

ТЕРМОХИМИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ РЕАКЦИЙ
КИСЛОТНО-ОСНОВНОГО ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ
В ВОДНОМ РАСТВОРЕ L-ГЛУТАТИОНА© 2021 г. А. И. Лыткин^{а,*}, О. Н. Крутова^а, Е. Ю. Тюнина^а, В. В. Черников^а,
Ю. В. Мохова^а, Е. Д. Крутова^а^а Ивановский государственный химико-технологический университет, Иваново, Россия

*e-mail: kdvkonkpd@yandex.ru

Поступила в редакцию 30.11.2020 г.

После доработки 18.01.2021 г.

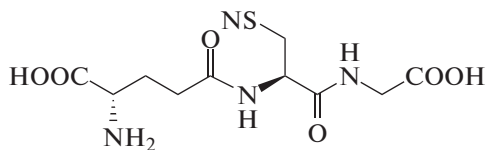
Принята к публикации 19.01.2021 г.

Калориметрическим методом измерены тепловые эффекты взаимодействия раствора L-глутатиона с растворами HNO_3 при температуре 298.15 К и значениях ионной силы 0.5, 1.0 и 1.5 М (фоновый электролит KNO_3). Литературные данные по константам ступенчатой диссоциации L-глутатиона экстраполированы на нулевую ионную силу. Получены следующие значения: $pK_1^0 = 2.05 \pm 0.03$, $pK_2^0 = 3.49 \pm 0.03$, $pK_3^0 = 8.65 \pm 0.05$, $pK_4^0 = 9.60 \pm 0.05$ и рассчитаны ступенчатые константы ионизации пептида при фиксированных значениях ионной силы ($I = 0.5, 1.0, 1.5$ М). Тепловые эффекты диссоциации трипептида рассчитаны с использованием универсальной программы HEAT. Рассчитаны стандартные термодинамические характеристики ($\Delta_r H^\circ$, $\Delta_r G^\circ$, $\Delta_r S^\circ$) реакций кислотно-основного взаимодействия в водных растворах L-глутатиона. Рассмотрено влияние концентрации фонового электролита на энтальпии диссоциации пептида.

Ключевые слова: L-глутатион, трипептиды, калориметрия, энтальпия, растворы

DOI: 10.31857/S0044453721100162

L-Глутатион – трипептид, принимающий активное участие во многих окислительно-восстановительных превращениях в организме человека и животных и обеспечивающий функционирование ряда SH-зависимых ферментов:



В литературе имеется достаточно большое количество данных по константам ионизации глутатиона [1–5]. Эти работы выполнены при различных значениях ионной силы, на фоне отличающихся по своей природе поддерживающих электролитов. Поэтому для сопоставления и анализа литературных данных необходимо для каждого значения ионной силы найти наиболее вероятные величины констант диссоциации. Полученные таким образом константы экстраполировали на нулевую ионную силу с использованием уравнения с одним индивидуальным параметром [6]. Получили следующие значения: $pK_1^0 = 2.05 \pm 0.03$,

$pK_2^0 = 3.49 \pm 0.03$, $pK_3^0 = 8.65 \pm 0.05$, $pK_4^0 = 9.60 \pm 0.05$ и вычислили ступенчатые константы ионизации кислоты при фиксированных значениях ионной силы ($I = 0.5, 1.0, 1.5$ М). Первые два значения pK_1 и pK_2 относятся к процессам диссоциации карбоксильных групп, а величины pK_3 и pK_4 соответствуют тиольной и аминогруппам L-глутатиона. Эти величины в дальнейшем были использованы для подбора условий калориметрических измерений и расчета результатов.

Цель настоящей работы – исследование влияния концентрации фонового электролита на тепловые эффекты диссоциации L-глутатиона путем экспериментального определения энтальпии ионизации глутатиона в водном растворе при 298.15 К и значениях ионной силы 0.5, 1.0 и 1.5 М на фоне нитрата калия; расчет стандартных термодинамических характеристик процессов ступенчатой диссоциации пептида.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали кристаллический препарат L-глутатиона ($\text{C}_{10}\text{H}_{17}\text{O}_6\text{N}_3\text{S}$) марки “SIG-

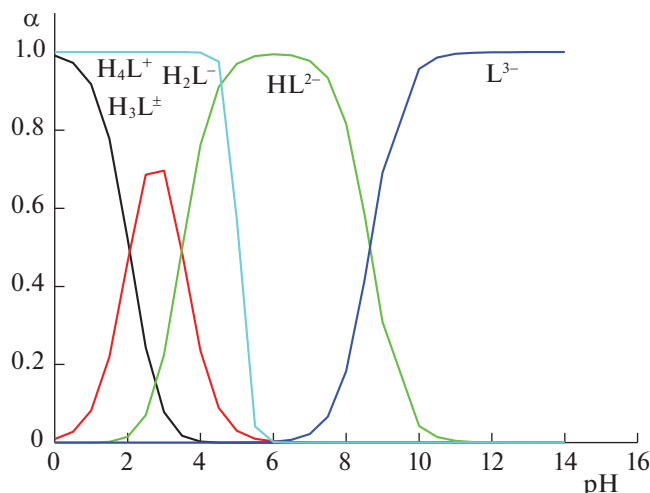
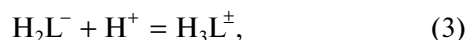
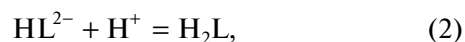
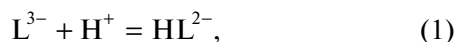


Рис. 1. Диаграмма равновесий в водном растворе глутатиона при 298.15 К.

МА-ALDRICH”, содержание основного компонента >98% (по массе), без дополнительной очистки. Перед использованием кристаллический пептид высушивали при 353 К до постоянной массы. Бескарбонатный раствор КОН и раствор HNO₃ готовили по обычной методике [7] из реактивов марки “х.ч.”. Концентрации устанавливали титриметрическим методом. Препарат нитрата калия квалификации “х.ч.” очищали перекристаллизацией из бидистиллята.

В настоящей работе были измерены теплоты смешения растворов L-глутатиона с растворами HNO₃ в различных интервалах pH на калориметре с изотермической оболочкой и автоматической записью кривой температура–время [8]. Работа калориметрической установки была проверена по общепринятым калориметрическим стандартам – теплоте растворения кристаллического хлорида калия в воде. Препарат KCl очищали двукратной перекристаллизацией реактива марки “х.ч.” из бидистиллята. Согласование экспериментально полученных теплот растворения KCl(кр.) в воде $\Delta_{sol}H_{(\infty H_2O)} = 17.25 \pm 0.06$ кДж/моль с наиболее надежными литературными данными [9] свидетельствует об отсутствии заметной систематической погрешности в работе калориметрической установки. Навески растворов взвешивали на весах марки ВЛР-200 с точностью 2×10^{-4} г.

Процессы последовательного протонирования аниона L³⁻ L-глутатиона в водном растворе можно представить схемой:



Как видно из диаграммы равновесий в водном растворе L-глутатиона (рис. 1), близкие значения констант ступенчатой диссоциации не позволяют выделить такую область pH, где протекал бы только один из процессов. Для того, чтобы подобрать необходимые условия проведения калориметрического опыта, был проведен предварительный расчет по программе “RRSU” [10] с учетом всех протекающих процессов в системе. Поэтому измерялся суммарный тепловой эффект протонирования частиц L³⁻, HL²⁻ и H₂L⁻, H₃L[±], причем подбор условий при проведении эксперимента осуществлялся таким образом, чтобы доля процессов (1), (2) и (3), (4) менялась в серии опытов и ее различие в первом и последнем опыте серии было максимальным.

Измеряли суммарный тепловой эффект присоединения протонов к частицам L³⁻, HL²⁻ и H₂L⁻, H₃L[±] в нескольких интервалах pH и на основании этих данных рассчитывали энтальпии диссоциации по каждой ступени. Измеряли энтальпии взаимодействия L-глутатиона, pH_{нач} 9.5 (концентрация раствора 1.5125 моль/кг) с растворами азотной кислоты различной концентрации (от 0.00465 до 0.06198 моль/л). Раствор минеральной кислоты помещали в калориметрический стакан, а в ампулу – точную навеску раствора L-глутатиона с pH_{нач} 9.5. Величину pH раствора после смешения реагентов (pH_{кон}) изменяли в пределах от 7.2 до 1.5. Измерения проводили при трех значениях ионной силы I = 0.5, 1.0, 1.5 М (KNO₃) и температуре 298.15 К. Также измеряли тепловые эффекты разведения раствора L-глутатиона с pH 9.5 (концентрация раствора 1.5125 моль/кг раствора) в растворах фонового электролита. Поскольку ионная сила, создаваемая L-глутатионом, в стакане после смешения, в серии опытов менялась, в каждом опыте добавляли различное количество фонового электролита. В связи с этим тепловые эффекты разведения измеряли в трех интервалах концентраций KNO₃: 0.4–0.5, 0.9–1.0, 1.4–1.5 моль/л при температуре 298.15 К. Количество опытов в каждой серии было не менее четырех. На основании экспериментальных данных были получены эмпирические выражения, связывающие теплоты разведения с ионной силой раствора для каждого интервала разведений:

$$\Delta H_{dil} = a + bI. \tag{5}$$

Исходные экспериментальные данные для расчета теплот диссоциации глутатиона приведены в табл. 1.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Суммарный тепловой эффект протонирования (процессы (1)–(4)) в ходе калориметрического опыта рассчитывали на моль L-глутатиона:

$$\Delta_r H_{\text{сум}} = \Delta_r H_{\text{см}} - \Delta_r H_{\text{разв}},$$

$$\Delta_r H_{\text{расч}} = \Delta[\text{OH}^-]\Delta H_w + \Delta[\text{L}^{3-}]\Delta_r H_1 + \quad (6)$$

$$+ \Delta[\text{HL}^{2-}]\Delta_r H_2 + \Delta[\text{H}_2\text{L}^-]\Delta_r H_3 + \Delta[\text{H}_3\text{L}^\pm]\Delta_r H_4 / C_{\text{H}_4\text{L}}^0,$$

где $\Delta[\text{OH}^-]$, $\Delta[\text{L}^{3-}]$, $\Delta[\text{HL}^{2-}]$, $\Delta[\text{H}_2\text{L}^-]$ и $\Delta[\text{H}_3\text{L}^\pm]$ – разность конечных и начальных равновесных концентраций соответствующих частиц; $C_{\text{H}_4\text{L}}^0$ – общая концентрация L-глутатиона с учетом разведения до объема калориметрической жидкости; $\Delta_r H_4$, $\Delta_r H_3$, $\Delta_r H_2$, $\Delta_r H_1$ – мольные тепловые эффекты процессов протонирования частиц H_3L^\pm , H_2L^- , HL^{2-} и L^{3-} соответственно; ΔH_w – мольный тепловой эффект нейтрализации сильной кислоты сильным основанием. Вклад последнего процесса не превышал 0.01% от экспериментально измеренной величины.

На основании экспериментальных данных, представленных в табл. 1, осуществляли поиск ступенчатых теплот ионизации. Расчет выполняли на по программе “HEAT” [11]. Полученные величины представлены в табл. 2. Погрешности в величинах $\Delta_{\text{дис}}H$ увеличены по сравнению с вычисленными по методу наименьших квадратов, поскольку погрешность работы установки не позволяет дать их меньше, чем ± 0.2 кДж/моль.

Стандартные тепловые эффекты ступенчатой ионизации трипептида были найдены экстраполяцией полученных величин к нулевой ионной силе раствора по уравнению [6]:

$$\Delta H - \Delta Z^2 \Psi(I) = \Delta H^\circ + bI. \quad (7)$$

Точки вполне удовлетворительно укладываются на прямую, которая отсекает на оси ординат отрезок, равный тепловому эффекту диссоциации при нулевой ионной силе. Оптимальное положение прямой найдено по методу наименьших квадратов. Стандартные энтальпии ступенчатой диссоциации L-глутатиона приведены в табл. 2.

Для анализа данных по термодинамике реакций кислотно-основного взаимодействия и комплексообразования с биолигандами оказывается полезным подход, основанный на представлениях Герни, подробно описанный в работе [12]. Изменение энтальпии можно представить в виде суммы температурно-зависимого ($\Delta_r H_3$) и температурно-независимого ($\Delta_r H_{\text{H}_3}$) слагаемых:

$$\Delta_r H = \Delta_r H_3 + \Delta_r H_{\text{H}_3}. \quad (8)$$

В работе [12] было предложено разделить протонноакцепторные частицы на две группы в зависимости от величины вклада $\Delta_r H_{\text{H}_3} / \Delta_r G_{\text{H}_3}$

Таблица 1. Исходные экспериментальные данные по теплотам взаимодействия раствора глутатиона ($C = 1.5125$ моль/кг) с раствором HNO_3 (от 0.00465 до 0.06198 моль/л) при $T = 298.15$ К ($\Delta = \Delta_r H_{\text{см}} - \Delta_r H_{\text{разв}}$, кДж/моль)

C_{HNO_3} , моль/л	$I = 0.5$ моль/л		$I = 1.0$ моль/л		$I = 1.5$ моль/л	
	$m_{\text{пеп}}$, г	Δ	$m_{\text{пеп}}$, г	Δ	$m_{\text{пеп}}$, г	Δ
0.00478	0.4945	0.625	0.4998	0.862	0.5023	0.902
0.00910	0.4965	1.786	0.4993	1.829	0.4994	2.210
0.01295	0.5001	2.253	0.5010	3.107	0.5012	3.508
0.01840	0.4982	3.126	0.4984	3.996	0.5013	4.726
0.02523	0.5018	4.456	0.4997	4.199	0.5013	5.860
0.02788	0.5006	5.594	0.5028	6.835	0.5012	7.364
0.03195	0.4990	6.608	0.4989	7.075	0.4999	8.450
0.03200	0.5016	7.442	0.4993	8.246	0.5015	9.945
0.03765	0.5018	8.524	0.5001	9.342	0.5014	10.902
0.04120	0.5001	9.101	0.4993	10.653	0.5011	11.994
0.04874	0.4996	10.525	0.5016	11.672	0.5012	12.985
0.05368	0.4991	13.724	0.5018	12.811	0.5011	14.971

Первая группа характеризуется высоким значением данного вклада. Сюда относятся все частицы, содержащие аминокгруппу. Численные значения вклада $\Delta_r H_{\text{H}_3} / \Delta_r G_{\text{H}_3}$ при протонировании частиц этого типа составляет, как правило, 30–40 кДж/моль и больше. Эту группу называют неэлектростатической. Значение зависящего от температуры вклада при протонировании частиц этого типа невелико.

У частиц второй группы, протонирование которых происходит через кислород, величина независящего от температуры вклада много меньше и лишь в редких случаях превышает 12 кДж/моль. Примерно ту же величину составляет у частиц этой группы и зависящий от температуры вклад $\Delta_r H_3$.

В нашем случае молекула пептида содержит обе эти функциональные группы; протонирование – NR_2 происходит, очевидно, как у частиц первой группы ($\Delta_r H_{\text{H}_3} = 50.49$ кДж/моль), а протонирование кислородсодержащего фрагмента – как у частиц второй группы ($\Delta_r H_{\text{H}_3} = -2.89$ кДж/моль).

При переходе от аминокислот к пептидам ослабевает действие индукционного эффекта, так как аминокгруппа в пептидах отделена от карбоксильной группы большим количеством углеродных атомов, чем в аминокислотах. Ослабление действия индукционного эффекта при переходе

Таблица 2. Термодинамические характеристики процессов ступенчатой диссоциации глутатиона при $T = 298.15$ К и различных значениях ионной силы

I, M	pK	$\Delta G,$ кДж/моль	$\Delta_r H,$ кДж/моль	$\Delta S,$ Дж/(моль К)
$H_4L^+ = H_3L^\pm + H^+$				
0	2.05 ± 0.01	11.7 ± 0.06	-1.5 ± 0.3	44.3 ± 0.9
0.5	2.14 ± 0.05	12.2 ± 0.3	-1.1 ± 0.2	44.7 ± 1.2
1.0	2.19 ± 0.05	12.5 ± 0.3	-0.7 ± 0.2	44.3 ± 1.1
1.5	2.31 ± 0.05	13.2 ± 0.3	-0.3 ± 0.2	45.3 ± 1.1
$H_3L^\pm = H_2L^- + H^+$				
0	3.49 ± 0.01	19.9 ± 0.06	-2.7 ± 0.3	75.7 ± 0.9
0.5	3.62 ± 0.05	20.7 ± 0.3	-2.2 ± 0.2	76.7 ± 1.1
1.0	3.75 ± 0.05	21.4 ± 0.3	-1.8 ± 0.2	77.6 ± 1.1
1.5	3.86 ± 0.05	22.0 ± 0.3	-1.3 ± 0.2	78.1 ± 1.1
$H_2L^- = HL^{2-} + H^+$				
0	8.65 ± 0.01	49.4 ± 0.06	39.4 ± 0.3	-33.5 ± 0.9
0.5	8.72 ± 0.05	49.8 ± 0.3	40.4 ± 0.2	-31.4 ± 1.1
1.0	8.92 ± 0.05	50.9 ± 0.3	41.6 ± 0.2	-31.1 ± 1.1
1.5	9.06 ± 0.05	51.7 ± 0.3	42.8 ± 0.2	-29.8 ± 1.1
$HL^{2-} = L^{3-} + H^+$				
0	9.60 ± 0.01	54.8 ± 0.06	42.1 ± 0.3	-42.4 ± 0.9
0.5	9.71 ± 0.05	55.4 ± 0.3	43.7 ± 0.2	-39.1 ± 1.1
1.0	9.82 ± 0.05	56.0 ± 0.3	45.3 ± 0.2	-36.1 ± 1.1
1.5	9.99 ± 0.05	57.0 ± 0.3	46.8 ± 0.2	-34.1 ± 1.1

от аминокислот к пептидам ведет к ослаблению азот-водородной связи в последних и, как следствие, заряженные аминогруппы пептидов могут связывать больше воды, чем NH_3^+ -группа в аминокислоте. Это проявляется, в частности, в том, что ΔS_1^0 при диссоциации пептидов больше по

абсолютной величине, чем ΔS_1^0 при диссоциации аминокислот [13].

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ и Администрации Ивановской области в рамках научного проекта № 18-43-370018.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Bugarcic Z., Jancic D., Shoukry A., Shoukry M. // Monatsh. Chem. 2004. V. 135. p. 151. <https://doi.org/10.1007/s00706-003-0091-4>
2. Bugarcic Z., Soldatovic T., Jelic R. // J. Chem. Soc., Dalton Trans. 2004. P. 3869. <https://doi.org/10.1039/B411168K>
3. Rey N., Howarth O., Pereira-Maia E. // J. Inorg. Biochem. 2004. V. 98. P. 1151. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2004.03.010>
4. Pessoa J., Tomaz I., Kiss T. et al. // J. Biol. Inorg. Chem. 2002. V. 7. P. 225. <https://doi.org/10.1007/s007750100289>
5. Armas M., Mederos A., Brito F. // Polyhedron. 2001. V. 20. P. 799. [https://doi.org/10.1016/S0277-5387\(01\)00694-5](https://doi.org/10.1016/S0277-5387(01)00694-5)
6. Васильев В.П. Термодинамические свойства растворов электролитов. М.: Высшая школа, 1982. С. 200, 313.
7. Коростелев П.П. Приготовление растворов для химико-аналитических работ. М.: Изд-во АН СССР, 1962. 398 с.
8. Lytkin A.I., Chernikov V.V., Krutova O.N., Skvortsov I.A. // J. Thermal Analysis and Calorimetry. 2017. V. 130 (1). P. 457. <https://doi.org/10.1007/s-10973-017-6134>
9. Archer D.G. // J. Phys. Chem. Ref. Data. 1999. V. 28. № 1. P. 1. <https://doi.org/10.1063/1.556034>
10. Meshkov A.N., Gamov G.A. // Talanta. 2019. V. 198. P. 200. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2019.01.107>
11. Бородин В.А., Васильев В.П., Козловский Е.В. // Математические задачи химической термодинамики. Новосибирск: Наука, 1985. 219 с.
12. Васильев В.П. // Журн. неорганической химии. 1984. Т. 29. № 11. С. 2785
13. Lytkin A.I., Barannikov V.P., Badelin V.G., Krutova O.N. // J. Therm. Anal. and Calorimetry. 2020. V. 139. № 6. P. 3683–3689. <https://doi.org/10.1007/s10973-019-08604-y>