

ИОННЫЕ РАВНОВЕСИЯ В РАСТВОРАХ АМИНОКИСЛОТ ПРИ РАЗЛИЧНЫХ ТЕМПЕРАТУРАХ

© 2003 г. В.Ю. Хохлов, В.Ф. Селеменев, О.Н. Хохлова, А.А. Загородний*

Воронежский государственный университет

* Королевский химико-технологический институт, Стокгольм, Швеция

Исследовано влияние температурного фактора на ионизацию аминокислот в воде. Повышение температуры ведет к увеличению констант диссоциации всех функциональных групп в молекуле. Особенности процессов ионизации каждой аминокислоты при повышенных температурах определяются строением бокового радикала. Оценены термодинамические характеристики ионизации аминокислот в воде и возможность взаимных переходов между различными ионными формами исследуемых цвиттерлитов.

ВВЕДЕНИЕ

В связи с применением аминокислотных добавок в фармацевтической, пищевой промышленности, сельском хозяйстве получение аминокислот в чистом виде является важной практической задачей, решение которой возможно при использовании различных методов. Оптимизировать условия выделения и разделения веществ можно, в ряде случаев, варьируя температуру. Температурный фактор оказывает влияние прежде всего на диссоциацию функциональных групп участников процесса и, как следствие, на равновесные характеристики разделения.

Протолитические равновесия аминокислот в разных условиях (состав растворителя, ионная сила, температура и др.) изучались отечественными и зарубежными авторами различными методами (потенциометрическим, ЭДС, ионофоретическим и др.) [1-7], однако, влияние температуры на константы указанных равновесий в воде изучено недостаточно.

В данной работе показано влияние температуры на ионизацию алифатических (глицин, глутаминовая кислота), ароматических (фенилаланин, тирозин), гетероциклических (гистидин) аминокислот, сопутствующих друг другу при микробиологическом синтезе. Исследования проводились при 293, 313, 333 К, что обусловлено применением данного температурного интервала в технологии аминокислотных производств [8].

ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

В соответствии с теорией Бренстеда кислотами являются вещества, способные отщеплять протоны. У слабых кислот тенденция к отщеплению протона выражена незначительно, т.е. состояние равновесия

реакции $\text{HA} \rightleftharpoons \text{H}^+ + \text{A}^-$ сдвинуто в левую сторону. С учетом того, что $[\text{H}^+] = [\text{A}^-]$, а $[\text{HA}] = C - [\text{H}^+]$ константа диссоциации записывается как

$$K_a = \frac{[\text{H}^+]^2}{C - [\text{H}^+]}, \quad (1)$$

где K_a - константа диссоциации кислоты, C - концентрация растворенного вещества, $[\text{HA}]$ - концентрация недиссоциированных молекул, $[\text{H}^+]$ и $[\text{A}^-]$ - концентрации протона и аниона, образующихся при диссоциации. Величиной $[\text{H}^+]$ в знаменателе уравнения (1) можно пренебречь, т.к. кислоты являются слабыми и доля диссоциированных молекул мала. После дальнейших преобразований получим

$$pH = \frac{1}{2} pK_a - \frac{1}{2} \lg C. \quad (2)$$

Аналогичные рассуждения для слабых оснований, являющихся акцепторами протона $\text{B} + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{BH}^+ + \text{OH}^-$, приведут к уравнению

$$pH = 14 - \frac{1}{2} pK_b - \frac{1}{2} \lg C, \quad (3)$$

где K_b - константа основности, C - концентрация растворенного вещества [9].

В молекуле аминокислот имеется как кислотная группировка $-\text{COOH}$, так и основная $-\text{NH}_2$, поэтому эти вещества могут как отдавать протон, выступая кислотами, так и принимать H^+ , выступая основаниями. В определенных условиях они могут существовать в виде биполярного иона, поэтому по теории Бренстеда они являются амфолитами. К ним применимы уравнения (2) и (3), которые положены в основу метода определения констант диссоциации функциональных групп аминокислот.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Константы диссоциации определяли методом ЭДС. Электролитическая ячейка состояла из стеклянного и хлорсеребряного электродов, измерения проводили с помощью потенциометра ЭВ-74 и М-100, которые работали в режиме милливольтметра. Калибровку приборов проводили по буферным растворам с известным pH при температурах 293, 313, 333 K, поддерживаемых с помощью термостата UTU - 2. По полученным данным строились графики E=f(pH) для каждой температуры.

Последовательным разбавлением готовили серию растворов аминокислот с концентрациями в пределах растворимости каждого цвиттерита; pH растворов имел величину, необходимую для ионизации конкретной функциональной группы (кислая среда для протонирования -NH_2 группировки, щелочная - для диссоциации -COOH группы); ионная сила во всех случаях была постоянной. Потенциал растворов аминокислот измеряли при исследуемых температурах и строили графики зависимости pH=f(C), которые обрабатывали по методу наименьших квадратов.

Из уравнений (2) и (3) видно, что при $\lg C=0$ pH раствора определяется величиной рK, поэтому экстраполяцией полученных графиков pH=f(C) на $\lg C=0$ и определялись значения рK функциональных групп аминокислот. Ошибка эксперимента не превысила 5 %.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Изменение величин рK ионизации исследуемых аминокислот при действии температурного фактора приведено в таблице. С увеличением температуры происходит снижение рK как амино- и карбоксильных групп, так и функциональных групп бокового радикала, что свидетельствует об увеличении степени их ионизации и согласуется с теорией слабых электролитов [10].

Необходимо отметить, что температурный эффект более ярко проявляется для аминогрупп, причем степень влияния температурного фактора зависит от структуры бокового радикала. Дополнительные функциональные группы в радикале тирозина, гистидина и глутаминовой кислоты оказывают определенное стабилизирующее влияние на состояние аминогрупп за счет перераспределения электронной плотности в молекулах. Это обусловливает меньшую степень протонирования -NH_2 группировки этих аминокислот, чем у фенилаланина и глицина, особенно при повышении температуры. Энергетическое состояние карбоксильной группы приблизительно одинаково для всех рассматриваемых аминокислот и влияние температурного фактора на ее диссоциацию мало [7].

Для оценки процессов ионизации аминокислот при различных температурах были рассчитаны термодинамические параметры процессов ионизации. Для этого использованы уравнения:

$$\Delta G = -RT \ln K, \quad (4)$$

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S. \quad (5)$$

Таблица

Значения физико-химических параметров процессов ионизации аминокислот в воде при различных температурах

| Амино- кислота | Формула | Функцио- нальная группа | рK | | | | ΔG, кДж/моль | | | ΔH, кДж/ моль K | ΔS, Дж/ моль K | |
|------------------------------|---------|-------------------------------|--------------------------------------|-----------------------|-----------------------|----------------------|----------------------|-----------------------|----------------------|-----------------------|----------------------|-------------------------|
| | | | 293 K | 298*K [12] | 313 K | 333 K | 293K | 313 K | 333K | | | |
| Глицин | | Gly | -COOH -NH ₂ | 2,37 9,65 | 2,35 9,60 | 2,11 8,40 | 1,76 8,01 | 13,3 54,1 | 12,6 50,3 | 11,2 51,0 | 29,2 78,4 | 53,5 84,7 |
| Фенилал- анин | | Phe | -COOH -NH ₂ | 2,62 9,30 | 2,58 9,24 | 2,32 8,22 | 2,21 7,19 | 14,7 52,1 | 13,9 49,2 | 14,1 45,8 | 19,6 100,8 | 17,4 105,2 |
| Тирозин | | Tyr | -COOH -NH ₂ R | 2,25 10,15 9,15 | 2,20 10,07 9,11 | 2,05 9,97 8,98 | 1,94 56,8 8,83 | 12,6 60,2 51,48 | 12,3 63,5 53,7 | 12,4 56,2 56,2 | 14,8 8,6 15,3 | 7,7 -16,5 -122,8 |
| Глутами- новая кислота | | Glu | -COOH -NH ₂ R | 2,12 9,47 4,21 | 2,10 9,47 4,07 | 2,08 8,93 4,02 | 2,00 8,60 3,97 | 11,9 53,0 23,6 | 12,4 53,4 24,1 | 12,7 54,7 25,3 | 5,73 41,6 11,6 | -21,2 -40,0 -41,1 |
| Гистидин | | Gys | -COOH -NH ₂ R R' | 1,80 9,27 5,94 | 1,77 9,18 5,92 | 1,53 8,90 5,88 | 1,46 8,73 5,81 | 10,1 52,0 33,3 | 9,2 53,2 35,2 | 9,3 55,6 37,0 | 16,3 25,8 6,2 | 21,5 -88,8 -92,4 |

Рассчитанные по уравнению (4) величины ΔG (Табл.) свидетельствуют о том, что процесс ионизации не является самопроизвольным. Исходя из уравнений (4) и (5), путем преобразований получено уравнение зависимости величины pK от обратной температуры

$$pK = \frac{\Delta H}{2.3RT} - \frac{\Delta S}{2.3R}. \quad (6)$$

Зависимость pK от обратной температуры в данном интервале аппроксимируется прямыми. Необходимо отметить, что для водных растворов в ряде работ эта линейность подтверждается независимыми методами, либо берется за основу [6, 11]. Кроме того, величины pK ионизации при 298 К и 308 К для глицина и фенилаланина [2, 12, 13] подчиняются вышеупомянутой зависимости, полученной нами. В смешанных же растворителях зависимость $pK=f(1/T)$ имеет как линейный, так и нелинейный характер [3, 4].

Из прямолинейного вида рассматриваемых зависимостей следует, что процесс ионизации исследуемых аминокислот в данном интервале температур характеризуется постоянными ΔH и ΔS . Изменение энталпии определяется тангенсом угла наклона прямой и показывает, что изменение температуры на одинаковое число градусов (от 293 до 313 и от 313 до 333 К) в рассматриваемом случае приводит к изменению pK приблизительно на одну и ту же величину.

Величина энтропии характеризует взаимодействие молекул с растворителем и существенно зависит от строения бокового радикала аминокислоты [14, 15]. Для молекул с неполярными боковыми радикалами (фенилаланин) характерно слабое взаимодействие с водой ($\Delta S > 0$), наличие гидрофильного радикала в боковой цепи (тироzin, глутаминовая кислота, гистидин) будет способствовать интенсивному взаимодействию с водой ($\Delta S < 0$). Процесс гид-

ратации молекул аминокислот при повышенных температурах практически не меняется, поскольку не происходит изменения энтропии (Табл.).

Как указывалось ранее, наличие в молекуле аминокислоты кислотной (-COOH) и основной (-NH₂) группировок обуславливает возможность существования катиона, аниона и цвиттериона при определенных величинах pH раствора. При наличии функциональной группы в боковом радикале возможно образование двухзарядного катиона (аниона) аминокислоты. Между различными ионными формами возможны переходы, представленные на Рис.1. Каждый переход, представленный на схеме, характеризуется определенной величиной pK . Величины pK и ΔG для отдельных равновесий, входящих в этот цикл, связаны соотношениями [16]:

$$pK_1 + pK_2 = pK_3, \quad (7), \quad \Delta G_1 + \Delta G_2 = \Delta G_3. \quad (8)$$

Например, для α -аминомонокарбоновых кислот (глицин, фенилаланин), имеющих между карбоксильной и амино-группами один атом водорода, переходы /1/ и /2/ (Рис.1.а) определяются константами ионизации карбоксильной и аминогрупп (Табл. T=293 К) и энергиями Гиббса соответственно $\Delta G^{Phe}_1 = 14,7$ и $\Delta G^{Phe}_2 = 52,1$ кДж/моль, $\Delta G^{Gly}_1 = 13,3$ и $\Delta G^{Gly}_2 = 54,1$ кДж/моль. Переход /3/ катион \rightleftharpoons анион затруднен и осуществляется ступенчато через цвиттерионную форму. Это подтверждается большими значениями величин pK ($pK^{Phe}_3 = 11,92$ и $pK^{Gly}_3 = 11,95$) и величинами энергии Гиббса данного перехода ($\Delta G^{Phe}_3 = 66,80$ и $\Delta G^{Gly}_3 = 67,40$ кДж/моль).

Повышение температуры приводит к усилению процессов ионизации обеих функциональных групп, характеризуемых величинами pK_1 и pK_2 (Табл. T=313 и 333 К). Причем, для перехода /1/ влияние температуры будет сказываться сильнее, чем для перехода /2/. Отсутствие делокализации электронной плотности неподеленной электронной пары атома азота в

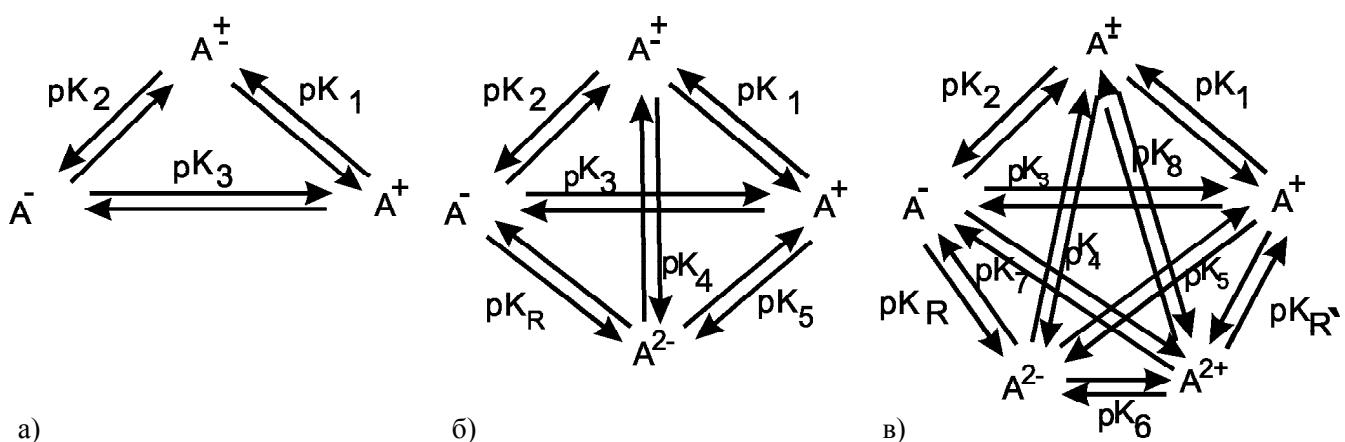


Рис. 1. Схемы возможных переходов между различными ионными формами аминокислот:
 (а) – фенилаланин глицин,
 (б) – тирозин, глутаминовая кислота,
 (в) – гистидин.

молекуле глицина обуславливает активное протонирование NH_2 -группы. Это утверждение справедливо и для фенилаланина. Причем, наличие ароматического кольца в молекуле фенилаланина приводит к увеличению электронной плотности на атоме азота α -аминогруппы, что облегчает его протонирование с увеличением температуры.

При рассмотрении протолиза аминокислот с протоактивными группами в боковом радикале цикл частных состояний более сложен. Для глутаминовой кислоты и тирозина он представлен на Рис.1б. Переходы /1/-/3/ подчиняются закономерностям, описанным выше. Наличие перехода $\text{A}^{\cdot} \leftrightarrow \text{A}^{2\cdot}$, характеризуемого константой ионизации pK_{R} , не исключает возможности протекания процессов $\text{A}^+ \leftrightarrow \text{A}^{2\cdot}$ и $\text{A}^{\pm} \leftrightarrow \text{A}^{2\cdot}$, характеризующихся величинами pK_5 и pK_4 соответственно, где $pK_5 = pK_1 + pK_2 + pK_{\text{R}}$ и $pK_4 = pK_2 + pK_{\text{R}}$. Однако, малые значения констант равновесия ($pK^{\text{Tyr}}_{4,5} > 19$, $pK^{\text{Glu}}_{4,5} > 16$) и большие значения величин свободной энергии ($\Delta G^{\text{Tyr}}_{4,5} > 100$, $\Delta G^{\text{Glu}}_{4,5} > 76$ кДж/моль) свидетельствует о том, что данные процессы являются маловероятными по сравнению с процессами ступенчатой ионизации аминокислот в водных растворах, которые характеризуются величинами констант pK_1 , pK_2 , pK_3 и образование двухзарядного аниона происходит через однозарядный анион.

Для диаминомонокарбоновых кислот (гистидин), способных к образованию так же двухзарядных

катионов, цикл переходных состояний имеет еще более сложный вид, представленный на Рис.1в. Для этих аминокислот равновесие между пятью ионными формами в растворе обуславливает возможность десяти типов переходов между ними. Согласно уравнению (7), pK переходов /3/-/6/ определяются из pK_1 , pK_2 , pK_{R} , $pK_{\text{R}^{\prime}}$ и их величины будут большими, а следовательно, сами переходы менее вероятными. Таким образом, образование двухзарядных ионов этой аминокислоты будет идти ступенчато через образование однозарядных.

Наличие данной ионной формы вещества в растворе оценивается величиной α , которая определяется как отношение концентрации частиц в данной ионной форме к общей концентрации частиц в системе. Зависимость $\alpha = f(pH)$ рассчитывается из величин pK функциональных групп вещества и концентрации H^+ ионов в растворе [9,17]. Увеличение констант ионизации функциональных групп при повышении температуры приводит к изменению областей существования каждой ионной формы аминокислоты (Рис.2). Как видно из рисунка, область существования катионов и анионов расширяется, а область цвиттерионов сужается.

Таким образом, варьируя температуру можно повышать или понижать содержание различных ионных форм аминокислоты в растворе. Особенности ионизации исследуемых цвиттерлитов определяются структурой их бокового радикала. Это позволяет подобрать оптимальный температурный режим разделения конкретной смеси аминокислот.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

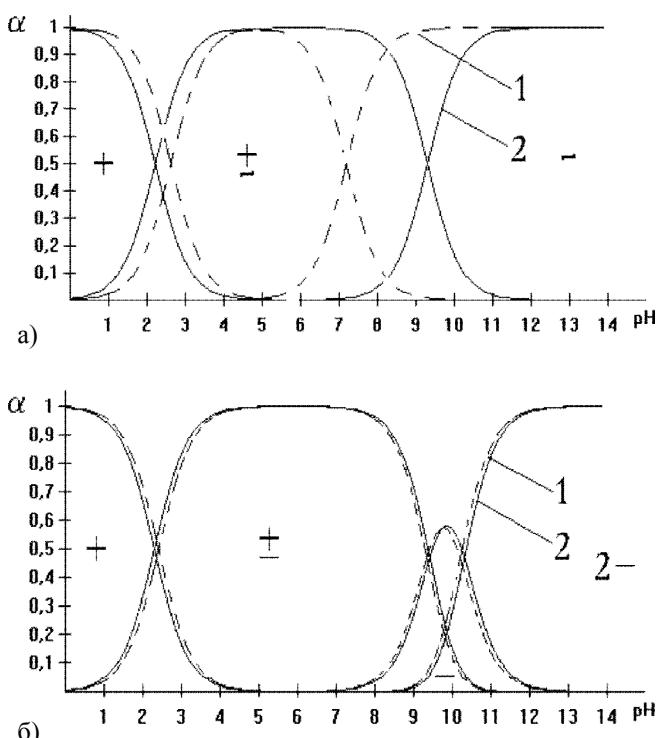


Рис. 2. Изменение содержания ионных форм фенилаланина (а), тирозина (б) при температурах 293 К (—), 333 К (---).

1. Крешков А.П., Танчанов Б.Б., Яровенко А.Н. и др. // ЖФХ. 1982. Т.56. №1. С. 30-33.

2. Singh S., Gupta D., Tewari M. // Electrochimica Acta. 1985. Vol. 30. №1. P.105-107.

3. Yang Jia-Zhen, Men Dian-yuan, Liang Chun-yu // J. Phys. Chem. 1989. Vol.93. №20. P.7248-7252.

4. Курицын Л.В., Калинина Н.В.// ЖФХ. 1990. Т.64. №1. С.119-123.

5. Курицын Л.В., Калинина Н.В. // ЖФХ. 1993. Т.67. №9. С. 1791-1795.

6. Abdelbary H.M., Shehata H.A., F. Ez M. A. et al // J. Indian. Chem. Soc. 1996. Vol.73. №1. P. 25-29.

7. Datta S.C., Lahiri S.C. // J. Indian. Chem. Soc. 1995. Vol.72. №5. P.315-322.

8. Ионообменные методы очистки веществ/Под. ред. Г.А. Чикина и О.Н. Мягкого. Изд-во ВорГУ, 1984. 372с.

9. Пилипенко А.Т., И.В. Пятницкий И.В. Аналитическая химия. М.: Химия, 1990. Кн.1.480с.

10. Харнер Г., Оуэн Б. Физическая химия растворов электролитов/Под ред. А.Ф. Капустинского. М.: Госиноиздат, 1952.628с.

11. *Blandamer J.M., Burgess J., Duce P.P et al // J. Chem. Soc. Faraday Trans.* 1981. Vol. 77. N 9. P.2281-2286.
12. *Гордон А., Форд Р.* Спутник химика. М.: Мир, 1976. 545с.
13. *Brost C.L., Grzegorczyk D.S., Strand S.J. et al // Reactiv and Functional Polymers.* 1997. Vol. 32. N1. P.25-41.
14. *Эдеи-Груз Т.* Явление переноса в водных растворах. М.: Мир. 1976. 595с.
15. *Самойлов О.Я.* Структура водных растворов электролитов и гидратация ионов. М.:АН СССР. 1957.281с.
16. *Крецков А.П., Танчанов Б.Б., Яровенко А.Н. и др.*// Журн. физ. химии. 1980. Т.54. N1. С.105-106.
17. *Selemenev V.F., Chikin G.A., Khokhlov V. Yu.* Interionic and intermolecular interactions in ion-exchange and sorption systems including physiologically active substances // Solvent Extraction and Ion Exchange. 1999 V.17, N4. P.851-925.