

УДК 577.1:543.422.27

ОДНОСТАДИЙНЫЙ МЕТОД ЖЕЛИРОВАНИЯ L-ЦИСТЕИН-СЕРЕБРЯНЫХ РАСТВОРОВ

М.М. Овчинников¹, В.С. Лагушева², С.Д. Хижняк², П.М. Пахомов²

¹Тверской государственный медицинский университет

²Тверской государственный университет

Разработан одностадийный метод желирования низкоконцентрированных водных растворов, содержащих аминокислоту L-цистеин, нитрат серебра и хлорид натрия. Процессы самоорганизации и механизм гелеобразования в системе изучены с помощью методов УФ-спектроскопии, динамического светорассеяния (ДСР), просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ) и вискозиметрических исследований. Установлено, что на процесс гелеобразования существенное влияние оказывает соотношение концентраций исходных компонентов (ионов серебра и L-цистеина), и концентрация хлорида натрия.

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

Супрамолекулярные гидрогели привлекают повышенное внимание исследователей, как перспективные материалы для биомедицинского применения, и как интересные объекты для изучения процессов самоорганизации [1–3]. Супрамолекулярные гидрогели могут быть образованы низкомолекулярными соединениями различной природы - пептидами, аминокислотами и их производными и т.д, что обеспечивает их биосовместимость [4–6]. Благодаря высокому содержанию воды они идеально подходят для биологического применения в качестве покрытий ран, контактных линз, суперсорбентов, биосенсоров. Авторы детально исследовали процессы самоорганизации и гелеобразования в разбавленных цистеин-серебряных растворах (ЦСР), приготовленных на основе аминокислоты L-цистеин и нитрата серебра [7–10]. Структурно эти системы представляют собой совокупность положительно заряженных фрагментов пространственной сетки, распределенных в водной или водно-органической фазе. Фрагменты сетки построены из пересекающихся цепочек кластеров, которые, в свою очередь, образуются из молекул меркаптида серебра. ЦСР при концентрациях 0.003 М (по содержанию цистеина) не образует гель, однако он может быть переведен в гелеобразное состояние несколькими способами: изменением диэлектрической постоянной среды с помощью водорастворимых органических растворителей [8], добавлением в

раствор определенных анионов, играющих роль линкеров (скрепок) между положительно заряженными фрагментами, изменением заряда фрагментов, добавлением в раствор щелочи. Таким образом, гель в системах на основе ЦСР формируется в две стадии: сначала синтезируется ЦСР, а затем в него добавляется определенный компонент, стимулирующий гелеобразование. Кроме того, авторами была обнаружена новая система, полученная из N-ацетил-L-цистеина и нитрата серебра, способная образовывать гель при малых концентрациях компонентов в одну стадию [9]. Наблюдаемые в эксперименте примеры гелеобразования в одну стадию стимулировали поиск ответа на вопрос, возможен ли в системах на основе L-цистеина и солей серебра достаточно быстрый процесс гелеобразования в одну стадию? Выяснению этого вопроса посвящена данная работа.

Экспериментальная часть

В работе использованы реактивы: нитрат серебра 99% («Lancaster»), L-цистеин 99% («Acros»), хлорид натрия (х.ч.). Все растворы готовили на бидистиллированной воде.

Для приготовления смесей на основе L-цистеина (L-Cys) и нитрата серебра использовали водные растворы исходных компонентов с концентрацией 0,03 М. Смеси для испытаний получали по следующей схеме: к раствору L-Cys приливали рассчитанные количества раствора хлорида натрия, воды, а затем раствора нитрата серебра. При этом отношение молярной концентрации ионов серебра к концентрации L-Cys должно составлять заданное значение. Смесь растворов энергично перемешивали и оставляли на сутки в защищенном от света месте при комнатной температуре.

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

Изучение образцов методом динамического светорассеяния (ДСР) проводили на анализаторе Zetasizer «Nano ZS» (фирма «Malvern») с He-Ne-лазером (633 нм) мощностью 4 мВт. Все измерения осуществлялись при 25 °С в конфигурации обратного рассеяния (173⁰), обеспечивающей наибольшую чувствительность прибора.

Вязкость, точнее, произведение динамической вязкости на плотность образца, 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 проводили при температуре 19 °С.

Прочность гелей оценивали по характеру деформации столбика геля в пробирке при переворачивании её на 180 градусов. Соответствующая шкала деформаций приведена в работе [7].

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 медную сетку, покрытую формвар-углеродной пленкой толщиной около 100 нм, и высушивали на воздухе.

Результаты и их обсуждение

В данной работе установлено, что в результате смешивания водных растворов нитрата серебра, L-Cys и хлорида натрия при определенных концентрационных соотношениях компонентов запускаются процессы структурообразования, в результате которых в системе через некоторое время образуется гель. Результаты, полученные на вибрационном вискозиметре, показывают, что через 10 мин после смешивания исходных компонентов вязкость раствора монотонно возрастает (рис. 1а), что свидетельствует о структурировании образца. Характер зависимости вязкости от времени для этого же образца через два дня изменяется (рис. 1б). При стоянии происходит возрастание вязкости образца до значения 9.8 мПа с г/см³, а в результате измерения наблюдается уменьшение вязкости до 7.5 мПа с г/см³, что указывает на разрушение структуры под действием вибраций измерительных пластин.

Отметим некоторые закономерности гелеобразования. Установлено, что прочность образованных гелей зависит от концентраций компонентов и их соотношений. Так, на рис. 2 показаны зависимости прочности геля от соотношения концентраций иона серебра и цистеина при фиксированной концентрации хлорида натрия. Как видно из рисунков характер зависимости прочности гелей от соотношения концентраций Ag⁺/L-Cys имеет куполообразную форму, т.е. если задается определенная концентрация хлорид-иона в системе, то наибольшая прочность гелей наблюдается при определенных соотношениях концентраций иона серебра и цистеина, которые находятся в диапазоне значений 1.5–1.8, что существенно больше значения 1.25, характерного для ЦСР. Из анализа этих зависимостей можно также заключить, что при фиксированной начальной концентрации Ag⁺ в растворе, при заданном отношении Ag⁺/L-Cys, прочность геля, как правило, возрастает с увеличением концентрации хлорид-иона. Следует также отметить, что при достаточно больших концентрациях хлорид-иона в системе гели становятся мутными и в растворе может образоваться осадок. Однако прозрачные гели достаточно устойчивы и их прочность практически не изменяется в течение длительного времени (10–14 дней).

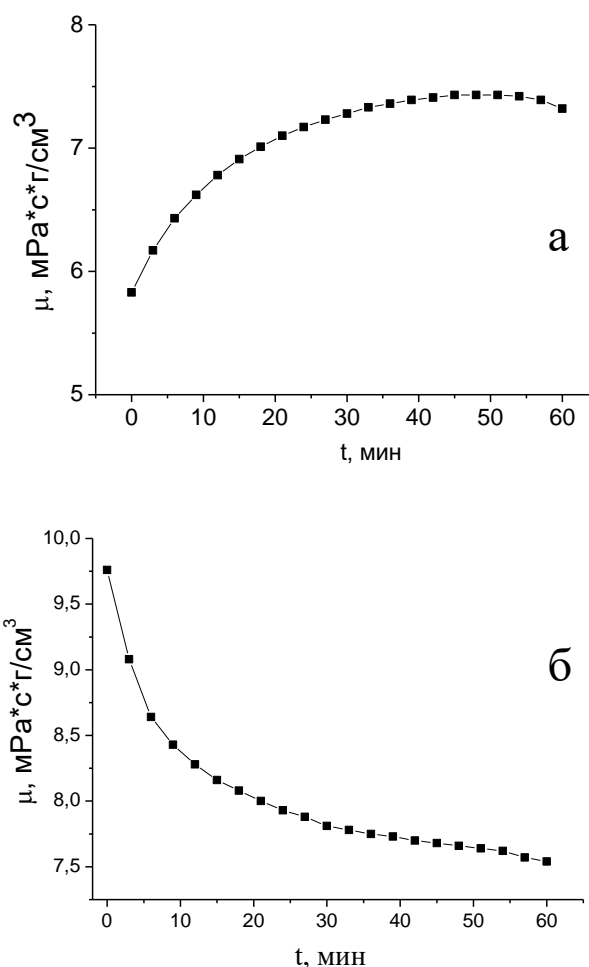


Рис. 1. Зависимость относительной вязкости образца от времени: а – через 10 мин после смешения компонентов, б – через 2 дня, $T=19^{\circ}\text{C}$

Согласно данным ПЭМ, в гелях фиксируется сетка пересекающихся цепочек, образованных кластерами, как это видно на рис. 3. Подобная структура характерна для всех типов гелей, полученных на основе цистеина и нитрата серебра [7], и, вероятно, отражает физически возможную перколяционную структуру, формирующуюся в сильно разбавленных гелеобразующих растворах.

Исследование гелеобразующих растворов методом ДСР показало, что гидродинамический радиус агрегатов, регистрируемых в системе, зависит от концентрации исходных компонентов и времени стояния образца (рис. 4). Как и в случае гелей на основе ЦСР, полученных двухстадийным способом, значения гидродинамических радиусов намного превышают размер кластеров, наблюдаемых методом ПЭМ, размер которых, как правило, не превышает 2 нм (рис. 3а).

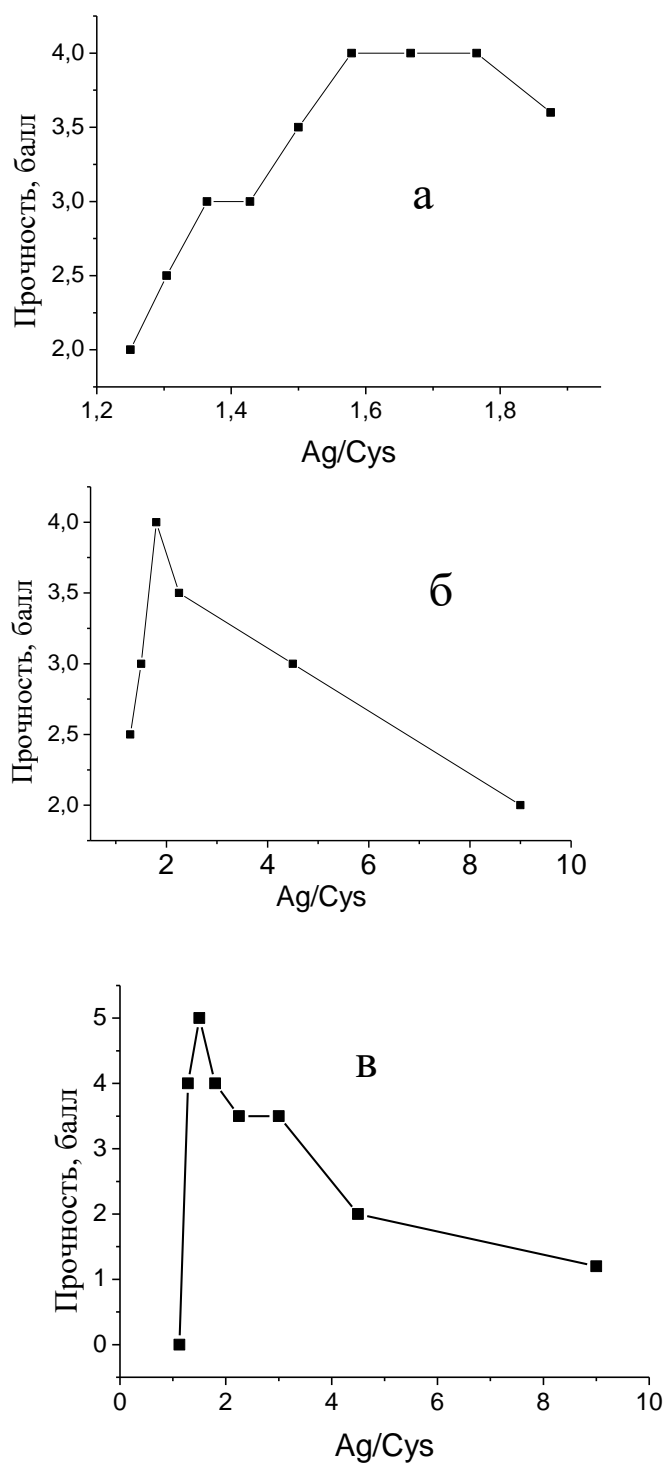
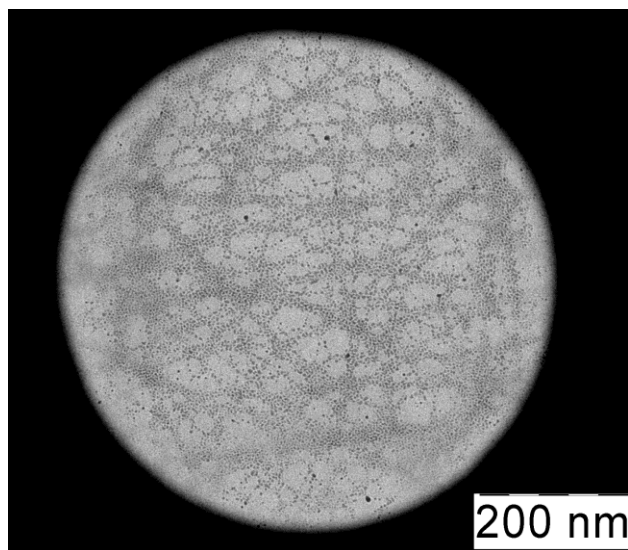
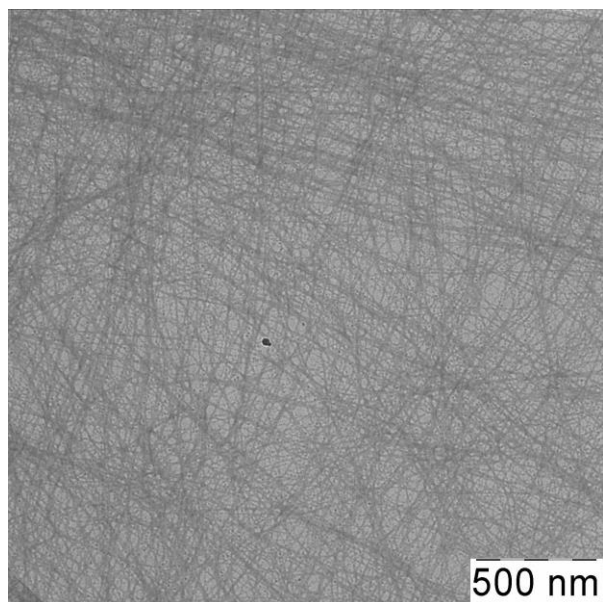


Рис. 2. Прочность гелей в зависимости от соотношения концентраций нитрата серебра и L-Cys при различном содержании хлорида натрия: а – CNaCl = 0.75 мМ; б – CNaCl = 1.0 мМ; в – CNaCl = 2.0 мМ; CAgNO₃ = 4.5 мМ



а



б

Рис. 3. ПЭМ изображения гелеобразца, полученного одностадийным методом, при различном увеличении. $\text{CAgNO}_3 = 3 \text{ мМ}$, $\text{CL-Cys} = 2 \text{ мМ}$, $\text{CNaCl} = 0.75 \text{ мМ}$

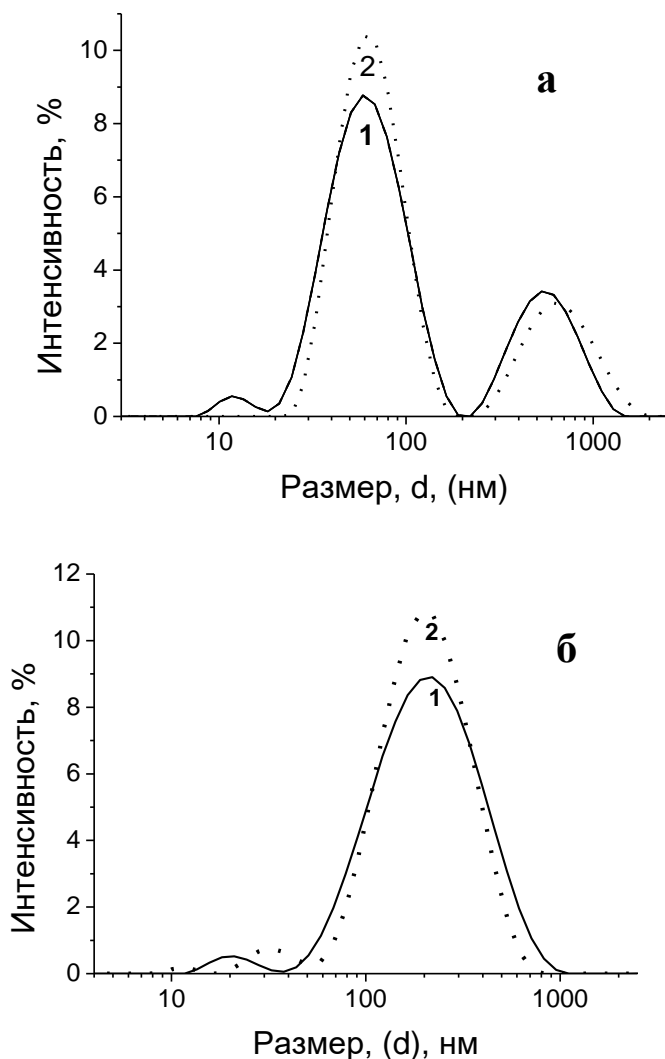


Рис. 4. Распределение частиц по размерам в системе $\text{AgNO}_3\text{-L-Cys-NaCl}$ при различной концентрации исходных компонентов в зависимости от времени стояния образца: а – $\text{CAgNO}_3 = 2.250 \text{ mM}$, $\text{CNaCl} = 0.375 \text{ mM}$, $\text{CAg}^+/\text{CL-Cys} = 1.5$; 1 – через 20 мин после смешения компонентов, 2 – через 1 день; б – $\text{CAgNO}_3 = 1,125 \text{ mM}$, $\text{CNaCl} = 0.187 \text{ mM}$, $\text{CAg}^+/\text{CL-Cys} = 1.5$; 1 – через 90 мин, 2 – через 180 мин после смешения компонентов

Как и в случае с ЦСР, вероятная физическая интерпретация данных по ДСР состоит в том, что светорассеяние происходит на разреженных фрагментах пространственной сетки, т.е. структурах, характеризующихся фрактальной размерностью меньшей, чем 3. Следует отметить, что картина распределения рассеивающих центров по размерам для изучаемой системы отличается большой

изменчивостью. Вероятно, этот факт отражает неравновесный характер системы, способной пребывать в разных структурных состояниях.

Изучение электронных спектров проводилось для прозрачных растворов с соотношением молярных концентраций иона серебра к L-Cys, равном 1,5. Причем были сопоставлены спектры системы (Ag^+ -L-Cys-вода), не способной к гелеобразованию, и гелеобразующей системы (с тем же содержанием серебра и цистеина), но содержащей NaCl. Эти спектры приведены на рис. 5. Из рис. 5 следует, что в электронном спектре системы AgNO_3 -L-Cys (кривая 1) наблюдаются 2 полосы поглощения: в области ~ 316 нм и ~ 390 нм. Согласно нашим исследованиям эти же полосы поглощения характерны и для ЦСР, причем поглощение в областях 316 нм и 390 нм проявляются только в растворах с аналитической концентрацией цистеина более $1,3 \cdot 10^{-4}$ М, причем, чем больше концентрация исходных компонентов, тем более выражены эти полосы поглощения.

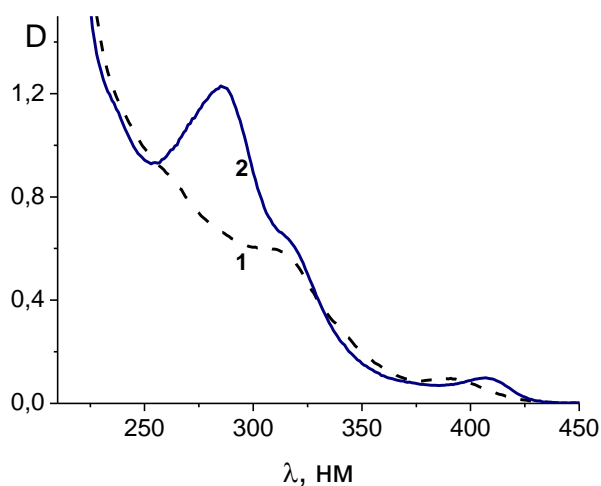


Рис. 5. Электронные спектры систем: AgNO_3 -L-Cys (1) и AgNO_3 -L-Cys-NaCl (2); $C_{\text{AgNO}_3} = 2.25$ мМ, $C_{\text{Cys}} = 1.5$ мМ, $C_{\text{NaCl}} = 0.375$ мМ

Этот факт указывает на связь данных полос поглощения со взаимодействием кластерных цепочек в растворе. В присутствии хлорид-иона происходит изменение в дисперсионной фазе системы, она становится способной структурироваться в гель, изменяется и УФ спектр раствора. Наблюдается хорошо выраженная полоса поглощения с максимумом 285 нм, имеется поглощение в области 315–320 нм, аналогичное поглощению системы без хлорид-иона, и присутствует слабая, но хорошо выраженная, полоса поглощения с максимумом ~ 410 нм (кривая 2). Таким образом, согласно электронному спектру геля, в присутствии хлорид-иона, сохраняются центры координации цепочек кластеров (или фрагментов сетки), которые характеризуются

поглощением в области 315–320 нм. Предположительно эти центры соответствуют взаимодействию супрамолекулярных цепочек в отсутствие ионов хлора и обуславливают гелеобразование в ЦСР при повышенных концентрациях компонентов (рис. 6, схема а) [10]. Центры связывания, характеризуемые поглощением в области 390 нм, видоизменяются, и их поглощение смещается в длинноволновую область. Видоизменение может состоять в том, что положительно заряженный ион серебра, связывающий цепочки, координируется с отрицательно заряженным ионом хлора, как это показано на схеме б (рис. 6).

Теперь можно систематизировать роль иона хлора в процессах гелеобразования. Так как положительный заряд связывающего центра после присоединения иона хлора уменьшается, то это способствует уменьшению кулоновского отталкивания связывающего центра от положительно заряженных кластерных цепочек или фрагментов сетки. Цепочки более прочно связываются, что способствует формированию геля. Если в растворе присутствуют свободные ионы хлора, то нельзя исключать, что они могут химически связывать разные цепочки, координируясь с атомами серебра в цепочках (схема в). Так, например, фторид-ион, не образующий химической (координационной) связи с ионом серебра, не способен стимулировать гелеобразование.

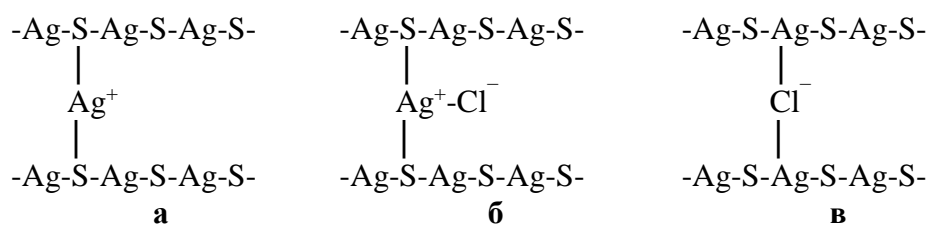


Рис. 6. Предполагаемые схемы участия хлорид-аниона в процессе гелеобразования в $\text{AgNO}_3\text{-L-Cys-NaCl-H}_2\text{O}$ системе

Отмеченная роль хлорид-иона имеет место как в случае одностадийного, так и в случае двухстадийного процесса гелеобразования, т.е. Cl^- способен стимулировать гелеобразование и в ЦСР, как, например, двухзарядный сульфат-ион. Но сульфат-ион не способен формировать гель в одну стадию в рассматриваемой системе. Причина заключается в том, что этот анион, благодаря кулоновскому притяжению к положительно заряженным кластерным цепочкам, препятствует развитию в растворе сильно разветвленной, перколяционной структуры. Двухзарядный анион связывает цепочки, способствуя, тем самым, коллапсу фрактальной структуры. В то же время хлорид-анион образует с ионом серебра незаряженный комплекс – $\text{Ag}^+\text{-Cl}^-$, который не препятствует формированию в системе фрактальной структуры, а встраиваясь между цепочками способствует

образованию перколяционной пространственной сетки. Согласно предварительным данным, аналогично хлорид-иону, одностадийный процесс гелеобразования может быть реализован в присутствии и других анионов, образующих с ионом серебра химические связи – бромид-, йодид-, роданид-ионов, но это предмет дальнейших исследований.

Работа выполнена при финансовой поддержке Минобрнауки РФ в рамках выполнения государственных работ в сфере научной деятельности (проект №4.5508.2017/БЧ).

Список литературы

1. Supramolecular Polymers / Ed. by A. Ciferri. New York: Marcel Dekker, 2000.
2. Bernet A., Behr M., Schmidt H.-W. // Soft Matter. 2012. V. 8. P. 4873.
3. Qin L., Wang P., Guo Y., Chen C., Liu M. // Adv. Sci. 2015. 1500134. P. 1.
4. Пахомов П.М., Хижняк С.Д., Овчинников М.М., Комаров П.В. Супрамолекулярные гели. Тверь: Тверской гос. ун-т. 2011. 272 с.
5. Terech P., Weiss R.G. // Chem. Rev. 1997. V. 97. P. 3133.
6. Du X., Zhou J., Shi J., Xu B. // Chem. Rev. 2015. V 115. P. 13165.
7. Khizhnyak S.D., Komarov P.V., Ovchinnikov M.M., Zherenkova L.V., Pakhomov P.M. // Soft Matter. 2017. V. 13. P. 5168.
8. Овчинников М.М., Хижняк С.Д., Пахомов П.М. // Журн. структ. химии. 2011. Т. 52, № 6. С. 1203 – 1207.
9. Хижняк С.Д., Овчинников М.М., Пахомов П.М. // Журн. структ. химии. 2014. Т. 55. № 1. С. 173–177.
10. Овчинников М.М., Хижняк С.Д., Пахомов П.М. // Физико-химия полимеров. Тверь: Тверской гос. ун-т. 2007. Вып. 13. С. 140–147.

ONE-STAGE GELATION OF L-CYSTEINE-SILVER SOLUTIONS

M.M. Ovchinnikov¹, V.S. Laguseva², S.D. Khizhnyak², P.M. Pakhomov²

¹Tver State Medical University

²Tver State University

One-stage method for gelation of low-concentration aqueous solutions containing the amino acid L-cysteine, silver nitrate and sodium chloride has been discovered. Self-organization processes and mechanism of gelation in the system are studied by means of viscosimetry tests, UV spectroscopy, Dynamic Light Scattering (DLS), Transmission electron microscopy (TEM). It is established that gelation is mainly depends on molar ratio of silver ions and L-cysteine, as well as sodium chloride concentration.

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

Об авторах:

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

ЛАГУСЕВА Вера Сергеевна – аспирантка, Тверской государственный университет (ТвГУ), e-mail: laguseva-vera@yandex.ru

ХИЖНЯК Светлана Дмитриевна – кандидат химических наук, зав. лабораторией спектроскопии, Центр коллективного пользования, ТвГУ, e-mail: sveta_khizhnyak@mail.ru

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