

MODULO DI ANALISI DELLE PROTEINE

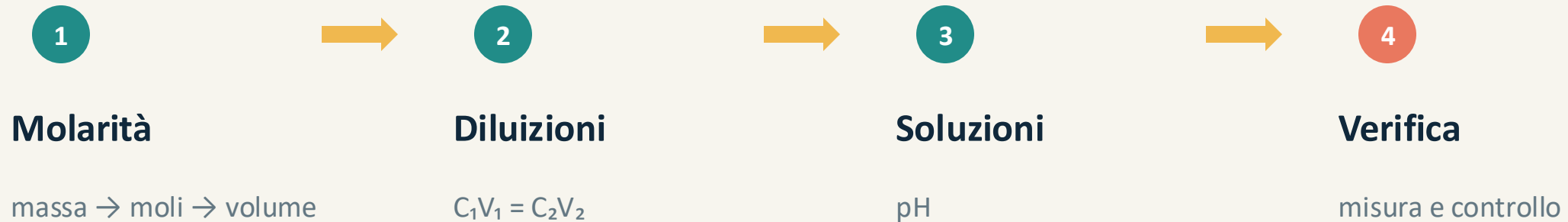
Soluzioni in laboratorio

Molarità, diluizioni e soluzioni tampone



Obiettivi dell'esercitazione

Al termine, saprai calcolare una concentrazione, preparare una diluizione e impostare un tampone a pH definito.



Prodotto finale

Una scheda di calcolo con masse, volumi, concentrazioni.

Concentrazione molare

La molarità esprime la quantità di sostanza contenuta in un litro di soluzione.

$$M = n / V$$

$$\text{mol/L} = M$$

SIGNIFICATO DEI SIMBOLI

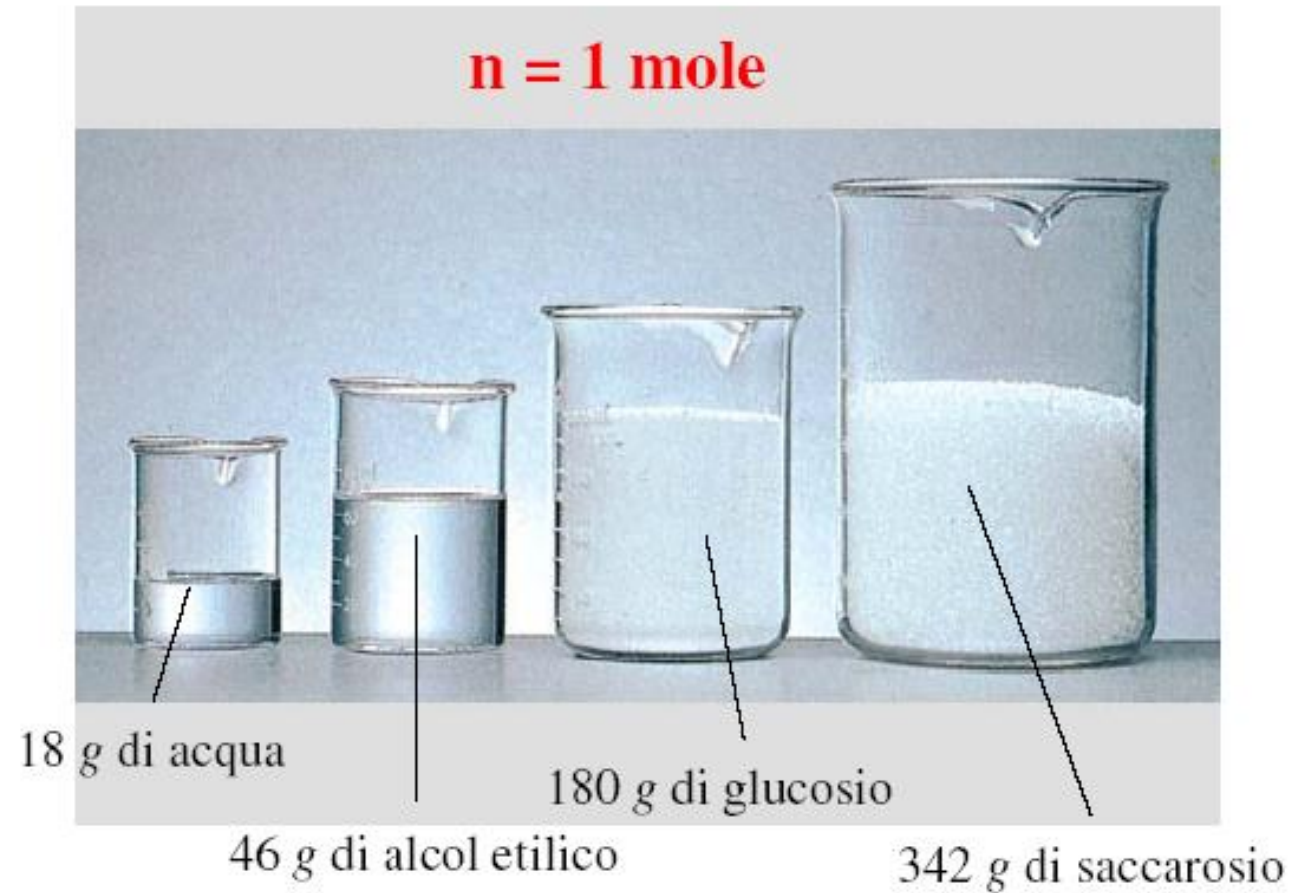
M concentrazione molare

n quantità di sostanza, in mol

V volume finale della soluzione, in L

Per ricavare le moli dalla massa: $n = g / M_r$

Massa molare (di un elemento o di un composto)



Esempio svolto · 1 L di NaCl 1 M

DATI

PM NaCl = 58,44 g/mol

V = 1L

M = 1mol/L = 1M

CALCOLO

58,44 g sono i grammi da aggiungere ad 1 L di soluzione per avere una soluzione 1M



MASSA DA PESARE

58,44 g

di NaCl per ottenere
1L di soluzione 1 M

Controllo dimensionale

$$\text{mol/L} \times \text{L} \times \text{g/mol} = \text{g}$$

Preparazione da solido

- 1 Calcola i grammi da pesare**

Usa concentrazione, volume finale e massa molare.
- 2 Pesa il soluto**

Usa una navicella e registra la massa pesata.
- 3 Sciogli in parte del solvente**

Mescola fino a dissoluzione completa.
- 4 Trasferisci e porta a volume**

Risciacqua il becher e completa al segno del matraccio.

Il volume indicato è il volume finale della soluzione, non il volume d'acqua da aggiungere.

Esempio svolto · 100 mL di NaCl 0,1 M

DATI

PM NaCl = 58,44 g/mol

V = 100 mL = 0,1 L

M = 0,100 mol/L (0,1 M)

CALCOLO

58,44 g : 1 M = x : 0.1 M

$(58,44 \times 0,1) / 1 = 5,84 \text{ g in 1L di soluzione}$

5,84 g : 1 L = x : 0.1L (100 mL)

$(58,44 \times 0,1) / 1 = 0,584 \text{ g in 100 mL di soluzione}$

MASSA DA PESARE

0,584 g

di NaCl per ottenere
100 mL di soluzione 0,1 M

Controllo dimensionale

$\text{mol/L} \times \text{L} \times \text{g/mol} = \text{g}$

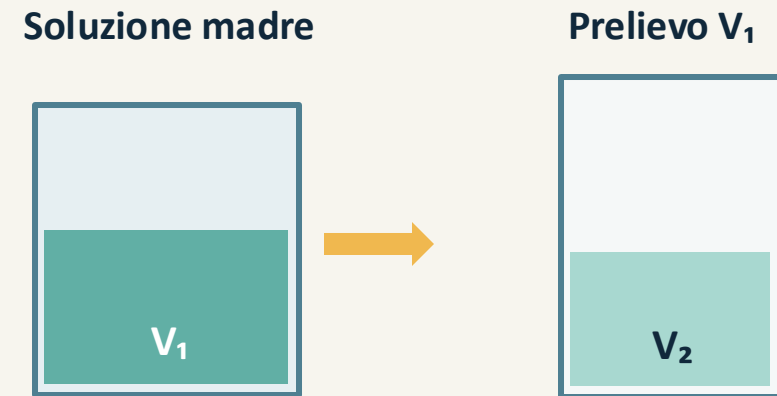
Diluizione di una soluzione madre

Si preleva una quantità nota della soluzione concentrata e si aggiunge solvente fino al volume finale.

La quantità di soluto trasferita resta costante:

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

SCHEMA



Dopo la diluizione, C_2 è più bassa di C_1 .

Esempio svolto · diluizione da 1 M a 0,1M

Da una soluzione 1 M preparare 100 mL a 0,1 M.

$$C_1 = 1 \text{ M}$$

$$V_1 = ?$$

$$C_2 = 0,1 \text{ M}$$

$$V_2 = 100 \text{ mL}$$

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

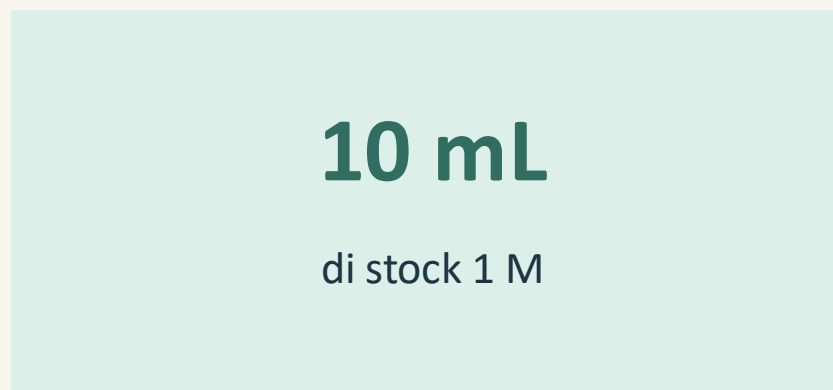
EQUAZIONE

$$V_1 = C_2V_2 / C_1$$

$$V_1 = (0,1 \text{ M} \times 100 \text{ mL}) / 1 \text{ M} = 10 \text{ mL}$$



Completa a 100 mL (quindi 90 mL di acqua)



Non aggiungere 100 mL d'acqua: porta la soluzione al volume finale di 100 mL.

Questa è una diluizione 1:10, quindi 10 è il coefficiente di diluizione

Diluizioni 1:20 e 1:50 in 50 µL

20 e 50 sono i Coefficienti di diluizione

Il rapporto indica la frazione di campione nel volume finale.

DILUIZIONE 1:20

$$V \text{ campione} = 50 / 20$$

$$= 2,5 \mu\text{L}$$

$$\text{Diluente} = 50 - 2,5$$

$$= 47,5 \mu\text{L}$$

DILUIZIONE 1:50

$$V \text{ campione} = 50 / 50$$

$$= 1,0 \mu\text{L}$$

$$\text{Diluente} = 50 - 1,0$$

$$= 49,0 \mu\text{L}$$

Per 1,0 µL usa una P10 nel suo intervallo nominale e pipetta con particolare accuratezza.

Preparare una diluizione in 50 μL

Il volume finale è la somma del campione e del diluente.

1 · Soluzione madre

2 · Trasferisco il campione

3 · Aggiungo il diluente

1:20



Stock · C_1



Prelevo 2,5 μL



+ 47,5 μL diluente

50 μL finali

1:50



Stock · C_1



Prelevo 1,0 μL



+ 49,0 μL diluente

50 μL finali

Aggiungi il diluente al campione nel nuovo tubo e agita. Schema non in scala.

Diluizione seriale 1:10

Obiettivo: ottenere 50 mL di NaCl 1 mM partendo da 0,1 M.



Ogni passaggio riduce la concentrazione di dieci volte. Mescola ogni diluizione prima di prelevare la successiva.

Soluzioni percentuali p/V

La percentuale peso/volume indica **i grammi** di soluto presenti in **100 mL** di soluzione finale.

$$\% \text{ p/V} = \text{g di soluto} / 100 \text{ mL di soluzione}$$

ESEMPIO · 250 mL DI NaCl 2% P/V

$$2 \text{ g} : 100 \text{ mL} = X \text{ g} : 250 \text{ mL}$$

$$X = 2 \text{ g} \times 250 \text{ mL} / 100 \text{ mL} = 5,0 \text{ g}$$

- 1 Pesa** 5,0 g di NaCl
- 2 Sciogli** in una quantità parziale di acqua
- 3 Porta a volume** completa fino a 250 mL di soluzione

Il volume indicato è quello finale della soluzione, non il volume d'acqua da aggiungere.

Soluzioni percentuali V/V

La percentuale volume/volume esprime **i millilitri** di soluto liquido in **100 mL** di soluzione finale.

$$\% \text{ V/V} = \text{mL di soluto} / 100 \text{ mL di soluzione}$$

ESEMPIO · 100 ML DI ETANOLO 70% V/V

$$V_1 = 70 \text{ mL}$$

Preleva 70 mL di stock e completa con acqua al volume finale di 100 mL.

I volumi dei liquidi miscelati non sono sempre additivi: porta sempre la soluzione al volume finale.

Con uno stock diverso dal 96%, ricalcola V_1 con $C_1V_1 = C_2V_2$.

Esercizio svolto · HCl 1 M (1 L)

Dati dello stock: HCl 37% p/p · $d = 1,19 \text{ g/mL}$ · $PM = 36,46 \text{ g/mol}$

$$d = m/V \quad m = d \times V$$

1 Massa di 1 L di stock

$$1,19 \times 1000 = 1190 \text{ g in 1 L}$$

2 Massa di HCl puro

$$37 \text{ g} : 100 \text{ g} = 1190 \text{ g} : x$$

$$x = (37 \times 1190)/100 = 440,3 \text{ g di HCl puro in 1 L}$$

3 M dello stock (n di moli = g/ PM)

$$440,3 / 36,46 = 12,08 \text{ moli in 1 L} \approx 12,08 \text{ M}$$

4 Volume da prelevare

$$(1,00 \times 1000) / 12,08 = 82,8 \text{ mL} \approx 83 \text{ mL}$$

$$C_1 = 12,08 \text{ M}$$

$$V_1 = \text{mL ?}$$

$$C_2 = 1 \text{ M}$$

$$V_2 = 1000 \text{ mL}$$

$$C_1 V_1 = C_2 V_2 \rightarrow 12,08 \text{ M} \times V_1 = 1 \text{ M} \times 1000 \text{ mL}$$

In cappa e con DPI: aggiungi lentamente l'acido all'acqua; lascia raffreddare e porta al volume finale di 1 L.

Micropipette P10, P100 e P1000

Scegli lo strumento il cui intervallo comprende il volume da trasferire.

MODELLO	INTERVALLO DI LAVORO	ESEMPIO
P10	0,5–10 µL	8,0 µL
P100	10–100 µL	80 µL
P1000	100–1000 µL	800 µL

Lavora sempre entro il range indicato sul corpo della pipetta. Intervalli riferiti a Eppendorf Research plus.

Parti esterne della micropipetta

I comandi e gli elementi di lavoro si riconoscono dall'esterno.

- 1 Pulsante di pipettaggio**
Premi e rilascia per aspirare o dispensare.
- 2 Ghiera / cursore del volume**
Imposta il volume entro il range dello strumento.
- 3 Pulsante espulsore**
Espelle il puntale usato senza toccarlo.
- 4 Finestrella del volume**
Mostra il volume impostato.
- 5 Cono portapuntale**
Sostiene il puntale e forma il collegamento con la pipetta.
- 6 Puntale monouso**
È la parte che entra in contatto con il liquido.



Impostare e leggere il volume

Il volume si imposta con la ghiera e si verifica nella finestrella prima di aspirare.

1 Identifica il range

Verifica il volume da prelevare e assicurati che il volume richiesto rientri nei limiti.

2 Ruota la ghiera

Imposta il volume richiesto senza forzare il meccanismo oltre i fine corsa.

3 Controlla il display

Leggi tutte le cifre e l'eventuale separatore decimale, dall'alto verso il basso.

Esempio: per trasferire 80 μ L, scegli P100 e imposta 80 μ L.



Aspirazione e dispensazione

- 1 Prepara**

Monta un puntale compatibile e imposta il volume. Premi il pulsante fino al primo arresto.
- 2 Aspira**

Immergi la punta verticalmente e rilascia lentamente il pulsante. Attendi che il liquido entri nel puntale.
- 3 Dispensa**

Appoggia il puntale alla parete del recipiente. Premi lentamente fino al primo arresto, poi fino al secondo per espellere il residuo.
- 4 Concludi**

Tieni premuto mentre ritiri il puntale dalla parete. Poi rilascia il pulsante ed espelli il puntale.

Profondità d'immersione: 2–3 mm per P10/P100 · 2–4 mm per P1000

Pipettaggio diretto e inverso

La tecnica inversa può migliorare la dispensazione di liquidi viscosi o schiumogeni.

DIRETTO • PROCEDURA STANDARD

**Premi fino al
1° arresto**



**Immergi e rilascia
lentamente**



**Dispensa al 1° arresto,
poi al 2°**

INVERSO • CAMPIONI VISCOSI O SCHIUMOGENI

**Premi fino al
2° arresto**



**Immergi e rilascia
lentamente**



**Dispensa solo al 1°;
l'eccesso resta nel puntale**

Nel pipettaggio inverso, espelli il residuo nel contenitore di scarto; non fa parte del volume erogato.

Vetreria e strumenti di misura



STRUMENTO	USO	ATTENZIONE
Bilancia	Pesare il soluto	Tara la navicella
Pipetta / micropipetta	Prelevare V_1	Usa il puntale corretto
Matraccio tarato	Impostare V_2 finale	Leggi il menisco all'altezza degli occhi
pH-metro	Misurare pH	Risciacqua l'elettrodo tra i campioni

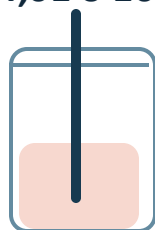
La vetreria volumetrica serve a definire con accuratezza il volume finale.

Misurare il pH prima di correggerlo

Calibra il pHmetro e misura il campione alla temperatura di lavoro.

1 • CALIBRAZIONE A DUE PUNTI

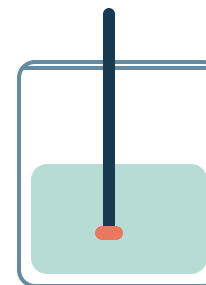
pH 4,01 o 10,01



tampone più vicino
al valore atteso (4 o 10)

Risciacqua l'elettrodo con acqua deionizzata e tampona delicatamente tra i tamponi.

2 • MISURA DEL CAMPIONE



campione

pH 6,8

Immergi l'elettrodo senza toccare il fondo. Attendi che la lettura si stabilizzi, quindi annota pH e temperatura.

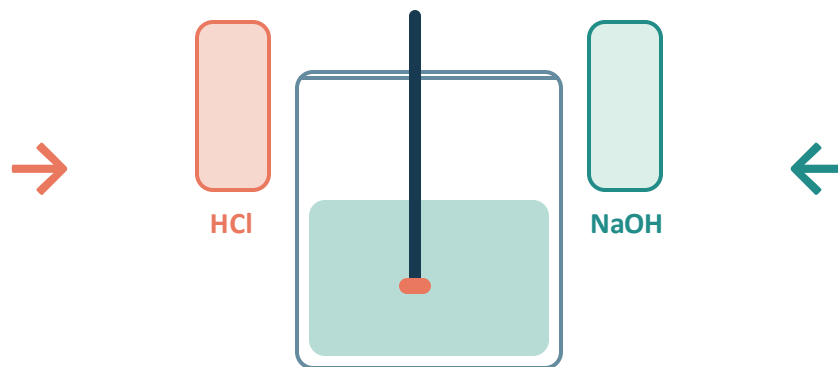
Il pH atteso guida la scelta del secondo tampone di calibrazione: pH 4 per campioni acidi, pH 10 per campioni basici.

Correggere il pH in modo graduale

Lavora inizialmente **sotto il volume finale** e usa titolanti adatti alla soluzione.

pH sopra il target

Aggiungi acido diluito
(es. HCl)



pH sotto il target

Aggiungi base diluita
(es. NaOH)

mescola · attendi stabilità · misura di nuovo

- 1 Aggiungi poche gocce
- 2 Mescola bene
- 3 Ferma l'agitazione e attendi
- 4 Misura di nuovo

Vicino al target, riduci ancora la quantità aggiunta.

Raggiunto il pH desiderato alla temperatura di lavoro, porta al volume finale e ricontrolla il pH.

Controlli prima di concludere

Piccoli errori di unità o di tecnica cambiano la concentrazione finale.

Unità

mL $\rightarrow$ L quando calcoli le moli

Volume

completa al volume finale, non aggiungere quel volume di solvente

Omogeneità

mescola dopo ogni preparazione o diluizione

Tracciabilità

annota masse, volumi e concentrazioni effettive

Prima di procedere: controlla unità, calcolo e volume finale.