

О.С. Чернишова, Х. Абдульрахман, О.П. Бойченко, Л.П. Логінова
Харківський національний університет імені В.Н.Каразіна,
кафедра хімічної метрології

ВПЛИВ ЛІОФІЛЬНИХ НАНОРОЗМІРНИХ ДИСПЕРСІЙ РІЗНОГО ЗАРЯДНОГО ТИПУ НА ПРОТОЛІТИЧНІ ВЛАСТИВОСТІ ДЕЯКИХ АМІНОКИСЛОТ ТА ЇХ ДИПЕПТИДІВ

© Чернишова О.С., Абдульрахман Х., Бойченко О.П., Логінова Л.П., 2011

Вперше вивчено вплив міцелярних розчинів поверхнево-активних речовин (аніонного додецилсульфата натрію, катіонного цетилпіридиній хлориду і неіонногенного Брідж 35) на константи дисоціації вільних амінокислот (α -аланіну і валіну) і дипептидів, сформованих з них.

Ключові слова: ліофільні нанорозмірні дисперсії, константи дисоціації, амінокислоти, дипептиди.

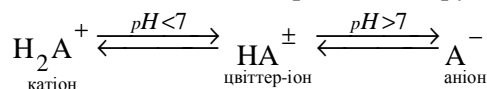
For the first time the effect of micellar solutions of surfactants (anionic sodium dodecylsulfate, cationic cetylpyridinium chloride, nonionic Brij 35) on the dissociation constants of free amino acids (α -alanine and valine) and dipeptides formed by this amino acids have been investigated.

Key words: lyophilic nanosized dispersions, the dissociation constants, amino acids, dipeptides.

Вступ. Амінокислоти займають особливе місце серед біологічно важливих речовин. Вони не мають собі рівних за різноманітністю та спектром біологічних функцій, що виконують, та беруть участь у багатьох процесах життєдіяльності [1].

Дослідження властивостей амінокислот у водних та змішаних водно-органічних розчинниках має достатньо довгу історію, хоча і тепер з'являються роботи, присвячені уточненню та/або перевизначенню констант дисоціації амінокислот у різних середовищах [2–5]. З іншого боку, актуальним є вивчення констант дисоціації у біологічних системах, оскільки це сприятиме розумінню механізму структурної організації білків та пептидів. Але дані, отримані у водних та змішаних водно-органічних розчинах, не відображають специфічну поведінку реагенту в біологічних системах, що є мікрогетерогенними середовищами [6]. У присутності біологічних мікроагрегатів кількісні характеристики хімічних рівноваг можуть змінюватися порівняно з водними розчинами. Адекватнішими моделями біологічних систем – біоміметиками – прийнято вважати організовані розчини, в яких є області як для електростатичних, так і гідрофобних взаємодій із розчиненими речовинами [6].

Проблема дослідження гідрофобності амінокислот, яку пов'язують зі здатністю до проникнення крізь біологічні мембрани, пов'язана з їх цвіттер-іонною структурою:



Наявність зарядних центрів у молекулах амінокислот не дає змогу використати звичайні двофазні системи, наприклад, октанол-вода, для оцінювання їх гідрофобності.

Наступним ступенем організації амінокислот є дипептиди. Деякі з них виявляють значну біологічну активність та регулюють важливі біологічні функції [1]. Крім того, пептиди за рівнем організації стоять між високомолекулярними білками та амінокислотами, а тому цікаво порівняти вплив ліофільних нанорозмірних дисперсій різного зарядного типу на протолітичні властивості амінокислот та утворених з них дипептидів. Це дасть змогу зробити висновки про можливість використання даних про протолітичні рівноваги амінокислот для прогнозування впливу самоорганізованих середовищ на протолітичні рівноваги складніших молекул.

Експериментальна частина. Методом рН-метричного титрування у водних і міцелярних розчинах цетилпіридиній хлориду (ЦПХ), *n*-додецилсульфату натрію (ДСН) і Бридж 35 визначали константи протонування α -аланіну, валіну, L- α -аланіл-1- α -аланіну, DL- α -аланіл-DL- α -валіну.

Матеріали та реагенти. Для приготування розчинів використовували вільну від карбонатів бідистильовану воду, гідроксид і хлорид натрію кваліфікації х.ч. Комерційні препарати цетилпіридиній хлориду моногідрату $C_{21}H_{38}NCl \cdot H_2O$ (вміст основної речовини 99.0-101.0 %) і Бридж 35 $(C_{12}H_{25}O)_2C_{12}H_{26}O$ виробництва фірми Merck (Германія) використовували без додаткового очищення. Комерційний препарат *n*-додецилсульфату натрію $C_{12}H_{25}OSO_3Na$ з масовою часткою основної речовини 97 % (AppliChem) додатково очищували перекристалізацією з ізопропілового спирту.

У всіх випадках концентрація ПАР в міцелярних розчинах складала 0.10 моль/л. Іонну силу 0.10 моль/л у водних розчинах і в міцелярних розчинах Бридж 35 створювали добавками NaCl. В міцелярні розчини іонних ПАР (ЦПХ і ДСН) не вводили додаткових електролітів, що підтримують іонну силу. Хлорид натрію обрано в якості фонового електроліту, щоб наблизити, наскільки можливо, природу сольового фону у водному розчині і міцелярному середовищі.

В якості титрантів використовували розчини хлороводневої кислоти і гідроксиду натрію. Розчини NaOH, вільні від карбонатів, готували за відомою методикою з насиченого розчину NaOH [7] і стандартизували за наважками адипінової кислоти з індикатором фенолфталеїном. Розчини HCl готували розведенням концентрованого розчину HCl кваліфікації х.ч. і стандартизували за наважками карбонату натрію.

Концентрація досліджуваної речовини в розчині, що титрується, складала $1.0 \cdot 10^{-2}$ моль/л. Об'єм розчину, що титрують, дорівнював 20 мл; криві титрування мали 20 точок в області рН від 2.5 до 10. Для розрахунків використовували дані при ступені відтитрованості речовини за кожним ступенем від 20 до 80 %.

Потенціометричні дослідження виконані при температурі $(25.0 \pm 0.1)^\circ C$. Потенціометрична ячейка складалась із скляного електроду ЭСЛ-63-07 та напівелементу порівняння ЭВЛ-1М3. При дослідженні протолітичних рівноваг в міцелярних розчинах ДСН вводили додаткове рідинне сполучення у вигляді сольового містка, заповненого розчином 1 моль/л NH_4NO_3 в агар-агаровім гелі, щоб уникнути утворення малорозчинної солі додецилсульфату калію. Ячейку градували за стандартними буферними розчинами з рН 1.68, 4.01, 6.86 і 9.18. Значення електрорушійної сили (е.р.с.) вимірювали за компенсаційної схемою (потенціометр Р 307, нуль-інструмент рН-метр рН-121), невизначеність вимірювань е.р.с. складала 0.2 мВ.

Теоретична частина. У водних розчинах ПАР за концентрації вищої від критичної концентрації міцелоутворення утворюються ліофільні нанорозмірні агрегати, що складаються з гідрофобного ядра та гідрофільної поверхні. Отже, міцелярні розчини ПАР є системами гетерогенними на нанорівні. Динамічні агрегати ПАР утворюють особливу, так звану псевдофазу, що хоча й не може бути механічно відділена від водної фази, однак виявляє властивості, що значно відрізняються від властивостей водної фази. В присутності міцел ПАР відбувається зміна протолітичних властивостей речовин, яка обумовлена процесами розподілу протолітичних форм між водною фазою та псевдофазою, аналогічного розподілу у

двофазних системах рідина-рідина. На рис. 1 схематично наведено рівноваги, що мають місце для амінокислоти в міцелярних розчинах ПАР.

Для опису рівноваг у міцелярних розчинах ПАР застосовують концепцію «явних» (apparent) констант дисоціації, K_a^{app} [8]. При їх визначенні виміряні значення рН відносять до об'єму водної фази, а концентрації протонованої та депротонованої форми є сумарною концентрацією кожної з форм і складаються з рівноважних концентрацій форми в об'ємі водної фази та в міцелярній

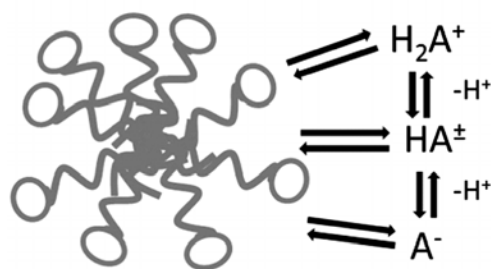


Рис. 1. Схема дисоціації амінокислоти та зв'язування протолітичних форм міцелами ПАР

псевдофазі. Всі концентрації при цьому відносять до загального об'єму розчину. Наприклад, для першої константи дисоціації амінокислоти можна записати наступне рівняння:

$$pK_{al}^{app} = pH_w + \lg \frac{[H_2A^+]_w + [H_2A^+]_m}{[HA^\pm]_w + [HA^\pm]_m} \quad (1)$$

Зв'язування речовин міцелярною псевдофазою характеризують константами зв'язування. Так, зв'язування спряжених форм HA^\pm та H_2A^+ міцелами можна подати рівняннями:



де $H_2A^+ Mic$ та $HA^\pm Mic$ міцелярно-зв'язані протолітичні форми. Рівновагам (2) та (3) відповідають константи зв'язування K_{b,H_2A^+} та K_{b,HA^\pm} . Визначення останніх, на жаль, є доволі складним завданням та потребує значної кількості експериментальних даних, наприклад, щодо впливу концентрації ПАР на значення «уявних» констант дисоціації, або на спектри поглинання. Втім, для порівняння зв'язування органічних речовин ліофільними дисперсіями можна використовувати значення так званого ефекту середовища, ΔpK_a , що розраховується як різниця між показником «уявної» константи дисоціації та значенням pK_a у водному середовищі з близькою іонною силою.

Результати та обговорення. На рис. 2 наведено графічні формули досліджених у роботі дипептидів. Як і амінокислоти, кожен з дипептидів має кінцеву карбоксильну групу та кінцеву аміногрупу, що здатні вступати в кислотно-основні рівноваги. У випадку L- α -аланіл-l- α -аланіну обидві групи відповідають залишкам α -аланіну, а для DL- α -аланіл-DL- α -валіну аміногрупа відповідає залишку аланіну, а карбоксильна група – залишку валіну.

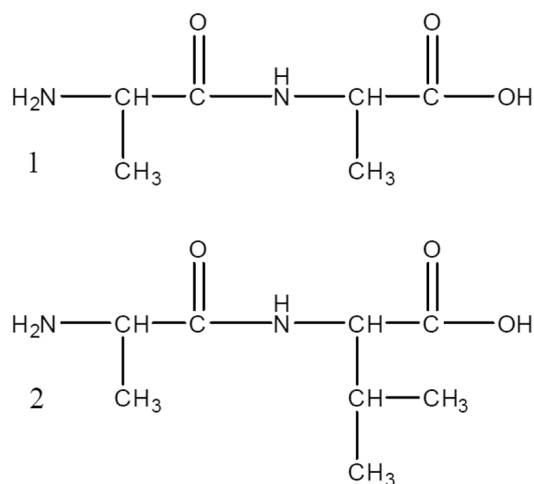


Рис. 2. Графічні формули L- α -аланіл-l- α -аланіну (1) та DL- α -аланіл-DL- α -валіну (2)

Вплив міцелярного середовища на константи дисоціації вільних амінокислот. В табл. 1 наведено результати визначення показників констант дисоціації вільних амінокислот у водному середовищі з іонною силою 0.1 М та міцелярних розчинах ПАР різного зарядного типу: катіонної – ЦПХ, аніонної – ДСН, неіонної – Бридж 35.

На значення pK_{al} , що відповідає дисоціації карбоксильної групи, найбільшим виявився вплив міцелярних розчинів аніонної ПАР – ДСН. Порівнюючи вплив міцел ДСН на значення pK_{al} аланіну та валіну, можна стверджувати, що валін сильніше зв'язується міцелами ДСН, ніж аланін, що проявляється в більшому значенні ΔpK_{al} для нього. Це, найвирогідніше, пов'язано з наявністю розгалуженого гідрофобного замісника в боковому ланцюзі валіну. Аналогічно міцелярним розчинам ДСН, силу амінокислот при дисоціації за першим ступенем зменшують і розчини

Бридж 35. Однак вплив міцелярного середовища Бридж 35 на значення pK_{a1} аланіну та валіну приблизно однаковий.

Таблиця 1

Значення показників змішаних (у водному середовищі) та «уявних» (у міцелярних розчинах ПАР) констант дисоціації амінокислот

| Середовище | | α -Аланін | Валін |
|--------------------------------|-----------|------------------|-----------------|
| Водний розчин, $I=0.1$ М, NaCl | pK_{a2} | 9.52 ± 0.02 | 9.31 ± 0.01 |
| | pK_{a1} | 2.62 ± 0.03 | 2.20 ± 0.03 |
| Міцелярний розчин ДСН | pK_{a2} | 9.45 ± 0.02 | 9.28 ± 0.02 |
| | pK_{a1} | 3.51 ± 0.02 | 3.71 ± 0.02 |
| Міцелярний розчин ЦПХ | pK_{a2} | 9.48 ± 0.08 | 9.31 ± 0.02 |
| | pK_{a1} | 2.80 ± 0.02 | 2.61 ± 0.02 |
| Міцелярний розчин Бридж 35 | pK_{a2} | 9.49 ± 0.02 | 9.17 ± 0.12 |
| | pK_{a1} | 3.23 ± 0.02 | 2.87 ± 0.12 |

З іншого боку, міцелярні розчини катіонної ПАР – ЦПХ практично не впливають на значення pK_{a2} амінокислот, а значення pK_{a1} збільшуються, як і в присутності ДСН або Бридж 35. Це не відповідає правилу Хартлі, згідно якого в міцелярних розчинах катіонних ПАР сила сольовізованих кислот зростає. Аномальний вплив ЦПХ на значення pK_{a1} можна частково пояснити відмінностями у значеннях іонної сили у розчинах ЦПХ та у водному середовищі, а також специфікою цвіттер-іонної будови амінокислот. Збільшення значення pK_{a1} в присутності міцел ЦПХ свідчить про більш високі значення K_{b,H_2A^+} , порівняно з K_{b,HA^\pm} , а незначний вплив на pK_{a1} вказує на приблизно однакові значення K_{b,HA^\pm} та K_{b,A^-} . Отже, можна стверджувати, що у випадку вільних амінокислот аланіну та валіну наявність негативного заряду карбоксильної групи майже не відбивається на зв'язуванні амінокислот міцелами катіонної ПАР.

На рис. 3 наведено гістограму ефектів середовища, з якої видно, що значення pK_{a2} практично не залежать від типу заряду ПАР, а pK_{a1} збільшується в міцелярних розчинах у послідовності ДСН > Бридж 35 > ЦПХ. При цьому помітніший вплив міцелярного середовища спостерігається для валіну. Слід відзначити, що боковий ланцюг валіну помітно більш гідрофобний, ніж у аланіну: логарифми констант розподілу в системі 1-октанол-вода для бокових груп аланіну та валіну дорівнюють 1.09 та 2.36, відповідно.

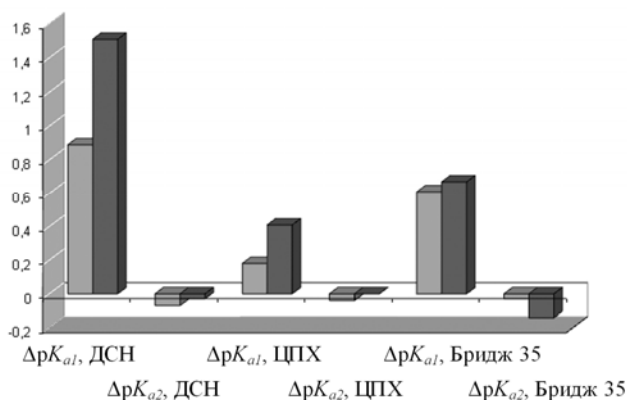


Рис. 3. Ефекти середовища для аланіну (світлі стовпчики) та валіну (темні стовпчики)

Вплив міцелярного середовища на константи дисоціації дипептидів. У табл. 2 наведено результати визначення показників констант дисоціації дипептидів у водному середовищі з іонною

силою 0.1 М та міцелярних розчинах ПАР різного зарядного типу. Аналіз впливу міцелярного середовища ПАР на константи дисоціації дипептидів свідчить про ефекти, аналогічні виявленим для амінокислот. Необхідно, однак, зазначити, що значення першої та другої констант дисоціації для дипептидів ближчі, ніж для амінокислот.

Таблиця 2

Значення змішаних pK_a (у водному середовищі) та «уявних» pK_a (у міцелярних розчинах ПАР) дипептидів

| Середовище | | <i>L</i> - α -Аланіл- <i>l</i> - α -аланін | <i>DL</i> - α -Аланіл- <i>DL</i> - α -валін |
|--------------------------------|-----------|--|---|
| Водний розчин, $I=0.1$ М, NaCl | pK_{a2} | 8.12 ± 0.01 | 8.30 ± 0.01 |
| | pK_{a1} | 3.31 ± 0.01 | 3.11 ± 0.01 |
| Міцелярний розчин ДСН | pK_{a2} | 8.16 ± 0.02 | 8.25 ± 0.03 |
| | pK_{a1} | 4.25 ± 0.02 | 4.69 ± 0.03 |
| Міцелярний розчин ЦПХ | pK_{a2} | 7.97 ± 0.01 | 7.91 ± 0.01 |
| | pK_{a1} | 3.46 ± 0.01 | 3.21 ± 0.01 |
| Міцелярний розчин Бридж 35 | pK_{a2} | 7.88 ± 0.02 | 8.06 ± 0.02 |
| | pK_{a1} | 3.62 ± 0.03 | 3.31 ± 0.02 |

В міцелярних розчинах ДСН pK_{a1} обох дипептидів збільшується, причому ефект помітніший для *DL*- α -аланіл-*DL*- α -валіну, в якому саме залишок валіну відповідає за дисоціацію карбоксильної групи. Цікаво також, що абсолютні значення ефекту середовища для дипептидів та амінокислот близькі. Як і у випадку вільних амінокислот значення pK_{a2} практично не змінюються в міцелярних розчинах аніонної ПАР порівняно з водним розчином.

Міцелярні розчини катіонної ПАР збільшують значення pK_{a1} та зменшують pK_{a2} , останнє відповідає загальним закономірностям: протолітична форма з від'ємним зарядом A^- зв'язується найсильніше. З іншого боку, щодо впливу катіонної ПАР на значення pK_{a1} дипептидів, як і у випадку вільних амінокислот, результат є неординарним: збільшення значення pK_{a1} може спостерігатися лише за умови, що дипротонувана форма зв'язується сильніше, ніж монопротонувана. Цей факт свідчить про специфіку впливу міцелярних розчинів катіонної ПАР на протоліти з цвіттер-іонною будовою.

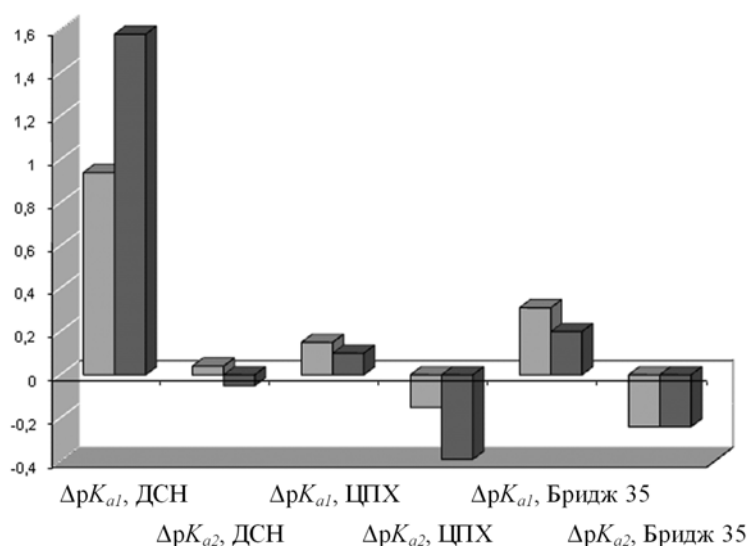


Рис. 4. Ефекти середовища для *L*- α -аланіл-*l*- α -аланіну (світлі стовпчики) та *DL*- α -аланіл-*DL*- α -валіну (темні стовпчики)

Закономірності впливу міцелярних розчинів ЦПХ зберігаються і для Бридж 35. Однак аномальний ефект для першої константи дисоціації у розчинах Бридж 35 є виразнішим.

Порівняння даних для мицелярних розчинів ЦПХ і ДСН зумовлює висновки. Зв'язування протолітичних форм амінокислот та дипептидів аніонними мицелами ДСН зумовлено в основному електростатичною взаємодією з катіонними центрами амінокислоти чи дипептиду, у відповідності з цим і ефекти середовища для pK_{a1} амінокислоти і дипептиду майже однакові. ЦПХ відрізняється від ДСН більшою довжиною, а відтак і гідрофобністю вуглеводневого радикалу. За цих обставин гідрофобність протоліту набуває більшого значення для його зв'язування мицелами ЦПХ, ніж наявність негативного заряду на карбоксильній групі, який частково компенсується позитивним зарядом аміногрупи. Відповідна зміна конформації молекули може привести до зменшення можливої площі контакту амінокислоти або дипептиду з гідрофобним ядром мицели ЦПХ.

Висновки. Закономірності впливу ліофільних нанорозмірних дисперсій на протолітичні властивості не змінюються при переході від вільних амінокислот (аланін і валін) до дипептидів, з них сформованих. Для дисоціації за протонованою аміногрупою (значення pK_{a2}) ефекти середовища відповідають відомим ефектам впливу мікроагрегатів різного зарядного типу. Для дисоціації карбоксильної групи спостерігається аномальний вплив середовища катіонного ПАВ ЦПХ та неіоногенного Бридж 35: значення pK_{a1} зростають порівняно з водними розчинами, що можна пояснити переважаючою роллю гідрофобних взаємодій у зв'язуванні протолітів мицелами ЦПХ. Збільшення значень pK_{a1} в розчинах Бридж 35 узгоджується з уявленнями про стабілізацію в неполярному середовищі форми з меншим зарядом: у випадку амінокислоти чи дипептиду це катіонна (дипротонована) форма, оскільки вона має менше заряджених центрів, ніж цвіттер-іонна (монопротонована) форма.

1. Якубке Х.Д. Аминокислоты, пептиды, белки / Х.Д. Якубке, Х. Ешкайт. – М.: Мир, 1985. – 245с.
2. Partanen J.I. Re-evaluation of the second thermodynamic dissociation constants of alanine, valine and leucine using potentiometric data measured for aqueous potassium chloride solutions at 298.15 K. / J.I. Partanen, M.P. Juusola, V. Virginie // *Can. J. Chem.*, 2005. – № 83. – P. 46–56.
3. Partanen J.I. Determination of the second stoichiometric dissociation constants of glycine in aqueous sodium or potassium chloride solutions at 298.15 K / J.I. Partanen, P.M. Juusola, P.O. Minkkinen, V. Verraes // *Can. J. Chem.* – 2003. – № 81. – P. 1462–1470.
4. Kiss T. Critical survey of stability constants of complexes of glycine / T.Kiss, I.Sovago, A.Gergely // *Pure & Appl Chem.*, 1991. – Vol. 63, № 4. – P. 597–638.
5. Canel E. The Determination of Protonation Constants of Some Amino Acids and Their Esters by Potentiometry in Different Media / E. Canel, A. Gultepe, A. Dogan, E. Kilic // *Journal of Solution Chemistry*. – 2006. – Vol. 35, № 1. – P. 5–17.
6. Yamashita T. Micellar catalytic effects on the kinetics of the ionization of basic amino acid and acidic amino acid studied by the ultrasonic absorption method / T. Yamashita, M. Yamasaki, T. Sano, S. Harada, H. Yano // *Langmuir*. – 1995. – Vol. 11. – P.1477.
7. Альберт А. Константы ионизации кислот и оснований / А. Альберт, Е. Сержент. – М.: Химия, 1964. – 180 с.
8. Мчедлов-Петросян Н.О. Дифференцирование силы органических кислот в истинных и организованных растворах / Н.О. Мчедлов-Петросян. – Х.: Изд. ХНУ им. В.Н.Каразина, 2004. – 326 с.