

**О.С.Чернышева**

## **ПРОТОЛИТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА 2,4-ДИНИТРОФЕНИЛЬНЫХ ПРОИЗВОДНЫХ АМИНОКИСЛОТ В МИЦЕЛЛЯРНЫХ РАСТВОРАХ ДОДЕЦИЛСУЛЬФАТА НАТРИЯ**

Определены константы диссоциации 2,4-динитрофенильных производных  $\alpha$ -аминокислот и сопоставлены с протолитическими свойствами соответствующих  $\alpha$ -аминокислот в мицеллярных растворах додецилсульфата натрия. Выявлен эффект мицеллярной среды на значения показателей констант диссоциации 2,4-динитрофенильных производных  $\alpha$ -аминокислот.

**ВВЕДЕНИЕ.** В последние годы широкое распространение получили методы разделения и концентрирования, основанные на использовании растворов лиофильных наноразмерных агрегатов поверхностно-активных веществ, например, мицеллярная хроматография, мицеллярная экстракция, мицеллярная электрокинетическая хроматография [1—4]. В связи с этим представляется актуальной задача изучения физико-химических свойств аналитов в мицеллярных растворах поверхностно-активных веществ (ПАВ). Мицеллярные растворы ПАВ давно признаны биомиметиками клеточных мембран, и поэтому являются наиболее подходящей средой для исследования свойств биологически активных веществ, например, таких как аминокислоты, пептиды, протеины и т.д.

С другой стороны, при разработке методик аминокислотного анализа, который необходим при контроле качества лекарственных препаратов на основе пептидов и протеинов, при регистрации атипичных аминокислот, контроле пептидного синтеза, выявлении биомаркеров различных заболеваний и т.д. [5—11], применяют пред- или послеколоночную дериватизацию аминокислот, чтобы избежать ряда трудностей, связанных с их определением [12]. Наиболее известным и часто используемым реагентом для дериватизации аминокислот является динитрофторбензол (ДНФБ) — реагент Сангера [13—16]. Свойства 2,4-динитрофенильных производных аминокислот изучены недостаточно. До недавнего времени было известно, что под действием солнечного света они разлагаются, а значения констант диссоциации некоторых производных приводились лишь приблизительные [17—19].

В нашей предыдущей работе [12] исследова-

ны протолитические свойства 2,4-динитрофенильных производных глицина, лейцина, треонина, валина и цистеина. Цель настоящей работы — исследовать протолитические свойства 2,4-динитрофенильных производных аланина, пролина, аспарагина и сравнить их с протолитическими свойствами соответствующих аминокислот в мицеллярных растворах додецилсульфата натрия (ДСН), а также выявить эффект влияния мицеллярной среды на значения показателей констант диссоциации 2,4-динитрофенильных производных аминокислот.

**ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ.** Использовали 2,4-ДНФ-производные протеиногенных аминокислот квалификации ч. из “Набора 2,4-динитрофенильных производных” (Химреактив-комплект), додецилсульфат натрия с массовой долей основного вещества 97 % (Appli Chem), дополнительно очищенный перекристаллизацией из изопропилового спирта [20]. Растворы NaOH, свободные от карбонатов, готовили по известной методике из насыщенного раствора NaOH [21] и стандартизовали по навескам адипиновой кислоты с индикатором фенолфталеином. Для приготовления растворов применяли свободную от карбонатов бидистиллированную воду (удельная электропроводность  $1.5 \cdot 10^{-6} \text{ Ом}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$ ).

Потенциометрические измерения выполняли по компенсационной схеме (потенциометр Р 307, рНметр рН121 как нуль-инструмент). Потенциометрическая ячейка состояла из стеклянного электрода ЭСЛ6307 и полуэлемента сравнения ЭВЛ1М3. При потенциометрических исследованиях в мицеллярных растворах во избежание образования малорастворимого додецилсульфата калия между исследуемым раствором и раствором сравнения помещали дополнитель-

ный солевой мостик, заполненный раствором 1 М  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  в агар-агаровом геле. Все потенциометрические исследования выполнены при температуре  $25.0 \pm 0.1$  °С. Стандартное отклонение измерений э.д.с. составляло 0.2 мВ.

Методом потенциометрического титрования в мицеллярных растворах 0.10 М ДСН определяли константы диссоциации по карбоксильной группе 2,4-ДНФ-аминокислот. В мицеллярных растворах ионная сила создавалась 0.10 М ДСН.

Концентрация 2,4-ДНФ-аминокислот в титруемом растворе составляла  $2.0 \cdot 10^{-3}$  М. В качестве титранта использовали растворы гидроксида натрия с точно известной концентрацией, содержащие добавки поддерживающего ионную силу ДСН. Объем титруемого раствора равнялся 20 мл. Кривая титрования состояла из 25 точек; для расчетов использовали данные, соответствующие степени оттитрованности исследуемого вещества от 20 до 80 %. Диапазон изменения рН в процессе титрования составлял от 3.8 до 8.6. Градуировку рН-метрической ячейки выполняли по стандартным буферным растворам с рН 1.68, 6.86 и 9.18 до и после титрования; при этом градуировочные параметры оказывались практически неизменными.

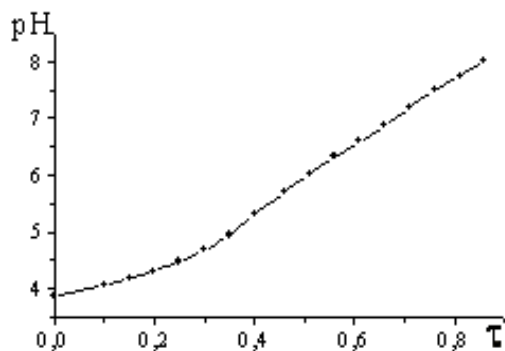
Данные потенциометрических титрований обрабатывали по программе CLINP 2.1 (<http://www.chemo.univer.kharkov.ua/kholin/clinp.html>). Значения логарифмов констант, полученных в параллельных титрованиях, усредняли с использованием ранее предложенного подхода [22]. Алгоритм был реализован ранее в среде MATLAB 7.0 (<http://www.mathworks.com>) [23]. Значения  $pK_a$  2,4-ДНФ-аминокислот в воде рассчитывали с помощью программы ACD/p $K_a$  (Advanced Chemistry Development, <http://www.acdlats.com>). Для вспомогательных расчетов применяли Microsoft Excel (2002, Microsoft Corporation, <http://office.microsoft.com>).

**ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ.** Для выбора наиболее подходящего метода анализа и оптимальных условий разделения органических веществ, оценки возможности регулировать селективность разделения за счет изменения кислотности среды необходимыми и важными характеристиками являются константы их диссоциации. В работе [24] описана попытка определить константы диссоциации 2,4-ДНФ-аминокислот в во-

дных растворах. Отмечалось, что метод потенциометрического титрования в водных растворах неприменим для определения констант диссоциации 2,4-ДНФ-аминокислот, поскольку растворимость последних в воде очень низкая [24]. Для исследования протолитических равновесий 2,4-ДНФ-производных  $\alpha$ -аминокислот [24] наиболее подходящим оказался метод спектрофотометрии, основанный на различии спектров поглощения протонированной и депротонированной форм исследуемого вещества [25]. С ростом числа атомов углерода, разделяющих амино- и карбоксильную группу, диссоциация последней все меньше влияет на состояние хромофорной 2,4-ДНФ-группировки, поглощение перестает зависеть от рН, и спектрофотометрический метод определения константы диссоциации теряет информативность. Однако и для 2,4-ДНФ-производных  $\alpha$ -аминокислот различия в спектрах поглощения форм с недиссоциированной и диссоциированной карбоксильной группой невелики: для 2,4-ДНФ-аргинина в водных растворах максимальная разность оптической плотности составляла приблизительно 0.15 [24].

Не дала положительных результатов и попытка спектрофотометрического определения констант диссоциации 2,4-ДНФ-глицина в мицеллярных растворах 0.10 М ДСН [12]. Максимумы поглощения недиссоциированной и диссоциированной форм 2,4-ДНФ-глицина различались лишь на 10 нм. Максимальная разность значений оптической плотности в спектрах двух протолитических форм не превышала 0.08, что было недостаточно для надежного определения значений констант диссоциации.

С другой стороны, в мицеллярных растворах поверхностно-активных веществ растворимость многих соединений значительно повышается за счет солюбилизации [26]. Оказалось, что, растворяя 2,4-ДНФ-аминокислоты в 0.10 М ДСН, можно достичь концентрации производной, достаточной для потенциометрического определения константы диссоциации [25]. Типичная кривая титрования растворов 2,4-ДНФ-производных  $\alpha$ -аминокислот в присутствии мицелл ДСН представлена на рисунке. Результаты определения констант диссоциации по карбоксильной группе 2,4-ДНФ-аминокислот и соответствующих  $\alpha$ -аминокислот по данным потенциометрического титрования приведены в таблице, где



Зависимость рН титруемого раствора 2,4-ДНФ-производной  $\alpha$ -аминокислоты от степени оттитрованности ( $\tau$ ) в мицеллярных растворах додецилсульфата натрия.

$P=0.95$  — значение доверительной вероятности,  $n=3$  — число параллельных определений.

Константы диссоциации протолитов, определяемые в водных растворах, являются смешанными, так как по условиям градуировки рН-метрической ячейки включают активность ионов  $H^+$ . Диссоциацию протолитов в мицеллярных растворах принято описывать “кажущимися” константами диссоциации,  $K_a^{app}$ , которые отображают частичное связывание сопряженных протолитических форм мицеллярной псевдофазой [27, 28] и соответствуют следующему выражению закона действия масс (ЗДМ):

**Показатели констант диссоциации свободных аминокислот и их 2,4-ДНФ производных в водных и мицеллярных растворах 0.10 М ДСН**

| Соединение        | $pK_a$ ,<br>0.10 М NaCl | $pK_a^{app}$ ,<br>0.10 М ДСН | $\Delta pK_a =$<br>$pK_a^{app} - pK_a$ |
|-------------------|-------------------------|------------------------------|--|
|                   | $P=0.95, n=3$           |                              |  |
| Пролин            | $2.22 \pm 0.12$ [29]    | $3.58 \pm 0.06$ [29]         | 1.36                                   |
| Аспарагин         | 2.14 [30]               | $2.69 \pm 0.12$              | 0.55                                   |
| $\alpha$ -Аланин  | $2.62 \pm 0.03$ [31]    | $3.51 \pm 0.02$ [31]         | 0.89                                   |
| 2,4-ДНФ-пролин    | $3.84 \pm 0.20^*$       | $4.86 \pm 0.19$              | 1.02                                   |
|                   | $2.8 \pm 0.1$ [24]      |                              |  |
| 2,4-ДНФ-аспарагин | $3.55 \pm 0.10^*$       | $4.12 \pm 0.19$              | 0.57                                   |
|                   | $3.2 \pm 0.1$ [24]      |                              |  |
| 2,4-ДНФ-аланин    | $3.77 \pm 0.20^*$       | $4.90 \pm 0.02$              | 1.13                                   |
|                   | $3.5 \pm 0.1$ [24]      |                              |  |

\*  $pK_a$ , вычисленные по программе ACDLabs.

$$K_a^{app} = \frac{10^{-pH} [A]_{tot}}{[HA]_{tot}}$$

где  $10^{-pH}$  — активность ионов  $H^+$ , определяемая потенциометрически в водной фазе;  $[A]_{tot} = [A]_w + [A]_m$  — суммарная концентрация депротонированной формы в водной фазе и мицеллярной псевдофазе, отнесенная к объему раствора в целом;  $[HA]_{tot} = [HA]_w + [HA]_m$  — суммарная концентрация протонированной формы в водной фазе (индекс  $w$ ) и мицеллярной псевдофазе (индекс  $m$ ), отнесенная к объему раствора в целом.

Данные, полученные в мицеллярных растворах ДСН, свидетельствуют о том, что введение 2,4-ДНФ-заместителя по аминогруппе ослабляет диссоциацию карбоксильной группы аминокислот, что соответствует литературным данным для водных растворов [24]. Различие в свойствах аминокислоты и ее 2,4-ДНФ-производной в мицеллярном растворе наиболее заметно в случае аспарагина. Для свободной аминокислоты значение  $pK_a^{app}$  равно 2.69, тогда как для 2,4-ДНФ-аспарагина — 4.12.

Для оценки влияния мицеллярной среды использованы расчетные и литературные данные о константах диссоциации 2,4-ДНФ-аминокислот в водных растворах. Как видно из таблицы, в мицеллярных растворах ДСН уменьшается сила как свободных аминокислот, так и 2,4-ДНФ-аминокислот, что согласуется с правилом Хартли [32] и объясняется более сильным связыванием недиссоциированных форм протолитов мицеллами анионного ПАВ.

Разницу между значением показателя константы диссоциации в мицеллярном и водном растворе  $\Delta pK_a = pK_a^{app} - pK_a$  называют эффектом мицеллярной среды [28]. Интересно, что по величине эффекта среды свободные аминокислоты и их 2,4-ДНФ-производные выстраиваются в различной последовательности:  $\Delta pK_a$  аминокислот возрастает в ряду аспарагин < аланин < пролин, а  $\Delta pK_a$  их 2,4-ДНФ-производных увеличивается в ряду аспарагин < пролин < аланин (таблица). При этом для аспарагина и его 2,4-ДНФ-производного значение величины эффекта среды,  $\Delta pK_a$ , практически одинаково.

**ВЫВОДЫ.** Исследование протолитических свойств 2,4-динитрофенильных производных аланина, пролина, аспарагина показало, что в мицеллярных растворах додецилсульфата натрия наблюдается уменьшение силы 2,4-динитрофенильных производных аминокислот, также как и свободных аминокислот. Влияние мицеллярной среды усиливается в ряду аспарагин < пролин < аланин.

**РЕЗЮМЕ.** Визначено константи дисоціації 2,4-динітрофенільних похідних  $\alpha$ -амінокислот та співставлено їх із протолітичними властивостями відповідних  $\alpha$ -амінокислот у мицелярних розчинах додецилсульфату натрію. Виявлено ефект мицелярного середовища на значення показників констант дисоціації 2,4-динітрофенільних похідних  $\alpha$ -амінокислот.

**SUMMARY.** Dissociation constants of 2,4-dinitrophenyl derivatives of  $\alpha$ -amino acids in micellar solutions of sodium dodecyl sulfate were determined. Protolytic properties of  $\alpha$ -amino acids and their 2,4-dinitrophenyl derivatives were compared. The effect of micellar medium on the values of the dissociation constants of 2,4-dinitrophenyl derivatives of  $\alpha$ -amino acids was revealed.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. *Boichenko A.P., Berthod A.* // J. Chromatogr. A. -2010. -**1217**, № 36. -P. 5665—5673.
2. *Berthod A., Garcia-Alvarez-Coque M.C.* Micellar Liquid Chromatography. -New York: Marcel Dekker, 2000.
3. *Kulikov A.U., Galat M.N., Boichenko A.P.* // Chromatographia. -2009. -**70**, № 3-4. -P. 371—379.
4. *Loginova L.P., Kulikov A.U., Yakovleva E.Yu., Boichenko A.P.* // Ibid. -2008. -**67**, № 78. -P. 615—620.
5. *Якубке Х.-Д., Ешкайт Х.* Аминокислоты, пептиды, белки. -М.: Мир, 1985.
6. *Fountoulakis M., Lahm H.* // J. Chromatogr. A. -1998. -**826**, № 2. -P. 109—134.
7. *Woo K.-L., Hwang Q.-C., Kim H.-S.* // Ibid. -1996. -**740**, № 1. -P. 31—40.
8. *Albala-Hurtado S., Bover-Cid S., Izquierdo-Pulido M. et al.* // J. Chromatogr. A. -1997. -**778**, № 1-2. -P. 235—241.
9. *Molnar-Perl I.* // Ibid. -2000. -**891**, № 1. -P. 1—32.
10. *Khuhavar M.Y., Rajper A.D.* // Chromatographia. -2003. -**58**, № 7-8. -P. 479—482.
11. *Campanella L., Crescentini G., Avino P.* // J. Chromatogr. A. -1999. -**833**, № 2. -P. 137—145.
12. *Бойченко А.П., Чернышева О.С., Куликов А.Ю., Логінова Л.П.* // Журн. прикл. хімії. -2011. -**84**, вып. 6. -С. 933—939.
13. *Sanger F.* // Biochem. J. -1945. -**39**, № 5. -P. 507—515.
14. *Sanger F., Thompson E.O.P.* // Ibid. -1953. -**53**, № 3. -P. 353—366.
15. *Wang F., Chen X., Chen Q. et al.* // J. Chromatogr. A. -2000. -**883**, № 1-2. -P. 113—118.
16. *Boichenko A.P., Kulikov A.U., Loginova L.P., Iwashchenko A.L.* // Ibid. -2007. -**1157**, № 1-2. -P. 252—259.
17. *Mills G.L.* // Biochem J. -1952. -**50**, № 5. -P. 707—712.
18. *Blackburn S.* // Ibid. -1949. -**45**, № 5. -P. 579—584.
19. *Rosmus J., Deyl Z.* // J. Chromatogr. -1972. -**70**, № 2. -P. 221—339.
20. *Armarego W.L.F., Perrin D.D.* Purification of laboratory chemicals. -Great Britain, Oxford: Butterworth-Heinemann, 2000.
21. *Kolthoff I.M., Sandell E.B.* Textbook of quantitative inorganic analysis. -New York: The Macmillan comp., 1938.
22. *Бугаевский А.А., Никушина Л.Е., Мутин А.В. и др.* // Укр. хім. журн. -1990. -**56**, № 7. -С. 775—778.
23. *Boichenko A.P., Markov V.V., Le Kong H. et al.* // Central Europ. J. Chem. -2009. -**7**, № 1. -P. 8—13.
24. *Ramachandran L.K., Sastry L.V.S.* // Biochemistry. -1962. -**1**, № 1. -P. 75—78.
25. *Альберт А., Сержент Е.* Константы ионизации кислот и оснований. -Л.: Химия, 1964.
26. *Christian S.D., Scamehorn J.F.* Solubilization in surfactant aggregates. -New York; Basel; Hong Kong: Marcel Dekker, 1995.
27. *Cong H.L., Boichenko A.P., Levin I.V. et al.* // J. Mol. Liq. -2010. -**154**, № 2-3. -P. 76—81.
28. *Mchedlov-Petrosyan N.O.* // Pure Appl. Chem. -2008. -**80**, № 7. -P. 1459—1510.
29. *Ле Конг Х., Логінова Л.П., Чернышева О.С. и др.* // Вісн. Харк. нац. ун-ту. Хімія. -2008. -**16**, вып. 39. -С. 76—85.
30. *Berthon G.* // Pure & Appl. Chem. -1995. -**67**, № 7. -P. 1117—1240.
31. *Чернышева О.С., Абдулрахман Х., Бойченко О.П., Логінова Л.П.* // Вісн. нац. ун-ту “Львівська політехніка”. -2011. -№ 700. -С. 147—152.
32. *Hartley G.S.* // Trans. Farad. Soc. -1934. -**30**. -P. 444—450.