

УДК 577.1:543.422.27

ГЕЛЕОБРАЗОВАНИЕ В ВОДНОМ РАСТВОРЕ L-ЦИСТЕИНА И НИТРИТА СЕРЕБРА

Т.В. Перезова¹, С.Д. Хижняк¹, Л.Р. Арутюнян², Р.С. Арутюнян²,
М.М. Овчинников³, П.М. Пахомов¹

¹Тверской государственной университет

²Ереванский государственный университет

³Тверской государственной медицинский университет

Авторами открыто явление гелеобразования в низкоконцентрированных водных растворах L-цистеина и AgNO₂ при соотношениях компонентов 1:1 и 1.00:1.25. С применением методов вискозиметрии, рН-метрии, динамического светорассеяния (ДСР), измерения ζ-потенциала, просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ), УФ- и Фурье-ИК-спектроскопии изучен механизм самоорганизации в цистеин-серебряном растворе (ЦСР) и строение образующихся гелей.

Ключевые слова: L-цистеин, нитрит серебра, процессы самоорганизации, супрамолекулярный гидрогель.

Гидрогели на основе природных полимеров (белки, нуклеиновые кислоты, хитозан и др.) уже давно привлекают повышенное внимание, поскольку эти материалы могут быть использованы для биомедицинских целей, например доставки лекарств, инжиниринга тканей и т.д. [1]. Однако гели в этих случаях формируются из больших молекул высокомолекулярных соединений. В последнее время повышенное внимание уделяют изучению процесса гелеобразования с участием низкомолекулярных соединений (органожелаторов) [1–6]. Среди подобных соединений особый интерес представляет серосодержащая аминокислота L-цистеин, поскольку в ее водном растворе с участием нитрата серебра (AgNO₃) при очень низкой концентрации дисперсной фазы (~0.01%) происходит процесс самоорганизации, приводящий, при определенных условиях, к формированию пространственной супрамолекулярной гелевой сетки [1]. Весьма примечательно, что исходные компоненты являются биологически активными веществами, поэтому изучение подобной системы представляет не только чисто научный, но и практический интерес. Указанная система авторами исследована достаточно подробно.

В настоящей работе изучаются более сложные процессы самоорганизации при взаимодействии L-цистеина с нитритом серебра (AgNO₂). Сложность этой системы заключается в том, что нитрит-анион в противоположность нитрат-аниону не является химически нейтральным по отношению к L-цистеину, а способен взаимодействовать с аминокислотной группой цистеина в кислой среде. Эффект гелеобразования в низко-

концентрированном водном растворе L-цистеина и AgNO_2 впервые обнаружен в [7]. Целью настоящей работы является дальнейшее изучение процессов самоорганизации в новой системе, а также самих гелей, с привлечением более широкого комплекса инструментальных методов анализа.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В настоящей работе были использованы реактивы: серебро азотистокислородное, серебро азотнокислородное 99% («Lancaster»), L-цистеин 99% («Across»), калий азотистокислый, калий азотнокислый, натрий азотистокислый. Все растворы готовили на бидистиллированной воде.

Растворимость нитрита серебра в воде при 25 °С в 550 раз меньше, чем нитрата серебра, и составляет 0.0266 М. Для приготовления рабочих растворов использовался исходный раствор с концентрацией 0.01 М.

Приготовление исходного раствора нитрита серебра с концентрацией 0.01 М: к навеске нитрита серебра приливается рассчитанное количество воды, и навеску растворяют при постоянном помешивании и нагревании при 60 °С. Раствор хранят в защищенном от света месте.

Смешивание водных растворов исходных компонентов (L-цистеин и AgNO_2) при концентрации обоих компонентов 1.0 мМ осуществляли в соотношении (L-цистеин : AgNO_2) 1:1 и 1.00:1.25.

Методика изучения структурирования в растворах, содержащих L-цистеин и нитрит серебра: в пробирке на 4 мл к водному раствору нитрита серебра добавляли рассчитанное количество воды так, чтобы общий объем системы (после добавления раствора цистеина) составлял 2 мл, затем приливали раствор L-цистеина, смесь быстро перемешивали встряхиванием, ставили в темное место и через 18 ч фиксировали наблюдаемый эффект [7]. В опытах использовали только свежеприготовленные растворы L-цистеина.

Реологические исследования проводили на вибрационном лепестковом вискозиметре «SV-10», фирмы A&D Company, Япония. Вибрации двух тонких сенсорных пластин производились с частотой 30 Гц и постоянной амплитудой около 1 мм. Измерение вязкости образовавшихся гелей проводилось при температуре 20 °С. Исследуемые гели были приготовлены в специальных лабораторных чашках, которые впоследствии устанавливались на сенсорное устройство.

УФ-спектры системы L-цистеин – нитрит серебра с разной концентрацией и различным соотношением компонентов регистрировали на спектрофотометре «Evolution Array» фирмы «Thermo Scientific» USA в диапазоне от 200 до 1100 нм. Запись спектров осуществляли при комнатной температуре в кварцевых кюветах с толщиной поглощающего слоя 1 мм.

Исследование интенсивности светорассеяния и величины ζ -потенциала, а также оценку распределения рассеивающих частиц по размерам проводили на анализаторе «Zetasizer ZS» «Malvern», Великобритания.

Анализ морфологии ЦСР и гелей на его основе осуществляли в центре коллективного пользования «Просвечивающая электронная микроскопия» МГУ им. М.В. Ломоносова, используя просвечивающий электронный микроскоп «Leo 912 AB OMEGA» («Carl Zeiss», Германия) с возможностью получения электронограмм образцов. Раствор или гель наносили на стандартную медную сетку с полимерной подложкой из поливинилформала толщиной около 100 нм, высушивали и помещали в микроскоп.

Измерение pH среды осуществляли на pH-метре, «PCE-PHD-1», «PCE Instruments Company», Germany.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Установлено, что в результате смешивания водных растворов L-цистеина и AgNO_2 в начальный момент образуется слегка мутный раствор, который при стоянии желирует и приобретает слегка желтоватую окраску. Скорость формирования гелей зависит от концентрации компонентов, их соотношения, температуры и времени стояния. Все образцы гелей были устойчивы во времени и проявляли тиксотропные свойства, т.е. способность к многократному восстановлению после механического разрушения.

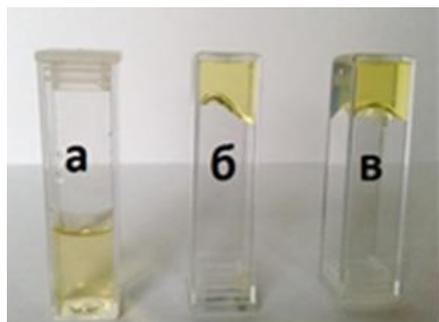
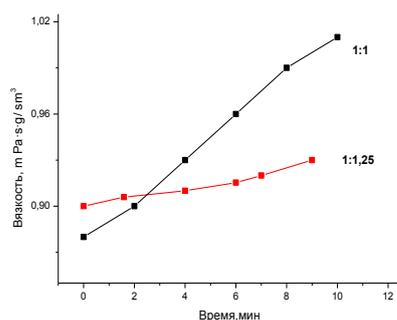


Рис. 1. Фотографии образцов системы на основе L-цистеина и AgNO_2 сразу после смешивания исходных компонентов (а) и через 2 суток (б, в). Образцы получены при разном молярном соотношении компонентов: 1:1 (б) и 1:1.25 (в)

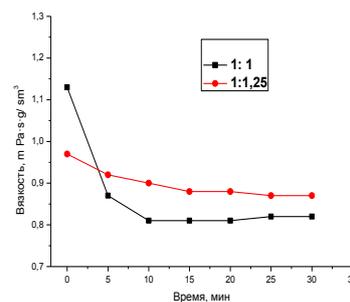
Системы Cys/AgNO_2 1:1. Однако через 10 минут вязкость системы с соотношением 1:1 становится выше. Эти данные свидетельствуют о том, что

структурирование системы при молярном соотношении «цистеин – нитрит» 1:1 происходит быстрее (рис. 2а).

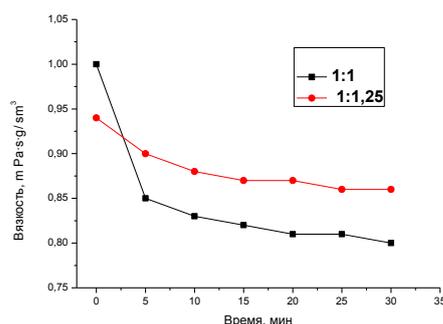
Через неделю стояния образцов в покое была измерена вязкость образовавшихся гелей. Вязкость геля при 1:1 оказалась выше, но через 5 минут мы наблюдали резкое уменьшение вязкости, и она становилась ниже, чем у системы с избытком серебра (рис. 2б). Таким образом, в результате механического воздействия гель (1:1) разрушается быстрее и в большей степени по сравнению с гелем (1:1.25). Иными словами гель (1:1) оказался менее прочным.



а



б



в

Рис. 2. Изменение вязкости систем L-цистеин–AgNO₂ с разным соотношением компонентов при сливании исходных компонентов (а), после стояния в течение недели (б) и 3 суток до повторного испытания (в)

Спустя трое суток нахождения исследуемых систем в покое после первичных реологических испытаний их подвергли повторным испытаниям. Оказалось, что эти системы обладают тиксотропными свойствами, то есть гидрогели при механическом воздействии разрушаются и переходят в состояние раствора. Затем, находясь в покое, растворы снова переходили в состояние геля, но полного восстановления вязкости при этом не происходило (рис. 2в). При последующих реологических испытаниях обе системы вели себя симбатно (сравните рис. 2б и 2в).

Для изучения механизма самоорганизации рассматриваемых систем в работе предприняты их комплексные экспериментальные исследования. Ранее [7] методом ИК-спектроскопии при изучении исходного цистеина и вымороженного геля было установлено, что в геле происходит замена группы $-\text{NH}_3^+$ в цистеиновом радикале на гидроксильную группу с образованием связи С-О. Эти ИК спектроскопические данные достоверно подтверждаются большим опытным материалом по реакционной способности соединений, содержащих аминогруппу. Хорошо известно, что в кислой среде первичные алифатические амины, а также аминокислоты, взаимодействуют с азотистой кислотой с образованием очень нестабильного диазониевого иона, который распадается уже при температуре около 0°C , отщепляя молекулу азота. Азотистая кислота присутствует в системе в результате протонирования нитрит-ионов: $\text{H}^+ + \text{NO}_2^- \rightarrow \text{HNO}_2$. Она реагирует с аминогруппой по схеме: $\text{R-NH}_2 + \text{HNO}_2 \rightarrow \text{R-OH} + \text{N}_2 + \text{H}_2\text{O}$. Через R здесь обозначена та часть органической молекулы, которая связана с аминогруппой. Для протонированной аминогруппы схему реакции можно представить следующим образом: $\text{R-NH}_3^+ + \text{NO}_2^- \rightarrow \text{R-OH} + \text{N}_2 + \text{H}_2\text{O}$. Это реакция деаминации, и по количеству выделенного азота она используется для определения аминогрупп в органических соединениях уже более 100 лет [8].

Анализ водной системы L-цистеин – AgNO_2 методом УФ-спектроскопии показал, что в спектре исходной системы присутствуют две полосы поглощения с максимумами 285 и 357 нм (рис. 3). При стоянии раствора в системе наблюдается исчезновение

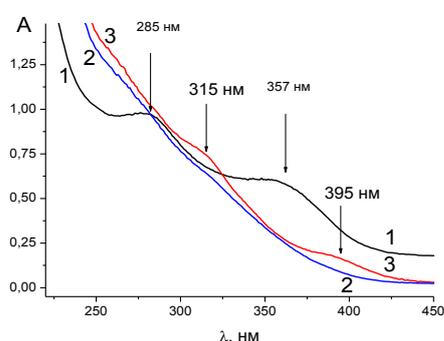


Рис. 3. Электронные спектры поглощения водной системы L-цистеин– AgNO_2 , молярное соотношение исходных компонентов 1:1, в зависимости от времени: 1 – в начальный момент, 2 – через 20 мин, 3 – через 3.5 часа

наблюдается исчезновение указанных полос поглощения и появление новых – 315 и 395 нм. Возникновение новых полос поглощения и рост их интенсивности во времени наблюдаются для некоторых супрамолекулярных цепочечных структур, образованных чередованием связей между атомами серебра и серы. Например, ранее это наблюдалось при созревании цистеин-серебряного раствора на основе нитрата се-

ребра, т.е. при формировании структур типа $-\text{Ag-S---Ag-S---Ag-S}$ [1]. Метод УФ-спектроскопии свидетельствует о существенных изменениях в электронной структуре атомно-молекулярной системы, реализуемых в

процессе формирования супрамолекулярных олигомерных фрагментов пространственной сетки.

Система L-цистеин – нитрит серебра была изучена методом динамического светорассеяния, оказалось, что образующиеся в растворе агрегаты устойчивы во времени (рис. 4). В системе с соотношением компонентов (1:1) присутствуют агрегаты большего размера (~70 нм), чем в системе с избытком серебра (~ 50 нм). Причем кластеры формируются достаточно быстро и остаются практически неизменными в течение определенного времени.

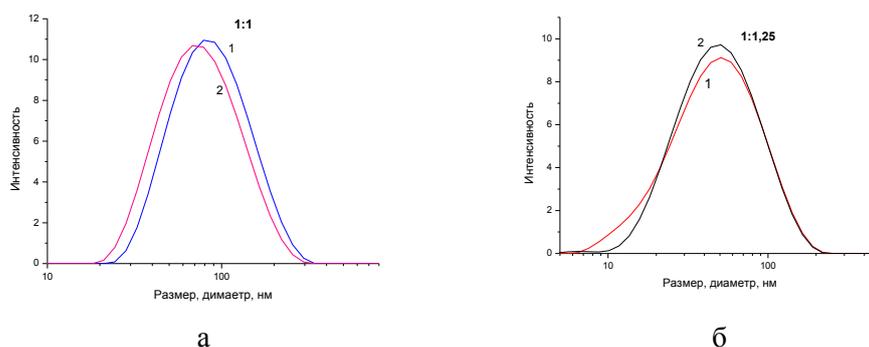


Рис. 4. Распределения агрегатов по размерам в зависимости от времени для систем с соотношением компонентов 1:1 (а) и 1:1.25 (б): 1 – через 3 мин; 2 – через 85 мин

Результаты по измерению ζ -потенциала образца с соотношением компонентов (Cys/Ag⁺) 1:1.25 представлены на рис. 4. Авторам удалось точно измерить заряд этих частиц. Подкисление раствора приводит к образованию положительно заряженных аминогрупп NH₃⁺, которые в силу кулоновского отталкивания не могут взаимодействовать с положительно заряженным ионом Ag⁺. Вследствие этого общий заряд частицы положителен и в среднем равен 30 милливольтам.

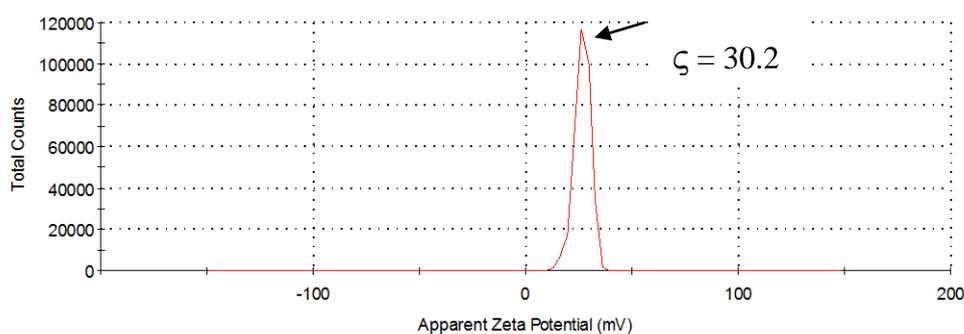


Рис. 4. ζ -потенциал системы L-цистеин–нитрит серебра при молярном соотношении компонентов 1:1.25, $C_{Cys}=3.0$ мМ

Измерение pH в рассматриваемых системах показало (см. таблицу), что наблюдается тенденция к увеличению значения pH для образцов с избыточным содержанием нитрита серебра в растворе. При этом происходит связывание протона анионом слабой азотистой кислоты NO_2^- . С увеличением времени стояния в обоих случаях наблюдается уменьшение величины pH, что обусловлено процессом взаимодействия нитрит-иона с протонированной аминогруппой, в ходе которого высвобождаются протоны из NH_3^+ группы.

Величина pH для систем Cys-AgNO₂
с разным соотношением компонентов, $C_{\text{Cys}} = 3.0$ мМ

Молярное соотношение исходных компонентов (Cys/AgNO ₂)	1:1	1:1.25
Величина pH свежеприготовленной системы	3.31	3.45
Величина pH системы через 5 дней	2.90	3.11

С помощью просвечивающей электронной микроскопии удалось визуализировать сеточную структуру геля. На рис. 5 представлены микрофотографии геля, полученные при различном увеличении. Наблюдается кластерная структура, характерная для пространственной сетки гидрогелей.

Полученные данные позволяют обосновать следующий механизм формирования гелей, образованных в результате смешения водных растворов нитрита серебра и L-цистеина. Нитрит серебра при диссоциации поставляет ионы серебра в водный раствор.

Как и в случае с нитратом серебра, на первом этапе происходит быстрая реакция взаимодействия иона серебра с L-цистеином, с образованием меркаптида серебра [1].

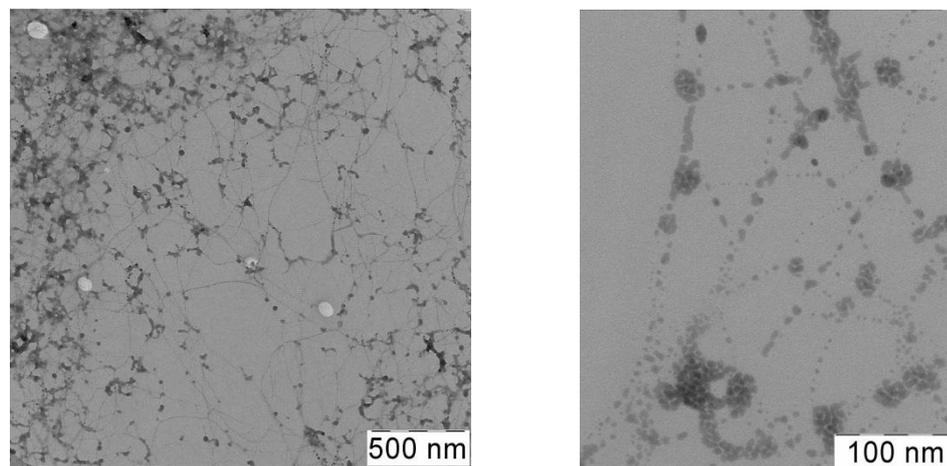


Рис. 5. ПЭМ изображения образца геля на основе Cys-AgNO₂ (1:1) при различном увеличении, $C_{\text{Cys}}=0.75$ мМ

На следующей, более медленной, стадии происходит самоорганизация молекул меркаптида серебра с образованием кластеров, супрамолекулярных цепей и сеточных структур. Следует отметить, что формирование трехмерной гель-сетки определяется не только взаимодействием между атомами серебра и серы, но и зарядовым состоянием сеточных фрагментов, в формировании которого участвуют нитрит-анионы, взаимодействующие с аминок группами цистеина.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации в рамках выполнения государственных работ в сфере научной деятельности (проект №4.1325.2014/К), государственного задания «Обеспечение проведения научных исследований» на базе ЦКП Тверского государственного университета и Германо-российского междисциплинарного научного центра G-RISC (Номер проекта С-2015b-1).

Список литературы

1. Пахомов П.М., Хижняк С.Д., Овчинников М.М., Комаров П.В. Супрамолекулярные гели. Тверь: ТвГУ, 2011.
2. Лен Ж.-М. Супрамолекулярная химия. Концепции и перспективы. Новосибирск, 1998.
3. *Supramolecular Polymers* / Ed. by A. Ciferri. New York: Marcel Dekker, 2000.
4. Sangeetha M.N., Neralagatta, Maitra U. // *Chem. Soc. Rev.* 2005. № 34. P. 821.
5. Terech P., Weiss R.G. // *Chem. Rev.* 1997. V. 97. № 8. P. 3133.
6. Xuewen Du, Jie Zhou, Junfeng Shi, and Bing Xu. *Chem. Rev.* 2015. DOI: 10.1021/acs.chemrev.5b00299.
7. Овчинников М.М., Хижняк С.Д., Арутюнян Л.Р., Перевозова Т.В., Адомян А.Н., Арутюнян Р.С., Пахомов П.М. // *Физико-химия полимеров*, Тверь, 2015, вып. 21, С. 113–119.
8. Черонис Н.Д., Ма Т.А. Микро- и полумикрометоды органического функционального анализа. М., 1973. 576 с.

GELATION IN AQUEOUS SOLUTION OF L-CYSTEINE AND SILVER NITRITE

**T.V. Perevozova¹, S.D. Khizhnyak¹, L.R. Arutyunyan²,
R.S. Arutyunyan², M.M. Ovchinnikov³, P.M. Pakhomov¹**

¹Tver State University

²Erevan State University

³Tver State Medical University

The authors discovered phenomenon of gelation in low concentration aqueous solutions of L-cysteine and AgNO₂ at ratios of 1: 1 and 1: 1.25. The mechanism of self-organization in cysteine silver solution (CSR) and the structure of the gels formed have studied with using viscometry methods, measuring of pH, dynamic light scattering (JEM), measuring the Z-potential, transmittance electron microscopy (TEM), UV and FTIR spectroscopy

Keywords: *L-cysteine, silver nitrate, self-organization, the supramolecular hydrogel.*

Об авторах:

ПЕРЕВОЗОВА Татьяна Викторовна – студентка 5 курса обучения химико-технологического факультета, кафедры физической химии ТвГУ, e-mail: tanya.perevozova05@yandex.ru

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

АРУТЮНЯН Лусине Ромиковна – кандидат химических наук, доцент, Ереванский государственный университет, e-mail: lusinehar@ysu.am

АРУТЮНЯН Ромик Суренович – доктор химических наук., профессор, заведующий кафедрой неорганической и аналитической химии, Ереванского государственного университета, e-mail: romik@ysu.am

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

ПАХОМОВ Павел Михайлович – доктор химических наук, профессор, заведующий кафедрой физической химии ТвГУ, e-mail: pavel.pakhomov@mail.ru