

Vlastnosti pufrů

Představení kapitoly

Tato kapitola se věnuje pufrům – roztokům, které dokážou udržovat stabilní pH i po přidání kyselin nebo zásad. Stabilní pH je nezbytné jak pro správnou funkci enzymů a buněk v lidském těle, tak pro spolehlivost laboratorních metod. V kapitole se podíváme na princip fungování pufrů, pufrací kapacitu a Henderson-Hasselbalchovu rovnici, přirozené pufrovací systémy v organismu, laboratorní pufrы a faktory ovlivňující jejich stabilitu.

Obsah

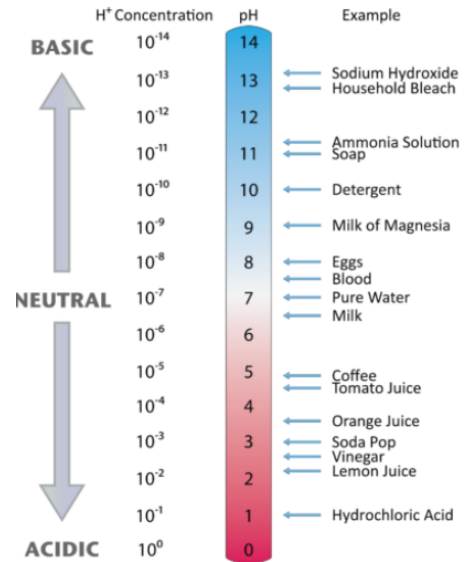
1	Teoretický úvod – pH	2
2	Co je to vlastně pufr?	3
2.1	Příklady složení pufrů	3
2.2	Mechanismus účinku	3
3	Henderson-Hasselbalchova rovnice a pufrací kapacita	4
3.1	Henderson-Hasselbalchova rovnice:	4
3.2	Pufrací kapacita	5
3.3	Faktory ovlivňující pufrací kapacitu	5
4	Laboratorní pufrы a jejich použití	6
4.1	Vlastnosti laboratorních pufrů	6
4.2	Nejčastěji používané laboratorní pufrы	6
5	Přirozené pufrovací systémy v lidském těle	7
6	Uplatnění pufracích systémů v diagnostice	8

1 Teoretický úvod – pH

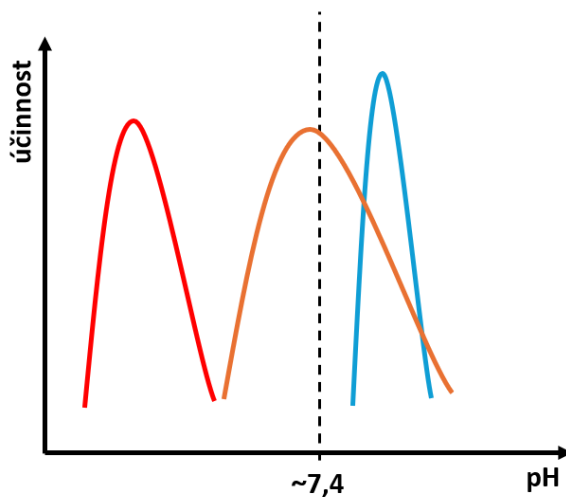
pH je číslo, které vyjadřuje kyselost nebo zásaditost roztoku. Definuje se jako záporný logaritmus koncentrace oxoniových iontů $[H_3O^+]$. Čím více protonů roztok obsahuje, tím je pH nižší (roztok je kyselý), a naopak při jejich nedostatku je pH vyšší (roztok je zásaditý). Ve vodě dochází k tzv. autoprotolýze – molekuly vody se navzájem částečně štěpí na $[H_3O^+]$ a $[OH^-]$. Součin jejich koncentrací je konstantní ($K_w=10^{-14}$ při 25 °C), proto platí vztah **pH + pOH = 14**.

Hodnota pH zásadním způsobem ovlivňuje průběh chemických reakcí, zejména ve vodném prostředí. Enzymové reakce jsou na pH obzvláště citlivé – posun pH mimo jejich optimální rozmezí může vést k poklesu katalytické aktivity nebo až k úplné inaktivaci enzymu. Každý enzym má své charakteristické optimum (např. pepsin v žaludku při pH 1–2, trypsin ve střevě při pH 8–9). pH má zásadní vliv i na **konformaci bílkovin**, stabilitu membrán, distribuci iontů nebo nevazebné interakce v organismu. Proto je nezbytné udržovat pH vnitřního prostředí v úzkém fyziologickém rozmezí, např. v krvi kolem hodnoty 7,35–7,45.

Tento úkol zajišťují **pufr**y, které tlumí změny pH po přidání kyselin nebo zásad.



(Zdroj: <https://courses.lumenlearning.com/umes-cheminter/chapter/the-ph-scale/>)



Pepsin – nejvíce účinný v kyselé oblasti

Trypsin – nejvíce účinný v alkalické oblasti

(Při fyziologickém pH jsou oba neaktivní)

Amyláza – účinná při fyziologickém pH

2 Co je to vlastně pufr?

Pufry jsou roztoky, které mají schopnost udržovat relativně stálou hodnotu pH i po přidání menšího množství kyseliny nebo zásady. Tato vlastnost je klíčová jak v biologických systémech, tak v laboratorní praxi. Z chemického hlediska se jedná o roztoky obsahující **slabou kyselinu a její konjugovanou zásadu** (případně slabou zásadu a její konjugovanou kyselinu). Jejich účinnost je založena na **rovnováze disociace slabé kyseliny**, kdy přidané protony nebo hydroxidové ionty jsou zachyceny příslušnou složkou pufru a nedojde k významné změně pH.

2.1 Příklady složení pufrů

Jak již bylo zmíněno, pufr je vodný roztok složený z **konjugovaného páru** – slabé kyseliny a její soli se silnou zásadou nebo slabé zásady a její soli se silnou kyselinou.

- **Kyselý pufr:** acetátový pufr ($\text{CH}_3\text{COOH} + \text{CH}_3\text{COONa}$), bikarbonátový pufr ($\text{H}_2\text{CO}_3 + \text{NaHCO}_3$).
- **Zásaditý pufr:** amoniakální pufr ($\text{NH}_3 + \text{NH}_4\text{Cl}$).

2.2 Mechanismus účinku

Princip jejich účinku spočívá v přítomnosti slabé kyseliny a její konjugované zásady. Při přidání kyseliny (H^+) reaguje konjugovaná báze (např. acetátový anion, CH_3COO^-) s protonem a vzniká zpět slabá kyselina (CH_3COOH). Při přidavku zásady (OH^-) naopak slabá kyselina neutralizuje hydroxidové ionty za vzniku vody a své konjugované báze. Díky těmto reakcím je nárůst koncentrace volných iontů H^+ či OH^- omezen a pH zůstává relativně stabilní. Pufry fungují nejefektivněji v oblasti kolem hodnoty svého pKa, kdy jsou slabá kyselina i její konjugovaná báze zastoupeny ve srovnatelném množství.

- Slabá kyselina zachytí přidané OH^- ionty a brání zvýšení pH.
- Konjugovaná báze zachytí přidané H^+ ionty a brání poklesu pH.

Pojďme si to více rozebrat:

Jako modelový příklad kyselého pufru slouží **acetátový pufr**, tvořený kyselinou octovou (slabá kyselina) a octanem sodným (sůl slabé kyseliny se silnou zásadou).

- **Při přidavku silné zásady (např. NaOH):**
Hydroxidové anionty reagují s kyselinou octovou a vzniká octan. Tím se sice část volné kyseliny octové spotřebuje, ale protože je kyselina octová jen slabě disociovaná (např. jen z 1 %), koncentrace iontů H^+ se sníží pouze mírně. Změna pH je tedy mnohem menší, než by nastala bez přítomnosti kyseliny octové.
- **Při přidavku silné kyseliny (např. HCl):**
Protony z přidané kyseliny reagují s octanovými anionty za vzniku kyseliny octové. Protože je kyselina octová opět jen slabě disociovaná, nepřispěje do roztoku velkým množstvím H^+ . Koncentrace H^+ se proto zvýší jen částečně oproti situaci bez přítomnosti octanu sodného.



Otázka: Co se stane, když přidáme silnou kyselinu do roztoku obsahujícího pouze vodu versus roztoku s acetátovým pufrem?

3 Henderson-Hasselbalchova rovnice a pufrací kapacita

3.1 Henderson-Hasselbalchova rovnice:

Henderson-Hasselbalchova rovnice nám pomáhá pochopit, jak se stabilní pH udržuje. Vychází z toho, že v každém roztoku obsahujícím slabou kyselinu a její „zásaditou“ formu (tzv. konjugovanou bázi) závisí pH na jejich vzájemném poměru. Když je množství kyselého a zásadité složky stejné, pH odpovídá tzv. pK_a , což je hodnota charakteristická pro danou kyselinu.

Henderson-Hasselbalchova rovnice umožňuje výpočet pH pufru na základě koncentrací jeho složek:

$$pH = pK_a + \log \frac{[A^-]}{[HA]}$$

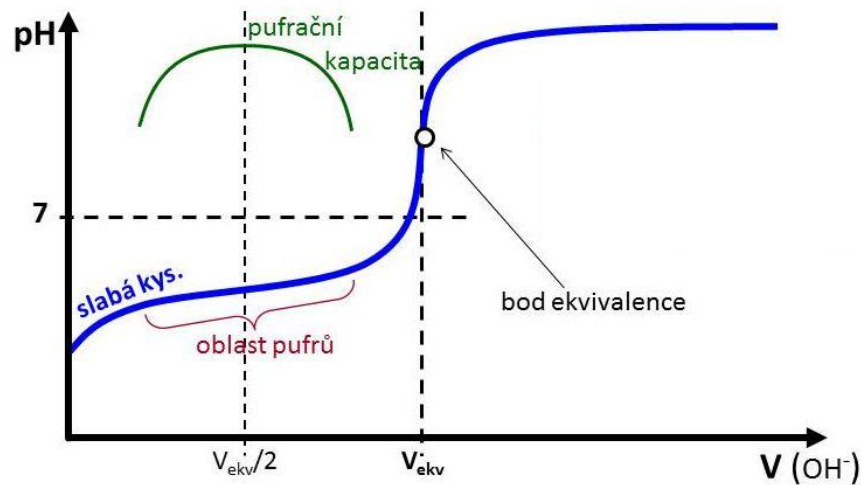


Otázka: Jaký bude poměr báze a kyseliny, pokud $pH = pK_a + 1$? Co když $pH = pK_a - 1$?

3.2 Pufrační kapacita

Pufrační kapacita představuje míru schopnosti pufru odolávat změnám pH při přidání kyseliny nebo zásady. Vyjadřuje množství silné kyseliny či báze, které lze do pufru přidat, aniž by došlo ke změně pH o více než jednu jednotku. Hodnota pufrační kapacity tedy určuje, jak „silný“ je pufr při stabilizaci prostředí.

Následující obrázek ukazuje závislost pH na přidavku NaOH při titraci kyseliny octové, kde část křivky označená červenou svorkou přibližně vymezuje oblast výše popsaného acetátového pufru.



Nejvyšší účinnost pufru, tedy schopnost odolávat změnám pH při přidavku jak kyseliny, tak zásady, nastává tehdy, když je poměr mezi kyselinou a její konjugovanou bází **1:1**. V tomto bodě je pH roztoku rovno pK_a dané kyseliny. Například u kyseliny octové ($\text{pK}_a \approx 4,76$) je maximální účinnost pufru při poměru kyseliny octové a octanu sodného 1:1, což odpovídá polovině ekvivalenčního bodu titrace.

Pufrační kapacita udává, jak velké množství silné kyseliny nebo zásady je potřeba přidat, aby se pH změnilo o jednu jednotku. Čím je tato hodnota vyšší, tím stabilnější je roztok vůči výkyvům pH.

3.3 Faktory ovlivňující pufrační kapacitu

- **Koncentrace složek pufru:** vyšší koncentrace kyseliny a její báze znamená vyšší pufrační kapacitu.
- **Poměr mezi kyselinou a bází:** maximální účinek má poměr 1:1 (viz. předchozí kapitola). Odlišný poměr posouvá pH směrem ke kyselým nebo zásaditým hodnotám.
- **Typ kyseliny a báze:** nejúčinnější jsou pufrы, jejichž pK_a leží co nejbližší požadovanému pH prostředí.

Praktický příklad: acetátový pufr ($\text{CH}_3\text{COOH}/\text{CH}_3\text{COONa}$) působí nejlépe v rozmezí pH 3,7–5,7. Poměrem složek lze pH upravit podle konkrétních potřeb reakce či experimentu.

4 Laboratorní pufrы a jejich použití

V laboratorní biochemii jsou pufrы nezbytné pro stabilizaci pH během chemických i biologických reakcí. Vytvářejí definované prostředí, které zajišťuje **reprodukovatelnost, spolehlivost a přesnost výsledků**. Správně zvolený pufr zároveň minimalizuje riziko denaturace biomolekul a zachovává aktivitu enzymů.

4.1 Vlastnosti laboratorních pufrů

- **Stabilní pH** v požadovaném rozsahu.
- **Kompatibilita s biologickými systémy** (netoxické, bez nežádoucích interakcí).
- **Odolnost při sterilizaci** (autoklávování, filtrace) bez ztráty účinnosti.



***Otázka:** Proč je důležité použít pufr při měření enzymatické aktivity v in vitro podmínkách?*

4.2 Nejčastěji používané laboratorní pufrы

- **PBS (phosphate buffered saline)** je fyziologický roztok, který kombinuje **fosfátový pufr** ($\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$) s ionty Na^+ a Cl^- . Fosfátový systém stabilizuje pH kolem 7,4, zatímco soli zajišťují izotonii s tělními tekutinami. Díky tomu je PBS ideální prostředí pro práci s buňkami a tkáněmi, kde napodobuje přirozené podmínky. Využívá se v imunologii, buněčné biologii i při imunoanalýzách (např. ELISA).
- **Tris-HCl (tris(hydroxymethyl)aminomethan)** je organická báze, která v kombinaci s HCl vytváří pufr účinný v oblasti pH 7,0–9,0. Protonace/deprotonace aminoskupiny zajišťuje stabilní pH. Díky tomuto rozmezí je Tris-HCl velmi univerzální a využívá se v molekulární biologii – od elektroforézy DNA přes proteinové extrakce až po Western blot.
- **HEPES (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonová kyselina)** je tzv. Goodův pufr, který se vyznačuje **minimální teplotní závislostí**. Je tvořen sulfonovanou organickou bází, jejíž protonace udržuje pH v rozmezí 6,8–8,2. To je zvláště důležité pro citlivé enzymatické reakce a pro pěstování buněčných kultur, kde i malé změny pH mohou ovlivnit životaschopnost buněk.
- **MOPS (3-(N-morfolino)propanesulfonová kyselina), MES (2-(N-morfolino)ethansulfonová kyselina)**. Oba tyto pufrы patří také mezi Goodovy pufrы a fungují na principu protonace sulfonové skupiny. **MOPS** (pH kolem 7,2) a **MES** (pH kolem 6,1) se používají zejména při práci s RNA a při biochemických experimentech, kde je potřeba stabilní prostředí v mírně kyselé až neutrální oblasti pH.

- **TAE, TBE:** TAE (Tris–acetát–EDTA) a TBE (Tris–borát–EDTA) jsou specializované pufrы pro **elektroforézu nukleových kyselin**. Základ tvoří Tris, který udržuje pH, zatímco acetát nebo borát slouží jako konjugovaná báze. Přidané **EDTA** chelatuje dvoumocné kationty (např. Mg^{2+}), čímž brání degradaci DNA enzymy. Tyto pufrы tedy nejen stabilizují pH, ale zároveň chrání nukleové kyseliny během analýzy.



Poznámka: „Goodovy pufrы“ jsou skupinou speciálně navržených pufrů, které vznikly v 60. letech díky biologovi Normanu Goodovi s cílem poskytnout ideální prostředí pro biologické a biochemické experimenty. Jsou účinné v oblasti pH blízké fyziologickým podmínkám (6–8), mají nízkou toxicitu, jsou stabilní a jejich vlastnosti se jen málo mění s teplotou. Nejsou rozkládány enzymy a nezasahují do biologických procesů ani neinterferují s ionty, což z nich činí univerzální nástroj pro práci s buňkami a biomolekulami.

5 Přirozené pufrovací systémy v lidském těle

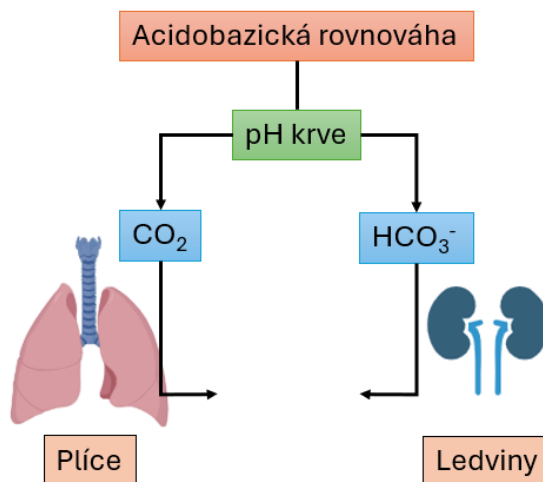
Udržení stabilní hodnoty pH je klíčovým předpokladem správné funkce buněk, enzymů a celého metabolismu. V lidském organismu působí několik přirozených pufrovacích systémů, které brání prudkým změnám pH při metabolických a respiračních procesech.

Bikarbonátový pufr (H_2CO_3 / HCO_3^-)

Je nejdůležitějším **extracelulárním pufrovým systémem**, který reguluje pH krve. Založen je na rovnováze mezi oxidem uhličitým, kyselinou uhličitou a bikarbonátem (sodným):



Rovnováhu ovlivňuje **dýchací systém** (odstraňování CO_2) a **ledviny** (reabsorpce a sekrece HCO_3^-).



Zajímavost: Lidské sliny mají pH kolem 6,5–7,4 a obsahují bikarbonátový pufr, který chrání zuby před kyselinami z jídla a nápojů.

Hemoglobinový pufr

V červených krvinkách se hemoglobin podílí na udržování acidobazické rovnováhy tím, že váže protony, které vznikají při přeměně CO_2 na hydrogenuhličitan. Důležité je, že **hemoglobin bez navázaného kyslíku** (deoxyhemoglobin) váže protony lépe než hemoglobin nasycený kyslíkem. Tento jev se označuje jako **Bohrův efekt** a vysvětluje, proč se kyslík snadněji uvolňuje v tkáních, kde je vyšší tvorba CO_2 a tím i více protonů.

Fosfátový pufr ($\text{H}_2\text{PO}_4^- / \text{HPO}_4^{2-}$)

Významný především v **intracelulárním prostoru a v moči**. Je účinný kolem pH 6,8, proto hraje zásadní roli v regulaci pH v ledvinách.



Zajímavost: Fosfátový pufr ve sladu je klíčový pro správnou aktivitu enzymů při výrobě piva. Proto má i pivovarnictví „pufrovací chemii“.

Proteinový pufr

Plazmatické proteiny, zejména albumin, obsahují ionizovatelné skupiny, které mohou přijímat či uvolňovat protony. Tento systém se významně podílí na **pufrování krevní plazmy**.

6 Uplatnění pufracích systémů v diagnostice

Fyziologické pufrы (bikarbonátový, fosfátový, hemoglobinový a proteinové) společně udržují stabilní pH krve a tkání, což je nezbytné pro správnou funkci buněk. Jejich poruchy vedou k acidobazickým nerovnováhám, které se hodnotí pomocí analyzátorů krevních plynů měřením pH, pCO_2 a HCO_3^- . Tyto parametry ukazují, zda je porucha metabolická nebo respirační a zda probíhá kompenzace.

Klinicky se rozlišují čtyři základní typy poruch: respirační acidóza (hypoventilace, např. CHOPN), respirační alkalóza (hyperventilace), metabolická acidóza (např. ketoacidóza, selhání ledvin, intoxikace) a metabolická alkalóza (opakované zvracení, nadměrné diuretikum, podání bikarbonátu).

Terapie vychází z diagnostiky – nejčastější je podání NaHCO_3 u těžkých metabolických acidóz, nebo cílená alkalizace moči při intoxikacích či léčbě urolitiázy a infekcí. Monitorování pH, pCO_2 a HCO_3^- má zásadní význam hlavně u kriticky nemocných pacientů, kde umožňuje včas odhalit život ohrožující poruchy vnitřního prostředí.

Více k ABR bude probíráno v letním semestru v rámci tématu „Vnitřní prostředí, metabolismus ledvin“.

Shrnutí

Pufry jsou roztoky, které díky rovnováze mezi slabou kyselinou a její konjugovanou zásadou (nebo naopak) udržují stabilní pH. Jejich účinnost je popsána Henderson-Hasselbalchovou rovnicí a závisí na pufracní kapacitě. V lidském těle hrají klíčovou roli bikarbonátový, hemoglobinový, fosfátový a proteinový pufr. V laboratoři se pufry využívají k zajištění stabilního prostředí při enzymatických reakcích, imunologických testech nebo buněčných kulturách. Nesprávná příprava, skladování nebo vliv CO_2 mohou vést k chybám měření. Pufry tak představují nezbytný nástroj v biologii, medicíně i každodenní laboratorní praxi.

Kontrolní otázky

1. Jaký je princip fungování pufru při přidání kyseliny nebo zásady?
2. Jak zní Henderson-Hasselbalchova rovnice a kdy se používá?
3. Při jakém poměru kyselina : báze má pufr nejvyšší účinnost?
4. Který pufrovací systém je nejdůležitější pro udržení pH krve?
5. Jaký je rozdíl mezi bikarbonátovým a fosfátovým pufrem?