

Konduktometrie a potenciometrie

Kyselost či zásaditost vodných roztoků určuje koncentrace hydroxoniových iontů, které vznikají protolýzou příslušné kyseliny: $HA + H_2O \leftrightarrow H_3O^+ + A^-$

Pro jednoduchost se obvykle píšou jen ionty H^+ a uvedená rovnice má tvar $HA \leftrightarrow H^+ + A^-$. Pro praktičtější vyjádření nízkých hodnot koncentrace H^+ zavedl Sørensen v roce 1907 veličinu: $pH = -\log c_{H^+}$, kde c_{H^+} je koncentrace vodíkových kationtů. Obecně se však při měření pH neuplatňuje skutečná koncentrace iontů, ale jen koncentrace účinná neboli aktivita a_{H^+} , což je hodnota zmenšená vlivem vzájemného působení iontů. Aktivita $a_{H^+} = c_{H^+}$ pouze pro velmi zředěné kyseliny. Protože však nás zajímá především *aktivitní* koncentrace H^+ , tj. ta, která určuje chemickou účinnost, byla definice pH v roce 1924 přeformulována na $pH = -\log a_{H^+}$.

Ve vodě se ustavuje rovnováha $H_2O \leftrightarrow H^+ + OH^-$. Disociaci vody charakterizuje disociační konstanta vody: $K_{H_2O} = \frac{a_{H^+} a_{OH^-}}{a_{H_2O}}$. Pro čistou vodu při 25 °C je iontový součin vody $a_{H_2O} K_{H_2O} = a_{H^+} a_{OH^-} = 10^{-14} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ a $a_{H^+} = a_{OH^-} = 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$, a tedy $pH = 7$. Pro kyselé roztoky nabývá pH hodnot < 7 a pro zásadité nabývá hodnot > 7 .

POTENCIOMETRICKÉ MĚŘENÍ pH

Potenciometrické měření pH se zakládá na měření rozdílu potenciálů měřící a referenční elektrody. Měření pH tedy spočívá v měření elektromotorického napětí článku, přičemž každá z elektrod představuje vlastně poločlánek článku. Kromě nepraktické vodíkové elektrody lze jako měřící elektrodu použít další indikační elektrody (nejčastěji skleněná), jejichž potenciál je nepřímo ovlivněn aktivitou H^+ . Pro jejich potenciál E obecně platí Nernstova rovnice:

$$E = k + \frac{2,303 \times R \times T}{F} \log a_{H^+} = k - \frac{2,303 \times R \times T}{F} pH$$
, kde k je konstanta. R , T a F jsou univerzální plynová konstanta ($8,314 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$), absolutní teplota a Faradayova konstanta ($9,6484 \cdot 10^4 \text{ C mol}^{-1}$). Jako referenční elektrody se používá kalomelová nebo argentchloridová elektroda (tzv. elektrody druhého druhu), které mají známý konstantní reprodukovatelný potenciál E_{ref} . Elektromotorické napětí měřícího článku U_e pak je
$$U_e = E - E_{ref} = K - \frac{2,303 \times R \times T}{F} pH$$
, kde K je konstanta, která musí být určena kalibrací pomocí roztoků o známém pH. Měřené napětí U_e je tedy za konstantní teploty lineární funkcí pH. Pro teplotu 25 °C (298,15 K) je $U_e \cong K - 0,0592 \times pH$. Strmost lineární závislosti při pokojové teplotě je tedy kolem $-59,2 \text{ mV/pH}$.

Potenciometricky se pH určuje měřením potenciálu vhodné elektrody. Prakticky se užívá pouze skleněná elektroda. Tělo je tvořeno skleněnou trubičkou, responsivním elementem je tenká skleněná membrána obvykle tvaru baničky na spodním konci. Tato je naplněna standardním vnitřním roztokem (0,1 M HCl), v němž je ponořena argentchloridová elektroda. Pro speciální účely mohou mít elektrody různý tvar. Při práci s pH metrem (obr. 1) se řídíme návodem výrobce.



Obr. 1: pH metr s elektrodou

Obecný postup a zásady práce, zejména zacházení s elektrodou, jsou následující:

1. S elektrodou manipulujeme opatrně, skleněná banička je velmi tenká a křehká. Pokud připravovaný roztok mícháme, dbáme na to, aby elektroda byla mimo dosah míchátko.
2. Elektroda, kterou používáme, nesmí vyschnout. Uchováváme ji ponořenou v pufru o pH, při kterém nejčastěji měříme. Pokud se s ní denně nepracuje, kontrolujeme ji a doplňujeme odpařenou vodu.
3. Referenční kalomelová elektroda může být samostatná nebo kombinovaná se skleněnou. Její těleso tvaru skleněné trubičky je vyplněno vnitřním roztokem KCl a vodivé spojení s vnějším měřeným roztokem zajišťuje fritu.
4. Před měřením je nutno přístroj s elektrodou kalibrovat. Elektrodu vyjmeme z roztoku, ve kterém je uchovávána, opláchneme ji destilovanou vodou a odsajeme přebytek vody. Ponoříme elektrodu do standardního pufru o pH nejbližším tomu, které bude mít i měřený roztok a kalibračním tlačítkem nastavíme na digitálním výstupu hodnotu pH standardního pufru. Elektrodu vyjmeme ze standardu, opět opláchneme a ponoříme do měřeného vzorku. Kalibraci je nutno provádět při každém novém zapnutí přístroje.
5. Často se ke kalibraci využívají dva pufrы – můžeme pracovat ve větším rozmezí pH aniž bychom museli přístroj při každém měření znova kalibrovat.

ACIDOBAZICKÉ INDIKÁTORY

Některé organické látky mění uspořádání dvojných vazeb v molekule v závislosti na pH prostředí, což se projeví změnou zbarvení roztoku. Například čaj změní barvu přidáním citronové šťávy. Takovým látkám říkáme **acidobazické indikátory**. Kyselost můžeme měřit přidáním indikátoru do roztoku a porovnáním barvy s kalibrovanou barevnou škálou. Používají se například tyto látky:

Indikátor	Změna
Lakmus	z kyselé červené formy na zásaditou modrou
Fenolftalein	z kyselé bezbarvé formy na zásaditou fialovou v oblasti pH 8,0 - 9,8
Methyloranž	z kyselé oranžové formy na zásaditou žlutou v oblasti pH 3,1 - 4,5
Bromthymolová modř	z kyselé žluté formy na zásaditou modrou v oblasti pH 6,0 - 7,6
Thymolová modř	z kyselé červené formy na zásaditou žlutou v oblasti pH 1,2 - 2,8
Methylová žluť	z kyselé červené formy na zásaditou žlutou v oblasti pH 2,9 - 4,0

Pro hrubou orientaci o kyselosti měřeného roztoku se k měření pH používá lakmusový papírek, což je proužek papíru napuštěný lakmusem. Poněkud přesnější údaj o kyselosti měřeného roztoku poskytuje univerzální indikátorový papírek, jehož zbarvení se mění s pH měřeného roztoku od červené až po tmavě modrou (barevnou škálu vystihuje tabulka hodnot pH běžně známých roztoků, kterou vidíte níže).

Látka	pH
Kyselina v bateriích	<1,0
Žaludeční šťávy	2,0
Citronová šťáva	2,4
Coca-cola	2,5
Ocet	2,9
Šťáva z pomeranče nebo jablka	3,5
Pivo	4,5
Káva	5,0
Čaj	5,5
Kyselý déšť	< 5,6
Sliny onkologických pacientů	4,5-5,7
Mléko	6,5
Čistá voda	7,0
Sliny zdravého člověka	6,5-7,4
Krev	7,34 - 7,45
Mořská voda	8,0
Mýdlo	9,0 - 10,0
Čpavek pro domácí použití	11,5
Hašené vápno	12,5
Louh sodný pro domácí použití	13,5

PUFRY

Důležitými roztoky používanými v molekulárně-biologických a biochemických laboratořích jsou pufr. Jedná se o směsi slabé kyseliny nebo slabé zásady a jejich solí. Takovýto systém je za určitých podmínek schopen udržovat téměř neměnné pH, jestliže k němu přidáváme kyselinu či zásadu. Tento stav trvá do té doby, než se reakcemi spotřebuje většina nedisociovaných molekul kyseliny či iontů soli a řídicím jevem přestane být disociace použité kyseliny. Pufr má maximální pufrací kapacitu tehdy, když je jeho pH číselně rovno pKa použité slabé kyseliny.

Výběr vhodného pufru se řídí především požadovanou hodnotou pH, iontovou silou, možnými interakcemi s ostatními komponentami reakční směsi atd. Složení vhodného pufru lze nalézt v laboratorních příručkách. Vždy je nutné skutečnou hodnotu pH pufru měřením ověřit a případně ji upravit roztokem silné kyseliny či zásady. Většina pufrů podléhá mikrobiální kontaminaci. Běžné pufrы užívané v biochemických laboratorních postupech pokrývají neutrální až mírně alkalickou oblast cca pH 6,0 – 9,0.

Úloha 1: Určete pH zředěných vodných roztoků kyseliny octové.

Pomůcky: pH metr, kádinky, odměrné válce, pipety, špičky, indikátorový papírek

Chemikálie: kyselina octová, destilovaná voda

Postup:

1. Připravte zásobní roztok CH_3COOH o látkové koncentraci $0,1 \text{ mol} \times \text{l}^{-1}$ a objemu 50 ml. Při práci s koncentrovanou kyselinou si počínejte velice opatrně, práci provádějte v dobře táhnoucí digestoři **za přímého dozoru vedoucího praktika**.
2. Ředěním zásobního roztoku vodou připravte sadu roztoků kyseliny octové o koncentracích 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} a $10^{-7} \text{ mol} \times \text{l}^{-1}$.
3. Změřte pH připravených roztoků lakmusovým papírkem.
4. Změřte pH připravených roztoků pH metrem a zjištěné hodnoty zaznamenejte do následující tabulky:

CH_3COOH [$\text{mol} \times \text{l}^{-1}$]	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}
pH					

5. Vytvořte graf závislosti pH na koncentraci z hodnot získaných pomocí pH metru a diskutujte získané výsledky.

Úloha 2A: Upravte pH pufru TAE 50x, který budete používat v následujících cvičeních

Pomůcky: pufr TAE namíchaný během minulého cvičení, pH metr, kádinka, pipety, špičky, stříčka s vodou

Chemikálie: standardní roztoky na kalibraci pH metru, kyselina či hydroxid pro úpravu pH

Postup:

1. Seznamte se s obsluhou pH metru.
2. Elektrodu pH metru nejprve kalibrujte pomocí standardních roztoků.
3. Zjistěte pH roztoku připraveného v minulém cvičení.
4. Upravte pH roztoku na hodnotu 8 za použití kyseliny či hydroxidu.
5. Hotový pufr skladujte při teplotě 4 – 7 °C.

Úloha 2B: Upravte pH migračního pufru pro SDS-PAGE, který budete používat v následujících cvičeních

Pomůcky: migrační pufr namíchaný během minulého cvičení, pH metr, kádinka, pipety, špičky, stříčka s vodou

Chemikálie: standardní roztoky na kalibraci pH metru, kyselina či hydroxid pro úpravu pH

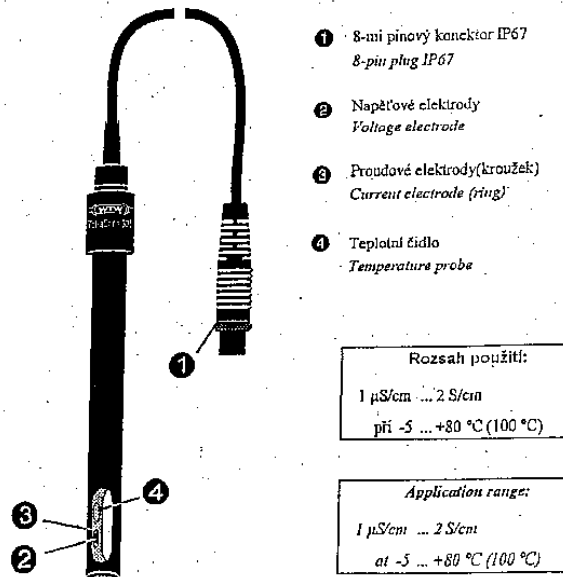
Postup:

1. Seznamte se s obsluhou pH metru.
2. Elektrodu pH metru nejprve kalibrujte pomocí standardních roztoků.
3. Zjistěte pH roztoku připraveného v minulém cvičení.
4. Upravte pH roztoku na hodnotu 8,3 za použití kyseliny či hydroxidu.
5. Hotový pufr skladujte při teplotě 4 – 7 °C.

MĚŘENÍ VODIVOSTI

Vodivost se měří ve vodivostní nádobce (cele), ve které je vzorek (elektrolyt) mezi platinovými elektrodami plochy S ve vzdálenosti l . **Měřená vodivost G** (charakteristika vzorku i geometrie měřící cely) je přímo úměrná **měrné vodivosti elektrolytu κ** (charakteristika samotného vzorku), ploše S a nepřímo úměrná l : $G = \kappa \frac{S}{l}$. Jednotkou vodivosti G je 1 Siemens [S], jednotkou měrné vodivosti κ je [S×cm⁻¹]. Poměr $\frac{S}{l}$ určuje tzv. odporovou konstantu vodivostní nádoby (cely) C . Měrná vodivost elektrolytu κ je $\kappa = C \times G$. Odporová konstanta souvisí pouze s uspořádáním elektrod vodivostní cely a lze ji změřit pomocí roztoku známé měrné vodivosti (např. roztoku KCl). Vodivostní cela se uchovává na vzduchu. V principu nepodléhá stárnutí. Nevhodné skladování, měření

silných kyselin a zásad či organických rozpouštědel a vysoké teploty zkracují životnost sondy. Pro čištění se používá destilovaná voda, saponáty nebo 10 % kyselina octová. Při silném znečištění používáme líh a to maximálně po dobu 5 minut.



Obr. 2: přístroj pH/Cond 340i s vodivostní celou TetraCon 325

Úloha 3: Změřte měrnou vodivost suspenze kvasinek před a po ohřevu

Pomůcky: přístroj pH/Cond 340i, kádinky, termoblok

Chemikálie: kvasnice, 10mM NaCl

Postup:

1. Připravte 150 ml 10mM NaCl ze zásobního roztoku 4M NaCl.
2. Připravte suspenzi kvasinek v 10mM NaCl - pipetováním resuspendujte 0,05g kvasnic v 20 ml 10mM NaCl.
3. Změřte měrnou vodivost suspenze kvasinek za RT.
4. Zahřejte suspenzi při 70 °C po dobu 5 min.
5. Opět změřte měrnou vodivost suspenze kvasinek.
6. Diskutujte zjištěné rozdíly.