

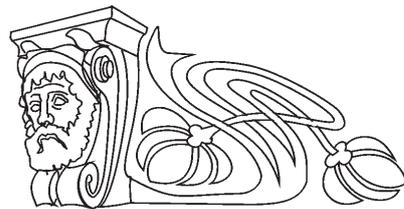


УДК 543. 25

ИЗБИРАТЕЛЬНОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ГИСТИДИНА В СМЕШАННЫХ РАСТВОРАХ α -АМИНОКИСЛОТ

Р. К. Чернова, О. В. Варыгина, Н. С. Березкина

Саратовский государственный университет
E-mail: varigini@mail.ru



Рассмотрено состояние основных и нейтральных α -аминокислот в водных средах. Построены диаграммы распределения ионизированных форм гистидина и аланина при варьировании pH. Показана возможность pH-метрического избирательного определения гистидина в смесях нейтральных аминокислот со стеклянным индикаторным электродом. Погрешность не превышает 7%.

Ключевые слова: гистидин, ионоселективный электрод, ионометрия.

Selective Determination of Histidine in Mixed Solutions of α -Amino Acids

R. K. Chernova, O. V. Varygina, N. S. Bereskina

Examined the condition of the main and neutral α -amino acids in aqueous media. Graphs of the distribution of ionized forms of histidine and alanine with varying pH. Pakistan the possibility of pH – metric selective determination of histidine in mixtures of neutral amino acid with a glass indicator electrode. The error does not exceed 7%.

Key words: gistidin, ion-selective electrode, ionometry.

DOI: 10.18500/1816-9775-2015-15-4-15-21

Гистидин – одна из незаменимых α -аминокислот, которая выполняет ряд важных функций в организме человека: входит в состав активных центров многих ферментов, является предшественником в биосинтезе гистамина, способствует росту и восстановлению тканей.

Гистидин – составная часть многих витаминных комплексов, он используется при лечении ревматоидных артритов, аллергий, язв и анемии. Гистидина гидрохлорид применяется при лечении гепатитов, язвенной болезни желудка и двенадцатиперстной кишки. Имеются также данные о благоприятном влиянии препарата на липопротеиновый обмен у больных атеросклерозом. Гистидин является также диагностическим фактором: его содержание в биологических жидкостях определяют при диагностике гистидинемии, беременности, гемолизе.

В связи с этим разработка простых, избирательных способов определения гистидина востребована при предварительных скрининговых обследованиях многочисленных объектов. Применение в этих случаях прецизионных, дорогостоящих и сложных методов, таких как капиллярный электрофорез, ВЭЖХ, экономически не оправдано и технически не всегда реализуемо.

В настоящей работе нами рассмотрена возможность применения стандартного стеклянного индикаторного электрода для избирательного pH-титриметрического определения гистидина в смешанных растворах «нейтральных» аминокислот. Предложенный подход к титриметрическому определению основных α -аминокислот основан на особенностях взаимодействия основных и нейтральных α -аминокислот с ионами воды соответственно, специфическом изменении pH их водных растворов, а также способности стеклянного электрода уловить эти различия в смешанных растворах.

Известно, что протолитические свойства α -аминокислот определяют их многие физико-химические характеристики.

Полученные к настоящему времени значения констант ионизации α -аминокислот обобщены и критически оценены в материалах ИЮПАК [1–5]. Так, известен обзор протолитических равновесий в растворах глицина [1], алифатических аминокислот с незаряженными полярными [2] и неполярными [3] боковыми цепями, ароматических аминокислот [4], аминокислот с положительно заряженными боковыми цепями [5].

В табл. 1 обобщены данные о кислотно-основных свойствах α -аминокислот.

Для α -аминокислот первая константа ионизации соответствует диссоциации α -COOH группы, вторая связана с депротонированием атома азота α -NH₃⁺ группы:

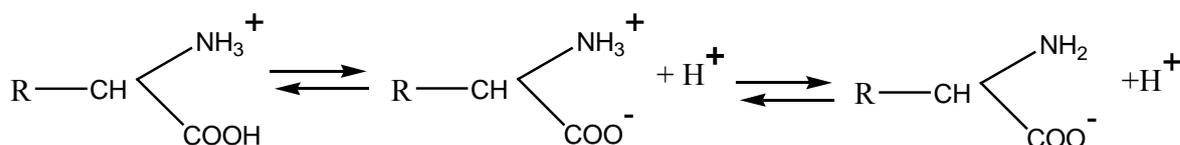




Таблица 1

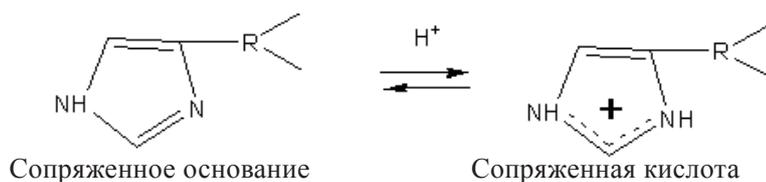
Значения рК ионизации α-аминокислот [6]

№	Аминокислота	Обозначение	рК								рI	
			α- COOH	β-COOH	γ- COOH	α-NH ₂	>NH ₂	δ-NH ₂	ε-NH ₂	-OH		-SH
Основные												
1	Аргинин	Arg	1,82			8,99		12,48				10,76
2	Гистидин	His	1,80			9,33	6,04					7,69
3	Лизин	Lys	2,16			9,06			10,54			9,80
Кислые												
4	Аспарагиновая кислота	Asp	1,99	3,90		9,90						2,95
5	Глутаминовая кислота	Glu	2,10		4,07	9,47						3,09
Нейтральные												
6	Аланин	Ala	2,35			9,78						6,07
7	Аспарагин	Asn	2,14			8,72						5,43
8	Валин	Val	2,29			9,74						6,02
9	Глицин	Gly	2,35			9,78						6,07
10	Глутамин	Gln	2,17			9,13						5,43
11	Изолейцин	Ile	2,32			9,76						6,74
12	Лейцин	Leu	2,33			9,74						6,04
13	Метионин	Met	2,13			9,28						5,71
14	Пролин	Pro	1,95				10,64					6,30
15	Серин	Ser	2,19			9,21						5,70
16	Тирозин	Tyr	2,20			9,21			10,46			5,71
17	Треонин	Thr	2,11			9,10						5,61
18	Триптофан	Trp	2,46			9,41	11,50					5,94
19	Фенилаланин	Phe	2,20			9,31						5,76
20	Цистеин	Cys	1,92			10,70					8,37	5,15

Указанные превращения для нейтральных α-аминокислот, не содержащих ионизированных групп в радикалах, могут быть представлены на примере аланина с помощью диаграммы (рис. 1).

Гистидин является основной аминокислотой,

имеющей два основных центра: аминогруппу в α-положении и имидазольную группу, которая благодаря резонансной делокализации заряда при протонировании является основной (рК_а ~ 6,0).



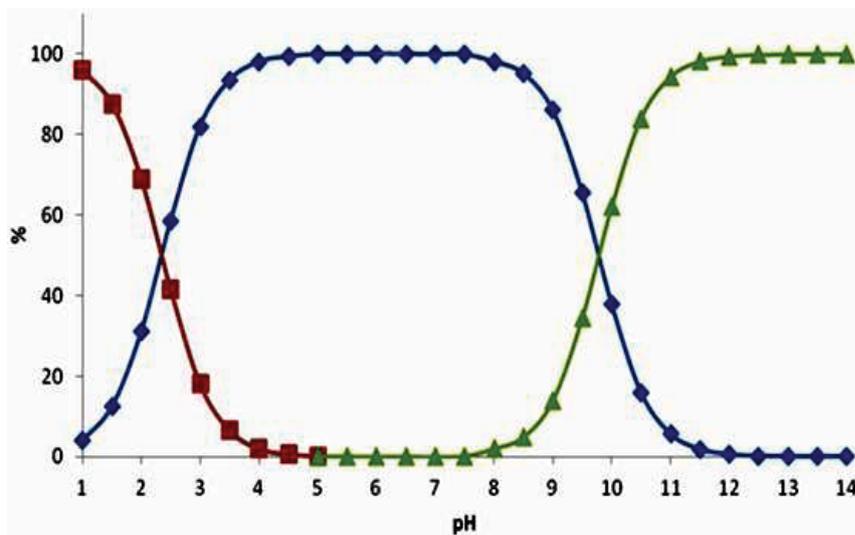


Рис. 1. Распределение ионизованных форм аланина при разных рН

Протонированию подвергается иминный азот, пара электронов которого создает большую основность. На протонирование имидазольного кольца влияет природа заместителя: электронодонорные – увеличивают его основность, акцепторные – уменьшают.

Последовательность образования иони-

зированных форм гистидина и диаграмма их распределения в зависимости от рН приведены соответственно на схеме 1 и рис. 2.

Как следует из вышеприведенных данных, значения $pK_a=6,0$ (протонирование имидазольной группы гистидина) и $pK_a=9,33$ (протонирование α -аминогруппы).

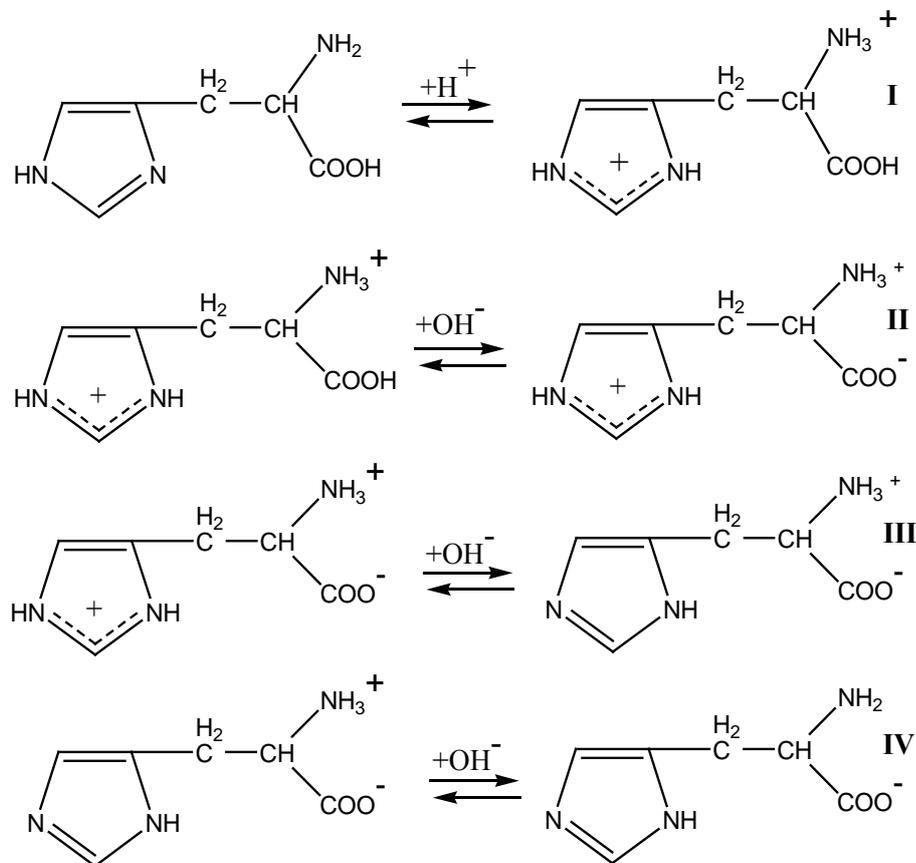


Схема 1. Ионизованные формы гистидина при разной кислотности среды

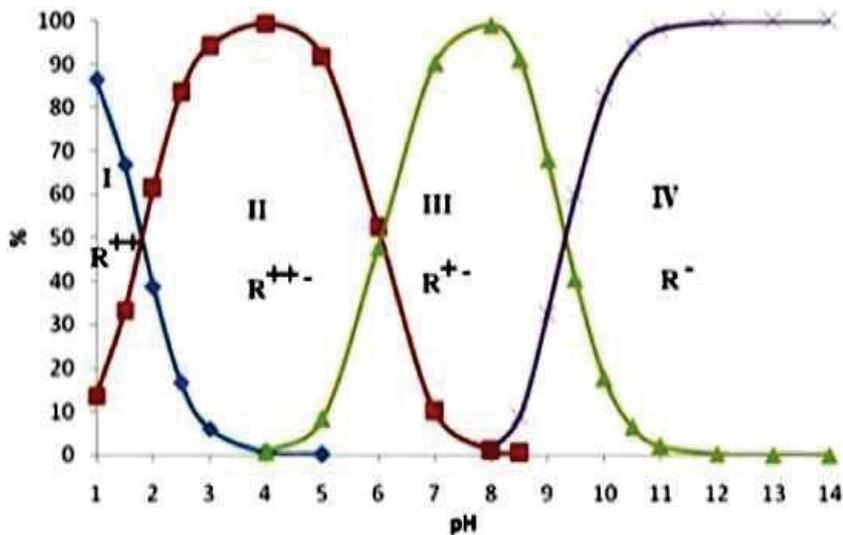


Рис. 2. Диаграмма распределения ионизированных форм гистидина в зависимости от pH

Отсюда щелочная реакция среды при растворении гистидина в воде (pH=7,61), в то время как pH водных растворов «нейтральных» аминокислот, протонированных только по α-аминогруппе, находится в области pH=6 (см. табл. 1). Следовательно, возможно титриметрически, по количеству оттитрованных OH⁻ ионов, определить содержание основной α-аминокислоты на фоне «нейтральной». Эта цель и была реализована в

данной работе путем pH-метрического титрования на примерах водных растворов гистидина раствором HCl. В качестве индикаторного применяли стандартный стеклянный электрод.

Предварительно нами оценена возможность титрования водных растворов гистидина (исходное значение pH=7,61) раствором HCl. На рис. 3, а приведен пример кривой титрования водного раствора гистидина.

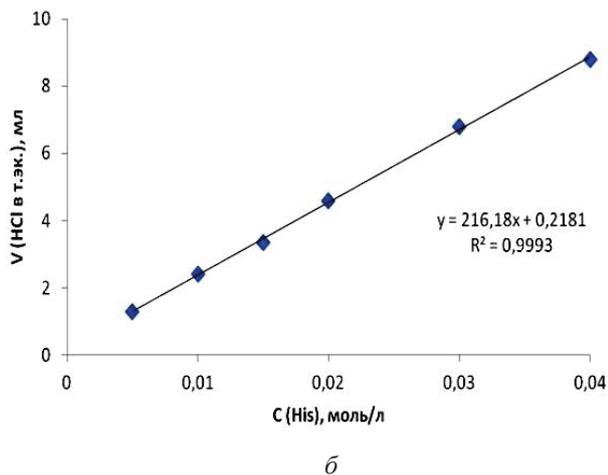
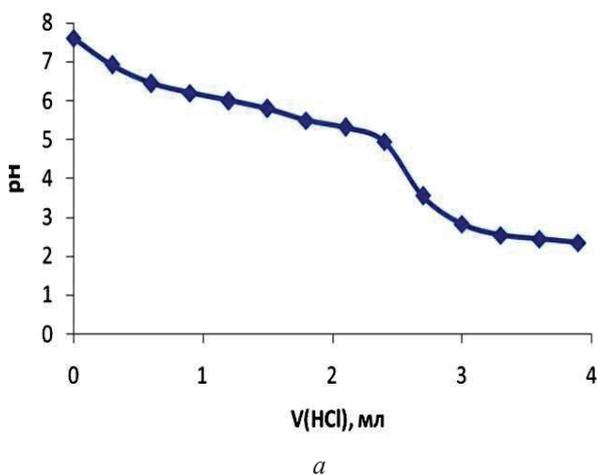


Рис. 3. Титрование водного раствора гистидина: а – кривая pH-метрического титрования 0,01M раствора гистидина 0,1M раствором HCl; б – градуировочный график для определения гистидина в водном растворе

Согласно вышеприведенной схеме 1, при исходном значении pH водного раствора гистидина 7,61 преобладает цвиттерионная форма III (R[±]), протонированная по α-аминогруппе, т.е. в этих условиях имидазольная группировка депротонирована. Однако в процессе титрования HCl

равновесие реакции снова смещается в сторону протонирования имидазольной группы, и скачок титрования характеризует переход от формы III к форме II (см. рис. 2, схема 1). При дальнейшем прибавлении кислоты pH соответственно медленно понижается.



Как следует из рис. 3, б, линейная зависимость наблюдается в интервале концентраций 0,005–0,04 моль/л гистидина, что свидетельствует о принципиальной возможности определения гистидина вышеописанным способом.

Далее проводилось избирательное титриметрическое определение гистидина в смеси с изолейцином, пролином, серином, тирозином. Для приготовления смеси аминокислот в мерную колбу вместимостью 100 мл вводили навески: 0,6558г Ile; 0,5856г Pro; 0,5254 Ser; 0,9060г Tyr, причем концентрация каждой аминокислоты

составляла 0,05М. В эту смесь добавлялось 0,7758 г гистидина. Дистиллированной водой довели объем до 100 мл.

Из полученного раствора смеси аминокислот аликвоту 5 мл разбавляли дистиллированной водой до 25 мл. Полученную смесь (рН = 8,02) оттитровывали раствором 0,1М НСl. Объем титранта в точке эквивалентности составил 2,45 мл.

Пример кривой потенциометрического титрования гистидина в указанной смеси α -аминокислот показан на рис. 4, а.

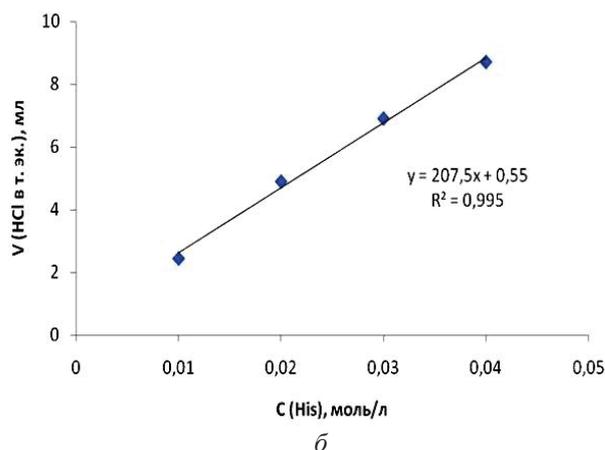
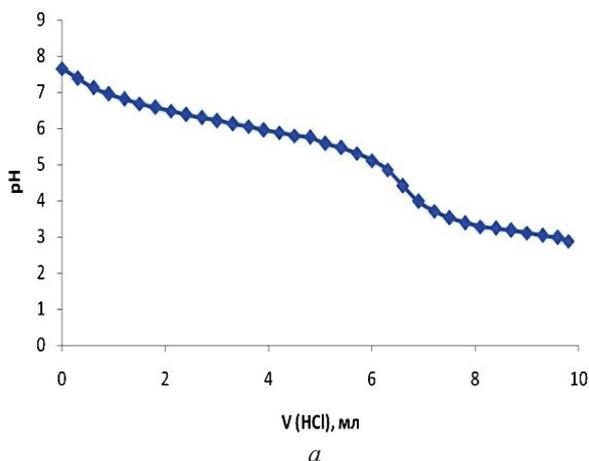


Рис. 4. Титрование гистидина в смеси аминокислот: изолейцина, пролина, серина, тирозина (смесь I): а – кривая рН-метрического титрования 0,01М раствора гистидина в смеси с Ile, Pro, Ser, Tyr 0,1М раствором НСl; б – градуировочный график для определения гистидина в указанной смеси

На титрование одного и того же количества гистидина в водном растворе и в смеси указанных аминокислот расходуетя титранта соответственно 2,60 мл и 2,45 мл. Влияние фоновых и «нейтральных» аминокислот приводит к небольшому «подкислению» титруемого раствора, однако принципиально не влияет на характер градуировочного

графика и сходимость результатов титрования.

Добавление гистидина в другую смесь, содержащую аланин, валин, глицин, лейцин, изолейцин, пролин, серин, тирозин, приводило к повышению рН от 6,04 до 7,50. Пример кривой потенциометрического титрования гистидина в этой смеси показан на рис. 5, а.

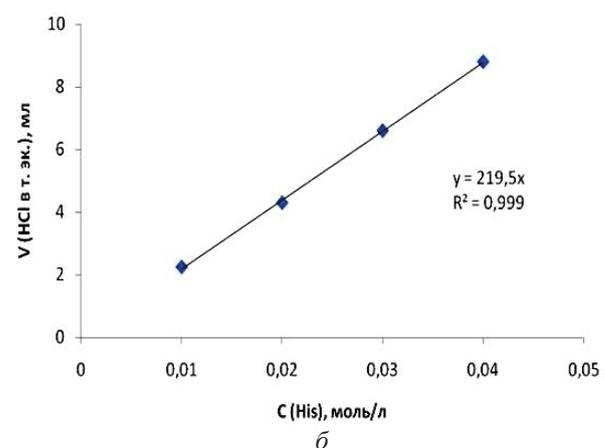
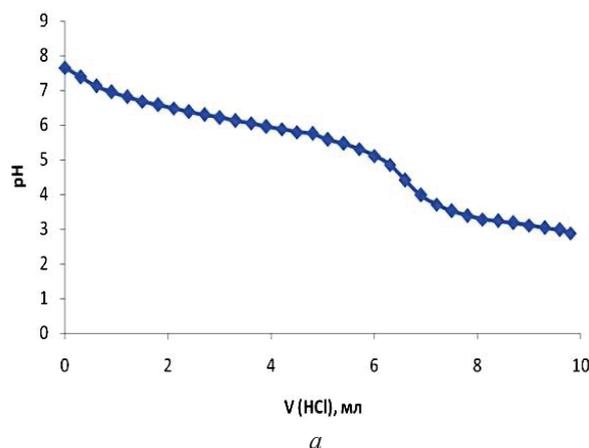


Рис. 5. Титрование гистидина в смеси аминокислот: аланина, валина, глицина, лейцина, изолейцина, пролина, серина, тирозина (смесь II): а – кривая титрования гистидина в смеси с Ala, Val, Gly, Leu, Ile, Pro, Ser, Tyr 0,1М раствором НСl; б – градуировочный график для определения гистидина в смеси II



Из рис. 5, а следует, что на титрование одного и того же количества гистидина в водном растворе и в смеси указанных аминокислот расходуется соответственно 2,60 и 2,25 мл. «Подкисление» раствора здесь более выражено, скачок титрования несколько уменьшен, однако линейность градуировочного графика четко воспроизводится. Добавление гистидина в третью смесь,

содержащую треонин, триптофан, цистеин, фенилаланин, приводило к повышению pH от 6,06 до 7,58. Пример кривой потенциометрического титрования гистидина показан на рис. 6, а.

Из рис. 6, б следует, что на титрование одного и того же количества гистидина в водном растворе и в смеси указанных аминокислот расходуется соответственно HCl 2,60 и 2,45 мл.

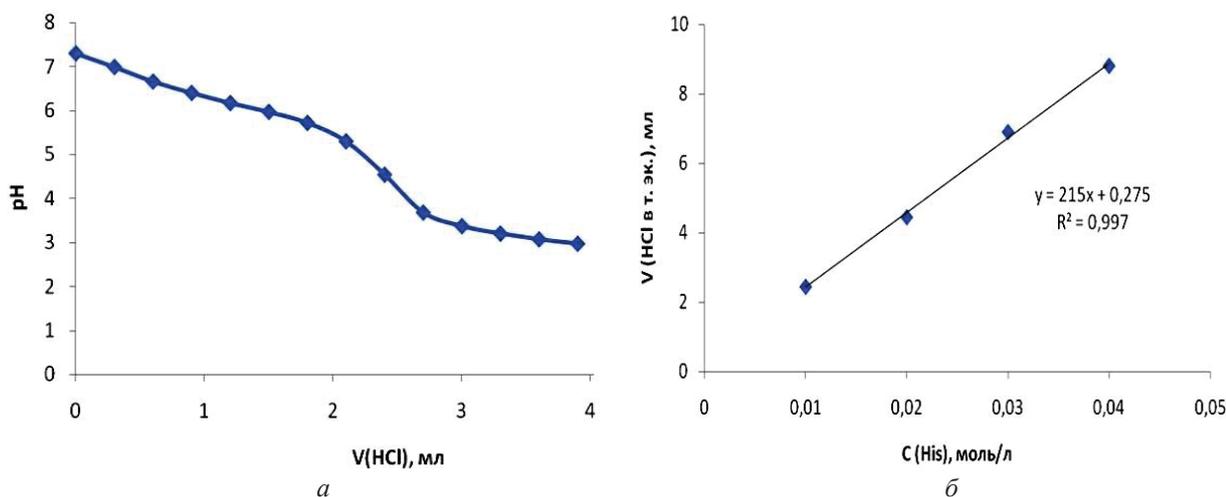


Рис. 6. Титрование гистидина в смеси аминокислот треонина, триптофана, цистеина, фенилаланина: а – кривая титрования гистидина в смеси с Thr, Trp, Cys, Phe 0,1M раствором HCl; б – градуировочный график для определения гистидина в смеси III

Для оценки правильности определения гистидина в смеси указанных аминокислот был применен метод «введено–найдено». Для этого в смесь аминокислот вводилось разное количество гистидина (табл. 2). Проведенные

pH-потенциометрические определения показали, что в интервале концентраций, указанных на градуировочном графике, возможно определение гистидина с относительной погрешностью, варьирующей от 3,3 до 7,0%.

Таблица 2

Пример определения гистидина в смеси с аланином, валином, глицином, лейцином в водной среде методом «введено–найдено»

Введено His, г	Найдено His, г	Относительная погрешность, %	Введено His, г	Найдено His, г	Относительная погрешность, %
0,3940	0,3685	6,0	0,6000	0,5624	6,3
0,4090	0,3995	3,3	0,3103	0,2987	3,7

Проведенные исследования показали, что в интервале концентраций 0,78–62,00 мг возможно прямое избирательное pH-потенциометрическое определение гистидина в различных смешанных растворах нейтральных аминокислот с погрешностью, не превышающей 7%.

Работа выполнена в рамках Госзадания Минобрнауки РФ в сфере научной деятельности (базовая часть) по заданию № 2014/203 «Методология создания и анализ новых практически

ценных многокомпонентных систем и материалов» (код проекта 1255).

Список литературы

1. Kiss T., Sóvágó I., Gergely A. Critical survey of the stability constants of complexes of glycine // Pure & Appl. Chem. 1991. Vol. 63, № 4. P. 597–638.
2. Berthon G. The stability constants of metal complexes of amino acids with polar side chains // Pure & Appl. Chem. 1995. Vol. 67, № 7. P. 1117–1240.
3. Sóvágó J., Kiss T., Gergely A. Critical survey of the



- stability constants of complexes of aliphatic amino acids // Pure & Appl. Chem. 1993. Vol. 65, № 5. P. 1029–1080.
4. Pettit L.D. Critical survey of formation constants of complexes of histidine, phenylalanine, tyrosine, L-Dopa and tryptophan // Pure & Appl. Chem. 2009. Vol. 56, № 2. P. 247–292.
 5. Yamauchi O., Odani A. Stability constants of metal complexes of amino acids with charged side chains-Part I : Positively charged side chains // Pure & Appl. Chem. 1996. Vol. 68, № 2. P. 469–496.
 6. Химическая энциклопедия : в 5 т. М. : Сов. энцикл., 1988. Т. 1. 623 с.

УДК 541.1

ВЯЗКОСТНАЯ ДЕГРАДАЦИЯ КИСЛОТНЫХ РАСТВОРОВ ХИТОЗАНА И ЕЁ ИЗУЧЕНИЕ МЕТОДОМ ИОННОГО ЗОНДА

И. С. Бойко, О. А. Подколотная, С. Г. Лысачок, С. Л. Шмаков

Саратовский государственный университет
E-mail: boyko_is@mail.ru



Дан обзор литературы по явлению старения (значительного падения вязкости во времени) кислых растворов хитозана. Проведено исследование уксуснокислых (2%) растворов хитозана различной средневязкостной молекулярной массы (200 и 46 кДа) методом ионного зонда (добавление раствора KI). Косвенно подтверждено предположение, что при движении в электрическом поле ион-зонд возбуждает не всю среднестатистическую макромолекулу, а лишь часть её (примерно четверть). Исследование хитозана (46 кДа) показало, что, хотя предельная электропроводность со временем снижается при всех концентрациях полимера, предельное число микровязкости остаётся примерно постоянным. Это указывает на то, что деструкция макромолекул отсутствует, и старение кислых растворов хитозана обусловлено другими причинами.

Ключевые слова: хитозан, вязкость, деградация, ионный зонд, правило Вальдена, кондуктометрия.

Viscous Degradation of Acidic Chitosan Solutions and its Ionic Probe Study

I. S. Boyko, O. A. Podkolodnaya,
S. G. Lysachok, S. L. Shmakov

A review of the literature on the phenomenon of aging (a significant drop in viscosity over time) of acidic chitosan solutions is given. A study was made on acetic acid (2%) solutions of chitosan of two viscosity-average molecular weights (200 and 46 kDa) by ion probing (addition of a KI solution). It has been indirectly confirmed that the motion of the probing ions in an electric field disturbs part (about a quarter) of the average macromolecule rather than the whole one. Our study on 46 kDa chitosan has shown that, although the limiting electrical conductivity decreases over time at all polymer concentrations, the intrinsic microviscosity remains approximately constant. This indicates no degradation of macromolecules, so the aging of acidic chitosan solutions is due to some other causes.

Key words: chitosan, viscosity, degradation, ionic probe, Walden rule, conductometry.

DOI: 10.18500/1816-9775-2015-15-4-21-30

Введение

Искусственный аминополисахарид хитозан в настоящее время находит широкое применение в различных отраслях экономики, особые перспективы открыты перед ним в медицине [1]. Интересен этот полимер, являющийся катионным полиэлектролитом, и с фундаментальной точки зрения. В частности, до сих пор не ясны причины и механизм деградации кислотных растворов хитозана, проявляющейся в постепенном снижении их вязкости «вплоть до полного разжижения» [2]. Это явление следует принимать в расчёт всякий раз, когда хитозановые растворы предполагается хранить какое-то время перед применением.

Первое упоминание этого эффекта в литературе относится к 1978 г. [3]. Впоследствии его объясняли либо кислотным гидролизом гликозидных связей (деструкцией) [2, 4–8], либо другими причинами: медленным образованием внутримолекулярных водородных связей с уплотнением клубков [9, 10], компактизацией макромолекул хитозана [11], снижением степени структурированности растворов [12], перестройкой надмолекулярной структуры раствора [13], процессами структурной перестройки [14, 15], агрегации [16], биодеградации [17]. Однако авторы работы [2] замечают, что изменение конформаций макромолекул и степени структурирования не может приводить к практически полному разжижению концентрированных растворов полимера при длительном хранении.

Накопленные экспериментальные данные позволяют сделать некоторые обобщения.

1. Снижение вязкости и её предельного числа ярче проявляется в более вязких растворах