

## ROZTOKY PUFRŮ

**Pufry** (tlumivé roztoky, ústoje) jsou roztoky látek, které nedovolují, aby došlo k podstatnějším změnám hodnoty pH po přidavku kyseliny nebo zásady anebo po jejich zředění. Jedná o roztoky slabých kyselin a jejich solí (tj. konjugovaných bází) nebo o roztoky slabých zásad a jejich solí (tj. konjugovaných kyselin) nebo o roztoky solí vícesytných kyselin (které spolu tvoří konjugovaný pár). Název jednoduchých pufrů vždy pochází ze jména konjugované báze nebo akronymu kyseliny, např. hydrogenuhličitanový nebo HEPES pufr. Koncentrace pufru je definována jako součet koncentrací kyselé a bazické složky pufru - typické koncentrace jsou 20–100 mmol/l.

Hodnotu pH daného pufru lze vypočítat pomocí Hendersonovy-Hasselbalchovy rovnice:

$$\text{pH} = \text{p}K_A + \log \frac{[\text{B}]}{[\text{HB}]}$$

kde [HB], [B] jsou látkové koncentrace základních složek (tj. kyseliny HB a její konjugované báze B) ve **výsledném roztoku pufru**,  $\text{p}K_A$  je záporný dekadický logaritmus disociační konstanty kyseliny HB.

Poměr látkových koncentrací složek ve výsledném pufru lze nahradit poměrem látkových množství daných složek, platí tedy:

$$\text{pH} = \text{p}K_A + \log \frac{n_B}{n_{\text{HB}}}$$

Poněvadž látkové množství  $n$  se rovná součinu  $c \cdot V$ , lze látkové množství v rovnici nahradit součinem výchozích koncentrací  $c_{\text{HB}}$ ,  $c_B$  a objemů  $V_{\text{HB}}$ ,  $V_B$  základních složek před jejich smícháním:

$$\text{pH} = \text{p}K_A + \log \frac{c_B V_B}{c_{\text{HB}} V_{\text{HB}}}$$

Z uvedeného vztahu vyplývá, že je-li výchozí koncentrace základních složek stejná ( $c_{\text{HB}} = c_B$ ), lze do rovnice pro výpočet pH pufru dosadit pouze poměr výchozích objemů  $V_B/V_{\text{HB}}$ . Podobně byl-li pufr připraven smícháním stejných objemů základních složek ( $V_{\text{HB}} = V_B$ ), lze do Hendersonovy-Hasselbalchovy rovnice dosadit pouze poměr výchozích koncentrací  $c_B/c_{\text{HB}}$ .

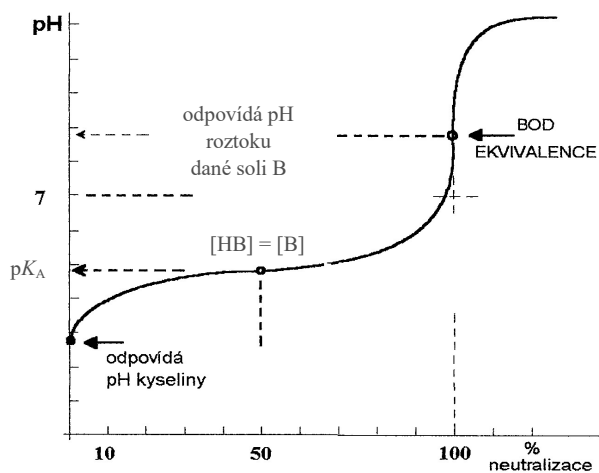
Ze vztahu je patrné, že pH pufru závisí na použité kyselině (hodnota  $\text{p}K_A$ ), na teplotě (hodnota  $\text{p}K_A$ ) a na logaritmu poměru látkových koncentrací/látkových množství složek. V případě rovnosti koncentrací ( $[\text{HB}] = [\text{B}]$ ), resp. látkových množství bazické a kyselá složky pufru ( $n_{\text{HB}} = n_B$ ) se pH pufru rovná disociační konstantě  $\text{p}K_A$  dané kyseliny HB.

Schopnost pufru tlumit změny pH vyjadřuje veličina **pufrační kapacita**  $\beta$ , která je definována jako látkové množství  $\text{H}^+$  nebo  $\text{OH}^-$  vyvolávající změnu pH v 1 litru pufru o jednotku:

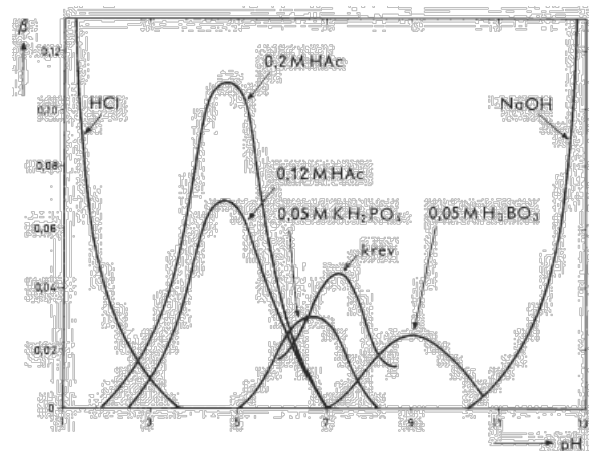
$$\beta = \frac{\Delta n_{\text{H}^+, \text{OH}^-}}{V \Delta \text{pH}}$$

Poněvadž při  $\Delta \text{pH} = \pm 1$  je vždy aspoň v jednom směru překračována oblast dobré účinnosti pufru ( $\text{p}K_A \pm 1$ ), v praxi se hodnotí jako látkové množství  $\text{H}^+$  či  $\text{OH}^-$ , které v 1 litru pufru vyvolá změnu  $\Delta \text{pH} = \pm 0,1$ .

Grafickým vyjádřením Hendersonovy-Hasselbalchovy rovnice jsou **titrační křivky** slabých kyselin nebo zásad (jejich horizontální část). Při postupném přidávání zředěných roztoků silné kyseliny nebo zásady (tzn. při titraci pufru) se pH zpočátku mění jen pozvolna, po překročení hodnoty  $\text{pH} = \text{p}K_A \pm 1$  jsou změny již značné. Z průběhu titrační křivky pufru dané koncentrace ( $c_{\text{HB}} + c_{\text{B}}$ ) lze určit puфраční kapacitu pro kteroukoliv hodnotu pH. Puфраční kapacita pufru je maximální při  $\text{pH} = \text{p}K_A$ . Jednoduchý pufr je použitelný přibližně v rozmezí hodnot pH od  $(\text{p}K_A - 1)$  do  $(\text{p}K_A + 1)$ , což odpovídá poměru  $[\text{B}]/[\text{HB}]$ , resp.  $n_{\text{B}}/n_{\text{HB}}$  od 0,1 do 10. Ředěním pufru klesá jeho kapacita, přičemž hodnota pH se nemění. Kapacita dobrých pufrů dosahuje prakticky až hodnoty 0,2 mol/l.



Titrační křivka jednosytné slabé kyseliny



Závislost kapacit vybraných pufrů na pH

### Příprava pufrů

Při přípravě pufru je třeba dopředu zvážit, jaký objem pufru je třeba připravit, jaké bude mít pH a koncentraci, jaká slabá kyselina/konjugovaná báze bude použita a jaká bude jeho iontová síla, resp. osmolarita. Z hlediska puфраční kapacity je nejlepší takový pufr, jehož kyselá složka má  $\text{p}K_A$  v rozsahu požadovaného  $\text{pH} \pm 1$ . Při výběru složení pufru je důležitá jeho potenciální toxicita, příp. interakce složek puфраčního systému se studovaným chemickým/biologickým systémem. Rovněž ekonomika ovlivňuje výběr základních složek pufru, čím levnější, tím lepší. Iontová síla pufru je velmi důležitá např. z hlediska stability biomolekul. Bílkoviny jsou nejstabilnější při iontové síle, která odpovídá prostředí uvnitř buněk, tj. kolem 150 mmol/l. Při iontové síle vyšší než 500 mmol/l dochází k rozvinutí bílkovin (porušení sekundární, terciární a příp. kvartérní struktury) a tedy k jejich denaturaci. Je-li třeba, iontovou sílu nebo osmolaritu pufrů lze zvýšit přidávkem neutrální soli.

Je-li pufr tvořen slabou kyselinou/bází a konjugovanou složkou, je puфраční rozsah poměrně úzký  $\text{p}K_A \pm 1$ . V některých případech je potřeba puфrovat širší rozsah pH. Pro tyto účely se připravují různé *vícetložkové puфry (puфраční směsi)*. Pokud puфраční složky vícetložkové směsi mají hodnotu  $\text{p}K_A$  lišící se maximálně o 2 pH jednotky, puфраční kapacity jednotlivých puфраčních systémů jsou aditivní.

Při přípravě pufrů se vychází buď z roztoků slabých kyselin, resp. zásad a jejich solí, nebo z pevných solí vícesytných kyselin nebo jejich roztoků, anebo se částečně neutralizuje slabá kyselina, resp. zásada silnou zásadou, resp. kyselinou.

### Nejběžnější postupy při přípravě pufru:

1. *Navázení kyselé i bazické složky pufru.* S použitím Hendersonovy-Hasselbalchovy rovnice a rovnice definující koncentraci pufru ( $= [\text{HB}] + [\text{B}]$ ) (tj. dvou rovnic o dvou neznámých) se vypočtou požadované látkové koncentrace kyselé a bazické složky pufru, které se pak převedou na látková množství, která jsou potřebná pro přípravu požadovaného objemu pufru. Pomocí molekulové hmotnosti se látková množství složek pufru převedou na jejich hmotnosti, která se rozpustí v požadovaném objemu vody.
2. *Částečná neutralizace jedné složky pufru.* Nejdříve se vypočte, jaká hmotnost (objem roztoku) slabé kyseliny/zásady je třeba pro přípravu požadovaného objemu pufru dané koncentrace. Vypočtené množství slabého elektrolytu se rozpustí/naředí ve vodě přibližně na 90 % požadovaného konečného objemu. Za stálého míchání a měření pH skleněnou elektrodou se přidává po kapkách silný hydroxid, resp. kyselina (např. 6M-NaOH, resp. 6M-HCl) dokud hodnota pH pufru nedosáhne požadované hodnoty. Poté se pufr doplní na požadovaný konečný objem deionizovanou vodou. V případě, že kyselou součástí pufru je protonizovaná báze (např. HTris<sup>+</sup>), navažuje se přednostně slabá báze, která se pak částečně neutralizuje silnou kyselinou.  
Tato metoda může být poměrně zdlouhavá, protože po přidavku silné zásady/kyseliny dochází k zahřívání neutralizovaného roztoku a pro správné odečtení hodnoty pH (závisí na teplotě) je třeba čekat, dokud se roztok nevyteperuje zpět na svoji původní teplotu.
3. *Metoda dvou roztoků.* Pufr se připraví smísením odpovídajících objemů roztoků kyselé a bazické složky, které mají stejnou koncentraci (a iontovou sílu, je-li požadována) jakou má mít výsledný pufr, a to v takovém poměru (zjištěném z Hendersonovy-Hasselbalchovy rovnice), aby se dosáhlo požadované hodnoty pH.
4. *Tabulková metoda.* V tabulkách se nalezne odpovídající množství kyselé a bazické složky požadovaného pufru, které se rozpustí ve vodě na cca 90 % konečného objemu pufru, ověří se jeho pH a případně se upraví na požadovanou hodnotu přidavkem silné kyseliny/hydroxidu, a nakonec se doplní deionizovanou vodou na konečný objem.

**Zabránění mikrobiální kontaminace pufrů.** Mikroorganismy mohou snadno znehodnotit pufr již během krátké doby i přesto, že je pufr uchováván při teplotě kolem 4 °C (např. fosfátový pufr lze uchovávat maximálně týden v lednici). Existuje několik možností jak zabránit mikrobiální kontaminaci. Nejjednodušší způsob je skladování pufru při teplotě blízké nule nebo připravit si zásobní roztok o vysoké koncentraci, který se před použitím naředí. Zde je nutno počítat s tím, že některé pufrové systémy mění své pH při ředění. Jinou možností je roztok pufru sterilizovat buď filtrací (přes filtry 0,2 nebo 0,45 μm) nebo autoklávováním, anebo se přidá azid sodný v koncentraci 0,02 % (3 mmol/l).

Větší množství pufru lze uchovávat ve zmraženém stavu. Před použitím je nutno rozmrazit celé množství pufru a roztok zamíchat. Po odebrání potřebného objemu je možné zbytek opět zmrazit.

Zvláštní pozornost při přípravě a případné sterilizaci zasluhují pufrы, obsahující hydrogenuhličitan. Při přípravě se roztok míchá jenom krátce a ne moc intenzivně. Pufr se musí uchovávat v uzavřených nádobách, sterilizovat jej lze pouze filtrací (nelze jej autoklávovat, při teplotě nad 20 °C se  $\text{HCO}_3^-$  začíná rozkládat na  $\text{CO}_2$  a  $\text{CO}_3^{2-}$ ).

Některé pufrы označujeme jako *těkavé*, tvořené složkami, jež mohou být snadno a úplně odstraněny z roztoku (mravenčí nebo octová kyselina, amoniak, uhličitan amonný, pyridin, triethanolamin).

**Biologické pufrы.** Některé pufrací směsi byly vyvinuty speciálně pro využití v biochemii. Označujeme je jako *biologické pufrы* (v angl. literatuře nebo též po svém objeviteli jako Good's buffer). Jedná se o pufrы tvořené většinou *N*-substituovaným taurinem nebo glycinem, splňující určitá kritéria, velmi důležitá pro zajištění průběhu biochemických reakcí, např.: musí být dobře rozpustné ve vodě a současně nepropustné buněčnou membránou; pro zajištění maximální pufrací kapacity hodnota  $\text{p}K_A$  kyselých složek musí být v blízkosti fyziologického pH (tj. pH 6–8); musí být chemicky stabilní a odolné vůči enzymové nebo neenzymové degradaci; neinterferují s běžně užívanými spektrofotometrickými metodami (neabsorbují záření nad 230 nm). Většinou se označují písmennými zkratkami, vzniklých z chemických názvů bazických složek, např. MES (2-morpholinoethanesulfonate), ADA (*N*-(2-acetamido)iminodiacetate), PIPES (piperazine-1,4-bis(2-ethanesulfonate), ACES (*N*-(2-acetamido)-2-aminoethane-sulfonate), BES (*N,N*-bis(2-hydroxyethyl)-2-aminoethanesulfonate), TES (*N*-tris(hydroxymethyl)methyl-2-aminoethanesulfonate), HEPES (*N*-(2-hydroxyethyl)-piperazine-*N'*-2-ethanesulfonate).

## PRAKTICKÁ ČÁST

### Úkol 8.1 Příprava hydrogenfosfátových pufrů s rozdílnými hodnotami pH

**Materiál:** Roztoky hydrogenfosforečnanu sodného a dihydrogenfosforečnanu sodného (oba roztoky o stejné koncentraci 0,05 mol/l). 2 dělené pipety 10 ml, pipetovací nástavce, zkumavky, popisovač, pH-metr.

#### Provedení:

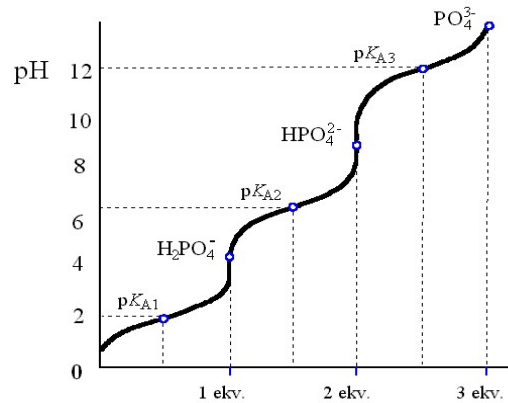
- Připravte 6 zkumavek a podle tabulky pipetujte do každé roztok báze ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) a roztok konjugované kyseliny ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ). Celkový objem pufru je 10 ml.

Zkumavka	1	2	3	4	5	6
$\text{HPO}_4^{2-}$ (ml)	2,0	4,0	5,0	6,0	8,0	9,0
[B] (mmol/l)						
$\text{H}_2\text{PO}_4^-$ (ml)	8,0	6,0	5,0	4,0	2,0	1,0
[HB] (mmol/l)						
pH	vypočtené					
	změřené					

- Změřte pH připravených pufrů pomocí pH elektrody.

1. Vypočtete a doplňte do tabulky koncentrace obou složek ve výsledném pufru (o objemu 10 ml) a hodnoty pH jednotlivých fosfátových pufrů (při dané iontové síle je  $\text{p}K_A(\text{H}_2\text{PO}_4^-) \approx 6,80$ ).
2. Porovnejte hodnoty pH vypočtené a naměřené.

3. Na kterých dalších faktorech, kromě teploty, závisí výsledná hodnota pH pufrů?
4. Jaká je koncentrace připraveného hydrogenfosfátového pufru v jednotlivých zkumavkách?
5. Rozepište přesný návod pro přípravu 0,5 litru hydrogenfosfátového pufru o stejné koncentraci a hodnotě pH jako má pufr ve zkumavce č. 3 pomocí částečné neutralizace kyseliny fosforečné hydroxidem sodným (kon.  $\text{H}_3\text{PO}_4$  je 85 % o hustotě 1,70 g/ml,  $M_r(\text{H}_3\text{PO}_4) = 98,00$ ,  $M_r(\text{NaOH}) = 40,0$ ).
6. Vyznačte do titrační křivky kyseliny fosforečné možné pufrací oblasti pH.



7. Vypočítejte pH fosfátového pufru, který obsahuje 138 mM NaCl, 5,4 mM KCl, 7,8 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  a 1,4 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  ( $pK_{A1} = 2,1$ ;  $pK_{A2} = 7,2$ ;  $pK_{A3} = 12,3$ ).

## Úkol 8.2 Titrace pufru. Zjištění pufrací kapacity

**Materiál:** Roztoky octové kyseliny a octanu sodného (oba roztoky 0,1 mol/l), odměrné roztoky HCl a NaOH (0,1 mol/l, přesná koncentrace zjištěná v předchozím praktickém cvičení). Plastové kádinky, nastavitelné dávkovače 10 ml, pH-metr, 2 byrety dělené po 0,1 ml s nálevkou na odměrné roztoky, magnetická míchačka, buničitá vata.

### Provedení:

#### Příprava koncentrovaného pufru (20 ml)

- Do plastové kádinky odměřte dávkovačem 10 ml roztoku octové kyseliny a 10 ml roztoku octanu sodného a pufr promíchejte.

#### Příprava dvakrát zředěného pufru (20 ml)

- Do plastové kádinky odměřte dávkovačem 5 ml roztoku octové kyseliny, 5 ml roztoku octanu sodného a 10 ml deionizované vody.

*Titrace pufru kyselinou (postup stejný pro koncentrovaný i zředěný pufr)*

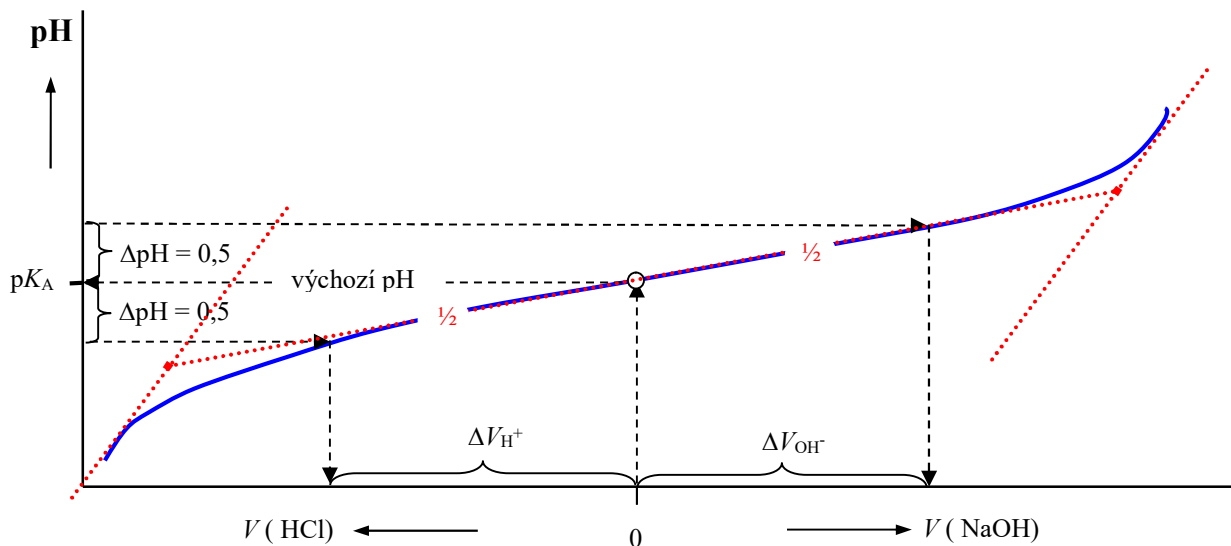
- Změřte pH-metrem výchozí hodnotu pH pufru s přesností na desetiny.
- Roztok pufru titrujte 0,5 ml přídatky odměrného roztoku HCl. Po každém přidavku odměrného činidla promíchejte a odečtěte hodnotu pH. Titraci ukončete při dosažení hodnoty  $\text{pH} < 3$ .

*Titrace pufru zásadou (postup stejný pro koncentrovaný i zředěný pufr)*

- Změřte pH-metrem výchozí hodnotu pH pufru s přesností na desetiny.
- Roztok pufru titrujte 0,5 ml přídatky odměrného roztoku NaOH. Po každém přidavku odměrného činidla promíchejte a odečtěte hodnotu pH. Titraci ukončete při dosažení hodnoty  $\text{pH} < 12$ .
- Naměřené údaje zaznamenejte ve formě tabulky do protokolu:

$V_{\text{HCl}}$ (ml)	$\text{pH}_{\text{konc. pufr}}$	$\text{pH}_{\text{zřed. pufr}}$	$V_{\text{NaOH}}$ (ml)	$\text{pH}_{\text{konc. pufr}}$	$\text{pH}_{\text{zřed. pufr}}$
0	...	...	0	...	...

- 8. Jaká je koncentrace připraveného koncentrovaného octanového pufru?
- 9. Porovnejte naměřené výchozí hodnoty pH koncentrovaného a zředěného pufru a srovnajte je s teoretickou (vypočtenou) hodnotou.
- 10. Z naměřených údajů sestrojte na milimetrový papír do jednoho grafu titrační křivky obou pufrů.



$$\Delta n_{\text{H}^+} = c_{\text{HCl}} \Delta V_{\text{H}^+}$$

$$\Delta n_{\text{OH}^-} = c_{\text{NaOH}} \Delta V_{\text{OH}^-}$$

$$\beta_{\text{H}^+} = \frac{\Delta n_{\text{H}^+}}{V_{\text{pufru}} \Delta \text{pH}}$$

$$\beta_{\text{OH}^-} = \frac{\Delta n_{\text{OH}^-}}{V_{\text{pufru}} \Delta \text{pH}}$$

Titrační křivka octanového pufru a postup při určení jeho pufráční kapacity (pro  $\Delta \text{pH} = 0,5$ )

- ✂ 11. Z titračních křivek koncentrovaného a zředěného pufru odečtete jaké látkové množství HCl ( $\Delta n_{\text{H}^+}$ ) a látkové množství NaOH ( $\Delta n_{\text{OH}^-}$ ) vyvolá v připravených pufrech  $\Delta \text{pH} = \pm 0,5$ .
- ✂ 12. Vypočtete a porovnejte puфраční kapacity  $\beta_{\text{H}^+}$  a  $\beta_{\text{OH}^-}$  koncentrovaného a zředěného octanového pufru. Jak zředění pufru ovlivní jeho puфраční kapacitu?
- ✂ 13. Srovnajte koncentraci koncentrovaného pufru se zjištěnou hodnotou puфраční kapacity.
- ✂ 14. Podle sestrojeného grafu rozhodněte, zda octanový pufr vykazuje stejnou puфраční schopnost do kyselé i alkalické oblasti?
- ✂ 15. S použitím titrační křivky vypočtete puфраční kapacitu  $\beta_{\text{H}^+}$  a  $\beta_{\text{OH}^-}$  (pro  $\Delta \text{pH} = 0,5$ ) koncentrovaného pufru, jehož složení odpovídá na křivce bodu s hodnotou  $\text{pH} = 5,7$  (výchozí bod).
- ✂ 16. Na základě výsledků zdůvodněte, zda kapacita pufru závisí  
 a) na celkové koncentraci pufru (tzn. hodnotě  $[\text{B}] + [\text{HB}]$ );  
 b) na poměru složek  $[\text{B}]/[\text{HB}]$ .
- ✂ 17. Jaký vliv má ředění na hodnotu  $\text{pH}$  pufru?
- ✂ 18. Pro jakou oblast  $\text{pH}$  lze použít octanový pufr?
- ✂ 19. Doplňte do tabulky vybraných jednoduchých pufrů bazickou a kyselou puфраční složky:

Efektivní rozsah pH	$\text{pK}_A$ (25 °C)	Název pufru	Puфраční báze	Puфраční kyselina
1,7-2,9 5,8-8,0 -	2,15 7,20 12,33	(hydrogen)fosfátový	...	...
2,2-3,6 8,8-10,6	2,35 9,78	glycinový	...	...
2,2-6,5 3,0-6,2 5,5-7,2	3,13 4,76 6,40	citrátový	...	...
3,6-5,6	4,76	octanový (acetátový)	...	...
6,0-8,0 9,5-11,1	6,35 10,33	hydrogenuhlíčitánový (bikarbonátový) uhlíčitánový	...	...
6,8-8,2	7,48	HEPES*	...	...
7,5-9,0	8,06	Trizma (tris) <sup>+</sup>	...	...
8,5-10,2 - -	9,23 12,74 13,80	borátový	$\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$	...
1,8-12,0	-	univerzální Brittonův-Robinsonův		$\text{H}_3\text{PO}_4$ $\text{CH}_3\text{COOH}$ $\text{H}_3\text{BO}_3$

<sup>+</sup>tris(hydroxymethyl)aminomethan; \* 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinthansulfonová kyselina

