

УДК 543.554.4+544.354.081.7

ВЛИЯНИЕ МИЦЕЛЛЯРНОЙ СРЕДЫ ПОВЕРХНОСТНО-АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ НА ПРОТОЛИТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА НЕКОТОРЫХ АМИНОКИСЛОТ

© 2008 Ле Конг Хоан, Л. П. Логинова, О. С. Чернышева, А. И. Герман, А. П. Бойченко

Изучено влияние мицеллярных растворов поверхностно-активных веществ (анионного додецилсульфата натрия, катионного цетилпиридиний хлорида и неионогенного Бридж 35) на отдельные ступени протонирования глицина, пролина, 4 алифатических аминокислот, 3 аминокислот с положительно заряженными и 2 аминокислот с отрицательно заряженными боковыми цепями, 3 ароматических аминокислот. Влияние мицеллярной среды ионных поверхностно-активных веществ на логарифмы констант протонирования аминокислот соответствует правилу Хартли. Эффекты мицеллярной среды Бридж 35 объяснены стабилизацией менее заряженных протолитических форм в микроокружении с низкой диэлектрической проницаемостью. Наибольшие по абсолютному значению эффекты мицеллярной среды наблюдались в растворах додецилсульфата натрия для констант образования дикатионов гистидина и лизина, монокатионов β -фенил- α -аланина и триптофана. Обсуждена роль электростатических и гидрофобных взаимодействий между мицеллярными микроагрегатами и аминокислотами с боковыми цепями разного типа.

К числу важнейших биологических реакций относится ионизация аминокарбоновых кислот, входящих в состав белков, по амино- или карбоксильной группе. Различия в свойствах аминокислот и их биологические функции связаны с различиями в боковых цепях аминокислот — фрагментах, соединенных с α -атомом углерода аминокарбоновой группировки. Протеиногенные и другие биологически важные аминокислоты по природе боковой цепи и типу ионизации боковых групп в нейтральных растворах делят на следующие группы и подгруппы [1]:

1) алифатические аминокислоты — неполярные (аланин, валин, лейцин, изолейцин, β -аланин, 2-аминопентановая и 2-аминогексановая кислоты) и незаряженные полярные (цистеин, цистин, метионин, серин, аспарагин, глутамин);

2) заряженные аминокислоты — с положительно и отрицательно заряженными боковыми цепями. Кислоты с положительно заряженной боковой цепью содержат, кроме α -аминогруппы, дополнительную сильноосновную группу, находящуюся в катионной форме при рН ниже 9, и называются основными аминокислотами (аргинин, лизин, орнитин, гистидин). Кислоты с отрицательно заряженной боковой цепью содержат добавочную карбоксильную группу, ионизированную при рН выше 4-5, и называются кислотными аминокислотами (аспарагиновая и глутаминовая кислоты).

3) ароматические аминокислоты (фенилаланин, тирозин, триптофан); среди них только у тирозина боковая цепь полярна и содержит гидроксильную группу.

В эту классификацию не входит простейшая аминокислота глицин, боковая цепь которой состоит только из атома Н, и пролин с уникальной боковой цепью, замкнутой на атом азота аминогруппы и на α -атом углерода.

Константы ионизации аминокислот, как и константы устойчивости их металлокомплексов, были предметом многочисленных исследований. Литературные данные обобщены и критически оценены в материалах Комиссии IUPAC по данным о равновесиях; наиболее надежные значения констант протонирования аминокислот аттестованы как рекомендованные данные [1-5]. Специальные отчеты Комиссии посвящены обзору равновесий глицина [2], алифатических аминокислот с незаряженными полярными [3] и неполярными [4] боковыми цепями, ароматических аминокислот [5], аминокислот с положительно заряженными боковыми цепями [1]; незавершенным остался проект соответствующего обзора равновесий для аминокислот с отрицательно заряженными боковыми цепями [6]. Подавляющее большинство данных о константах ионизации аминокислот относятся к водным растворам; встречаются лишь отдельные значения констант ионизации некоторых аминокислот в водно-спиртовых средах, ацетонитриле, уксусной кислоте [1].

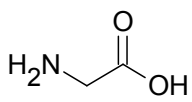
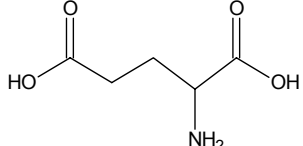
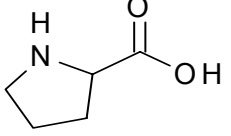
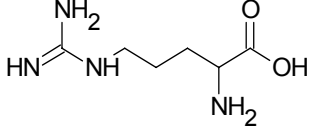
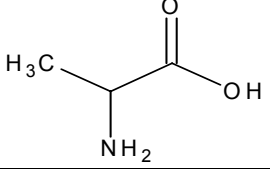
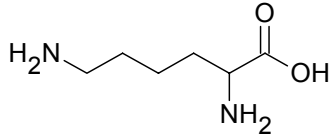
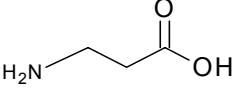
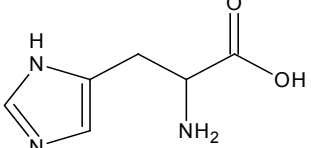
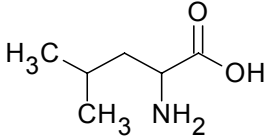
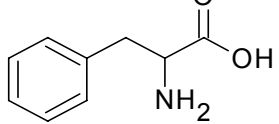
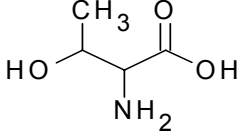
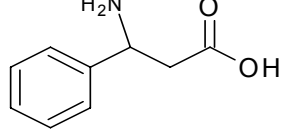
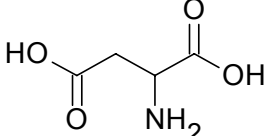
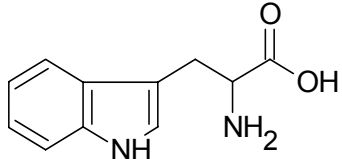
Однако более подходящими для описания биологических систем были бы данные о свойствах аминокислот в присутствии высокомолекулярных агрегатов [7]. В качестве биомодельных микроагрегатов в последние десятилетия используются мицеллы поверхностно-активных ве-

ществ (ПАВ), в которых имеются области как для электростатических, так и гидрофобных взаимодействий с растворенными веществами. Ионизация аминокислот в мицеллярных растворах ПАВ изучена мало. Установлен различный характер влияния мицеллярной среды на кинетику ионизации отдельных алифатических, основных и кислотных аминокислот [7]. В связи с развитием методов разделения, в которых используются мицеллярные подвижные фазы, охарактеризованы эффекты мицеллярной среды для констант ионизации пяти аминокислот и трех пептидов [8]. Представляет интерес более детальное изучение мицеллярных эффектов в зависимости от природы боковой цепи аминокислоты и в зависимости от зарядного типа ПАВ.

Цель настоящей работы состоит в выявлении эффектов мицеллярной среды катионного (цетилпиридиний хлорид), анионного (н-додецилсульфат натрия) и неионного (Бридж 35) ПАВ по отношению к протолитическим свойствам 14 аминокислот, относящихся к разным группам в соответствии с природой боковой цепи.

Экспериментальная часть

Методом рН-метрического титрования в водных растворах и мицеллярных растворах цетилпиридиний хлорида (ЦПХ), н-додецилсульфата натрия (ДСН) и Бридж 35 определяли константы протонирования следующих аминокислот: Глицин (Gly), Пролин (Pro), α -Аланин(α -ala), β -Аланин(β -ala), Лейцин (Leu), Треонин (Thr); Аспарагиновая кислота (Asp), Глютаминовая кислота (Glu), Аргинин (Arg), Лизин (Lys), Гистидин (His), β -фенил- α -аланин (β -Phe- α -ala), β -фенил- β -аланин (β -Phe- β -ala), Триптофан (Trp); их формулы приведены ниже:

 Gly	 Glu
 Pro	 Arg
 α -ala	 Lys
 β -ala	 His
 Leu	 β -Phe- α -ala
 Thr	 β -Phe- β -ala
 Asp	 Trp

Материалы и реагенты. Для приготовления растворов использовалась свободная от карбонатов бидистиллированная вода (удельная электропроводность $1.5 \cdot 10^{-6} \text{ Ом}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$), гидроксид и хлорид натрия квалификации х.ч. и ч.д.а. Коммерческие препараты цетилпиридиний хлорида моногидрата $\text{C}_{21}\text{H}_{38}\text{NCl} \cdot \text{H}_2\text{O}$ (содержание основного вещества 99.0-101.0 %) и Бридж 35 $(\text{C}_2\text{H}_4\text{O})_{23}\text{C}_{12}\text{H}_{26}\text{O}$ производства фирмы Merck использовали без дополнительной очистки. Коммерческий препарат *n*-додецилсульфата натрия $\text{C}_{12}\text{H}_{25}\text{OSO}_3\text{Na}$ с массовой долей основного вещества 97 % (Appli Chem) дополнительно очищали перекристаллизацией из изопропилового спирта.

Во всех случаях концентрация ПАВ в мицеллярных растворах составляла 0.10 моль/л. Ионную силу 0.10 моль/л в водных растворах и в мицеллярных растворах Бридж 35 создавали добавками NaCl. В мицеллярные растворы ионных ПАВ (ЦПХ и ДСН) не вводили дополнительных электролитов, поддерживающих ионную силу. Хлорид натрия выбран в качестве фонового электролита, чтобы сблизить, насколько возможно, природу солевого фона в водном растворе и мицеллярных средах.

В качестве титрантов использовали растворы хлороводородной кислоты и гидроксида натрия. Растворы NaOH, свободные от карбонатов, готовили по известной методике из насыщенного раствора NaOH [9] и стандартизовали по навескам адипиновой кислоты с индикатором фенолфталеином. Растворы HCl готовили разбавлением концентрированного раствора HCl (пл. 1.17 г/см^3) квалификации х.ч. и стандартизовали по навескам карбоната натрия и тетрабората натрия декагидрата.

Концентрация исследуемой кислоты в титруемом растворе составляла $1.0 \cdot 10^{-3}$ моль/л, когда определяли первые константы протонирования аминокислот в мицеллярных растворах ЦПХ и водных растворах, и $1.0 \cdot 10^{-2}$ моль/л во всех остальных случаях. Объем титруемого раствора равнялся 20 мл; кривые титрования содержали 20 точек в области pH от 6 до 11 (титрование раствором NaOH) или от 5 до 2 (титрование раствором HCl). При исследовании протолитических свойств ароматических аминокислот кривые титрования охватывали диапазон pH от 2 до 10.5. Для расчетов использовали данные при степени оттитрованности аминокислоты по каждой ступени от 20 до 80 %.

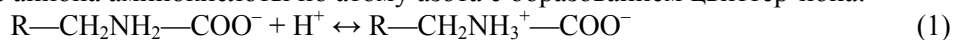
Потенциометрические исследования выполнены при температуре $25.0 \pm 0.1^\circ\text{C}$. Потенциометрическая ячейка состояла из стеклянного электрода ЭСЛ-63-07 и полужлемента сравнения ЭВЛ-1МЗ. Жидкостное соединение осуществляли с помощью солевого мостика, заполненного раствором 1 моль/л NH_4NO_3 в агар-агаровом геле (исследование мицеллярных растворов ДСН), или мостика типа капилляр-пришлифованная муфта, заполненного насыщенным раствором KCl (все остальные случаи). Ячейку градуировали по стандартным буферным растворам с pH 1.68, 3.56, 6.86 и 9.18, градуировку проверяли до и после титрования. Значения э.д.с. измеряли по компенсационной схеме (потенциометр Р 307, нуль-инструмент pH-метр pH-121), стандартное отклонение измерений э.д.с. 0.2 мВ.

Данные потенциометрических титрований обрабатывали по программе CLINP 2.1 [10]. Наборы значений логарифмов констант, полученных в параллельных титрованиях, усредняли с использованием ранее предложенного подхода [11], учитывающего коррелированность рассчитанных значений логарифмов констант, с помощью программы, разработанной в среде MATLAB 7.0 (<http://www.mathworks.com>).

Результаты и обсуждение

В табл. 1 приведены литературные данные о константах протонирования исследуемых аминокислот: рекомендованные и ориентировочные данные из обзоров [1-5], а также данные справочника [12] в случаях, когда рекомендованные справочные данные не установлены.

Если в боковой цепи нет ионизируемых групп, первая константа протонирования K_{H1} описывает протонирование аниона аминокислоты по атому азота с образованием цвиттер-иона:



где R — боковая цепь аминокислоты.

Вторая константа протонирования K_{H2} относится к протонированию по карбоксильной группе с образованием монокатиона:



Пять из исследованных в данной работе аминокислот содержат в боковой цепи ионизируемые группы: аргинин, лизин, гистидин — основные группы, глутаминовая и аспарагиновая кислоты — дополнительные карбоксильные группы.

Конечными продуктами протонирования аргинина, лизина, гистидина являются дикатионы. Аргинин содержит при δ-атоме углерода сильноосновную гуанидиниевую группировку, для которой $\lg K_{H1} > 12$ [1]. При $pH < 10$ боковая цепь аргинина заряжена положительно, и равновесия, аналогичные (1) и (2), имеют вид:

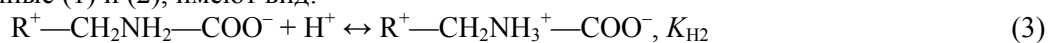


Таблица 1. Литературные данные о логарифмах констант протонирования аминокислот в водных растворах, температура 25 °С
(категории данных: R — рекомендованные, T — ориентировочные)

Аминокислота	Логарифмы констант протонирования			Источник	Категория	Ионная сила, моль/л (фоновый электролит)
	$\lg K_{H1}$	$\lg K_{H2}$	$\lg K_{H3}$			
Gly	9.60	2.37		[2,4]	R	0.1-0.2
				[2,4]	T	0.1-0.2
	9.67 ¹	2.36 ¹		[2]	R	0.1-0.2
				[2]	T	0.1-0.2
Pro	10.38	1.90		[12]		0.1
Группа 1						
α-ala	9.72	2.33		[4]	R	0.1-0.2
β-ala	10.14	3.57		[4]	R	0.1-0.2
Leu	9.66	2.32		[4]	R	0.1-0.2
Thr	8.98±0.01	2.18±0.06		[3]	T	0.05(KCl)
	8.97±0.06	2.2±0.3		[3]	R	0.1(KNO ₃)
Группа 2						
Arg	-	9.02±0.04 ¹	1.99±0.03 ¹	[1]	R	0.1(KNO ₃)
	12.09±0.04			[1]	T	0.1(KNO ₃)
Lys	10.71±0.08	9.19±0.09	2.16±0.03	[1]	R	0.1-0.2
His	9.17±0.03 ¹	6.07±0.02 ¹	1.8±0.1 ¹	[5]		0.1-0.2
Asp	9.63±0.01	3.70±0.01	1.93±0.01	[12]		0.1
Glu	9.59±0.09	4.20±0.08	2.18±0.01	[12]		0.1
Группа 3						
β-Phe-α-ala	9.12 ¹	2.16 ¹		[5]		0.1 (NaCl)
β-Phe-β-ala	9.00			[13]		
	9.45±0.39	3.45±0.12		ACDLabs, расчет		0.5
Trp	9.40 ¹	2.46 ¹		[5]		0.1 (KCl)

¹ — смешанная константа; во всех остальных случаях концентрационные константы.

Ступени протонирования лизина по α- и ε-аминогруппам перекрываются. В водных растворах при соответствующих pH форма с непротонированной α-NH₂ и протонированной ε-NH₃⁺-группой преобладает над формой с протонированной α-NH₃⁺ и непротонированной ε-NH₂-группой [1], следовательно, значение K_{H1} лизина характеризует аминогруппу в боковой цепи. В случае гистидина протонирование происходит сначала по α-аминогруппе (K_{H1}), затем по атому азота имидазольного цикла (K_{H2}) и карбоксильной группе (K_{H3}).

Полностью депротонированные формы глутаминовой и аспарагиновой кислот являются дианионами. Из двух карбоксилатных групп такой аминокислоты первой протонируется группа в боковой цепи (K_{H2}).

Для тестирования методик эксперимента и обработки данных были определены константы протонирования аминокислот в водных растворах, и результаты сопоставлены с литературными данными. Большинство полученных значений логарифмов констант протонирования хорошо согласовались с рекомендованными справочными данными. В случаях, если расхождения

превышали 0.1, для оценки эффектов мицеллярной среды в качестве констант протонирования в водных растворах использовались также рекомендованные справочные данные [1]. Это касается прежде всего лизина, для которого в водных растворах нами получены значения, заметно отличающиеся от рекомендованных: $\lg K_{H1} = 10.32 \pm 0.13$, $\lg K_{H2} = 8.98 \pm 0.05$, $\lg K_{H3} = 2.37$ (ср. с табл. 1), что требует дополнительной проверки.

При сопоставлении полученных значений $\lg K_{Hi}$ с данными, полученными из других источников [12] (в случаях отсутствия рекомендованных справочных данных), наблюдалось как очень хорошее согласие, так и расхождения в 0.1-0.3 лог. ед., чаще всего в значениях $\lg K_{H1}$. Расхождения могут частично объясняться разным характером сопоставляемых констант: в нашей работе по условиям градуировки рН-метрической ячейки определяемые константы протонирования в водных растворах являются смешанными, тогда как большинство данных [1-4] относится к концентрационным константам или их характер неизвестен [12-13]. Впрочем, как видно из обзоров [1-4], при ионной силе около 0.1 моль/л логарифмы смешанных и концентрационных констант редко отличаются больше чем на 0.1-0.2.

В мицеллярной среде константы протолитических равновесий изменяются по сравнению с водным раствором, если сопряженные протолитические формы частично или полностью связываются мицеллами и распределяются между водной фазой и мицеллярной псевдофазой. Константы протонирования, определяемые в мицеллярных растворах ПАВ методами потенциометрии или спектрофотометрии, называются кажущимися (apparent). Для i -той ступени протонирования кажущаяся константа K_{Hi}^{app} соответствует уравнению ЗДМ:

$$K_{Hi}^{app} = \frac{[H_i A]_t}{10^{-pH} [H_{i-1} A]_t}, \quad (5)$$

где $[H_i A]_t = [H_i A]_w + [H_i A]_m$ — суммарная концентрация продукта протонирования в водной фазе (индекс w) и мицеллярной псевдофазе (индекс m) раствора ПАВ;

$[H_{i-1} A]_t = [H_{i-1} A]_w + [H_{i-1} A]_m$ — суммарная концентрация протонируемой формы в водной фазе и мицеллярной псевдофазе раствора ПАВ; все концентрации отнесены к объему раствора в целом; потенциометрически определяемое значение рН характеризует водную фазу.

Связывание веществ мицеллами ионных ПАВ происходит за счет гидрофобных взаимодействий и электростатического притяжения. Электростатическое отталкивание препятствует взаимодействию ионных мицелл с одноименно заряженными протолитическими формами, что подтверждают результаты исследований некоторых аминокислот и пептидов [8]. Так, в присутствии анионных мицелл ДСН почти не изменялись константы протонирования анионов глицина, лизина, β -фенил- α -аланина, дианиона аспарагиновой кислоты, в присутствии катионных мицелл цетилтриметиламмоний бромида не менялась константа равновесия цвиттер-ион — катион β -фенил- α -аланина [8]. Заметных эффектов мицеллярной среды за счет электростатической составляющей связывания можно ожидать в случаях, когда заряд протолита по знаку противоположен заряду поверхности ионной мицеллы. Поэтому в нашей работе представляло интерес в мицеллярных растворах катионного ЦПХ исследовать протонирование анионов или дианионов аминокислот, а в мицеллярных растворах анионного ДСН — протонирование цвиттер-ионов и/или монокатионных форм аминокислот.

Результаты определения констант протонирования аминокислот в водных растворах и мицеллярных растворах ПАВ приведены в табл. 2-4. Эффекты мицеллярной среды характеризуют разности $\Delta \lg K_{Hi} = \lg K_{Hi}^{app} - \lg K_{Hi}$; звездочками* помечены значения, не превышающие неопределенности разности логарифмов констант.

Знаки эффектов среды, наблюдаемых в мицеллярных растворах ЦПХ и ДСН, соответствуют правилу Хартли [14] и результатам других исследований [15]: они положительны для анионных и отрицательны для катионных мицелл (табл. 2 и 3). Оценки эффектов, полученные нами для глицина, лизина, аспарагиновой кислоты, β -фенил- α -аланина и триптофана в мицеллярных растворах ДСН удовлетворительно согласуются с данными работы [8] (табл. 3).

Наибольшие по абсолютному значению эффекты среды наблюдаются в мицеллярных растворах ДСН для реакций образования дикатионов ($\pm\pm/++$) основных аминокислот второй группы и монокатионов ($\pm/+$) ароматических α -аминокислот (третья группа). В последнем случае

мицеллярно-опосредованные сдвиги величин $\lg K_{H_2}$ в два раза и более превышают эффекты, наблюдающиеся для реакций того же зарядного типа с участием аминокислот второй группы (ср. со сдвигом $\lg K_{H_3}$ аспарагиновой и глутаминовой кислот). Эти различия можно объяснить усилением гидрофобной составляющей связывания при переходе к аминокислотам третьей группы, содержащим более гидрофобные боковые цепи. Особенно высокие эффекты мицеллярной среды для триптофана объясняются тем, что его молекула наиболее объемна, и отрицательно заряженная карбоксильная группа, препятствующая взаимодействию с анионной мицеллой, удалена на большее расстояние от гидрофобной группировки, обеспечивающей связывание триптофана мицеллой ДСН [8].

Таблица 2. Логарифмы смешанных ($\lg K_{H_i}$) и кажущихся ($\lg K_{H_i}^{app}$) констант протонирования аминокислот и эффекты среды в мицеллярных растворах 0.10 моль/л ЦПХ (25 °С)

Аминокислота	Зарядный тип $H_{i-1}A/H_iA$	$\lg K_{H_i}$	Водный раствор 0.1 моль/л NaCl, $\lg K_{H_i}$	Мицеллярный раствор ЦПХ, $\lg K_{H_i}^{app}$	Эффект среды (ЦПХ - H ₂ O) $\Delta \lg K_{H_i} = \lg K_{H_i}^{app} - \lg K_{H_i}$
Gly	-/±	$\lg K_{H1}$	9.45±0.03 9.67 [2]	9.33±0.01	-0.12; -0.34 ¹
Группа 1					
α-ala	-/±	$\lg K_{H1}$	9.68±0.03	9.42±0.08	-0.26
β-ala	-/±	$\lg K_{H1}$	10.05±0.03	9.73±0.04	-0.32
Leu	-/±	$\lg K_{H1}$	9.48±0.03 9.66 [4]	8.63±0.01	-0.85; -1.03 ¹
Thr	-/±	$\lg K_{H1}$	8.97±0.03	8.66±0.08	-0.31
Группа 2					
Arg	±/+±	$\lg K_{H2}$	8.95±0.04	8.72±0.01	-0.23
Lys	±/+±	$\lg K_{H2}$	8.98±0.05 9.19±0.05 [1]	9.05±0.01	+0.07*; -0.14 ¹
	-/±	$\lg K_{H1}$	10.32±0.13 10.71±0.08[1]	9.87±0.02	-0.45; -0.84 ¹
Asp	--/-±	$\lg K_{H1}$	9.79±0.03	9.09±0.02	-0.70
Glu	--/-±	$\lg K_{H1}$	9.48±0.04	8.72±0.06	-0.76
Группа 3					
β-Phe-α-ala	-/±	$\lg K_{H1}$	8.82±0.03 9.23 [8]	7.50±0.01 8.71 ² [8]	-1.32 -0.54 ² [8]

¹ — в расчетах использованы рекомендованные справочные значения $\lg K_{H_i}$ для водного раствора;

² — мицеллярный раствор 0.1 моль/л цетилтриметиламмоний бромид.

Для пролина и аминокислот второй группы в мицеллярных растворах ДСН только константы реакций зарядного типа -/± практически не менялись, как и ожидалось из электростатических соображений. В остальных случаях мицеллярно-опосредованные сдвиги логарифмов констант протонирования в основном зависят от зарядного типа сопряженных протолитических форм. В случае равновесий типа ±/+ для пролина, аминокислот первой и второй групп наблюдаются близкие по величине эффекты мицеллярной среды ДСН, а для реакций зарядного типа ±±/++ лизина и гистидина эффекты почти в два раза больше. Эти факты свидетельствуют о преимущественно электростатической природе мицеллярных эффектов ДСН и, следовательно, преимущественно электростатическом характере связывания аминокислот первой и второй группы анионными мицеллами. При изучении кинетики ионизации аргинина и других аминокислот в мицеллярных растворах ДСН ранее был сделан вывод о том, что механизм ионизации α-аминогруппы определяется в первую очередь электростатическими взаимодействиями между α-NH₃⁺ или α-COO⁻ и анионной поверхностью мицелл ДСН, независимо от того, является ли боковая цепь аминокислоты гидрофобной или полярной, незаряженной или положительно заряженной [7].

Таблица 3. Логарифмы смешанных ($\lg K_{Hi}$) и кажущихся ($\lg K_{Hi}^{app}$) констант протонирования аминокислот и эффекты среды в мицеллярных растворах 0.10 моль/л ДСН (25 °С)

Аминокислота	Зарядный тип $H_{i-1}A/H_iA$	$\lg K_{Hi}$	Водный раствор 0.1 моль/л NaCl, $\lg K_{Hi}$	Мицеллярный раствор ДСН, $\lg K_{Hi}^{app}$	Эффект среды (ДСН - H ₂ O) $\Delta \lg K_{Hi} = \lg K_{Hi}^{app} - \lg K_{Hi}$
Gly	±/+	$\lg K_{H2}$	2.35±0.05	2.62±0.08 2.57 [8]	0.27 0.23 [8]
Pro	-/± ±/+	$\lg K_{H1}$ $\lg K_{H2}$	10.13±0.14 2.22±0.12	9.99±0.14 3.58±0.06	-0.14* 1.36
Группа 1					
Thr	±/+	$\lg K_{H2}$	2.18	3.26±0.17	1.08
Группа 2					
Lys	±+/+++	$\lg K_{H3}$	2.38±0.03; 2.16 [1]; 2.29 [8]	3.96±0.15 3.88 [8]	1.58; 1.80 ¹ 1.59 [8]
His	-/± ±/±+ ±+/+++	$\lg K_{H1}$	9.03±0.10	8.96±0.09	-0.07*
		$\lg K_{H2}$	6.13±0.04	6.76±0.04	0.63
		$\lg K_{H3}$	1.8±0.2	3.88±0.04	2.1
Asp	-±/± ±/+	$\lg K_{H2}$	3.73±0.06	3.79±0.05; 3.68 [8]	0.06*; 0.23 [8]
		$\lg K_{H3}$	1.96±0.02	3.14±0.04 2.39 [8]	1.18; 0.35 [8]
Glu	-±/± ±/+	$\lg K_{H2}$	4.20±0.05	4.20±0.08	0.00*
		$\lg K_{H3}$	2.18±0.03	3.22±0.05	1.04
Группа 3					
β-Phe-α-ala	-/± ±/+	$\lg K_{H1}$	8.82±0.03	9.16±0.02; 9.25 [8]	0.34 0.02 [8]
		$\lg K_{H2}$	2.23±0.01	4.28±0.03 4.07 [8]	2.03; 1.86[8]
β-Phe-β-ala	-/± ±/+	$\lg K_{H1}$	8.82±0.03	8.81±0.09	-0.01*
		$\lg K_{H2}$	3.60±0.05	5.06±0.05	1.46
Trp	-/± ±/+	$\lg K_{H1}$	9.03±0.09	9.55±0.09 9.68 [8]	0.52 0.57 [8]
		$\lg K_{H2}$	2.54±0.11	5.09±0.04 4.59 [8]	2.55 2.27 [8]

¹ — в расчетах использованы рекомендованные справочные значения $\lg K_{Hi}$ для водного раствора.

Результаты, полученные в мицеллярных растворах ЦПХ, также позволяют выявить преобладающий характер связывания аминокислот мицеллярной псевдофазой. В случае аминокислот первой и второй групп, за исключением лейцина, преобладает электростатическое связывание: величина эффекта среды определяется зарядным типом реакции протонирования и увеличивается примерно в два раза при переходе от протонирования анионов (-/±) к протонированию дианионов (--/-±). Гидрофобные взаимодействия проявляются в увеличении эффектов мицеллярной среды для реакций того же зарядного типа (-/±) кислот третьей группы, что отчетливо видно для ароматической аминокислоты β-Phe-α-ala, и лейцина, который имеет более гидрофобную боковую цепь, чем остальные исследованные кислоты первой и второй групп.

В мицеллярных растворах ионных ПАВ наблюдается сближение ступенчатых констант протонирования аминокислоты, в частности, нивелируются протолитические свойства однотипных групп в аминокислотах с заряженными боковыми цепями. По сравнению с водными растворами в мицеллярных растворах ЦПХ меньше различаются константы протонирования двух аминокислот лизина (табл. 2), в мицеллярных растворах ДСН сближаются вторая и третья константы протонирования аспарагиновой и глутаминовой кислот, относящиеся к боковой карбоксильной группе и α-СОО⁻. Нивелирующее действие также обусловлено электростатическим характером мицеллярных эффектов, и, следовательно, разной степенью влияния мицелл на отдельные ступени протонирования, поскольку с каждым присоединяемым протоном связывание протолита анионными мицеллами усиливается, а катионными — ослабевает.

Мицеллы катионных ПАВ больше влияют на первые ступени протонирования, занижая их константы, мицеллы анионных ПАВ больше способствуют протонированию по последним ступеням. И в том, и в другом случае уменьшается разность между логарифмами первой и последней ступенчатых констант протонирования, сужаются диапазоны существования промежуточных протолитических форм, а также изменяются координаты изоэлектрических точек аминокислот.

Мицеллярная среда неионогенного Бридж 35 практически не влияет на первые константы протонирования α -аминокислот, представленных в табл. 4, но вызывает существенный положительный сдвиг $\Delta \lg K_{H1}$ в случае β -Phe- β -ala. Влияние мицелл Бридж 35 на вторые и третью (для гистидина) константы протонирования выражается положительными эффектами среды.

Таблица 4. Логарифмы смешанных ($\lg K_{Hi}$) и кажущихся ($\lg K_{Hi}^{app}$) констант протонирования аминокислот и эффекты среды в мицеллярных растворах 0.1 моль/л Бридж 35 (25 °С)

Кислота	Зарядный тип $H_{i-1}A / H_iA$	$\lg K_{Hi}$	Водный раствор 0.1 моль/л NaCl, $\lg K_{Hi}$	Мицеллярный раствор Бридж 35, 0.1 моль/л NaCl, $\lg K_{Hi}^{app}$	Эффект среды (Бридж 35 - H ₂ O) $\Delta \lg K_{Hi} = \lg K_{Hi}^{app} - \lg K_{Hi}$
Pro	-/ \pm \pm / $+$	$\lg K_{H1}$	10.13 \pm 0.14	10.20 \pm 0.05	0.07*
		$\lg K_{H2}$	2.22 \pm 0.12	2.77 \pm 0.06	0.55
Группа 2					
His	-/ \pm \pm / \pm $+$ \pm / $+$ $+$ $+$	$\lg K_{H1}$	9.03 \pm 0.10	9.11 \pm 0.10	0.08*
		$\lg K_{H2}$	6.13 \pm 0.04	6.26 \pm 0.05	0.13
		$\lg K_{H3}$	1.79 \pm 0.20	2.68 \pm 0.14	0.89
Группа 3					
β -Phe- α -ala	-/ \pm \pm / $+$	$\lg K_{H1}$	8.82 \pm 0.03	8.87 \pm 0.07	0.05*
		$\lg K_{H2}$	2.23 \pm 0.01	3.08 \pm 0.08	0.85
β -Phe- β -ala	-/ \pm \pm / $+$	$\lg K_{H1}$	8.82 \pm 0.08	10.22 \pm 0.13	1.40
		$\lg K_{H2}$	3.60 \pm 0.05	5.08 \pm 0.04	1.48
Trp	-/ \pm \pm / $+$	$\lg K_{H1}$	9.03 \pm 0.09	8.85 \pm 0.09	-0.18*
		$\lg K_{H2}$	2.54 \pm 0.11	3.05 \pm 0.05	0.51

Мицеллярные эффекты неионогенных ПАВ аналогичны влиянию неводных растворителей: меньшая диэлектрическая проницаемость в микроокружении протолита, связанного неионной мицеллой, способствует стабилизации формы с меньшим числом зарядов. Образование катионокислоты сопровождается уменьшением числа ионизированных групп в том случае, если протонируется не молекула, а цвиттер-ион, что и приводит к положительным сдвигам $\Delta \lg K_{H2}$ и $\Delta \lg K_{H3}$ (табл. 4). Таким образом, эффекты среды в мицеллярном растворе неионного ПАВ для реакций протонирования можно рассматривать как пробу на цвиттер-ионное строение молекул амфолитов.

Сопоставление результатов, полученных для одних и тех же α -аминокислот в мицеллярных растворах ДСН и Бридж 35 (табл. 3 и 4), показывает, что мицеллярная среда вызывает гораздо меньшие эффекты, если отсутствует электростатическая составляющая связывания α -аминокислоты мицеллярной псевдофазой. Совершенно другая картина имеет место в случае β -Phe- β -ala. Для него в мицеллярных растворах ДСН и Бридж 35 наблюдаются почти одинаковые сдвиги $\Delta \lg K_{H2}$, в то же время первая константа протонирования, которая практически не менялась в присутствии мицелл ДСН, как уже упоминалось, существенно увеличивается в мицеллярных растворах Бридж 35.

Выводы

Изучено влияние мицеллярных растворов 0.1 моль/л анионного ДСН, катионного ЦПХ и неионогенного Бридж 35 на отдельные ступени протонирования глицина, пролина, четырех алифатических аминокислот, трех аминокислот с положительно заряженными и двух аминокислот с отрицательно заряженными боковыми цепями и трех ароматических аминокислот. Мицеллярно-опосредованные сдвиги логарифмов констант протонирования аминокислот соответствуют правилу Хартли в случае катионного и анионного ПАВ. Эффекты мицеллярной среды неионного ПАВ объясняются стабилизацией менее заряженных протолитических форм аминокислот в условиях низкой диэлектрической проницаемости микроокружения в мицеллярной псевдофазе и могут рассматриваться как проба на цвиттер-ионное строение молекул амфолитов. Оценка влияния мицеллярных сред на константы протонирования аминокислот с разными типами боковых цепей позволяет оценить роль электростатических и гидрофобных взаимодействий аминокислот с мицеллярными микроагрегатами ПАВ. Протолитические формы глицина, большинства алифатических аминокислот и аминокислот с положительно и отрицательно заряженными боковыми цепями, по-видимому, связываются мицеллярными агрегатами преимущественно за счет электростатических взаимодействий. Гидрофобные взаимодействия заметно отражаются на величине мицеллярных эффектов в случае ароматических аминокислот и лейцина с неполярной боковой цепью. Наибольшие по абсолютному значению эффекты мицеллярной среды наблюдаются в растворах ДСН для констант образования дикатионов гистидина и лизина, монокатионов β -фенил- α -аланина и триптофана.

Авторы выражают благодарность Министерству образования и науки Украины за финансирование НИР 16-15-07 и 5-15-08, Ле Конг Хоан благодарит Во Лам Фи, председателя облласти Хань Хоа, Вьетнам за финансовую поддержку.

Литература

1. Yamauchi O., Odani A. Stability constants of metal complexes of amino acids with charged side chains—Part I: Positively charged side chains // *Pure&Appl.Chem.* 1996. 68. 469.
2. Kiss T., Sóvágó I., Gergely A. Critical survey of the stability constants of complexes of glycine // *Pure&Appl.Chem.* 1991. 63. 597.
3. Berthon G. The stability constants of metal complexes of amino acids with polar side chains// *Pure&Appl.Chem.* 1995. 67. 1117.
4. Sóvágó J., Kiss T., Gergely A. Critical survey of the stability constants of complexes of aliphatic amino acids // *Pure&Appl.Chem.* 1993. 65. 1029.
5. Pettit L.D. Critical survey of formation constants of complexes of histidine, phenylalanine, tyrosine, L-Dopa and tryptophan// *Pure&Appl.Chem.* 1984. 56. 247.
6. <http://www.iupac.org/web/ins/560-22-87>
7. Yamashita T., Yamasaki M., Sano T., Harada S., Yano H. Micellar catalytic effects on the kinetics of the ionization of basic amino acid and acidic amino acid studied by the ultrasonic absorption method // *Langmuir.* 1995. 11. 1477.
8. Khaledi M.G., Rodgers A.H. Micellar-mediated shifts of ionization constants of amino acids and peptides // *Anal. Chim. Acta.* 1990. 239. 121.
9. Альберт А., Сергент Е. *Константы ионизации кислот и оснований.* М.: Химия, 1964. 180 с.
10. <http://www.bestnet.kharkov.ua/kholin/clinp/html>.
11. Бугаевский А.А., Никишина Л.Е., Мулин А.В., Холин Ю.В., Решетняк Е.А., Рубцов М.И., Лукацкая Л.Л. // *Укр. хим. журн.* 1990. 56. 775.
12. Martell A.E., Smith R.M. *Critical stability constants. Vol. 1: Amino acids.* New York- London, Plenum Press, 1974. 469 p.
13. Коршунов И.А., Сергеев Г.М., *Радиохимия.* 1971. 13. 929.
14. Hartley G.S. // *Trans. Faraday Soc.* 1934. 30. 444.
15. Мчедлов-Петросян Н.О. Дифференцирование силы органических кислот в истинных и организованных растворах. Х.: Изд. ХНУ им. В.Н.Каразина, 2004. 326 с.

Поступила в редакцию 19 мая 2008 г.

Kharkov University Bulletin. 2008. № 820. Chemical Series. Issue 16(39). Le Kong Hoan, L. P. Loginova, A. P. Boichenko, O. S. Chernysheva, A. I. German. The effect of micellar media of surfactants on the protolytic properties of some amino acids.

The effect of micellar solutions of surfactants (anionic sodium dodecylsulfate, cationic cetylpyridinium chloride, nonionic Brij 35) on the protolytic properties of glycine, proline, four aliphatic amino acids, three amino acids with positively charged side chains, two amino acids with negatively charged side chains and three aromatic amino acids have been investigated. The effects of micellar media of ionic surfactants on logarithm of protolytic constants of amino acids agree with Hartley law. The effects of micellar media of nonionic surfactants Brij 35 in respect to stabilization of less charged protolytic forms in the presence of nonionic micelles have been treated. The greatest values of micellar media effects have been observed for the stability constants of dicationic histidine and lysine and monocationic β -phenyl- α -alanine and tryptophane in sodium dodecylsulfate solution. The role of electrostatic and hydrophobic interactions between amino acids with different side chains and micellar microaggregates is discussed.