

БИОПОЛИМЕРЫ, ГИДРОГЕЛИ

УДК 577.1:543.422.27

ГЕЛЕОБРАЗОВАНИЕ В НИЗКОКОНЦЕНТРИРОВАННЫХ ВОДНЫХ РАСТВОРАХ, СОДЕРЖАЩИХ L-ЦИСТЕИН И АЦЕТАТ СЕРЕБРА

**А. Н. Адамян¹, Д. В. Аверкин¹, С. Д. Хижняк¹, М. М. Овчинников²,
П. М. Пахомов¹**

¹Тверской государственной университет

²Тверской государственной медицинской университет

Обнаружено, что низкоконцентрированные водные растворы аминокислоты L-цистеин и ацетата серебра при определенном молярном соотношении компонентов образуют супрамолекулярные гели при добавлении электролитов (сульфатов и хлоридов металлов). Механизм гелеобразования в системе изучен с помощью реологических испытаний, Фурье-ИК и УФ-спектроскопии, динамического светорассеяния (ДСР), просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ). Установлено, что в результате процессов самоорганизации в системе L-Cysteine–AgOOCCH₃ на первой стадии происходит образование супрамолекулярных цепочек (-AgS...AgS)_n. Формирование гидрогеля (вторая стадия) инициируется добавлением электролита.

Ключевые слова: *гидрогель, супрамолекулярный, L-цистеин, ацетат серебра.*

Известно [1–3], что некоторые производные аминокислот при низких концентрациях способны формировать гидрогели, структурируя воду. Например, 0.2 % раствор дибензоил L-цистина, что соответствует соотношению ~12000 молекул воды на 1 молекулу гелеобразователя (аминокислоты), образует прочный гидрогель. Подобные системы относятся к супрамолекулярным гелям, в которых за гелеобразование ответственны нековалентные межмолекулярные взаимодействия [4; 5]. Большинство таких гелей состоит из длинных волокон, образованных в результате самосборки за счет слабых сил (водородного связывания, электростатического взаимодействия и др.). Нековалентные шивки волокон и (или) механические зацепления образуют трехмерную сетку, внутри которой находится растворитель, что и придает жесткость системе [6].

Авторы работы [7] обнаружили гелеобразование в низкоконцентрированных водных системах на основе аминокислоты L-цистеина (L-Cys) и нитрата серебра. L-Cys является уникальной аминокислотой, в состав которой входят три функциональные группы: амина,

тиольная и карбоксильная. Видимо, благодаря наличию именно этих функциональных групп реализуется простейший способ получения гидрогелей на основе низкомолекулярных соединений путем смешивания водных растворов исходных компонентов. Исследования по применению в качестве гелеобразующих веществ цистеина, L-серина, 3-меркаптопропионовой кислоты, в которых отсутствует одна из трех функциональных групп L-Cys, к успеху не привели, получить гидрогель на их основе с нитратом серебра не удалось [8]. Однако установлены условия формирования гидрогелей в системе на основе N-ацетилцистеина (НАС) и нитрата серебра [9;10]. Кроме того, обнаружен процесс гелеобразования в системах L-Cys-нитрит серебра [11;12] и L-Cys-ацетат серебра [13].

Известно, что растворимость нитрата серебра в воде при 25 °С составляет 2570 г/л, нитрита серебра – 4.2 г/л, ацетата серебра – 11.11 г/л, поэтому можно предположить, что существуют некоторые различия в механизме гелеобразования цистеина с этими солями. Так, гелеобразование в системе L-Cys–AgNO₂ – процесс одностадийный, гидрогель образуется при смешивании водных растворов исходных компонентов, а в системах L-Cys–AgNO₃ и L-Cys–AgOOCCH₃ – процесс двухстадийный. Первая стадия – смешивание водных растворов исходных компонентов – получение цистеинсеребряного раствора (ЦСР), вторая стадия – инициирование гелеобразования добавлением в ЦСР раствора соли. Это могут быть сульфаты, хлориды, вольфраматы, молибдаты металлов. Поэтому представляет интерес изучение процессов самоорганизации и гелеобразования в водных растворах L-цистеина и разных солей серебра.

Данная работа посвящена изучению процессов структурирования в системе L-цистеин – ацетат серебра при добавлении сульфата или хлорида натрия с помощью комплекса физико-химических методов: реологических испытаний, Фурье-ИК и УФ-спектроскопии, ДСР и ПЭМ.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использованы реактивы: ацетат серебра 99%, («Lancaster»), L-цистеин 99% («Acros»), сульфат натрия и хлорид натрия хч. Все растворы готовили на бидистиллированной воде.

Для приготовления образцов гидрогелей на основе L-Cys и ацетата серебра (AgAcet) использовали водные растворы исходных компонентов с концентрацией 0.01 М. ЦСР в объеме 2 мл получали по следующей схеме: 0.6 мл раствора L-Cys приливали к 0.65 мл воды, смесь перемешивали, затем добавляли 0.75 мл раствора AgAcet. В результате получали бледно-желтый опалесцирующий раствор, который при стоя-

нии в течение ~6–12 ч при комнатной температуре, в темноте, становился прозрачным. Это так называемая стадия созревания ЦСР [5]. Для получения геля в созревший ЦСР добавляли раствор электролита – хлорида или сульфата натрия. Концентрацию соли в образцах варьировали в интервале 0.050–0.375 мМ, при этом время формирования геля и его прочность зависели от типа электролита, его концентрации и температуры.

ИК спектры образцов, приготовленных в виде таблеток с бромидом калия, навеска которого составляла ~ 700 мг, а исследуемого вещества ~ 22–24 мг, регистрировали на Фурье-ИК спектрометре «Vertex-70» (фирма «Bruker»). Исследуемые образцы предварительно вымораживали, полученные осадки отделяли центрифугированием при скорости 10000 об/мин в течение 30 мин, тщательно промывали водой, а затем сушили при температуре ~30 °С.

Электронные спектры исследуемых образцов регистрировали на спектрофотометре «Evolution Agra» (фирма «Thermo Scientific») в кварцевой кювете с толщиной слоя 1 мм.

Измерение интенсивности светорассеяния в исследуемых растворах проводили методом ДСР с использованием анализатора Zetasizer «Nano ZS» (фирма «Malvern») с He-Ne-лазером (633 нм) мощностью 4 мВт. Все измерения осуществлялись при температуре 25 °С в конфигурации обратного рассеяния (173°), обеспечивающей наибольшую чувствительность прибора. Расчет распределений частиц по размерам производился по формуле Стокса – Эйнштейна: $D = kT/6\pi\eta R$, где D – коэффициент диффузии, k – константа Больцмана, T – абсолютная температура, η – вязкость среды, R – радиус рассеивающих частиц. Измерение электрофоретической подвижности агрегатов в образцах проведено в U-образных капиллярных кюветах.

Вязкость образцов измеряли на вибрационном вискозиметре SV-10 (фирма A&D Company), в котором вибрация сенсорных пластин осуществлялась с частотой 30 Гц и постоянной амплитудой около 1 мм. Измерение вязкости растворов и гелей проводилось при температуре 25 °С.

Микрофотографии образцов были получены с помощью просвечивающего электронного микроскопа LEO 912 AB OMEGA (фирма «Carl Zeiss») в Центре коллективного пользования Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова. Образцы были предварительно нанесены на стандартную полимерную подложку Formvar (polyvinylformal) толщиной 100 нм, покрытую медной сеткой, а затем подвергнуты вакуумной сушке при комнатной температуре.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

На рис. 1, представляющем результаты реологических испытаний свежеприготовленных смеси L-Cys–AgAcet и геля с Na₂SO₄, демон-

стрирует различия в структурированности систем. Вязкость свежеприготовленной смеси на основе водных растворов L-Cys и AgAcet с соотношением компонентов 1:1.25 постепенно возрастает, что свидетельствует об увеличении структурированности системы. Для геля с сульфатом натрия, сформированного в течение 1 часа, значение вязкости существенно выше, чем для раствора. Однако в условиях эксперимента на вибрационном вискозиметре вязкость геля уменьшается, что обусловлено разрушением гель-сетки. Установлено, что гели, инициированные сульфатами или хлоридами, являются тиксотропными, т.е., разрушаясь в результате механического воздействия, вновь восстанавливаются при стоянии. Следует отметить, что при одинаковой концентрации соли гели с сульфат-анионом формируются намного быстрее, чем с хлоридом. Установлено, что ЦСР сохраняет гелеобразующую способность при хранении в темноте в течение длительного времени, не менее 7-8 месяцев.

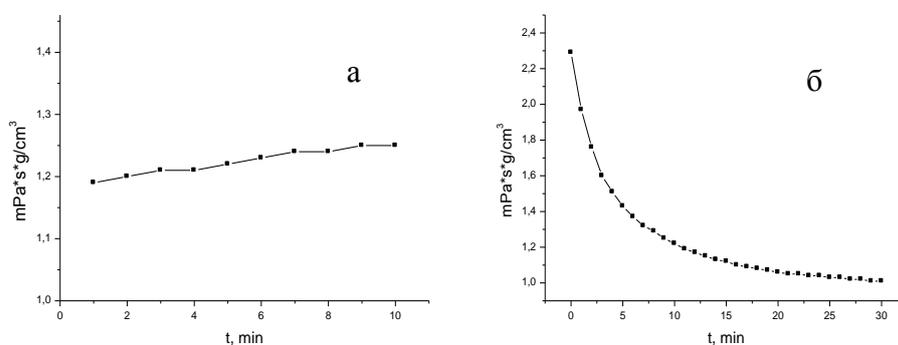


Рис. 1. Зависимость вязкости от времени: а – свежеприготовленный раствор L-Cys–AgAcet через 1 час после смешивания компонентов, б – гидрогель с Na_2SO_4 , время формирования геля – 1 час; $C_{\text{Cys}} - 3.0 \text{ mM}$, $\text{Ag}^+/\text{C}_{\text{Cys}} - 1.25$, $C_{\text{Na}_2\text{SO}_4} - 0.25 \text{ mM}$, $T=25 \text{ }^\circ\text{C}$

Спектральные исследования в ИК-диапазоне образцов ЦСР и гелей показали, что взаимодействие L-Cys и AgAcet происходит по тиольной группе, аналогично процессам с нитратом [7] и нитритом [11] серебра, о чем свидетельствует отсутствие в спектрах гелей с хлоридом и сульфатом натрия (вставка рис. 2) полосы поглощения валентных колебаний SH-группы с максимумом $\sim 2551 \text{ cm}^{-1}$. ИК-спектр ЦСР не показан, а основное внимание обращено на различия в спектрах гелей с сульфатом (спектр 1) и хлоридом натрия (спектр 2), которые проявляются в области колебаний COO^- , NH^- , SO_4^{2-} групп. Положение карбоксильной группы в образцах гелей предполагает их участие в меж- и внутримолекулярном взаимодействии, вероятно, за счет водородного связывания, поскольку в спектрах гелей полоса $\nu(\text{C}=\text{O})$, Амид I, находится $\sim 1626 \text{ cm}^{-1}$, а в спектре цистеина ей соответствует полоса поглощения с максимумом $\sim 1650 \text{ cm}^{-1}$ [14]. Широкая полоса поглощения в

области валентных колебаний $\sim 3104\text{--}2970\text{ см}^{-1}$ соответствует $\nu(\text{NH}_3^+)$, а поглощение $\sim 1569\text{ см}^{-1}$ характеризует $\delta(\text{NH}_3^+)$. Разная форма этих полос в спектрах гелей с сульфат- и хлорид-анионом свидетельствует о различной степени вовлеченности этих групп в межмолекулярное связывание. Сульфат-анион в спектре геля проявляется в диапазоне $\sim 1117\text{--}1050\text{ см}^{-1}$, подтверждая нековалентный характер взаимодействия с супрамолекулярной полимерной цепочкой.

Согласно данным УФ спектроскопии, представленным на рис. 3 а, в спектре раствора ЦСР с молярным соотношением $\text{Ag}^+/\text{L-Cys} = 1.25$ сразу после смешивания исходных компонентов полосы поглощения отсутствуют. Однако спустя некоторое время появляются две полосы поглощения с максимумами ~ 311 и 393 нм , интенсивность которых постепенно возрастает. Происхождение этих полос, как и в случае системы L-цистеин– AgNO_3 [5], связано с формированием супрамолекулярных цепочек $(\text{--Ag-S(Cys)--Ag-S(Cys)--})_n$, образованных

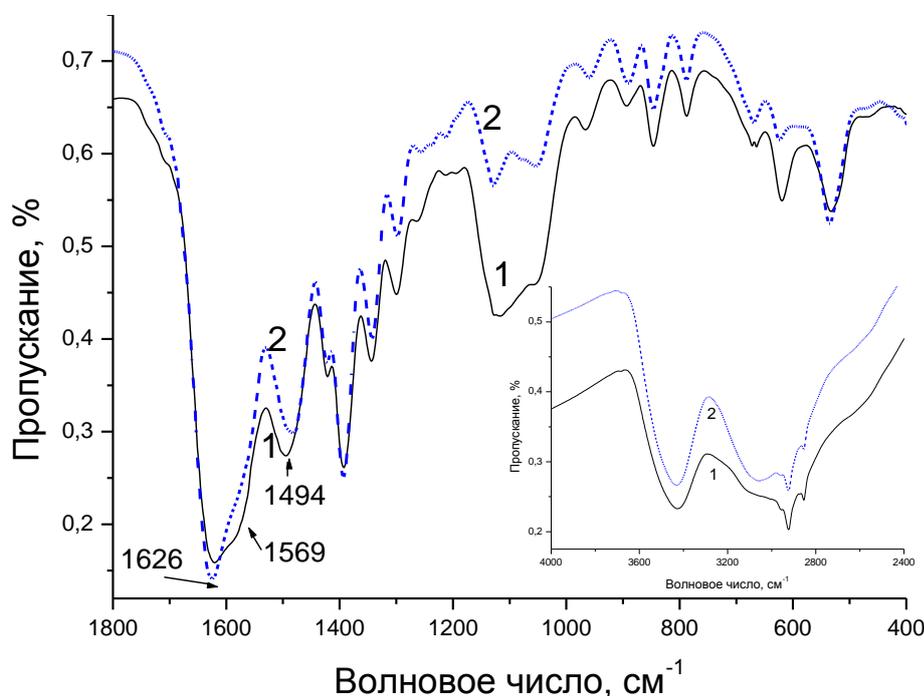


Рис. 2. ИК-спектры пропускания высушенных образцов гелей на основе L-цистеина и ацетата серебра с добавлением Na_2SO_4 (1) и NaCl (2), $C_{\text{AgAcet}} = 3.75\text{ мМ}$, $C_{\text{L-Cys}} = 3.0\text{ мМ}$, $C_{\text{Na}_2\text{SO}_4} = C_{\text{NaCl}} = 0.25\text{ мМ}$

за счет нековалентного взаимодействия молекул меркаптида серебра. Избыточные ионы серебра создают дополнительные точки роста цепей и структурируют систему. Полоса поглощения с максимумом $\sim 311\text{ нм}$ согласно [14] связана с переносом заряда от донорных атомов серы к акцепторным атомам серебра, а слабая полоса с максимумом $\sim 393\text{ нм}$,

которую обычно ассоциируют с наночастицами серебра, модифицированными тиолсодержащими соединениями (цистеином, меркаптопропионовой кислотой), соответствует в таком случае, связи Ag-S [12].

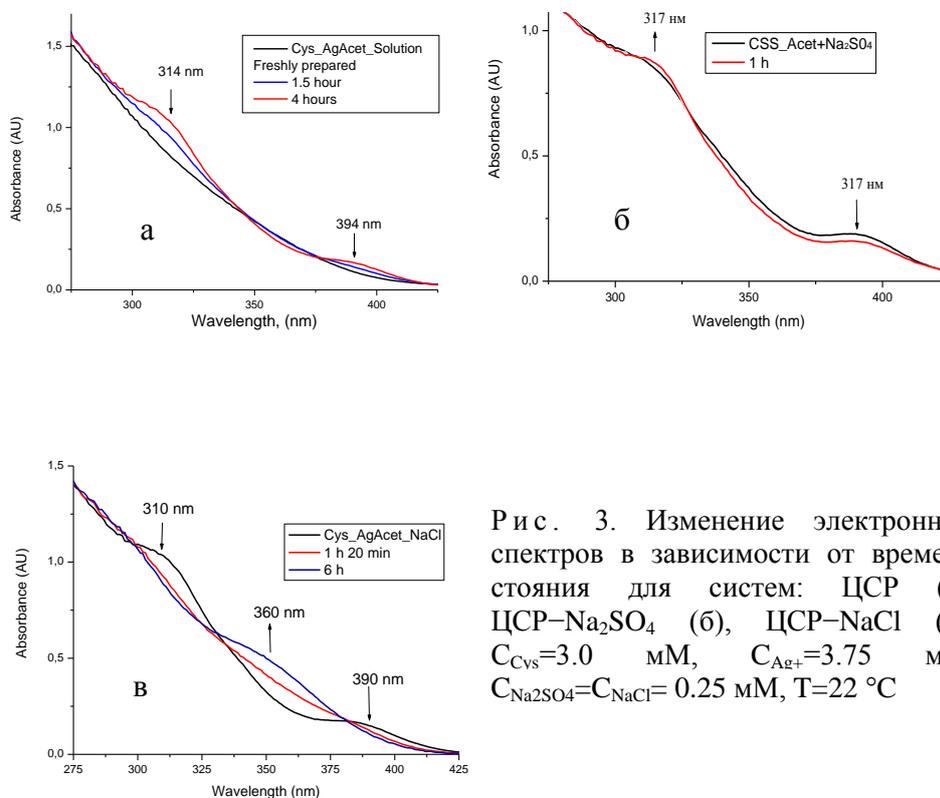
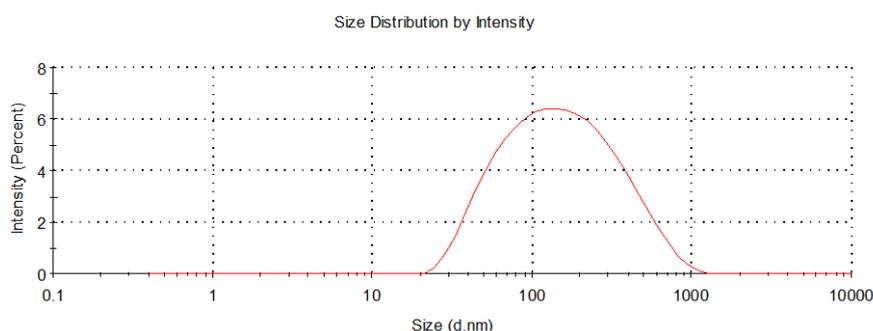


Рис. 3. Изменение электронных спектров в зависимости от времени стояния для систем: ЦСР (а), ЦСР–Na₂SO₄ (б), ЦСР–NaCl (в): C_{Cys}=3.0 мМ, C_{Ag⁺}=3.75 мМ, C_{Na₂SO₄}=C_{NaCl}= 0.25 мМ, T=22 °С

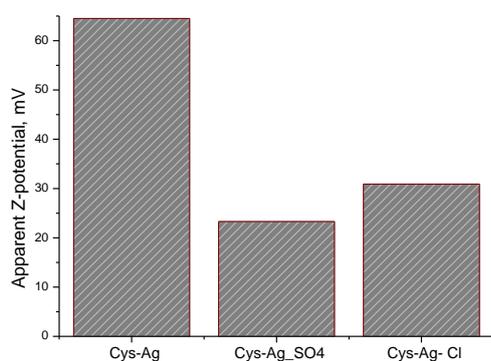
Процессы самоорганизации, протекающие в ЦСР при добавлении в качестве инициаторов гелеобразования водных растворов сульфатов или хлоридов металлов, проявляют некоторые различия, что в данном исследовании показано на примере солей натрия (Na₂SO₄ и NaCl). Как видно из рис. 3б, раствор сульфата натрия, добавленный к ЦСР, приводит к незначительным изменениям в УФ-спектре: наблюдается незначительное возрастание поглощения полосы ~317 нм и уменьшение поглощения в диапазоне 329–410 нм. Добавка же хлорида натрия к ЦСР вызывает существенные изменения в спектре (рис. 3в): уже через ~100 мин в спектре исчезают полосы поглощения с максимумами ~311 и 393 нм, а через ~6 час появляется полоса с максимумом ~364 нм, что свидетельствует о существенных изменениях в электронной структуре супрамолекулярных цепочек в процессе формирования пространственной сетки. Следует отметить, что гидрогели с хлоридом натрия в процессе стояния становятся бесцветными, теряя желтое окрашивание. Если сравнить растворимость солей серебра в воде, то она составляет 0.00193 г/л для AgCl и 8.3 г/л для Ag₂SO₄ при температуре 25°C. Можно предположить, что в присутствии хлорида натрия в диапазоне концентраций 0.03-0.30

мМ в системе L-Cys–AgAcet начинают происходить конкурирующие реакции: фрагменты супрамолекулярных цепей, вероятно содержащие избыточные ионы серебра, в первую очередь образуют сложные комплексы с хлорид анионом. В результате образования этих хлор-серебряных комплексов происходит постепенное разрушение геля и выпадает осадок, тогда как гели с сульфатом натрия более устойчивы при хранении.

По данным метода ДСР, распределение частиц по размерам в ЦСР мономодальное, достаточно широкое, среднее значение диаметра частиц ~165 нм, что свидетельствует о формировании кластеров и фрагментов супрамолекулярных цепей (рис. 4).



Р и с . 4. Распределение частиц по размерам, (в единицах интенсивности), в созревшем образце ЦСР, $C_{\text{Cys}}=3.0$ мМ, $C_{\text{Ag}^+}=3.75$ мМ



Р и с . 5. Диаграмма значений ζ -потенциала для различных систем: ЦСР, геля с сульфатом и хлоридом натрия: $C_{\text{Cys}}=3.0$ мМ, $C_{\text{Ag}^+}=3.75$ мМ, $C_{\text{Na}_2\text{SO}_4}=C_{\text{NaCl}}=0.375$ мМ

Измерение ζ -потенциала показало, что эта величина достаточно устойчива для частиц ЦСР и составляет $\sim(+64$ мВ). Добавление электролита приводит к изменению заряда частиц, при этом наблюдается уменьшение значения ζ -потенциала в разной степени в зависимости от заряда и типа аниона.

Анионы действуют как дополнительные скрепки, приводящие не только к уплотнению супрамолекулярных цепочек, но и формированию трехмерной сетки за счет изменения заряда полимерных фрагментов, который определяется не только взаимодействием атомов серебра и серы, но также амино- и карбоксильных групп цистеина с ацетат-анионом.

Электронно-микроскопические изображения образцов, показанные на рис. 6, подтверждают факт самоорганизации в образцах: в ЦСР наблюдаются цепочки, состоящие из отдельных кластеров разного размера. Электронограмма образца ЦСР (рис. 4б) свидетельствует об отсутствии в нем наночастиц серебра.

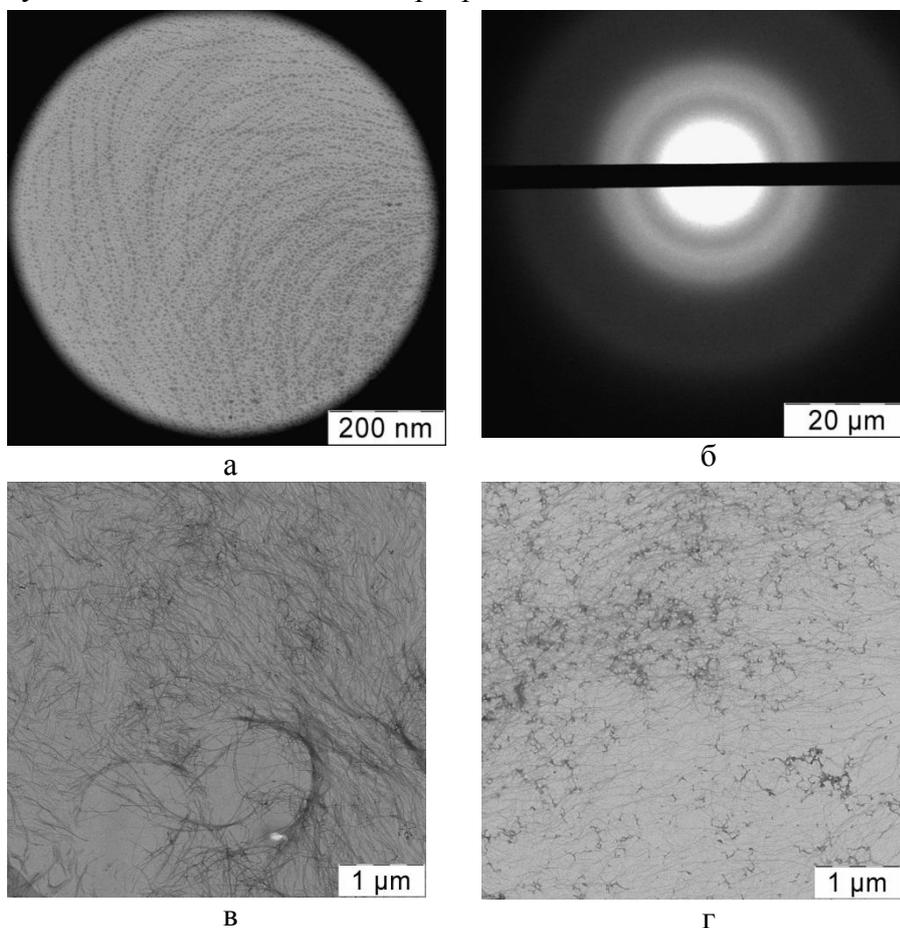


Рис. 6. ПЭМ изображения образцов ЦСР (а), геля сульфатом натрия (с) хлоридом натрия (д), электронограмма ЦСР (б)

Раствор сульфата натрия дополнительно структурирует ЦСР, в образце формируется пространственная сетка, имеющая четкую волоконную структуру (рис. 4в). Гель-сетка с хлорид-анионом выглядит иначе, она состоит из коротких, более тонких фрагментов цепочек с множеством зацеплений (рис. 4г).

Таким образом, в результате проведенных исследований становится очевидным, что гелеобразование в системе на основе аминокислоты L-цистеин и ацетата серебра, инициированное сульфатом или хлоридом натрия, имеет определенные различия и, как следствие, образцы гелей с разными анионами отличаются временем формирования, прочностью и

устойчивостью во времени. Эти гидрогели являются интересным объектом для изучения процессов самоорганизации в наноструктурированных системах на основе низкомолекулярных соединений, особенно принимая во внимание простоту их синтеза и возможность модификации.

Авторы выражают благодарность С.Н. Абрамчуку за любезно предоставленные микроснимки (ПЭМ) изучаемых образцов.

Работа выполнена при финансовой поддержке Минобрнауки Российской Федерации в рамках выполнения государственных работ в сфере научной деятельности (проект №4.1325.2014/К) на оборудовании Центра коллективного пользования Тверского государственного университета.

Список литературы

1. Gortner R.A., Hoffman W.F. // *J. Am. Chem. Soc.* 1921. V. 43. P. 2199.
2. Wolfe C.G.L., Rideal E.K. // *Biochem. J.* 1922. V. 16. P. 548.
3. Suzuki M., Yumoto M, Shirai H., Hanabusa K. // *Org. Biomol. Chem.* 2005. № 3. P. 2073–3078.
4. Лен Ж.-М. Супрамолекулярная химия. Концепции и перспективы. Новосибирск. 1998.
5. Пахомов П.М., Хижняк С.Д., Овчинников М.М., Комаров П.В. Супрамолекулярные гели. Тверь: ТвГУ. 2011. 272 с.
6. Menger F.M., Caran K.L. // *J. Am. Chem. Soc.* 2000. №. 122, P. 11679–11691.
7. 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.
8. Овчинников М.М., Перезовова Т.В., Хижняк С.Д., Пахомов П.М. // *Физико-химия полимеров.* Тверь: ТвГУ. 2014. Вып. 20. С. 106–113.
9. Овчинников М.М., Перезовова Т.В., Хижняк С.Д., Пахомов П.М. // *Физико-химия полимеров.* Тверь: ТвГУ, 2013. Вып. 19. С. 145–152.
10. Хижняк С.Д., Овчинников М.М., Пахомов П.М. // *Журн. структурной химии.* 2014. Т. 55, № 1. С. 173–177.
11. Овчинников М.М., Хижняк С.Д., Арутюнян Л.Р., Перезовова Т.В., Адамян А.Н., Арутюнян Р.С., Пахомов П.М. // *Физико-химия полимеров.* Тверь: ТвГУ. 2015. Вып. 21. С. 113–119.
12. Перезовова Т.В., Хижняк С.Д., Арутюнян Р.С., Арутюнян Л.Р., Овчинников М.М., Пахомов П.М. // *Вестник ТвГУ. Серия «Химия».* 2016, Вып. 2, С. 216.
13. Хижняк С.Д., Овчинников М.М., Перезовова Т.В., Адамян А.Н., Пахомов П.М. // *Материалы IV Международ. конф. «Современные проблемы химической физики».* Ереван, 2015. С. 118
14. Mandal S., Gole A, Lala N., Gonnad R., Ganvir V., Sastry M. // *Langmuir.* 2001. V. 17. P. 6262–6268.

**GELATION IN LOW CONCENTRATION AQUEOUS SYSTEMS
BASED ON AMINO ACID L-CYSTEINE AND SILVER ACETATE**

**A.N. Adamyan¹, D.V. Averkin¹, S.D. Khizhnyak¹, M.M. Ovchinnikov²,
P.M. Pakhomov¹**

¹Tver State University

²Tver State Medicinal University

It is found out that low concentration aqueous solutions of amino acid L-Cysteine and silver acetate are able to form supramolecular gels at definite molar ratio of the components after addition of electrolytes (sulfates, chlorides). Mechanism of gelation in the systems is studied by FTIR and UV spectroscopy, Dynamic light scattering, TEM. It is established that due to self-organization, supramolecular polymer chains $(-AgS-AgS-)_n$ are formed in L-Cysteine–AgOOCCH₃ solution on a first stage. Formation of hydrogel – a second stage - is induced by a salt solution.

Keywords: hydrogel, supramolecular, *L-Cysteine*, *silver acetate*.

Об авторах:

АДАМЯН Анна Нориковна – студентка химико-технологического факультета Тверского государственного университета, *e-mail*:

Аверкин Дмитрий Вадимович – студент химико-технологического факультета Тверского государственного университета, *e-mail*:

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

ОВЧИННИКОВ Максим Максимович – научный сотрудник. Тверской государственной медицинской университет, *e-mail*: max.ms.ovchinnikov@yandex.ru

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