

УДК 543.554.4.+544.354.081.7

## ЗВ'ЯЗУВАННЯ $\beta$ -ФЕНІЛ- $\alpha$ -АЛАНІНУ НАНОРОЗМІРНИМИ АГРЕГАТАМИ ДОДЕЦИЛСУЛЬФАТУ НАТРІЮ

© 2011 О. С. Чернишова

В роботі вперше отримані значення уявних констант дисоціації  $\beta$ -феніл- $\alpha$ -аланіну в міцелярному середовищі з концентрацією *n*-додецилсульфату натрію 0.01 – 0.30 моль/л. На підставі цих даних розраховані константи зв'язування для  $\beta$ -феніл- $\alpha$ -аланіну.

**Ключові слова:**  $\beta$ -феніл- $\alpha$ -аланін, додецилсульфат натрію, потенціометрія, константа дисоціації, константа зв'язування.

Амінокислоти відіграють дуже важливу роль у життєдіяльності організмів і постійно залишаються в колі уваги дослідників [1,2]. Вони входять до складу білків, беруть участь у ряді важливих біохімічних процесів. Для моделювання біологічних процесів за участю амінокислот необхідні дані про протолітичні властивості та інші константи рівноваг. Використання даних, одержаних в водних розчинах, не забезпечує потреб моделювання в біологічних системах. Більш адекватним модельним середовищем є організовані розчини поверхнево-активних речовин (ПАР), що містять нанорозмірні дифільні агрегати. У них є області для електростатичних і для гідрофобних взаємодій із розчиненими речовинами [3].

Отже метою даної роботи стало одержання залежності констант дисоціації  $\beta$ -феніл- $\alpha$ -аланіну від концентрації додецилсульфату натрію і на цій основі визначення константи зв'язування  $\beta$ -феніл- $\alpha$ -аланіну нанорозмірними агрегатами додецилсульфату натрію.

Константи дисоціації  $\beta$ -феніл- $\alpha$ -аланіну визначали методом потенціометричного титрування у водному та міцелярних розчинах з концентрацією додецилсульфату натрію (ДСН) від 0.01 до 0.30 моль/л. Іонну силу підтримували постійною на рівні 0.1 моль/л додатками натрій хлориду.

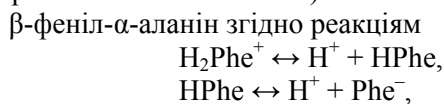
Вимірювання *e.p.c.* проводили за компенсаційною схемою проти насиченого елемента Вестона II класу (потенціометр Р-307, рН-метр-мілівольтметр рН-121 як нуль-інструмент). Щоб запобігти утворенню малорозчинного додецилсульфату калію, рідинне сполучення в колі з переносом заповнювали 3% агар-агаром у водному розчині 1.0 моль/л  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ . В якості електроду порівняння використовували хлорсрібний напівелемент порівняння ЭВЛ-1МЗ, в якості рН-електроду – скляний електрод ЭСЛ-63-07.

Скляний електрод градуювали за стандартними буферними розчинами з рН 1.68, 6.86 і 9.18.

Для приготування розчинів використовувалась вільна від карбонатів бідистильована вода (питома електропровідність  $1.5 \cdot 10^{-6} \text{ Ом}^{-1} \text{ см}^{-1}$ ), гідроксид і хлорид натрію кваліфікації х.ч. і ч.д.а. Комерційний препарат додецилсульфату натрію  $\text{C}_{12}\text{H}_{25}\text{OSO}_3\text{Na}$  з масовою часткою основної речовини 97 % (Appli Chem) додатково очищували перекристалізацією із ізопропілового спирту. В якості титрантів використовували розчини хлороводневої кислоти і гідроксиду натрію. Вихідний розчин  $\text{NaOH}$ , вільний від карбонатів, готували і зберігали за методикою, яка описана в [4], та стандартизували за наважками адипінової кислоти з індикатором фенолфталеїном. Розчини  $\text{HCl}$  готували розведенням концентрованого розчину  $\text{HCl}$  (гус.  $1.17 \text{ г/см}^3$ ) кваліфікації х.ч. і стандартизували за наважками карбонату натрію.

Концентрація  $\beta$ -феніл- $\alpha$ -аланіну в розчині, що титрується, складала  $1.0 \cdot 10^{-2}$  моль/л; об'єм розчину, що титрують, дорівнював 20 мл. Для розрахунків використовували дані при ступені відтитрованості амінокислоти за кожним ступенем від 20 до 80 %.

Дані потенціометричних титрувань обробляли за програмою CLINP 2.1 [5]. Набори значень логарифмів констант, що одержані в паралельних титруваннях, усереднювали із використанням раніш запропонованого підходу [6], що враховує корельованість розрахованих значень логарифмів констант, за допомогою програми, що розроблена в середовищі MATLAB 7.0 (<http://www.mathworks.com>).



$$\begin{aligned} K_{a1} \\ K_{a2} \end{aligned}$$

має дві константи дисоціації, причому  $pK_{a2} - pK_{a1} > 7$  [1]. Змішана константа дисоціації β-феніл-α-аланіну за першим і другим ступенем у водному середовищі описується рівняннями ЗДМ:

$$K_{a1} = \frac{a_{H^+} [\text{HPhе}]}{[\text{H}_2\text{Phе}^+]} \quad (1)$$

$$K_{a2} = \frac{a_{H^+} [\text{Phе}^-]}{[\text{HPhе}]} \quad (2)$$

а показник констант можна представити у вигляді рівнянь:

$$pK_{a1} = \text{pH}_w + \lg \frac{[\text{H}_2\text{Phе}^+]}{[\text{HPhе}]} \quad (3)$$

$$pK_{a2} = \text{pH}_w + \lg \frac{[\text{HPhе}]}{[\text{Phе}^-]} \quad (4)$$

В міцелярних розчинах додецилсульфату натрію протолітичні форми β-феніл-α-аланіну можуть зв'язуватись міцелярною псевдофазою. Цим процесам відповідають константи зв'язування.

Для описання рівноваг в міцелярних розчинах поверхнево-активних речовин застосовують концепцію уявних констант дисоціації,  $K_a^a$  [7]. При їх визначенні виміряні значення рН відносять до об'єму водної фази, а концентрації протолітичних форм є сумою рівноважних концентрацій кожної форми в об'ємі водної фази і в міцелярній псевдофазі, які віднесені до загального об'єму розчину. Тоді рівняння (5) та (6) є виразами для показника першої та другої уявної константи дисоціації β-феніл-α-аланіну.

$$pK_{a1}^a = \text{pH}_w + \lg \frac{[\text{H}_2\text{Phе}^+]_w + [\text{H}_2\text{Phе}^+]_m}{[\text{HPhе}]_w + [\text{HPhе}]_m} \quad (5)$$

$$pK_{a2}^a = \text{pH}_w + \lg \frac{[\text{HPhе}]_w + [\text{HPhе}]_m}{[\text{Phе}^-]_w + [\text{Phе}^-]_m} \quad (6)$$

де індекси  $w$  і  $m$  відносяться до водної та міцелярної псевдофази відповідно.

У випадку неповного зв'язування однієї чи декількох супряжених форм уявна константа дисоціації включає константи зв'язування кожної форми та пов'язана зі змішаною константою дисоціації у водному розчині співвідношеннями [7]:

$$pK_{a1}^a = pK_{a1}^w + \lg \frac{(1 + K_{b,\text{H}_2\text{Phе}^+} (c_s - \text{cmc}))}{(1 + K_{b,\text{HPhе}} (c_s - \text{cmc}))} \quad (7)$$

$$pK_{a2}^a = pK_{a2}^w + \lg \frac{(1 + K_{b,\text{HPhе}} (c_s - \text{cmc}))}{(1 + K_{b,\text{Phе}^-} (c_s - \text{cmc}))} \quad (8)$$

де  $K_{b,\text{H}_2\text{Phе}^+}$ ,  $K_{b,\text{HPhе}}$ ,  $K_{b,\text{Phе}^-}$  - константи зв'язування протонірованої, нейтральної і аніонної форм β-феніл-α-аланіну з міцелями ПАР,  $\text{cmc}$  - критична концентрація міцелоутворення;  $c_s$  - концентрація ПАР.

Залежність  $pK_a^a$  від концентрації ПАР в умовах неповного зв'язування дозволяє оцінити константи зв'язування окремих протолітичних форм. Звичайно для цього використовують лінеаризовану форму рівнянь (7,8):

$$\frac{(1 - 10^{pK_{a1}^w - pK_{a1}^a})}{(c_s - \text{cmc})} = -K_{b,\text{HPhе}} + K_{b,\text{H}_2\text{Phе}^+} \cdot (10^{pK_{a1}^w - pK_{a1}^a}) \quad (9)$$

$$\frac{(1 - 10^{pK_{a2}^w - pK_{a2}^a})}{(c_s - \text{cmc})} = -K_{b,\text{Phе}^-} + K_{b,\text{HPhе}} \cdot (10^{pK_{a2}^w - pK_{a2}^a}) \quad (10)$$

За даними потенціометричних титрувань для 9 систем, що включали водні розчини і міцелярні розчини ДСН у діапазоні концентрацій від 0.01 моль/л до 0.3 моль/л, були обчислені конс-

танти дисоціації β-феніл-α-аланіну за двома ступенями. Значення  $pK_{a1}^a$  і  $pK_{a2}^a$ , а також значення  $\Delta pK_a^a = pK_{a1}^w - pK_{a1}^a$  наведено в таблиці 1.

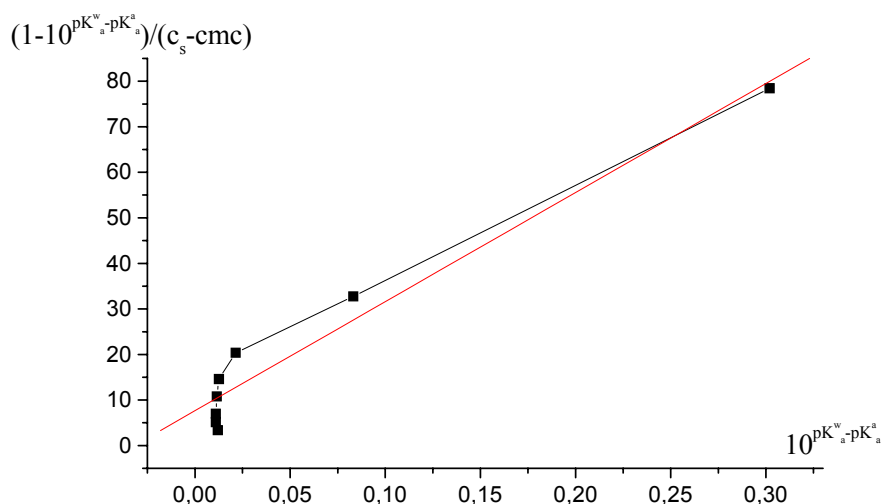
**Таблиця 1.** Значення показників уявних констант дисоціації β-феніл-α-аланіну у воді та міцелярному середовищі додецилсульфату натрію.

c (ДСН), моль/л	$pK_{a1}^a$	$pK_{a1}^w - pK_{a1}^a$	$pK_{a2}^a$	$pK_{a2}^w - pK_{a2}^a$
–	2.16 [8] (I=0.1, NaCl)	–	9.15 [8] (I=0.1, NaCl)	–
–	2.41±0.08	–	8.86±0.03	–
0.01	2.93±0.07	-0.52	9.03±0.05	-0.17
0.03	3.49±0.05	-1.08	9.05±0.05	-0.19
0.05	4.08±0.01	-1.67	9.03±0.01	-0.17
0.07	4.31±0.06	-1.90	9.12±0.05	-0.26
0.10	4.35±0.02	-1.94	9.16±0.02	-0.30
0.15	4.37±0.08	-1.96	9.32±0.08	-0.46
0.20	4.37±0.08	-1.96	9.37±0.08	-0.51
0.30	4.33±0.07	-1.92	9.40±0.08	-0.54

З таблиці 1 видно, що значення  $pK_{a1}^a$  і  $pK_{a2}^a$  із збільшенням концентрації міцел ДСН зростають. Зміна показника константи дисоціації при переході від водного розчину до міцелярного розчину ПАР характеризує ефект міцелярного середовища, зумовлений як сольватаційними ефектами, так і електростатичною взаємодією іонів з міцелярною поверхнею. А саме зв'язуванням зарядженою поверхнею міцел протилежно заряджених іонів кислоти, а також сольобілізацією гідрофобною частиною міцели молекул кислоти.

Для оцінки констант зв'язування протонованої, нейтральної та депротонованої форм β-феніл-α-аланіну скористалися рівняннями (9,10), де константи зв'язування  $K_{b,H_2Phe^+}$  і  $K_{b,HPhe}$ , є параметрами регресії. Якщо всі форми β-феніл-α-аланіну зв'язуються міцелями ДСН, то повинна спостерігатися лінійна залежність  $(1-10^{pK_a^w - pK_a^a}) / (c_s - cmc)$  від  $(10^{pK_a^w - pK_a^a})$ . В нашій роботі ці

залежності виявилися нелінійними (рис. 1). Ця не лінійність можливо пов'язана із зміною рівноважної концентрації противоіонів, що спричиняє зміну електричного потенціалу  $\psi$  в області локалізації противоіонів, і тому впливає на значення констант зв'язування.



**Рис. 1** Залежність  $(1-10^{pK_a^w - pK_a^a}) / (c_s - cmc)$  від  $(10^{pK_a^w - pK_a^a})$  для форм  $H_2Phe^+$  і  $HPhe$  β-феніл-α-аланіну.

Константи зв'язування розраховували із залежності  $pK_a^a$  від концентрації додецилсульфату натрію в області, де  $pK_a^a$  практично не змінювались при збільшенні концентрації ПАР. При оцінюванні констант зв'язування форм  $H_2Phe^+$  і  $HPhe$  використали знайдені  $pK_{a1}^a$ , а зв'язування форм  $HPhe$  і  $Phe^-$  оцінювали за допомогою знайдених  $pK_{a2}^a$ . Оскільки вільний член рівняння (10) виявився статистичним нулем було зроблено припущення, що аніонна форма  $\beta$ -феніл- $\alpha$ -аланіну не зв'язується міцелами ДСН, а розраховані значення логарифмів констант зв'язування протонованої та нейтральної форм  $\beta$ -феніл- $\alpha$ -аланіну міцелами ДСН дорівнюють  $2.43 \pm 0.13$  та  $0.92 \pm 0.05$  відповідно. Оскільки для підтримання  $I=0.1$  моль/л додавали NaCl у всі досліджувані розчини, що містили ДСН менше 0.1 моль/л, то для розрахунку члена рівняння (9)  $c_s - cmc$  використовували значення  $cmc$  відповідно до вмісту доданого електроліту [9].

З іншого боку в рамках псевдофозної моделі зв'язування, якщо відомі  $K_{b,H_2Phe^+}$  і  $K_{b,HPhe}$ , можна розрахувати значення  $pK_{a1}^a$  в умовах повного зв'язування,  $pK_{a1}^{ac}$  [7]. Знайдено, що для  $\beta$ -феніл- $\alpha$ -аланіну  $pK_{a1}^{ac}$  дорівнює  $4.55 \pm 0.12$ .

Згідно одержаних даних видно, що протонована форма  $H_2Phe^+$  краще зв'язується негативно зарядженими міцелами ДСН, як і слід було очікувати, ніж нейтральна  $HPhe$ .

### Висновки

В водних розчинах та мицелярних розчинах додецилсульфату натрію визначено константи дисоціації  $\beta$ -феніл- $\alpha$ -аланіну за двома ступенями. З ростом концентрації додецилсульфату натрію в мицелярних розчинах дещо збільшуються значення  $pK_{a2}^a$  та суттєво збільшуються значення  $pK_{a1}^a$   $\beta$ -феніл- $\alpha$ -аланіну.

Обчислені на цій основі константи зв'язування окремих протолітичних форм  $\beta$ -феніл- $\alpha$ -аланіну збільшуються в ряду:  $Phe^- < HPhe < H_2Phe^+$ , що свідчить про переважання електростатичної складової зв'язування міцелами аніонної ПАР.

### Литература

1. Pettit L.D. Critical survey of formation constants of complexes of histidine, phenylalanine, tyrosine, L-Dopa and tryptophan / Pettit L.D. // Pure and Appl. Chem. – 1984. – Vol. 56, № 2. – P. 247-292.
2. Влияние мицелярной среды поверхностно-активных веществ на протолитические свойства некоторых аминокислот / Ле Конг Хоан, Л.П. Логинова, О.С. Чернышева [и др.] // Вестник Харьков. нац. ун-та. - 2008. - № 820, вып.16(39). - С. 76-85.
3. Мицеллообразование, солюбилизация и микроэмульсии : [под ред. К.Миттела] -М.: Мир, 1980. - 597с.
4. Альберт А. Константы ионизации кислот и оснований / А. Альберт, Е. Сергент. - М.: Химия, 1978. - 180 с.
5. <http://www.bestnet.kharkov.ua/kholin/clinp.html>
6. Объединение оценки параметров, полученных в нескольких сериях спектрофотометрических или потенциометрических измерений / А.А. Бугаевский, Л.Е. Никишина, А.В. Мутин [и др.] // Укр. Хим. Журнал. -1990. - Т. 56, № 7. - С.775-778.
7. Н.О. Мчедлов-Петросян. Дифференцирование силы органических кислот в истинных и организованных растворах / Мчедлов-Петросян Н.О. - Харьков: Изд. Харьковского ун-та им. В.Н.Каразина, 2004. - 326с.
8. D.D.Perrin. Dissociation constants of organic bases in aqueous solution / D.D.Perrin. – London: Butterworths, 1965.
9. Самохина Л.В. Количественное описание химической модификации мицелярных растворов додецилсульфата натрия и модель удерживания в мицелярной жидкостной хроматографии: Дис...канд. хим. наук: 02.00.02 / Самохина Лариса Вячеславовна. - Харьков, 2004. - 228 с.

### References

1. Pettit L.D. Critical survey of formation constants of complexes of histidine, phenylalanine, tyrosine, L-Dopa and tryptophan / Pettit L.D. // Pure and Appl. Chem. – 1984. – Vol. 56, № 2. – P. 247-292.
2. Le Kong Hoan, L.P. Loginova, O.S. Chernyshova [i dr.] // Visn. Hark. nac. Univ., 2008, № 820, Ser. Him., issue 16(39), P. 76-85. [ISSN 0453-8048 (print), ISSN 2220-6396 (online), <http://chembull.univer.kharkov.ua/archiv/2008/07.pdf>] [in Russian]
3. Micellization, Solubilization, and Microemulsions. Vol. 1,2. Edited by K.L. Mittal, Plenum, New York, 1977.
4. Albert A., Serjeant E. Ionization Constants of Acids and Bases, London: Methuen, New York: Wiley, 1962.
5. <http://www.bestnet.kharkov.ua/kholin/clinp.html>
6. A.A. Bugaevskiy, L.E. Nikishina, A.V. Mutin [i dr.] // Ukr. Him. Jurnal, 1990, T. 56, № 7. S.775-778. [in Russian]
7. N.O. Mchedlov-Petrosyan. Differencirovanie sily' organicheskikh kislot v istinny'h i organizovanny'h rastvorah (Differentiation of the strength of organic acids in true and organized solutions), Kharkov, Kharkov Univ., 2004. 326 s. [in Russian]
8. D.D.Perrin. Dissociation constants of organic bases in aqueous solution / D.D.Perrin. – London: Butterworths, 1965.
9. Samokhina L.V. Kolichestvennoe opisanie himicheskoy modifikacii micellyarny'h rastvorov dodecilsul'fata natriya i model' uderjivaniya v micellyarnoy jiadkostnoy hromatografii: Dis... kand. him. nauk: 02.00.02 / Samokhina Larisa Vyacheslavovna. Har'kov, 2004. 228 s. [in Russian]

*Поступила в редакцию 18 августа 2011 г.*

О. С. Чернышёва. Связывание  $\beta$ -фенил- $\alpha$ -аланина наноразмерными агрегатами додецилсульфата натрия.

В работе впервые получены значения кажущихся констант диссоциации  $\beta$ -фенил- $\alpha$ -аланина в среде с концентрацией додецилсульфата натрия 0.01 – 0.03 моль/л. На основании этих данных рассчитаны константы связывания для  $\beta$ -фенил- $\alpha$ -аланина.

**Ключевые слова:**  $\beta$ -фенил- $\alpha$ -аланин, додецилсульфат натрия, потенциометрия, константа диссоциации, константа связывания.

O. S. Chernyshova. The binding of  $\beta$ -phenil- $\alpha$ -alanine by nanodimensional aggregates of sodium dodecylsulphate.

The values of apparent constants of the dissociation of  $\beta$ -phenil- $\alpha$ -alanine in the medium with the concentration of sodium dodecylsulphate 0.01 – 0.03 mol/l have been obtained for the first time. Proceeding from these data the binding constants for  $\beta$ -phenil- $\alpha$ -alanine have been calculated.

**Key words:**  $\beta$ -phenil- $\alpha$ -alanine, sodium dodecylsulphate, potentiometry, dissociation constant, binding constant.

Kharkov University Bulletin. 2011. № 976. Chemical Series. Issue 20(43).