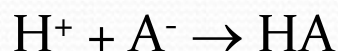


ПУФЕРИ

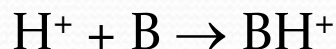
Како функционираат пуферите

Општи принципи

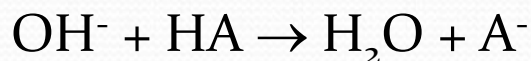
- Пуферите се смеси кои се спротивставуваат на промената на рН вредноста
- Пуферите содржат висока концентрација на
 - Киселина НА и нејзината конјугирана база А⁻, односно
 - База В и нејзината конјугирана киселина ВН⁺
- Додадените Н⁺, реагираат со присутната база: конјугирана или слаба база



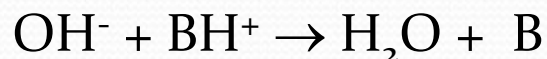
или



- Додадените ОН⁻ реагираат со присутната киселина: слаба или конјугирана киселина



или



Henderson-Hasselbalch-ова равенка



- pH ја определуваме преку
 - K_a на киселината и односот меѓу рамнотежните концентрации на конјугираната база и киселината

$$K_a = \frac{[H^+] \cdot [A^-]}{[HA]}$$

$$[H^+] = K_a \frac{[HA]}{[A^-]}$$

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

Или

- K_b на базата и односот меѓу рамнотежните концентрации на конјугираната киселина и базата

Избор на пуфер

- **Максимален капацитет на пуферите**
 - Се додека односот меѓу концентрациите е константен, и рН ќе биде константна
 - Ова е можно се додека концентрациите на пуферите (НА/А-) или (В/ВН+) се повисоки во однос на додадените Н+ или ОН-
- **Интервал на пуферирање**
 - $pH \approx pK_a \pm 1$
- Пример 1: Како да направиме пуфер со рН 4,0?

Избираме најблиска рКа до бараната рН

рКа (мравска киселина/формијат) = 3,74

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

$$4,0 = 3,74 + \log \frac{[A^-]}{[HA]}$$

$$0,26 = \log \frac{[A^-]}{[HA]}$$

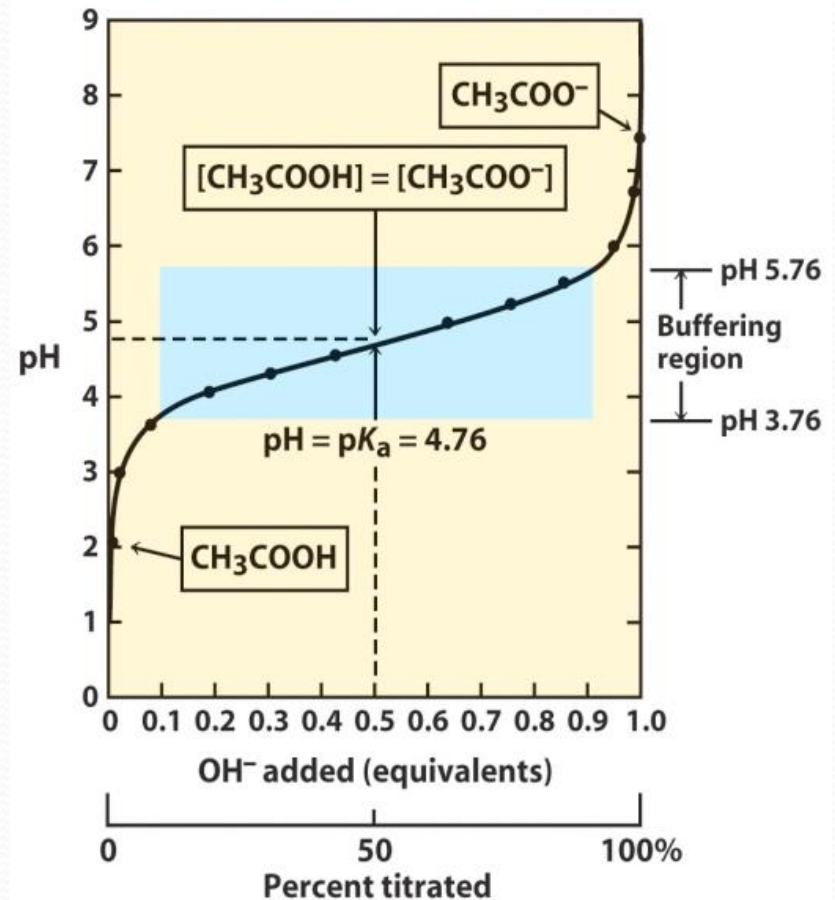
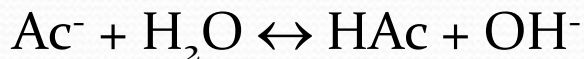
$$\frac{[A^-]}{[HA]} = 1,8$$

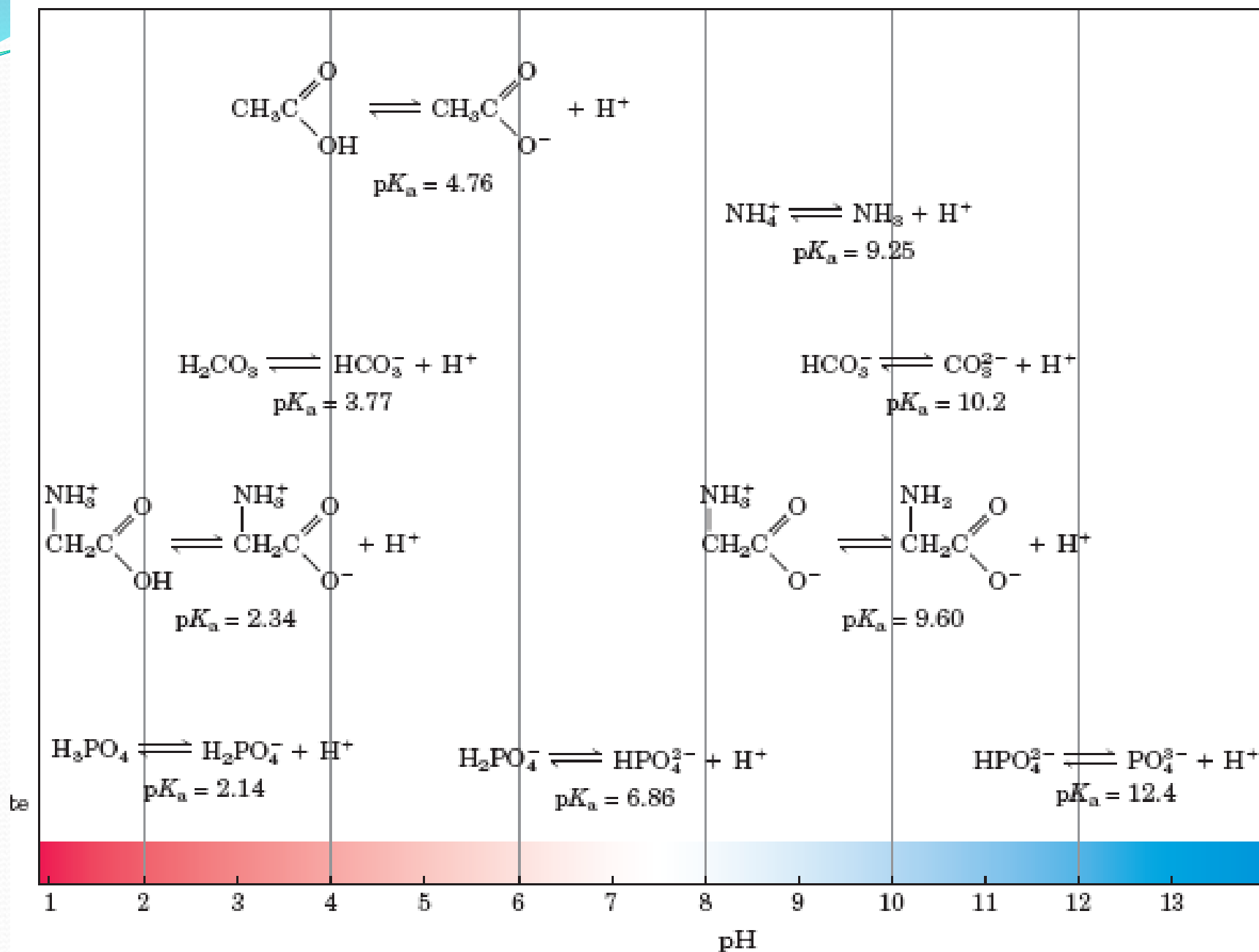
Како функционираат пуферите

- Пример 2. Колку ќе изнесува pH ако кон 25 mL 0,2 M оцетна киселина (HAc) се додадат 10 mL 0,2 M NaOH ?
- Количеството на слабата киселина е поголемо од количеството на додадената база
- NaOH е лимитирачкиот реагенс, според што
$$n(\text{NaOH}) = n(\text{Ac}^-) = 0,02 \text{ mol}$$
$$n(\text{HAc})_{\text{н}} = 0,005 \text{ mol} - n(\text{NaOH})$$
$$n(\text{HAc})_{\text{н}} = 0,003 \text{ mol}$$
- Во растворот постои смеса од оцетна киселина (која неизреагирала 0,003 mol) и натриум ацетат (0,002 mol), односно пуфер, за кој важи Henderson-Hasselbalch-овата равенка.
$$\text{HAc} \leftrightarrow \text{H}^+ + \text{Ac}^-$$
$$pK_a = 4,76$$
$$pH = pK_a + \log \frac{[A^-]}{[HA]}$$
- Одговор: pH = 4,58

Крива на титрација

- Во еквивалентната точка на титрација рамнотежните концентрации на оцетната киселина и ацетатниот јон се еднакви, па $\text{pH} = \text{pK} = 4,76$.
- Интервалот на пуферирање изнесува $\text{pK} \pm 1$, односно е во границите на pH од 3,76 до 5,76.
- Пример 3. Колку ќе изнесува pH ако кон 10 mL 0,2 M оцетна киселина (HAc) се додадат 25 mL 0,2 M NaOH ?
 - Оцетната киселина целосно конвертира во ацетатен јон





Вообичаени пуфери

- **Фосфатни пуфери** (pH 6,5 до 7,5)
 - природна околина
 - Едноставно приготвување на натриум и калиум фосфатни раствори со сите концентрации
 - **Недостатоци:** (1) таложење или врзување со некои биолошки катјони (Ca^{2+} и Mg^{2+}), (2) инхибирање на некои биолошки процеси, како и на некои ензими, и (3) ограничен pH интервал на употреба.
- Пуфери на **карбоксилни киселини** (pH 3 до 6)
 - Ацетатен, **формијатен**, цитратен и сукцинатен
 - **Недостатоци:** претставуваат природни метаболити кои може да стапат во интерференција со биолошките процеси, со металните јони Fe^{3+} , Ca^{2+} , Zn^{2+} , Mg^{2+}

Вообичаени пуфери

- **Трис пуфер** [трис(хидроксиметил)аминометан] (pH 7,5-8,5)
 - Примарен амин, предизвикува минимална интерференција, не ги таложи калциумовите јони.
 - Подесување со концентрирана HCl
 - **Недостатоци:** зависност на pH од концентрацијата (ефект на разредување); интерференција со некои pH електроди, поизразена промена на pKa во зависност од температурата.
- **Боратни пуфери** (pH од 8,5 до 10)
 - **Недостаток:** образување комплекси со многу метаболити (јаглехидрати)
- **Аминокиселини** (глицин 2-3 и 9,5-10,5, **хистидин** 5,5-6,5, глицинамид 7,8-8,8, **глицилглицин** 8-9)
 - Најприродна средина за клеточните компоненти и екстракти
 - **Недостаток:** Интерферираат во биолошките процеси.

Good-ови пуфери

- Опишани од Norman Good и колегите во 1966
- Главна примена за биохемиски и биолошки истражувања
- Критериуми за избор
 - **pKa** помеѓу 6 и 8.
 - **Растворливост.** Добра растворливост во вода, мала растворливост во неполарни растворувачи (масла, масти и органски растворувачи).
 - **Непропустливост на мембраната.** Исклучен или минимален транспорт преку клеточните мембрани.

Критериуми за избор

- **Минимално влијание на соли.**
- **Минимално влијание на дисоцијацијата.**
- **Интеракција со катјоните.** Да не создаваат пуфер-метален јон комплекси, или истите да се растворливи и добро дефинирани.
- **Хемиска стабилност.** Отпорни кон ензимска и неензимска деградација.
- **Оптичка абсорпција.** Незначителна абсорпција на светлина во видливиот и ултравиолетовиот дел од спектарот.
- **Едноставни за приготвување.** Достапни во чист облик, а се добиваат и пречистуваат од достапни материјали.

Table 2.1

Structures and Properties of Several Synthetic Zwitterionic Buffers

Buffer Name	Abbreviation	Structure (All structures shown in salt form)	pK _a (20°C)	Useful pH Range	ΔpK _a /C°	Concentration of a Saturated Solution (M, 0°C)
<i>N</i> -2-Acetamido-2-aminoethanesulfonic acid	ACES	$\text{H}_2\text{NCOCH}_2\text{NH}_2^+\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SO}_3^-$	6.9	6.4–7.4	−0.020	0.22
<i>N</i> -2-Acetamidiminodiacetic acid	ADA	$\text{H}_2\text{NCOCH}_2\text{N}^+\begin{matrix} \text{CH}_2\text{COO}^- \\ \text{CH}_2\text{COO}^- \end{matrix}$	6.6	6.2–7.2	−0.011	—
<i>N,N</i> -Bis(2-hydroxyethyl)-2-aminoethanesulfonic acid	BES	$(\text{HOCH}_2\text{CH}_2)_2\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{SO}_3^-$	7.15	6.6–7.6	−0.016	3.2
<i>N,N</i> -Bis(2-hydroxyethyl)glycine	Bicine	$(\text{HOCH}_2\text{CH}_2)_2\text{NHCH}_2\text{COO}^-$	8.35	7.5–9.0	−0.018	1.1
3-(Cyclohexylamino)propanesulfonic acid	CAPS	 $\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SO}_3^-$	10.4	10.0–11.0	−0.009	0.85
Cyclohexylaminoethanesulfonic acid	CHES	 $\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{SO}_3^-$	9.5	9.0–10.0	−0.009	0.85
Glycylglycine	Gly-Gly	$\text{H}_3\text{N}^+\text{CH}_2\text{CONHCH}_2\text{COO}^-$	8.4	7.5–9.5	−0.028	1.1
<i>N</i> -2-Hydroxyethylpiperazine- <i>N'</i> -2-ethanesulfonic acid	HEPES	$\text{HO}(\text{CH}_2)_2\text{N}^+\text{C}_4\text{H}_8\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{SO}_3^-$	7.55	7.0–8.0	−0.014	2.25
2-(<i>N</i> -Morpholino)ethanesulfonic acid	MES	 $\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{SO}_3^-$	6.15	5.8–6.5	−0.011	0.65
3-(<i>N</i> -Morpholino)propanesulfonic acid	MOPS	 $\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SO}_3^-$	7.20	6.5–7.9	—	—
Piperazine- <i>N,N'</i> -bis-2-ethanesulfonic acid	PIPES	$^-\text{O}_3\text{SCH}_2\text{CH}_2\text{N}^+\text{C}_4\text{H}_8\text{N}^+\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SO}_3^-$	6.8	6.4–7.2	−0.0085	—
<i>N</i> -Tris(hydroxymethyl)methyl-2-aminoethanesulfonic acid	TES	$(\text{HOCH}_2)_3\text{N}^+\text{HCH}_2\text{CH}_2\text{SO}_3^-$	7.5	7.0–8.0	−0.020	2.6
<i>N</i> -Tris(hydroxymethyl)methylglycine	Tricine	$(\text{HOCH}_2)_3\text{CNH}_2^+\text{CH}_2\text{COO}^-$	8.15	7.5–8.5	−0.021	0.8
Tris(hydroxymethyl)aminomethane	Tris	$(\text{HOCH}_2)_3\text{CNH}_2^+$	8.3	7.5–9.0	−0.031	2.4

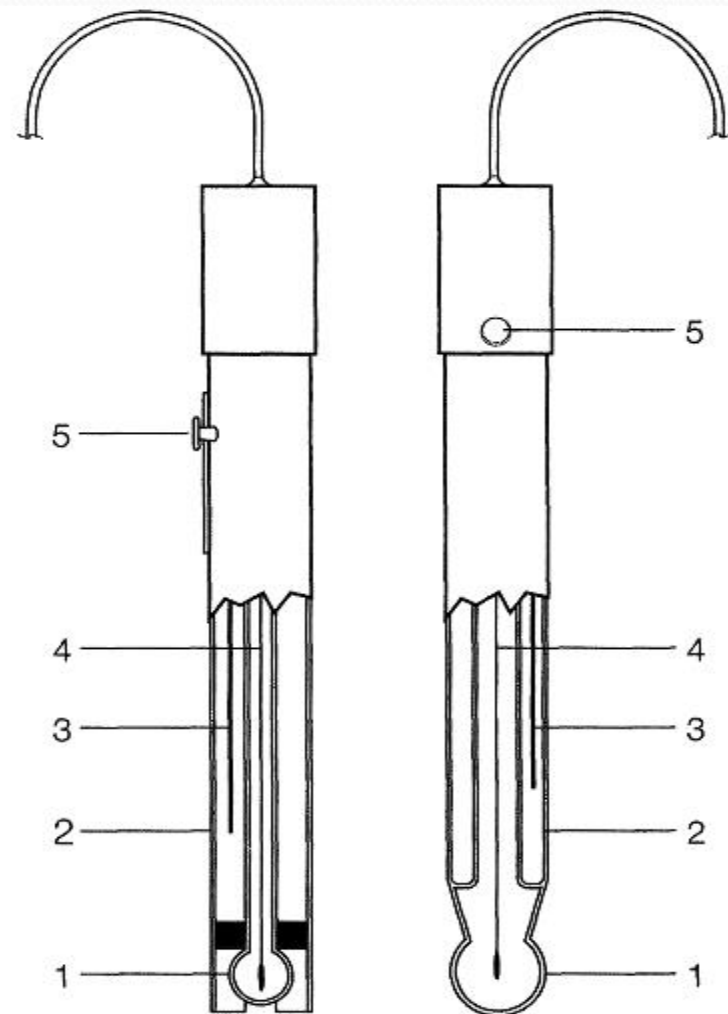
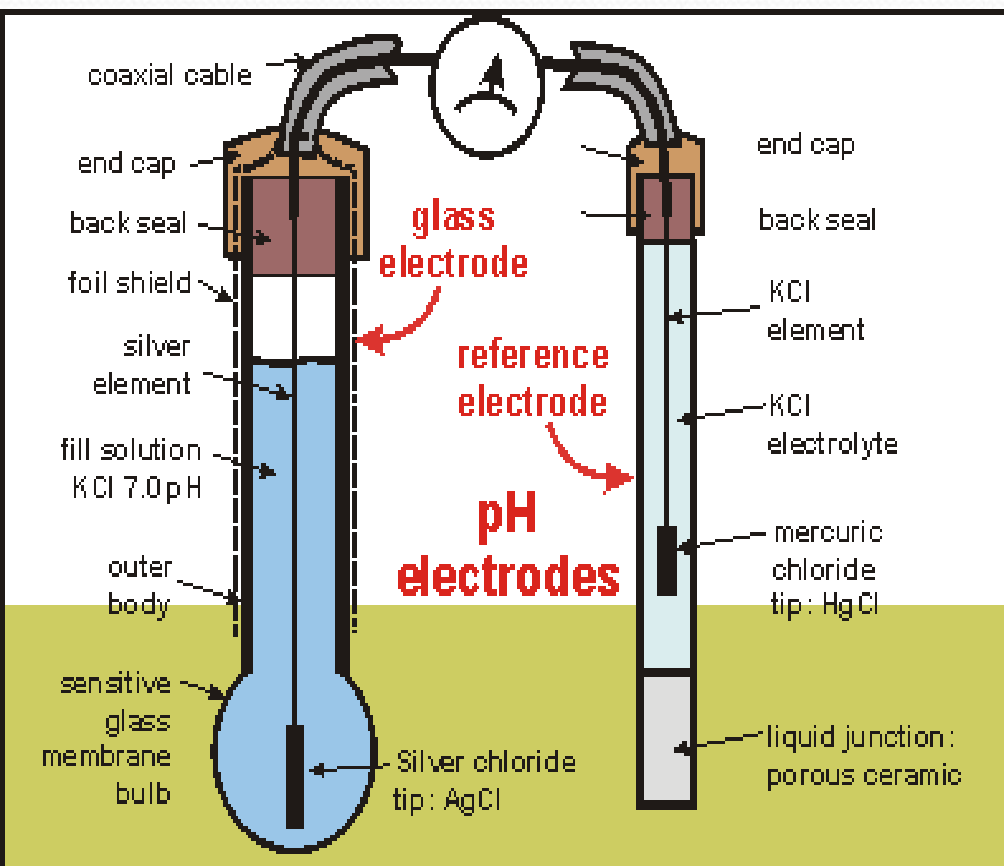
Определување на рН

- Приближно определување на рН на водни раствори со **индикаторски бои**: лакмус, фенолфталеин, фенол црвено.
- Употреба на рН-метри



pH-метар со две електроди: стаклена и референтна (каломелова)

pH-метар со единечна комбинирана електрода



$$V = E_{\text{constant}} + \frac{2,303RT}{F} \text{pH}$$

V = напон на затворено струјно коло

E_{constant} = потенцијална енергија на референтна електрода

R = универзална гасна константа

T = апсолутна температура

F = Фарадеева константа

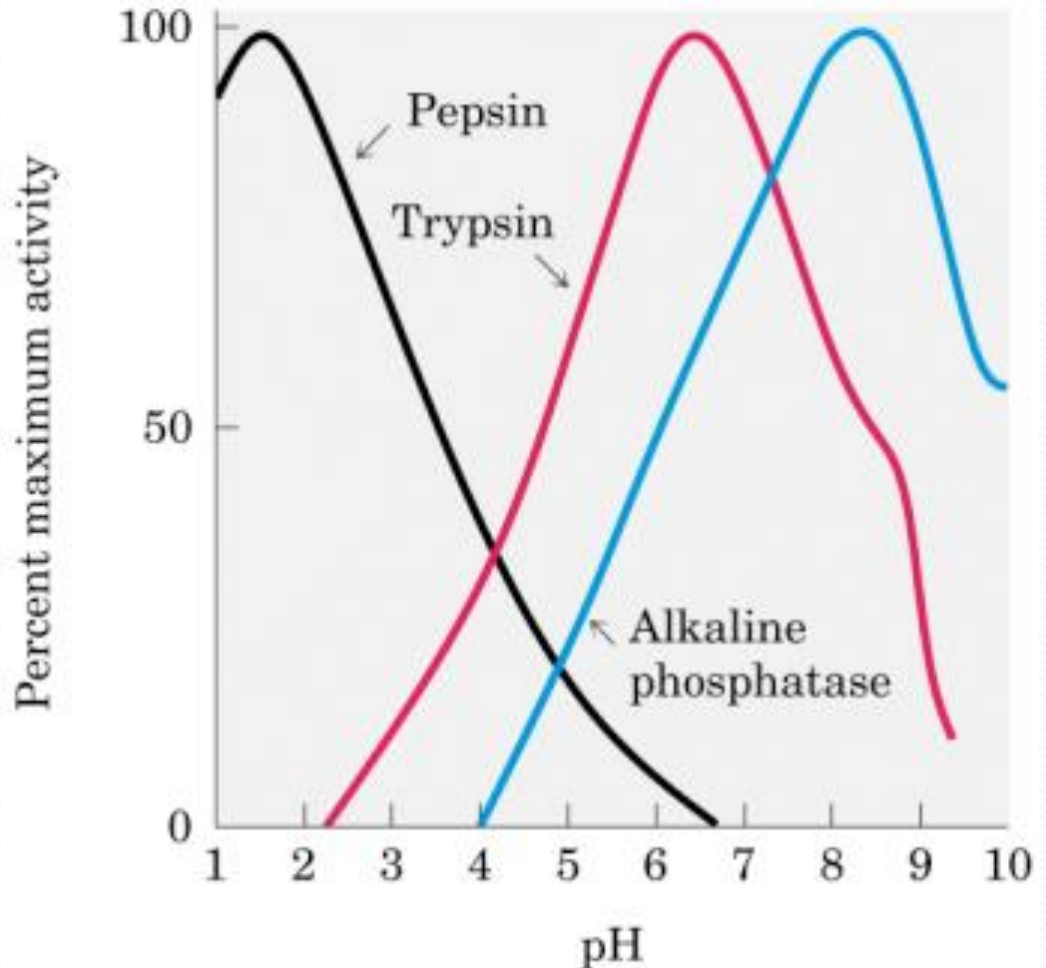
- **Калибрирање** на pH-метар
- Температурна корекција
- Правилно ракување со pH-метар
- Правилно одржување на електродите
 - При работа со протеини, електродата се потопува во 5% пепсин во 0,1 M HCl 2 часа, а потоа се мие со дестилирана вода.

Експериментални грешки

- Грешка на **Na** (стандардна крива за корекција; електрода која не е чувствителна на Na јони како комбинирана стаклена или замена на натриумови соли со калиумови).
- Влијание на **концентрација** (разредување на пуферите).
- Влијание на **температура** (калибрирањето на електродата и определување на непозната pH да се изведуваат на иста температура)
 - Пример: Трис пуферот со pH 7,0 направен на 4 °C, ќе има pH од 5,95 на температура од 37 °C.

pH: Зошто треба да ја одржуваме?

- Биохемиските процеси зависат од pH на средината
- Клетките и организмите ја одржуваат константна специфичната pH вредност оптимална за нивна функција.



Улога на бикарбонатниот пуфер од крвната плазма

- Бикарбонатниот пуфер е најефикасен при $\text{pH} = 7,4$ кога H_2CO_3 од крвната плазма е во рамнотежа со CO_2 од белите дробови.
- Што ако $\text{pH} < 6,8$?
- Зголемената концентрација на H^+ доведува до воспоставување на нова рамнотежа, при што концентрацијата на H_2CO_3 се зголемува. Со тоа се зголемува концентрацијата на растворениот CO_2 во крвта, односно се зголемува притисокот на гасот CO_2 во внатрешноста на белите дробови. Вишокот од CO_2 се издишува.

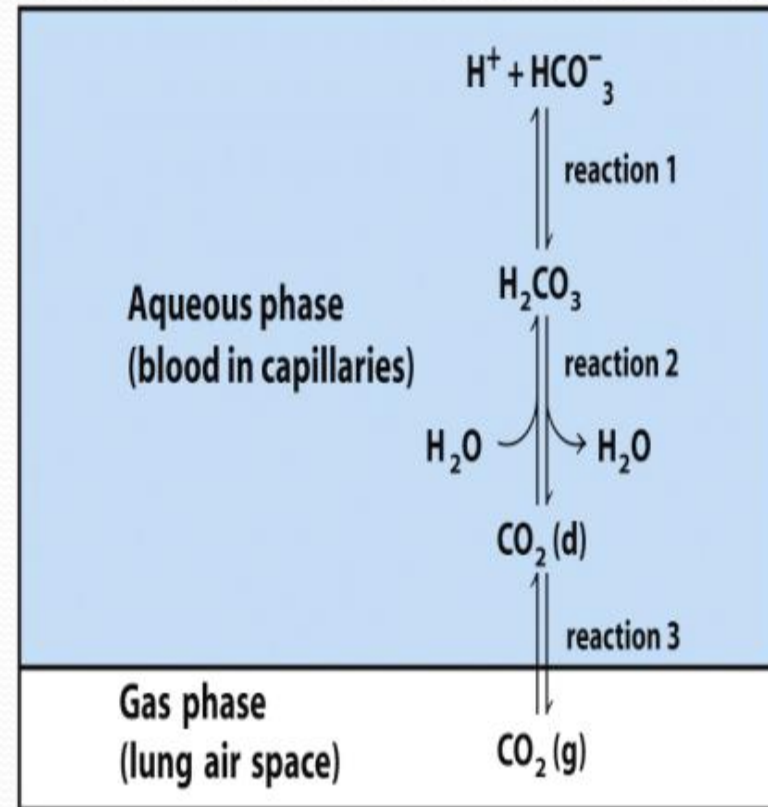
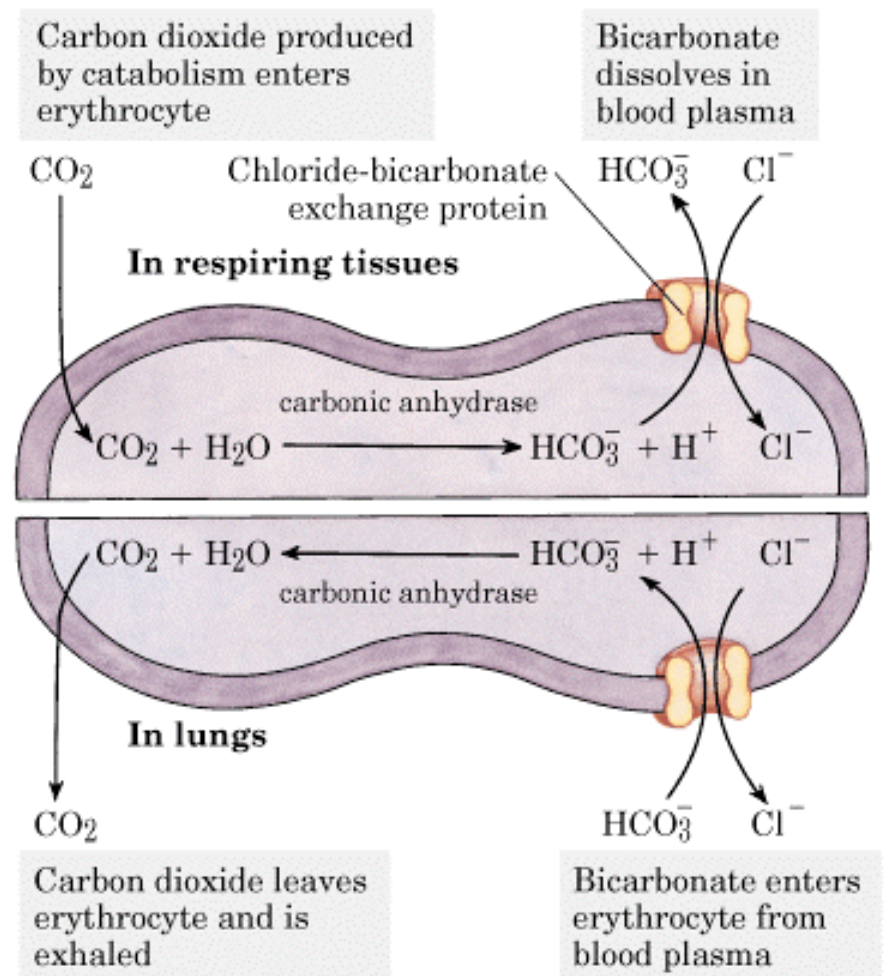


Figure 2-20
Lehninger Principles of Biochemistry, Fifth Edition
© 2008 W. H. Freeman and Company

Улога на бикарбонатниот пуфер од крвната плазма

- Што ако $pH > 7,8$?
- Се случува спротивното, па е неопходно поголемо количество CO_2 од белите дробови.
- Што се случува со CO_2 во респираторните ткива, а што во белите дробови?
- Што е дишење?
- Каква е pH на средината?



Кога нештата ќе тргнат наопаку...

- **Алкалоза:** состојба на вишок база во телесните течности
- **Ацидоза:** состојба на вишок киселина во телесните течности

Причинители
Хипераерација

ефекти

Акутна дијареа

загуба на бикарбонати

Екстремно долго вежбање

акумулирање на млечна киселина

Продолжени настинки

задржување на бикарбонатниот јон

Екстремна апнеа

намалено вдишување