

# Voda a pH

Peter J. Kennelly a Victor W. Rodwell

## BIOCHEMICKÝ VÝZNAM

Voda je převažující chemickou složkou živých organismů. Její unikátní fyzikální vlastnosti, zahrnující schopnost solvatovat široké spektrum organických a anorganických molekul, jsou odvozeny od dipolární struktury vody a její mimořádné kapacity pro tvorbu vodíkových vazeb. Způsob, jakým voda interaguje se solvatovanými biomolekulami, ovlivňuje strukturu každé z nich. Jako výjimečný nukleofil je voda reaktantem nebo produktem v mnoha metabolických reakcích. Voda má slabou tendenci disociovat na hydroxylové ionty a protony. Kyselost vodných roztoků je obecně vyjadřována za použití logaritmické pH stupnice. Hydrogenuhličitaný a jiné pufrý normálně udržují pH extracelulární tekutiny mezi 7,35 a 7,45. Podezření na poruchy acidobazické rovnováhy jsou ověřovány měřením pH arteriální krve a obsahu  $\text{CO}_2$  ve venózní krvi. Příčiny acidózy (pH krve  $< 7,35$ ) zahrnují diabetické ketoacidózy a acidózy vyvolané nadbytkem kyseliny mléčné. Alkalózy (pH  $> 7,45$ ) mohou být důsledkem zvracení kyselého obsahu žaludku. Regulace rovnováhy vody závisí na hypothalamovém mechanismu, který ovládá žízeň, na antidiuretickém hormonu (ADH), na retenci nebo vyměšování vody ledvinami a na ztrátách odpařením. Nefrogenní diabetes insipidus, který zahrnuje neschopnost koncentrovat moč nebo nastavit sotva patrné změny osmolarity mimobuněčné tekutiny, pramení z malé citlivosti ledvinových tubulárních osmoreceptorů na ADH.

## VODA JE IDEÁLNÍ BIOLOGICKÉ ROZPOUŠTĚDLO

### Molekuly vody tvoří dipóly

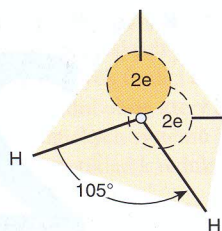
Molekula vody je nepravidelný, slabě zkosený čtyřstěn s kyslíkem v jeho středu (obr. 2-1). Dva vodíky a dva volné elektronové páry zbývajících dvou  $sp^3$  hybridizovaných orbitálů kyslíku zabírají rohy čtyř-

stěnu. Úhel mezi atomy vodíku (105 stupňů) se slabě liší od ideálního úhlu čtyřstěnu, který je 109,5 stupně. Amoniak má také tvar čtyřstěnu s úhly 107 stupňů mezi jeho atomy vodíku. Voda je **dipól**, molekula s elektrickým nábojem nesymetricky rozloženým kolem její struktury. Silně elektronegativní atom kyslíku odtahuje elektrony od vodíkových jader a zanechává je s částečným kladným nábojem, zatímco jeho dva nepárové elektrony vytvářejí oblast lokálního záporného náboje.

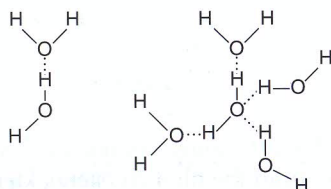
Voda, silný dipól, má vysokou **dielektrickou konstantu**. Jak je popsáno kvantitativně Coulombovým zákonem, síla interakce  $F$  mezi opačně nabitými částicemi je nepřímo úměrná dielektrické konstantě  $\epsilon$  obklopujícího prostředí. Dielektrická konstanta pro vakuum je 1, pro hexan 1,9, pro ethanol 24,3 a pro vodu 78,5. Voda proto silně snižuje přitažlivou sílu mezi nabitými a polárními částicemi ve srovnání s bezvodým prostředím s nižšími dielektrickými konstantami. Její silný dipól a vysoká dielektrická konstanta umožňují vodě rozpouštět velká množství iontových sloučenin, jako jsou soli.

### Molekuly vody tvoří vodíkové vazby

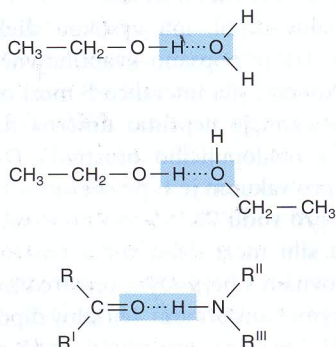
Částečně nestíněná vodíková jádra kovalentně vázaná na kyslíkový nebo dusíkový atom, který odtahuje elektrony, mohou interagovat s volným elektronovým párem jiného kyslíkového nebo dusíkového atomu a tvořit **vodíkovou vazbu**. Protože molekuly vody mají obě tyto vlastnosti, dávají přednost tvorbě vodíkové vazby navzájem mezi sebou za vzniku uspořádaných útvarů (obr. 2-2). Vodíkové vazby hluboce ovlivňují fyzikální vlastnosti vody a jsou příčinou její mimořádně vysoké viskozity, povrchového napětí a bodu varu. V průměru každá molekula vody v kapalném stavu asociuje pomocí vodíkových vazeb se 3,5 jinými molekulami. Tyto vazby jsou nejen poměrně slabé, ale i krátkodobé, s poločasem životnosti jedné mikrosekundy a kratším. K roztržení vodíkové vazby v kapalně vodě



**OBR. 2-1.** Molekula vody je čtyřstěn



**OBR. 2-2.** Vlevo: Asociace dvou dipolárních molekul vody pomocí vodíkové vazby (tečkovaná čára). Vpravo: shluk (klastř) čtyř molekul vody, vytvořený pomocí vodíkových vazeb. Všimněte si, že molekula vody může sloužit současně jako donor vodíku i jako akceptor vodíku.



**OBR. 2-3.** Také polární skupiny se podílejí na vodíkových vazbách. Na obr. jsou ukázány vodíkové vazby vytvořené mezi ethanolem a vodou, mezi dvěma molekulami ethanolu a mezi karbonylovým kyslíkem peptidů a vodíkem aminoskupiny sousední aminokyseliny.

je zapotřebí pouze asi 4,5 kcal/mol, méně než 5 % energie potřebné k roztržení kovalentní O–H vazby.

Vodíkové vazby umožňují vodě rozpouštět mnoho organických biomolekul, obsahujících funkční skupiny, které se mohou podílet na tvorbě vodíkových vazeb. Kyslíkové atomy aldehydů, ketonů a amidů například poskytují volné elektronové páry, které mohou sloužit jako akceptory vodíku. Alkoholy a aminy mohou sloužit jako akceptory vodíku i donory nestíněných vodíkových atomů pro tvorbu vodíkových vazeb (obr. 2-3).

## INTERAKCE S VODOU OVLIVŇUJE STRUKTURU BIOMOLEKUL

### Kovalentní a nekovalentní vazby stabilizují biologické molekuly

Kovalentní vazba je největší síla, která drží molekuly pohromadě (tab. 2-1). Nekovalentní síly, přestože mají menší velikost, značně přispívají ke struktuře, stabilitě a funkční schopnosti makromolekul v živých buňkách. Tyto síly, které mohou být buď přitažlivé, nebo odpudivé, zahrnují interakce jak uvnitř biomolekuly, tak mezi ní a vodou, která tvoří hlavní složku okolního prostředí.

### Biomolekuly zaujímají takovou konformaci, aby jejich polární a nabitě skupiny byly na jejich povrchu

Většina biomolekul je **amfipatická**, to znamená, že mají oblasti bohaté na nabitě nebo polární funkční skupiny i oblasti s hydrofobním charakterem. Proteiny mají sklon svinovat se tak, aby R-skupiny aminokyselin s hydrofobním postranním řetězcem byly uvnitř molekuly. Aminokyseliny s nabitým nebo polárním postranním řetězcem (např. arginin, glutamát, serin) jsou obecně přítomné na povrchu, v kontaktu s vodou. Podobné modely převažují ve fosfolipidových dvojvrstvách, kde nabitě skupiny fosfatidylserinu nebo fosfatidylethanolaminu jsou v kontaktu s vodou, zatímco jejich hydrofobní postranní řetězce, tvořené acyly mastných kyselin, se spolu shlukují (klastřují) za vyloučení vody. Tento model maximalizuje možnost tvorby energeticky preferovaných interakcí náboj – dipól, dipól – dipól a vodíkových vazeb mezi polárními skupinami v biomolekule a vodou. Také minimalizuje energeticky nepříznivé kontakty mezi vodou a hydrofobními skupinami.

**TAB. 2-1.** Vazebné energie pro atomy biologického významu

Typ vazby	Energie (kcal/mol)	Typ vazby	Energie (kcal/mol)
O–O	34	O=O	96
S–S	51	C–H	99
C–N	70	C=S	108
S–H	81	O–H	110
C–C	82	C=C	147
C–O	84	C=N	147
N–H	94	C=O	164

## Hydrofobní interakce

Hydrofobní interakce jsou tendence nepolárních sloučenin k »samoasociaci« ve vodném prostředí. Tato »samoasociace« není řízena ani vzájemným přitahováním, ani – jak se někdy nesprávně říká – hydrofobními vazbami. »Samoasociace« minimalizuje energeticky nevýhodné interakce mezi nepolárními skupinami a vodou.

Jestliže vodíky nepolárních skupin, jako jsou methylenové skupiny uhlovodíků, netvoří vodíkové vazby, musí ovlivňovat strukturu vody, která je obklopuje. Molekuly vody sousedící s hydrofobními skupinami jsou omezeny v počtu orientací (stupně volnosti), které jim dovolují zúčastnit se maximálního počtu energeticky výhodných vodíkových vazeb. Maximální tvorba násobných vodíkových vazeb může být udržována jen zvýšeným uspořádáním přiléhajících molekul vody, provázeným poklesem entropie.

Z druhého zákona termodynamiky vyplývá, že optimální volná energie směsi uhlovodík – voda je funkcí jak maximální entalpie (z vodíkové vazby), tak minimální entropie (maximum stupňů volnosti). Nepolární molekuly mají tendenci tvořit kapičky, aby minimalizovaly plochu odhaleného povrchu a zmenšovaly počet ovlivněných molekul vody. Podobně ve vodném prostředí živých buněk hydrofobní části biopolymerů směřují k tomu, aby byly schovány uvnitř struktury molekuly nebo uvnitř lipidové dvojvrstvy, čímž se zmenší kontakt s vodou.

## Elektrostatické interakce

Interakce mezi nabitými skupinami pomáhají tvarovat strukturu biomolekul. Elektrostatické interakce mezi opačně nabitými skupinami uvnitř biomolekul nebo mezi nimi jsou nazývány **solné můstky**. Solné můstky jsou svou silou srovnatelné s vodíkovými vazbami, ale působí na větší vzdálenosti. Proto často usnadňují vazbu nabitých molekul a iontů k proteinům a nukleovým kyselinám.

## Van der Waalsovy síly

Van der Waalsovy síly vznikají přitahováním mezi přechodnými dipóly tvořenými rychlým pohybem elektronů všech neutrálních atomů. Značně slabší než vodíkové vazby, ale potenciálně extrémně početné van der Waalsovy síly klesají šestkrát se vzdáleností oddělených atomů. Proto působí jen na velmi malé vzdálenosti, typicky 2–4 Å.

## Násobné síly stabilizují biomolekuly

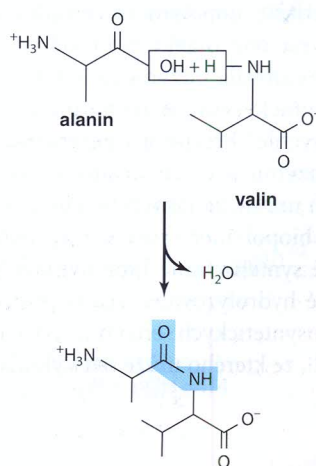
Dvojitá šroubovice DNA ilustruje příspěvek násobných sil ke struktuře biomolekul. Zatímco každé

jednotlivé vlákno DNA je drženo pohromadě kovalentními vazbami, dvě vlákna šroubovice jsou držena pohromadě výhradně nekovalentními interakcemi. Tyto nekovalentní interakce zahrnují vodíkové vazby mezi nukleotidovými bázemi (Watsonovo-Crickovo párování bází) a van der Waalsovy interakce mezi nahromaděnými purinovými a pyrimidinovými bázemi. Šroubovice stáčí nabitě fosfátové skupiny a polární sacharidy (ribosu a deoxyribosu), tvořící páteř DNA, k vodě, zatímco relativně hydrofobní nukleotidové báze jsou schovány uvnitř. Rozvolněná páteř maximalizuje vzdálenosti mezi negativně nabitými fosfáty a tak minimalizuje nepříznivé elektrostatické interakce.

## VODA JE VÝBORNÝ NUKLEOFIL

Metabolické reakce často zahrnují atak volných elektronových párů, které jsou v elektronově bohatých molekulách, nazývaných **nukleofily**, na elektronově chudé atomy – **elektrofil**. Nukleofily a elektrofil nemusí mít bezpodmínečně formální záporný nebo kladný náboj. Voda, jejíž dva volné elektronové páry  $sp^3$  elektronů nesou částečný záporný náboj, je výborný nukleofil. Jiné nukleofily biologického významu obsahují kyslíkové atomy fosfátů, alkoholů a karboxylových kyselin; síru thiolů; dusík aminů a imidazolový kruh histidinu. Běžné elektrofil obsahují karbonylový uhlík v amidech, esterech, aldehydech a ketonech a fosforové atomy fosfoesterů.

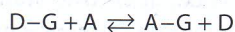
Důsledkem nukleofilního útoku vody je obecné štěpení amidových, glykosidových nebo esterových vazeb, které drží biopolymery pohromadě. Tento proces se nazývá **hydrolýza**. Opačně, jsou-li monomerní jednotky spojovány navzájem za vzniku biopolymerů, jako jsou proteiny nebo glykogen, je voda produktem, např. během tvorby peptidové vazby mezi dvěma aminokyselinami:



Zatímco hydrolyza je termodynamicky upřednostňovanou reakcí, amidové a fosfoesterové vazby polypeptidů a oligonukleotidů jsou stále ve vodném prostředí buněk. Toto zdánlivě paradoxní chování odráží skutečnost, že termodynamické ovládní rovnováhy reakce neurčuje, jakou rychlostí bude probíhat. Je-li to zapotřebí, proteinové katalyzátory, **enzymy**, zvětšují rychlost hydrolytických reakcí v buňkách. **Proteasy** katalyzují hydrolyzu proteinů na jejich složky aminokyseliny, zatímco **nukleasy** katalyzují hydrolyzu fosfoesterových vazeb v DNA a RNA. Aktivitu těchto enzymů je třeba citlivě ovládat, aby bylo zajištěno, že působí na vhodné cílené molekuly ve vhodnou dobu.

### Mnohé metabolické reakce zahrnují přesun skupin

Mnoho enzymových reakcí zodpovědných za syntézu a štěpení biomolekul zahrnuje přesun chemické skupiny G z donoru D na akceptor A za vzniku komplexu mezi akceptorem a přenášenou skupinou A-G:



Hydrolyza a fosforolýza glykogenu např. zahrnuje přesun glukosylových skupin na vodu nebo na fosfáty. Rovnovážná konstanta pro hydrolyzu kovalentních vazeb silně podporuje vznik štěpných produktů. Naopak v mnoha případech reakce s přesunem skupiny, které vedou k biosyntéze makromolekul, zahrnují termodynamicky nevýhodnou tvorbu kovalentních vazeb. Enzymy překonávají tuto bariéru spřažením těchto reakcí s reakcemi termodynamicky výhodnými, takže celková změna volné energie podporuje syntézu biopolymeru. Je nukleofilní charakter vody a její vysoká koncentrace v buňkách příčinou toho, že biopolymery, jako proteiny a DNA, jsou poměrně stálé? A jak může docházet k syntéze biopolymerů ve vodném prostředí? Odpovědi na obě otázky jsou vlastnosti enzymů. Kdyby neexistovala enzymová katalýza, ani reakce termodynamicky vysoce zvýhodněné by nemusely probíhat rychle. Přesné a diferencované ovládní aktivity enzymů a jejich lokalizace ve speciálních organelách určují, za jakých fyziologických podmínek bude biopolymer syntetizován nebo degradován. Nově syntetizované biopolymery nejsou bezprostředně hydrolyzovány, zčásti proto, že aktivní centra biosyntetických enzymů udržují substráty v prostředí, ze kterého může být vyloučena voda.

### Molekuly vody vykazují slabou, ale důležitou tendenci k disociaci

Schopnost vody ionizovat, i když slabě, má ústřední význam pro život. Jelikož voda může působit jako kyselina i jako báze, může být její ionizace znázorněna jako intermolekulární přesun protonu za tvorby hydroniového iontu ( $H_3O^+$ ) a hydroxylového iontu ( $OH^-$ ):



Přesunutý proton je ve skutečnosti asociován se shlukem (klastrem) molekul vody. Proton neexistuje v roztoku jen jako  $H_3O^+$ , ale také jako multimery  $H_5O_2^+$  a  $H_7O_3^+$ . Proton je přesto běžně uváděn jako  $H^+$ , i když je ve skutečnosti silně hydratován.

Protože hydroniové a hydroxylové ionty jsou kontinuálně rekombinovány za tvorby molekul vody, nemůžeme říci, že *individuální* vodík nebo kyslík je přítomen jako ion, nebo jako součást molekuly vody. V jednom okamžiku je jako ion a v dalším jako součást molekuly vody. Nejsou tedy uvažovány jednotlivé ionty nebo molekuly. Namísto toho hovoříme o *pravděpodobnosti*, že v jistém okamžiku je vodík přítomen jako ion, nebo jako část molekuly vody. Protože 1 g vody obsahuje  $3,46 \cdot 10^{22}$  molekul, může být ionizace vody popsána statisticky. Prohlásit, že pravděpodobnost, že vodík existuje jako ion, je 0,01, znamená, že v daném časovém okamžiku je jedna možnost ze sta, že existuje jako ion, a 99 možností ze sta, že je součástí molekuly vody. Skutečná pravděpodobnost, že vodíkový atom existuje v čisté vodě jako vodíkový ion, je asi  $1,8 \cdot 10^{-9}$ . Pravděpodobnost, že je součástí molekuly vody, je tak téměř jednotka. Vyjádřeno jiným způsobem, na každý vodíkový a hydroxylový ion v čisté vodě připadá 1,8 bilionu nebo  $1,8 \cdot 10^9$  molekul vody. Přesto vodíkové a hydroxylové ionty přispívají značně k vlastnostem vody.

Pro disociaci vody platí vztah

$$K = \frac{[H^+][OH^-]}{[H_2O]}$$

Závorky reprezentují molární koncentrace (přesně řečeno molární aktivity) a  $K$  je **disociační konstanta**. Protože hmotnost 1 molu (mol) vody je 18 g, 1 litr (1000 g) vody obsahuje  $1000 : 18 = 55,56$  molu. Čistá voda je tak 55,56 molární. Protože pravděpodobnost, že vodík v čisté vodě bude existovat jako vodíkový ion, je  $1,8 \cdot 10^{-9}$ , bude molární koncentrace  $[H^+]$  iontů (nebo  $[OH^-]$  iontů) v čisté vodě výsle-

kem součinu pravděpodobnosti  $1,8 \cdot 10^{-9}$  a molární koncentrace vody  $55,56 \text{ mol/l}$ , což je  $1,0 \cdot 10^{-7} \text{ mol/l}$ .

Nyní můžeme spočítat  $K$  pro čistou vodu:

$$K = \frac{[\text{H}^+][\text{OH}^-]}{[\text{H}_2\text{O}]} = \frac{[10^{-7}][10^{-7}]}{[55,56]} \\ = 0,018 \cdot 10^{-14} = 1,8 \cdot 10^{-16} \text{ mol/l}$$

Molární koncentrace vody  $55,56 \text{ mol/l}$  je příliš vysoká, aby byla významnou měrou ovlivňována disociací. Je tudíž považována v podstatě za konstantní. Tato konstanta může proto být včleněna do disociační konstanty  $K$  a poskytnout novou užitečnou konstantu  $K_w$ , nazývanou **iontový součin** vody. Vztah mezi  $K_w$  a  $K$  je ukázán níže:

$$K = \frac{[\text{H}^+][\text{OH}^-]}{[\text{H}_2\text{O}]} = 1,8 \cdot 10^{-16} \text{ mol/l} \\ K_w = (K)[\text{H}_2\text{O}] = [\text{H}^+][\text{OH}^-] \\ = (1,8 \cdot 10^{-16} \text{ mol/l})(55,56 \text{ mol/l}) \\ = 1,00 \cdot 10^{-14} (\text{mol/l})^2$$

Všimněme si, že rozměry  $K$  jsou moly na litr a rozměry  $K_w$  jsou moly<sup>2</sup> na litr<sup>2</sup>.

Jak název naznačuje, iontový součin  $K_w$  je číselně shodný se součinem molárních koncentrací  $\text{H}^+$  a  $\text{OH}^-$ :

$$K_w = [\text{H}^+][\text{OH}^-]$$

Při  $25 \text{ }^\circ\text{C}$   $K_w = (10^{-7})^2$ , nebo  $10^{-14} (\text{mol/l})^2$ . Při teplotách pod  $25 \text{ }^\circ\text{C}$  je  $K_w$  o málo menší než  $10^{-14}$  a při teplotách nad  $25 \text{ }^\circ\text{C}$  je o málo větší než  $10^{-14}$ . Uvnitř stanovených limitů vlivu teploty je  $K_w$  rovno  $10^{-14} (\text{mol/l})^2$  pro všechny vodné roztoky, tedy i pro roztoky kyselin a zásad.  $K_w$  používáme k výpočtu pH kyselých i bazických roztoků.

## pH JE ZÁPORNÝ LOGARITMUS KONCENTRACE VODÍKOVÝCH IONTŮ

Termín **pH** byl zaveden v roce 1909 Sørensenem, který definoval pH jako záporný log koncentrace vodíkových iontů:

$$\text{pH} = -\log [\text{H}^+]$$

Tato definice, i když není zcela přesná, postačuje k mnoha biochemickým účelům. Výpočet pH roztoku se provádí následovně:

1. Vypočte se koncentrace vodíkových iontů  $[\text{H}^+]$ .
2. Vypočte se základ dekadického logaritmu  $[\text{H}^+]$ .
3. pH je záporná hodnota čísla vypočteného v bodě 2.

Např. pro čistou vodu při  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ ,

$$\text{pH} = -\log [\text{H}^+] = -\log 10^{-7} = -(-7) = 7,0$$

Tato hodnota je také známa jako *power* (anglicky), *puissant* (francouzsky) nebo *potenz* (německy) exponentu, proto se pro ni používá písmeno *p*.

Nízké hodnoty pH odpovídají vysokým koncentracím  $\text{H}^+$  a vysoké hodnoty pH odpovídají nízkým koncentracím  $\text{H}^+$ .

Kyseliny jsou **donory protonů** a báze **akceptory protonů**. **Silné kyseliny** (jako  $\text{HCl}$ ,  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) kompletně disociují na anionty a kationty i v silně kyselých roztocích (o nízkém pH). **Slabé kyseliny** disociují jen zčásti v kyselých roztocích. Podobně **silné báze** (jako  $\text{NaOH}$ ,  $\text{KOH}$ ) – ale ne **slabé báze** (jako  $\text{Ca}[\text{OH}]_2$ ) – jsou kompletně disociovány při vysokých pH. Mnohé biochemikálie jsou slabé kyseliny. Výjimky zahrnují fosforylované intermediáty, jejichž fosforylová skupina obsahuje dva disociovatelné protony, z nichž první je silně kyselý.

Následující příklady ukazují, jak se počítá pH kyselých a bazických roztoků.

**Příklad 1:** Jaké je pH roztoku, jehož koncentrace vodíkových iontů je  $3,2 \cdot 10^{-4} \text{ mol/l}$ ?

$$\text{pH} = -\log [\text{H}^+] \\ = -\log (3,2 \cdot 10^{-4}) \\ = -\log (3,2) - \log (10^{-4}) \\ = -0,5 + 4,0 \\ = 3,5$$

**Příklad 2:** Jaké je pH roztoku, jehož koncentrace hydroxylových iontů je  $4,0 \cdot 10^{-4} \text{ mol/l}$ ?

Nejprve definujeme hodnotu **pOH**, která je rovna  $-\log [\text{OH}^-]$  a může být odvozena z definice  $K_w$ :

$$K_w = [\text{H}^+][\text{OH}^-] = 10^{-14}$$

Tudíž

$$\log [\text{H}^+] + \log [\text{OH}^-] = \log 10^{-14}$$

nebo

$$\text{pH} + \text{pOH} = 14$$

Řešení problému jiným postupem:

$$\begin{aligned} [\text{OH}^-] &= 4,0 \cdot 10^{-4} \\ \text{pOH} &= -\log [\text{OH}^-] \\ &= -\log (4,0 \cdot 10^{-4}) \\ &= -\log (4,0) - \log (10^{-4}) \\ &= -0,60 + 4,0 \\ &= 3,4 \end{aligned}$$

Nyní

$$\begin{aligned} \text{pH} &= 14 - \text{pOH} = 14 - 3,4 \\ &= 10,6 \end{aligned}$$

Uvedené příklady ilustrují, jak logaritmická pH stupnice usnadňuje podávání informací a porovnávání koncentrací vodíkových iontů, které se vzájemně řádově liší, to je 0,00032 M (pH 3,5) a 0,00000000025 M (pH 10,6).

**Příklad 3:** Jaká je hodnota pH (a)  $2,0 \cdot 10^{-2}$  mol/l KOH a (b)  $2,0 \times 10^{-6}$  mol/l KOH?

$\text{OH}^-$  pocházejí ze dvou zdrojů, KOH a vody. Protože pH je stanovováno z celkové  $[\text{H}^+]$  (a pOH z celkové  $[\text{OH}^-]$ ), musí být uvažovány oba zdroje. V prvním případě (a) je příspěvek vody k celkové  $[\text{OH}^-]$  zanedbatelný. To ale nemůže být řečeno pro druhý příklad (b):

	Koncentrace (mol/l)	
	(a)	(b)
Molarita KOH	$2,0 \cdot 10^{-2}$	$2,0 \cdot 10^{-6}$
$[\text{OH}^-]$ z KOH	$2,0 \cdot 10^{-2}$	$2,0 \cdot 10^{-6}$
$[\text{OH}^-]$ z vody	$1,0 \cdot 10^{-7}$	$1,0 \cdot 10^{-7}$
Celková $[\text{OH}^-]$	$2,00001 \cdot 10^{-2}$	$2,1 \cdot 10^{-6}$

pH může být vypočteno, jak je uvedeno výše.

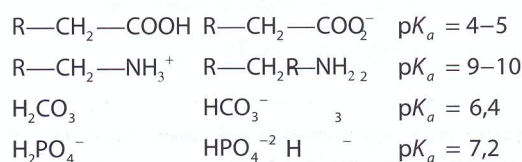
Uvedené příklady předpokládají, že silná báze KOH je v roztoku kompletně disociována, a že koncentrace  $\text{OH}^-$  byla tudíž rovna koncentraci KOH plus koncentraci  $\text{OH}^-$  původně přítomných ve vodě. Tento předpoklad je správný pro zředěné roztoky silnýchází nebo kyselin, ale ne pro slabé báze nebo kyseliny. Protože slabé elektrolyty disociují v roztocích jen slabě, musíme k výpočtu pH roztoků slabých kyselin neboází použít **disociační konstantu**. Ta nám umožní vypočítat hodnoty  $[\text{H}^+]$  (nebo  $[\text{OH}^-]$ ) pro danou molaritu slabé kyseliny (nebo báze) a z ní následně pH.

### Funkční skupiny, které jsou slabými kyselinami, mají velký fyziologický význam

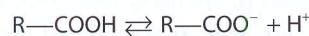
Mnoho biochemikálií má funkční skupiny, které jsou slabými kyselinami nebo bázemi. Karboxylové

skupiny, aminoskupiny a estery kyseliny fosforečné, jejichž disociace do druhého stupně klesá v rozmezí fyziologických koncentrací, jsou přítomny v proteinech a nukleových kyselinách, ve většině koenzymů a většině intermediárních metabolitů. Znalost disociace slabých kyselin aází je tak základem k porozumění vlivu intracelulárního pH na strukturu a biologickou aktivitu. Separace, založené na pohybu nabitých částic, jako je elektroforéza a iontově výměnná chromatografie, jsou také dobře pochopitelné v pojmech disociačního chování funkčních skupin.

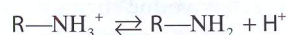
Protonované částice (jako HA nebo  $\text{R-NH}_3^+$ ) nazýváme **kyseliny** a neprotonované částice (jako  $\text{A}^-$  nebo  $\text{R-NH}_2$ ) jejich **konjugované báze**. Podobně můžeme mluvit o **bázích** (jako  $\text{A}^-$  nebo  $\text{R-NH}_2$ ) a jejich **konjugovaných kyselinách** (jako HA nebo  $\text{R-NH}_3^+$ ). Dále jsou uvedeny reprezentativní slabé kyseliny (vlevo), jejich konjugované báze (uprostřed) a  $\text{pK}_a$  hodnoty (vpravo):



Relativní sílu slabých kyselin a zásad vyjadřujeme v pojmech jejich disociačních konstant. Níže jsou uvedeny výrazy pro disociační konstanty ( $K_a$ ) pro dva reprezentanty slabých kyselin,  $\text{R-COOH}$  a  $\text{R-NH}_3^+$ .



$$K_a = \frac{[\text{R-COO}^-][\text{H}^+]}{[\text{R-COOH}]}$$



$$K_a = \frac{[\text{R-NH}_2][\text{H}^+]}{[\text{R-NH}_3^+]}$$

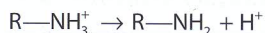
Protože číselné hodnoty  $K_a$  pro slabé kyseliny jsou záporná exponenciální čísla, vyjadřujeme  $K_a$  jako  $\text{pK}_a$ , kde

$$\text{pK}_a = -\log K_a$$

Všimněme si, že  $\text{pK}_a$  má stejný vztah ke  $K_a$  jako pH k  $[\text{H}^+]$ . Čím silnější kyselina, tím nižší je  $\text{pK}_a$  hodnota.

$\text{pK}_a$  je používána k vyjádření relativní síly jak kyselin, tak zásad. Pro jakoukoliv slabou kyselinu je jejím konjugátem silná báze. Podobně je konjugátem silné báze slabá kyselina. Relativní sílyází jsou vyjadřovány pomocí  $\text{pK}_a$  jejich konjugovaných

kyselin. Pro vícetytné sloučeniny, obsahující více než jeden disociovatelný proton, je číselný subskript přiřazován ke každé disociaci v pořadí relativních acidit. Pro disociaci typu



$\text{p}K_a$  odpovídá pH, při kterém je koncentrace kyseliny  $\text{R-NH}_3^+$  rovná koncentraci báze  $\text{R-NH}_2$ .

Z výše uvedených rovnic, uvádějících vztah mezi  $K_a$  a  $[\text{H}^+]$  a koncentracemi nedisociovaných kyselin a jejich konjugovanýchází vyplývá: když

$$[\text{R-COO}^-] = [\text{R-COOH}]$$

nebo když

$$[\text{R-NH}_2] = [\text{R-NH}_3^+]$$

pak

$$K_a = [\text{H}^+]$$

Když asociované (protonované) a disociované (konjugované báze) částice jsou přítomné ve stejných koncentracích, převažující koncentrace vodíkových iontů  $[\text{H}^+]$  je číselně rovna disociační konstantě  $K_a$ . Zlogaritmuje-li obě strany rovnice uvedené výše a vynásobíme je  $-1$ , dostaneme tyto výrazy:

$$\begin{aligned} K_a &= [\text{H}^+] \\ -\log K_a &= -\log [\text{H}^+] \end{aligned}$$

Protože  $-\log K_a$  je definovaný jako  $\text{p}K_a$  a  $-\log [\text{H}^+]$  definuje pH, může být rovnice přepsána jako

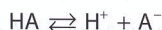
$$\text{p}K_a = \text{pH}$$

To znamená, že  $\text{p}K_a$  kyselých skupiny je pH, při kterém protonované a neprotonované částice jsou přítomné ve stejných koncentracích.  $\text{p}K_a$  pro kyselinu může být stanovena přidáním 0,5 ekvivalentu alkalického hydroxidu na ekvivalent kyseliny. Výsledné pH bude stejné jako  $\text{p}K_a$  kyseliny.

### Hendersonova-Hasselbalchova rovnice popisuje chování slabých kyselin a pufrů

Hendersonova-Hasselbalchova rovnice je odvozena níže.

Slabá kyselina HA ionizuje takto:



Rovnovážná konstanta pro tuto disociaci je

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

Křížovým vynásobením dostaneme

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

Vydělíme obě strany rovnice  $[\text{A}^-]$ :

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

Zlogaritmuje obě strany rovnice

$$\begin{aligned} \log [\text{H}^+] &= \log \left( K_a \frac{[\text{HA}]}{[\text{A}^-]} \right) \\ &= \log K_a + \log \frac{[\text{HA}]}{[\text{A}^-]} \end{aligned}$$

Vynásobíme obě strany rovnice  $-1$ :

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

Nahradíme pH a  $\text{p}K_a - \log [\text{H}^+]$  a  $-\log K_a$ , pak:

$$\text{pH} = \text{p}K_a - \log \frac{[\text{HA}]}{[\text{A}^-]}$$

Inverzí posledního výrazu odstraníme znaménko minus a dostaneme Hendersonovu-Hasselbalchovu rovnici:

$$\text{pH} = \text{p}K_a + \log \frac{[\text{A}^-]}{[\text{HA}]}$$

Hendersonova-Hasselbalchova rovnice má vysokou předpovědní hodnotu v protonové rovnováze. Např.

1. Je-li kyselina přesně z poloviny zneutralizována,  $[\text{A}^-] = [\text{HA}]$ .

Za těchto podmínek

$$\text{pH} = \text{p}K_a + \log \frac{[\text{A}^-]}{[\text{HA}]} = \text{p}K_a + \log \frac{1}{1} = \text{p}K_a + 0$$

Tedy v polovině neutralizace  $\text{pH} = \text{p}K_a$ .

2. Je-li poměr  $[\text{A}^-]/[\text{HA}] = 100 : 1$ ,

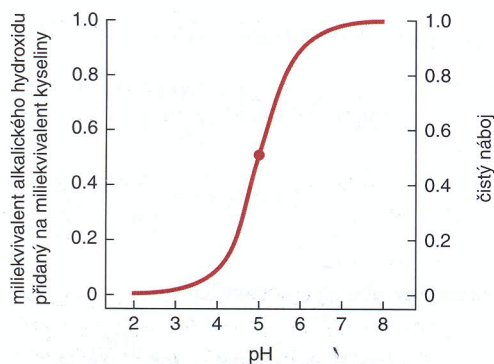
$$\text{pH} = \text{p}K_a + \log \frac{[\text{A}^-]}{[\text{HA}]}$$

$$\text{pH} = \text{p}K_a + \log 100/1 = \text{p}K_a + 2$$

3. Je-li poměr  $[\text{A}^-]/[\text{HA}] = 1 : 10$ ,

$$\text{pH} = \text{p}K_a + \log 1/10 = \text{p}K_a + (-1)$$

Je-li rovnice vypočítána při poměru  $[\text{A}^-]/[\text{HA}]$  pohybujícím se od  $10^3$  do  $10^{-3}$  a vypočtené hodnoty pH jsou vyneseny do grafu, pak graf popisuje titrační křivku pro slabou kyselinu (obr. 2-4).



**OBR. 2-4.** Titrační křivka pro kyselinu typu HA. Bod uprostřed křivky označuje  $\text{p}K_a$  5,0.

### Roztoky slabých kyselin a jejich solí pufrují změny pH

Roztoky slabých kyselin nebo bází a jejich konjugáty mají schopnost pufrovat, tj. odolávat změnám pH při přidavku silné kyseliny nebo báze. Protože mnohé metabolické reakce jsou prováděny uvolněním nebo spotřebou protonů, jsou některé z nich uvnitř buňky pufrované. Oxidační metabolismus produkuje  $\text{CO}_2$ , anhydrid kyseliny uhličitě, která v případě, že by nebyla pufrována, mohla by způsobovat silné acidózy. Udržování konstantního pH zahrnuje pufrování fosfáty, hydrogenuhličitany a proteiny, které přijímají nebo uvolňují protony a brání tak změnám pH. Při pokusech za použití tkáňových extraktů nebo enzymů je konstantní pH udržováno přidávkou pufrů, jako je MES ([2-N-morfolino]ethansulfonová kyselina,  $\text{p}K_a$  6,1), anorganický fosfát ( $\text{p}K_{a2}$  7,2), HEPES (N-hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonová kyselina,  $\text{p}K_a$  6,8) nebo Tris (tris[hydroxymethyl]aminomethan,  $\text{p}K_a$  8,3). Hodnota  $\text{p}K_a$  vztažená k požadovanému pH je hlavní charakteristikou pro výběr pufru.

Pufování může být sledováno pH metrem při titraci slabé kyseliny nebo báze (obr. 2-4). Můžeme také vypočítat posun pH, provádějící přidávek kyseliny nebo báze k pufrovanému roztoku. V uvede-

ném příkladu má pufrovaný roztok (slabá kyselina,  $\text{p}K_a = 5,0$ , a její konjugovaná báze) na počátku jednu ze čtyř hodnot pH. Vypočítáme posun pH, který nastane, když k 0,1 mílekvivalentu KOH je přidán 1 mílekvivalent každého roztoku:

Počáteční pH	5,00	5,37	5,60	5,86
$[\text{A}^-]_{\text{počáteční}}$	0,50	0,70	0,80	0,88
$[\text{HA}]_{\text{počáteční}}$	0,50	0,30	0,20	0,12
$([\text{A}^-]/[\text{HA}])_{\text{počáteční}}$	1,00	2,33	4,00	7,33
<b>Přídavek 0,1 mílekvivalentu KOH způsobí</b>				
$[\text{A}^-]_{\text{konečná}}$	0,60	0,80	0,90	0,98
$[\text{HA}]_{\text{konečná}}$	0,40	0,20	0,10	0,02
$([\text{A}^-]/[\text{HA}])_{\text{konečný}}$	1,50	4,00	9,00	49,0
$\log([\text{A}^-]/[\text{HA}])_{\text{konečný}}$	0,18	0,60	0,95	1,69
konečné pH	5,18	5,60	5,95	6,69
$\Delta\text{pH}$	<b>0,18</b>	<b>0,60</b>	<b>0,95</b>	<b>1,69</b>

Všimněme si, že změna pH na mílekvivalent přidaného  $\text{OH}^-$  závisí na počátečním pH.

Roztok odolává změnám pH nejučinněji při hodnotách pH blízkých  $\text{p}K_a$ . Roztok slabé kyseliny a její konjugované báze pufrují nejučinněji v rozmezí pH,  $\text{p}K_a \pm 1,0$  jednotky pH.

Obr. 2-4 také ilustruje čistý náboj na jedné molekule kyseliny jako funkci pH. Frakční náboj  $-0,5$  neznamená, že jednotlivá molekula nese frakční náboj, ale že pravděpodobnost, že daná molekula má jednotkový záporný náboj v kterémkoliv časovém okamžiku, je 0,5. Úvaha o čistém náboji na makromolekulách jako funkci pH poskytuje základ pro separační techniky, jako je iontové výměnná chromatografie nebo elektroforéza.

### Síla kyseliny závisí na struktuře molekuly

Mnoho biologicky zajímavých kyselin má více než jednu disociující skupinu. Přítomnost záporného náboje v sousedství brání ztrátě protonu z blízké skupiny a tím zvyšuje její  $\text{p}K_a$ . To je patrné z  $\text{p}K_a$  hodnot pro tři disociující skupiny kyseliny fosforečné a citronové (tab. 2-2). Vliv sousedního náboje klesá se vzdáleností. Druhá  $\text{p}K_a$  pro kyselinu jantarovou, která má dvě methylenové skupiny mezi svými karboxylovými skupinami, je 5,6, zatímco  $\text{p}K_a$  pro kyselinu glutarovou, která má ještě jednu methylenovou skupinu navíc, je 5,4.

### Hodnoty $\text{p}K_a$ závisí na vlastnostech prostředí

$\text{p}K_a$  funkční skupiny je také silně ovlivňováno okolním prostředím. Prostředí může  $\text{p}K_a$  buď zvyšovat, nebo snižovat v závislosti na tom, je-li nedisocio-



**TAB. 2-2. Relativní síly vybraných kyselin biologického významu<sup>1</sup>**

Kyseliny s jedním protonem		
mravenčí	pK	3,75
mléčná	pK	3,86
octová	pK	4,76
amoniový ion	pK	9,25
Kyseliny se dvěma protony		
uhličitá	pK <sub>1</sub>	6,37
	pK <sub>2</sub>	10,25
jantarová	pK <sub>1</sub>	4,21
	pK <sub>2</sub>	5,64
glutarová	pK <sub>1</sub>	4,34
	pK <sub>2</sub>	5,41
Kyseliny se třemi protony		
fosforečná	pK <sub>1</sub>	2,15
	pK <sub>2</sub>	6,82
	pK <sub>3</sub>	12,38
citronová	pK <sub>1</sub>	3,08
	pK <sub>2</sub>	4,74
	pK <sub>3</sub>	5,40

<sup>1</sup>**Poznámka:** Hodnoty uvedené v tabulce jsou hodnoty pK<sub>a</sub> (-log disociační konstanty) vybraných kyselin s jedním, dvěma a třemi protony.

vaná kyselina nebo její konjugovaná báze nabitou částicí. Vliv dielektrické konstanty na pK<sub>a</sub> může být pozorován po přidavku ethanolu do vody. pK<sub>a</sub> karboxylové kyseliny *vzrůstá*, zatímco pK<sub>a</sub> aminu *klesá*, protože ethanol snižuje schopnost vody solvatovat nabitou částici. Hodnoty pK<sub>a</sub> disociujících skupin uvnitř proteinů jsou hluboce ovlivňovány jejich lokálním prostředím, včetně přítomnosti nebo nepřítomnosti vody.

## SOUHRN

- Voda tvoří pomocí vodíkových vazeb shluky (klastry) se svými molekulami nebo s jinými donory či akceptory protonů. Vodíkové vazby jsou odpovědné za povrchové napětí, viskozitu, kapalný stav při pokojové teplotě a rozpouštěcí sílu vody.
- Sloučeniny, které obsahují O, N nebo S, mohou sloužit jako donory nebo akceptory vodíkových vazeb.
- Makromolekuly mění vodíkové vazby na vnitřním povrchu za vodíkové vazby s vodou. Entropické síly způsobují, že makromolekuly nastavují polární oblasti směrem k vodnému rozhraní a skrývají nepolární oblasti.
- Solné můstky, hydrofobní interakce a van der Waalsovy síly se podílejí na tvorbě molekulární struktury.
- pH je záporný log [H<sup>+</sup>]. Nízké pH charakterizuje kyselé roztoky a vysoké pH označuje bazické roztoky.
- Síla slabých kyselin je vyjadřována pomocí pK<sub>a</sub>, záporného log disociační konstanty kyseliny. Silné kyseliny mají nízké hodnoty pK<sub>a</sub> a slabé kyseliny vysoké hodnoty pK<sub>a</sub>.
- Pufrý brání změně pH při vzniku nebo spotřebě protonů. Maximální pufrací kapacita je ± 1 pH jednotka na obě strany od pK<sub>a</sub>. Mezi fyziologické pufrý patří hydrogenuhličitany, fosfáty a proteiny.

## LITERATURA

- Reese KM: Whence came the symbol pH. *Chem & Eng News* 2004;82:64.
- Segel IM: *Biochemical Calculations*. Wiley, 1968.
- Stillinger FH: Water revisited. *Science* 1980;209:451.
- Suresh SJ, Naik VM: Hydrogen bond thermodynamic properties of water from dielectric constant data. *J Chem Phys* 2000;113:9727.
- Wiggins PM: Role of water in some biological processes. *Microbiol Rev* 1990;54:432.