

УДК 577.1:543.422.27

ГЕЛЕОБРАЗОВАНИЕ В НИЗКОКОНЦЕНТРИРОВАННЫХ ВОДНЫХ РАСТВОРАХ, СОДЕРЖАЩИХ N-АЦЕТИЛ-L-ЦИСТЕИН И НИТРАТ СЕРЕБРА**С.Д. Хижняк¹, М.М. Овчинников², П.М. Пахомов¹**¹*Тверской государственной университет*

E-mail: sveta_khizhnyak@mail.ru

²*Тверская государственная медицинская академия**Статья поступила 10 июля 2013 г.*

Исследован процесс структурирования супрамолекулярной системы на основе низкоконцентрированных водных растворов N-ацетил-L-цистеина и нитрата серебра с применением методов электронной спектроскопии, просвечивающей электронной микроскопии и динамического светорассеяния. Рассмотрен механизм гелеобразования в системе.

Ключевые слова: N-ацетил-L-цистеин, нитрат серебра, кластер, супрамолекулярная структура, гидрогель.

ВВЕДЕНИЕ

Гелеобразование в сильно разбавленных водных или водно-органических растворах низкомолекулярных соединений относится к числу парадоксальных и редко наблюдаемых физико-химических процессов. Парадоксальность явления состоит в том, что хаотически движущиеся молекулы растворенных веществ, среднее расстояние между которыми составляет (при концентрации 1 мМ) сотни ангстрем, способны спонтанно организовываться в трехмерную пространственную сетку (гель), а не образовывать, например, слабо взаимодействующие комплексы или агрегировать с образованием осадка, что, на первый взгляд, представляется более вероятным.

Известно [1], что германат кальция способен образовывать гель при концентрации 0,067 %. Совершенно другого типа гели были получены на основе восьми производных L-цистина [2]. Оказалось, что раствор в диметилсульфоксиде такого производного, как, например, N,N'-добензоил-L-цистин диамида, при разбавлении его водой желируется. При этом концентрация растворенного вещества в геле составляет всего 0,5 мМ. Авторами уже в течение ряда лет изучается система, полученная на основе природной аминокислоты L-цистеина (2-амино-3-меркаптопропионовой кислоты) и нитрата серебра, которая может структурироваться в гель при общей концентрации растворенных компонентов 0,015 %, и названная авторами цистеин-серебряным раствором (ЦСР) [3–6]. Было установлено, что процесс гелеобразования значительно инициируется добавлением в ЦСР щелочей, электролитов с определенными анионами [3–5] или разбавлением раствора некоторыми водорастворимыми жидкими неэлектролитами, например, спиртами [6]. Эти исследования позволили предложить модель ЦСР и качественно интерпретировать наблюдаемые закономерности гелеобразования. Более глубокий анализ процессов самоорганизации в разбавленных многокомпонентных растворах требует обобщения более широкого экспериментального материала. Нами открыта новая система, составленная из N-ацетил-L-цистеина (НАЦ) и нитрата серебра, способная образовывать гидрогель при малых концентрациях компонентов. Следует отметить, что в работе [7] уже сообщалось о получении

геля из указанных веществ. Однако в этой работе концентрация компонентов в геле была в 30—60 раз выше, чем в наших опытах, а получение геля обеспечивалось в трехстадийном процессе. Первоначально формировался осадок при взаимодействии компонентов, затем осадок растворяли добавлением гидроксида натрия и, наконец, прозрачный раствор помещали в пары уксусной кислоты до образования геля. Целью настоящей работы являлись синтез и изучение процесса гелеобразования при непосредственном смешении водных растворов НАЦ и нитрата серебра с привлечением методов УФ спектроскопии, просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ) и динамического светорассеяния (ДСР).

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе были использованы следующие реактивы: серебро азотнокислое 99 % (Lancaster), N-ацетил-L-цистеин 99 % (Across). Все растворы готовили на бидистиллированной воде.

Опыты по исследованию структурирования в растворах, содержащих НАЦ и нитрат серебра, проводили по следующей схеме: к водному раствору НАЦ приливали раствор нитрата серебра, смесь быстро перемешивали встряхиванием и через 18 ч фиксировали наблюдаемый эффект. В опытах использовали свежеприготовленные растворы НАЦ.

Измерение интенсивности ДСР проводили на установке Zetasizer Nano-ZS (Malvern, Великобритания), в которой используется He—Ne лазер ($\lambda = 633$ нм) мощностью 4 мВт. Все измерения осуществляли при 23 °С.

Анализ морфологии гелей выполняли в центре коллективного пользования "Просвечивающая электронная микроскопия" МГУ, используя электронный микроскоп Leo 912 AB OMEGA (Carl Zeiss, Германия). Образцы наносили на медные сетки, покрытые формвар-углеродной пленкой толщиной около 100 нм, и высушивали на воздухе.

Спектры образцов в УФ видимом диапазоне регистрировали на спектрофотометре Evolution Array (Thermo Scientific) при температуре 23 °С в кварцевых кюветах толщиной 1 мм.

Прочность гелей оценивали по характеру деформации столбика геля в пробирке при ее переворачивании на 180°. Определенному типу деформации присваивали соответствующий балл [8]. Так, если при переворачивании пробирки столбик геля не деформировался, то присваивали балл 5; если столбик геля деформировался, образуя куполообразный мениск, но при этом удерживался на месте — присваивали балл 4; если гель медленно отрывался кусками — 3; если легко срывался — 2; легко текущий гель характеризовали баллом 1. На рис. 1, а приведены средние значения, как правило, из 3—4-х параллельных опытов.

Измерения pH растворов осуществляли с помощью pH-метра Seven Multi S70 (Mettler Toledo). Измерения pH гелей проводили следующим образом: через 18 ч (после завершения гелеобразования) гель переносили в полиэтиленовую пробирку и в него погружали стеклянный электрод.

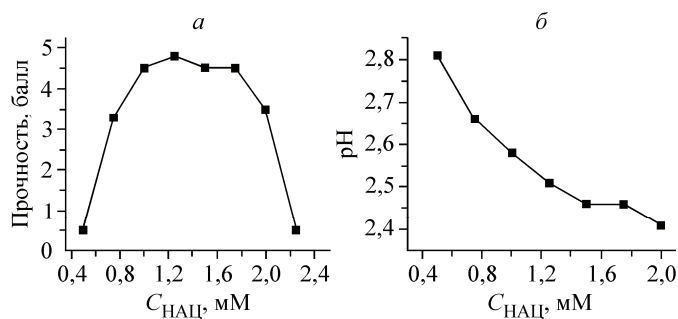


Рис. 1. Зависимость прочности гелей (а) и pH образцов гелей (б) на основе НАЦ—нитрат серебра от концентрации НАЦ; соотношение молярных концентраций компонентов 1:1

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

N-ацетил-L-цистеин является производным от L-цистеина, в котором один из атомов водорода аминогруппы замещен на ацетильную группу, что приводит к изменению кислотно-основных свойств молекулы. Так, константы ионизации L-цистеина имеют значения $pK_{a1} = 1,96$, $pK_{a2} = 8,36$, $pK_{a3} = 10,28$ [9], а соответствующие константы для НАЦ $pK_{a1} = 1,7$, $pK_{a2} = 3,2$, $pK_{a3} = 9,75$ [10]. Из этих данных следует, что растворы НАЦ имеют более низкие значения pH, вследствие меньшего сродства замещенной аминогруппы к протону и большей способности карбоксильной группы к ионизации. По этой причине заряды функциональных групп этих молекул в водной среде также различаются.

При сливании водных растворов НАЦ и нитрата серебра определенных концентраций образуется прозрачная смесь, которая желируется с течением времени. Наиболее прочные гели формировались при эквимолярном соотношении компонентов. При избытке нитрата серебра прочность гелей уменьшается, и уже при отношении молярных концентраций 1,14 гели не образуются. Для сравнения отметим, что физико-химические условия гелеобразования для этой системы существенно отличаются от условий для растворов с L-цистеином: для получения гелеобразующего ЦСР необходим избыток ионов серебра [3—5]. Зависимость прочности гелей на основе НАЦ от концентрации компонентов, взятых в молярном отношении 1:1, показана на рис. 1, а.

Как следует из данных рис. 1, а, по мере увеличения концентрации компонентов прочность гелей возрастает, а затем после достижения определенной концентрации монотонно уменьшается. Причина существования такой зависимости становится более понятной, если прочностные характеристики гелей сопоставить со значениями pH этой серии растворов, представленными на рис. 1, б. Видно, что формирование гелей возможно лишь в определенном, довольно узком, диапазоне значений pH растворов.

Это означает, что именно в этом диапазоне pH реализуются такие заряды функциональных групп молекул НАЦ, которые способствуют образованию наиболее устойчивых гелей. Если допустить, что при замещении атома водорода в тиольной группе ($HS-$) НАЦ ионом серебра константы ионизации молекулы почти не изменяются, то можно видеть, что гель образуется при значениях pH растворов, близких к pH изоэлектрической точки, равной 2,45, вычисление которой по известным формулам [9] дает значение 2,45. Поэтому выведение системы из зарядового состояния, соответствующего изоэлектрической точке, должно препятствовать процессу гелеобразования. Действительно, это заключение подтверждается в эксперименте. Так, при добавлении в раствор хлорной кислоты до аналитической концентрации 0,8 мМ или гидроокиси натрия до аналитической концентрации 1 мМ формирование гелей не наблюдается.

Исследование УФ спектров гелей показало, что в спектре наблюдаются две полосы поглощения, одна из которых имеет максимум при $\lambda = 265$ нм, а другая, менее выраженная, при $\lambda = 320$ нм (рис. 2). Следует заметить, что НАЦ не имеет хромофорных групп, поглощающих в этом спектральном диапазоне. Однако имеются предположения, что молекулы меркаптида серебра могут ассоциироваться с образованием линейных цепочек типа $-Ag-S-Ag-S-$ [11]. Теоретически это возможно, так как атомы серы в молекуле меркаптида имеют две неподеленные пары электронов, и при образовании цепочки электроны одной из этих пар могли бы обобществляться с вовлечением свободных орбиталей иона серебра. С этой точки зрения наблюдаемое небольшое увеличение интенсивности длинноволновой полосы поглощения во времени можно интерпретировать как следствие образования таких цепочек [12].

Образование в гелеобразующем растворе сложных полимолекулярных структур было подтверждено методом ДСР (рис. 3). Из рисунка видно, что в системе присутствуют рассеивающие центры нескольких типов, которые можно идентифицировать как ассоциаты кластеров или как фрагменты сеточных структур. Следует отметить, что картина распределения рассеивающих центров по размерам для изучаемой системы весьма лабильна. Вероятно, этот факт отражает переходы системы между разными структурными состояниями.

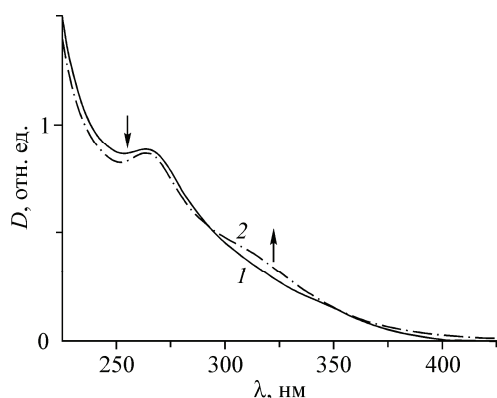


Рис. 2. УФ спектры поглощения образцов геля на основе NAЦ—AgNO_3 в зависимости от времени стояния после момента смешивания исходных растворов: 5 мин (1), 5 ч (2) ($C_{\text{NAЦ}} = 1,25 \text{ мМ}$, $C_{\text{AgNO}_3} = 1,25 \text{ мМ}$)

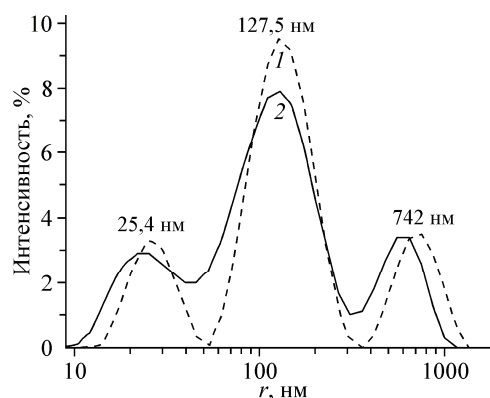


Рис. 3. Распределение частиц по размерам (в единицах интенсивности) для образцов гелей на основе NAЦ—AgNO_3 в зависимости от времени стояния после момента смешивания исходных растворов: 11 мин (1) и 22 мин (2) ($C_{\text{NAЦ}} = 1,25 \text{ мМ}$, $C_{\text{AgNO}_3} = 1,25 \text{ мМ}$)

В результате исследований методом ПЭМ обнаружено, что пространственная сетка гидрогеля на основе NAЦ—AgNO_3 состоит из тонких нановолокон, а отсутствие наночастиц в образце подтверждается электронограммой, показанной на врезке рис. 4, а. Рис. 4, б позволяет увидеть детали структуры высушенного образца, который состоит из пересекающихся цепочек, образованных линейно координированными фрактальными кластерами с размером $1,6 \div 10 \text{ нм}$. В крупных кластерах можно различить более электронно-плотные центры, окруженные диффузной оболочкой. Физически это отражает тот факт, что большие кластеры образованы в результате ассоциации нескольких малых кластеров. Данные ПЭМ показывают, что в образцах на основе NAЦ формируются более крупные кластеры и их ассоциаты, чем в случае систем на основе L-цистеина [8].

На основании приведенных экспериментальных данных можно предложить следующий механизм формирования пространственной сетки в водном растворе NAЦ и нитрата серебра. Первой, самой быстрой стадией, является взаимодействие NAЦ с ионом серебра, замещающим протон в меркаптогруппе молекулы. Как мы уже отмечали при анализе систем с L-цистеином , это характерная реакция для соединений с незамещенной меркаптогруппой [13]. В данном случае образуются молекулы меркаптида серебра (Ag—NAЦ), которые ассоциируют в олигомерные супрамолекулярные цепочки, построенные из чередующихся атомов серебра и серы, $\text{—Ag—S(R)—Ag—S(R)—Ag—S(R)—}$, где R обозначает фрагменты молекулы NAЦ . Однако

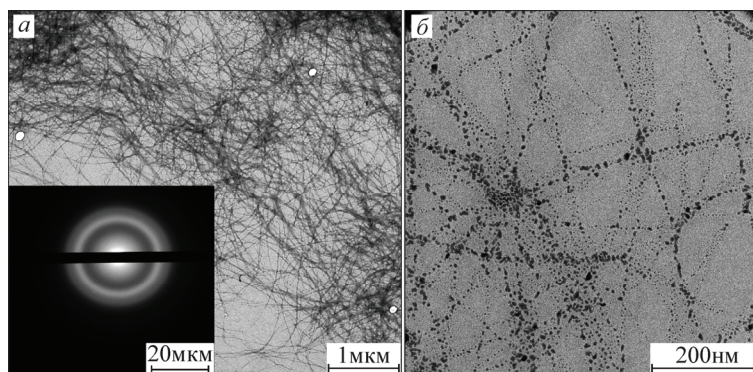


Рис. 4. Микрофотографии образцов гелей на основе NAЦ—AgNO_3 при различном увеличении ($C_{\text{NAЦ}} = 1,25 \text{ мМ}$, $C_{\text{AgNO}_3} = 1,25 \text{ мМ}$) и полученная при этом электронограмма (врезка на рис. 4, а)

в области концентраций компонентов, благоприятных для гелеобразования, эти цепочки не агрегируют с образованием осадка, как это имеет место в случае L-цистеина. Но могут ассоциировать благодаря кулоновскому взаимодействию противоположных зарядов, приблизительно в равных количествах распределенных вдоль цепочки. Совокупность связанных между собой олигомерных цепочек образует кластер. В силу того, что на основе НАЦ можно получить гель при малых концентрациях компонентов, кластеры должны иметь фрактальный характер [14, 15]. Кластеры могут объединяться в цепочки, из которых формируются сетчатые структуры. Соединение кластеров может осуществляться через цепочки Ag—НАЦ (цепочки, проходящие через два кластера), как мы это предполагали для систем на основе цистеина. Сеточные структуры могут участвовать в дальнейшем процессе самосборки в более протяженные пространственные структуры, вплоть до образования непрерывной пространственной сетки.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Открыта новая система, полученная на основе водных растворов N-ацетил-L-цистеина и нитрата серебра, способная образовывать гель при низких (миллимолярных) концентрациях компонентов. Введение ацетильной группы в молекулу L-цистеина существенно меняет условия и механизм гелеобразования по сравнению с L-цистеином, что в значительной степени обусловлено изменением заряда аминокислотного компонента. Однако общая последовательность процесса гелеобразования остается сходной, а именно: сначала образование цепочек меркаптида серебра, затем образование фрактальных кластеров и цепочек кластеров и, наконец, формирование пространственной сетки.

В заключение авторы выражают благодарность С.С. Абрамчуку за любезно предоставленные микрофотографии гидрогеля на основе НАЦ.

Работа выполнена при финансовой поддержке Программы стратегического развития ФГБОУ ВПО "Тверской государственной университет" (2012—2016 гг.), подраздел "Разработка и освоение гель-технологий нового типа как основы создания сверхвысокопрочных волокон и лекарственных препаратов" и гос. задания № 01201253692 (2012—2014) "Наноструктурированные супрамолекулярные гидрогели из биологически активных веществ для медицинского назначения".

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Болдырев А.И. Демонстрационные опыты по физической и коллоидной химии. – М.: Высшая школа, 1976.
2. Menger F.M., Caran K.L. // J. Amer. Chem. Soc. – 2000. – **122**. – P. 11679 – 11691.
3. Овчинников М.М., Хижняк С.Д., Пахомов П.М. В: Физико-химия полимеров / Вып. 13. – Тверь: ТвГУ, 2007.
4. Овчинников М.М., Хижняк С.Д., Пахомов П.М. В: Физико-химия полимеров / Вып. 14. – Тверь: ТвГУ, 2008.
5. Пахомов П.М., Овчинников М.М., Хижняк С.Д., Рощина О.А., Комаров П.В. // Высокомолекул. соед. А. – 2011. – **53**, № 9. – С. 1574.
6. Овчинников М.М., Хижняк С.Д., Пахомов П.М. // Журн. структур. химии. – 2011. – **52**, № 6. – С. 1200.
7. Casuso P., Carrasco P., Loinaz I., Grande H.J., Odriozola I. // Org. Biomol. Chem. – 2010. – **8**, N 23. – P. 5455 – 5458.
8. Пахомов П.М., Хижняк С.Д., Овчинников М.М., Комаров П.В. Супрамолекулярные гели. – Тверь, 2011.
9. Батлер Дж.Н. Ионные равновесия. – Л.: Химия, 1973.
10. Инцеди Я. Применение комплексов в аналитической химии. – М.: Мир, 1979.
11. Anderson L. // J. Polym. Sci. – 1972. – **10**, part A1. – P. 1963.
12. Маррел Дж., Кеттл С., Теддер Дж. Химическая связь. – М.: Мир, 1980.
13. Черонис Н.Д., Ма Т.А. Микро- и полумикрометоды органического функционального анализа. – М.: Мир, 1973.
14. Смирнов Б.М. Физика фрактальных кластеров. – М.: Наука, 1991.
15. Смирнов Б.М. // Усп. физ. наук. – 1992. – **162**, № 8. – С. 43.