

**ФИЗИЧЕСКАЯ ХИМИЯ
РАСТВОРОВ**

УДК 541.11:536.7

**ТЕРМОДИНАМИКА СТУПЕНЧАТОЙ ДИССОЦИИИ
D,L-АЛАНИЛ-D,L-ФЕНИЛАЛАНИНА В ВОДНОМ РАСТВОРЕ**

© 2022 г. А. И. Лыткин^а, В. В. Черников^а, О. Н. Крутова^{а,*}, П. Д. Крутов^а, Р. А. Романов^а^аИвановский государственный химико-технологический университет, Иваново, Россия

*e-mail: kdvkonkpd@yandex.ru

Поступила в редакцию 11.12.2021 г.

После доработки 03.02.2022 г.

Принята к публикации 04.02.2022 г.

Калориметрическим методом определены теплоты взаимодействия D,L-аланил-D,L-фенилаланина с растворами азотной кислоты и гидроксида калия при 298.15 К и значениях ионной силы раствора 0.5, 0.75 и 1.0 в присутствии KNO₃. Рассчитаны стандартные термодинамические характеристики ($\Delta_r H^\circ$, $\Delta_r G^\circ$, $\Delta_r S^\circ$) реакций кислотно-основного взаимодействия в водных растворах D,L-аланил-D,L-фенилаланина. Рассмотрено влияние концентрации фонового электролита на теплоты диссоциации D,L-аланил-D,L-фенилаланина. Проведен сравнительный анализ стандартных термодинамических характеристик ступенчатой диссоциации L-фенилаланина и D,L-аланил-D,L-фенилаланина с учетом современных представлений о структуре и физико-химических свойствах этих соединений и их растворов.

Ключевые слова: D,L-аланил-D,L-фенилаланин, пептиды, калориметрия, энтальпия, растворы

DOI: 10.31857/S0044453722080131

Кислотно-основные свойства D,L-аланил-D,L-фенилаланина (HL[±]) вследствие его дипольности сильно зависят от pH среды. В водном растворе аланил-фенилаланин диссоциирует по следующей схеме:



В литературе имеется большое количество данных по константам ионизации пептида [1–5] (табл. 1). 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 по методу наименьших квадратов с использованием уравнения с одним индивидуальным параметром [6]. Получили значения $pK_1^0 = 2.98 \pm 0.03$, $pK_2^0 = 8.13 \pm 0.03$, и вычислили ступенчатые константы ионизации пептида при фиксированных значениях ионной силы ($I = 0.5, 0.75$ и 1.0). Эти величины в дальнейшем были использованы для подбора оптимальных

условий калориметрических измерений и расчета результатов.

Данные по теплотам ступенчатой диссоциации D,L-аланил-D,L-фенилаланина весьма немногочисленны, единственная работа [4], где авторы калориметрическим методом определяют величины $\Delta H_1^0 = 0.21$ кДж/моль и $\Delta H_2^0 = 42.97$ кДж/моль при единственном значении температуры 298.15 К и ионной силы раствора 0.1 на фоне нитрата калия.

Цель настоящей работы – изучение влияния концентрации фонового электролита на тепловые эффекты диссоциации D,L-аланил-D,L-фе-

Таблица 1. Литературные данные о константах диссоциации D,L-аланил-D,L-фенилаланина (методы: потенциометрический (I) и калориметрический (II), I – ионная сила (KNO₃))

Метод	I, M	T, K	pK_1	pK_2	Ссылка
I	0.1	298	3.24	7.92	[1]
I	0.1	308	3.67	8.18	[2]
		318	3.60	7.85	
I	0.1	273	3.15	8.77	[3]
II	0.1	298	3.14	7.93	[4]
I	0.5	293	3.33	7.94	[5]

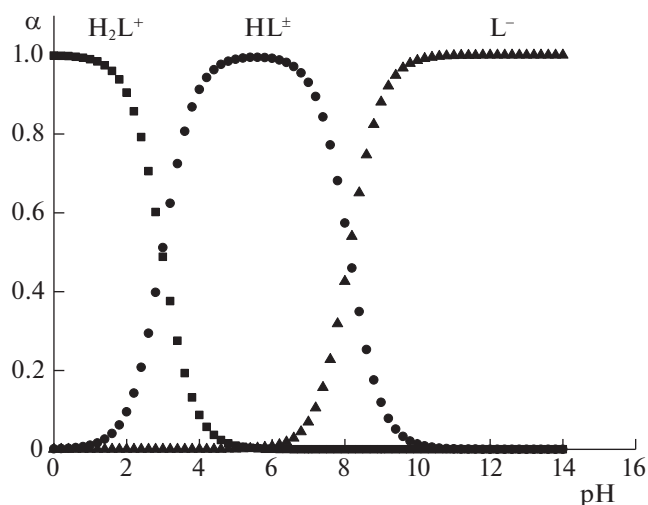


Рис. 1. Диаграмма равновесия в водном растворе D,L-аланил-D,L-фенилаланина при $T = 298.15$ К.

нилаланин методом прямой калориметрии, расчет стандартных термодинамических характеристик реакций кислотно-основного взаимодействия в растворах пептида.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали D,L-аланил-D,L-фенилаланин производства фирмы “РеаХим” без дальнейшей очистки. Для поддержания заданного значения ионной силы применяли нитрат калия, перекристаллизованный из реактива марки “ч”, (его растворы готовили по точной навеске). Бескарбонатный раствор KOH и раствор HNO_3 приготавливали из реактивов квалификации “х.ч.” по обычной методике. Измерения тепловых эффектов проводили на калориметре с изо-

термической оболочкой и автоматической записью кривой температура–время [7, 8].

Долевое распределение частиц H_2L^+ , HL^\pm и L^- при различных значениях pH среды (рис. 1) указывает на возможность независимого определения теплот диссоциации катиона и цвиттер-иона D,L-аланил-D,L-фенилаланина.

При определении теплового эффекта присоединения протона к карбоксильной группе D,L-аланил-D,L-фенилаланина в качестве калориметрической жидкости использовался 0.01 М раствор пептида ($\text{pH}_{\text{исх}} 3.50$), а в ампулу соответственно помещали точную навеску раствора HNO_3 (с концентрацией 0.5903 моль/кг раствора). После смешения растворов величина pH была близка к 2.1. Экспериментальные данные приведены в табл. 2.

Тепловой эффект процесса диссоциации D,L-аланил-D,L-фенилаланина по второй ступени в соответствии с диаграммой равновесий (рис. 1) изучали в интервале pH от 10.7 до 9.0. Для этого измеряли теплоты взаимодействия 0.01 М раствора D,L-аланил-D,L-фенилаланина, имеющего значение pH 10.7, с раствором HNO_3 (исходная концентрация 0.5903 моль/1000 г раствора). Навески растворов взвешивали на весах марки ВЛР-200 с точностью 2×10^{-4} г. Полученные значения $\Delta_{\text{mix}}H$ и $\Delta_{\text{dil}}H$ приведены в табл. 3. Каждая серия опытов включала от 3 до 5 измерений. Для расчета доверительного интервала среднего значения критерий Стьюдента брали при доверительной вероятности 0.95.

Измерения теплот смешения проводили при значениях ионной силы раствора 0.50, 0.75 и 1.00 и температуре 298.15 К. В тех же концентрационных и температурных условиях измеряли теплоты разведения азотной кислоты в растворе фонового электролита.

Таблица 2. Тепловые эффекты взаимодействия 0.01 М раствора D,L-аланил-D,L-фенилаланина с раствором HNO_3 (0.5903 моль/кг раствора) pH 3.5–2.1

I	m , г	$\Delta_{\text{mix}}H$, Дж/моль	m , г	$\Delta_{\text{dil}}H$, Дж/моль	α	$\Delta_{\text{dis}}H$, Дж/моль
0.5	0.5002	–549	0.5001	545	0.8333	1355 ± 120
	0.5002	–620	0.5002	578	0.8334	
	0.5000	–529	0.5002	562	0.8332	
		$\Delta_{\text{mix}}H_{\text{cp}} = -566 \pm 120$		$\Delta_{\text{dil}}H_{\text{cp}} = 562 \pm 120$		
0.75	0.5007	–738	0.5006	632	0.8259	1689 ± 100
	0.5000	–799	0.5006	654	0.8256	
	0.5003	–733	0.5004	627	0.8258	
		$\Delta_{\text{mix}}H_{\text{cp}} = -756 \pm 100$		$\Delta_{\text{dil}}H_{\text{cp}} = 638 \pm 100$		
1.0	0.5002	–964	0.5002	712	0.8262	1978 ± 120
	0.5001	–901	0.5003	698	0.8263	
	0.5002	–913	0.5006	709	0.8264	
		$\Delta_{\text{mix}}H_{\text{cp}} = -927 \pm 100$		$\Delta_{\text{dil}}H_{\text{cp}} = 706 \pm 120$		

Таблица 3. Тепловые эффекты (Дж/моль) взаимодействия раствора D,L-аланил-D,L-фенилаланина с 0.02 М растворами КОН при 298.15 К и рН 10.7–9.0

<i>I</i>	Навеска пептида	$-\Delta_{\text{mix}}H^I$	$\Delta_{\text{dil}}H^I$	$-\Delta_{\text{neut}}H$	$\Delta_{\text{dis}}H(\text{HL}^\pm)$
0.5	0.5005	13211	810	10375	44429 ± 340
	0.5001	13399	820	10356	
	0.5003	13245	815	10405	
		$-\Delta_{\text{mix}}H_{\text{cp}} = 13286 \pm 260$	$-\Delta_{\text{dil}}H_{\text{cp}} = 815 \pm 120$	$-\Delta_{\text{neut}}H_{\text{cp}} = 12471 \pm 260$	
0.75	0.5002	12751	1045	9824	44994 ± 300
	0.5003	12845	1011	9839	
	0.4998	12900	1025	9811	
		$-\Delta_{\text{mix}}H_{\text{cp}} = 12831 \pm 210$	$-\Delta_{\text{dil}}H_{\text{cp}} = 1027 \pm 100$	$-\Delta_{\text{neut}}H_{\text{cp}} = 11806 \pm 220$	
1.0	0.5003	13096	2053	9436	45759 ± 310
	0.5000	13089	2112	9420	
	0.4997	13061	2200	9359	
		$-\Delta_{\text{mix}}H_{\text{cp}} = 13081 \pm 200$	$-\Delta_{\text{dil}}H_{\text{cp}} = 2121 \pm 120$	$-\Delta_{\text{neut}}H_{\text{cp}} = 10961 \pm 220$	

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

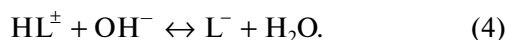
Изменение энтальпии в процессе диссоциации карбоксильной группы D,L-аланил-D,L-фенилаланина $\Delta_{\text{dis}}H(\text{H}_2\text{L}^+)$ находили по уравнению:

$$\Delta_{\text{dis}}H(\text{H}_2\text{L}^+) = -(\Delta_{\text{mix}}H - \Delta_{\text{dil}}H)/\alpha, \quad (3)$$

где $\Delta_{\text{mix}}H$ – тепловой эффект взаимодействия раствора HNO_3 с 0.01 М раствором пептида в интервале рН от 3.5 до 2.1; $\Delta_{\text{dil}}H$ – изменение энтальпии в процессе разведения раствора HNO_3 в растворе поддерживающего электролита; α – полнота реакции протонирования частицы HL^\pm .

Равновесный состав растворов до и после калориметрического опыта рассчитывали с использованием универсальной программы KEV [9]. Тепловые эффекты диссоциации D,L-аланил-D,L-фенилаланина по первой ступени при различных значениях ионной силы приведены в табл. 2.

Процесс нейтрализации водного раствора D,L-аланил-D,L-фенилаланина можно представить уравнением:



Тепловой эффект диссоциации бетаинового протона D,L-аланил-D,L-фенилаланина ($\Delta_{\text{dis}}H_{\text{HL}^\pm}$) рассчитывали по уравнению:

$$\Delta_{\text{neut}}H = (\Delta_{\text{mix}}H^1 - \Delta_{\text{dil}}H^1)/\alpha_2, \quad (5)$$

$$\Delta_{\text{dis}}H_{\text{HL}^\pm} = \Delta_{\text{neut}}H - \Delta H_w, \quad (6)$$

где $\Delta_{\text{mix}}H^1$ – тепловой эффект смешения раствора пептида с раствором КОН; $\Delta_{\text{dil}}H^1$ – тепловой эффект разведения раствора пептида в растворе фонового электролита; α_2 – полнота протекания процесса (4) 99.9%; ΔH_w – теплота нейтрализации

сильной кислоты сильным основанием на фоне поддерживающего электролита.

Величина ΔH_w была взята из работы [10] для фонового электролита, использовавшегося в нашей работе. Найденные тепловые эффекты диссоциации пептида приведены в табл. 3. Погрешность определена как стандартное отклонение средней величины из трех–четырех параллельных опытов.

Энтальпии ступенчатой диссоциации D,L-аланил-D,L-фенилаланина при нулевой ионной силе находили по уравнению с одним индивидуальным параметром [6]:

$$\Delta H - \Delta Z^2 Y(I) \equiv \Delta H^\circ + bI, \quad (7)$$

где ΔH и ΔH° – изменение энтальпии при конечном значении ионной силы и при $I = 0$, соответственно; $\Psi(I)$ – функция ионной силы, вычисленная теоретически; ΔZ^2 – разность квадратов зарядов продуктов реакции и исходных компонентов; b – эмпирический коэффициент.

Точки в координатах $[\Delta H - \Delta Z^2 \Psi(I)] - I$ удовлетворительно укладываются на прямые, которые отсекают на оси ординат тепловые эффекты диссоциации пептида по второй ступени при нулевой ионной силе раствора. Оптимальные положения прямых найдены по МНК.

Стандартные термодинамические характеристики процессов ступенчатой диссоциации D,L-аланил-D,L-фенилаланина представлены в табл. 4.

Анализ полученных и литературных данных показал, что энтальпия диссоциации частицы H_2L^+ хорошо согласуется с результатами работы [4], в которой использовался метод прямой калориметрии при температуре 298.15 К, а вот данные

Таблица 4. Стандартные термодинамические характеристики процессов ступенчатой диссоциации D,L-аланил-D,L-фенилаланина

Процесс	T , К	pK°	$\Delta_r H^{\circ}$, кДж/моль	$\Delta_r G^{\circ}$, кДж/моль	$-\Delta_r S^{\circ}$, кДж/(моль К)
$H_2L^+ = HL^{\pm} + H^+$	298.15	2.98 ± 0.03	0.75 ± 0.24	17.01 ± 0.10	54.5 ± 1.0
$HL^{\pm} = L^- + H^+$	298.15	8.13 ± 0.03	42.51 ± 0.40	46.41 ± 0.10	13.1 ± 1.4

для энтальпии диссоциации частицы HL^{\pm} отличаются более, чем на 1 кДж.

Поскольку особенности строения исследуемого пептида наиболее четко проявляются в энтропийных характеристиках, интересно сопоставить изменение энтропии в процессах диссоциации карбоновой кислоты (например, пропионовой) и карбоксильной группы соответствующей алифатической аминокислоты (α -аланина) и ароматической производной α -аланина (L-фенилаланина) и дипептида (D,L-аланил-D,L-фенилаланина) [11–13]. Можно отметить, что различие в $\Delta_r S^{\circ}$ диссоциации цвиттер-иона и нейтральной кислоты, по-видимому, связано с различным вкладом гидратационных равновесий. Цвиттер-ионы, обладающие широко разделенными зарядами, связывают большее количество молекул воды, чем нейтральная кислота. Когда такой цвиттер-ион диссоциирует с отщеплением протона, изменение в количестве “связанной воды” много меньше, чем при диссоциации нейтральных молекул кислоты. В связи с этим становится понятным, что величина $\Delta_r S_1^{\circ}$ при ионизации цвиттер-иона ароматического производного аминокислоты составляет $\Delta_r S^{\circ}$ (D,L-Phe–D,L-Ala) = -29.5 Дж/(моль К), а для алифатической аминокислоты $\Delta_r S^{\circ}$ (α -Ala) = -40.4 Дж/(моль К) [11]. Неудивительна и наибольшая в этом ряду соединений величина $\Delta_r S^{\circ}$ (CH_3CH_2COOH) = -96.1 Дж/(моль К) для ионизации пропионовой кислоты [12, 13], и наименьшая для дипептида $\Delta_r S^{\circ}$ (AlaPheAla) = -13.1 Дж/(моль К).

Для аланил-фенилаланина характерно более отрицательное значение $\Delta_r S_2^{\circ}$, чем для L-фенилаланина или α -аланина. Это связано с образованием в результате кислотной диссоциации дипептида цвиттер-иона, у которого карбоксильная и аминогруппы расположены на более значительном расстоянии. Ослабление действия индукционного эффекта при переходе от α -аланина к L-фенилаланину и к D,L-аланил-D,L-фенилаланину ведет к ослаблению азот-водородной связи в последнем и, как следствие, заряженная амино-

группа пептида может связывать гораздо больше молекул воды, чем аминогруппа в соответствующих аминокислотах.

Работа выполнена в НИИ Термодинамики и кинетики химических процессов Ивановского государственного химико-технологического университета в рамках государственного задания (базовая часть) проект № FZZW-2020-0009. Исследование проводилось с использованием ресурсов Центра совместного использования научного оборудования ISUCT (при поддержке Министерства науки и высшего образования России, грант № 075-15-2021-671).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Reddy P., Nightingale K. // Indian J. Chem. 2000. V. 39A. P. 1024.
2. Reddy P., Nightingale K. // Indian J. Chem. 2000. V. 39A. P. 1157.
3. Kufelnicki A. // Pol. J. Chem. 1992. V. 66. P. 1077.
4. Bonomo R., Cali R., Cucinotta V. // Inorg. Chem. 1986. V. 25. P. 1641.
5. Impellizzeri G., Bonomo R., Cali R. // Thermochim. Acta. 1984. V. 80. P. 275.
6. Васильев В.П. Термодинамические свойства растворов электролитов. М.: Наука, 1982. С. 262.
7. Lytkin A.I., Barannikov V.P., Badelin V.G., Krutova O.N. // J. Thermal Analysis and Calorimetry. 2020. V. 139. P. 3683.
8. Лыткин А.И., Черников В.В., Крутова О.Н., Смирнова Д.К. // Журн. физ. химии. 2019. Т. 93. № 9. С. 1338.
9. Meshkov A.N., Gamov G.A. // Talanta. 2019. V. 198. P. 200.
10. Васильев В.П., Шеханова Л.Д. // Журн. неорган. химии. 1974. Т. 19. № 11. С. 2969.
11. Васильев В.П., Кочергина Л.А., Гаравин В.Ю. // Журн. общ. химии. 1992. Т. 62. № 1. С. 213.
12. Васильев В.П., Кочергина Л.А. // Там же. 1979. Т. 49. № 9. С. 2042.
13. Кочергина Л.А., Емельянов А.В., Крутова О.Н. // Изв. вузов. Химия и хим. технология. 2011. Т. 54. № 2. С. 95.