

3.3.4 Ода протону. Что такое pH и буферные растворы

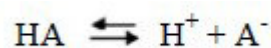
3.3.4.1. Главное

1. Величина pH или водородный показатель – количественная мера кислотности раствора, мера концентрации ионов водорода в растворе. В нейтральных растворах pH=7, в кислых pH<7, в щелочных pH>7.
2. Ионы водорода чрезвычайно важны для клетки
 - 2.1. Изменение pH может сильно менять свойства белковых молекул.
 - 2.2. Протоны прямо или косвенно участвуют в подавляющем большинстве химических реакций в клетке.
 - 2.3. Различие в концентрации протонов по разные стороны мембраны – одна из форм запасания энергии в клетке.
3. Существуют несколько способов регуляции pH внутри клетки и поддержания его оптимальных значений, среди них главное – буферные системы цитоплазмы и специфический транспорт кислот и оснований.
4. Буферные системы – это системы, поддерживающие постоянное значение какой-либо характеристики при изменении состава среды. Кислотно-основные буферные растворы сохраняют значение pH при добавлении вполне заметных количеств кислоты или щелочи

3.3.4.2. Что такое pH?

• Как связаны pH и кислотность раствора?

Общее свойство лимонной, серной, яблочной, азотной кислот – способность диссоциировать в воде с высвобождением катиона водорода H⁺:

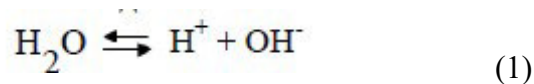


Чем выше концентрация протона, [H⁺] в таких растворах, тем более выражены особые, кислотные свойства раствора. •

Концентрацию протонов принято выражать в единицах pH.

• Почему pH чистой воды равно 7 ?

Вода может самопроизвольно ионизоваться



Константа равновесия такой реакции:

$$K_{\text{равн}} = \frac{[H^+][OH^-]}{[H_2O]}, \quad (2)$$

где [H⁺], [OH⁻], [H₂O] – концентрации протона, гидроксила и воды в ситуации равновесия. •

K_{равн} – величина, постоянная при заданной температуре, ее значение определяется экспериментально. С другой стороны, диссоциация воды настолько мала, что равновесную концентрацию воды ([H₂O] в уравнении(2)) можем считать равной исходной концентрации воды в чистой воде, т.е. величине постоянной ••

Постоянную величину [H₂O] оказалось удобным объединить вместе с K_{равн} в новую константу, которую назвали ионным произведением воды или константой ионизации воды, K_{H2O}

$$K_{H2O} = [H_2O] \cdot K_{\text{равн}} = [H^+] \cdot [OH^-] \quad (3)$$

При комнатной температуре K_{H2O} = 1,0 · 10⁻¹⁴ моль²/л²

И соответственно

$$[H^+] = [OH^-] = 1,0 \cdot 10^{-7} \text{ моль/л}$$

Со степенными выражениями неудобно работать, поэтому их переводят в логарифмические••••:

$$\text{pH} = -\log_{10}[H^+] = -\lg[H^+] \quad \text{или} \\ \text{pH} - \text{отрицательный десятичный логарифм концентрации водородных ионов} \bullet \bullet \bullet \bullet$$

Аналогично pH можем определить pOH, и оба показателя взаимосвязаны.

Действительно,

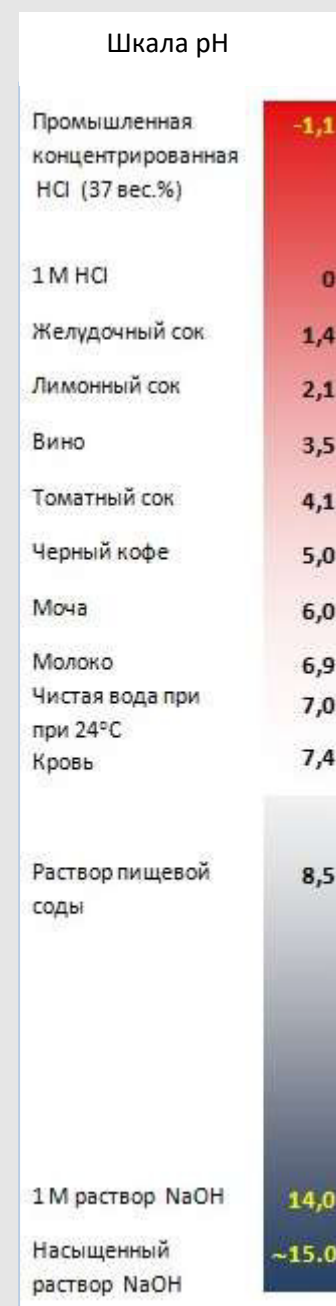
$$K_{H2O} = [H^+] \cdot [OH^-] \Leftrightarrow -\lg K_{H2O} = -\lg([H^+][OH^-]) = -\lg[H^+] - \lg[OH^-] \Leftrightarrow 14 = \text{pH} + \text{pOH}$$

• Какие значения может принимать pH ?

Значение pH чистой воды при комнатной температуре равно 7.0, и это значение принято называть нейтральным.

Из определения pH (см. выше) следует, что при увеличении кислотных свойств раствора, т.е. при увеличении [H⁺], pH уменьшается. И, наоборот, при увеличении щелочных свойств раствора, pH возрастает. Сопоставьте эти утверждения со шкалой pH часто встречающихся растворов.

Шкалу pH приводят в диапазоне 0-14. Это не значит, что не бывает более кислых или более щелочных растворов. Просто такие концентрированные растворы ведут себя необычно, в них невозможно измерить pH обычными методами с помощью индикаторов или стеклянных электродов, для таких суперкислот и суперщелочей используют иные оценки их свойств •••••



• Ионы [H⁺], [OH⁻] как и другие ионы в водных растворах гидратированы. Гидратированный протон часто представляют как ион гидроксония H⁺ · H₂O. По мнению других ученых правильнее говорить о кластере H⁺ · (H₂O)₄ рис?

•• 1 л воды имеет массу 1кг. 1 моль (6,02 · 10²³ молекул) воды весит 18 г. Тогда $[H_2O] = \frac{1000 \text{ г} \cdot \text{л}^{-1}}{18 \text{ г} \cdot \text{моль}^{-1}} = 55,6 \text{ моль/литр}$

••• **Определение логарифма: $m = \log_a N$, если $a^m = N$.**
Например, $\log_{10} 100 = 2$; $\log_2 1/32 = -5$; $\log_a 1 = 0$
Принято записывать $\log_{10} N$ как $\lg N$

•••• Строго говоря, в определении pH вместо концентрации водородных ионов (с) следует использовать их активность (а), т.е. $\text{pH} = -\lg a$, где $a = \gamma c$, а γ – коэффициент активности, показывающий, насколько раствор отличается от идеального раствора. Для разбавленных растворов $\gamma \approx 1$, и мы можем смело использовать значения концентраций.

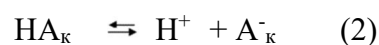
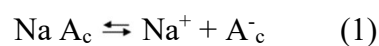
-
1. ВА Островский [За нижней границей шкалы pH](#) СОРОСОВСКИЙ ОБРАЗОВАТЕЛЬНЫЙ ЖУРНАЛ, №12, 1998. ХИМИЯ
 2. ВВ Кузнецов « [Определение pH](#) » СОРОСОВСКИЙ ОБРАЗОВАТЕЛЬНЫЙ ЖУРНАЛ, ТОМ 7, №4, 2001. 44. ХИМИЯ

3.3.4.3. Что такое буферные растворы?

В этом разделе, посвященном протону, речь пойдет о кислотно-основных буферных растворах. Главное свойство таких растворов – pH растворов почти не изменяется при их разбавлении или при добавлении к ним некоторых количеств кислот или оснований.

Рассмотрим свойства буферного раствора на примере ацетатного буфера^[ref]. Ацетатный буфер – это водный раствор уксусной кислоты, HA, и ее соли, например, натриевой соли NaA, где A- кислотный остаток уксусной кислоты. Для удобства пометим ацетат в составе молекулы кислоты индексом 'к', а в составе соли индексом 'с'.

В воде и кислота и соль диссоциируют:



При этом соль диссоциирует полностью, а кислота – только чуть-чуть. Слабая диссоциация уксусной кислоты связана с тем, что, во-первых, это слабая кислота, а, во-вторых, с тем, что диссоциация соли сильно увеличивает концентрацию аниона в растворе и тем самым в соответствии с принципом Ле Шателье подавляет диссоциацию кислоты, сдвигает равновесие реакции (2) влево. Итак, как поведет себя такой раствор при добавлении кислоты или щелочи?

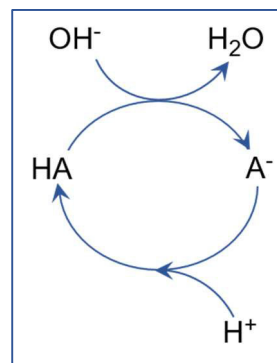
• Поведение ацетатного буфера на пальцах

Добавим к ацетатному буферу некоторое количество сильной кислоты, например, HCl. Такая кислота полностью диссоциирует. Образовавшиеся новые ионы H⁺ нарушат равновесие реакции (2), и в соответствии с принципом Ле Шателье «лишние» H⁺ начнут связываться с анионами соли A_c⁻ (анионов кислоты A_k⁻ гораздо меньше, они как бы не в счет). В результате вместо сильной кислоты в растворе появится примерно такое же количество слабой плохо диссоциирующей кислоты HA. И pH раствора сильно не изменится.

Если же добавить к ацетатному буферу некоторое количество щелочи, то она будет связываться со свободными протонами в растворе, образуя молекулы воды. В результате нарушится равновесие реакции (2), и в соответствии с принципом Ле Шателье диссоциирует дополнительное количество кислоты, и опять pH раствора сильно не изменится.

Буферная емкость имеет свои пределы. Если добавить кислоты больше, чем в буфере растворено соли, или, если добавить щелочи больше, чем в буфере есть кислоты, то буферный раствор не справится, и pH раствора начнет быстро меняться.

Как следует из вышесказанного, в процессе поддержания постоянного значения pH не участвуют ни катионы соли буфера или щелочи, ни анионы добавленной сильной кислоты. Поэтому, события, происходящие в буферном растворе, можно описать такой схемой →



• Какие бывают кислотно-основные буферы? Главные буферы в биологии

Роль кислотно-основного буфера могут играть

- 1) смешанный раствор слабой кислоты и её соли с сильным основанием, примером может служить рассмотренный выше ацетатный буфер;
- 2) смешанный раствор слабого основания и его соли с сильной кислотой, например, раствор NH₄OH + NH₄Cl

Отдельно выделяют белковые буферы, например, гемоглобин может играть роль кислотно-основного буфера. При более детальном рассмотрении белковые буферы сводятся к одному из перечисленных выше типов

Главной буферной системой внутри клеток считают фосфатный буфер



H₂PO₄⁻ в этой системе играет роль кислоты, т.е. донора протонов, а HPO₄²⁻ играет роль соли, т.е. акцептора протонов.

Добавление кислоты приводит к тому, что избыточные H⁺ связываются с HPO₄²⁻, добавление щелочи приводит к тому, анионы гидроксила связывают свободные протоны в растворе, в результате диссоциирует добавочное количество H₂PO₄⁻. Фосфатный буфер хорошо работает в диапазоне 6,1 < pH < 7,7 и поддерживает внутриклеточный pH ≈ 6,9-7,4.

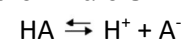
Важной буферной системой в биологии является также бикарбонатный буфер



Роль кислоты в этой системе играет угольная кислота, роль соли – анион HCO₃⁻. Концентрация угольной кислоты находится в равновесии с углекислым газом растворенным в воде. Подробнее о бикарбонатном буфере и буферных свойствах гемоглобина см. в дополнительном материале «Буферные системы крови».

• Силу кислоты можно оценить по ее способности диссоциировать и отдавать протон в раствор.

Рассмотрим диссоциацию уксусной кислоты:



где H⁺ - протон, A⁻ - кислотный остаток, ацетат.

Константа равновесия этой реакции:

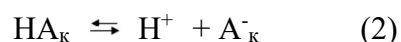
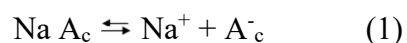
$$K_a = \frac{[\text{H}^+][\text{A}^-]}{[\text{HA}]}$$

Чем сильнее диссоциирована кислота, тем больше такая константа. Поэтому значение K_a используют для описания силы кислоты.

Значения K_a определяются экспериментально для каждой кислоты.

Поведение ацетатного буфера в деталях и формулах для самых любопытных и упорных

Рассмотрим еще раз уравнения (1) и (2)



Существенно, что соль диссоциирует полностью, а кислота – только чуть-чуть. Это позволяет нам сделать следующие приблизительные оценки:

а) целых молекул NaA в растворе практически нет, т.е.

$$[\text{соль}] = [\text{NaA}_c] + [\text{A}^-_c] \approx [\text{A}^-_c];$$

б) подавляющее большинство молекул кислоты находятся в недиссоциированной форме, т.е.

$$[\text{кислота}] = [\text{A}^-_k] + [\text{HA}_k] \approx [\text{HA}_k];$$

в) общая концентрация анионов практически равна концентрации соли, т.е.

$$[\text{A}^-] = [\text{A}^-_c] + [\text{A}^-_k] \approx [\text{A}^-_c] \approx [\text{соль}]$$

Равновесие реакции (1) сильно сдвинуто вправо, а равновесие реакции (2) описывается константой диссоциации уксусной кислоты:

$$K_a = \frac{[\text{H}^+][\text{A}^-]}{[\text{HA}]} = 1,76 \cdot 10^{-5} \text{ моль/л} \quad (3)$$

В этом выражении концентрации всех веществ – это концентрации в положении химического равновесия. Но из описанных выше приближений следует, что равновесную концентрацию HA_к можно с достаточной точностью заменить на общую концентрацию кислоты, а концентрацию аниона – на общую концентрацию соли. Тогда

$$K_a = \frac{[\text{H}^+][\text{соль}]}{[\text{кислота}]} \quad \text{или} \quad [\text{H}^+] = K_a \frac{[\text{кислота}]}{[\text{соль}]}$$

Прологарифмируем обе части уравнения и умножим на -1, получим

$$-\lg[\text{H}^+] = -\lg K_a - \lg \frac{[\text{кислота}]}{[\text{соль}]} \quad \text{или}$$

$$\text{pH} = \text{pKa} + \lg \frac{[\text{соль}]}{[\text{кислота}]} = \text{pKa} + \lg \frac{[\text{акцептор протонов}]}{[\text{донор протонов}]} \quad (4)$$

Используем уравнение (4) для описания поведения ацетатного буфера.

Рассмотрим ацетатный буфер, в котором концентрации соли и кислоты равны, и равны, например, 0,05 моль/л. Исходный pH такого буфера несложно вычислить:

$$[\text{H}^+] = K_a = 1,76 \cdot 10^{-5} \text{ моль/л} \quad \text{тогда} \quad \text{pH} = 4,75$$

Добавим к 1 л этого буфера ничтожно малую каплю раствора, содержащего 0,001 М HCl. Соляная кислота – сильная кислота, полностью диссоциирует в растворе. Количество протонов возрастет, что сдвинет равновесие реакции (2) влево, новые протоны будут связываться с ацетатными ионами (из соли! их гораздо больше!) и образовывать новые недиссоциированные молекулы уксусной кислоты



И тогда

$$[\text{A}^-]_{\text{новая}} = [\text{A}^-]_{\text{старая}} - [\text{H}^+]_{\text{HCl}} \approx [\text{соль}] - [\text{H}^+]_{\text{HCl}} = 0,050 - 0,001 = 0,049 \text{ моль/л}$$

$$[\text{HA}]_{\text{новая}} = [\text{HA}]_{\text{старая}} + [\text{H}^+]_{\text{HCl}} \approx [\text{кислота}] + [\text{H}^+]_{\text{HCl}} = 0,050 + 0,001 = 0,051 \text{ моль/л}$$

Подставим новые значения равновесных концентраций в выражение (3) и получим

$$K_a = \frac{[\text{H}^+] \cdot 0,049}{0,051} = 1,76 \cdot 10^{-5} \text{ моль/л} \Rightarrow [\text{H}^+] = 1,83 \cdot 10^{-5} \text{ моль/л} \Rightarrow \text{pH} = 4,74$$

Значение pH изменилось всего на 0,01 !!

Для сравнения, если бы добавить ровно столько же HCl к чистой воде (pH=7), то получится раствор с pH = lg0,001 = 3, т.е. pH уменьшился бы на 4 единицы!!

А теперь попробуем добавить к исходному ацетатному буферу щелочь, например, ничтожно малую каплю раствора, содержащего 0,001 М KOH. Щелочь диссоциирует с образованием анионов гидроксила, гидроксиды соединяются с протонами, образуя молекулы воды и смещая равновесие реакции (2) вправо, тогда

$$[\text{A}^-]_{\text{новая}} = [\text{A}^-]_{\text{старая}} + [\text{OH}^-]_{\text{KOH}} \approx [\text{соль}] + [\text{OH}^-]_{\text{KOH}} = 0,050 + 0,001 = 0,051 \text{ моль/л}$$

$$[\text{HA}]_{\text{новая}} = [\text{HA}]_{\text{старая}} - [\text{OH}^-]_{\text{KOH}} = 0,050 - 0,001 = 0,049 \text{ моль/л}$$

$$K_a = \frac{[\text{H}^+] \cdot 0,051}{0,049} = 1,76 \cdot 10^{-5} \text{ моль/л} \Rightarrow [\text{H}^+] = 1,69 \cdot 10^{-5} \text{ моль/л} \Rightarrow \text{pH} = 4,77$$

Значение pH изменилось всего на 0,02 !!

Для сравнения при растворении такого же количества щелочи в чистой воде получим раствор с pH = 14 - lg0,001 = 11.

Никаких чудес, только разумные приближения!

• Это уравнение называют еще уравнением Гендерсона - Хассельбаха

3.3.4.4. Ода протону. Катионы водорода чрезвычайно важны для клетки.

- Изменение pH может сильно менять физико-химические свойства белковых молекул

Значение pH определяет величину электрического заряда молекулы белка.

Более четверти аминокислотных остатков в белках имеют химические группы в боковых цепях, способные ионизироваться, т.е. становятся положительно или отрицательно заряженными [ref]

Существование заряженных остатков в молекулах белков важно для жизни клетки, по крайней мере, по трем причинам:

- электростатические взаимодействия между заряженными остатками, а также взаимодействия заряженных остатков с растворителем играют определенную роль в поддержании «правильной» пространственной структуры белков;
- заряженные остатки входят в состав активных центров самых разных ферментов и непосредственно участвуют в акте катализа [ref, ref], подробнее см. дополнительный материал к этому разделу;
- заряженные остатки необходимы для функционально важных контактов белка с другими молекулами, например, для связывания заряженной молекулы субстрата с ферментом, для формирования селективной поры в белковом канале и, наконец, для важнейшего в жизни эукариотической клетки процесса упаковки ДНК, когда положительно заряженные белки гистоны связываются с отрицательно заряженной молекулой ДНК.

Электрический заряд появляется в боковых группах аминокислот в результате присоединения или отщепления протона, или, как говорят, в результате протонирования или депротонирования определенных химических группировок, см. Табл. •. А это значит, что в соответствии с принципом Ле Шателье заряд таких группировок зависит от концентрации ионов водорода, т.е. от pH. Например, увеличим концентрацию протонов в растворе смеси аминокислот, тогда доля молекул аспарагиновой кислоты с отрицательно заряженными боковыми цепями будет уменьшаться, а доля положительно заряженных молекул гистидина будет увеличиваться, см. Табл. •. Поэтому при уменьшении pH общий заряд белковой молекулы может даже поменять знак заряда с отрицательного на положительный, см. рис. ••.

Вот и получается, что изменение pH среды влияет на то, сколько и каких ионизируемых химических групп в белке будут заряжены, а это, в свою очередь, влияет на структуру и функцию белка.

Классическим примером того, как изменение pH влияет на физико-химические свойства белка является история о скисании и створаживании молока•••.

Молоко – уникальная питательная жидкость, которой млекопитающие вскармливают своих детенышей. Уникальная, потому что в ней есть все, что нужно быстро растущему организму новорожденного.

В основе молока – прозрачный слегка опалесцирующий раствор молочного сахара (лактозы), сывороточных белков и некоторых других веществ. Привычный белый непрозрачный цвет молоку придают стабильные в растворе капельки жира 1-5 мкм в диаметре• и еще более мелкие частицы, рыхлые комочки из белков казеинов, остатков фосфорной кислоты и катионов кальция. Это очень важные комочки, или, как их называют, мицеллы. Именно они помогают перенести в организм детеныша фосфаты кальция, необходимые для формирования костей. Задача нетривиальная, т.к. фосфаты кальция плохо растворимы в воде.

Когда человек сообразил, что можно пить молоко животных?

Примерно 8-10 тысяч лет тому назад человек приручил европейского тура (предка современных коров), коз, овец, верблюдов. Так же давно человек научился делать из свежего молока йогурт и простоквашу, творог и сыр, сметану и масло. Эти «изобретения» требовали только наблюдательности, действительно, налитое в кувшин про запас молоко через несколько дней само собой превращается в простоквашу, нагретая на огне простокваша превращается в творог, а, если бурдюк с молоком долго тряса притороченным к седлу, в нем могло сбиться масло. Шли годы, человек придумал, как изготавливать и более изысканные молочные продукты, например, разнообразные сыры. Хорошая современная хозяйка знает, как приготовить нежный творожок: надо добавить в кипящее свежее молоко совсем немного лимонного сока, и молоко свернется.

Но, что именно происходит с молоком при этом, до конца непонятно и сейчас. Ведь всего примерно 150 лет тому назад ученые приступили к изучению молока..

Что же известно сегодня о скисании молока?

Все дело в главных белках молока, белках группы казеинов. Примерно 80% белков коровьего молока составляют белки группы казеинов. Казеины содержат очень много остатков глутаминовой и аспарагиновой кислот, и поэтому в свежем молоке (pH ≈ 6,9) эти белки отрицательно заряжены. Электростатическое отталкивание между одноименно заряженными молекулами препятствуют их слипанию.

Естественный процесс скисания молока вызывается поселившимися в нем молочнокислыми бактериями. Бактерии сбраживают молочный сахар в молочную кислоту. В результате pH молока начинает снижаться, и, соответственно, растет доля незаряженных остатков глутаминовой и аспарагиновой кислот. Примерно при pH=4,6-4,7 суммарный заряд молекул казеина становится равным нулю, и молекулы начинают быстро слипаться. Казеины слипаются в структуру, похожую на ячеистую сетку, в ячейках которой скапливается жидкость. Получаются гелеобразные простокваша или йогурт. Если же отжать сыворотку, то получится творог, который представляет собой почти чистые кальциевые соли казеинов. Можно и искусственно вызвать сворачивание, коагуляцию казеина, например, добавив в кипящее молоко немного лимонной кислоты.

Картинка??

Таблица •. Что происходит в боковых группах полярных аминокислот, когда те приобретают электрический заряд?

Аминокислота	Как происходит ионизация боковой цепи?	pKa **
аспарагиновая и глутаминовая кислоты	$-COOH \rightleftharpoons -COO^- + H^+$	3,7 4,1
гистидин	$-CH_2 \begin{matrix} \diagup \\ NH \\ \diagdown \end{matrix} \rightleftharpoons -CH_2 \begin{matrix} \diagup \\ N \\ \diagdown \end{matrix} + H^+$	6,0
цистеин	$-SH \rightleftharpoons -S^- + H^+$	8,1
тирозин	$\text{C}_6\text{H}_4-OH \rightleftharpoons \text{C}_6\text{H}_4-O^- + H^+$	10,1
лизин	$-NH_3^+ \rightleftharpoons -NH_2 + H^+$	10,7
аргинин	$\begin{matrix} H \\ \\ -N-C \begin{matrix} \diagup \\ NH_2 \\ \diagdown \end{matrix} \end{matrix} \rightleftharpoons \begin{matrix} H \\ \\ -N-C \begin{matrix} \diagup \\ NH \\ \diagdown \end{matrix} \end{matrix} + H^+$	12,1

** Приведены значения pKa боковых групп аминокислот в растворе [1, 2].

pKa – это значение pH, при котором концентрация молекул кислоты и ее депротонированной формы равны. Иными словами, это значение pH, при котором в каждый момент времени примерно половина молекул несет электрический заряд. Подробнее см. Вставку X

Теоретически в сильно щелочной среде спиртовая группа боковой цепи серина также ведет себя как кислота (pKa > 13 [3]) а в сильно кислых средах атомы азота амидной группы аспарагина и глутамин, а также атомы азота индольной группы триптофана могут быть протонированы (pKa < 1,5). Но это чересчур экзотические ситуации для клетки.

pKa аминокислотных остатков, расположенных на поверхности белка (а именно так расположены большинство полярных остатков), не сильно отличаются от приведенных в таблице, не более, чем на 1-2 единицы. А вот pKa функционально важных остатков цистеина, гистидина в активных центрах некоторых белков могут отличаться очень сильно, на 4-6 единиц [T. K. Harris, G. J. Turner IUBMB Life, 53: 85-98, 2002]

Рис. ••



Приведены теоретические зависимости суммарного заряда боковых цепей аминокислотных остатков в 3-х белках от pH среды

В подобных расчетах делается допущение, что боковые группы в аминокислотных остатках белка ионизируются ровно так же, как в отдельных аминокислотах. В общем случае, такое утверждение не верно, см. примечание к табл. •. Но вносимые искажения имеют количественный характер и не меняют принципиально вид функции.

В качестве примера выбраны 3 белка человека

1 – альфа-амилаза слюны, пищеварительный фермент, катализирующий гидролиз крахмала; в результате из крахмала получаются ди- и трисахариды, мальтоза и мальтотриоза;

2 – гистон H2A, один из положительно заряженных белков нуклеосом, белковых «катушек», на которые наматываются нити ДНК при их упаковке

3 – пепсин А-2, фермент желудочного сока, катализирующий гидролиз белков; в результате такого гидролиза белок расщепляется на простые пептиды и свободные аминокислоты

•••

Тысячелетия употребления молока в пищу не прошли даром для человека. Мы ощущаем как жир любую пищу, если ее частицы имеют размер 1-5 мкм. На этом основано производство обезжиренного мороженого, в котором масло заменено на белковые частицы такого же размера. [1]