

PŘÍPRAVA PUFŘŮ, MĚŘENÍ pH

Měření pH

V biochemické laboratoři měříme pH pomocí pH-metrů. pH-metry jsou citlivé voltmetry, které převádí měřený potenciál na jednotky pH. Principem měření je potenciometrické měření potenciálu pomocí vhodné elektrody. Nejběžněji se používá skleněná elektroda. Skleněná membrána je naplněna vnitřním roztokem (0,1 M HCl), v němž je ponořena argentschloridová elektroda. Potenciál se měří proti referenční kalomelové elektrodě. Ta je buď samostatná, nebo kombinovaná se skleněnou. Její tělo je vyplněno vnitřním elektrolytem (nasycený roztok KCl) a vodivé spojení s vnějším měřeným roztokem zajišťuje přepážka. V horní části kalomelové elektrody je uzavřený otvor, kterým lze v případě potřeby doplňovat vnitřní elektrolyt.

Při práci s pH-metrem postupujeme podle návodu k vlastnímu pH-metru. Platí však několik základních pravidel, která jsou pro všechny přístroje společná:

1. S elektrodou manipulujeme opatrně.
2. Elektroda se nesmí nechat vyschnout. Uchováváme ji ponořenou do vody nebo roztoku, který nejčastěji měříme.
3. Před měřením je nutné přístroj s elektrodou kalibrovat pomocí standardních pufrů o známém pH (co nejbližším tomu, který bude mít měřený roztok). Po ustálení hodnoty pH tuto hodnotu zkoriguje na hodnotu standardu.

Příprava pufrů

Složení vhodného pufru lze nalézt v laboratorních příručkách, kde podle tabulek smícháme příslušné (obvykle dva) roztoky tak, aby bylo dosaženo požadované hodnoty pH. Vždy je ale nutné se měřením přesvědčit, že připravený pufr má požadované pH, případně tuto hodnotu upravit jedním ze dvou výchozích roztoků nebo kyselinou či zásadou. Nejčastěji používané pufrů v biochemii a jejich výchozí látky jsou uvedeny v následující tabulce:

Pufr	kyselina	zásada	rozsah pH
Acetátový	CH ₃ COOH	CH ₃ COONa (případně CH ₃ COOK)	3,5 – 5,5
Fosfátový	NaH ₂ PO ₄	Na ₂ HPO ₄	5,5 – 8,0
Tris-HCl	HCl	Tris	7,0 – 9,0
Borátový	H ₃ BO ₃	Na ₃ BO ₃	7,5 – 9,5
Glycinový - kyselý	HCl	glycin	2,0 – 3,5
- zásaditý	glycin	NaOH	8,5 – 10,5
Uhličitanový	NaHCO ₃	Na ₂ CO ₃	9,0 – 10,5



Vedle požadované hodnoty pH se výběr složek řídí také jejich možnými specifickými vlivy na reakční směs. Někdy může dojít k vysrážení některých složek směsi pufrů, k interakci složek pufru s bílkovinami, k inhibici enzymů nebo k využívání složek pufru jako substrátu. Většina pufrů podléhá mikrobiální kontaminaci. Pro některé účely je možné pufrů konzervovat (azid, methiolát), ale většinou se skladují nekonzervované.

Úloha 1: Příprava 100 ml 0,1 M fosfátového pufru o daném pH

Chemikálie a pomůcky:

NaH_2PO_4

Na_2HPO_4

předvážky

pH-metr

kalibrační pufrů

Postup:

Podle tabulky připravte pufr odpovídající molarity a *pH

Požadované pH	ml NaH_2PO_4	ml Na_2HPO_4
7,0	19,5	30,5
7,2	14	36
7,4	9,5	40,5
7,6	6,5	43,5
7,8	4,5	45,5

* zvolte si podle tabulky pH pufru, které budete připravovat

1. Připravte si zásobní roztoky jednotlivých složek o koncentraci dvojnásobné než je výsledná koncentrace pufru (počítejte s rezervou objemu pro případnou úpravu výsledného pH).
2. Smíchejte roztoky v odpovídajícím poměru a dořeďte destilovanou vodou na výsledný objem.
3. Hodnotu pH připraveného pufru ověřte měřením.

Výpočty:

Výpočet navážky a přípravy zásobních roztoků NaH_2PO_4 a Na_2HPO_4 potřebných pro přípravu pufru o zvoleném pH:

Výsledky měření pH:

