

TAMPONES

INTRODUCCION

La preparación de tampones constituye una tarea de rutina en un laboratorio de bioquímica. Su utilización no solo es indispensable en la manipulación de cualquier enzima, sino que todas aquellas técnicas, analíticas o preparativas, para la separación de moléculas biológicas capaces de ionizarse, basadas precisamente en la diferencia de carga (electroforesis, cromatografía de intercambio iónico) de las distintas moléculas implican la utilización de tampones adecuados que permitan una ionización diferenciada de las moléculas y, por tanto, su separación.

Es imprescindible, en consecuencia, familiarizarse con la preparación y características de los tampones. ¿Cómo preparar un tampón adecuado?, ¿Cuál es la zona útil de un tampón?, ¿Cuál es la capacidad de un tampón?, y, en definitiva ¿Cómo debe prepararse un tampón? Son cuestiones que debemos tener absolutamente claras.

En esta práctica realizaremos una serie de experimentos que además de pretender resolver las cuestiones señaladas previamente nos permitan visualizar el efecto de tamponación.

(En caso de necesidad conviene repasar los conceptos teóricos relacionados: pH, pKa, disociación de ácidos y bases débiles, etc.).

PREPARACION DE UN TAMPON

Los tampones son, como sabemos, mezcla de ácidos o bases débiles con sus sales, y su zona de utilidad como tales depende lógicamente del valor de su pKa. Este es pues un factor limitante a la hora de seleccionar un tampón. Pero además hay que tener en cuenta, por ejemplo, si alguno de los componentes del tampón puede interferir con la reacción o el proceso a realizar. Este dato no siempre tendremos la posibilidad de conocerlo a priori y puede ser necesario ensayar varios tampones de similar pKa.

Por otra parte hemos de tener en cuenta cuales van a ser los cambios previsibles de la concentración de iones hidrógeno durante el proceso, con el fin de que el tampón que preparemos tenga una

capacidad adecuada para amortiguar dicho cambio en forma conveniente.

En este sentido, hemos de tener en cuenta que si bien el valor de pH que se obtiene con determinado tampón es dependiente de la relación existente entre los dos componentes del tampón, con independencia (dentro de ciertos márgenes de concentración en lo que las variaciones de actividad sean despreciables) de la concentración del tampón, expresada siempre como la suma de las concentraciones de ambos componentes.

En definitiva, pues, la preparación de un tampón implica la selección inicial del mismo en base a los requisitos señalados previamente. El cálculo de la relación de concentraciones entre ambos componentes necesaria para obtener el pH deseado, se utiliza la ecuación de Henderson-Hasselbalch, y el cálculo de las cantidades de cada uno de los componentes en base a la concentración deseada y del volumen total a preparar.

Ejemplo: deseamos preparar 100ml de un tampón A^-/AH de pK_a 7.1 a pH 7.4 y una concentración 0.1 M.

Partiendo de la ecuación de Henderson-Hasselbalch:

$$pH = pK_a + \log [A^-] / [AH]$$

$$7.4 = 7.1 + \log [A^-] / [AH]$$

$$\log [A^-] / [AH] = 0.3 ; [A^-] / [AH] = 1.995$$

Teniendo en cuenta que deseamos preparar 100 ml de este tampón con una concentración 0.1 M, quiere esto decir que el número total de moles de $A^- + AH$ ha de ser de 0.01. Luego:

$[A^-] / [AH] = (0.01 - x) / x = 1.995$, dado que el volumen es común para ambos componentes. De donde:

$$x = 0.0034 \text{ moles AH}$$

$$0.01 - x = 0.0066 \text{ moles de } A^-$$

obteniendo de aquí el número de gramos de ácido (AH) y de sal (A^-) que se requieren para la preparación de los 100 ml de tampón.

En la practica resulta mas conveniente preparar soluciones 0.1 M de cada uno de los componentes del tampón y calcular la relación de volúmenes (que coincidirá con la relación molar calculada previamente);

$$[A^-] / [AH] = 1.995 = c_1 \times v_1 / c_2 \times v_2; c_1 = c_2$$

$$v_1 / v_2 = 1.995 \text{ y como } v_1 + v_2 = 100 \text{ ml}$$

$$(100 - v_2) / v_2 = 1.995$$

Sobre uno de los volúmenes calculados se adicionara gradualmente el del otro componente siguiendo las variaciones de pH en el pH-metro hasta conseguir el pH deseado.

Como hemos dicho anteriormente el pH de un tampón es dependiente de la relación entre los componentes del mismo e independiente de su concentración (dentro de ciertos límites), pero en cualquier caso no ocurre así con su capacidad de amortiguación que depende de la concentración. Con el fin de comprender estos conceptos y visualizar el efecto de amortiguación del pH se realizará la siguiente parte experimental.

Parte experimental

A partir de soluciones 0.1 M de PO_4H_2K y PO_4HK_2 , preparar 100 ml de tampón por mezcla a partes iguales de ambas soluciones. Tras medir el pH del tampón así preparado se procederá a la adición, a partir de una bureta de alícuotas de 1 ml de HCl 1N, leyendo y anotando el pH después de cada adición del ácido, hasta alcanzar un pH que rebase las dos unidades por debajo del de partida.

Con otros 100 ml de tampón preparado de la misma manera que anteriormente, se procede de forma similar pero utilizando en este caso para la valoración HONa 1N, hasta obtener un pH que sobrepase en dos unidades el de partida.

El experimento total se repetirá con el tampón previamente diluido a la mitad.

Realizar con los datos obtenidos en cada caso las graficas respectivas que relacionen valores de pH (en ordenadas) frente a ml de

HCl y NaOH añadidos (en abscisas). Coméntense los resultados obtenidos respecto a:

- pKa del tampón
- efecto tampón
- capacidad del tampón
- efecto de la dilución sobre los anteriores apartados.

Ejemplos:

