

УДК 542.61:547.466

ЭКСТРАКЦИЯ АМИНОКИСЛОТ ДИНОНИЛНАФТАЛИНСУЛЬФОКИСЛОТОЙ В ПРИСУТСТВИИ ДИЦИКЛОГЕКСИЛ-18-КРАУН-6

С. В. Смирнова, И. И. Торочешникова, И. В. Плетнев

(кафедра аналитической химии)

Изучена экстракция аминокислот из водных растворов динонилнафталинсульфокислотой в хлороформ и гептан. Показано уменьшение эффективности извлечения в ряду: $\text{Phe} > \text{Trp} > \text{Phe} > \text{Lys} > \text{Gly} > \text{Glu}$, что коррелирует с гидрофобностью аминокислот. Введение в систему краун-эфира позволяет повысить степень извлечения изолейцина, триптофана, фенилаланина, лизина с 75–85% до 90–98%, а глицина – с 15 до 40%. Установлено соотношение компонентов в экстрагирующихся соединениях. Рассчитаны значения констант экстракции; исследовано мешающее влияние катионов металлов и аминов.

Принятые в статье сокращения: Phe – изолейцин, Trp – триптофан, Phe – фенилаланин, Lys – лизин, Gly – глицин, Glu – глутаминовая кислота.

Разработка методов экстракционного выделения аминокислот – актуальная проблема биотехнологии и аналитической химии. Описано применение в качестве экстрагентов краун-эфиров и других макроциклических соединений, образующих водородные связи с аминогруппой субстрата по типу комплексообразования «гость – хозяин» [1–3]. Однако извлечение протонированных аминокислот в присутствии противоионов в этих системах не очень велико из-за большой полярности и гидрофильности субстрата. С достаточно высокой эффективностью аминокислоты извлекаются катионообменным экстрагентом динонилнафталинсульфокислотой. Реагент обеспечивает сравнительно высокое извлечение аминокислот из кислых растворов и реэкстракцию [4], но его экстракционная способность недостаточна для количественного извлечения аминокислот однократной экстракцией.

Предметом нашей работы стало изучение экстракции аминокислот с динонилнафталинсульфокислотой (ДННСК) и дициклогексил-18-краун-6 (ДЦГ18К6) при совместном присутствии. В качестве растворителя использовали хлороформ (своего рода «стандарт» при исследовании экстракции комплексов «гость–хозяин») и гептан. Поскольку литературные данные об извлечении имеются только для толуола [4], изучали также экстракцию в хлороформ и гептан с этим реагентом.

Экспериментальная часть

Растворы и реагенты. В работе использовали динонилнафталинсульфокислоту (промышленный образец) и дициклогексил-18-краун-6 (квалификации «х.ч.», смесь изомеров, производство ВНИПИМ, г. Тула). Растворы дициклогексил-18-краун-6 ($1 \cdot 10^{-2}$ М) готовили растворением точной навески в хлороформе или гептане. Исходный раствор ДННСК в толуоле имел концентрацию 0,13 М. Рабочие растворы ДННСК и ДЦГ18К6 готовили последовательным разбавлением в хлороформе или в гептане. Органические растворители квалификации «х.ч.» и «ч.д.а.» использовали без дополнительной очистки. Для приготовления исходных растворов аминокислот ($1 \cdot 10^{-2}$ М) использовали триптофан, изолейцин, фенилаланин, лизин, глицин, глутаминовую кислоту квалификации «ч.д.а.».

Исходные растворы аминов готовили из соответствующих гидрохлоридов квалификации «ч.» Использовали нитраты металлов (натрия, калия, кальция), хлорид кальция квалификации «ч.д.а.». Рабочие растворы аминокислот, аминов, нитратов металлов готовили растворением точной навески в дистиллированной воде. Рабочий раствор нингидрина – растворением точной навески в ацетоне.

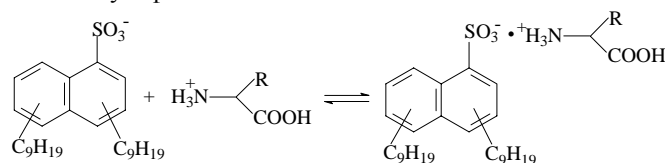
Методика экстракционного эксперимента. В делительные воронки вводили необходимые количества аминокислот, устанавливали нужное значение pH (добавлением HNO_3 или LiOH), добавляли раствор реагента в органическом растворителе или чистый растворитель и встряхивали на механическом вибраторе в течение необходимого для установления равновесия времени. Объемы водной и органической фаз составляли по 5 мл. После достижения равновесия фазы разделяли. Контроль за содержанием аминокислот осуществляли по водной фазе фотометрическим методом с нингидрином [5].

Измерения pH водных растворов проводили на pH-метре pH-121 со стеклянным электродом ЭСЛ-63-07. Спектрофотометрические измерения проводили на фотоэлектрокалориметре КФК-2 и спектрофотометре СФ-46.

Результаты и обсуждение

Экстракционные свойства динонилнафталинсульфокислоты. Изучали экстракцию Phe , Trp , Phe , Lys , Gly , Glu хлороформными растворами динонилнафталинсульфокислоты в интервале pH 1–9 (рис. 1). Время установления экстракционного равновесия не превышало 5 мин.

Извлечение максимально и практически постоянно в интервале pH 1,5–4,0, что соответствует экстракции ионных ассоциатов протонированных форм аминокислот с анионом сульфокислоты:



Снижение экстракции с увеличением pH связано с депротонированием аминокислот.

В постоянных концентрационных условиях ($C_{\text{АмН}}^+ = 5 \cdot 10^{-4}$ М, $C_{\text{ДННСК}} = 1 \cdot 10^{-3}$ М) экстракция снижается в ряду:

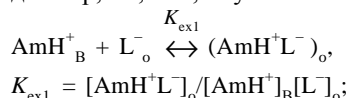
Ile>Trp>Phe>Lys>Gly>Glu, соответствующем ряду гидрофобности аминокислот [6, 7]. Степени извлечения аминокислот при экстракции их $1 \cdot 10^{-3}$ М раствором ДННСК в хлороформ в интервале концентраций $1 \cdot 10^{-4}$ – $1 \cdot 10^{-3}$ М аминокислоты (рН 2–4) приведены ниже.

Амино-кислота	Ile	Trp	Phe	Lys	Gly
R, %	83	82	73	72	13

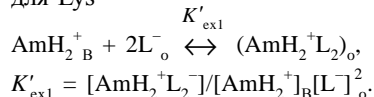
Для выяснения состава экстрагирующихся соединений изучили зависимость коэффициентов распределения аминокислот от концентрации реагента. Тангенсы углов наклона соответствующих бипологических зависимостей $\lg D - \lg C_{\text{ДННСК}}$ для Ile, Trp, Phe, Gly, изолейцина, триптофана, фенилаланина, глицина равны 1, что указывает на экстракцию соединений с соотношением $\text{AmH}^+ : \text{ДННСК} = 1:1$ (рис. 2). Для Lys тангенс угла наклона соответствующей бипологической зависимости близок к 2, т.е. соотношение Lys:ДННСК составляет 1:2. Действительно, при низких значениях рН обе аминогруппы лизина протонированы, и для образования нейтрального экстрагирующегося комплекса необходимы два аниона ДННСК.

Полагая, что вся аминокислота существует в водной фазе в виде AmH^+ , а реагент (ДННСК) – в органической фазе в виде L_o^- , уравнения экстракции можно представить следующим образом:

для Trp, Ile, Phe, Gly



для Lys



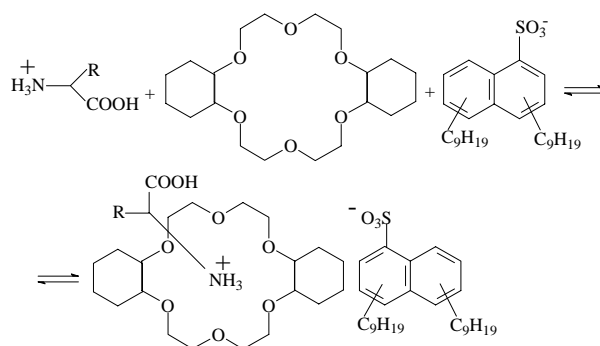
Рассчитанные значения констант экстракции представлены в табл. 1.

Мешающее влияние катионов щелочных и щелочноземельных металлов на экстракцию аминокислот реагентом ДННСК изучено на примере К, Na, Са; мешающее влияние аминов – на примере бензиламина и октиламина. Показано, что 10-кратные (по отношению к аминокислоте) количества К, Na, Са снижают извлечение Trp на 10–20%, а при 1000-кратном избытке металлов экстрагируется 20–50% аминокислоты, причем мешающее влияние возрастает в ряду: К > Na > Са. Более сильное влияние на экстракцию оказывают амины. При стехиометрическом соотношении октиламина и Trp последний экстрагируется только на 30% и практически не экстрагируется при 100-кратном избытке амина. Несколько слабее мешающее влияние бензиламина – полностью подавляет экстракцию триптофана лишь 1000-кратный избыток мешающего катиона (табл. 2).

На примере Trp исследовали экстракцию аминокислот в гептан. Как и в случае хлороформа время установления экстракционного равновесия составляло 5 мин. Степень извлечения Trp в гептан ниже, чем в хлороформ, примерно на 10%. Максимальная экстракция наблюдается при рН 1,5–4,0. Соотношение компонентов в экстрагирующемся комплексе для гептана составляет 1:1. Это, несомненно, связано с меньшей полярностью растворителя.

Таким образом, использование ДННСК в качестве реагента для экстракции дает возможность относительно эффективно извлекать аминокислоты из кислых водных растворов. Повысить степень извлечения можно путем введения в систему еще одного реагента – дициклогексил-18-краун-6.

Экстракция аминокислот динонилфталинсульфокислотой в присутствии дициклогексил-18-краун-6. Предполагалось, что «обволакивание» протонированной аминогруппы аминокислоты краун-эфиром увеличит гидрофобность ионного ассоциата:



Связывание аминогруппы полиэфирным кольцом должно способствовать и увеличению устойчивости комплекса. Действительно, извлечение аминокислот в присутствии ДЦГ18К6 заметно улучшается.

Влияние присутствия краун-эфира на эффективность экстракции аминокислот реагентом ДННСК в хлороформ представлено на рис. 3. Для аминокислот изолейцин,

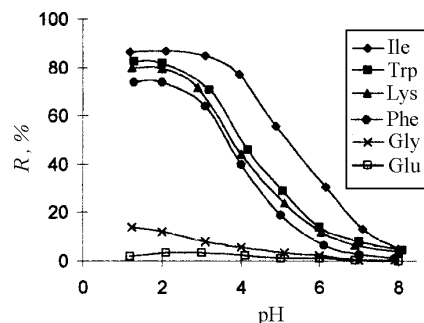


Рис. 1. Зависимость экстракции аминокислот ($5 \cdot 10^{-4}$ М) реагентом ДННСК ($1 \cdot 10^{-3}$ М, CHCl_3) от рН

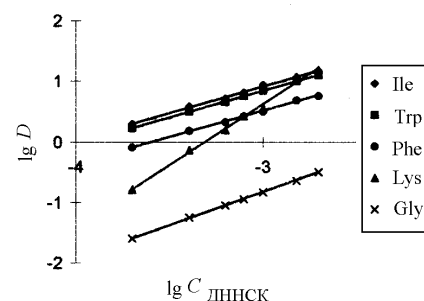


Рис. 2. Зависимость коэффициентов распределения аминокислот ($5 \cdot 10^{-4}$ М) от концентрации реагента ДННСК

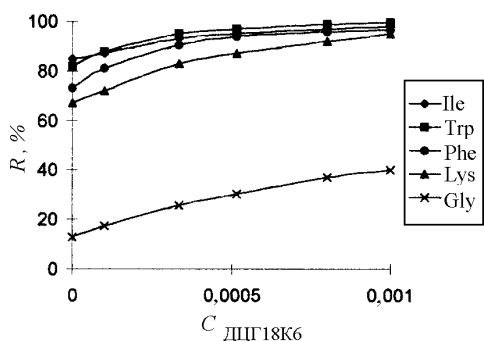


Рис. 3. Зависимость экстракции аминокислот ($5 \cdot 10^{-4}$ М) реагентом ДННСК ($1 \cdot 10^{-3}$ М, CHCl_3) от концентрации краун-эфира

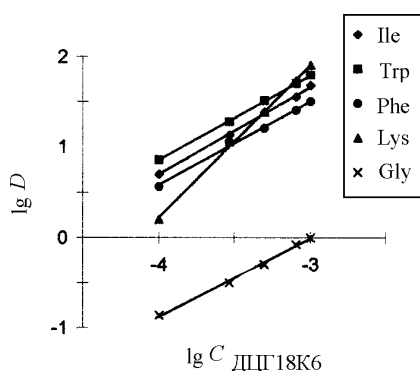


Рис. 4. Зависимость коэффициентов распределения аминокислот ($5 \cdot 10^{-4}$ М) реагентом ДННСК ($1 \cdot 10^{-3}$ М, CHCl_3) от концентрации краун-эфира

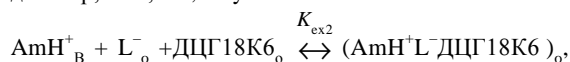
триптофан, фенилаланин извлечение составило 95% при стехиометрическом соотношении аминокислоты к краун-эфиру, а увеличение концентрации ДЦГ18К6 в два раза обеспечило практически количественное извлечение. Эффективность извлечения глицина повысилась в 2,5 раза и составила 40%.

Анализ билогарифмических зависимостей коэффициентов распределения аминокислоты от концентрации краун-эфира позволил сделать вывод, что для Ile, Trp, Phe, Gly соотношение $\text{AmH}^+ : \text{ДЦГ18К6}$ в комплексе составляет 1:1. Для Lys тангенс угла наклона соответствующей билогарифмической зависимости близок к 2, т.е. на одну молекулу Lys приходится две молекулы краун-эфира; очевидно, обе аминогруппы лизина связываются с атомами кислорода полиэфира (рис. 4).

Аналогично влияет краун-эфир и на извлечение аминокислот с ДННСК в гептан (показано на примере триптофана). В этом случае степень извлечения увеличивается с 76 до 94%, однако остается более низкой, чем в случае хлороформа. Соотношение компонентов в экстрагирующемся комплексе составляет 1:1 (определено методом сдвига равновесия).

Уравнение экстракции аминокислот динонилнафталинсульфонокислотой в присутствии краун-эфира можно представить следующим образом:

для Trp, Phe, Ile, Gly



$$K_{\text{ex2}} = [\text{AmH}^+\text{L}^-\text{ДЦГ18К6}]_0 / [\text{AmH}^+]_{\text{B}} [\text{L}^-]_{\text{O}} [\text{ДЦГ18К6}]_0;$$

Таблица 1

Константы экстракции аминокислот в хлороформ с ДННСК в отсутствие ($\text{Lg } K_{\text{ex1}}$) и в присутствии ДЦГ18К6 ($\text{Lg } K_{\text{ex2}}$)

Аминокислота	$\text{Lg } K_{\text{ex1}}$	$\text{Lg } K_{\text{ex2}}$
Изолейцин	$3,9 \pm 0,2$	$8,6 \pm 0,2$
Триптофан	$3,8 \pm 0,1$	$8,2 \pm 0,2$
Фенилаланин	$3,6 \pm 0,1$	$8,0 \pm 0,1$
Лизин	$3,8 \pm 0,2^*$	$8,5 \pm 0,2$
Глицин	$2,2 \pm 0,1$	$6,1 \pm 0,1$

* $\text{Lg } K_{\text{ex}}$ для комплексов 1:2.

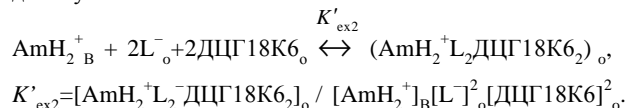
Таблица 2

Мешающее влияние катионов металлов и аминов на экстракцию триптофана ($5 \cdot 10^{-4}$ М) реагентом ДННСК ($1 \cdot 10^{-3}$ М)

Мешающий ион	R (%) при соотношении аминокислота : мешающий ион*			
	1 : 1	1 : 10	1 : 100	1 : 1000
K	79	68	51	20
Na	81	75	66	45
Ca	82	76	68	54
Октиламин	29	12	1	
Бензиламин	40	21	8	1

* В отсутствие мешающего иона R = 82 %.

для Lys



Рассчитанные значения констант экстракции представлены в табл. 2.

Таким образом, показано, что введение краун-эфира позволяет улучшить экстракцию аминокислот катионообменным экстрагентом (в ряде случаев вплоть до количественного извлечения).

Авторы выражают искреннюю благодарность докт. хим. наук. А.А.Формановскому и канд. хим. наук. Д.Н.Муравьеву за предоставленные реактивы и Российскому фонду фундаментальных исследований за финансовую поддержку.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Muthas L., Muthas R., Buschmann H.-J. // J.Inclusion Phenom. Mol. Recognit. Chem. 1995. **23**. P. 167.
- Popescu D.O., Muthas L., Konstantinescu T. // Rev. Roum. Chim. 1997. **42**. P. 907.
- Chen H., Ogo S., Fish R.H. // J. Chem. Soc. 1996. **118**. P. 4993.
- Kelly N.A., Lukhezo M., Reuben B.J. // J. Chem. Technol. Biotechnol. 1998. **72**. P. 347.
- Семенов А.Д., Ивлева И.Н., Дацко В.Г. // Изв. АН СССР ОХН 1961. С. 184.
- Barett G.C. Chemistry and biochemistry of the aminoacids. N.Y., 1985.
- Волькенштейн М.В. Биофизика М., 1981

Поступила в редакцию 14.09.99