

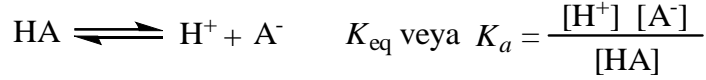
# DENEY 7 TAMPON ÇÖZELTİLER, TAMPON KAPASİTESİ ve TAMPONLAMA BÖLGESİ

## 7.1. AMAÇ

- Bir tampon çözeltinin nasıl hazırlandığını öğrenmek.
- Bir tampon çözeltinin tampon kapasitesini belirlemek.
- Bir tampon çözeltinin tamponlama bölgesini belirlemek.

## 7.2. TEORİ

**Tampon** çözeltiler, az miktarda asit veya baz eklendiği zaman pH'ındaki değişimlere direnç gösteren sulu sistemlerdir. Tampon çözeltiler, zayıf bir asit (proton verici) ve onun konjuge bazından (proton alıcı) oluşur. Tamponlama, bir çözeltideki, bir proton vericisi (HA) ve onun konjuge proton alıcısı (A<sup>-</sup>) arasındaki denge reaksiyonundan kaynaklanır.



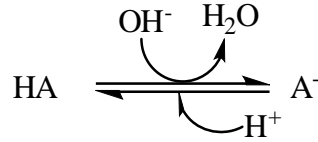
Verilen herhangi bir tamponun pH'sı, **Henderson-Hasselbalch eşitliği** vasıtasıyla, içerdiği zayıf asidin pK<sub>a</sub>'sı ve onun konjuge bazının mol oranının logaritması ile ilişkilendirilmektedir:

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

Daha genel olarak şöyle yazılır,

$$\text{pH} = \text{pK}_a + \log \frac{[\text{proton acceptor}]}{[\text{proton donor}]}$$

Bir tampona H<sup>+</sup> veya OH<sup>-</sup> eklendiğinde sonuç, zayıf asidin ve onun anyonunun rölatif (göreceli) konsantrasyonlarının oranındaki küçük bir değişimdir ve böylece pH'da küçük bir değişim olur. Sistemin bir bileşeninin konsantrasyonundaki düşüş, bir diğerindeki artış ile tamamıyla dengelenmiş olur. Tampon bileşenlerinin toplamı değişmez, sadece oranları değişir.



**Tampon kapasitesi**, genellikle tampon çözeltinin konsantrasyonuna bağlıdır. Yüksek konsantrasyondaki tamponlar daha yüksek tamponlama kapasitesine sahiptir. Diğer bir deyişle, pH, tampon bileşenlerinin tam konsantrasyonuna bağlı değildir ancak oranlarına bağlıdır. *Tampon kapasitesi, verilen bir tamponun eklenen asit veya baza karşı pH'ındaki değişimlere direnç gösterme yeteneğini tanımlamak için kullanılan bir terimdir.* Bir litre tampona bir mol asit veya alkali (baz) eklendiği zaman tampon kapasitesi bir (1) olur ve pH bir birim değişir.

**Tamponlama Bölgesi:** Her konjuge asit-baz çifti, etkili bir tamponu oluşturan karakteristik bir pH bölgesine sahiptir. HA ve A<sup>-</sup> arasındaki denge yüzünden oluşan tamponlamadan dolayı, bu denge çoğunlukla pH değerlerinin pK<sub>a</sub> ± 1'e eşit olmasıyla tespit edilir.

**Sıcaklık katsayısı (ΔpK<sub>a</sub>/°C) değerleri:** Bir tamponun pK<sub>a</sub>'sı ve dolayısıyla pH'sı sıcaklıkla çok az değişir. Sıcaklık ve aktivitenin matematiksel ilişkisi karmaşık olabilmesine rağmen, sıcaklıkla pK<sub>a</sub>'nın gerçek değişimi yaklaşık olarak lineerdir. Tablo 7.1, biyolojik deneylerde çoğunlukla kullanılan seçilmiş çeşitli tamponların pK<sub>a</sub> ve ΔpK<sub>a</sub>/°C değerlerini göstermektedir.

**Tablo 7.1. Biyolojik çalışmalarda kullanılan bazı tampon çözeltiler**

Common Name	Molecular Weight	pK <sub>a</sub> at 25°C <sup>a</sup>	ΔpK <sub>a</sub> /Δ°C
MES	195.2	6.15	-0.011
PIPES	324.3	6.80	-0.0085
Imidazole	68.1	7.00	-0.020
MOPS	231.2	7.20	-0.013
TES	251.2	7.50	-0.020
HEPES	260.3	7.55	-0.014
HEPPS	252.3	8.00	-0.015
Tricine	179.2	8.15	-0.021
Tris	121.1	8.30	-0.031
CHES	207.3	9.50	-0.029
CAPS	221.3	10.40	-0.032

<sup>a</sup>Values listed for the buffers at an infinite dilution.

Çoğu biyokimyasal deney pH'dan etkilenir ve pek çok biyokimyasal deney sistemi pH'sının kontrol edilmesi gerekliliği bu sebeptendir. Bunu başarmanın genel bir yolu, bu deneyleri tampon sistemlerinde gerçekleştirmektir. Bu yüzden, biyokimyasal deneyimler genellikle tampon hazırlamayı gerektirir. Bu deneyin amacı, istenen pH'da bir asetik asit-sodyum asetat tamponunu size hazırlatarak tampon hazırlanmasını göstermektir.

İstenen pH'da bir tampon hazırlamak için, uygun miktarlarda zayıf bir asit ve onun konjuge bazını içeren bir çözeltiyi hazırlamak gerekir.

Tampon hazırlamanın bir yolu, uygun bir zayıf asit ve onun konjuge bazının gerekli miktarlarını karıştırmaktır. Bir diğer yol, zayıf bir asitten çıkarak onun konjuge bazını güçlü bir baz ekleyerek oluşturmayı veya tersine, konjuge bir bazdan çıkılıp güçlü bir baz ekleyerek zayıf bir asit oluşturmayı kapsar. Eğer bir pH metre kullanılabilirse, uygun karışım tampon hazırlanması için kullanılabilir çözeltilerin karıştırılmasıyla “deneme-yanılma”yla da elde edilebilir. Ancak, pH metrenin bulunmadığı durumlarda sahip değinilse veya bu yaklaşım kullanılmak istenmezse, kullanılan maddelerin uygun miktarları biyokimyasal el-kitaplarından veya Henderson-Hasselbalch eşitliğinden hesaplanarak bulunabilir. Bu deneyde sonraki yaklaşım (Henderson-Hasselbalch eşitliği) kullanılacaktır.

### 7.3. MADDE VE MALZEMELER

Malzemeler	Kimyasallar
pH Metre	1 M Asetik Asit Çözeltisi
Büret ve Büret Tutucu	1 M Sodyum Asetat Çözeltisi
Manyetik Karıştırıcı	1 M Sodyum Hidroksit(NaOH) Çözeltisi
İki Ayaklı Stant	
250 mL beher	
100 mL mezür	
Cam pipet	
Distile su	

## 7.4. DENEYİN YAPILIŞI

Bir titrasyon düzeneği bir manyetik karıştırıcı, beher ve büret (veya pipet) ile birlikte uygun bir stanttan oluşur (Şekil 7.3).



Şekil 7.1. pH Titrasyonu için kullanılan deney düzeneği

**pH 5.0 olan 0.1 M 100 mL'lik Asetik Asit-Sodyum Asetat tamponunu** hazırlayınız. Böyle bir tamponun 100 mL'sindeki asetik asit ve asetat iyonlarının miktarlarını hesaplamak için Henderson-Hasselbalch eşitliğini kullanınız:

- 1) Size sağlanacak **1 M asetik asit ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ ) ve 1 M sodyum asetat ( $\text{CH}_3\text{COONa}$ ) çözeltilerinin** uygun miktarlarını karıştırarak, **bu tamponun 100 mL'lik örneğini hazırlayınız.**
- 2) **İstenen tamponun ikinci bir 100 mL'lik örneğini**, uygun miktarlardaki **asetik asit** ve sağlanacak **1 M sodyum hidroksit ( $\text{NaOH}$ ) çözeltilerinden** alıp karıştırarak hazırlayınız. Not: Bu durumda asetik asidin doğru miktarıyla başladığımızdan emin olun. İki tampon örneğini hazırladıktan sonra **laboratuvar sorumlusu ile her birinin pH'sını kontrol ediniz.**

**Hazırladığınız tampon çözeltileri saklayın!**

**Tampon kapasitesi:** Bir tamponun amacı, çözeltiye ya asit ya da baz eklendiği zaman pH'daki değişimleri minimize etmektir. Bir tamponun pH değişimlerine direnme yeteneği tampon bileşenlerinin kesin konsantrasyonuna ve her birinin oranına bağlıdır. Verilen bir pH'da konsantre bir tampon, dilüe (seyreltilmiş) bir tampondan daha iyi bir tamponlama kapasitesine sahip olacaktır. Verilen bir konsantrasyonda bir tamponun tamponlama kapasitesi, tamponu hazırlamak için kullanılan asidin  $pK_a$ 'sı pH'sına eşit olduğu zaman maksimum olacaktır.

- 1) İki tampon örneğinizin pH'sını ölçtükten sonra **asetik asit-sodyum asetat tamponunuzun yaklaşık olarak 200 mL olacak şekilde birleştiriniz.**
- 2) 200 mL'lik tampon çözeltiden 20 mL alıp 100 mL'lik temiz bir erlene ilave edin. 100 mL'ye saf su ile tamamlayın ve iyice karıştırın. **Şimdi, konsantrasyonları 5 kat farklı olan iki tane tampon çözeltiye sahipsiniz.**
- 3) Hazırladığınız **seyreltilmemiş tampon çözeltiden** 25 mL alıp, temiz bir behere koyun. pH'sını pH metre ile ölçün. 1 mL 0.1 N NaOH ilave edip, iyice karıştırın ve pH'sını ölçün. 1 mL NaOH ilavesine, asetik asitin  $pK_a$  değerinin bir fazlasına çıkana kadar devam edin. Bu noktadan sonra pH, asetik asitin  $pK_a$  değerinin iki fazlasına çıkana kadar 0.5 mL NaOH ilave edip, pH'ı ölçün. (Asetik Asit için  $pK_a = 4.75$ ).
- 4) Hazırladığınız **seyreltilmiş tampon çözeltiden** 25 mL alıp, temiz bir behere koyun. pH'ını ölçün. **Seyreltilmemiş tampon çözeltinin pH'sıyla aynı mı?** 0.5 mL 0.1 N NaOH ilave edip, iyice karıştırın ve pH'sını ölçün. 0.5 mL NaOH ilavesine, asetik asitin  $pK_a$  değerinin yaklaşık olarak iki fazlasına çıkana kadar devam edin.
- 5) Hazırladığınız **seyreltilmemiş tampon çözelti** örneğinden 25 mL alıp, temiz bir behere koyun. pH'sını pH metre ile ölçün. 1 mL 0.1 N HCl ilave edip, iyice karıştırın ve pH'sını ölçün. 1 mL HCl ilavesine, asetik asitin  $pK_a$  değerinin bir eksiğine düşene kadar devam edin. Bu noktadan sonra pH, asetik asitin  $pK_a$  değerinin yaklaşık iki eksiğine düşene kadar 0.5 mL HCl ilave edip, pH'ı ölçün.
- 6) Son olarak, **seyreltilmiş tampon çözelti** örneğinden 25 mL alıp, temiz bir behere koyun. pH'sını pH metre ile ölçün. 0.5 mL 0.1 N HCl ilave edip, iyice karıştırın ve pH'sını ölçün. 0.5 mL HCl ilavesine, asetik asitin  $pK_a$  değerinin yaklaşık olarak iki eksiğine düşene kadar devam edin.

## 7.5. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

**Tablo 1. Hazırladığımız Tampon Çözeltilerin pH Değerleri**

Tampon Çözelti	pH
1	
2	

**Tablo 2. Seyreltilmemiş Tampon Çözeltinin Titrasyonu**

NaOH (0.1 N) Hacmi, mL	pH

**Tablo 3. Seyreltilmiş Tampon Çözeltinin Titrasyonu**

NaOH (0.1 N) hacmi, mL	pH

**Tablo 4. Seyreltilmemiş Tampon Çözeltinin Titrasyonu**

HCl (0.1 N) hacmi, mL	pH

**Tablo 5. Seyreltilmiş Tampon Çözeltinin Titrasyonu**

HCl (0.1 N) hacmi, mL	pH

## EK BİLGİLER:

### Bir tamponun Molaritesi ve İyonik Şiddeti:

Biyokimyasal literatürün kimisinde tampon çözeltiler molariteleri, kimisinde de iyonik şiddetleri bakımından tanımlanırlar. Sonuç olarak bu kavramların bilinmesi gerekir. Daha önemlisi ise iyonik şiddet kavramının öneminin farkında olmanın gerekliliğidir.

**Bir tampon çözeltinin molaritesi**, içindeki Bronsted asidi veya bazı ve onun konjuge bazı veya asidinin konsantrasyonlarının toplamı olarak tanımlanır. Örneğin, litresinde 0,045 mol asetik asit ve 0,055 mol sodyum asetat içeren bir asetik asit-asetat tamponunun molaritesi 0,100 olur.

İyonik şiddet kavramı molariteden iki yolla ayrıdır. Birincisi, iyonik türlerin çözeltide görüldüğü düşünülmesidir. İkincisi ise, bu iyonik türlerin hem konsantrasyonlarının hem de yüklerinin düşünülmesidir. Matematiksel olarak bir çözeltinin iyonik şiddeti ( $\mu$ ), aşağıdaki gibi tanımlanır:

$$\mu = \frac{1}{2} \sum c_i Z_i^2$$

$c_i$  “i” iyonunun konsantrasyonu,  $Z_i$  bu iyonunun yükünü ifade eder. Bu deneyde ve çoğu biyokimyasal literatürde  $\mu$  iyonik şiddeti belirtirken, biyokimyasal literatürde bu nicelik/kavram için sıklıkla “I” nın kullanımıyla da karşılaşılacaktır.

### ÖRNEK HESAPLAMA

- 0,1 M NaCl' ün **iyonik şiddeti** aşağıdaki gibi hesaplanabilir:
- 

$$\mu = \frac{1}{2} ([Na^+](1)^2 + [Cl^-](-1)^2)$$

$$\mu = \frac{1}{2} [(0.1)(1) + (0.1)(1)]$$

$$\mu = \frac{1}{2} (0.1 + 0.1) = 0.1$$

Bu durumda iyonik şiddet çözeltinin konsantrasyonuna eşit olur. Bu, tek değerlikli iyonlardan oluşan elektrolitlerin tüm çözeltileri için doğru olacaktır.

- 0.1 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>' ün iyonik şiddeti aşağıdaki gibi hesaplanabilir:

$$\mu = \frac{1}{2} ([NH_4](1)^2 + [SO_4](-2)^2)$$

$$\mu = \frac{1}{2} [(0.2)(1) + (0.1)(4)]$$

$$\mu = \frac{1}{2} (0.2 + 0.4) = 0.3$$

Bu durumda iyonik şiddet, sayısal olarak çözeltideki konsantrasyondan daha büyük olur. Bu, çok değerlikli iyonlardan oluşan elektrolitlerin tüm çözeltileri için doğru olacaktır.

İyonik şiddet kavramı yüklü maddeleri içeren sistemler için önemlidir çünkü, bu maddeler arasındaki çekme ve itme kuvvetleri çözeltinin iyonik gücü arttığı zaman azalacaktır. Örneğin, asetik asit için iyonlaşma sabiti çözeltinin iyonik şiddeti arttığında artar. Biyokimyada bunun daha belirgin önemi, yüklü çözünenler ve iyon değiştirme kromatografisinde kullanılan yüklü iyon değiştirici matrisin arasındaki etkileşimlerde, proteinlerdeki yüklü gruplar arasındaki molekül içi reaksiyonlarda ve yüklü maddelerle proteinlerin moleküller arası reaksiyonlarında görülür. Tüm bu etkileşimler iyonik şiddetteki etkileşimlerden etkilenirler.

## ÖRNEK HESAPLAMALAR

### Bölüm 1: Belirlenen pH'da bir tampon elde etmek için 1 M Asetik Asit, 1 M Sodyum Asetat ve suyun birleştirilmesi

Burada, iki eşitliği kullanacağız. Birincisi, Henderson-Hasselbalch eşitliğinin yeniden düzenlenmesidir:

$$\text{Eşitlik I: } 10^{(pH-pK_a)} = \frac{[A^-]}{[HA]} = \frac{(A^-)}{HA}$$

Eşitlik I bize, konjuge asit ve konjuge bazın (istenen pH ve ilgili asitin pK<sub>a</sub>'sı bakımından) konsantrasyonunun (veya ekvivalent olarak miktarlarını) gereken oranını verir. İkinci eşitlik aşağıdaki gibidir:

$$\text{Eşitlik II: } [HA] + [A^-] = 0.1 M$$



Eşitlik II basitçe, 0,1 M olması gereken konjuge asit ve konjuge bazın konsantrasyonlarının birleştirilmesini belirtir.

Burada, [HA] ve [A<sup>-</sup>]’den oluşan iki bilinmeyenli, iki adet denkleme ulaştığımızı dikkat ediniz:

Eşitlik I’den,

$$[A^-] = [HA] \times 10^{(pH-pK_a)}$$

Eşitlik II’de [A<sup>-</sup>] yerine konulduğunda,

$$[HA] + [HA](10^{(pH-pK_a)}) = [HA] \times (1 + 10^{(pH-pK_a)}) = 0.1M$$

[HA]’nın bulunması için yeniden düzenlenir,

$$[HA] = \frac{0.1M}{1 + 10^{(pH-pK_a)}}$$

Ve, bu eşitlik kullanılır:

$$[A^-] = 0.1 M - [HA]$$

Şimdi, asetik asidin bilinen (veya söylenen) pK<sub>a</sub>’sı 4,76 ve belli bir pH’daki (mesela, 4,06) tamponu hazırlamak için, kullanmamız gereken 1 M asetik asit ve 1 M sodyum asetat çözeltilerinden ne kadar alınması gerektiğini kolaylıkla bulabiliriz:

$$[HA] = \frac{0.1M}{1 + 10^{(-0.7)}} = \frac{0.1M}{1 + 0.20} = \frac{0.1M}{1.20} = 0.083M$$

$$[A^-] = 0.1 M - 0.083 M = 0.017 M$$

Bu konsantrasyonlar 100 mL’lik son çözeltildeki konsantrasyonlardır. Basit ancak bununla birlikte 1 M stok çözeltilerin hacimlerinin ne olacağını hesaplamak için verilen bu son konsantrasyonların kullanılması gerekir (N<sub>1</sub>.V<sub>1</sub>=N<sub>2</sub>.V<sub>2</sub> formülüyle).

## **Bölüm II: Aynı pH ve konsantrasyondaki tamponun 1 M asetik asit, 1 M sodyum hidroksit ve su kullanılarak hazırlanması**

Hazırlanacak bu tampon çözeltildeki asetat iyonunun tamamının asetik asitten geleceğini düşündüğümüzde (asetik asite NaOH eklenerek oluşturulacaktır), hesaplamalar temel olarak

yukarıda verilen birinci örnektekiyle aynıdır. NaOH, asetik asit ve suyun henüz belirlenmemiş miktarlarını bulabilmek için aynı iki eşitliği kullanmamız gerekir:

$$10^{(pH-pK_a)} = \frac{[A^-]}{[HA]} = \frac{(A^-)}{HA} \quad (\text{Eşitlik 1})$$

$$[HA] + [A^-] = 0.1 M \quad (\text{Eşitlik 2})$$

Böylece, son çözeltideki bazın asite oranı Eşitlik 1 ile bulunur ve asetik asit ve asetatın konsantrasyonları toplamı 0.1 M olmalıdır. Kullanacağımız asetik asitin hacmi ne olursa olsun asetat iyonları oradan geleceği için, biz 1 M asetik asitin 10 mL'sini almamız gerekir (10 mL alınıp 100 mL'ye saf suyla tamamlanır ve konsantrasyon 0.1 M olur).

Yani, 1 M asetik asitten 10 mL alınır. Şimdi, geriye kalan işlem, yeterli miktarda asetat iyonu oluşturacak uygun hacimdeki 1 M NaOH' i Eşitlik 1 ile belirlemek olacaktır. Ancak bu yukarıda birinci örnekte verilen oranla aynıdır dolayısıyla, yukarıdaki örnekte verilen miktarlarla aynı hacimlerde 1 M NaOH ve 1 M asetat ekliyoruz. 1 M NaOH'in eklenmesi, Eşitlik 1'e göre gerekli oranı veren, doğru miktarda asetat iyonunun oluşmasını ve yeterli miktardaki asetik asitin ayrılmasını sağlayacaktır.

## 7.6. SORULAR

1. pH (ordinat) ve tampona eklenen asit veya bazın mmol (apsis) **grafliğini çiziniz**. Tamponlarınızın her biriyle (seyreltilmiş ve seyreltilmemiş) ilişkili olan noktalar aracılığıyla pürüzsüz bir eğri (en uygununu) çiziniz.
2. **Hangi tampon çözelti daha iyi bir tampondur? Hangi pH'da tampon çözeltiler pH değişimlerine karşı en iyi direnç göstermiştir?**
3. Bu deneyin ilk bölümünde seyrelterek hazırladığınız tamponun molaritesini ve iyonik şiddetini hesaplayınız.
4. Yaptığınız deneydeki tampon çözeltiyle aynı pH'daki, iyonik şiddeti 0.1 olan asetat tamponunu nasıl hazırlarsınız?
5. 1 M  $KH_2PO_4$  ve 1 M  $K_2HPO_4$ 'dan 1 L 0.1 M pH 7.0 olan tampon çözeltiyi hazırlayınız. (Fosforik asit için  $pK_a$  değerleri sırasıyla, 2,1, 7,2 ve 11,8'dir).
6. pH 7.0 olan bir asetik asit-sodyum asetat, bir Tris-hidroklorür-Tris ve bir fosfat tamponuna HCl ve NaOH ilave edildiğinde her birinin nasıl davranacağını denge eşitlikleriyle gösteriniz.