

NASTAVNI TEKST

pH i puferi

doc. dr. sc. Jasna Lovrić, Zavod za kemiju i biokemiju,
Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu

Ilustracije: Slaven Abdović

"Life is a struggle, not against the Money Power, not against malicious animal magnetism, but against hydrogen ions"

H. L. Mencken

Ako gospodin Mencken nije bio niti biokemičar, niti fiziolog, znao je kolika je važnost vodikovog iona za održavanje života. Organizam je vodena sredina u kojoj su enzimski sustavi djelotvorni samo kod optimalne koncentracije vodikovih iona i već samo mala odstupanja mogu dovesti do značajnih promjena u njihovoj aktivnosti. Unatoč tome, ili baš zato što se u organizmu nalazi u izrazito malim koncentracijama u usporedbi s nekim drugim za život neophodnim ionima (tablica 1.), važnost H^+ je neprocjenjiva. Vodikovi ioni se neprekidno oslobađaju i/ili vežu tijekom mnogobrojnih fizioloških procesa. I sama voda je izvor H^+ , no zbog vrlo slabe ionizacije ($K_a = 1,8 \times 10^{-16}$ mol/L pri 25°C) koncentracija H^+ u čistoj vodi iznosi samo 1×10^{-7} mol/L, što je zanemarivo malo u usporedbi s koncentracijom neioniziranih molekula vode (55,3 mol/L). Ako bi iz 1 L vode nasumično uklanjali 10 čestica (H_2O , OH^- ili H^+) u sekundi, trebalo bi nam 2 godine neprekidnog rada da bi naišli na samo jedan H^+ . Proces ionizacije vode u ravnoteži definiran je konstantom ionizacije, K_a .

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

Množenjem K_a s ravnotežnom koncentracijom vode dobiva se nova konstanta koju nazivamo ionski produkt vode, K_w , i koja pri 25° C iznosi:

$$K_w = K_a [H_2O] = [H^+][OH^-] = 1 \times 10^{-14} \text{ mol}^2/\text{l}^2,$$

pa vrijedi $[H^+] = [OH^-] = 10^{-7}$ mol/L

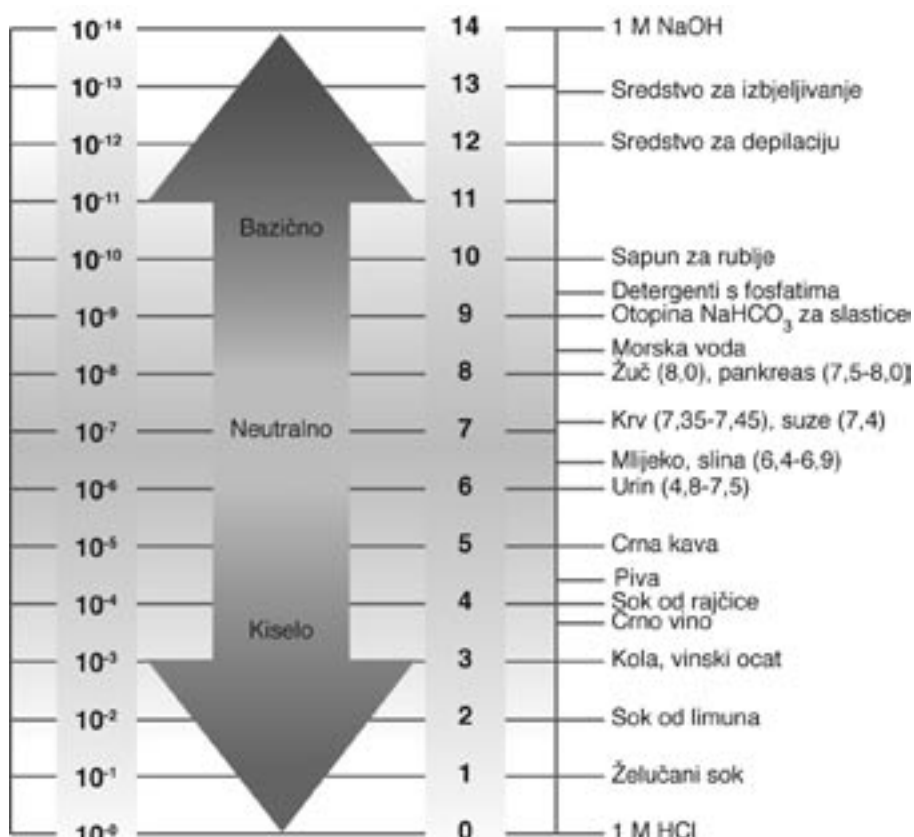
Kako su $[H^+]$ i $[OH^-]$ vrlo male vrijednosti, uvrijezilo se izražavanje kiselosti

kao negativnog logaritma $[H^+]$ ili $[OH^-]$, odnosno kao pH ili pOH vrijednost ($pH = -\log[H^+]$). Stoga se ionski produkt vode može izraziti kao $pH + pOH = 14$, odnosno u čistoj vodi $pH = pOH = 7$.

Iz izraza za K_w jasno je da porast $[H^+]$ u otopini uzrokuje smanjenje $[OH^-]$ i obrnuto. Budući da je pH skala logaritamska (a ne aritmetička), male razlike u pH vrijednosti odgovaraju velikim razlikama u koncentraciji vodikovih iona (slika 1.). Ako se neke dvije otopine razlikuju za samo 1 pH jedinicu, tada se koncentracije H^+ iona u tim otopinama razlikuju 10 puta. Tako je u voćnom soku pH 3,4, H^+ 10 000 puta veća od koncentracije H^+ u krvi pri pH 7,4.

Gotovo su svi biološki procesi ovisni o pH vrijednosti te se može reći da metaboličke reakcije teku povoljno samo kod

određenog i nepromjenljivog pH. Enzimi, kao i druge biološki važne molekule, posjeduju ionizabilne funkcionalne skupine s karakteristikama slabih kiselina ili baza (pK vrijednosti). Protonirane amino- i karboksilne skupine aminokiselina, kao i fosfatne skupine u nukleotidima (npr. u ATP-u), djeluju kao slabe kiseline te je njihov stupanj ionizacije direktno ovisan o pH medija u kojem se nalaze. Treba imati na umu da su ionske interakcije ključne u stabilizaciji molekula proteina kao i u vezanju supstrata za odgovarajući enzim. Živi organizmi zahtijevaju specifični i konstantni pH u svim tjelesnim tekućinama održavajući biomolekule u njihovom optimalnom ionskom stanju. Organizam je razvio regulacijske sustave za održavanje pH unutar uskih granica. Tako se pH krvi održava između 7,35 i 7,45. Mala promje-



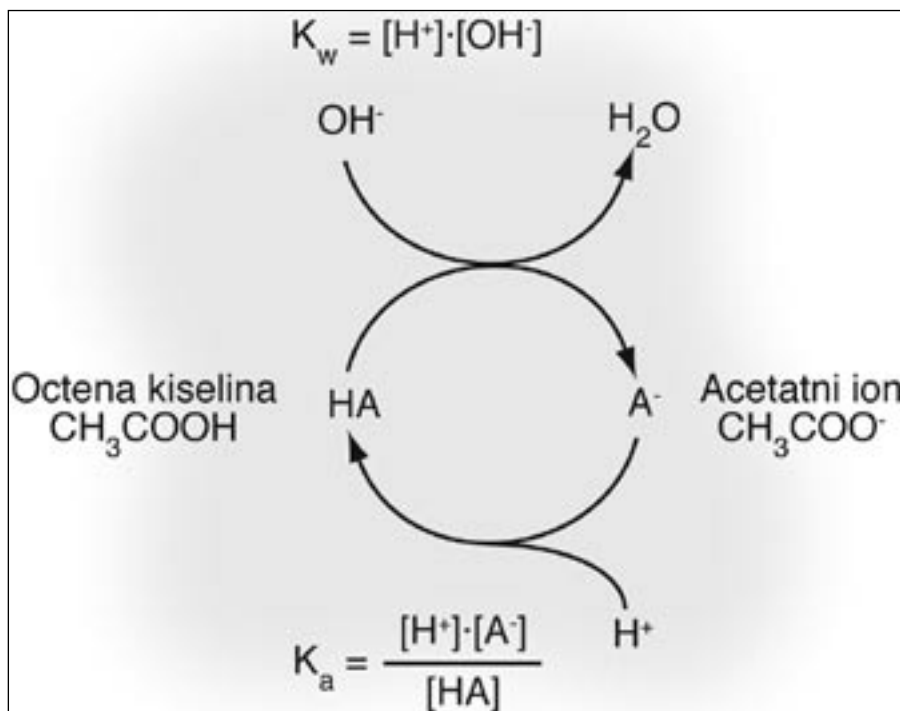
Slika 1. Skala pH vrijednosti nekih vodenih otopina

na pH od 7,35 ($[H^+] = 4,47 \times 10^{-8} \text{ mol/L}$) na 7,45 ($[H^+] = 3,55 \times 10^{-8} \text{ mol/L}$) predstavlja promjenu $[H^+]$ u krvi od oko 20%! Mnogi metabolički poremećaji imaju za posljedicu promjenu u vrijednosti pH.

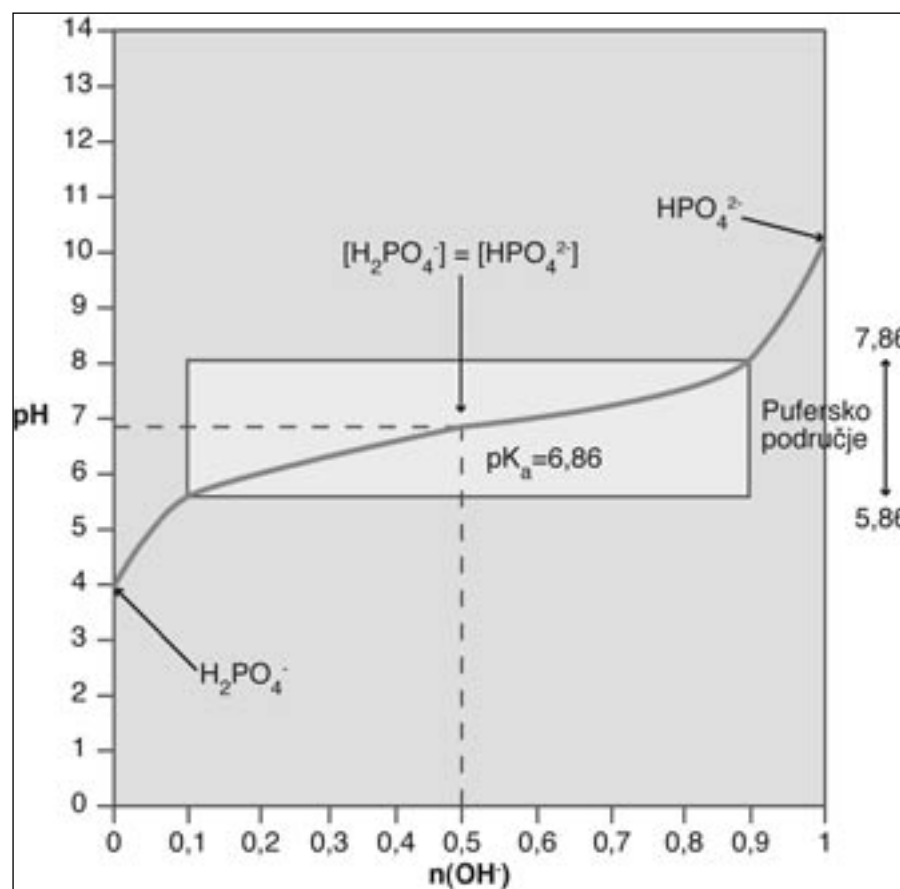
Acidoza je stanje organizma kada pH krvi padne ispod 7,35, a može biti respiracijska i metabolička. Glavni uzroci metaboličke acidoze su: povećano stvaranje metaboličkih kiselina (mliječne kiseline) ili njihovo nedovoljno izlučivanje preko bubrega, dugotrajno gladovanje (stvaranje ketonskih tijela), gubitak baza iz tjelesnih tekućina, uzimanje određenih lijekova (salicilati) ili hrane itd. Acidoza se javlja i u nekim metaboličkim bolestima kao što je npr. *diabetes mellitus*. Respiracijska acidoza je posljedica poremećaja disanja a često se javlja u patološkim stanjima u kojima su oštećeni dišni centri (uznapredovali kronični bronhitis). Kada se vrijednost pH krvi spusti ispod 7, središnji živčani sustav ulazi u stanje depresije što uzrokuje komu, a može nastupiti i smrt.

Alkaloza je stanje u kojem se pH vrijednost krvi poveća iznad 7,45, a kao i acidoza, može biti metabolička i respiracijska. Pojačani fizički naponi ili emocionalni stres uzrokuju hiperventilaciju koja vodi u respiracijsku alkalozu. Metabolička alkaloz nastaje uslijed dugotrajnog povraćanja (izbacivanje HCl iz želuca), kod uzimanja bazičnih lijekova (natrijevog bikarbonata), trovanja cijanidima, pojačanog lučenja aldosterona, itd., što dovodi do prekomjernog pobuđivanja CZS, te nastupa spazam mišića. Općenito vrijedi da promjena pH u organizmu za **0,4 pH** jedinice u bilo kojem smjeru može imati fatalne posljedice.

Iz svih navedenih razloga jasno je da u organizmu postoje vrlo djelotvorni sustavi koji se opiru promjeni koncentracije vodikovih iona - puferski sustavi. Osnovno svojstvo i svrha pufera je zaštita otopine od unutarnjih i vanjskih utjecaja koji bi proizveli promjenu pH. Oni ublažavaju efekte dodatka jake kiseline ili baze, a nastale promjene pH su značajno manje od onih do kojih bi došlo kada otopina ne bi bila puferirana. **PUFERI** su dvokomponentni sustavi u ravnoteži koji se sastoje od smjese slabih kiselina i njihovih soli ili slabih baza i njihovih soli. Tako se npr. acetatni puferski sustav sastoji od octene kiseline i natrijevog acetata ili amonijakalni puferski sustav od amonijevog hidroksida i amonijevog klorida. Prema Brönstedovoj teoriji kiselosti, puferi su smjese slabe kise-



Slika 2. Mehanizam djelovanja pufera na primjeru octena kiselina/acetatni ion

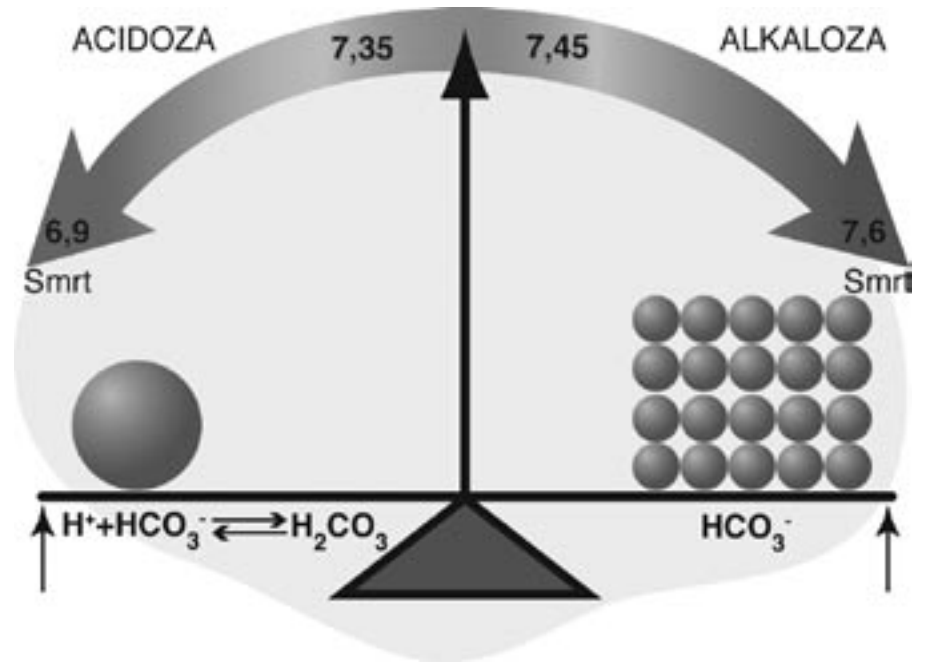


Slika 3. Titracijska krivulja dihidrogenfosfata, $H_2PO_4^-$, s jakim bazom

line (octena kiselina, CH_3COOH) i njene konjugirane baze (acetatni ioni, CH_3COO^-), odnosno smjese slabe baze (amonijev hidroksid, NH_4OH) i njene konjugirane kiseline (amonijev ion, NH_4^+). Homeostazu vodikovih iona održava konjugirani par kiselina-baza dok ioni natrija odnosno kloridni ioni nisu bitni za održavanje pH vrijednosti! Karakteristika slabe kiseline je da u vodenoj otopini slabo ionizira, što znači da se u ravnotežnom stanju kiselina nalazi pretežito u neioniziranom obliku (proton donor) za razliku od soli koja je u pravilu potpuno disocirana. Upravo zbog potpune disocijacije, pufersku sol čine anioni koji djeluju kao bazna komponenta pufera (proton akceptor). U vodenoj je otopini umnožak $K_a \times K_b$ za svaki konjugirani par kiselina-baza jednak ionskom produktu vode K_w .

Slika 2. prikazuje mehanizam djelovanja pufera na primjeru octena kiselina/acetatni ion. Sposobnost pufera da veže dodane H^+ ili OH^- ione može se objasniti *Le Châtelierovim* načelom koje kaže da svaka promjena koja se izvodi na sustavu u ravnoteži dovodi do takovog pomaka ravnoteže kojim se sustav opire vanjskom nasilju. Konkretno to znači da proton donor, octena kiselina (HA) koja je u vodenoj otopini praktički neionizirana, sadržava rezervnu količinu H^+ iona, koji mogu neutralizirati višak OH^- tvoreći H_2O . Do neutralizacije dolazi jer se sustav opire promjeni ravnoteže koja je nastala unosom OH^- . Istovremeno s reakcijom neutralizacije teći će i dodatna ionizacija octene kiseline da bi se u sustavu nadoknadili H^+ ioni utrošeni neutralizacijom s OH^- ionima. Ako u acetani pufer dodamo jaku kiselinu, također ne dolazi do osjetnog povećanja pH vrijednosti jer će konjugirana baza, CH_3COO^- , vezati H^+ te će nastati molekula octene kiseline. Općenito možemo reći da je djelovanje pufera posljedica dviju reverzibilnih reakcija koje teku istovremeno da bi se održale ravnoteže koje su određene konstantama K_w i K_a .

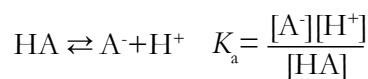
Svaki puferski sustav ima područje djelovanja u kojem je najučinkovitiji. Područje djelovanja pufera određuje se iz titracijske krivulje puferske kiseline s jakim bazom. Na slici 3. prikazana je krivulja titracije dihidrogen fosfata, H_2PO_4^- , kisele komponente fosfatnog pufera s jakim bazom. Postupnim dodavanjem OH^- troši se H_2PO_4^- a nastaje HPO_4^{2-} , bazična komponenta. Kada je upravo



Slika 4. Karbonatni puferski sustav-sastav i omjeri ravnotežnih koncentracija komponenti pufera; promjena omjera koncentracija komponenti pufera vodi u acidozu ili alkalozu

polovica kiseline neutralizirana, koncentracije kiseline i konjugirane baze postaju jednake, odnosno pH postaje jednak $\text{p}K_a$. U točki ekvivalencije, kada je sva kiselina neutralizirana, konjugirana baza je jedina komponenta pufera. Pufer je najučinkovitiji kada sadržava obje komponente pufera u jednakoj količini, odnosno kada je pH jednak $\text{p}K_a$. Za fosfatni pufer to je $\text{p}K_a = 6,86$. Općenito se smatra da je područje djelovanja pufera jednako $\text{p}K_a \pm 1$. Prema tome, fosfatni pufer je djelotvoran samo u području pH od 5,86 do 7,86. Fosfatni pufer je odgovoran za regulaciju pH unutar stanice gdje je koncentracija fosfata višestruko veća nego u izvanstaničnom prostoru. U krvi, omjer koncentracija $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$ iznosi 1/4.

Za računanje pH vrijednosti puferskih sustava koristi se *Henderson-Hasselbalchova jednadžba*. Za kiselu pufer se navedena jednadžba izvodi iz izraza za konstantu ionizacije slabe kiseline, K_a ,



iz koje se zatim može izraziti $[\text{H}^+]$.

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

Logaritmiranjem jednadžbe i množenjem s -1 dobiva se izraz:

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

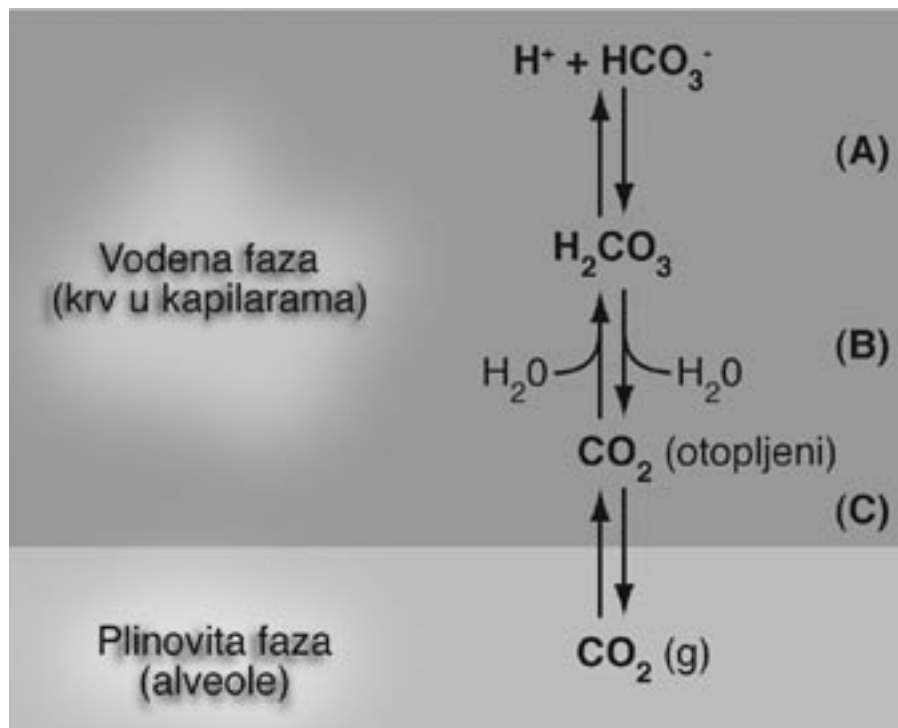
Budući da je u puferskoj smjesi kiselina vrlo slabo ionizirana, a sol gotovo potpuno disocirana, jasno je da praktički svi anioni potječu iz puferske soli, te se koncentracija aniona može zamijeniti koncentracijom soli. Henderson-Hasselbalchova jednadžba se stoga najčešće izražava kao:

$$\text{pH} = \text{p}K_a + \log \frac{[\text{sol}]}{[\text{kiselina}]}$$

Iz jednadžbe je vidljivo da pH pufera direktno ovisi o vrijednosti konstante ionizacije slabe kiseline ili baze, kao i o odnosu koncentracija kisele i bazične komponente pufera u otopini.

Henderson-Hasselbalchova jednadžba pokazuje da je $\text{p}K$ kiseline brojačno jednak pH otopine kada su molarne koncentracije puferske kiseline i njene konjugirane baze jednake (slika 3).

$$\text{pH} = \text{p}K_a + \log 1,0 = \text{p}K_a + 0 = \text{p}K_a$$



Slika 5. Karbonatni puferi sustav je otvoreni sustav koji uključuje tri reakcije ravnoteže između plinovitog CO_2 u plućima i HCO_3^- u krvnoj plazmi

Iz jednadžbe je također vidljivo da se razrjeđivanjem pufera pH praktički ne mijenja jer se razrjeđivanjem ne mijenja ni odnos koncentracija kisele i bazične komponente.

Sposobnost pufera da održava nepromijenjenu pH vrijednost izražava se kapacitetom. **Kapacitet pufera** je definiran količinom jake baze odnosno jake kiseline koja dodana u 1 L pufera izaziva promjenu pH za 1 pH jedinicu. Stoga se kapacitet pufera može izračunati prema izrazu:

$$C_{\text{pufera}} = \frac{\Delta n(\text{baze})}{V_{\text{(pufera)}} \Delta pH} = - \frac{\Delta n(\text{kiseline})}{V_{\text{(pufera)}} \Delta pH}$$

a ovisi o koncentraciji i kemijskom sastavu pufera.

Konstantni pH tjelesnih tekućina održava se putem tri puferi sustava: proteinskog, karbonatnog i fosfatnog. Citoplazma sadrži veliku količinu proteina pa je puferi djelovanje proteina najveće – čini oko 75% ukupnog puferi djelovanja u organizmu. Već je naglašeno da protonirane amino- i karboksilne skupine aminokiseline djeluju kao slabe kiseline, npr. histidinski bočni ogranci ($pK_a=6,0$) mogu puferirati u području koje je blisko neutralnom. I hemoglobin ima puferi djelovanje. Hemoglobinski pufer se sastoji od dva sustava: hemoglobina, Hb/HHb i oksihemoglobina, $HbO_2/HHbO_2$. Hemoglobin je važan pufer u eritrocitima.

Najvažniji puferi sustav u izvanstaničnoj tekućini je karbonatni. Karbonatni pufer čine karbonatna kiselina (otopljeni CO_2) i njena konjugirana baza, hidrogenkarbonatni ion (slika 4.). To je otvoreni puferi sustav jer je CO_2 u plućima u ravnoteži s CO_2 otopljenim u krvi. Obzirom da se koncentracija otopljenog CO_2 u krvi drastično mijenja s brzinom disanja, karbonatni pufer je praktički u ravnoteži s neiscrpnim rezervama CO_2 . Taj sustav uključuje tri reakcije ravnoteže između plinovitog CO_2 u plućima i hidrogenkarbonata u krvnoj plazmi (slika 5.)



Kada H^+ ulazi u krvotok, HCO_3^- vežu H^+ stvarajući karbonatnu kiselinu, H_2CO_3 (A) koja spontano prelazi u CO_2 i H_2O . Pojačano stvaranje CO_2 (B) povećava tlak CO_2 u plućnim alveolama (C) što dovodi do pojačanog izdisanja CO_2 . Unošenjem jake baze, pH krvi raste, pa reakcije teku u suprotnom smjeru. OH^- ioni vežu slobodne H^+ ione, što uzrokuje dodatnu ionizaciju karbonatne kiseline pa se istovremeno povećava količina HCO_3^- iona. Zbog ionizacije će se smanjivati koncentracija karbonatne kiseline pa dodatna količina CO_2 reagira s H_2O dajući nove molekule H_2CO_3 , a to znači da se količina CO_2 u krvi smanjuje. Brzina disanja se vrlo brzo prilagođava toj ravnoteži da bi se pH krvi održao konstantnim.

Kako je moguće da je karbonatni pufer (uz hemoglobin) ipak učinkovit u održavanju pH krvi na 7,4 kada je pK_a karbonatne kiseline 6,1? Dobru učinkovitost puferiranja karbonatni pufer postiže zahvaljujući tome što kao otvoreni puferi sustav može održavati koncentracije $[HCO_3^-]/[CO_2]$ u omjeru 20/1 (slika 4.).

U organizmu se kiselo-bazna ravnoteža primarno kontrolira preko dva sustava organa: pluća (CO_2) i bubrega (HCO_3^-). Henderson-Hasselbalchova jednadžba, u kliničkoj praksi, poprima oblik:

$$pH = pK_a + \log \frac{\text{bubrezi}}{\text{pluća}}$$

$$pH = 6,1 + \log \frac{[HCO_3^-]}{S \cdot pCO_2}$$

gdje je S konstanta topljivosti CO_2 u krvi pri određenoj temperaturi.

Kiselo-baznu ravnotežu u organizmu reguliraju 3 sustava: kemijski puferi sustavi tjelesnih tekućina (trenutačno djeluju u sprječavanju promjene $[H^+]$), dišni sustav (disanjem unutar nekoliko minuta izbacuje se CO_2) i bubrezi (najsnažniji regulacijski sustav čije se puferiranje mjeri u satima ili čak danima). Djelovanje svih puferi sustava u organizmu je međusobno ovisno jer su svi puferi u zajedničkoj otopini u ravnoteži s istom koncentracijom **vodikovih iona - načelo izohondričnosti**. Poremećaji u radu jednog puferi sustava odražavaju se na rad svih ostalih.

Tablica 1. Koncentracije nekih iona u plazmi

Ion	nmol/L
H^+	40
K^+	4 000 000
Ca^{2+}	2 500 000
Mg^{2+}	1 000 000
Na^+	140 000 000

Dodatna literatura:

- Nelson DL, Cox MM. Lehninger Principles of Biochemistry Worth Publishers, New York 2000; str. 95-105.
- McKee T, McKee JR. Biochemistry WCB McGraw-Hill USA, 1996; str. 45-53.
- Chang R. Chemistry, sixth ed. WCB McGraw-Hill USA, 1998; str. 649-665.
- <http://www.els.net> pH and Buffers - Nature Encyclopedia of Life Science, 2001. <http://www.gasnet.org/acid-base/AB>
- <http://www.gasnet.org/acid-base/AB>
- <http://www.mtsinai.org/pulmonary/book/physiology>