΙΒΛΙΟΠΩΛΕΙΟ ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗΣ:

Αρμενοπούλου 27, 546 35 Θεσσαλονίκη
Τηλ.: 2310.203.720, Fax: 2310.211.305 • e-mail: sales@ziti.gr

ΒΙΒΛΙΟΠΩΛΕΙΟ ΑΘΗΝΩΝ:

Χαριλάου Τρικούπη 22, 106 79 Αθήνα
Τηλ.-Fax: 210.3816.650 • e-mail: athina@ziti.gr

ΗΛΕΚΤΡΟΝΙΚΟ ΒΙΒΛΙΟΠΩΛΕΙΟ: www.ziti.gr

Πρόλογος

Η διδασκαλία της χημείας είναι μία αρκετά σημαντική πρόκληση. Περιλαμβάνει πολύ κόπο από τη μεριά των εκπαιδευτικών αλλά και των φοιτητών και ιδιαίτερα στο πλαίσιο ενός εργαστηρίου. Η μαγεία της μάθησης της χημείας σε σχέση με άλλες επιστήμες έγκειται στο γεγονός ότι μπορεί να προέλθει μέσω της παρατήρησης. Στην χημεία, θεωρία και πείραμα, παρατήρηση και ερμηνεία συνδυάζονται απόλυτα κάνοντας την χημεία κέντρο των θετικών επιστημών.

Στόχος μας γράφοντας τον εργαστηριακό οδηγό βιοχημείας είναι η παρουσίαση μιας σειράς πειραμάτων βιοχημείας, τα οποία αντιπροσωπεύουν ένα αρκετά ευρύ φάσμα του τομέα αυτού. Οι φοιτητές θα έρθουν σε επαφή μέσω του πειράματος με τις βασικές αρχές της βιοχημείας. Τα πειράματα είναι σχεδιασμένα έτσι ώστε, μέσω της βιβλιογραφικής έρευνας, να υπάρχει πολυδιάστατη μελέτη για την ερμηνεία του κάθε πειράματος. Με αυτόν τον τρόπο, ο φοιτητής κάθε τομέα μπορεί να αναλύει και να εμβαθίνει τις γνώσεις του από την οπτική που τον ενδιαφέρει.

Ο παρόν εργαστηριακός οδηγός, περιλαμβάνει 20 διαφορετικές πειραματικές ενότητες και πάνω από 30 διαφορετικές εργαστηριακές ασκήσεις. Είναι σχεδιασμένος με σκοπό να είναι πλήρης για δύο ακαδημαϊκά εξάμηνα. Το κάθε κεφάλαιο και ενότητα περιλαμβάνει εισαγωγή στο αντικείμενο που μελετάται κάθε φορά, λεπτομερή θεωρία και εμβάθυνση στις αρχές και στις μεθόδους που χρησιμοποιούνται για την πραγματοποίηση του αντίστοιχου πειράματος, καθώς και παρουσίαση του θέματος με μια πιο γενική μορφή, δίνοντας τη δυνατότητα για περαιτέρω αναζήτηση και έρευνα. Το πειραματικό μέρος είναι γραμμένο έτσι ώστε να βοηθά τόσο τους διδάσκοντες όσο και τους φοιτητές, με λεπτομερή περιγραφή της πειραματικής διαδικασίας. Οι πειραματικές διαδικασίες είναι ελεγμένες για την ορθότητά τους από καθηγητές χημείας τόσο στην Ελλάδα όσο και το εξωτερικό και αναφέρονται σε δημοσιεύσεις διεθνούς κύρους περιοδικών και βιβλίων χημείας.

Ύστερα από την πραγματοποίηση της κάθε εργαστηριακής άσκησης, οι φοιτητές καλούνται να περιγράψουν την πειραματική διαδικασία που ακολούθησαν, να διατυπώσουν τις παρατηρήσεις τους και όλες εκείνες τις λεπτομέρειες που θα

τους βοηθήσουν να καταλάβουν την ουσία του πειράματος. Οι ερωτήσεις που σχεδιάστηκαν για κάθε πείραμα, σκοπεύουν στη συνέχιση του πειράματος πέρα από τα όρια του εργαστηρίου, στη βιβλιογραφική αναζήτηση και έρευνα, μέσω της οποίας θα κατανοήσουν πλήρως όλες τις λεπτομέρειες του πειράματος που πραγματοποίησαν. Προς αυτήν την κατεύθυνση βοηθούν και οι βιβλιογραφικές πηγές που δίνονται στο τέλος κάθε κεφαλαίου.

Ο εργαστηριακός οδηγός βιοχημείας γράφτηκε κάτω από πολύ δύσκολες συνθήκες. Έχει γίνει τεράστια προσπάθεια για την εξάλειψη λαθών και παραλείψεων. Κάθε βιβλίο θα πρέπει να βελτιώνεται και να ακολουθεί την πορεία της εξέλιξης της επιστήμης την οποία προάγει. Γι' αυτό με πολύ μεγάλη χαρά θα δεχτούμε παρατηρήσεις και πιθανές διορθώσεις.

Κλείνοντας τον πρόλογο αυτό, αξίζει να σημειώσουμε την άποψη του Αριστοτέλη για το πείραμα και την αξία του... *«Εκ πολλών της εμπειρίας εννοημάτων μία καθόλου γίνεται περί των ομοίων υπόληψις ... ότι η μεν εμπειρία των καθ' έκαστον εστί γνώσις, η δε τέχνη των καθόλου».*

Οι συγγραφείς,

Αθανάσιος Α. Παναγιωτόπουλος

Γεωργία Ν. Νικολακάκου

Περιεχόμενα

Κανόνες ασφαλείας	13
1. Παρασκευή και μελέτη ρυθμιστικών διαλυμάτων	19
<hr/>	
1. Εισαγωγή	20
2. Θεωρία	21
3. Πειραματικό μέρος	26
4. Ερωτήματα αναφοράς	28
5. Βιβλιογραφία	29
2. Παρασκευή γαλακτωμάτων και ζελατινών	31
<hr/>	
1. Εισαγωγή	32
2. Θεωρία	33
3. Πειραματικό μέρος	38
4. Ερωτήματα αναφοράς	39
5. Βιβλιογραφία	40
3. Μελέτη αντιδράσεων οξειδοαναγωγής	41
<hr/>	
1. Εισαγωγή	42
2. Θεωρία	43
3. Πειραματικό μέρος	46
4. Ερωτήματα αναφοράς	48
5. Βιβλιογραφία	48

4. Ταυτοποίηση και διαχωρισμός αμινοξέων με χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC)	49
1. Εισαγωγή	50
2. Θεωρία	51
3. Πειραματικό μέρος	55
4. Ερωτήματα αναφοράς	57
5. Βιβλιογραφία	57
5. Ανίχνευση πεπτιδίων και πρωτεϊνών	59
1. Εισαγωγή	60
2. Θεωρία	62
3. Πειραματικό μέρος	65
4. Ερωτήματα αναφοράς	68
5. Βιβλιογραφία	68
6. Εύρεση ισοηλεκτρικού σημείου πρωτεϊνών	69
1. Εισαγωγή	70
2. Θεωρία	71
3. Πειραματικό μέρος	74
4. Ερωτήματα Αναφοράς	75
5. Βιβλιογραφία	76
7. Σχηματισμός και ανίχνευση του πυροσταφυλικού οξέος και της ακεταλδεϋδης με μεταβολισμό της γλυκόζης από κύτταρα ζύμης ...	77
1. Εισαγωγή	78
2. Θεωρία	82
3. Πειραματικό μέρος	87
4. Ερωτήματα αναφοράς	89
5. Βιβλιογραφία	89

8. Προσδιορισμός τρανσαμινασών στον ορό του αίματος 91

1. Εισαγωγή 92
2. Θεωρία 92
3. Πειραματική διαδικασία 98
4. Ερωτήματα αναφοράς 99
5. Βιβλιογραφία 100

9. Προσδιορισμός του φωσφόρου στον ορό αίματος 101

1. Εισαγωγή 102
2. Θεωρία 103
3. Πειραματικό μέρος 106
4. Ερωτήματα αναφοράς 108
5. Βιβλιογραφία 108

10. Προσδιορισμός της ουρίας στον ορό αίματος 109

1. Εισαγωγή 110
2. Θεωρία 111
3. Πειραματικό μέρος 116
4. Ερωτήματα αναφοράς 118
5. Βιβλιογραφία 118

II. Ενζυμική μελέτη της οξειδάσης της κατεχόλης 119

1. Εισαγωγή 120
2. Θεωρία 120
3. Πειραματικό μέρος 124
4. Ερωτήματα αναφοράς 128
5. Βιβλιογραφία 128

12. Ημιποσοτικός προσδιορισμός αμυλάσης σε δείγμα ούρων 129

1. Εισαγωγή	130
2. Θεωρία	131
3. Πειραματικό μέρος	134
4. Ερωτήματα αναφοράς	136
5. Βιβλιογραφία	137

13. Ενζυμική μελέτη της αμυλάσης 139

1. Εισαγωγή	140
2. Θεωρία	141
3. Πειραματικό μέρος	146
4. Ερωτήματα αναφοράς	152
5. Βιβλιογραφία	153

14. Κινητική μελέτη της τυροσινάσης 155

1. Εισαγωγή	156
2. Θεωρία	156
3. Πειραματικό μέρος	164
4. Ερωτήματα αναφοράς	169
5. Βιβλιογραφία	169

15. Απομόνωση και χαρακτηρισμός φυτικών χρωστικών 171

1. Εισαγωγή	172
2. Θεωρία	175
3. Πειραματικό μέρος	180
4. Ερωτήματα αναφοράς	184
5. Βιβλιογραφία	184

16. Ποσοτικός και ποιοτικός χαρακτηρισμός ανθοκυανινών 185

1. Εισαγωγή	186
2. Θεωρία	187
3. Πειραματικό μέρος	192
4. Ερωτήματα αναφοράς	196
5. Βιβλιογραφία	196

17. Απομόνωση και χαρακτηρισμός της α-λακταλβουμίνης 197

1. Εισαγωγή	198
2. Θεωρία	198
3. Πειραματικό μέρος	204
4. Ερωτήματα αναφοράς	213
5. Βιβλιογραφία	214

18. Ανοσοηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών ή Western blot 215

1. Εισαγωγή	216
2. Θεωρία	216
3. Πειραματικό μέρος	220
4. Ερωτήματα αναφοράς	224
5. Βιβλιογραφία	225

19. Απομόνωση και μελέτη χρωμοσωμικού DNA από βακτήρια 227

1. Εισαγωγή	228
2. Θεωρία	230
3. Πειραματικό μέρος	235
4. Ερωτήματα αναφοράς	237
5. Βιβλιογραφία	238

20. Μελέτη της επίδρασης περιοριστικών ενζύμων σε λ-DNA 239

1. Εισαγωγή	240
2. Θεωρία	241
3. Πειραματικό μέρος	248
4. Ερωτήματα αναφοράς	251
5. Βιβλιογραφία	251

Βιογραφικά σημειώματα 253

Σημειώσεις φοιτητή 255

Ευχαριστίες

Η συγγραφή ενός βιβλίου αποτελεί ταυτόχρονα μια μεγάλη πρόκληση και παράλληλα ευθύνη. Απαιτεί χρόνο, κόπο, κατάθεση ψυχής.

Ευχαριστούμε για τον λόγο αυτό τις οικογένειές μας για την αμέριστη στήριξή τους, γιατί κατάφεραν να είναι εκεί κάνοντας όλα τα δύσκολα εύκολα. Ευχαριστούμε την οικογένεια της Γεωργίας (Νίκος, Άννα και Βασίλης) και του Θανάση (Αντώνη, Ελένη και Βικτωρία) που στέκονται στο πλευρό μας κάθε στιγμή.

Ευχαριστούμε τους καλούς δασκάλους μας όλα αυτά τα χρόνια, που μας έδωσαν όλα εκείνα τα πνευματικά εφόδια, τη δίψα για αναζήτηση, το πείσμα να μην τα παρατάμε.

Ευχαριστούμε τους φίλους μας για όλες εκείνες τις στιγμές που μας χάρισαν και μας συνοδεύουν. Στιγμές που θα άξιζαν τη συγγραφή ολόκληρων βιβλίων.

Σε όλους αυτούς αφιερώνουμε το βιβλίο μας. Σε όλους εσάς που δεν το βάζετε κάτω στα δύσκολα. Που μένετε εκεί για να παλέψετε για τα όνειρά σας. Που δεν δειλιάζετε. Που μάχεστε για το δίκαιο. Που δίνετε την ψυχή σας για το δίκαιο. Σε όλους τους επιστήμονες που βλέπουν την επιστήμη τους ως τέχνη και αμέριστο καθήκον για τον συνάνθρωπό μας και όχι ως επάγγελμα.

Ασφάλεια στο εργαστήριο

Κανόνες Ασφαλείας

Οι βασικοί κανόνες ασφαλείας σε ένα εργαστήριο χημείας είναι οι ακόλουθοι:

1. Όσοι βρίσκονται στο εργαστήριο, θα πρέπει να φορούν προστατευτική ποδιά. Μέσα από την ποδιά θα πρέπει να φοράτε ρούχα τα οποία καλύπτουν όλο το σώμα. Ειδικότερα, απαγορεύονται τα κοντά ρούχα και τα ανοιχτά παπούτσια. Τα μακριά μαλλιά θα πρέπει να μαζεύονται, διότι μπορούν εύκολα να πάρουν φωτιά, να παγιδευτούν σε κάποια συσκευή ή να έρθουν σε επαφή με διάφορες χημικές ουσίες.
2. Τα προστατευτικά γυαλιά κατά τη διάρκεια των πειραμάτων είναι απαραίτητα. Προστατευτικά γυαλιά θα πρέπει να φορούν όλοι όσοι βρίσκονται στο εργαστήριο ακόμα και για μικρή χρονική διάρκεια.
3. Η παρουσία και η κατανάλωση φαγητών ή ποτών απαγορεύονται αυστηρά στο εσωτερικό του εργαστηρίου.
4. Τα προσωπικά ακτικείμενα όλων θα πρέπει να κλείνονται σε ειδικές θυρίδες εκτός εργαστηρίου.
5. Η παραμονή ατόμων στους χώρους του εργαστηρίου χωρίς την άδεια του επιβλέποντος καθηγητή απαγορεύεται αυστηρά.
6. Το κάπνισμα και η χρήση των κινητών τηλεφώνων απαγορεύεται τόσο εντός του εργαστηρίου όσο και στους διαδρόμους του.
7. Για τη μείωση των πιθανοτήτων πρόκλησης ατυχήματος μέσα στο εργαστήριο θα πρέπει να αποφεύγονται οι άσκοπες μετακινήσεις από τις θέσεις εργασίας, καθώς και η παρεμπόδιση των εξόδων του εργαστηρίου.
8. Όλοι θα πρέπει να δουλεύουν με σοβαρότητα και υπευθυνότητα.
9. Οι εξοδοί του εργαστηρίου θα πρέπει να είναι εύκολα προσβάσιμες και ανα πάσα στιγμή σε ετοιμότητα.

10. Απαγορεύεται η έξοδος από το εργαστήριο με γάντια ή και με την ποδιά.
11. Το εργαστήριο, καθώς και το κτήριο στο οποίο στεγάζεται, θα πρέπει απαραίτητως να είναι εξοπλισμένα με σύστημα ανίχνευσης φωτιάς, συναγερμό και σύστημα αυτόματης πυρόσβεσης.
12. Σε περίπτωση ατυχήματος θα πρέπει αμέσως να ενημερώνεται ο υπεύθυνος του εργαστηρίου, με σκοπό την παροχή των πρώτων βοηθειών.
13. Το εργαστήριο θα πρέπει να διαθέτει φορητό φαρμακείο και η θέση του να είναι εμφανής σε όλους.
14. Απαγορεύεται η αυτόβουλη διαχείριση ατυχημάτων, χωρίς την εντολή του υπεύθυνου καθηγητή.
15. Απαγορεύεται η δοκιμή οποιασδήποτε πειραματικής διαδικασίας εάν δεν έχει ενημερωθεί ο υπεύθυνος καθηγητής.
16. Απαγορεύεται η εκτέλεση ενός πειράματος χωρίς την πλήρη γνώση των κινδύνων του και όλων των λεπτομερειών του. Οι φοιτητές θα πρέπει να προετοιμάζουν το πείραμα πρώτα θεωρητικά πριν μπουν στο εργαστήριο.
17. Απαγορεύεται αυστηρά η παραποίηση των πειραματικών πρωτοκόλλων και οδηγιών.
18. Πριν από τη διεξαγωγή των πειραμάτων, οι φοιτητές θα πρέπει να ενημερώνονται πλήρως για την επικινδυνότητα όλων των αντιδραστηρίων που πρόκειται να χρησιμοποιήσουν. Κάθε χημικό αντιδραστήριο το οποίο χρησιμοποιείται θα πρέπει να φέρει ετικέτα με τους δείκτες επικινδυνότητας (<http://hazard.com>).
19. Απαγορεύεται αυστηρά η μετακίνηση των οργάνων, των χημικών ουσιών και των συσκευών εκτός εργαστηρίου.
20. Όλα τα πειράματα θα πρέπει να εκτελούνται εντός απαγωγού εστίας.
21. Στον απαγωγό θα πρέπει να υπάρχουν μόνο τα απαραίτητα αντικείμενα. Τετράδια και βιβλία επιτρέπονται μόνο σε θέσεις εκτός απαγωγού εστίας.
22. Η θέση εργασίας θα πρέπει να καθαρίζεται σχολαστικά πριν και μετά από κάθε πείραμα.
23. Το πάτωμα του εργαστηρίου θα πρέπει να διατηρείται πάντα καθαρό και στεγνό. Σε περίπτωση που ένα χημικό αντιδραστήριο πέσει στο πάτωμα, θα πρέπει ο υπεύθυνος του εργαστηρίου να ενημερωθεί αμέσως.
24. Απαγορεύεται η θέρμανση εύφλεκτων διαλυτών και κλειστών συστημάτων με γυμνή φλόγα.
25. Απαιτείται ιδιαίτερη προσοχή στην χρήση οξέων και βάσεων. Στην περίπτωση που πέσει οξύ ή βάση στα χέρια ή τα μάτια, ξεπλένουμε με άφθονο νερό. Ειδοποιούμε πάντα τον υπεύθυνο του εργαστηρίου.

26. Ιδιαίτερη προσοχή θα πρέπει να δίνεται στη διαχείριση των αποβλήτων. Θα πρέπει στο εργαστήριο να υπάρχουν δοχεία συλλογής υδατικών, οργανικών και χλωριωμένων οργανικών αποβλήτων. Απαγορεύεται η ρίψη χημικών στο νεροχύτη.
27. Στο εργαστήριο θα πρέπει να υπάρχει ειδικός κάδος απόρριψης σπασμένων και αιχμηρών αντικειμένων.
28. Στο τέλος της εργαστηριακής ημέρας, κάθε εργαστηριακή ομάδα θα πρέπει να καθαρίζει τα σκεύη που χρησιμοποίησε και να παραδίδει την θέση της όπως την παρέλαβε.
29. Οι κοινοί χώροι θα καθαρίζονται από την εκάστοτε οριζόμενη ομάδα καθαριότητας.
30. Επειδή τα περισσότερα ατυχήματα οφείλονται σε απροσεξία ή επιπολαιότητα θα πρέπει όλοι κατά τη διάρκεια του πειράματος να είναι προσεκτικοί για κάθε τους κίνηση.

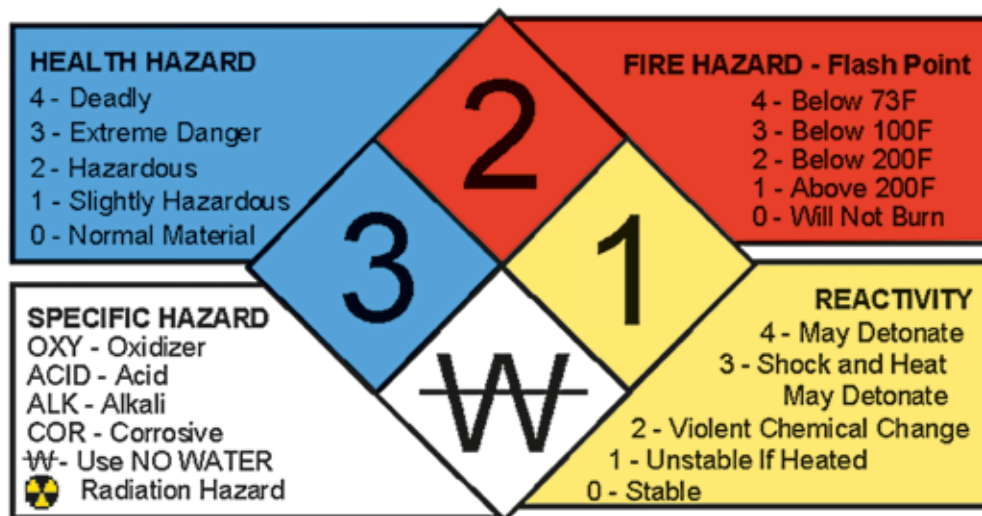
Πρώτες βοήθειες

Οι βασικές συμβουλές για πρώτες βοήθειες στο εργαστήριο είναι οι ακόλουθες:

1. Σε περίπτωση πρόκλησης πυρκαγιάς στο εργαστήριο, το νερό μπορεί να μην αποτελεί πάντα το καταλληλότερο μέσο πυρόσβεσης. Σε όλες τις περιπτώσεις όλες οι εύφλεκτες ουσίες θα πρέπει να απομακρύνονται, να διακόπτεται η παροχή ρεύματος και η εστία της φωτιάς να καλύπτεται με ένα υγρό ύφασμα ή με άμμο. Επίσης, στις περισσότερες περιπτώσεις απαιτείται η χρήση κατάλληλου πυροσβεστήρα.
2. Σε περιπτώσεις ηλεκτροπληξίας θα πρέπει αμέσως να διακοπεί η παροχή ρεύματος.
3. Σε περιπτώσεις ατυχήματος με οξέα ή βάσεις, θα πρέπει με άφθονο νερό να ξεπλύνουμε την περιοχή στο σώμα μας όπου έπεσαν οι ενώσεις αυτές. Πάντα συμβουλευόμαστε τον υπεύθυνο καθηγητή.
4. Σε περιπτώσεις διαρροής χημικών στην απαγωγό εστία ο απαγωγός σφραγίζεται με το τζάμι και ενημερώνεται ο υπεύθυνος καθηγητής.
5. Στην περίπτωση, έστω και υποψίας ότι έπεσε επάνω σας υδροφθορικό οξύ, ενημερώστε αμέσως τον υπεύθυνο καθηγητή. Μην κάνετε πολλές κινήσεις διότι το οξύ αυτό είναι τόσο τοξικό και επικίνδυνο που εισχωρεί πολύ γρήγορα διαμέσου των ιστών. Ξεπλύνετε την επιφάνεια του δέρματός σας με άφθονο νερό για πάνω από 15 λεπτά.
6. Ιδιαίτερη προσοχή απαιτούν οι οργανικές ενώσεις. Οι περισσότερες είναι το-

ξικές και επικίνδυνες. Σε περίπτωση άμεσης επαφής με αυτές, ενημερώστε τον υπεύθυνο του εργαστηρίου.

7. Σε περίπτωση εισπνοής δηλητηριωδών ατμών, το άτομο θα πρέπει να μεταφέρεται σε ανοιχτό χώρο. Εάν υποπέσει στην αντίληψή σας ότι οι ατμοί αυτοί είναι όξινοι, μπορεί να γίνει ελαφρά χορήγηση αμμωνίας.
8. Σε περίπτωση όπου μεγάλη ποσότητα οξέος πέσει επάνω σε κάποιο άτομο, πολύ προσεκτικά και γρήγορα μεταφέρεται το άτομο έξω από το εργαστήριο,



Εικόνα 1: Μερικά από τα πιο βασικά σύμβολα επικινδυνότητας χημικών αντιδραστηρίων.

κάτω από τις ειδικές ντουζιέρες που υπάρχουν. Ρίξτε όλο το νερό για την αποφυγή ανεπανόρθωτων εγκαυμάτων.

9. Σε περιπτώσεις εγκαυμάτων με διάλυμα πικρικού οξέος ή και αιθανόλης κάνετε επάλειψη. Στη συνέχεια, χρησιμοποιήστε αλοιφή και επιδέστε το σημείο.
10. Εάν συμβεί κάποιο ατύχημα με σπασμένα γυαλιά, πλύνετε το τραύμα με νερό, αιθανόλη και αραιό οξυζενέ. Χρησιμοποιείτε γάζα και επίδεσμο.
11. Πάντα σε περιπτώσεις ατυχήματος, διατηρούμε την ψυχραιμία μας και ειδοποιούμε τον υπεύθυνο του εργαστηρίου.

Πρόσθετα μέτρα ασφαλείας

Για τη μείωση των πιθανοτήτων πρόκλησης ατυχημάτων στο εργαστήριο, είναι απαραίτητη η λήψη των ακόλουθων μέτρων ασφαλείας:

1. Η θέση της εργασίας θα πρέπει πάντα να είναι καθαρή και οργανωμένη.
2. Μην αγγίζετε πιπέτες οι οποίες δεν γνωρίζεται εάν έχουν χρησιμοποιηθεί.
3. Απαγορεύεται η χρήση φθαρμένων γαντιών.
4. Στις περιπτώσεις των πειραμάτων που χρησιμοποιούν πολύ τοξικές ενώσεις, είναι απαραίτητη η χρήση διπλών προστατευτικών γαντιών.
5. Μην αλλάζετε τις θέσεις των αντιδραστηρίων.
6. Απαγορεύεται αυστηρά η χρήση σιφωνίων με ελαττωματικά πουάρ.
7. Απαγορεύεται αυστηρά η αναρρόφηση των χημικών σε σιφώνιο με την χρήση του στόματος.
8. Χρησιμοποιήστε πάντα τις απαιτούμενες ποσότητες των αντιδραστηρίων και όχι μεγαλύτερες από αυτές. Τα πειράματα είναι σχεδιασμένα και έχουν ελεγχθεί για την ασφάλειά τους.
9. Μην βάζετε σιφόνια ή πιπέτες στις φιάλες των αντιδραστηρίων.
10. Μην επιστρέφετε χημικά τα οποία σας περίσσεψαν στις αντίστοιχες φιάλες. Ενημερώστε τον υπεύθυνο καθηγητή.
11. Απαγορεύεται αυστηρά η εισπνοή, η κατάποση και κάθε είδους οργανοληπτικός έλεγχος των χημικών.
12. Οι φιάλες των αντιδραστηρίων όταν δεν χρησιμοποιούνται πρέπει να είναι κλεισμένες.
13. Απαγορεύεται η χρήση ελαττωματικών ηλεκτρικών συσκευών.
14. Στις περιπτώσεις χρήσης γουδιού, το γουδί θα πρέπει να καλύπτεται.

15. Απαγορεύεται τα στόμια δοκιμαστικών σωλήνων να είναι στραμμένα σε εσάς και τους γύρω σας.
16. Απαγορεύεται η ρίψη ενώσεων και διαλυμάτων στον νεροχύτη.
17. Μην χρησιμοποιείτε σπασμένα γυάλινα σκεύη.

I

Παρασκευή και μελέτη ρυθμιστικών διαλυμάτων



«Η ζωή δεν είναι μία πάλη ενάντια στην αμαρτία, στη δύναμη του χρήματος και σε κακόβουλα ζώα, αλλά ενάντια στα ιόντα υδρογόνου»

H.L. Mencken

I. Εισαγωγή

Η σημασία των ιόντων υδρογόνου, στους οργανισμούς είναι τεράστια παρόλο που υπάρχουν σε πολύ μικρές ποσότητες (40 nEq/L) στο πλάσμα του αίματος, συγκριτικά με τα άλλα ιόντα Na^+ , K^+ ($\text{Na}^+ = 140.000.000 \text{ nEq/L}$, $\text{K}^+ = 4.000.000 \text{ nEq/L}$). Η ρύθμιση τους για τον οργανισμό είναι από τις πρώτες προτεραιότητες. Μια από τις μεθόδους που χρησιμοποιούνται για την εξουδετέρωση οξέων που παράγονται από τον οργανισμό είναι τα ρυθμιστικά διαλύματα.

Η σημασία των ρυθμιστικών διαλυμάτων σε πολλούς τομείς της επιστήμης είναι αδιαμφισβήτητη. Έρευνες αναφορικά με βιολογικά μακρομόρια (π.χ. DNA) αποδεικνύουν ότι μια σημαντική αλλαγή στο pH μπορεί να αποδιατάξει τη μοριακή δομή. Πιο συγκεκριμένα, πρωτονίωση ή αποπρωτονίωση λειτουργικών ομάδων μπορούν δυνητικά να εκκινήσουν επιβλαβείς αντιδράσεις. Γίνεται αντιληπτό, πως στα βιολογικά συστήματα είναι αδήριτη ανάγκη να μετριάζονται οι αλλαγές στο pH. Για το λόγο αυτό χρησιμοποιούνται ρυθμιστικά διαλύματα (buffer).

Ορισμός ρυθμιστικών διαλυμάτων

Ρυθμιστικά διαλύματα ονομάζονται τα υδατικά διαλύματα που έχουν την ιδιότητα να διατηρούν το pH τους πρακτικά σταθερό, όταν προστεθεί σε αυτά μικρή αλλά υπολογίσιμη ποσότητα ισχυρού οξέος ή ισχυρής βάσης. Επίσης, ένα ρυθμιστικό διάλυμα μπορεί να αραιωθεί μέσα σε κάποια όρια, χωρίς να μεταβληθεί το pH του.

Κάθε ρυθμιστικό διάλυμα περιέχει ένα διάλυμα ασθενούς οξέος ή μιας ασθενούς βάσης και ενός άλατος του οξέος ή της βάσης αντίστοιχα. Έτσι, σε κάθε ρυθμιστικό διάλυμα περιέχεται ένα συζυγιακό σύστημα ασθενούς οξέος-ασθενούς βάσης με παραπλήσιες τιμές συγκεντρώσεων. Οι συγκεντρώσεις των συστατικών του διαλύματος πρέπει να είναι συγκρίσιμες (δηλαδή σχετικά υψηλές, 0,1 M - 1 M), ώστε το διάλυμα να έχει σημαντική ρυθμιστική ικανότητα, δηλαδή μεγάλη αντοχή στις μεταβολές pH που προκαλούνται λόγω προσθήκης οξέος, βάσης ή κατά την αραιώση.

Ένα ρυθμιστικό διάλυμα αντιστέκεται σε μεταβολές του pH, όταν προστεθεί περιορισμένη ποσότητα ισχυρού οξέος ή ισχυρής βάσης, διότι «καταναλώνει» το οξύ ή τη βάση που προστίθεται. Η όξινη μορφή του συζυγούς ζεύγους εξουδετερώνει τις προστιθέμενες βάσεις, ενώ η βασική μορφή του συζυγούς ζεύγους εξουδετερώνει τα προστιθέμενα οξέα.

2. Θεωρία

Υπολογισμός pH ενός ρυθμιστικού διαλύματος – Εξίσωση Henderson-Hasselbalch

Η εξίσωση Henderson-Hasselbalch αποτελεί τη βάση για τον υπολογισμό του pH σε ένα ρυθμιστικό διάλυμα. Ας θεωρήσουμε ένα ασθενές οξύ, HA.



Εξ ορισμού της σταθεράς ισορροπίας, K_a , έχουμε ότι:

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

Λογαριθμίζοντας και τα δύο μέλη της εξίσωσης θα έχουμε:

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

$$\Rightarrow \log K_a = \log \frac{[\text{H}^+][\text{A}^-]}{[\text{HA}]} \quad (\text{Ισχύει } \log(xy) = \log(x) + \log(y))$$

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

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

Εξίσωση Henderson-Hasselbalch για ασθενές οξύ (1):

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

Εάν ένα διάλυμα παρασκευάζεται από μια ασθενής βάση B και το συζυγές της οξύ, τότε η ανάλογη εξίσωση είναι:

Εξίσωση Henderson-Hasselbalch για ασθενή βάση (2):

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

όπου, το $\text{p}K_a$ αντιστοιχεί στο ασθενές οξύ BH^+ .

Παρατηρούμε ότι:

- Η σταθερά ισορροπίας K_a αντιστοιχεί στο οξύ που εμφανίζεται στον παρονομαστή και στις δύο εξισώσεις.

- Η βάση (A^- ή B) εμφανίζεται στον αριθμητή και στις δύο εξισώσεις.
- Εάν $[A^-] = [HA]$, τότε $pH = pK_a$.

Για να ισχύουν οι παραπάνω εξισώσεις θα πρέπει να πληρούνται οι εξής προϋποθέσεις:

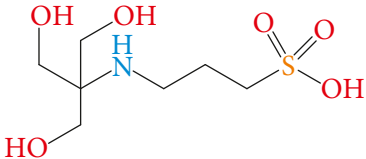
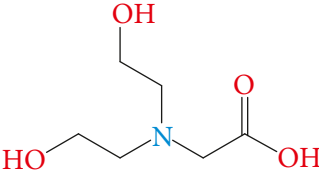
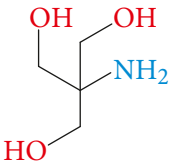
- Η συγκέντρωση του οξέος HA , στην κατάσταση ισορροπίας, θα πρέπει να είναι περίπου ίση την αρχική συγκέντρωση του οξέος.
- Η συγκέντρωση της συζυγούς βάσης A^- , στην κατάσταση ισορροπίας, θα πρέπει να είναι περίπου ίση με την αρχική συγκέντρωση της βάσης.

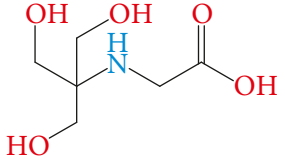
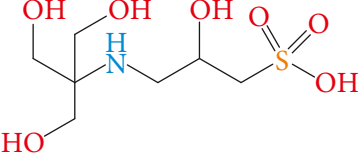
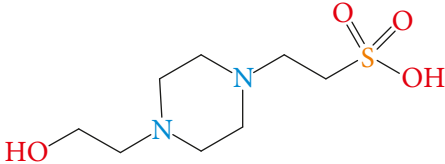
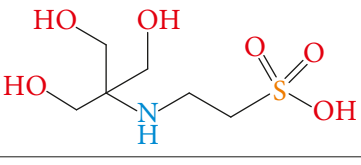
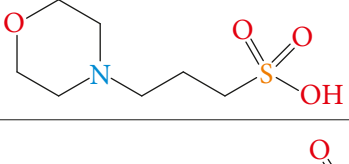
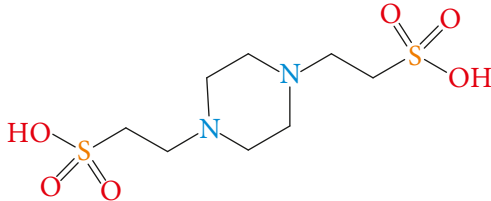
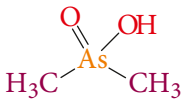
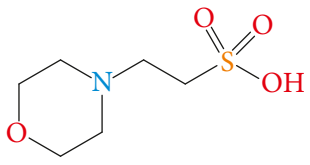
Δηλαδή, οι συγκεντρώσεις των HA και A^- δεν πρέπει να μεταβάλλονται. Αυτό, δεν ισχύει σε πολύ αραιά διαλύματα και σε ακραίες τιμές του pH .

Κριτήρια επιλογής ρυθμιστικού διαλύματος

Όταν ένα βιοχημικό σύστημα, π.χ. ένα κύτταρο, απομακρύνεται από το φυσικό του περιβάλλον, παραμένει σταθερό μόνο αν οι συνθήκες του pH πλησιάζουν τις αρχικές του συνθήκες pH . Ένα ρυθμιστικό διάλυμα, αποτελεί συνήθως την καλύ-

Πίνακας 1: Τα πιο συνηθισμένα ρυθμιστικά διαλύματα. Αναγράφεται το όνομα, η δομή, η τιμή του pK_a στους $25^\circ C$, ο λόγος dpH/dT (K^{-1}), δηλαδή πόσο εύκολα μεταβάλλεται το pH ανάλογα με τη μεταβολή στη θερμοκρασία και το μοριακό βάρος.

Buffer	Δομή	pK_a στους $25^\circ C$	dpH/dT (K^{-1})	Μοριακό Βάρος
TAPS		8,43	-0,018	243,3
Bicine		8,35	-0,018	163,2
Tris		8,06	-0,028	121,14

Tricine		8,05	-0,021	179,2
TAPSO		7,635		259,3
HEPES		7,48	-0,014	238,3
TES		7,40	-0,020	229,20
MOPS		7,20	-0,015	209,3
PIPES		6,76	-0,008	302,4
Cacodylate		6,27		138,0
MES		6,15	-0,011	195,2

τερη λύση για τη διατήρηση των συνθηκών pH του φυσικού περιβάλλοντος του κυττάρου. Συνήθως το εύρος pH το οποίο απαιτείται από ένα βιοχημικό σύστημα είναι 6-8, όμως αυτό δεν σημαίνει πως καμιά φορά υπάρχει ανάγκη για ρύθμιση σε όλο το εύρος pH (2-12). Είναι κατανοητό, πως είναι αδύνατον ένα μόνο συζυγιακό ζεύγος να είναι αποτελεσματικό σε ένα μεγάλο εύρος. Όμως, υπάρχουν ρυθμιστικά που δρουν αποτελεσματικά σε τμήματα του παραπάνω εύρους. Αυτής της κατηγορίας ρυθμιστικά είναι εκείνα που έχουν περισσότερες από μία τιμές pK_a , π.χ. φωσφορικά, κιτρικά. Ειδικά τα φωσφορικά, χρησιμοποιούνται κατά κόρον, καθώς αποτελούν φυσικό συστατικό των κυτταρικών συστημάτων. Παρόλα αυτά, έχουν αξιοσημείωτα μειονεκτήματα όπως ότι παρεμποδίζουν κάποιες ενζυμικές διεργασίες, δεσμεύουν κατιόντα ασβεστίου ή μαγνησίου, και το εύρος ρύθμισης pH είναι περιορισμένο (6,5-7,5).

Προκειμένου να επιλέξουμε ένα αποτελεσματικό ρυθμιστικό διάλυμα θα πρέπει να λάβουμε υπ' όψιν ότι όταν το pH ταυτίζεται με το pK_a του ρυθμιστικού, η ρυθμιστική ικανότητα είναι μέγιστη. Κάθε ρυθμιστικό διάλυμα έχει ένα εύρος pH αποτελεσματικότητας. Θεωρείται χρήσιμο να μην αποκλίνουμε πολύ από τις τιμές pK_a . Συγκεκριμένα, τιμές pH ίσες με $pK_a \pm 1$ είναι αποδεκτά όρια απόκλισης.

Επιπλέον, αξίζει να σημειώσουμε πως η θερμοκρασία μπορεί να επηρεάσει την αποτελεσματικότητα των ρυθμιστικών διαλυμάτων. Η βέλτιστη απόδοση υπάρχει όταν τα ρυθμιστικά διαλύματα παρασκευάζονται στη θερμοκρασία που πρόκειται να χρησιμοποιηθούν. Για παράδειγμα εάν αυξήσουμε τη θερμοκρασία του Bicine κατά ένα βαθμό κελσίου τότε το pH του θα ελαττωθεί κατά 0,018.

Ρυθμιστικά διαλύματα Good:

Ο Norman Good και οι συνεργάτες του, το 1966-1980 μελέτησαν διάφορα επαμφοτερίζοντα ρυθμιστικά, τα περισσότερα εκ των οποίων ερευνήθηκαν για πρώτη φορά (MES, ADA, BES, Bicine). Στην προσπάθειά τους να καταλήξουν στην ορθή επιλογή ρυθμιστικών διαλυμάτων για τα βιολογικά συστήματα, διατύπωσαν ορισμένα κριτήρια, τα οποία αναφέρονται παρακάτω.

- pK_a : Οι περισσότερες βιολογικές αντιδράσεις λαμβάνουν χώρα σε pH 6-8. Επομένως, ένα καλό ρυθμιστικό θα πρέπει να έχει pK_a σε αυτό το εύρος τιμών pH, ώστε να έχει μέγιστη ρυθμιστική ικανότητα.
- Διαλυτότητα στο H_2O : Τα βιολογικά συστήματα βρίσκονται σε υδατικά διαλύματα, επομένως απαιτείται καλή διαλυτότητα του ρυθμιστικού στο νερό.
- Αδιαπερατότητα στις βιολογικές μεμβράνες: Ιδανικά, ένα ρυθμιστικό διάλυμα δεν θα πρέπει να διέρχεται από τις βιολογικές μεμβράνες, ώστε να μην συσσωρεύεται το buffer εντός του κυττάρου.
- Ελάχιστες επιδράσεις από τυχόν σχηματισμούς άλλων ενώσεων. Για παράδειγμα σύμπλοκα ρυθμιστικού – μεταλλικών ιόντων πρέπει να είναι ανύπαρ-

κτα ή ευδιάλυτα, ώστε να μην διαταράσσεται η ισορροπία στα βιολογικά συστήματα.

- Σταθερότητα: Τα ρυθμιστικά διαλύματα πρέπει να είναι σταθερά, για να αντιστέκονται στις ενζυμικές δραστηριότητες (π.χ. αποικοδόμηση).
- Βιοχημική αδράνεια: Τα ρυθμιστικά διαλύματα δεν θα πρέπει να συμμετέχουν ή να παρεμβαίνουν στις βιοχημικές αντιδράσεις.
- Οπτική απορρόφηση: Τα ρυθμιστικά διαλύματα δεν θα πρέπει να απορροφούν ορατό ή υπεριώδες φως σε μήκος κύματος μεγαλύτερο από 230nm για να μην εμποδίζουν την φασματοφωτομετρική ανάλυση.
- Άμεσα διαθέσιμα και σε καθαρή μορφή.

Τα κυριότερα ρυθμιστικά, αναγράφονται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 2: Μερικά ρυθμιστικά διαλύματα του Good. Αναγράφεται το όνομα, η τιμή του pK_a στους $20^\circ C$, η τιμή $\Delta pK_a / ^\circ C$, δηλαδή πόσο εύκολα μεταβάλλεται το pK_a ανάλογα με τη μεταβολή στη θερμοκρασία και η συγκέντρωση των ενώσεων στο νερό στους $0^\circ C$.

Buffer	pK_a στους $20^\circ C$	$\Delta pK_a / ^\circ C$	Συγκέντρωση στο νερό στους $0^\circ C$
ACES	6,76	–	–
ACES	6,88	–0,020	0,22 M
ADA	6,62	–0,011	–
BES	7,17	–0,016	3,2 M
Bicine	8,35	–0,018	1,1 M
Choline chloride	7,10	–0,027	4,2 M (ως HCl)
DIPSO	7,6	–0,015	0,24 M
EPS	8,0	–	–
Glycinamide	8,2	–0,029	6,4 M (ως HCl)
Glycylglycine	8,2	–	–
HEPES	8,3	–	–
HEPES	7,55	–0,014	2,25 M
MES	6,15	–0,011	0,65 M
PIPES	6,82	–0,0085	–

3. Πειραματικό μέρος

Στόχοι πειράματος

Στόχος του πειράματος αυτού είναι η σωστή επιλογή και παρασκευή ρυθμιστικών διαλυμάτων. Επιπρόσθετα, μέσω της αραίωσης, της προσθήκης οξέων και βάσεων μελετάται η επίδραση στο pH των διαλυμάτων με και χωρίς ρύθμιση.

Απαραίτητα υλικά και συσκευές

- ▶ Στερεά αντιδραστήρια ρυθμιστικών διαλυμάτων
- ▶ Πρότυπα ρυθμιστικά διαλύματα με pH 4, pH 7 και pH 10
- ▶ Υδατικό διάλυμα NaOH συγκέντρωσης $C = 1\text{ M}$
- ▶ Υδατικό διάλυμα HCl συγκέντρωσης $C = 1\text{ M}$
- ▶ pH-μετρα

Πειραματική διαδικασία

Στο πρώτο μέρος του πειράματος αυτού πραγματοποιείται η παρασκευή ενός ρυθμιστικού διαλύματος όγκου $V = 100\text{ ml}$ και συγκέντρωσης $C = 0,1\text{ M}$ (**διάλυμα Α**) με τη διάλυση του κατάλληλου στερεού σε νερό. Η επιλογή του στερεού γίνεται με βάση το pH που πρέπει να έχει το ρυθμιστικό διάλυμα.

Αρχικά υπολογίζεται η μάζα του στερεού που απαιτείται για την παρασκευή του παραπάνω διαλύματος. Η ποσότητα αυτή διαλύεται σε 60 ml απιονισμένου νερού. Πρίν από τη μέτρηση του pH είναι απαραίτητη η βαθμονόμηση του pH-μέτρου (calibration), χρησιμοποιώντας πρότυπα ρυθμιστικά διαλύματα. Συνηθέστερα, επιλέγονται δυο ρυθμιστικά διαλύματα με τιμές pH μία χαμηλότερη και μία υψηλότερη από το pH που πρότεται να προσδιοριστεί. Το πρότυπο ρυθμιστικό διάλυμα τοποθετείται σε ένα μικρό ποτήρι ζέσεως ή σε πλαστικό σωλήνα (FALCON) και αναδεύεται ήπια με τη βοήθεια ενός μικρού μαγνήτη. Αξίζει να σημειωθεί ότι δεν θα πρέπει ο μαγνήτης ανάδευσης να χτυπάει στο ηλεκτρόδιο του pH-μέτρου.

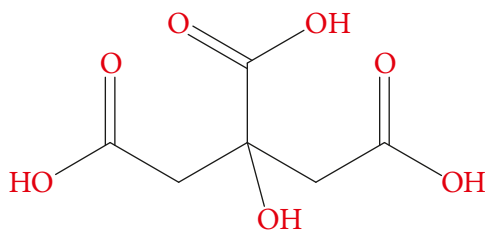
Ακολούθως, το διάλυμα που παρασκευάζεται τοποθετείται πάνω στον μαγνητικό αναδευτήρα και με την χρήση των υδατικών διαλυμάτων NaOH και HCl συγκεντρώσεων $C = 1\text{ M}$, τιτλοδοτείται μέχρι το επιθυμητό pH. Θα πρέπει η προσθήκη του οξέος ή της βάσης να γίνεται στάγδην λόγω της υψηλής συγκέντρωσής τους. Σταδιακά, ένα μέρος του ασθενούς οξέος μετατρέπεται στη συζυγή του βάση ή αντίστροφα, ένα μέρος της ασθενούς βάσης μετατρέπεται στο συζυγές οξύ. Τελικά, η σωστή αναλογία τους θα δώσει το επιθυμητό pH. Έπειτα, προστίθεται νερό έως ότου ο όγκος του διαλύματος να φτάσει περίπου 98-99 ml. Το pH ελέγχεται και πάλι για τυχόν μικρές μεταβολές του. Η τυχόν διόρθωση του pH

θα πρέπει να γίνει στο σημείο αυτό χρησιμοποιώντας αραιότερο διάλυμα οξέος ή βάσης σε σχέση με πριν. Τέλος, ο όγκος του διαλύματος ρυθμίζεται στα 100 ml. Το διάλυμα μεταφέρεται σε κατάλληλο μπουκάλι με συμπληρωμένα τα στοιχεία του, δηλαδή, το όνομα, τη συγκέντρωση, το pH, την ημερομηνία παρασκευής του, καθώς και το όνομα του παρασκευαστή του.

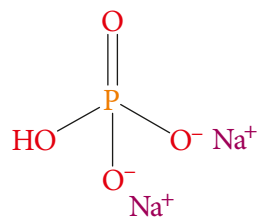
Στο δεύτερο μέρος του πειράματος λαμβάνει χώρα η μελέτη της επίδρασης της συγκέντρωσης στο pH του διαλύματος. Για τον σκοπό αυτό, σε ένα μικρό ποτήρι ζέσεως εισάγονται 10 ml του ρυθμιστικού διαλύματος που παρασκευάστηκε (**διάλυμα Α**) και λαμβάνει χώρα αραίωση, έτσι ώστε η συγκέντρωση του διαλύματος να γίνει ίση με $C=0,01\text{ M}$ (**διάλυμα Β**). Έπειτα σε άλλο ποτήρι ζέσεως μεταφέρονται 10 ml από το νέο ρυθμιστικό διάλυμα (**διάλυμα Β**) και αραιώνονται μέχρι η συγκέντρωση του διαλύματος να γίνει ίση με $C=0,001\text{ M}$ (**διάλυμα Γ**). Τέλος,

Πίνακας 3: Το μοριακό βάρος και οι σταθερές pK_a (στους 25°C) των προτεινόμενων ενώσεων για την παρασκευή των ρυθμιστικών διαλυμάτων.

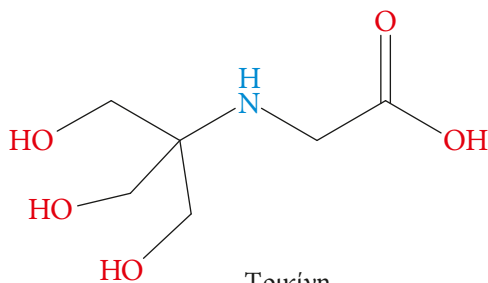
Ένωση	pK_{a1}	pK_{a2}	pK_{a3}	Μοριακό βάρος (g/mol)
Κιτρικό οξύ	3,13	4,76	6,39	192,12
Όξινο φωσφορικό νάτριο	2,12	7,21	12,32	141,96
Τρικίνη	2,30	8,15	–	179,17



Κιτρικό οξύ



Όξινοφωσφορικό νάτριο



Τρικίνη

Σχήμα 1: Οι δομές των ενώσεων του κιτρικού οξέος, του όξινου φωσφορικού νατρίου και της τρικίνης.

μετρώνται τα pH των αραιωμένων (**διαλύματα Β και Γ**), καθώς και του πυκνού διαλύματος (**διάλυμα Α**).

Στο τρίτο και τελευταίο μέρος του πειράματος πραγματοποιείται η μελέτη της ρυθμιστικής ικανότητας των παρασκευασμένων διαλυμάτων. Για τον λόγο αυτό, 70 ml από το ρυθμιστικό διάλυμα Α, συγκέντρωσης $C = 0,1 \text{ M}$ εισάγονται σε ποτήρι ζέσεως των 100 ml. Για τα ρυθμιστικά διαλύματα με pH μικρότερο από το pK_a προστίθενται 0,5 ml υδατικού διαλύματος NaOH συγκέντρωσης $C = 1 \text{ M}$. Αντίθετα, για τα ρυθμιστικά διαλύματα με pH μεγαλύτερο από το pK_a , προστίθενται 0,5 ml υδατικού διαλύματος HCl συγκέντρωσης $C = 1 \text{ M}$. Μετράται το pH πριν και μετά από την προσθήκη της βάσης ή του οξέος. Η ίδια διαδικασία επαναλαμβάνεται χρησιμοποιώντας νερό αντί για το ρυθμιστικό διάλυμα.

4. Ερωτήματα αναφοράς

1. Να γράψετε αναλυτικά τους υπολογισμούς που κάνατε για την απαιτούμενη ποσότητα του ρυθμιστικού αντιδραστηρίου.
2. Σημειώστε τις μετρήσεις pH των διαλυμάτων που παρασκευάσατε.
3. Διαθέτουμε υδατικό διάλυμα (Δ_1) CH_3COOH συγκέντρωσης 0,5 M. Θέλουμε να παρασκευάσουμε ρυθμιστικό διάλυμα CH_3COOH με $\text{pH} = 5$.
 - α) Πόσα mol NaOH πρέπει να προσθέσουμε σε 300 mL του διαλύματος Δ_1 χωρίς μεταβολή του όγκου;
 - β) Πόσα mL διαλύματος (Δ_2) CH_3COONa 0,5 M πρέπει να αναμείξουμε με το Δ_1 ώστε να παρασκευαστούν 900 mL του ρυθμιστικού διαλύματος;
Η σταθερά ιοντισμού του CH_3COOH είναι $K_a = 2 \times 10^{-5}$.
4. Ρυθμιστικό διάλυμα έχει όγκο 1 L και περιέχει CH_3NH_2 0,5 M και $\text{CH}_3\text{NH}_3\text{Cl}$ 1 M.
 - α) Να βρείτε το pH του διαλύματος και το βαθμό ιοντισμού της CH_3NH_2 στο διάλυμα.
 - β) Στο διάλυμα αυτό προσθέτουμε μικρή ποσότητα ισχυρού ηλεκτρολύτη οπότε ο βαθμός ιοντισμού της CH_3NH_2 διπλασιάζεται. Να βρείτε αν προσθέσαμε NaOH (ισχυρή βάση) ή HCl (ισχυρό οξύ), καθώς και την ποσότητα που προστέθηκε. Η προσθήκη του ισχυρού ηλεκτρολύτη δε μεταβάλλει τον όγκο του διαλύματος. Η σταθερά ιοντισμού της CH_3NH_2 είναι $K_b = 2 \times 10^{-4}$.
5. Διαθέτουμε τα παρακάτω υδατικά διαλύματα:
(Δ_1): HA 0,8 M και όγκου 1 L (HA ασθενές οξύ)
(Δ_2): NaA 1 M και όγκου 1 L

Η σταθερά ιοντισμού του HA είναι $K_a = 3 \times 10^{-5}$.

Να βρείτε το μέγιστο όγκο ενός ρυθμιστικού διαλύματος με $\text{pH} = 5$ που μπορεί να παρασκευαστεί από τα δύο παραπάνω υδατικά διαλύματα.

5. Βιβλιογραφία

1. Butler, J. N. (1964). *Ionic Equilibrium: A Mathematical Approach*. Addison-Wesley.
2. Hulanicki, A. (1987). *Reactions of acids and bases in analytical chemistry*.
3. Carmody, Walter R. (1961). "Easily prepared wide range buffer series". *J. Chem. Educ.* **38** (11): 559-560.
4. Alderighi, L.; Gans, P.; Ienco, A.; Peters, D.; Sabatini, A.; Vacca, A. (1999). "Hyperquad simulation and speciation (HySS): a utility program for the investigation of equilibria involving soluble and partially soluble species". *Coordination Chemistry Reviews*. **184** (1): 311-318.
5. McIlvaine, T. C. (1921). "A buffer solution for colorimetric comparison". *J. Biol. Chem.* **49** (1): 183-186.
6. Mendham, J.; Denney, R. C.; Barnes, J. D.; Thomas, M. J. K. (2000), *Vogel's Quantitative Chemical Analysis* (6th ed.), New York: Prentice Hall.
7. Bates, Roger G. *Determination of pH: theory and practice*. Wiley, 1973.
8. Feldman, Isaac (1956). "Use and Abuse of pH measurements". *Analytical Chemistry*. **28** (12): 1859-1866.
9. Nørby, Jens (2000). "The origin and the meaning of the little p in pH". *Trends in the Biochemical Sciences*. **25** (1): 36-37.
10. Lim, Kieran F. (2006). "Negative pH Does Exist". *Journal of Chemical Education*. **83** (10): 1465.