

Introduzione al corso
pH, tamponi, detergenti



Insegnamento di Biochimica Applicata e Proteomica

ALESSIO BRANCHINI

DIPARTIMENTO DI SCIENZE DELLA VITA E BIOTECNOLOGIE

c/o

DIPARTIMENTO DI SCIENZE DELLA VITA E BIOTECNOLOGIE

Via Luigi Borsari 46

44121 - Ferrara

 alessio.branchini@unife.it

 0532 974485  telefono ufficio

 0532974421  Telefono dell'ufficio

 Mercoledì dalle 14.30 alle 15.30, oppure su appuntamento

DIPARTIMENTO DI SCIENZE DELLA VITA E BIOTECNOLOGIE

c/o

DIPARTIMENTO DI SCIENZE DELLA VITA E BIOTECNOLOGIE

Via Fossato di Mortara, 74



Testi consigliati

Testi in italiano:

- **Biochimica Applicata. M. Stoppini e V. Bellotti. Ed. Edises. 2012.**
- **Biochimica e Biologia Molecolare. Principi e tecniche. Wilson K, Walker J. Ed. Cortina Raffaello. 2006.**
- Metodologie Biochimiche. Principi e tecniche per l'espressione, la purificazione e la caratterizzazione delle proteine. M.C. Bonaccorsi di Patti, R. Contestabile, M.L. Di Salvo. Ed. CEA. 2012.
- Principi di metodologia Biochimica . C. De Marco e C. Cini. Ed. Piccin. 2009.
- Metodologie di base per le scienze biomolecolari. R. Reed, D. Holmes, J. Weyers, A. Jones. Ed. Zanichelli. 2002.

Testi in inglese:

- **Principles and Techniques of Biochemistry and Molecular Biology. Seventh Edition. K. Wilson, J. Walker. Ed. Cambridge University Press. 2010.**
- The Protein protocols Handbook. J.M. Walker. Third Edition. Ed. Humana Press. 2009.

METODO SCIENTIFICO

Ricerca del **PERCHÉ**, con consapevolezza della **fallibilità** delle ipotesi sperimentali.

INDAGINE BIOCHIMICA

- Valutazione conoscenze nel settore di indagine (letteratura).
- Formulazioni ipotesi sperimentali.
- Selezione del sistema biologico.
- Scelta della variabile da studiare.
- Progettazione ed esecuzione dell'esperimento.
- Replicazione dell'esperimento e calcolo della variabilità.
- Formulazione delle conclusioni e nuove ipotesi.

PRINCIPALI METODOLOGIE BIOCHIMICHE

- 1. TECNICHE CENTRIFUGATIVE**
- 2. TECNICHE ENZIMATICHE**
- 3. TECNICHE IMMUNOCHEMICHE**
- 4. TECNICHE DI BIOLOGIA MOLECOLARE**
- 5. TECNICHE CROMATOGRAFICHE**
- 6. TECNICHE ELETTROFORETICHE**
- 7. TECNICHE SPETTROSCOPICHE**
- 8. TECNICHE RADIOISOTOPICHE**
- 9. TECNICHE DI SPETTROSCOPIA DI MASSA**
- 10. TECNICHE ELETTROCHIMICHE**

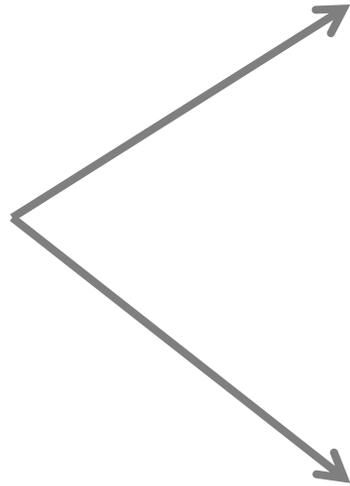
UNITÀ DI MISURA

Prefissi del Sistema Internazionale

10^n	Prefisso	Simbolo	Nome	Equivalente <u>decimale</u>
10^{24}	<u>yotta</u>	Y	<u>Quadrilione</u>	1 000 000 000 000 000 000 000 000
10^{21}	<u>zetta</u>	Z	<u>Triliardo</u>	1 000 000 000 000 000 000 000
10^{18}	<u>exa</u>	E	<u>Trilione</u>	1 000 000 000 000 000 000
10^{15}	<u>peta</u>	P	<u>Biliardo</u>	1 000 000 000 000 000
10^{12}	<u>tera</u>	T	<u>Bilione</u>	1 000 000 000 000
10^9	<u>giga</u>	G	<u>Miliardo</u>	1 000 000 000
10^6	<u>mega</u>	M	<u>Milione</u>	1 000 000
10^3	<u>kilo</u> o <u>chilo</u>	k	<u>Mille</u>	1 000
10^2	<u>etto</u>	h	<u>Cento</u>	100
10^1	<u>deca</u>	da	<u>Dieci</u>	10
10^{-1}	<u>deci</u>	d	Decimo	0,1
10^{-2}	<u>centi</u>	c	Centesimo	0,01
10^{-3}	<u>milli</u>	m	Millesimo	0,001
10^{-6}	<u>micro</u>	μ	Milionesimo	0,000 001
10^{-9}	<u>nano</u>	n	Miliardesimo	0,000 000 001
10^{-12}	<u>pico</u>	p	Bilionesimo	0,000 000 000 001
10^{-15}	<u>femto</u>	f	Biliardesimo	0,000 000 000 000 001
10^{-18}	<u>atto</u>	a	Trilionesimo	0,000 000 000 000 000 001
10^{-21}	<u>zepto</u>	z	Triliardesimo	0,000 000 000 000 000 000 001
10^{-24}	<u>yocto</u>	y	Quadrilionesimo	0,000 000 000 000 000 000 000 001

INDAGINE BIOCHIMICA MODERNA

Esperimenti



Kit
commerciali



Automatizzazione



MISURAZIONI e COMPORTAMENTO DI UNO STRUMENTO



MISURAZIONI e COMPORTAMENTO DI UNO STRUMENTO



Preciso, ma non
accurato



Preciso

Accurato
e preciso



Accurato



Preciso e Accurato

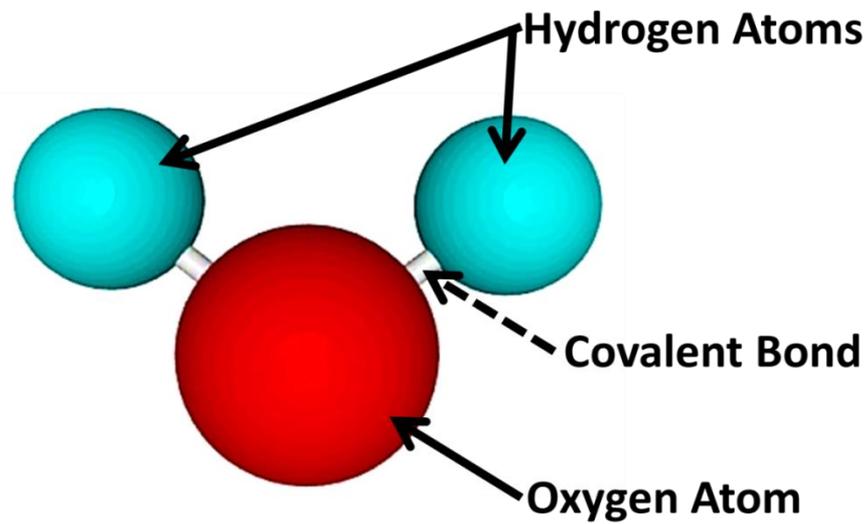


Né Preciso né Accurato

Accurato, ma
non preciso



Acqua e caratteristiche

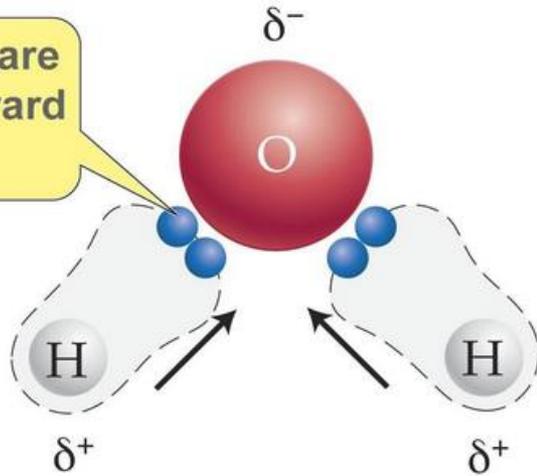


Acqua e caratteristiche

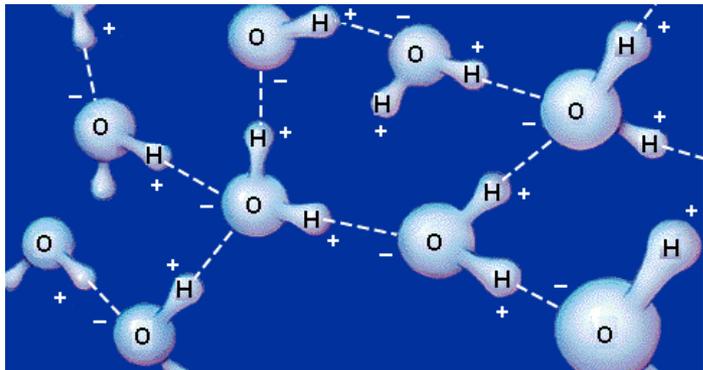
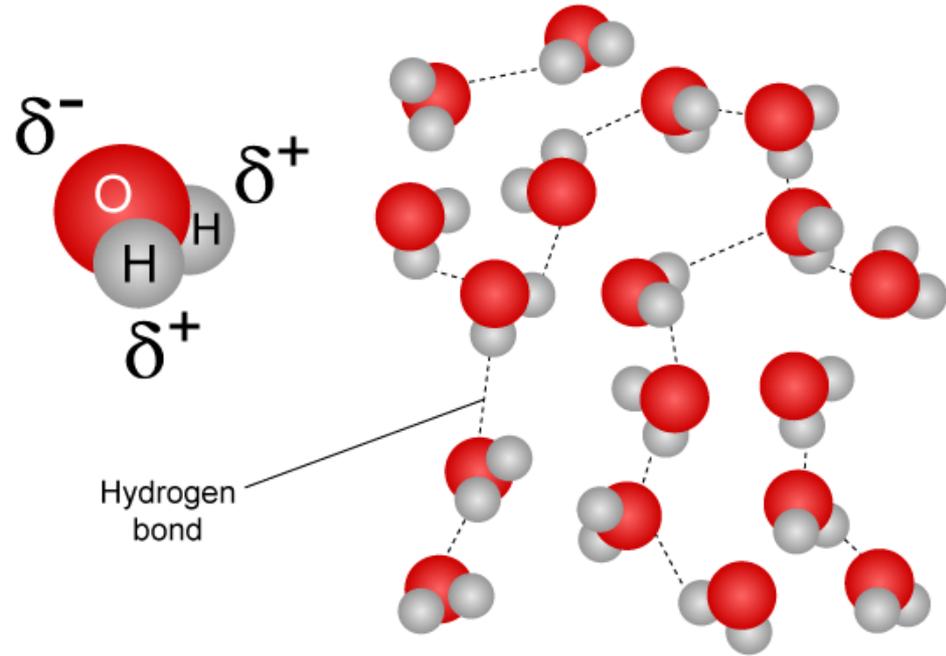
Unica sostanza ad essere presente naturalmente in tutti e tre gli stati di materia

Carica parziale negativa

Electrons are pulled toward oxygen.



Carica parziale positiva

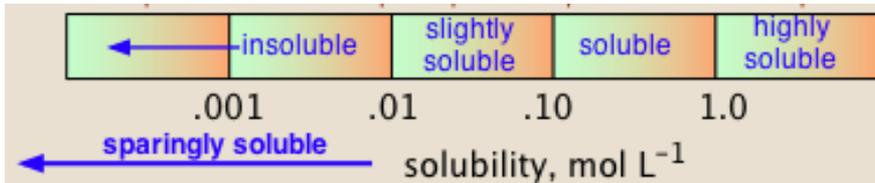


Soluzioni e solubilità dei sali

solvente + soluto = SOLUZIONE

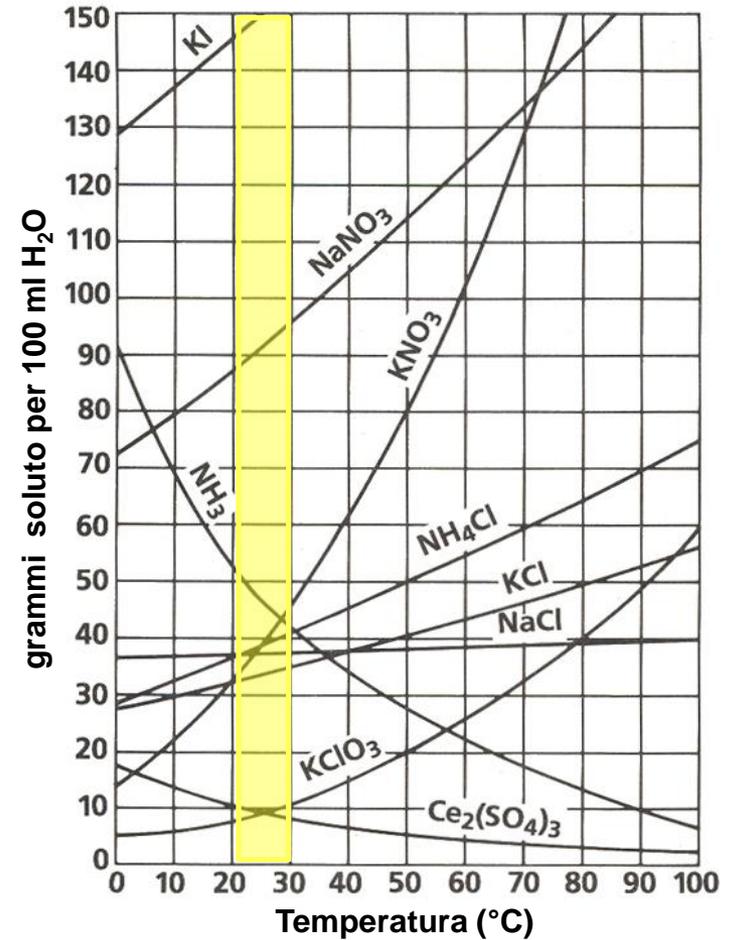


Solubilità dei sali



Alcuni esempi di sali solubili:

Sale	PM (g/mol)	Solubilità 25°C		
		g/100ml _{H₂O}	g/L	mol/L
NaCl	58.44	35.8	358	6.13
NaNO ₃	84.5	92.1	921	10.9
KCl	74.55	33	330	4.43
KNO ₃	101.1	38	380	3.76

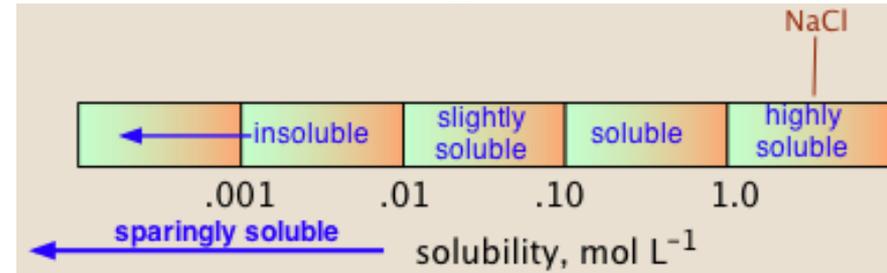


La temperatura influenza la solubilità dei sali!

Soluzioni e solubilità dei sali

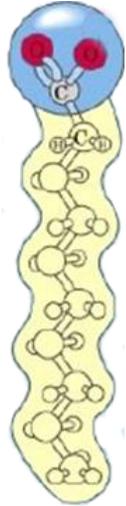
L'acqua dissolve sali come NaCl

- idrata e stabilizza Na^+ e Cl^-
- indebolisce attrazioni elettrostatiche

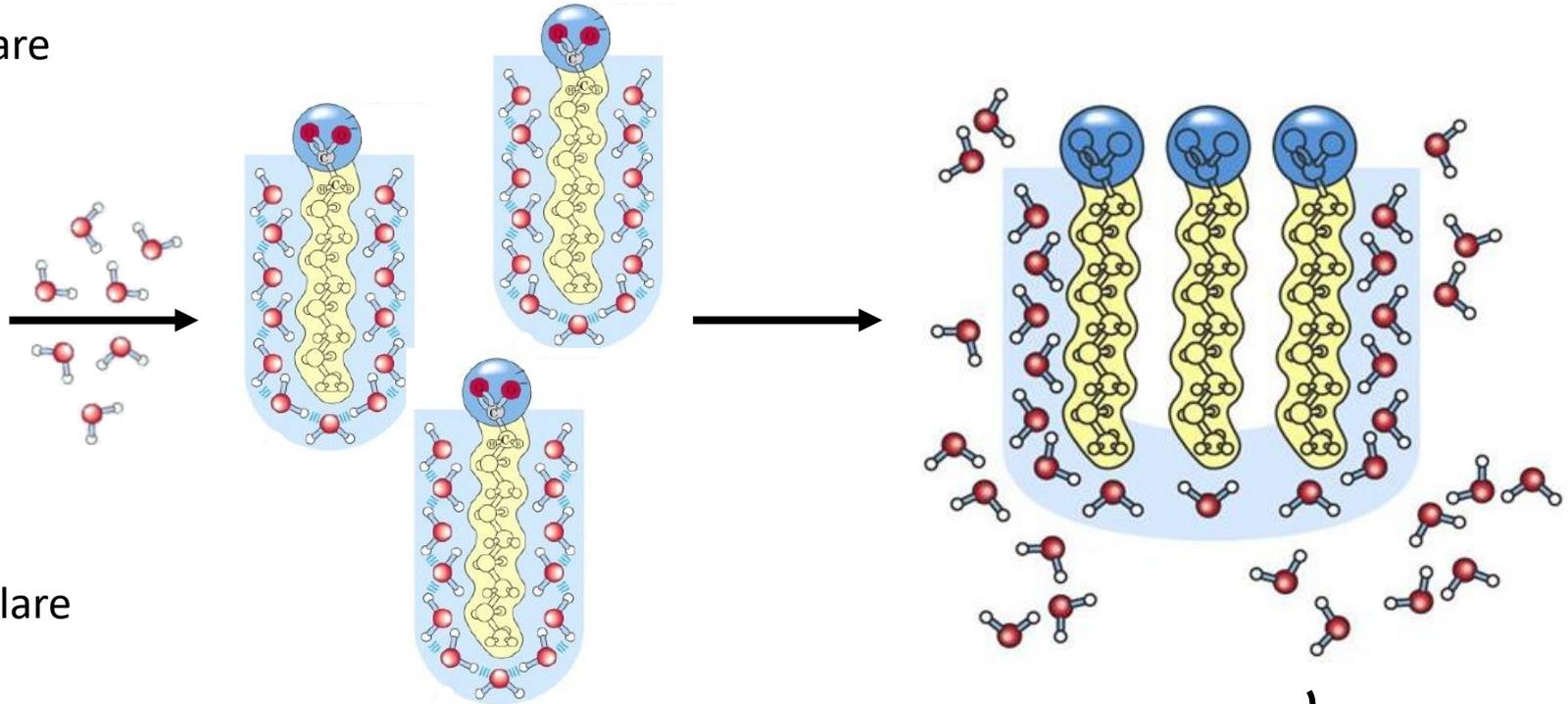


E le molecole apolari o anfipatiche?

"Testa" polare

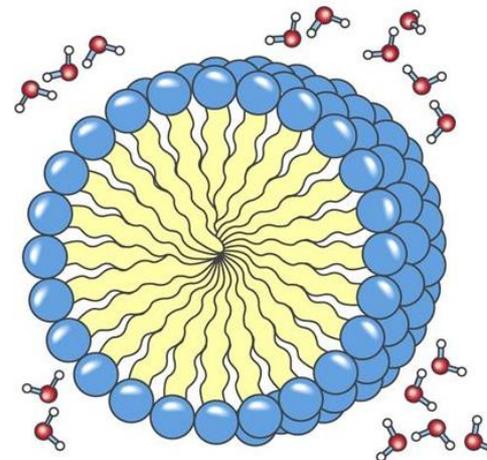


"Coda" apolare



Micella

I gruppi idrofobici tendono a minimizzare il contatto con l'acqua ed espongono al solvente le porzioni polari (condizione più favorevole



Modi di esprimere la concentrazione

Percentuale peso/volume (%p/vol; %p/v; %weight/volume; %w/v)

Grammi di soluto in 100 mL di soluzione

Percentuale volume/volume (%vol/vol; %v/v)

Volume di soluto in 100 mL di soluzione

Percentuale peso/peso (%p/p; %weight/weight; %w/w)

Grammi di soluto per 100 g di soluzione

Molarità (mol/L; M)

Numero di moli in 1 L di soluzione

Rapporto di concentrazione (X)

Usato per calcolare il volume di utilizzo

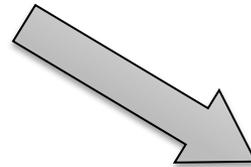
Es. PBS **10X** = PBS concentrato 10 volte di più (10X) rispetto alla concentrazione di lavoro (indicata come 1X)

→ **NO** unità di misura, **NO** informazioni su composizione/concentrazioni

TAMPONI

Organismi complessi e singole cellule resistono generalmente a grandi variazioni di pH dell'**ambiente esterno**.

Al contrario, vi è una forte sensibilità al pH dei **processi endocellulari**



Proprietà finemente regolata
(generalmente mantenuto vicino alla neutralità)
mediante **sistemi tampone**.

Scala del pH e concentrazioni di H⁺ e OH⁻

Hydrogen Ion [H⁺]

Hydroxyl Ion [OH⁻]

pH	[H ⁺]			[OH ⁻]	pOH	
14	1 × 10 ⁻¹⁴	1.0		1 × 10 ⁻⁰	0	
13	1 × 10 ⁻¹³	0.1		0.00000000000001	1 × 10 ⁻¹	1
12	1 × 10 ⁻¹²	0.01		0.00000000000001	1 × 10 ⁻²	2
11	1 × 10 ⁻¹¹	0.001		0.00000000000001	1 × 10 ⁻³	3
10	1 × 10 ⁻¹⁰	0.0001		0.00000000000001	1 × 10 ⁻⁴	4
9	1 × 10 ⁻⁹	0.00001		0.0000000001	1 × 10 ⁻⁵	5
8	1 × 10 ⁻⁸	0.000001		0.00000001	1 × 10 ⁻⁶	6
7	1 × 10 ⁻⁷	0.0000001		0.0000001	1 × 10 ⁻⁷	7
6	1 × 10 ⁻⁶	0.00000001		0.000001	1 × 10 ⁻⁸	8
5	1 × 10 ⁻⁵	0.000000001		0.00001	1 × 10 ⁻⁹	9
4	1 × 10 ⁻⁴	0.0000000001		0.0001	1 × 10 ⁻¹⁰	10
3	1 × 10 ⁻³	0.00000000001		0.001	1 × 10 ⁻¹¹	11
2	1 × 10 ⁻²	0.000000000001		0.01	1 × 10 ⁻¹²	12
1	1 × 10 ⁻¹	0.0000000000001		0.1	1 × 10 ⁻¹³	13
0	1 × 10 ⁰	0.00000000000001	1.0	1 × 10 ⁻¹⁴	14	

[H⁺] e [OH⁻] sono espresse in **molarità**, ovvero **moli/L**



$$\text{pH} = \log \frac{1}{[\text{H}^+]}$$



$$\text{pH} = \log \frac{1}{1.0 \times 10^{-7}} = 7.0$$



1 unità di pH indica una differenza di [H⁺] di **10 volte**

SELEZIONE DEI TAMPONI

Utilizzare un tampone con pK_a vicina al pH richiesto.

- **Henderson-Hasselbalch** -

$$pH = pK_a + \log \frac{[A^-]}{[HA]}$$

Esprime la **variazione** dello **stato di ionizzazione** di un elettrolita debole in funzione del pH.



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

K_a = Costante di
dissociazione **a**cida

pK_a log negativo della K_a

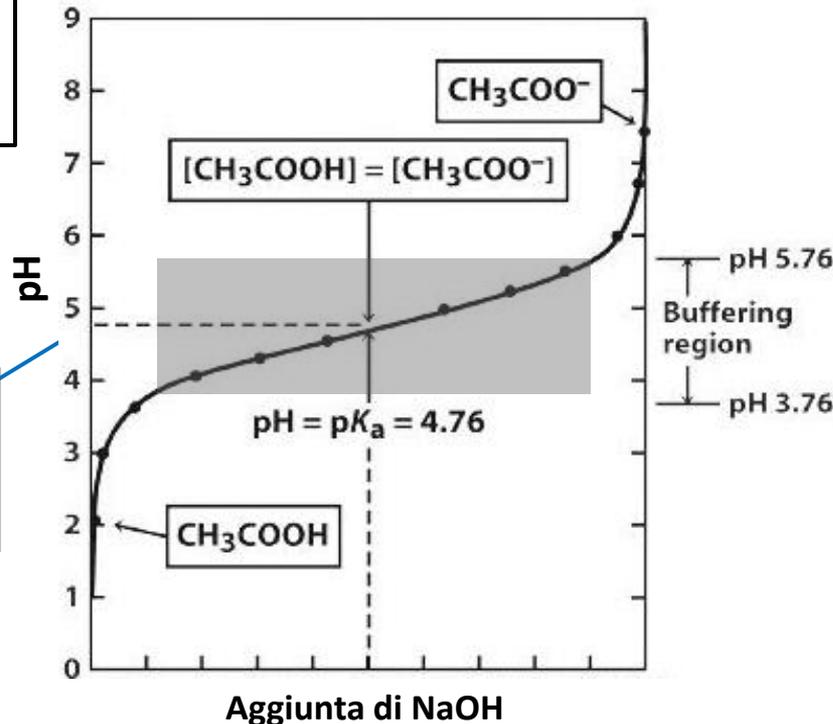
$$pK_a = \log \frac{1}{[K_a]} = -\log K_a$$

SELEZIONE DEI TAMPONI

I **tamponi** (buffer) sono soluzioni acquose in grado di resistere a piccole variazioni di pH (aggiunta di $[H^+]$ o $[OH^-]$)

Acido debole
(donatore di protoni)
+
Base coniugata
(accettore di protoni)

**Punto di
equivalenza**



$$pK_a = \log \frac{1}{[K_a]} = -\log K_a$$



$$K_a = \frac{1}{10^{4.76}} \quad \text{or} \quad K_a = 10^{-4.76}$$

K_a = Costante di
dissociazione **acida**

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

Utilizzare un tampone con **pK_a vicina al pH richiesto.**

Oltre l'intervallo di **$pH = pK_a \pm 1$** la capacità tamponante è scarsa.

SELEZIONE DEI TAMPONI

Utilizzare un tampone con pK_a vicina al pH richiesto.

- **Henderson-Hasselbalch** -

$$pH = pK_a + \log \frac{[A^-]}{[HA]}$$

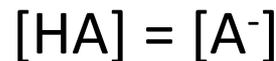
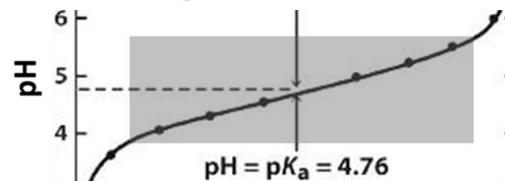
Esprime la **variazione** dello **stato di ionizzazione** di un elettrolita debole in funzione del pH.



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

K_a = Costante di dissociazione **acida**

Al **punto di equivalenza**



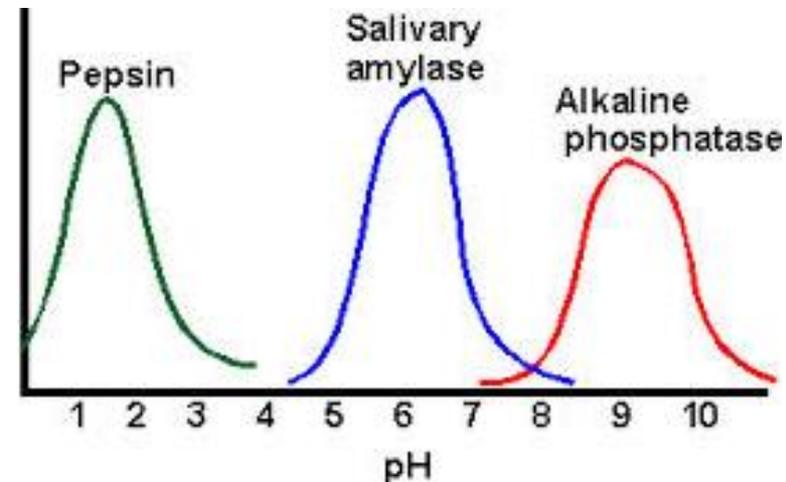
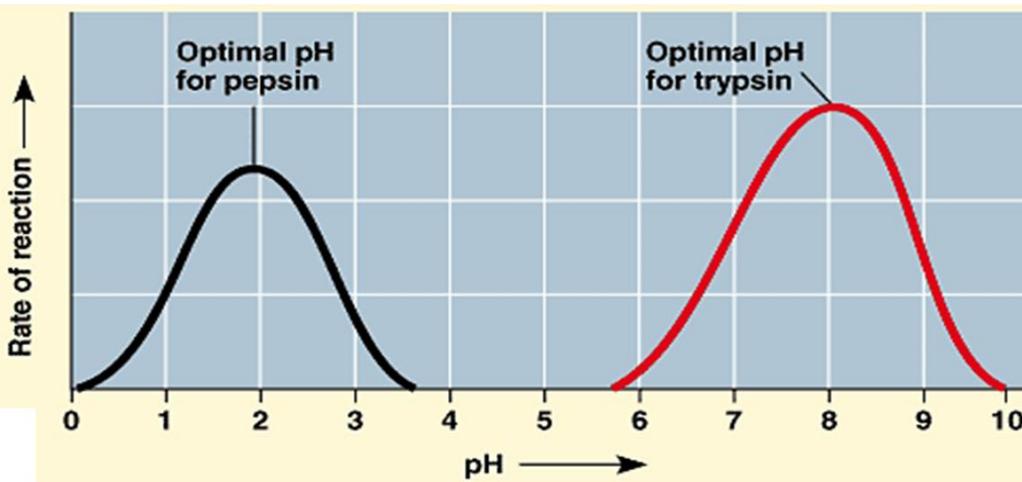
$$\longrightarrow pH = pK_a + \log 1$$

$$\downarrow$$
$$pH = pK_a$$

Il pH influenza la stabilità (e la funzione) delle proteine

Tuttavia.....

Non sempre pH "estremi" risultano dannosi...



È quindi importante mantenere **controllato**

il valore di **pH** necessario alle **condizioni ottimali** di lavoro

(che dipendono dalle molecole oggetto di studio)

SELEZIONE DEL TAMPONE SULLA BASE DELLA pKa

	pH	6	7	8	9	10	11	Useful pH Range	pKa (at 20)	pKa (at 25)	pKa (at 37)
MES		5.5-6.7						5.5-6.7	6.16	6.10	5.97
BIS-TRIS		5.8-7.2						5.8-7.2	-	6.50	6.36
ADA		6.0-7.2						6.0-7.2	6.65	6.59	6.46
ACES		6.1-7.5						6.1-7.5	6.88	6.78	6.54
PIPES		6.1-7.5						6.1-7.5	6.80	6.76	6.66
MOPSO		6.2-7.6						6.2-7.6	-	6.90	6.75
BIS-TRIS PROPANE		6.3-9.5						6.3-9.5	-	6.8,9.0	-
BES		6.4-7.8						6.4-7.8	7.17	7.09	6.90
MOPS		6.5-7.9						6.5-7.9	7.28	7.20	7.02
TES		6.8-8.2						6.8-8.2	7.50	7.40	7.16
HEPES		6.8-8.2						6.8-8.2	7.55	7.48	7.31
DIPSO		7.0-8.2						7.0-8.2	-	7.60	7.35
MOBS		6.9-8.3						6.9-8.3	-	7.60	-
TAPSO		7.0-8.2						7.0-8.2	-	7.60	7.39
TRIZMA		7.0-9.0						7.0-9.0	8.20	8.06	7.72
HEPPSO		7.1-8.5						7.1-8.5	-	7.80	6.66
POPSO		7.2-8.5						7.2-8.5	-	7.80	7.63
TEA		7.3-8.3						7.3-8.3	-	7.80	-
EPPS		7.3-8.7						7.3-8.7	-	8.00	-
TRICINE		7.4-8.8						7.4-8.8	8.16	8.05	7.80
GLYCYLGLYCINE		7.5-8.9						7.5-8.9	-	8.20	-
BICINE		7.6-9.0						7.6-9.0	8.35	8.26	8.04
HEPBS		7.6-9.0						7.6-9.0	-	8.30	-
TAPS		7.7-9.1						7.7-9.1	8.49	8.40	8.18
AMPD		7.8-9.7						7.8-9.7	-	8.80	-
TABS		8.2-9.6						8.2-9.6	-	8.90	-
AMPSO		8.3-9.7						8.3-9.7	-	9.00	9.10
CHES		8.6-10.0						8.6-10.0	9.55	9.49	9.36
CAPSO		8.9-10.3						8.9-10.3	-	9.60	9.43
AMP		9.0-10.5						9.0-10.5	-	9.70	-
CAPS		9.7-11.1						9.7-11.1	10.56	10.40	10.02
CABS		10.0-11.4						10.0-11.4	-	10.70	-

SELEZIONE DEI TAMPONI

Assicurarsi che il tampone non causi **precipitazioni** indesiderate (citrati e fosfati).



Per certi enzimi il fosfato di alcuni tamponi è substrato, attivatore o inibitore.

Il tris 2-idrossimetil-amminometano cloridrato o **TRIS**

($pK_a = 8.06$ a $20\text{ }^\circ\text{C}$, range pH: 7.0-9.2) è spesso **tossico** in sistemi biologici, per la sua solubilità in lipidi.

RIASSUMENDO

Il tampone adatto:

1. **pKa** opportuna.
2. **Range di pH** sufficiente.
3. **Solubilizza** le molecole in studio.
4. **Non interferisce** con la reazione.

(Intervallo di utilizzo: **0.02 - 0.5 mol/L**)

GOOD'S BUFFERS

Tamponi descritti da Norman **Good (1966)**, basati su **molecole zwitterioniche**, portate al pH di “lavoro” con acido forte o base forte.

VOL. 5, NO. 2, FEBRUARY 1966

Hydrogen Ion Buffers for Biological Research*

Norman E. Good, G. Douglas Winget, Wilhelmina Winter, Thomas N. Connolly, Seikichi Izawa, and Raizada M. M. Singh

- Scelti per aver **pK_a fra 6 e 8**.
- Bassa solubilità in solventi non polari.
- Chimicamente **stabili**.
- **Non attraversano** le membrane cellulari.
- **Non assorbono** nell'UV-visibile.

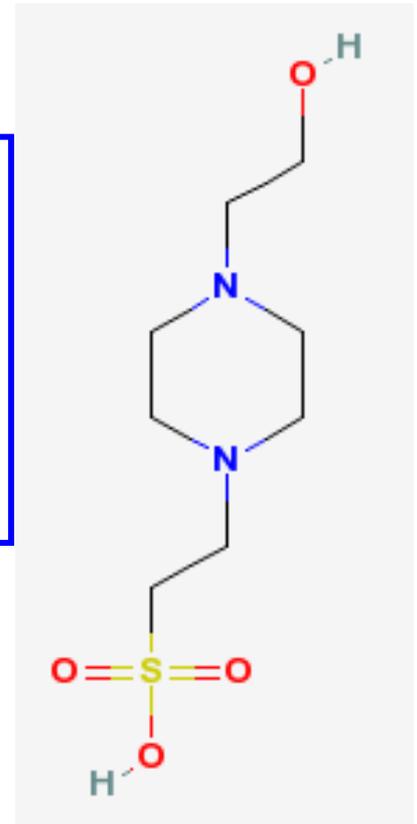
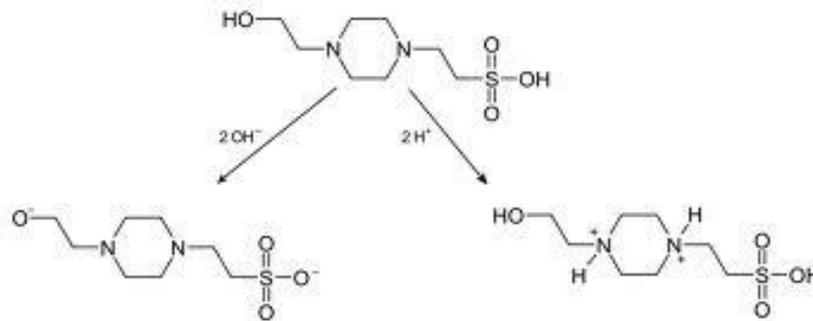
Buffer	<u>pK_a</u> at 20°C
<u>MES</u>	6.15
ADA	6.6
<u>PIPES</u>	6.8
<u>ACES</u>	6.9
Choline chloride	7.1
BES	7.15
TES	7.5
<u>HEPES</u>	7.55
Acetamidoglycine	7.7
<u>Tricine</u>	8.15
Glycinamide	8.2
Bicine	8.35

HEPES

N-2-Hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid

Normalmente neutralizzato con NaOH

- pK_a at 25°C of 7.55 (**7.31 at 37°C**)
- a second pK_a at pH 3 is not of interest
- usable **buffering range of 6.8 to 8.2**
- molecular weight 238.3
- HEPES contains tertiary amines, which are reactive under certain conditions. Chemical formula: $C_8H_{18}N_2O_4S$



Fototossico: produzione di perossido di idrogeno se esposto a luce solare (**riproducibilità a rischio!**).

SOLUZIONI TAMPONE FREQUENTEMENTE UTILIZZATI NELL'INDAGINE BIOCHIMICA

Hepes buffered saline (HBS)

20 mM Hepes, 150 mM NaCl, pH 7.4

Phosphate buffered saline (PBS)

137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1.8 mM KH₂PO₄, pH 7.4

Tris buffered saline (TBS)

50 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7.4

(In alcuni casi, aggiunta di **BSA 0.5-5% p/v** a seconda del tipo di esperimento)

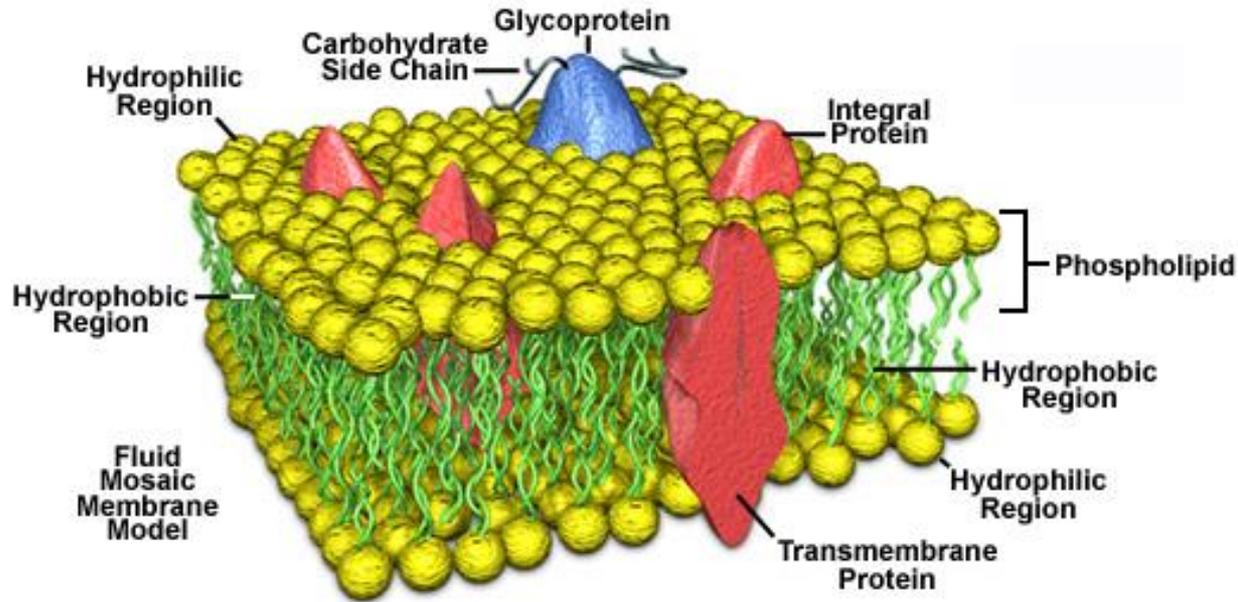
DETERGENTI

I **detergenti** sono molecole **ANFIPATICHE**, ovvero contengono sia gruppi **polari** (idrofili), sia **apolari** (idrofobici, lipofili).

Alcuni sono naturali, la maggior parte di sintesi (dal 1836).

Proteine transmembrana, se isolate dalle membrane, espongono regioni idrofobiche, causando **aggregazione**.

DETERGENTI



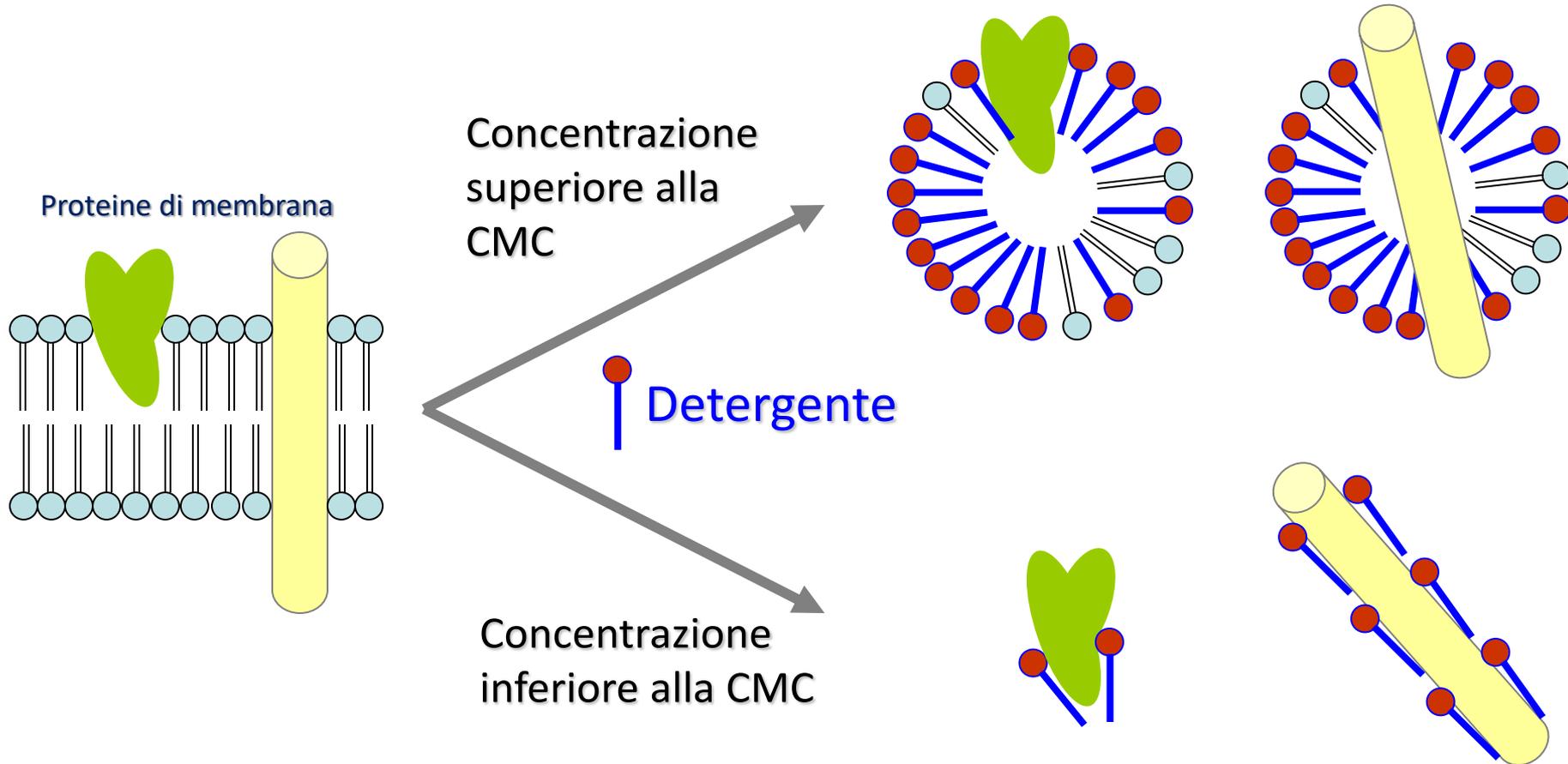
Proteine transmembrana, se isolate dalle membrane, espongono regioni idrofobiche, causando **aggregazione**.

I **detergenti** possono solubilizzare tali proteine avendo affinità per i gruppi idrofobici/idrofilici presenti in esse.

CONCENTRAZIONE MICELLARE CRITICA (CMC)

Basse [Detergente] = in H₂O come molecola isolata.

Alte [Detergente] = forma micelle.



La **CMC** è **caratteristica di ogni detergente** e dipende dalla sua struttura chimica.

TIPI DI DETERGENTI

NON IONICI: gruppo idrofilo **non** carico (alchiloamidi, esteri del glucosio e del saccarosio, alchilaminossidi, derivati etossilati).

ANIONICI: gruppo idrofilo **carico -** (alchilsolfati, alcoilсарcoinati, alchilsemisolfuccinati, condensati tra acidi grassi ed aminoacidi).

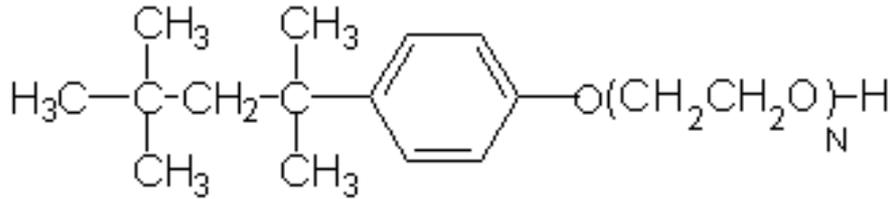
CATIONICI: gruppo idrofilo **carico +** (sali quaternari di ammonio, sali di piridinio quaternario, sali di isochinolinio quaternario).

ANFOTERI: contengono sia un gruppo carico - sia uno carico + (imidazoline e le betaine). Hanno un comportamento diverso **a seconda del pH.**

DETERGENTI

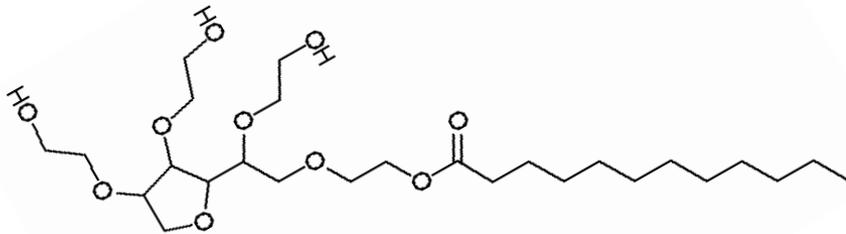
Non ionici:

Triton X-100 (estrazione DNA, permeabilizzazione membrane)



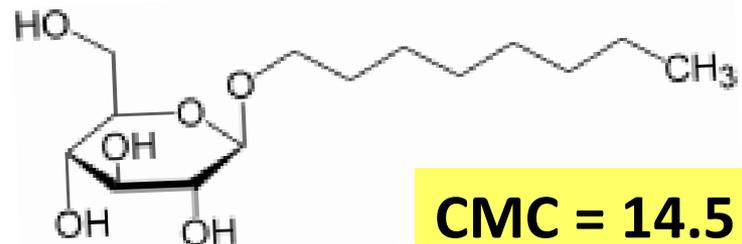
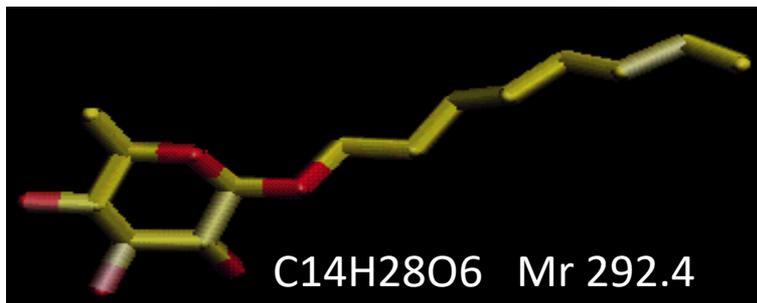
CMC = ~0,2 mM

Tween 20 (studi di interazione e funzione)



CMC = 0,06 mM

Octilglucoside (solubilizzazione proteine di membrana, elettroforesi 2D)



CMC = 14.5 mM

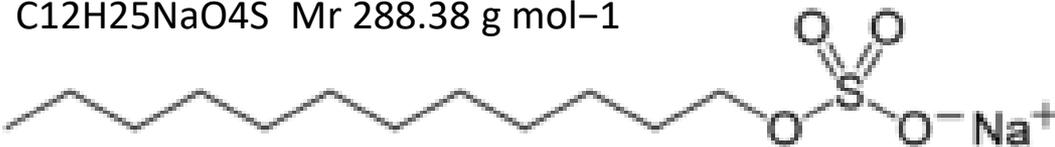
DETERGENTI

I **detergenti ionici**, a causa della carica, distruggono legami ionici e ponti idrogeno, portando anche alla completa **denaturazione** una proteina.

Anionici:

Sodio dodecil solfato (**SDS**) o sodio laurilsolfato (**SLS**)

$C_{12}H_{25}NaO_4S$ Mr 288.38 g mol⁻¹



CMC = 8.3 mM

Usato in prodotti, come dentifricio, shampoo, schiuma da barba e saponi liquidi.

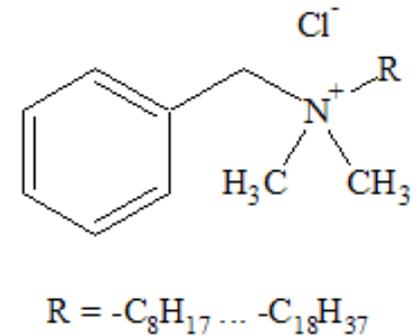
La **polvere di SDS** è molto volatile, irritante per occhi, cute e vie respiratorie. Contatti ripetuti o prolungati posson causar dermatiti. Alla combustione, forma gas tossici.

DETERGENTI

Cationici:

Medio/Alto potere disinfettante, per la capacità di agire sulla membrana esterna dei batteri gram -

Cloruro di benzalconio: miscela di cloruri di alchil-benzil-dimetilammonio (largamente presente in colliri e coluttori)



Trovano scarsa o nessuna applicazione nei comuni laboratori di biochimica e biologia molecolare.

Preparazione di un tampone (1L)

- pesare
- H₂O (~l'80%)
- miscelare
- pH
- portare a volume

 CALBIOCHEM®

Buffers

A guide for the preparation and use of buffers in biological systems

$$\text{pH} = \text{pK}_a + \log \frac{[\text{CH}_3\text{COO}^-]}{[\text{CH}_3\text{COOH}]}$$

Advancing your life science discoveries™

Es. Preparazione di un tampone

Hepes buffered saline (HBS)

20 mM Hepes, 150 mM NaCl, pH 7.4

	PM	C finale
Hepes	238.3 g/mol	20 mM
NaCl	58.44 g/mol	150 mM

V finale

1 L

	C iniziale	C finale
Hepes	1 M	20 mM
NaCl	1.5 M	150 mM

V finale

1 L

$$\text{n. moli} = \frac{\text{g soluto}}{\text{PM (g/mol)}}$$

$$C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$$

M = mol/L ; mM = mmol/L

Es. Preparazione di un tampone

Hepes buffered saline (HBS)

20 mM Hepes, 150 mM NaCl, pH 7.4

	PM	C finale
Hepes	238.3 g/mol	20 mM
NaCl	58.44 g/mol	150 mM

V finale

1 L

$$\text{n. moli} = \frac{\text{g soluto}}{\text{PM (g/mol)}}$$

Hepes

$$\text{PM (g/mol)} \times \text{n. moli} = \text{g soluto}$$

$$238.3 \text{ g/mol} \times 0.02 \text{ mol} = 4.76 \text{ g}$$

NaCl

$$\text{PM (g/mol)} \times \text{n. moli} = \text{g soluto}$$

$$58.44 \text{ g/mol} \times 0.15 \text{ mol} = 8.77 \text{ g}$$

Es. Preparazione di un tampone

Hepes buffered saline (HBS)

20 mM Hepes, 150 mM NaCl, pH 7.4

	C iniziale	C finale
Hepes	1 M	20 mM
NaCl	1.5 M	150 mM

V finale

1 L

$$C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$$

Hepes

$$C_1 = 1 \text{ M}; C_2 = 20 \text{ mM}; V_2 = 1 \text{ L}$$

$$V_1 = (20 \text{ mM} \times 1000 \text{ ml}) / 1000 \text{ mM} = \mathbf{20 \text{ ml}}$$

NaCl

$$C_1 = 1.5 \text{ M}; C_2 = 150 \text{ mM}; V_2 = 1 \text{ L}$$

$$V_1 = (150 \text{ mM} \times 1000 \text{ ml}) / 1500 \text{ mM} = \mathbf{100 \text{ ml}}$$

Es. Preparazione di un tampone

Hepes buffered saline (HBS)

20 mM Hepes, 150 mM NaCl, pH 7.4

	PM	C finale
Hepes	238.3 g/mol	20 mM
NaCl	58.44 g/mol	150 mM

V finale

1 L

	C iniziale	C finale
Hepes	1 M	20 mM
NaCl	1.5 M	150 mM

V finale

1 L

Fattore di diluizione

$$\left. \begin{array}{l} 238.3 \text{ g} = 1 \text{ M} \\ \text{C finale} = 20 \text{ mM} \end{array} \right\} \text{Rapporto} = 50$$

(50 volte meno) $\rightarrow 238.3 / 50 = 4.76 \text{ g}$

$$\left. \begin{array}{l} C_1 = 1 \text{ M} \\ C_2 = 20 \text{ mM} \end{array} \right\} \text{Rapporto} = 50$$

(50 volte meno) $\rightarrow 1000 \text{ ml} / 50 = 20 \text{ ml}$

$$\left. \begin{array}{l} 58.44 \text{ g} = 1 \text{ M} \\ \text{C finale} = 150 \text{ mM} \end{array} \right\} \text{Rapporto} = 6.66$$

(6.66 volte meno) $\rightarrow 58.44 / 6.66 = 8.77 \text{ g}$

$$\left. \begin{array}{l} C_1 = 1.5 \text{ M} \\ C_2 = 150 \text{ mM} \end{array} \right\} \text{Rapporto} = 10$$

(10 volte meno) $\rightarrow 1000 \text{ ml} / 10 = 100 \text{ ml}$