# Työ 1. LIUOSTEN VALMISTUS

## Tiivistelmä

Valmistimme 0,3M Tris-HCl – 4mM MgSO4 –puskurin, pH= 7,50 (100ml) ja 1M HCl-lioksen (100ml), jolla titrasimme Tris-liuoksen haluttuun pH:n Tris-elektroidin avulla. Valmistimme myös 250ml 5mM Na-fosfaatti pH=8,00 –liuoksen kahdesta valmiista kantaliuoksesta (100mM Na2HPO4  ja NaH2PO4 –liuokset).

## Johdanto

Puskuriliuosvalmistetaan heikosta haposta ja sen suolasta tai heikosta emäksestä ja sen suolasta. Puskuriliuoksen pH ei muutu juuri ollenkaan liuosta hieman laimennettaessa tai lisättäessä siihen hieman happoa tai emästä. Puskureita käytetään stabiloimaan ja mahdollistamaan esim. entsyymireaktiot, koska ne toimivat vain hyvin kapealla pH-alueella. Puskuri toimii parhaiten, kun pH = p*Ka* ± 1, tämän ulkopuolella puskurikapasiteetti on heikko tai olematon.

Tris on käyttönimi C4H11NO3–yhdisteelle. Trisin pKa = 8,06. Sitä voidaan käyttää puskuroimaan voimakkaitakin happoja ja pitämään liuoksen pH-välillä 7-9. pH-välille sijoittuu mm. ihmisen elimistön pH ja koska Tris on halpaa, helppo tuottaa hyvin puhtaana, pysyy vakaana huoneenlämmössä ja liukenee hyvin veteen, se on yksi yleisimmistä laboratoriopuskureista. Tris aiheuttaa häiriöitä hopeakloridielektrodeja käyttäessä, koska hopea ja Tris muodostavat niukkaliukoisia yhdisteitä, jotka haittaavat elektrodien toimintaa. Trisin pH-mittaukseen käytetään hopeattomia elektrodeja.

HCl (Suolahappo) on voimakas happo ja sitä käytetään usein säätämään Tris-puskurin pH haluttuihin lukemiin.

Fosforihappo (H3PO4) on kolmenarvoinen heikko happo, joten se protolysoituu kolmessa vaiheessa ja sillä on kolme suoloa.

H3PO4(s)   + H2O(l) is in equilibrium withH3O+(aq) + H2PO4−(aq)       p*K*a1= 2,1 (hapan)

H2PO4−(aq)+ H2O(l) is in equilibrium withH3O+(aq) + HPO42−(aq)       p*K*a2= 7,2 (hyvä neutraali puskuri)

HPO42−(aq)+ H2O(l) is in equilibrium withH3O+(aq) +  PO43−(aq)        p*K*a3= 12,3 (emäksinen)

Na2HPO4 ja NaH2PO4 ovat fosforihapon natriumsuoloja.

## Aineisto ja menetelmät

### Tris-puskuri

Laskettiin kuinka paljon tarvitaan Tris ja MgSO4 puskuriliuoksen tekemiseksi.

[Tris] = 0,3M , [MgSO4]=4mM V=100ml

M(Tris) = 121,14g/mol, M(MgSO4·7H2O) = 246,45g/mol

m=cVM - sijoitetaan: m(Tris) = 0,3M\*100ml\*121,14g/mol

m(MgSO4)= 4mM\*100ml\*246,56g/mol

m(Tris) = 3.6342g , m(MgSO4) = 0,098592g

Laskettiin kuinka paljon tarvitaan 2M-HCl liuosta, jotta saadaan 100ml 1M-HCl liuosta.

c1=1M , c2=2M, V1=100ml

c1V1=c2V2 -> V2 = c1V1/c2 - V2=50ml

HCl-liuos valmistetaan vetokaapissa. Mitataan 50ml 2M-HCl liuosta ja 50ml KOV-vettä. Kaadetaan ensin n. 40ml KOV-vettä mittalasiin, lisätään 50ml happoa ja täytetään haluttuun 100ml.

Punnittiin m(Tris)=3,633g. Punnittiin m(MgSO4)=0,0987g. Käytetyt aineet:

Tris: Trizma base, minimum 99.9% titration. Sigma Aldrich Inc, Batch#: 077K5410, T1503-1kg (Varoitus: Ärsyttävää)

MgSO4: MgSO4\*7H20, MERCIC Eurolab, 1.05886.0500 31.05.2005, 500g. Merck, Darmstadt, Germany.

Siirrettiin punnitut aineet 100ml dekanterilasiin, johon lisätään n. 50ml KOV-vettä. Annetaan liueta magneettisekoittajan avulla. Kalibroidaan Tris-elektrodi pH-välille 7-10 (korjaukset pH7 +0,02. pH10 -0,05). Aloitetaan HCl-titraus.

Siiryimme käyttämään 2M-HCl-liuosta 20ml kohdalla, koska dekanterilasi alkoi täyttyä ja pelkäsimme, että laimeampi liuos ylittäisi halutun 100ml tilavuuden. Kun pH=7,51 (käytetty 2ml 2M-HCl-liuosta) siirsimme liuoksen mittapulloon, täydensimme 100ml:n. (Taulukko 1) Nimesimme ja siirsimme Tris-puskurin säilytyspulloon. Ylijäämä 1M-HCl myös nimetty ja siirretty säilytyspulloon.

### Na-fosfaatti-puskuri

Aloitimme tekemään 5mM Na-fosfaattipuskuria laskemalla kuinka paljon tarvitsemme 100mM kantaliuoksia, tehdäksemme 2x 5mM Na2HPO4  ja NaH2PO4 –liuokset.

c1=100mM, c2=5mM, V2=100ml

c1V1=c2V2 -> V2 = c1V1/c2 - V2=5ml

Mitataan lasipipetillä 5ml kumpaakin liuosta mittapulloon. Jatketaan KVO-vedellä 100ml:n. Koska halutaan pH=8,00 liuosta, käytetään kaikki emäsmuoto Na2HPO4 ja titrataan sitä happamalla NaH2PO4 –liuoksella pH-elektrodin avulla, magneettisekoittajalla samalla sekoittaen. Kun pH=8,00 saavutettu (16,5ml happanta liuosta käytetty), siirretään liuos 250ml mittapulloon ja täytetään KVO-vedellä.

### Na-fosfaatti + 150mM suola

|  |  |
| --- | --- |
| pH (Tris) | V(HCl) |
| 10,70 | 0 ml |
| 9,90 | 1 ml |
| 9,50 | 2 ml |
| 9,28 | 3 ml |
| 9,16 | 4 ml |
| 9,03 | 5 ml |
| 8,93 | 6 ml |
| 8,83 | 7 ml |
| 8,76 | 8 ml |
| 8,67 | 9 ml |
| 8,60 | 10 ml |
| 8,50 | 11 ml |
| 8,44 | 12 ml |
| 8,36 | 13 ml |
| 8,30 | 14 ml |
| 8,24 | 15 ml |
| 8,17 | 16 ml |
| 8,11 | 17 ml |
| 8,07 | 18 ml |
| 7,99 | 19 ml |
| 7,94 | 20 ml |
| 7,63 | 21 ml |
| 7,51 | 22 ml |

Jos puskuriin olisi lisätty suolaa, olisi sen pitousuus punnuttu liuokseen ennen laimentamista ja titrausta. Olisi siis valmistettu 5mM Na2HPO4  ja NaH2PO4 –liuokset, joissa kummassakin 150mM NaCl. Tarvittavan NaCl:n massa selvitetään:

[NaCl]=150mM, V=100ml, M(NaCl)=58,44g/mol

m=cVM sijoitetaan: m(NaCl) = 150mM\*100ml\*58,44g/mol

m(NaCl)=0,8766g

100ml mittauspulloihin olisi molempiin lisätty 0,8766g NaCl, sitten happo ja KVO-vesi 100ml:n.

## Tulokset

Työn tuloksena 100ml 1M-HCl-liuosta ja 100ml 0,3M Tris-HCl – 4mM MgSO4-puskuria (pH=7,50). Kummatkin säilytetty myöhempää käyttöä varten. Valmistettu myös 5mM Na-fosfaatti pH=8,01 liuosta, joka hävitettiin.

## Tulosten tarkastelu

HCl-liuosta valmistaessa liuokseen tuli liikaa vettä. Kun 2M-HCl:ää oli mitattu 50ml, täydentäessä kokonaisliuosta 100ml:n KOV-vettä tuli liikaa. Liuos laimeampaa kuin 1M.

Titratessa Tris-liuosta HCl-liuoksella, olisi meidän pitänyt aloittaa vahvemmalla (2M) HCl-liuoksella ja vasta saavutettuamme n. pH=8 vaihtaa laimeampaan liuokseen. Jouduimme titrauksen loppua kohden vaihtamaan 1M-liuoksesta 2M-liuokseen kun pelkäsimme, että 1M-liuos veisi meidät yli halutusta 100ml tilavuudesta. Tris-liuos onnistui ja toimi hyvin, käyttessämme sitä puskurina Tehtävän 9:n spektrometrisissä harjoituksissa.

Na-fosfaattiliuoksen tekeminen onnistui paljon nopeammin kuin Tris-puskurin, vaikkakin emäsliuoksen alku-pH=8,80, joka vaikuttaa hieman matalalta. On saattanut tapahtua mittausvirhe 100mM-liuosta tai KVO-vettä lisätessä. Lopussa liuos oli kuitenkin pH=8,01 ja pH pysyi vakaana KVO-vedellä jatkettaessa 250ml:n.