

INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

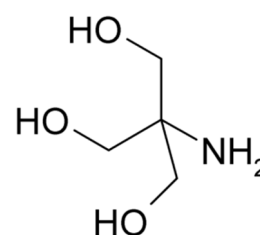
Úloha č.2

Stanovení disociačních konstanty TRIS a k. fosforečné

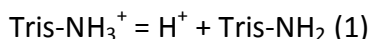
Jméno:	
Obor:	Datum provedení:

## TEORETICKÝ ÚVOD

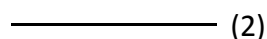
Tris je zkratkou organické sloučeniny tris(hydroxymetyl)aminometan (Obr. 1), která je velmi často používána v biochemii a molekulární biologii jako pufrální látka. Z chemického hlediska se jedná o primární amin, který se ve vodném roztoku chová podle disociační rovnováhy (1):



Obrázek 1: Struktura TRIS



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



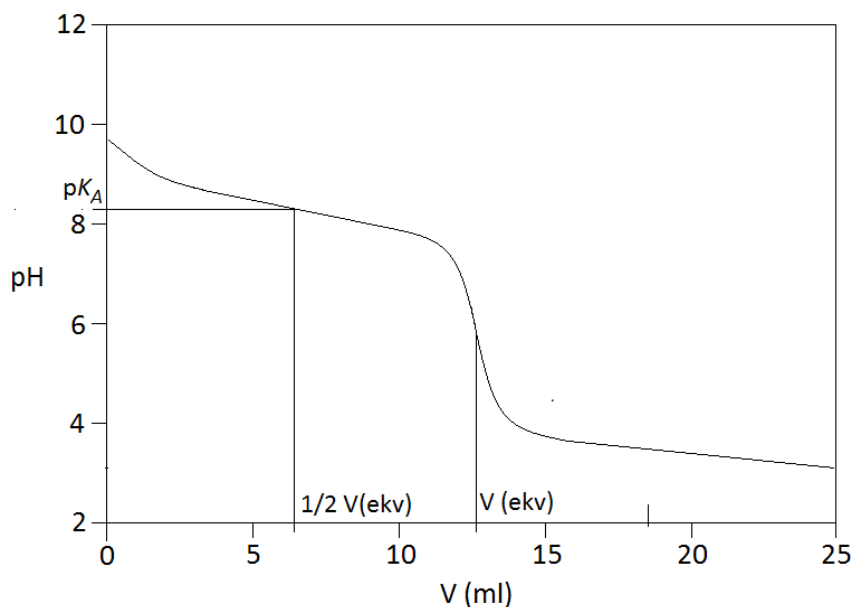
Protože hodnoty disociačních konstant mohou být různého řádu, udávají se z praktického hlediska v podobě svých logaritmů (resp. záporných logaritmů) jako  $\text{p}K_A$ .

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

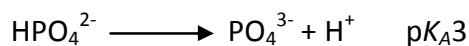
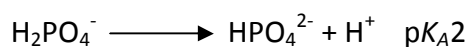
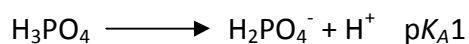
Úloha č.2

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 pKa hodnoty a poskytující tak více oblastí s dobrou pufrací kapacitou:

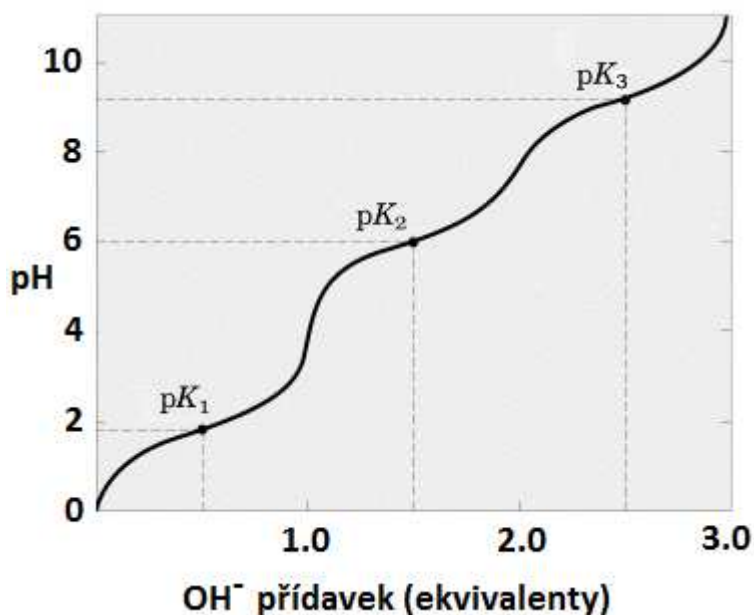


Na obrázku 3 je znázorněn průběh acidobazické titrace k. fosforečné, kdy při postupném přidávku hydroxidu můžeme pozorovat tři inflexní body odpovídající příslušným bodům ekvivalence.

INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Úloha č.2

Stanovení disociačních konstanty TRIS a k. fosforečné

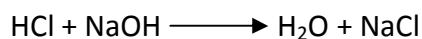


Obrázek 3: Titrací křivka kyseliny fosforečné hydroxidem sodným

## 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.

### Postup práce:

## INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Úloha č.2

Stanovení disociačních konstanty TRIS a k. fosforečné

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:

$V_{\text{NaOH}} \text{ (ml)}$			$V_{\text{prům}} \text{ (ml)}$	$c_{\text{HCl}} \text{ (M)}$

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

1. Otevřete menu pro kalibraci zmáčknutím tlačítka <CAL>
2. Pomocí tlačítka <CAL> zvolte typ kalibrace [ConCal]. Na displeji se objeví nápis „ASY“.
3. Důkladně opláchněte elektrodu destilovanou vodou a ponořte ji do prvního pufru o pH 7.0.
4. Spusťte měření zmáčknutím tlačítka <ENTER>.
5. Počkejte na stabilizaci hodnoty a nastavte pomocí šipek nahoru/dolů hodnotu na 7.0.
6. Ukončete zmáčknutím tlačítka <ENTER>.
7. Na displeji se objeví nápis „SLO“.

## INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Úloha č.2

Stanovení disociačních konstanty TRIS a k. fosforečné

---

8. Důkladně opláchněte elektrodu destilovanou vodou a ponořte ji do druhého pufru o pH 4.0.
9. Spusťte měření zmáčknutím tlačítka **<ENTER>**.
10. Počkejte na stabilizaci hodnoty a nastavte pomocí šipek nahoru/dolů hodnotu na 4.0.
11. Ukončete měření zmáčknutím tlačítka **<ENTER>**.
12. Objeví se zobrazení směrnice kalibrační přímky (mV/pH) a poté zmáčkněte opět **<ENTER>**.
13. Objeví se asymetrie (mV), měření spusťte zmáčknutím tlačítka **<ENTER>**.

### Vlastní měření

1. Do 75 ml kádinky napipetujte přesně 1,0 ml roztoku TRIS a naředte jej 29 ml vody.
2. Do kádinky vložte magnetické míchadlo, kádinku postavte na magnetickou míchačku a spusťte míchání.
3. 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.
4. Odečtěte hodnotu pH.
5. Do titrovaného roztoku přidejte pipetou 1,0 ml odměrného roztoku kyseliny chlorovodíkové a po ustálení hodnoty pH metru odečtěte pH.
6. Tento postup opakujte až do konečné spotřeby 24,0 ml.
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.

INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Úloha č.2

Stanovení disociačních konstanty TRIS a k. fosforečné

Výsledky:

$c_{\text{HCl}}$ (mM)	$V_{\text{ekv}}$ (ml)	$c_{\text{TRIS}}$ (mM)	$pK_{\text{A}}$ 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 naředte jej 29 ml vody.
2. Do kádinky vložte magnetické míchadlo, kádinku postavte na magnetickou míchačku a spusťte míchání.
3. Zkalibrovanou elektrodu opláchněte vodou, osušte kouskem buničité vaty a ponořte do naředěného roztoku kyseliny fosforečné v kádince. Při ponoření elektrody do roztoku si dejte pozor, aby elektroda nebyla v kontaktu s míchadlem a aby byla ponořena frita elektrody.

## INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Úloha č.2

*Stanovení disociačních konstanty TRIS a k. fosforečné*

- 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