

УДК: 541.11:536.7

ВЛИЯНИЕ ТЕМПЕРАТУРЫ НА ТЕРМОДИНАМИКУ СТУПЕНЧАТОЙ
ДИССОЦИИИ АЛАНИЛ-ФЕНИЛАЛАНИНА В ВОДНОМ РАСТВОРЕ© 2023 г. А. И. Лыткин^{a,*}, В. В. Черников^a, О. Н. Крутова^a, П. Д. Крутов^a, Р. А. Романов^a^aИвановский государственный химико-технологический университет, Иваново, Россия

*e-mail: kdvkonkpd@yandex.ru

Поступила в редакцию 09.07.2022 г.

После доработки 22.09.2022 г.

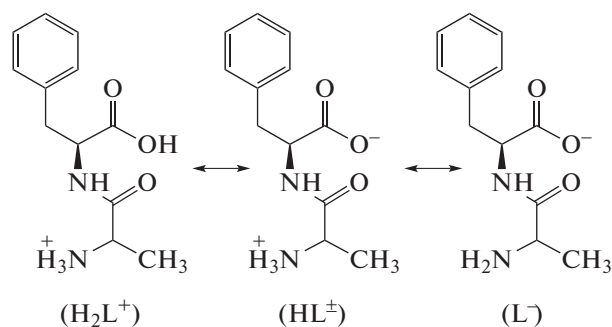
Принята к публикации 26.09.2022 г.

Калориметрическим методом определены теплоты взаимодействия аланил-фенилаланина с растворами азотной кислоты и гидроксида калия при 288.15 К и 308.15 К и значениях ионной силы раствора 0.5, 0.75 и 1.0 в присутствии KNO_3 . Рассчитаны стандартные термодинамические характеристики ($\Delta_r H^\circ$, $\Delta_r G^\circ$, $\Delta_r S^\circ$, $\Delta_r C_p^\circ$) реакций кислотно-основного взаимодействия в водных растворах аланил-фенилаланина. Рассмотрено влияние температуры на теплоты диссоциации аланил-фенилаланина и взаимосвязь термодинамических характеристик диссоциации дипептида со структурой данного соединения.

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

DOI: 10.31857/S0044453723030184, **EDN:** DXUYJB

В последнее время на фармацевтический рынок выводится все больше препаратов, являющихся производными олигопептидов. Структурными элементами этих соединений выступают аминокислоты и дипептиды. Избирательный механизм действия позволяет рассматривать пептиды как молекулы с низкой токсичностью [1–4]. При введении в пептидную структуру стабилизирующих функциональных групп, а также за счет использования специальных систем доставки, производные олигопептидов могут применяться в качестве инновационных лекарственных средств [5–7]. За счет замены аминокислот или введение дополнительных остатков появляется возможность получить любой сконструированный пептид из-за простоты синтеза и доступности мономеров. Сегодня около 200 пептидов находятся на стадии клинических исследований, около 600 на стадии доклинических исследований [8]. В качестве объекта исследования нами выбран аланил-фенилаланин, так как наша работа является продолжением исследования по изучению процессов кислотно-основного взаимодействия и комплексообразования различных биологандов в том числе дипептидов аланинового ряда [9–11]. Диссоциацию дипептида аланил-фенилаланина в водном растворе можно представить схемой:



Литературные данные по теплотам ступенчатой диссоциации D,L-аланил-D,L-фенилаланина весьма немногочисленны. Обе работы выполнены калориметрическим методом при единственном значении температуры 298.15 К. В работе [12] авторы приводят величины $\Delta H_1 = 0.21$ кДж/моль и $\Delta H_2 = 42.97$ кДж/моль (ионная сила раствора 0.1 на фоне нитрата калия). В работе [13] авторы дают значения: $\Delta H_1^\circ = 0.34 \pm 0.03$ кДж/моль и $\Delta H_2^\circ = 49.20 \pm 0.75$ кДж/моль. Анализ литературных данных показал, что энтальпия диссоциации частицы H_2L^+ хорошо согласуется между собой, а вот данные для энтальпии диссоциации частицы HL^\pm отличаются более, чем на 6 кДж. Исследование влияния температуры на тепловые эффекты диссоциации аланил-фенилаланина авторами работы [12, 13] не выполнялось.

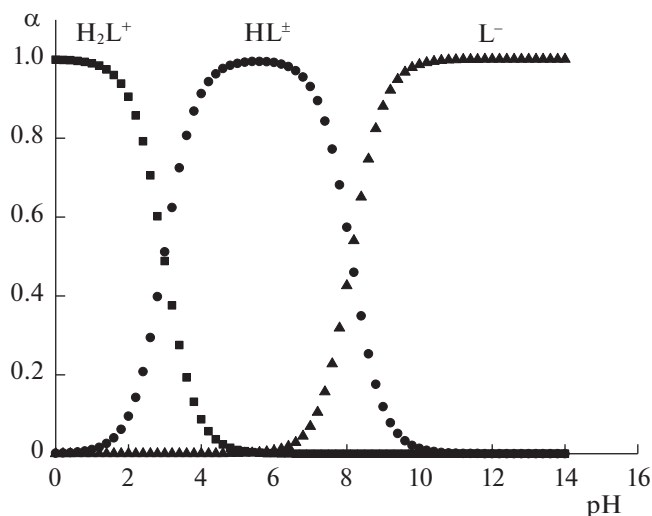


Рис. 1. Диаграмма равновесия в водном растворе аланил-фенилаланина $T = 298.15$ К и $I = 0.0$.

Целью настоящей работы является изучение влияния температуры на тепловые эффекты диссоциации аланил-фенилаланина методом прямой калориметрии, расчет стандартных термодинамических характеристик реакций кислотно-основного взаимодействия в растворах пептида; обсуждение полученных результатов.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

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 аланил-фенилаланина. Равновесный состав растворов до и после калориметрического опыта рассчитывали с использованием универсальной программы KEV [14]. Выбор концентрационных

Таблица 1. Тепловые эффекты, кДж/моль, взаимодействия 0.01 М раствора аланил-фенилаланина с раствором HNO_3 (0.5903 моль/кг раствора) pH 3.5–2.1

T , К	I (KNO_3)	$\Delta_{mix}H$	$\Delta_{dil}H$	$\Delta_{dis}H_{H_2L^+}$
288.15	0.5	4.0 ± 0.2	1.2 ± 0.2	3.3 ± 0.2
	0.75	7.8 ± 0.2	1.6 ± 0.2	3.9 ± 0.3
	1.0	5.7 ± 0.2	2.0 ± 0.2	4.4 ± 0.2
298.15*	0.5	-0.6 ± 0.1	0.6 ± 0.1	1.4 ± 0.1
	0.75	-0.8 ± 0.1	0.6 ± 0.1	1.7 ± 0.1
	1.0	-0.9 ± 0.1	0.7 ± 0.1	2.0 ± 0.1
308.15	0.5	1.9 ± 0.2	1.6 ± 0.2	0.3 ± 0.2
	0.75	2.7 ± 0.2	1.8 ± 0.2	1.0 ± 0.2
	1.0	3.6 ± 0.2	2.1 ± 0.2	1.8 ± 0.2

* Данные, полученные в работе [17]

условий проведения калориметрических опытов проводился на основании диаграммы равновесий в водном растворе аланил-фенилаланина (рис. 1).

Были измерены теплоты смешения растворов аланил-фенилаланина с растворами HNO_3 и KOH в различных интервалах pH на калориметре с изотермической оболочкой и автоматической записью кривой температура–время [15–17]. Навески растворов взвешивали на весах марки ВЛР-200 с точностью 2×10^{-4} г.

В работе использовали аланил-фенилаланина производства фирмы “Panreac Sintesis” (Испания) без дальнейшей очистки, содержание основного препарата 99.5%. 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.

При определении теплового эффекта присоединения протона к карбоксильной группе аланил-фенилаланина в качестве калориметрической жидкости использовался 0.01 М раствор пептида ($pH_{исх}$ 3.50, для создания заданного значения pH в калориметрическую ячейку вводили рассчитанное количество азотной кислоты и фоновый электролит KNO_3), 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. Полученные данные представлены в табл. 1.

Тепловой эффект процесса диссоциации аланил-фенилаланина по второй ступени в соответствии с диаграммой равновесий (рис. 1) изучали в интервале pH от 10.7 до 9.0. Для этого были измерены теплоты взаимодействия 0.01 М раствора аланил-фенилаланина, имеющего значение pH 10.7 (для создания заданного значения pH в калориметрическую ячейку вводили рассчитанное количество гидроксида калия и фоновый электролит KNO_3), с раствором HNO_3 (исходная концентрация 0.5903 моль/1000 г раствора). Каждая серия опытов включала от 3 до 5 измерений. Для расчета доверительного интервала среднего значения критерий Стьюдента был взят при доверительной вероятности 0.95. Данные представлены в табл. 2.

Измерения теплот смешения проводили при значениях ионной силы раствора 0.50, 0.75 и 1.00 и температуре 288.15 и 308.15 К. В тех же концентрационных и температурных условиях были измерены теплоты разведения азотной кислоты в растворе фонового электролита.

Таблица 2. Тепловые эффекты (кДж/моль) взаимодействия раствора аланил-фенилаланина с 0.02 М растворами КОН и рН 10.7–9.0

T, K	$I(KNO_3)$	$-\Delta_{mix}H$	$-\Delta_{dil}H$	$\Delta_{neut}H_{HL^\pm}$	$\Delta_{dis}H_{HL^\pm}$
288.15	0.5	10.9 ± 0.3	2.4 ± 0.1	13.2 ± 0.3	44.9 ± 0.4
	0.75	6.7 ± 0.2	6.7 ± 0.2	13.3 ± 0.3	45.2 ± 0.3
	1.0	2.6 ± 0.2	10.2 ± 0.2	12.8 ± 0.3	45.5 ± 0.3
298.15*	0.5	13.3 ± 0.3	0.8 ± 0.1	12.5 ± 0.3	44.4 ± 0.3
	0.75	12.8 ± 0.2	1.0 ± 0.1	11.8 ± 0.2	45.0 ± 0.3
	1.0	13.1 ± 0.2	2.1 ± 0.1	11.0 ± 0.2	45.8 ± 0.3
308.15	0.5	10.8 ± 0.3	1.8 ± 0.2	12.6 ± 0.3	42.9 ± 0.4
	0.75	7.0 ± 0.2	4.9 ± 0.2	11.9 ± 0.3	43.4 ± 0.3
	1.0	3.9 ± 0.3	7.9 ± 0.2	11.7 ± 0.3	43.9 ± 0.3

* Данные, полученные в работе [17].

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

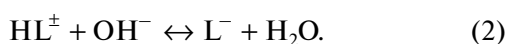
Изменение энтальпии в процессе диссоциации карбоксильной группы аланил-фенилаланина $\Delta_{dis}H(H_2L^+)$ находили по уравнению:

$$\Delta_{dis}H(H_2L^+) = -(\Delta_{mix}H - \Delta_{dil}H)/\alpha, \quad (1)$$

где $\Delta_{mix}H$ – тепловой эффект взаимодействия раствора HNO_3 с 0.01 М раствором дипептида в интервале рН от 3.5 до 2.1, $\Delta_{dil}H$ – 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 [14].

Процесс нейтрализации водного раствора аланил-фенилаланина можно представить уравнением:



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

$$\Delta_{neut}H = (\Delta_{mix}H^1 - \Delta_{dil}H^1)/\alpha_2, \quad (3)$$

$$\Delta_{dis}H_{HL^\pm} = \Delta_{neut}H - \Delta H_w, \quad (4)$$

где $\Delta_{mix}H^1$ – тепловой эффект смешения раствора пептида с раствором КОН; $\Delta_{dil}H^1$ – тепловой эффект разведения раствора пептида в растворе фонового электролита; α_2 – полнота протекания процесса (2) 99.9%; ΔH_w – теплота нейтрализации сильной кислоты сильным основанием на фоне поддерживающего электролита.

Величина ΔH_w была взята из работы [18] для фонового электролита, использовавшегося в нашей работе. Погрешность определена как стандартное отклонение средней величины из трех–четырёх параллельных опытов.

Энтальпии ступенчатой диссоциации аланил-фенилаланина при нулевой ионной силе находили по уравнению с одним индивидуальным параметром [19]

$$\Delta H - \Delta Z^2\Psi(I) = \Delta H^\circ + bI, \quad (5)$$

где ΔH , 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 аланил-фенилаланина представлены в табл. 3.

Большой экспериментальный материал по изучению температурной зависимости констант диссоциации слабых кислот и оснований показывает, что на кривой зависимости $\lg K$ от T наблюдается экстремум [20–23]. Анализ этой кривой позволяет отметить, что с увеличением температуры происходит рост константы диссоциации вплоть до достижения максимального значения; процесс же диссоциации кислот в этой области температур эндотермичен. При дальнейшем увеличении температуры K_{dis} уменьшается, а процесс ионизации становится экзотермичным. Следовательно, в точке максимума тепловой эффект реакции равен нулю. Тепловой эффект диссоциации H_2L^+ невелик. Величина изменения теплоемкости в процессе ионизации карбоксильной группы аланил-фенилаланина -77 Дж/(моль К). В связи с этим, с ростом температуры происходит изменение знака теплоты диссоциации протона карбоксильной группы пептида. Температуру Θ ,

Таблица 3. Стандартные термодинамические характеристики процессов диссоциации аланил-фенилаланина в водном растворе

Процесс	T, K	pK^0	$\Delta G^0,$ кДж/моль	$\Delta H^0,$ кДж/моль	$-\Delta S^0,$ Дж/(мольК)	$-\Delta C_p^0,$ Дж/(мольК)
$H_2L^+ = HL^\pm + H^+$	288.15	2.97 ± 0.02	16.4 ± 0.1	2.3 ± 0.3	47.4 ± 1.0	167
	298.15*	2.98 ± 0.02	17.0 ± 0.1	0.8 ± 0.3	54.5 ± 1.0	
	308.15	2.99 ± 0.02	17.6 ± 0.1	-1.1 ± 0.3	60.8 ± 1.0	
$HL^\pm = L^- + H^+$	288.15	8.41 ± 0.03	46.4 ± 0.1	44.0 ± 0.3	8.4 ± 1.4	136
	298.15*	8.13 ± 0.03	46.4 ± 0.2	42.5 ± 0.3	13.1 ± 1.3	
	308.15	7.89 ± 0.03	46.6 ± 0.2	41.2 ± 0.3	17.2 ± 1.3	

* Данные полученные в работе [17].

при которой тепловой эффект изменит знак, можно оценить по уравнению:

$$\Theta = 298.15 - \Delta H_{298.15}^0 / (\Delta C_p). \quad (6)$$

В интервале температур 278.15–298.15 К происходит изменение знака теплоты ионизации карбоксильной группы пептида. С увеличением концентрации фонового электролита Θ сдвигается в область более высоких температур. При диссоциации аминогруппы аланил-фенилаланина величина $\Delta_r C_{p2}$ близка к нулю, а тепловой эффект составляет большую положительную величину, следовательно ожидать изменение знака теплового эффекта не целесообразно, подобные зависимости были отмечены ранее [20–23] при диссоциации различных по своей природе функциональных групп в аминокислотах и комплексонах.

Анализ данных по температурной зависимости теплот диссоциации аланил-фенилаланина показал, что с увеличением концентрации фонового электролита (нитрата калия) происходит сдвиг Θ в область более высоких температур. Температурный коэффициент энтальпии диссоциации ΔC_p также заметно меняется с ростом ионной силы. Это, по-видимому, связано с тем, что при больших концентрациях электролита сказывается недостаток молекул воды в растворе, что уменьшает вклад “замораживания” в гидратных оболочках ионов и приводит к уменьшению абсолютной величины ΔC_p .

Увеличение температуры приводит к усилению хаотического, теплового движения молекул воды, способствующего разрушению ее структуры, поэтому ориентация молекул вокруг ионов облегчается и при постоянной ионной силе возрастание температуры приводит к более отрицательным значениям $\Delta_{dis}S$; это подтверждают данные табл. 3.

Изменение энтропии в процессе диссоциации аланил-фенилаланина значительно по абсолютной величине, причем возрастание заряда анионной частицы резко сказывается на величине $\Delta_{dis}S$. С повышением температуры эффект структури-

рования воды анионными частицами проявляется сильнее, что вызывает уменьшение энтропии ионизации. Повышение заряда частицы приводит к более резкому изменению $\Delta_{dis}S$ с ростом температуры. С увеличением концентрации “фоновый электролит” температура влияет в меньшей степени, а значение $\Delta_{dis}S$ по абсолютной величине уменьшается.

Работа выполнена в НИИ Термодинамики и кинетики химических процессов Ивановского государственного химико-технологического университета в рамках государственного задания Фундаментальные и прикладные аспекты создания полифункциональных волокнистых полимерных материалов с использованием капсулированных нано- и микросистем (FZZW-2023-0008). 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. Berkowitz S.A., Engen J.R., Mazzeo J.R., Jones G.B. // Nature reviews Drug discovery. 2012. V. 11. P. 527.
2. McGregor D.P. // Current Opinion in Pharmacology. 2008. V. 8. P. 616.
3. Zompra A., Galanis A., Werbitzky O., Albericio P. // Future Medicinal Chemistry. 2009. V. 1 (2). P. 361.
4. Bak A., Leung D., Barrett S.E. et al. // J. of the American Association of Pharmaceutical Scientists. 2015. V. 17 (1). P. 144.
5. Di L. // Ibid. 2015. V. 17 (1). P. 134.
6. Fosgerau K., Hoffmann T. // Drug Discovery Today. 2015. V. 20 (1). P. 122.
7. Slingluff C.L. // Cancer Journal. 2011. V. 17 (5). P. 343.
8. Craik D.J., Fairlie D.P., Liras S., Price D. // Chemical Biology and Drug Design. 2013. V. 81. P. 136.
9. Кочергина Л.А., Емельянов А.В., Крутова О.Н. // Изв. вузов. Химия и хим. технология. 2011. Т. 54. № 2. С. 95.
10. Лыткин А.И., Крутова О.Н., Черников В.В. и др. // Журн. физ. химии. 2021. V. 95. №. 11. P. 1674.

11. *Кочергина Л.А., Баделин В.Г., Крутова О.Н.* // Там же. 2012. Т. 86. № 9. С. 1555.
12. *Vonotto R., Cali R., Cucinotta V.* // Inorg. Chem. 1986. V. 25. P. 1641.
13. *Rodante F. et al.* // Thermochemica Acta. 1997. V. 296. P. 15.
14. *Meshkov A.N., Gamov G.A.* // Talanta. 2019. V. 198. P. 200.
15. *Lutkin A.I., Varannikov V.P., Badelin V.G., Krutova O.N.* // J. of Thermal Analysis and Calorimetry .2020. V. 139. P. 3683.
16. *Лыткин А.И., Черников В.В., Крутова О.Н., Смирнова Д.К.* // Журн. физ. химии. 2019. Т. 93. № 9. С. 1338.
17. *Лыткин А.И., Черников В.В., Крутова О.Н. и др.* // Там же. 2022. Т. 96. № 8. С. 1155.
18. *Васильев В.П., Шеханова Л.Д.* // Журн. неорганической химии. 1974. Т. 19. № 11. С. 2969.
19. *Васильев В.П.* Термодинамические свойства растворов электролитов, М.: Высш. школа, 1982. С. 200.
20. *Кочергина Л.А., Васильев В.П., Крутов Д.В., Крутова О.Н.* // Журн. физ. химии. 2007. Т. 81. С. 1.
21. *Кочергина Л.А., Емельянов А.В., Крутова О.Н.* // Журн. неорганической химии. 2008. Т. 53. № 9. С. 1628.
22. *Кочергина Л.А., Васильев В.П., Крутова О.Н.* // Журн. физ. химии. 2008. Т. 82. С. 426.
23. *Кочергина Л.А., Лыткин А.И., Крутова О.Н., Дамрина К.В.* // Журн. неорганической химии. 2015. Т. 60. № 5. С. 719.