

Příprava roztoků, absorpční spektrofotometrie

Příprava roztoků

Roztoky jsou homogenní soustavy složené ze dvou či více složek. Složení roztoků (tedy údaje o kvantitativním zastoupení jednotlivých složek) lze vyjadřovat různými způsoby. Volba způsobu se řídí podle účelu, k němuž má údaj o obsahu sloužit. Údaje jsou vztaženy vždy na určité množství roztoku nebo rozpouštědla.

Složení roztoků lze obecně vyjádřit:

- a) poměrným zastoupením vybrané složky v soustavě
- b) podílem množství dané složky a objemu soustavy

Poměrné zastoupení složky v soustavě

Složení roztoku můžeme vyjádřit poměrným zastoupením dané složky v soustavě podle použité veličiny v hmotnostních, objemových či molárních zlomcích.

Hmotnostní zlomek

Hmotnostní zlomek w_A látky A v roztoku vyjadřuje podíl hmotnosti rozpuštěné látky a celkové hmotnosti roztoku a je definován vztahem: $w_A = \frac{m_A}{m_S}$, kde m_A je hmotnost látky A v roztoku (hmotnost složky A) a m_S je celková hmotnost roztoku. Hmotnostní zlomek určité složky soustavy je relativní veličina a nabývá hodnot od nuly do jedné ($0 \leq w_A \leq 1$). Má-li hmotnostní zlomek hodnotu 0, znamená to, že látka není v soustavě přítomna. Hodnoty 1 pak dosahuje zlomek tehdy, je-li složka v soustavě přítomna sama (jedná se o čistou látku).

Často se používá vyjádření o hmotnostním složení soustavy v procentech jako hmotnostní procento nebo procentový obsah látky v soustavě. V podstatě se však jedná jen o vyjádření hmotnostního zlomku v procentech (% w/w). Protože procento je jedna setina, tj. 1 % = 0,01; lze pak hmotnostní zlomek zapsat např. $w_A = 0,15$ neboli $w_A = 15$ %. Další možná vyjádření hmotnostního zlomku pro malé obsahy látek v soustavě jsou promile, tj. jedna tisícina 1 ‰ = 0,001, nebo jednotky ppm (čteme „pípiem“, parts per milion), které znamenají jednu miliontinu, tedy 1 ppm = 10^{-6} . Obsah složky v ppm znamená např. hmotnost látky v µg na 1g soustavy nebo v g na 1 tunu soustavy.

Od uvedené definice hmotnostního zlomku připouštíme v laboratoři tyto odchylky:

1. Je-li rozpouštědlem destilovaná voda, pak množství rozpuštěné látky vztahujeme k objemu rozpouštědla. Např. 100 ml 20% NaOH připravíme rozpuštěním 20 g NaOH v 80 ml H₂O.
2. Roztoky s obsahem látky menším než 5 %, tedy s hustotou blízkou jedné, připravíme rozpuštěním příslušného množství látky přímo v zvoleném objemu vody.

Objemový zlomek

Objemový zlomek φ_A látky A v roztoku vyjadřuje podíl objemu rozpuštěné látky a objemu celého roztoku a je definován vztahem: $\varphi_A = \frac{V_A}{V_S}$, kde V_A je objem látky A v roztoku a V_S je celkový objem roztoku. Objemový zlomek slouží k vyjadřování složení zejména soustav kapalin a plynů, neboť odměřování objemu kapalin a plynů je snadnější než jejich odvažování. Objemový zlomek je opět relativní veličina, která může nabývat hodnot od 0 do 1. Lze jej rovněž vyjadřovat v objemových procentech (% v/v), popř. jednotkách promile či ppm. Všechny objemy musí být měřeny za stejných podmínek (teplota, tlak). Celkový objem soustavy nelze nahrazovat součtem objemů jednotlivých složek, protože může docházet k objemové kontrakci, popř. objemové dilataci (zmenšení či zvětšení výsledného objemu). Pouze v případech, kdy lze objemové změny při smíchání zanedbat (např. velmi zředěné roztoky), platí, že součet objemů všech složek roven celkovému objemu soustavy.

Molární zlomek

Molární zlomek x_A látky A v roztoku lze vyjádřit jako podíl látkového množství dané složky a celkového látkového množství všech složek v roztoku a je definován vztahem: $x_A = \frac{n_A}{n_S}$, kde n_A je látkové množství látky A v roztoku a n_S je celkové látkové množství jednotlivých složek v roztoku. Molární zlomky, stejně jako zlomky hmotnostní a objemové, jsou veličiny relativní a mohou nabývat hodnot od 0 do 1. Lze je rovněž vyjadřovat v molárních procentech (zápis mol %), promile a ppm. Vzhledem k platnosti Avogadrova zákona (stejná látková množství plynů za stejných podmínek zaujímají stejný objem) je obsah složky v soustavě plynů vyjádřený molárním zlomkem rovný objemovému zlomku. Tedy $\varphi_A = x_A$.

Další možností, jak vyjádřit složení roztoků, je definování podílu množství rozpuštěné látky a celkového objemu roztoku, tedy veličiny vztažené na objem roztoku. Tyto veličiny obecně označujeme jako tzv. koncentrace.

Koncentrace látkového množství

Koncentrace látkového množství $c_A(c)$ udává látkové množství rozpuštěné látky A obsažené v celkovém objemu roztoku. Lze ji vyjádřit vztahem: $c_A = \frac{n_A}{V_S}$, kdy $[c_A] = \text{mol} \times \text{dm}^{-3}$, kde n_A je látkové množství složky A v roztoku V_S je objem roztoku. V chemii se nejčastěji vyjadřuje koncentrace látkového množství v jednotkách $\text{mol} \times \text{dm}^{-3}$ (popř. $\text{mol} \times \text{l}^{-1}$). Běžně se této veličině nesprávně říká „molární koncentrace“. Přívlastek „molární“ totiž naznačuje, že rozměr veličiny je mol^{-1} a zde tomu tak není. Vhodným zkráceným termínem pro c_A je pojem látková koncentrace.

Hmotnostní koncentrace

Hmotnostní koncentrace c_m (w/v) vyjadřuje hmotnost rozpuštěné látky A v daném objemu roztoku. Je definována vztahem: $c_m = \frac{m_A}{V_S}$, kdy $[c_m]=\text{kg}\times\text{dm}^{-3}$, kde m_A je hmotnost složky A v roztoku a V_S je objem roztoku. Hlavní jednotkou hmotnostní koncentrace je již uvedený $\text{kg}\times\text{dm}^{-3}$, ale pro běžnou praxi se užívá dílčích jednotek jako je $\text{g}\times\text{cm}^{-3}$, $\text{g}\times\text{dm}^{-3}$. Ve velmi zředěných vodných roztocích je hodnota hmotnostní koncentrace prakticky shodná s hmotnostním zlomkem. Označení pro hmotnostní koncentraci není v literatuře jednotné.

Směšování a ředění roztoků

V praxi se často setkáváme s potřebou přípravy roztoku určitého složení, máme-li k dispozici roztoky téže látky, ale jiného složení. Složení roztoků lze upravovat přidáním rozpuštěné látky, přidáním či odpařením rozpouštědla nebo smísením roztoků různého složení, případně ochlazením nasyceného roztoku. Uvedené procesy lze popsat následovně:

a) **Zahušťování roztoků** – proces, při kterém dochází ke zvyšování obsahu rozpuštěné látky, důsledkem čehož vzniká „roztok koncentrovanější“. Zahušťování roztoků lze provést přidáním rozpuštěné látky, odpařením části rozpouštědla, přidáním roztoku s vyšším obsahem rozpuštěné látky.

b) **Ředění roztoků** – proces, při kterém dochází k poklesu obsahu rozpuštěné látky, důsledkem čehož vzniká „roztok zředěnější“. Ředění roztoků se provádí přidáním rozpouštědla, přidáním roztoku s nižším obsahem rozpuštěné látky a případně ochlazením nasyceného roztoku.

Úlohy na směšování a ředění roztoků řešíme pomocí:

- Směšovací rovnice
- Křížového (směšovacího) pravidla s následnou úměrou

SMĚŠOVACÍ ROVNICE

Pro výpočet potřebného množství směšovaných složek nebo výsledného složení roztoku se používá směšovací rovnice, která vychází z hmotnostní bilance soustavy. Smísíme-li dva roztoky o známém složení, lze určit celkovou hmotnost a složení výsledného roztoku:

$m_1 + m_2 = m_3$, $m_1w_1 + m_2w_2 = m_3w_3$, kde m_1, m_2, m_3 jsou hmotnosti jednotlivých roztoků w_1, w_2, w_3 jsou hmotnostní zlomky jednotlivých roztoků.

Ředíme-li roztok čistým rozpouštědlem (vodou) je hmotnostní zlomek rozpuštěné látky roven nule ($w = 0$) a druhý bilanční vztah se zjednoduší na vztah: $m_1w_1 = m_3w_3$. Přidáváme-li čistou rozpuštěnou látku v bezvodém stavu, je hmotnostní zlomek roven jedné ($w=1$).

Roztoky v laboratorní praxi většinou odměřujeme a jejich množství udáváme objemem. Ve směšovací rovnicích lze tedy hmotnost nahradit součinem objemu a hustoty ($m = V \times \rho$). Pro vyjádření hustoty se běžně užívá vedle hlavní jednotky $\text{kg} \cdot \text{m}^{-3}$ i $\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$ (zejména používáme-li hmotnosti látek v gramech a objemy v cm^3). Při výpočtech v běžných laboratorních podmínkách lze počítat s hustotou vody ρ (H_2O) $\approx 1 \text{ g} \cdot \text{cm}^{-3}$, tedy objem vody v cm^3 se číselně rovná přibližně její hmotnosti v gramech.

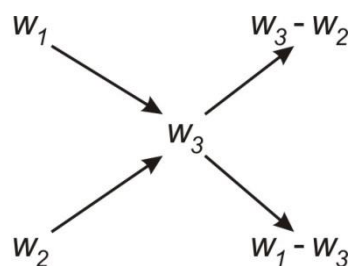
Pro výpočty při směšování roztoků je možné použít rovněž vztah založený na bilanci látkového množství rozpuštěné látky: $n_1 + n_2 = n_3 \Rightarrow c_1 V_1 + c_2 V_2 = c_3 V_3$, kde n_1, n_2, n_3 jsou látková množství rozpuštěné látky, c_1, c_2, c_3 jsou látkové koncentrace roztoků, V_1, V_2, V_3 jsou objemy roztoků.

Při směšování roztoků nesmíme automaticky vycházet pouze z objemové bilance a počítat jednotlivé objemy, protože dochází k objemové kontrakci, či dilataci. Abychom mohli použít bilanční vztah využívající objemy roztoků, je nutné vždy uvážit, zda je možné zanedbat změnu objemu při míšení roztoků. Platí, že výsledný objem nemůže být roven součtu objemů výchozích roztoků, jestliže:

- značně koncentrovaný roztok je ředěn čistým rozpouštědlem
- hustoty míšených roztoků jsou velmi rozdílné
- koncentrace míšených roztoků jsou relativně vysoké
- je-li vysoký rozdíl mezi teplotami míšených roztoků

KŘÍŽOVÉ (SMĚŠOVACÍ) PRAVIDLO

Křížové pravidlo vychází rovněž z hmotnostní bilance a směšovací rovnice. Vyjadřuje vlastně hmotnostní díly míšených roztoků, které je třeba upravit úměrou na požadované hmotnosti. Pravidlo lze obecně schematicky zapsat takto:



kde w_1 je hmotnostní zlomek roztoku 1, w_2 je hmotnostní zlomek roztoku 2, w_3 je hmotnostní zlomek výsledného roztoku. $w_3 - w_2$ jsou hmotnostní díly roztoku 1 po smíšení a $w_1 - w_3$ jsou hmotnostní díly roztoku 2 po smíšení. U složitějších příkladů je vhodnější použít směšovací rovnici.

Absorpční spektrofotometrie

Kromě přípravy roztoků přesného složení se budete během tohoto laboratorního cvičení věnovat také měření na absorpčním spektrofotometru. Použitá spektrofotometrická metoda je založena na Lambert-Beerově zákonu, který definuje vztah mezi absorbcí světla a vlastnostmi určité látky, kterou světlo prochází. V roce 1852 vyjádřil A. Beer pohlcování světla prostředím jako absorbanci, což je záporně vzatý dekadický logaritmus transmitance. Dále zjistil, že hodnota absorpance závisí na koncentraci látky v roztoku. Tuto závislost formuloval matematicky následujícím vztahem: $A(\lambda) = \varepsilon(\lambda) \times l \times c$, kde $A(\lambda)$ je absorpance světla, $\varepsilon(\lambda)$ je molární extinkční koeficient dané látky na dané vlnové délce světla λ , l je délka optické dráhy, c je koncentrace látky v roztoku. Z tohoto zákona je patrná přímá závislost absorpance světla látkou na její koncentraci v roztoku. Toho můžeme využít ke stanovení koncentrace látky v roztoku.

Přesné informace k uvedené problematice najdete v třetí přednášce z předmětu KBF/OSP1 Optické spektroskopie 1, který vyučuje pan doc. Kubala právě nyní (LS, 2. ročník oborů BF a MBF). Přednášky jsou dostupné na webu Katedry biofyziky (<http://biofyzika.upol.cz>) v sekci Výuka/Studijní materiály pod názvem příslušného předmětu. Doporučuji tedy nastudovat uvedený materiál.

Úloha 1: Přípravte koncentrační řadu skalice modré a určete její extinkční koeficient za použití absorpční spektrofotometrie

Pomůcky: předvážky, váženka, lžička, kádinka 10 ml, štěteček, mikrozkumavky, automatické pipety, špičky, stojánky, spektrofotometrické kyvety, spektrofotometr, ochranné rukavice

Chemikálie: pentahydrát síranu měďnatého, voda

Postup:

1. Navažte správné množství skalice modré k přípravě 5 ml zásobního roztoku o koncentraci 1 M.
2. Zapněte váhy do elektrické sítě.
3. Vložte váženku do váhového prostoru.
4. Vynulujte váhy stisknutím tlačítka TARE (ZERO).
5. Plastovou lžičkou nebo kopistí přidejte na váženku potřebné množství modré skalice. V žádném případě neodebírejte chemikálii.
6. Zznamenejte zjištěnou hmotnost modré skalice.
7. Skalici přesypte do kádinky.
8. Pokud navážíte více či méně skalice, přizpůsobte výsledný objem rozpouštědla tak, abyste získali 1 M zásobní roztok.

- Zásobní roztok zředte vodou tak, abyste získali řadu roztoků modré skalice o koncentracích 5, 10; 20; a 40 mM.
- Změřte absorbanci připravených roztoků na absorpčním spektrofotometru, zkontrolujte přesnost pipetování.
- Získané hodnoty maximální absorbance při zjištěné vlnové délce vynesete do tabulky:

Koncentrace roztoků c	5 mM	10 mM	20 mM	40 mM
A_{\max}				
λ_{\max}				

- Určete extinkční koeficient roztoku skalice modré o koncentraci 10 mM.

Úloha 2 A: Připravte zásobní roztok pufru TAE 50x, který budete používat v následujících cvičeních

Pomůcky: váhy, kádinka, lžička, odměrný válec, odměrná baňka, magnetické míchátko, magnetická míchačka

Chemikálie: TRIS, kyselina octová, Na₂EDTA, deionizovaná voda

Postup:

- Na přípravu roztoku TAE 50x v objemu 50 ml potřebujete:
12,1 g TRIS
0,93 g Na₂EDTA
2,86 ml CH₃COOH (99,7%)
- Navážte nebo odměřte příslušný objem výše uvedených složek pufru do vhodné nádoby s přibližně 35 ml deionizované vody, kterou budete používat pro přípravu pufru. Dejte rozpouštět na magnetickou míchačku. Použijte magnetické míchátko vhodné velikosti.
- Po rozpuštění všech složek doplňte vodou do objemu 50 ml a upravte hodnotu pH roztoku pomocí pH metru (úpravu pH proveďte během cvičení Konduktometrie a měření pH).

Úloha 2 B: Připravte migrační pufr pro SDS-PAGE, který budete používat v následujících cvičeních

Pomůcky: váhy, kádinka, lžička, odměrný válec, magnetické míchátko, magnetická míchačka

Chemikálie: TRIS, glycin, dodecylsírán sodný (SDS), deionizovaná voda

Postup:

1. Na přípravu 500 ml migračního pufru potřebujete:
 - 1,5 g TRIS
 - 7,2 g Glycinu
 - 5 ml SDS (10%)
2. Navažte nebo odměřte příslušný objem výše uvedených složek pufru do vhodné nádoby s přibližně 350 ml deionizované vody, kterou budete používat pro přípravu pufru. Dejte rozpouštět na magnetickou míchačku. Použijte magnetické míchátko vhodné velikosti.
3. Po rozpuštění všech složek doplňte vodou do objemu 500 ml a upravte hodnotu pH roztoku pomocí pH metru (úpravu pH proveďte během cvičení Konduktometrie a měření pH).