

INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

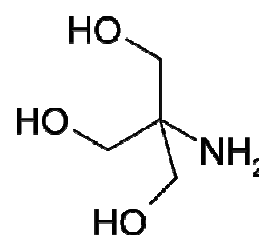
Úloha č.2

Stanovení disociačních konstanty TRIS a k. fosforečné

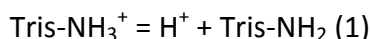
Jméno:	
Obor:	Datum provedení:

## TEORETICKÝ ÚVOD

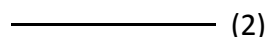
Tris je zkratkou organické sloučeniny tris(hydroxymetyl)aminometan (Obr. 1), která je velmi často používána v biochemii a molekulární biologii jako pufrální látka. Z chemického hlediska se jedná o primární amin, který se ve vodném roztoku chová podle disociační rovnováhy (1):



a TRIS



Z hlediska Brønstedovy teorie kyselin a zásad lze i na protonizované báze pohlížet jako na kyseliny a lze tudíž definovat následující disociační konstantu:



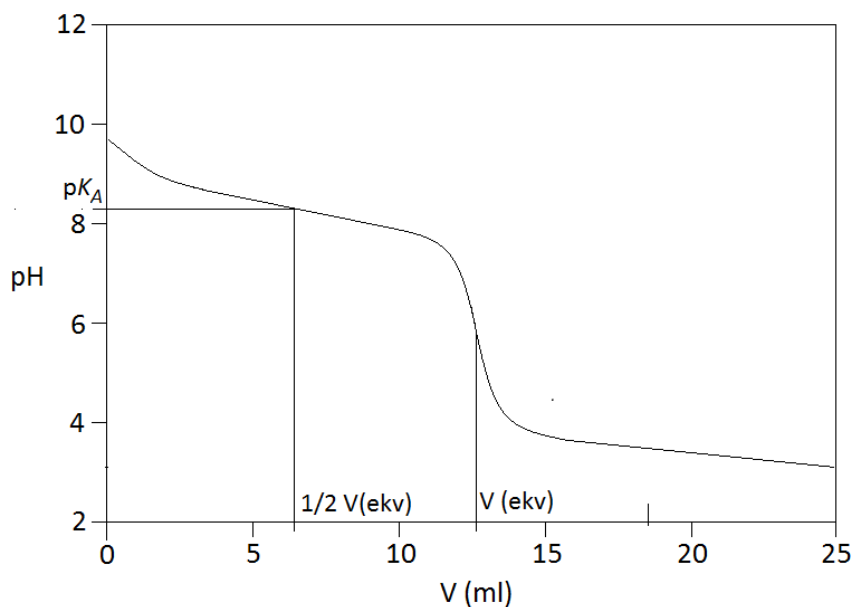
Protože hodnoty disociačních konstant mohou být různého řádu, udávají se z praktického hlediska v podobě svých logaritmů (resp. záporných logaritmů) jako  $\text{p}K_A$ .

Na obrázku 2 je znázorněn průběh acidobazické titrace, kdy pokud je k bazickému roztoku postupně přidávána kyselina, dochází k neutralizaci a pH roztoku se snižuje jen zvolna. Tato část titrační křivky se často označuje jako oblast pufrální, kdy s přidávkem titračního činidla (báze nebo kyseliny) se pH roztoku mění jen pozvolna. Bod, kdy je látkové množství kyseliny rovno látkovému množství báze nazýváme **bodem ekvivalence**. V oblasti bodu ekvivalence se směrnice titrační křivky významně mění a následně v oblasti velkého nadbytku kyseliny se pH mění opět jen zvolna.

INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

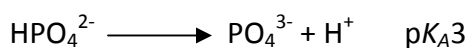
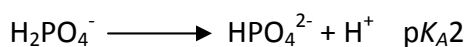
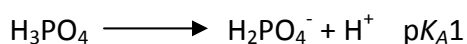
Úloha č.2

Stanovení disociačních konstanty TRIS a k. fosforečné

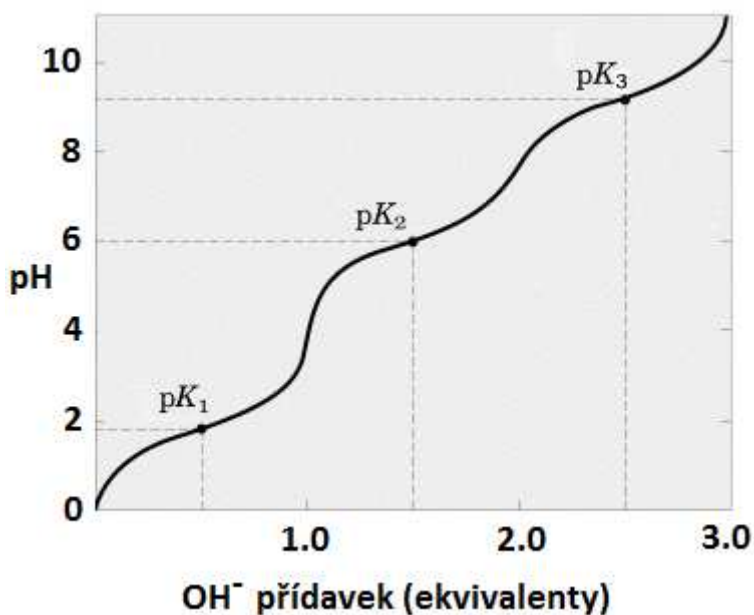


Obrázek 2: Titrační křivka slabé zásady silnou kyselinou

Dalším velmi často používaným pufrům je poté fosfátový pufr. Kyselina fosforečná je vícesytná kyselina mající tři různé  $pK_a$  hodnoty a poskytující tak více oblastí s dobrou pufrací kapacitou:



Na obrázku 3 je znázorněn průběh acidobazické titrace k. fosforečné, kdy při postupném přidávku hydroxidu můžeme pozorovat tři inflexní body odpovídající příslušným bodům ekvivalence.

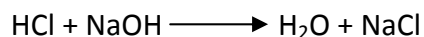


Obrázek 3: Titrací křivka kyseliny fosforečné hydroxidem sodným

## PRAKTICKÁ ČÁST

### A. Stanovení koncentrace HCl titrací roztokem NaOH

Při smíchání k. chlorovodíkové a hydroxidu sodného probíhá neutralizační reakce podle rovnice:



Během neutralizační reakce reagují ionty H<sup>+</sup> kyseliny přítomné v roztoku s přidávanými OH<sup>-</sup> ionty hydroxidu za vzniku molekuly H<sub>2</sub>O. Jakmile je veškerá kyselina zneutralizována, dojde při dalším přidavku hydroxidu ke vzniku nadbytku OH<sup>-</sup> iontů v roztoku. Tento stav lze určit pomocí vhodného indikátoru, v našem případě fenolftaleinu.

## INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Úloha č.2

Stanovení disociačních konstanty TRIS a k. fosforečné

Postup práce:

1. Do titrační baňky odpipetujte 5 ml roztoku HCl a přidejte několik kapek fenolftaleinu.
2. Titrujte 0.1 M roztokem NaOH. Titrace je skončena v okamžiku, když se poslední kapkou přidávaného činidla z byrety zbarví titrovaný roztok HCl dočervena. Barevné změně indikátoru odpovídá pod ekvivalence.
3. Titraci opakujte třikrát a na základě průměrné hodnoty ze tří titrací vypočítejte přesnou koncentraci roztoku HCl.

Výsledky:

V <sub>NaOH</sub> (ml)			V <sub>prům</sub> (ml)	c <sub>HCl</sub> (M)

**B. Stanovení disociační konstanty TRIS (tris(hydroxymetyl)aminometan)**Postup práce:*Kalibrace pH metru*

1. Otevřete menu pro kalibraci zmáčknutím tlačítka <CAL>, kdy se na displeji objeví blikající indikátor "BUF"
2. Důkladně opláchněte elektrodu destilovanou vodou a ponořte ji do prvního pufru o pH 7.01.
3. Na displeji bude blikat upozornění "NOT READY". Zkontrolujte, zdali je vybrán kalibrační pufr o správném pH=7.01 (na displeji hodnota vpravo dole). Pokud ne, nastavte pomocí šipek nahoru a dolů kalibrační pufr o pH=7.01. Pokud bude hodnota

## INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Úloha č.2

*Stanovení disociačních konstanty TRIS a k. fosforečné*

- pH vzdálená od vybraného pufru (na displeji hodnota vpravo dole), bude blikat upozornění “WRONG”.
- Pravidelně promíchejte elektrodu v ponořeném roztoku a vyčkejte, dokud se neustálí měřená hodnota pH. Jakmile se hodnota ustálí, objeví se na displeji upozornění “READY” a zmáčknete tlačítko <CFM>.
  - Důkladně opláchněte elektrodu destilovanou vodou a ponořte ji do druhého pufru o pH 4.01.
  - Na displeji bude blikat upozornění “NOT READY”. Zkontrolujte, zdali je vybrán kalibrační pufr o správném pH=4.01. Pokud ne, nastavte pomocí šipek nahoru a dolů kalibrační pufr o pH=4.01. Pokud bude hodnota pH vzdálená od vybraného pufru (na displeji hodnota vpravo dole), bude blikat upozornění “WRONG”.
  - Pravidelně promíchejte elektrodu v ponořeném roztoku a vyčkejte, dokud se neustálí měřená hodnota pH. Jakmile se hodnota ustálí, objeví se na displeji upozornění “READY” a zmáčknete tlačítko <CFM> a přístroj se vrátí do měřícího módu.

### *Vlastní měření*

- Do 75 ml kádinky napipetujte přesně 1,0 ml roztoku TRIS a naředte jej 29 ml vody.
- Do kádinky vložte magnetické míchadlo, kádinku postavte na magnetickou míchačku a spusťte míchání.
- Zkalibrovanou elektrodu opláchněte vodou, osušte kouskem buničité vaty a ponořte do naředěného roztoku TRIS v kádince. Při ponoření elektrody do roztoku si dejte pozor, aby elektroda nebyla v kontaktu s míchadlem a aby byla ponořena frita elektrody.
- Odečtěte hodnotu pH.
- Do titrovaného roztoku přidejte pipetou 1,0 ml odměrného roztoku kyseliny chlorovodíkové a po ustálení hodnoty pH metru odečtěte pH.
- Tento postup opakujte až do konečné spotřeby 24,0 ml.

## INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Úloha č.2

Stanovení disociačních konstanty TRIS a k. fosforečné

7. Vyneste v programu Excel titrační křivku (závislost pH na objemu přidané kyseliny chlorovodíkové) a proložením bodů určete bod ekvivalence (inflexe titrační křivky).
8. Vypočítejte koncentraci předloženého roztoku TRIS a v polovině spotřeby k bodu ekvivalence poté odečtěte  $pK_A$  TRIS.
9. Zhodnoťte, v jakém rozsahu pH se dá TRIS používat jako pufr.

Výsledky:

$c_{HCl}$ (mM)	$V_{ekv}$ (ml)	$c_{TRIS}$ (mM)	$pK_A$ TRIS

Titrační křivka (závislost pH na objemu přidané kyseliny chlorovodíkové)

## INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Úloha č.2  
*Stanovení disociačních konstanty TRIS a k. fosforečné*

Zhodnocení, v jakém rozsahu pH se dá TRIS používat jako pufr

### **C. Stanovení disociačních konstanty kyseliny fosforečné**

#### *Vlastní měření*

1. Do 75 ml kádinky napipetujte přesně 1,0 ml 0,3 M roztoku kyseliny fosforečné a nařed'te jej 29 ml vody.
2. Do kádinky vložte magnetické míchadlo, kádinku postavte na magnetickou míchačku a spus'tte míchání.
3. Zkalibrovanou elektrodu opláchněte vodou, osušte kouskem buničité vaty a ponořte do naředěného roztoku kyseliny fosforečné v kádince. Při ponoření elektrody do

## INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Úloha č.2

Stanovení disociačních konstanty TRIS a k. fosforečné

roztoku si dejte pozor, aby elektroda nebyla v kontaktu s míchadlem a aby byla ponořena fritá elektrody.

- Odečtěte hodnotu pH.
- Do titrovaného roztoku přidejte pipetou 0,5 ml 0.1M roztoku hydroxidu sodného a po ustálení hodnoty pH metru odečtěte pH.
- Tento postup opakujte až do konečné spotřeby 15,0 ml.
- Vyneste v programu Excel titrační křivku (závislost pH na objemu přidaného hydroxidu sodného) a proložením bodů určete body ekvivalence (inflexe titrační křivky) poté odečtěte jednotlivé hodnoty  $pK_A$  kyseliny fosforečné.
- Zhodnoťte, v jakém rozsahu pH se dá používat fosfátový pufr.

Titrační křivka (závislost pH na objemu přidaného hydroxidu sodného)



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Úloha č.2  
*Stanovení disociačních konstanty TRIS a k. fosforečné*

Zhodnocení, v jakém rozsahu pH se dá používat fosfátový pufr