

УДК 577.1:543.422.27
DOI 10.26456/vtchem2020.4.8

ПРОЦЕСС САМООРГАНИЗАЦИИ В НИЗКОКОНЦЕНТРИРОВАННЫХ ВОДНЫХ СИСТЕМАХ НА ОСНОВЕ N-АЦЕТИЛ-L-ЦИСТЕИНА, L-ЦИСТЕИНА И АЦЕТАТА СЕРЕБРА

Д.В. Аверкин, Д.В. Вишневецкий, В.Р. Петров,
С.Д. Хижняк, П.М. Пахомов

Тверской государственной университет

Проведено комплексное исследование процесса самоорганизации при сливании низкоконцентрированных водных растворов N-ацетил-L-цистеина и ацетата серебра. Все стадии самоорганизации изучены с помощью измерения величины рН, методов вискозиметрии, УФ спектроскопии и динамического светорассеяния (ДСР). Установлено, что началом самосборки является замена водорода в меркаптогруппе аминокислоты на катион серебра с образованием молекулы меркаптида серебра (МС). Далее происходит образование цепочек вида $(-Ag-S(NCys)-Ag-S(NCys)-)_n$, при этом происходит протонирование аминокислотных остатков N-ацетил-L-цистеина. Предложен механизм самоорганизации в водном растворе N-ацетил-L-цистеина и ацетата серебра (N-ацетилцистеин-серебряный раствор - HA_{ac}), заключающийся в образовании агрегатов типа «ядро-оболочка». «Ядро» агрегатов состоит из цепочек вида $(-Ag-S(NCys)-Ag-S(NCys)-)_n$, «оболочка» агрегатов состоит из протонированных аминокислотных остатков. Связывание таких агрегатов происходит посредством образования связей с ацетат-анионами.

Ключевые слова: *N-ацетил-L-цистеин, ацетат серебра, низкоконцентрированный водный раствор, самоорганизация, супрамолекулярный гидрогель.*

В настоящее время основные научные исследования молекулярной самосборки сфокусированы в области природных высокомолекулярных соединений (белков, нуклеиновых кислот, полисахаридов). При этом вопросу самосборки низкомолекулярных соединений уделяется меньшее внимание, а вместе с тем, процессы самосборки с их участием могут приводить к необычному явлению формирования супрамолекулярных гелей при низком содержании дисперсной фазы [1]. Необходимость установления взаимосвязи в цепочке «синтез-структура-свойство» различных супрамолекулярных

систем является актуальной проблемой для понимания механизма самоорганизации и перспектив использования таких систем. Так, например, супрамолекулярные гидрогели уже находят широкое применение в биомедицине [2].

Известно, что супрамолекулярные гидрогели возможно получить на основе низкоконцентрированных водных растворов L-цистеина и различных солей серебра (далее - ЦСР) – таких как нитрат или ацетат серебра – при введении различных электролитов в качестве желирующих агентов [3,4]. Таким системам характерно выстраивание в процессе самоорганизации супрамолекулярной структуры фрактального вида из кластеров, состоящих из цепочек вида (-Ag-S(Cys)-Ag-S(Cys)-)_n, и связанных с ними наночастиц серебра. Роль электролита заключается в связывании кластеров из супрамолекулярных цепей между собой по amino- и карбоксильным группам. Известна также система на основе L-цистеина и нитрата серебра, способная к образованию гидрогеля без введения инициатора [5]. Основной принцип образования супрамолекулярной гелевой сетки схож с системами на основе солей нитрата и ацетата серебра, однако в процессе саморганизации происходит реакция замещения аминогруппы на гидроксильную при взаимодействии с образующейся азотистой кислотой. Поэтому интересно более подробно изучить влияния аминогруппы L-цистеина на процессы самоорганизации с солями серебра. Известно, что водные растворы на основе N-ацетил-L-цистеина (N-ацетилцистеина) и нитрата серебра также могут образовывать гидрогели без введения инициатора [6]. Важным условием для гелеобразования является соблюдение значений pH в готовых растворах ниже 3 с целью смещения константы ионизации N-ацетилцистеина к значению $pK_a = 1,7$. Особенностью таких гидрогелей является отсутствие характерной полосы поглощения 395 нм в УФ-спектре, характерной для наночастиц серебра [7].

С целью повышенного интереса к изучению явления гелеобразования без введения инициатора и выяснению влияния аминогруппы L-цистеина на процесс самоорганизации в ЦСР в данной работе были проведены сравнительные исследования для водных растворов на основе N-ацетилцистеин – ацетата серебра (НАЦац) и L-цистеин – ацетат серебра (ЦСРац) с помощью различных физико-химических методов.

Экспериментальная часть

Для приготовления смесей на основе L-цистеина и CH_3COOAg (ацетата серебра) использовали водные растворы исходных компонентов с концентрацией 0,01 М. Для получения 2 мл исследуемой смеси к 0,6 мл раствора L-цистеина приливали 0,65 мл воды, а затем

0,75 мл раствора ацетата серебра. Отношение молярных концентраций ионов серебра и цистеина в данном случае равно 1,25. После энергичного перемешивания растворов исходных компонентов получали слегка мутный раствор, который при стоянии в защищенном от света месте при комнатной температуре через 4-6 ч становился прозрачным, приобретая слегка желтую окраску. Этот созревший прозрачный раствор и является ЦСРац.

Для приготовления смесей на основе N-ацетилцистеина и CH_3COOAg (ацетата серебра) использовали водные растворы исходных компонентов с концентрацией 0,01 М. Для получения 2 мл исследуемой смеси к 1 мл раствора N-ацетилцистеина 1 мл раствора ацетата серебра. Отношение молярных концентраций ионов серебра и цистеина в данном случае равно 1,0. Для приготовления систем с соотношением 1,3 и 2 к 1 мл раствора N-ацетилцистеина приливали 1,3 мл и 2 мл раствора ацетата серебра соответственно. После энергичного перемешивания растворов исходных компонентов получали слегка мутный раствор, который при стоянии в защищенном от света месте при комнатной температуре через 12 ч становился прозрачным, не приобретая окраски в системе с молярным соотношением 1,0 и слабо окрашиваясь в желтый цвет в системе с молярными соотношениями 1,3 и 2,0. Эти созревшие растворы мы обозначили как НАЦац.

Для приготовления разбавленных растворов НАЦац, необходимых для использования в методе измерения дзета-потенциала осуществляли увеличение объема добавляемой воды с сохранением молярного отношения концентраций ионов серебра и N-ацетилцистеина.

Реологические исследования проводили на вибрационном лепестковом вискозиметре «SV-10» фирмы A&D Company. Вибрации двух тонких сенсорных пластин производились с частотой 30 Гц и постоянной амплитудой ~1 мм. Температура исследуемых образцов составляла 23°C. Все образцы готовили и хранили в специальных кюветах объемом 10 мл, которые крепили к сенсорному устройству.

Измерения величины рН выполняли на рН-метре METTLER TOLEDO SevenMulti, регистрация данных производилась в условиях постоянного объема исследуемых систем (10мл) во временных промежутках $t_0 = 1$ ч с момента смешивания растворов и спустя $t = 48$ ч нахождения системы в покое; перед регистрацией данных в момент t образцы перемешивались с целью разрушения слабых водородных связей. Во время эксперимента система термостатировалась при температуре $25 \pm 1^\circ\text{C}$.

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

Измерение дзета-потенциала и размера образующихся кластеров в образцах осуществляли с использованием анализатора Zetasizer "Nano ZS" (Malvern). Измерения проводились путем подготовки необходимого исследуемого раствора, после чего он вносился в объеме 0,8 мл в U-образную капиллярную кювету, помещался в кюветную камеру и далее проводились измерения.

Результаты и их обсуждение

На первом этапе исследований были приготовлены разбавленные водные растворы с мольным соотношением N-ацетилцистеина к ацетату серебра 1,0 к 1,0, 1,0 к 1,3 и 1,0 к 2,0. Концентрация готовых растворов НАЦа составляла порядка 5 мМ по аминокислоте. Выбор соотношений и концентраций обусловлен ранее полученными результатами для других супрамолекулярных систем на основе производных цистеина и солей серебра [3,6]. При соотношении 1,0 к 1,0 в системах НАЦ на основе нитрата серебра наблюдались наиболее «прочные» гели, а при соотношении 1,0 к 2,0 и более происходит устойчивое комплексообразование в растворах НАЦ с ионами серебра, меди и золота [7,8]. Соотношение 1,0 к 1,3 соответствует оптимальным условиям самоорганизации в растворах ЦСРац [4], поэтому такая система является также важной реперной точкой в объяснении влияния аминокислотной группы L-цистеина и сопряжения между функциональными группами L-цистеина на процессы самоорганизации с катионами серебра.

Наличие самосборки в растворе НАЦа подтверждает то, что в системе происходит гелеобразование. Гидрогель обладает тиксотропными свойствами, так как при механическом воздействии он переходит в раствор, а в состоянии покоя через некоторое время снова образуется гель. Данные вискозиметрии (рис. 1) показывают, что динамическая вязкость для системы НАЦа с соотношением 1,0 к 1,0 (рис. 1а) в момент начала измерений (момент «покоя») совпадает с динамической вязкостью ЦСРац и равна 2,3 мПа·с. Однако в процессе длительного механического воздействия она превышает вязкость ЦСРац и достигает значения 3,2 мПа·с. Динамическая вязкость раствора НАЦа с соотношением 1,0 к 1,3 (рис. 1б) изначально на 0,5 мПа·с выше динамической вязкости ЦСРац и равна 2,9 мПа·с, а по завершении эксперимента динамическая вязкость НАЦа становится равной 3,5 мПа·с.

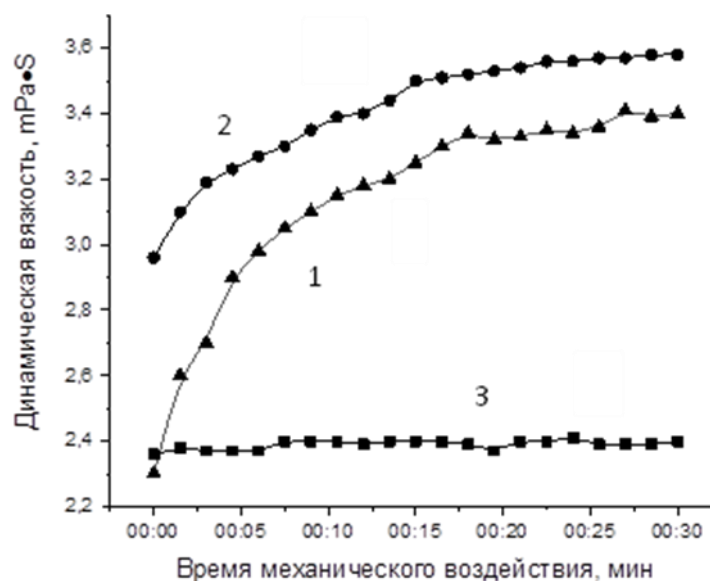


Рис. 1. Зависимость динамической вязкости раствора от длительности механического воздействия: 1 – НАЦац, соотношение 1,0 к 1,0; 2 – НАЦац, соотношение 1,0 к 1,3; 3 – ЦСРац, соотношение 1,0 к 1,25; Концентрация по аминокислоте 5мМ, Т = 23°С

Известно [9], что явлением самосборки обладают разбавленные растворы на основе L-цистеина с нитритом серебра и НАЦ с нитратом серебра. В первом случае это обусловлено окислением аминогруппы до гидроксильной в присутствии нитрит-аниона и образованию водородных связей между гидроксильными и карбоксильными группами разных цепочек [5]. В свою очередь, система НАЦ с нитратом серебра тоже обладает низкими значениями рН и гелеобразование происходит при рН ниже изоэлектрической точки аминокислоты N-ацетилцистеина при рН=2,5 [6]. Однако в статье [7] отмечается, что желирование растворов НАЦ наблюдается и при приближении к изоэлектрической точке, т.е. когда в растворе происходит достаточное накопление протонированных молекул меркаптида серебра вида $AgHNac$ и уменьшается количество депротонированных молекул $AgNac^-$ [9]. Учитывая степень диссоциации солей серебра, можно заключить, что у ацетата серебра степень диссоциации в воде значительно ниже, чем у нитрата и нитрита серебра. Введение ацетата серебра в водный раствор НАЦ вызывает уменьшение рН за счет реакции катионов серебра с меркапто-группой N-ацетилцистеина, в

результате чего происходит освобождение протона и протонирование максимально возможного количества молекул N-ацетилцистеина.

Результаты измерения величины рН для растворов НАЦац представлены в табл. 1. Видим, что наблюдается уменьшение значений рН во времени, и, следовательно, пропорциональное увеличение концентрации ионов H^+ в растворе. Значение рН в созревшем растворе ЦСРац равно 3,9.

Таблица 1. Значения рН НАЦац в зависимости от времени с момента смешения раствора.

Система	рН, t = 1 ч	рН, t = 48 ч
НАЦац, 1,0 к 1,0	3,8	3,4
НАЦац, 1,0 к 1,3	3,7	3,1

В растворах НАЦац с соотношениями 1,0 к 1,0 и 1,0 к 1,3 (рис. 2а и 2б) наблюдаются характерные, как и в растворе ЦСРац (рис. 2г), полосы поглощения с максимумами 270 и 320 нм.

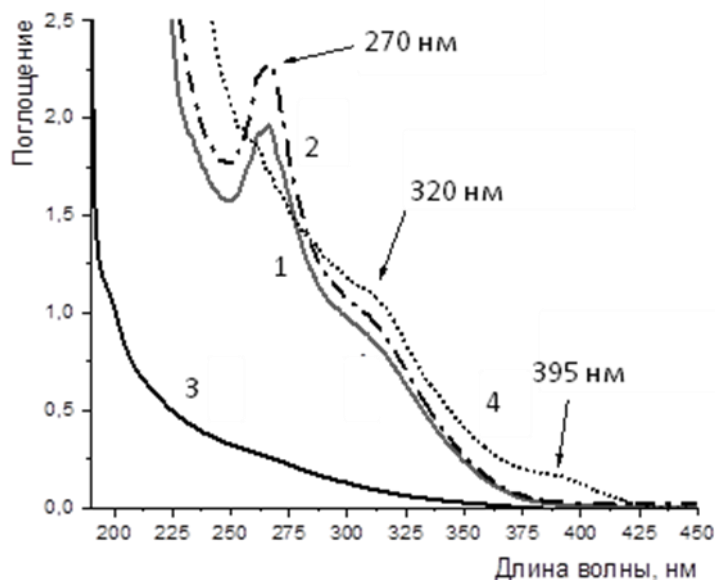


Рис. 2. Электронные спектры растворов НАЦац и ЦСРац: 1 – НАЦац, соотношение 1,0 к 1,0; 2 – НАЦац, соотношение 1,0 к 1,3; 3 – НАЦац, соотношение 1,0 к 2,0; 4 – раствор ЦСРац 1,0 к 1,25; Концентрация по аминокислоте для систем НАЦац – 5 мМ и для системы ЦСРац – 3 мМ

В системе с соотношением аминокислоты к соли серебра 1,0 к 1,3 поглощение полос выше, чем в системе с эквимольным соотношением аминокислоты и соли серебра. Предположительно, большее, чем у ЦСРац, поглощение на длине волны 270 нм относится к большей суммарной активности $n \rightarrow \pi^*$ переходов в связях C-O и C=O карбонильной и карбоксильной групп [10]. Полосу поглощения на длине волны 320 нм, по-видимому, можно отнести к связыванию меркапто-группы N-ацетилцистеина с катионом серебра за счет $ds^* \rightarrow rp$ перехода [7]. Ранее предполагалось, что поглощение 320 нм может относиться также к активности amino-группы аминокислоты L-цистеин, участвующей в реакции [4], однако в N-ацетилцистеине аминогруппа заблокирована.

Согласно электронным спектрам в образце с двукратным избытком катионов серебра (рис. 2в) не наблюдается полос поглощения, а в растворе со временем выпадает осадок меркаптида серебра.

В результате обработки полученных данных можно высказать гипотезу, что в растворе НАЦац имеется структурная организация, однако она отличается от таковой в растворе ЦСРац, так как

- отсутствует характерная полоса поглощения 395 нм в УФ-спектре раствора НАЦац (рис 2);
- раствор НАЦац при равных концентрациях ЦСРац способен к частичному желированию при приложении внешнего механического воздействия.

Следует отметить, что процесс гелеобразования в растворе НАЦац, а также в растворах НАЦ с участием других солей серебра, обусловлен наличием меньшего числа акцепторов протонов в молекуле этой аминокислоты, т.к. аминогруппа заблокирована и нейтрализована карбонильным заместителем, т.е. смещается акцент на ионизацию молекул воды и самосборку соседних молекул меркаптида серебра (МС) по карбоксильным и карбонильным группам путем электростатических и водородных взаимодействий.

Для понимания механизма самоорганизации в растворах НАЦац необходимо объяснить влияние наночастиц серебра и характерного для них поглощения 395 нм. Также известно, что поглощение наночастиц серебра (AgNPs) в электронном спектре может начинаться от 380 нм и достигать 600 нм и более в зависимости от размера и формы наночастиц [11,12]. Действительно, все ЦСР и гели на их основе имеют желтоватую окраску, т.е., предположительно, в ЦСРац присутствуют малые по размеру AgNPs. Действительно, на микроснимках гидрогеля, полученных с помощью метода просвечивающей электронной

микроскопии, они наблюдаются в виде черных частиц размером ~ 20 нм на фоне пространственной геле-сетки [11, 13].

В статьях [5, 14] выдвигалась гипотеза также с точки зрения теории двойного электрического слоя (ДЭС), поэтому были проведены измерения дзета-потенциала в растворах НАЦац; предварительно они были приготовлены с учетом требования проведения эксперимента электрофоретического светорассеяния. После разбавления исходных растворов в 4 раза были измерены значения дзета-потенциала для растворов НАЦац 1,0 к 1,0 и 1,0 к 1,3. Чтобы удостовериться, что в таких растворах происходит процесс самоорганизации, использовали метод УФ-спектроскопии (рис 3а и 3б). Видно, что в УФ спектрах наблюдается наличие характерных полос поглощения 320 и 260 нм. Смещение полосы поглощения от 270 (рис. 2) к 260 нм (рис. 3) предположительно связано с изменением размеров образующихся агрегатов НАЦац.

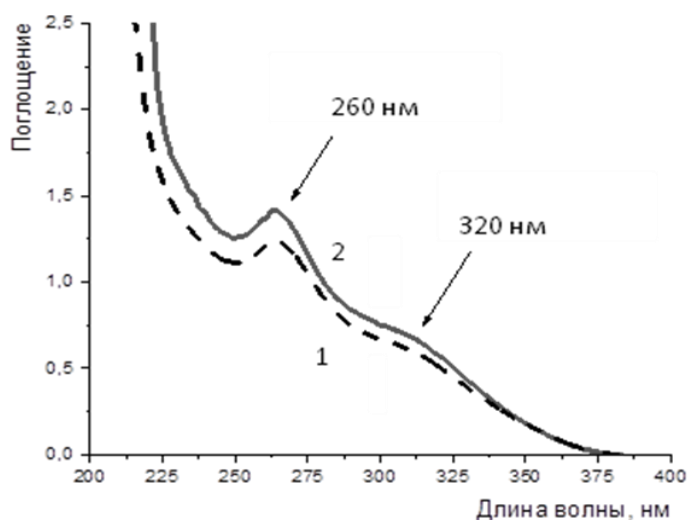


Рис. 3. Электронные спектры поглощения разбавленных растворов НАЦац: 1 – НАЦац, соотношение 1,0 к 1,0; 2 – НАЦац, соотношение 1,0 к 1,3; концентрация по аминокислоте 1 мМ

Распределение рассеивающих частиц по размерам в растворе НАЦац было получено с помощью метода ДСР (рис. 4). Видно, что распределение частиц характеризуется, как различным соотношением частиц как по интенсивности рассеяния, так и по объемному соотношению в растворе. Для раствора 1,0 к 1,0 существуют два типа частиц с размерами 20 и 220 нм (рис. 4.1.А), а для раствора 1,0 к 1,3 регистрируются частицы с размерами 100 и 600 нм (рис. 4.1.Б). С целью создания лучших оптических условий для определения рассеивающих

центров, были приготовлены и измерены предельно разбавленные растворы 1,0 к 1,0 и 1,0 к 1,3. В результате мы наблюдаем, что средний гидродинамический диаметр агрегатов в системе равен 100 нм (рис. 4.2а, б).

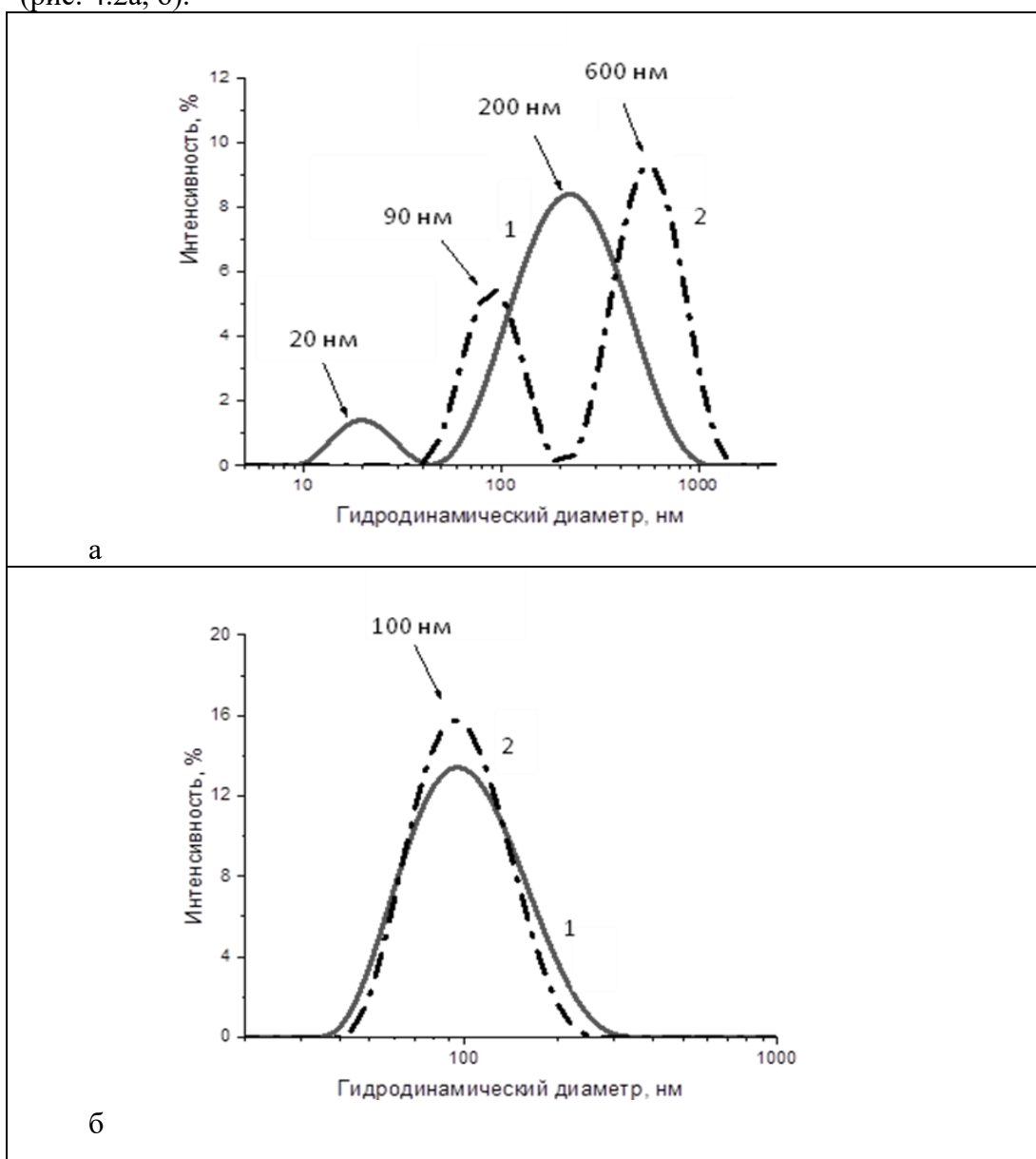


Рис. 4. а – Распределение рассеивающих агрегатов по размерам в растворах НАЦа; 1 – система НАЦа 1,0 к 1,0; 2 – система НАЦа 1,0 к 1,3. Концентрация по аминокислоте 1 мМ. б – Распределение частиц по размерам в растворах НАЦа при их разбавлении дополнительно в 10 раз

В табл. 2 приведены значения дзета-потенциала для систем НАЦац, а также сравнение с дзета-потенциалом ЦСРац, концентрации всех растворов составляют 1 мМ по аминокислоте. Результаты распределения значений мономодальны, а модуль значения среднеквадратичного отклонения говорит о стабильности агрегатов в системах ЦСРац и НАЦац. Полученные данные методами ДСР и измерения дзета-потенциала показывают, что в растворе существуют агрегаты различной степени организации, но общего строения.

Таблица 2

Значения дзета-потенциала в системах ЦСРац и НАЦац

Система	Дзета-потенциал, мВ	Среднеквадратическое отклонение, мВ
НАЦац 1 к 1	-33,0	±4,0
НАЦац 1 к 1,3	-47,0	±5,0
ЦСРац 1 к 1,25	+57,0	±5,0

Установлено, что первым этапом самоорганизации НАЦац является реакция меркаптогруппы аминокислоты N-ацетилцистеина с катионом серебра, в результате чего происходит образование цепочек линейного типа $(-Ag-(NCys)S-Ag-S(NCys)-)_n$. Учитывая пространственное строение N-ацетилцистеина (L-изомер), эти цепочки образуют шарообразные агрегаты типа «ядро-оболочка», где внутри находится меркапид серебра (рис. 5.1). На поверхности ядра расположены аминокислотные остатки N-ацетилцистеина. Такой механизм согласуется с данными УФ-спектроскопии и исследованиями растворов ЦСР [4, 5, 14]. Вторым этапом, согласно данным рН-метрии, происходит протонирование карбоксильных групп N-ацетилцистеина ионом гидроксония (рис. 5.2). Ионы гидроксония H_3O^+ образуют потенциалопределяющий слой агрегатов, диффузный слой образуется из остатков уксусной кислоты CH_3COO^- , благодаря чему и происходит связывание агрегатов в кластеры. Такой механизм самоорганизации подтверждают данные ДСР, измерения дзета-потенциала и измерения динамической вязкости – в растворах НАЦац находятся одинаковые по строению агрегаты. Механическое воздействие приводит к взаимодействию диффузных слоев нескольких агрегатов и образованию связей между ними. Строение агрегатов и их взаимодействие представлено на рис. 5.

5. Vishnevetskii Dmitry V., Mekhtiev Arif R., Perevozova Tatyana V., Averkin Dmitry V., Ivanova Alexandra I., Khizhnyak Svetlana D., Pakhomov Pavel M. // *Soft Matter*. 2020. V. 16. P. 9669-9673.
6. Хижняк С.Д., Овчинников М.М., Пахомов П.М. // *Журн. структурной химии*. 2014. Т. 55. №1. С.173-177.
7. Eduardo Lopez-Tobar, Belen Herná ndez, Mahmoud Ghomi, Santiago Sanchez-Cortes. // *J. Phys. Chem. C*, 2013, V. 117, P.1531-1537.
8. Pablo Casuso, Pedro Carrasco, Iraidia Loinaz, Hans J. Grande and Ibon Odriozola. // *Organic & Biomolecular Chemistry*, 2010, V. 8, P. 5455–5458.
9. R. A. Cobos Picot, M. Puiatti, A. Ben Altabef, R. J. Rubira, S. Sanchez-Cortes, S. Diaz and M. E. Tuttolomondo // *New J. Chem*, 2019, V. 43, P. 15201-15212
10. Saumya Prasad, Imon Mandal, Shubham Singh, Ashim Paul, Bhubaneswar Mandal, Ravindra Venkatramani, Rajaram Swaminathan. // *Chemical Science*. 2017. V. 8. P. 5219 – 5806
11. Pakhomov P.M., Khizhnyak S.D., Lavrienko M.V., Ovchinnikov M.M., Nierling W., Lechner M.D. // *Colloid Journal*. 2004. V. 66. № 1. P. 65-70.
12. Баранова О.А., Хижняк С.Д., Пахомов П.М.. // *Журн. структурной химии*. 2014. Т.55. №1. С.166-172.
13. Khizhnyak S.D., Komarov P.V., Ovchinnikov M.M., Zherenkova L.V., Pakhomov P.M. // *Soft Matter*. 2017. V. 13. P. 5168-5184.
14. Аверкин Д.В., Хижняк С.Д., Пахомов П.М. // *Вестник ТвГУ, Серия «Химия»*. 2019. № 2, с. 92-94.

Об авторах:

АВЕРКИН Дмитрий Вадимович – аспирант 2го года обучения кафедры физической химии Тверского государственного университета, e-mail: averkindmitry@gmail.com

ВИШНЕВЕЦКИЙ Дмитрий Викторович – кандидат химических наук, доцент кафедры физической химии Тверского государственного университета, e-mail: rickashet@yandex.ru

ПЕТРОВ Владимир Романович – студент, 3 курс химико-технологический факультет Тверского государственного университета, e-mail: vrpetrov@edu.tversu.net

ХИЖНЯК Светлана Дмитриевна – кандидат химических наук, заведующая лабораторией спектроскопии ЦКП Тверского государственного университета, e-mail: sveta_khizhnyak@mail.ru

ПАХОМОВ Павел Михайлович – доктор химических наук, профессор, зав. Кафедрой физической химии Тверского государственного университета, e-mail: pavel.pakhomov@mail.ru

**THE PROCESS OF SELF-ORGANIZATION IN LOW-
CONCENTRATED AQUEOUS SYSTEMS BASED
ON N-ACETYL-L-CYSTEINE, L-CYSTEINE
AND SILVER ACETATE**

**D.V. Averkin, D.V. Vishnevetskii, V.R. Petrov, S.D. Khizhnyak,
P.M. Pakhomov**

Tver State University

A comprehensive study of the self-organization process during the draining of low-concentration aqueous solutions of N-acetyl-L-cysteine and silver acetate was carried out. All stages of self-organization have been studied using pH measurements, viscometry, UV spectroscopy, and dynamic light scattering (DLS). It was found that the first stage of self-assembly is the replacement of hydrogen in the mercapto group of an amino acid with a silver cation with the formation of a silver mercaptide (MS) molecule. Further, the formation of chains of the form $(-\text{Ag-S}(\text{NCys})-\text{Ag-S}(\text{NCys})-)_n$ occurs, while excess electron density is retained in amino acid residues, leading to the interaction of chains with both silver cations and undissociated silver acetate molecules, with the formation of clusters. The mechanism of self-organization of the system as the formation of the aggregates of the "core-shell" type is proposed. The "core" consists of chains of the form $(-\text{Ag-S}(\text{NCys})-\text{Ag-S}(\text{NCys})-)_n$, the "shell" consists of protonated N-acetyl-L-cysteine residues. Further bonding of aggregates into clusters occurs through free acetic acid anions.

Keywords: *silver acetate, L-cysteine, N-acetyl-L-cysteine, hydrogel, supramolecular structure, structure formation.*