

Наноструктуры в очень разбавленных водных растворах*

Ш. Ло, В. Ли

ШУЙ-ИН ЛО (SHUI-YIN LO) — главный научный сотрудник Группы американских технологий (American Technologies Group Inc.), Чикагский университет, США. Область научных интересов: водные кластеры, квантовые когерентные эффекты, кристаллизация, каталитические эффекты.

ВЕНЧОНГ ЛИ (WENCHONG LI) — старший научный сотрудник Группы американских технологий (American Technologies Group Inc.), Чикагский университет, США. Область научных интересов: свойства и обработка воды, лазерная спектроскопия, биоспектроскопия.

1017 South Mountain Ave. Monrovia, CA 91016, USA, тел. (626) 357-5000, факс (626) 357-4464, E-mail atgmail@ateg.com, SyinLo@ateg.com

Вода — важнейшее химическое соединение, необходимое для жизни. Крупнейший биохимик Альберт Сент-Дьердьи так выразительно определил роль воды: «Удивительная многосторонняя реактивность воды увлекает нас на длинный путь к пониманию изумительно тонкого, совершенного устройства жизни и ее реакций» [1].

Вода как химический объект является предметом научных исследований вот уже на протяжении длительного периода времени и интенсивность их не снижается и в настоящее время [2—5]. Один из наиболее точных научных подходов к изучению структурообразования в воде предполагает исследование водных кластеров в изолированном виде [6—11] (число молекул H₂O на кластер составляет от 2 до 100). Однако следует ожидать, что изолированные водные кластеры при включении их в жидкую воду в большой степени модифицируются вследствие сильно интерактивной природы молекул воды в жидком состоянии. Заметим, что сведения об изолированных водных кластерах нельзя полностью переносить на жидкое состояние. В высшей степени интересно было бы знать, можно ли изучать водные кластеры в чистой воде. Но вряд ли это возможно, поскольку «чистая вода» очень реакционно-способна. К тому же следует учитывать, что состояние абсолютно чистой воды, подобно абсолютному нулю температуры, практически нельзя достичь.

Существует другой подход к выявлению водных кластеров — изучение свойств очень разбавленных водных растворов. Знание свойств разбавленных растворов важно также для прикладного аспекта, хорошо известно множество областей их применения. По исследованию очень разбавленных растворов выполнен значительный объем работ [12—17], которые позволяют с большой вероятностью предполагать существование в нормальных условиях стабильных водных кластеров, ответственных за каталитические реакции при горении топлива, а также за стимуляцию разного рода биологической активности.

В данной статье рассмотрены разбавленные растворы, как неорганические, так и органические, играющие важную роль в биосистемах. В качестве представителя неорганических разбавленных растворов выбран раствор хлорида натрия, в качестве органических — растворы, содержащие аминокислоты.

Структурообразование в очень разбавленных растворах NaCl

Прежде всего определим понятие «очень разбавленные ионные растворы». Это состояние мы относим к растворам, в которых концентрация ионов ниже критической. Пределом разбавления является чистая вода. В такой ситуации на задний план отступает эффект ионов, а эффект водных кластеров становится доминирующим.

Критическую концентрацию ионов можно рассчитать в рамках с теории Дебая—Хюккеля. Дебаевский радиус ионов — в нашем случае Na⁺ или Cl⁻ дается формулой

$$r_D = (\epsilon kT/4\pi e^2 n)^{1/2}$$

где ϵ — диэлектрическая проницаемость воды; e — электрический заряд; n — концентрация ионов; T — температура (K); k — константа Больцмана.

Расстояние между двумя ионами Na⁺ составляет $1/n^{1/3}$. Критическая концентрация n_c достигается при равенстве дебаевского радиуса величине $1/n^{1/3}$:

$$n_c = (\epsilon kT/4\pi e^2)^3$$

В состоянии предельного разбавления раствора, т.е. при концентрации ионов $n \ll n_c$, можно ожидать, что молекулы воды будут вести себя, как если бы была чистая вода. Примем, что критическая концентрация раствора NaCl равна $2 \cdot 10^{-3}$ M.

Исследование структурообразования в очень разбавленных растворах NaCl мы проводили методом атомной силовой микроскопии (АСМ) с использованием наноскопа производства фирмы «Digital Instrument Inc.», который широко применяется в кристаллографических исследованиях органических и биологических объектов.

Для подготовки образцов капли растворов хлорида натрия помещали на свежеподготовленную гладкую поверхность субстрата (слода) и выдерживали для высушивания на воздухе в чистом помещении при комнатной температуре (19—21 °C), нормальном давлении и относительной влажности воздуха 39—54%.

* Перевод с английского канд. биол. наук Е. М. Молочкиной.

В качестве контроля использовали деионизованную воду с удельной электропроводностью $\sim 2 \text{ МОМ}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$. После испарения деионизованной воды какие-либо существенные структуры на слюде не наблюдались.

В 1%-ном растворе хлорида натрия ($1,7 \cdot 10^{-1} \text{ M}$) обнаруживается хорошо известная кубическая струк-

тура кристаллов NaCl (рис. 1). В случае раствора с содержанием NaCl 214 ppm ($3,6 \cdot 10^{-3} \text{ M}$) кристаллическая структура изменяется: появляются «ветви». Мы интерпретируем это так, что с уменьшением концентрации ионов водные кластеры начинают оказывать влияние на процесс кристаллизации хлорида натрия. При этом, хотя образующаяся единичная ячейка еще кубическая, вместе с тем Na^+ -водные кластеры и Cl^- -водные кластеры за счет предоставляемых ионов Na^+ или Cl^- из жидкой фазы вызывают формирование новых кристаллических ячеек.

Далее поляризация этих кластеров может влиять на направление роста кристалла. Водные кластеры с несколькими молекулами воды могут иметь суммарный нулевой постоянный дипольный момент вследствие сохранения еще некой точной симметрии, что обеспечивает нейтрализацию дипольных моментов индивидуальных молекул воды.

По мере того, как все больше молекул воды объединяются, образуя огромные водные кластеры нанометрового размера, становится почти невозможным сохранять какую-то точную симметрию, и возникает суммарный дипольный момент больших ионно-водных кластеров. Этот дипольный момент становится источником сильного локального электрического поля, которое начинает оказывать влияние на рост кристаллов хлорида натрия, в результате чего и наблюдается образование «ветвей».

АСМ-изображение осадков, полученных при упаривании очень разбавленного раствора NaCl в концентрации 11 ppm ($1,9 \cdot 10^{-4} \text{ M}$), которая меньше, чем критическое значение, демонстрирует совершенно иную топографию остатка, а именно, в отличие от двух предыдущих случаев фиксируются несвязанные островки. Если бы не было никаких различий в (микро)окружении при образовании кристаллов хлорида натрия, более разбавленный раствор давал бы только кубические структуры в меньшем количестве и меньшего размера.

Обычно для оценки сложности поверхности при исследованиях методом АСМ применяют такой критерий, как фрактальный размер. Для проведения фрактального анализа мы использовали пакет компьютерных программ V.4.22ce (он поставляется производителем АСМ «Digital Instrument Inc», Santa Barbara, CA, USA). Фрактальный размер трех описанных выше изображений составил 2,34, 2,26 и 2,14, соответственно.

Помимо проведения кристаллографических исследований для обнаружения наноструктур в разбавленных растворах NaCl мы использовали кондуктометрический метод. Электропроводность растворов измеряли на рН-метре Accumet, модель 20, в котором цифровой интерфейс может быть непосредственно связан с компьютером. Режим ячейки проводимости: частота тока 225 Гц, напряжение 2,5 В. Запись данных измерений проводилась через каждые 0,75 с (без усреднения) в течение примерно 300 с.

На полученных осциллограммах — запись электропроводности как функции времени (рис. 2) четко видны колебания измеряемого параметра с периодом порядка 10 с. Таким образом, электропроводность можно представить в виде двух слагаемых:

$$\sigma(t) = \sigma_j + a_j$$

где σ_j — средняя электропроводность; a_j — амплитуда колебания около среднего значения.

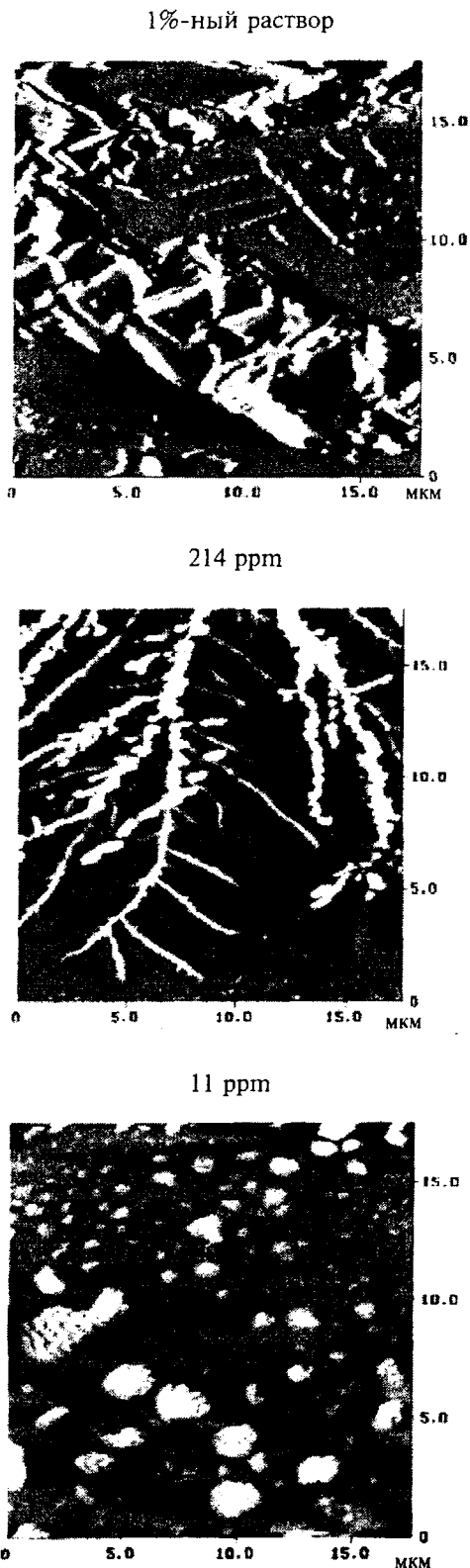


Рис. 1. АСМ-изображения образцов, полученных при выпаривании разбавленных растворов NaCl.

Площадь сканирования $17 \times 17 \text{ мкм}$

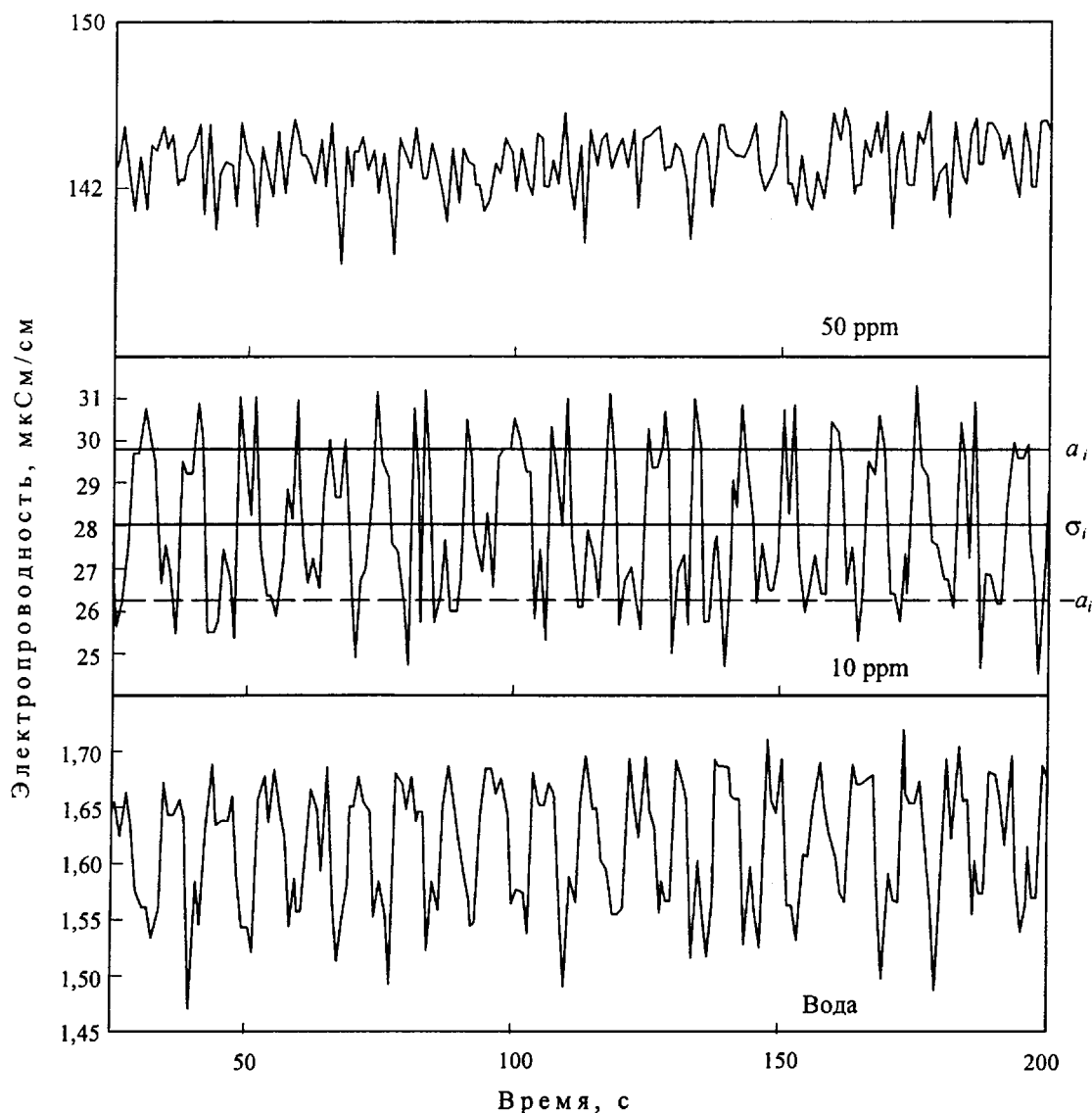


Рис. 2. Осциллограммы электропроводности разбавленных растворов NaCl и деионизованной воды

Значения σ_i и a_i определяли для каждой серии результатов измерений с помощью обычной статистической программы расчета среднего значения и стандартного отклонения. Путем фурье-преобразования проводили обработку данных измерений во временном интервале и вычисляли частотный спектр колебаний электропроводности (рис. 3). Аналогичные измерения были проведены для растворов KCl.

Из рис. 3 видно, что наиболее простым является спектр деионизованной воды. Он имеет характеристический высокоинтенсивный пик при частоте 0,1257 Гц. Пик на частоте 0,2514 Гц является второй гармоникой пика 0,1257 Гц. Другие четыре пика — при частотах 0,2171; 0,3268; 0,4205 и 0,5119 Гц всегда наблюдаются в спектре деионизованной воды (подтверждением тому являются воспроизводимые результаты измерений для деионизованной воды в течение нескольких месяцев).

Для растворов с содержанием NaCl 0,1 ppm (а также для KCl) частотный спектр практически аналогичен с таковым для деионизованной воды, за исключением единственного небольшого различия. По мере увеличения концентрации NaCl до 1 и 10 ppm появ-

ляются новые характеристические пики, а интенсивность пика при частоте 0,1257 Гц существенно снижается и пик слегка сдвигается относительно исходного положения для чистой воды. При концентрации хлорида натрия 50 ppm и выше частотный спектр становится очень сложным, но еще наблюдаются некоторые пики, характеристические для концентраций 10 и 1 ppm. Мы объясняем это тем, что в очень разбавленных растворах NaCl (0,1—1 ppm) доминируют водные кластеры, так что наблюдаются сходные спектральные характеристики, а при повышении концентрации становится более существенным ионный эффект, в результате частотные спектры принимают все больше отличий от спектра деионизованной воды. Сравнение частотных спектров растворов NaCl и KCl показывает, что между ними есть некоторые небольшие различия.

Как известно, носителями электричества в ионных растворах являются ионы, которые проводят электрический ток под влиянием внешнего напряжения, что и определяет постоянное значение электропроводности σ_i , которое мы измеряли. Если раствор содержит кроме ионов некоторое количество водных кластеров, которые имеют суммарные дипольные моменты, они

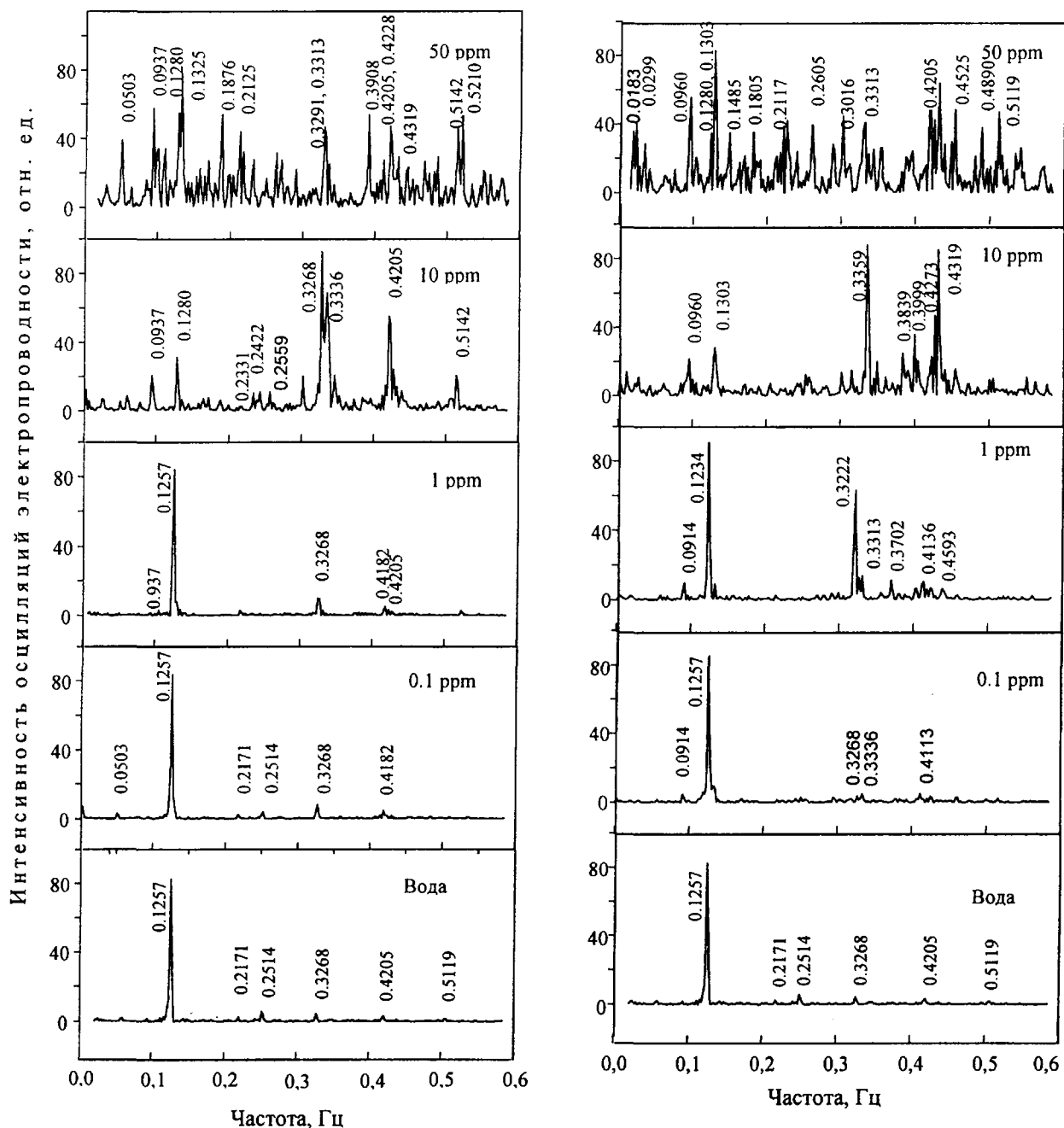


Рис. 3. Частотные спектры осцилляций электропроводности разбавленных растворов NaCl.

Для сравнения дан частотный спектр деионизованной воды

будут осциллировать в условиях приложенного напряжения. Этим, по нашему мнению, обусловлена амплитуда осцилляции α , электропроводности. Таким образом, характеристические осцилляции в частотных спектрах электропроводности воды и очень разбавленных водных растворов следует отнести к суспензии формирующихся в жидкой среде водных кластеров.

Структурообразование в очень разбавленных растворах аминокислот

Напомним, что аминокислотные остатки в определенной последовательности связываются в пептидную цепь, образуя первичную структуру белка. Такие

аминокислоты как гистидин, фенилаланин, триптофан и тирозин, входят в активные центры ферментов. Поскольку многие ферменты проявляют активность только в водной среде, представляло интерес исследовать свойства очень разбавленных водных растворов этих четырех аминокислот. Исследования проводили методами УФ-спектроскопии, атомной силовой микроскопии, измерением электропроводности с расчетом частотных спектров осцилляций проводимости и измерением pH растворов.

УФ-спектры регистрировали в интервале длин волн 190–350 нм с использованием двухлучевого спектрофотометра фирмы «Perkin-Elmer». УФ-спектры

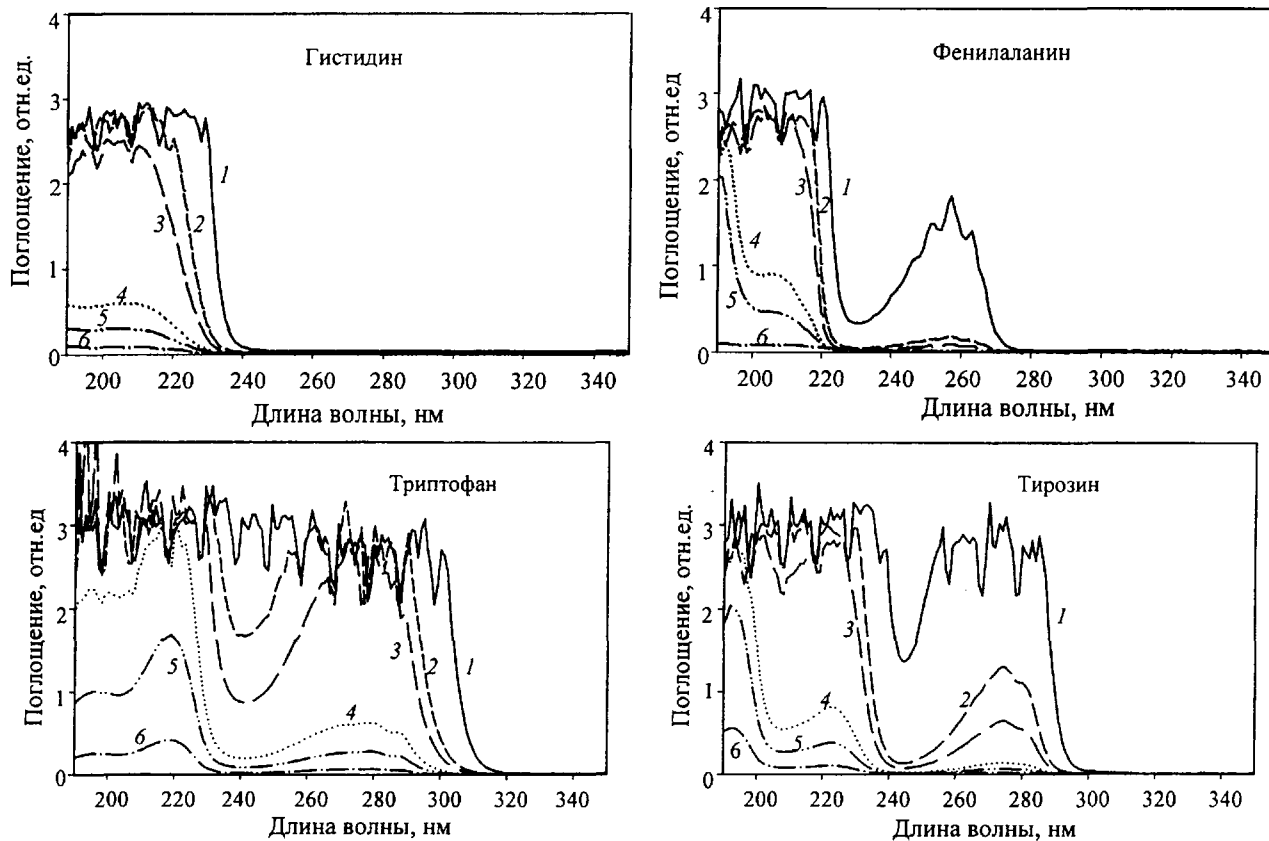


Рис. 4. УФ-спектры водных растворов гистидина, фенилаланина, триптофана, тирозина.
Концентрация растворов (M): $1 \cdot 10^{-2}$ (1), $1 \cdot 10^{-3}$ (2), $5 \cdot 10^{-4}$ (3), $1 \cdot 10^{-4}$ (4), $5 \cdot 10^{-5}$ (5), $1 \cdot 10^{-5}$ (6)

растворов исследованных аминокислот приведены на рис. 4, а также в табл. 1. Из-за наличия в изучаемых аминокислотах ароматических колец в области 190–300 нм появляется много полос поглощения. В спектре фенилаланина регистрируются основная полоса при 205 нм и вторая полоса при 257 нм. Эти две полосы были отнесены к электронному переходу $\pi \rightarrow \pi^*$ бензольного кольца. По мере снижения концентрации интенсивность пиков при 205 и 257 нм уменьшается, причем гораздо быстрее, чем пика при 192 нм (см. табл. 1). Действительно, отношение величин поглощения A_{192}/A_{205} возрастает от 0,95 до 2,61 и 5,00 при переходе от концентрации $10^{-3} M$ к 10^{-4} и $10^{-5} M$.

Сходное явление наблюдается также в УФ-спектрах тирозина. По мере уменьшения концентрации тирозина от $10^{-3} M$ до 10^{-4} и $10^{-5} M$, интенсивность полос при 193 и 222 и 274 нм существенно снижается, но отношения A_{193}/A_{222} и A_{193}/A_{274} увеличиваются.

Отметим, что полосы при 205 и 257 нм для фенилаланина так же, как полосы при 222 и 274 нм для тирозина являются хорошо разрешенными полосами, их часто используют для количественного определения аминокислот в растворах. Что касается полосы при 192 или 193 нм, то ее нельзя использовать для количественного анализа, поскольку она не простым образом зависит от концентрации растворенного вещества. В частности, ее интенсивность зависит от наличия водных кластеров, связываемых с растворенным веществом (исследуемые ароматические кислоты гидрофобны, но при низких концентрациях они слабо растворяются в воде). Так, в водных растворах аминокислот водные кластеры могут связываться с гидрофильными группами фенилаланина и тирозина.

Таким образом, изменения четкой полосы при 190–200 нм можно рассматривать как свидетельство существования водных кластеров в очень разбавленных растворах аминокислот.

Частотные спектры, полученные при исследовании осцилляций электропроводности разбавленных водных растворов аминокислот, представлены на рис. 5.

Таблица 1

Полосы поглощения УФ-спектров водных растворов фенилаланина и тирозина

Фенилаланин					
C, M	A_{192}	A_{205}	A_{257}	A_{192}/A_{205}	A_{192}/A_{257}
$1 \cdot 10^{-2}$	2,85	3,30	1,65	0,86	1,73
$1 \cdot 10^{-3}$	2,73	2,85	0,18	0,95	15,57
$5 \cdot 10^{-4}$	2,60	2,65	0,09	0,98	28,88
$1 \cdot 10^{-4}$	2,38	0,90		2,61	
$5 \cdot 10^{-5}$	2,03	0,47		4,26	
$1 \cdot 10^{-5}$	0,50	0,10		5,00	
Тирозин					
C, M	A_{193}	A_{222}	A_{274}	A_{193}/A_{222}	A_{193}/A_{274}
$1 \cdot 10^{-3}$	3,09	3,01	1,31	1,03	2,36
$5 \cdot 10^{-4}$	2,84	2,82	0,65	1,01	4,37
$1 \cdot 10^{-4}$	2,77	0,82	0,15	3,38	27,70
$5 \cdot 10^{-5}$	2,04	0,38	0,07	5,36	29,10
$1 \cdot 10^{-5}$	0,55	0,10	0,02	5,50	36,67

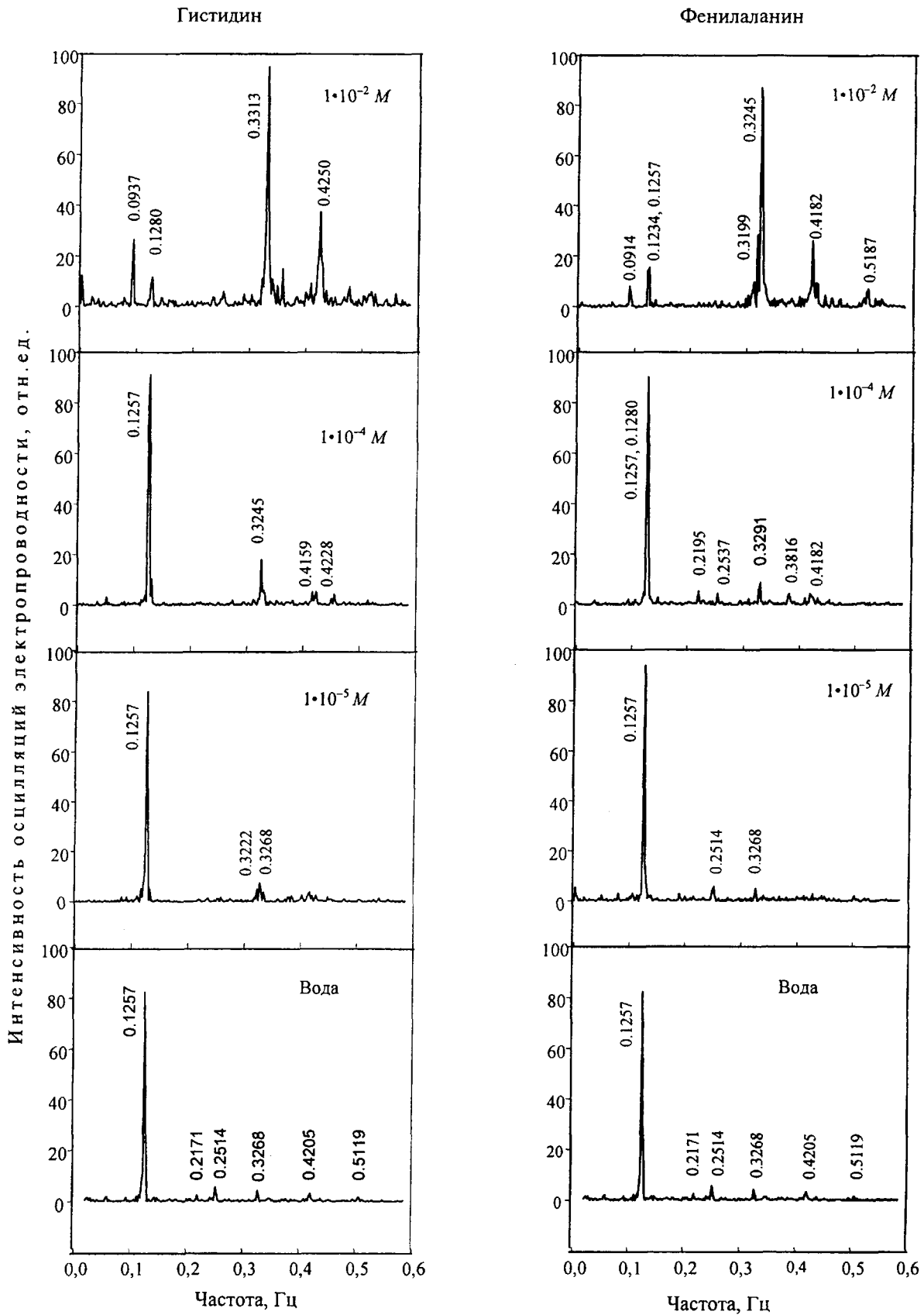


Рис. 5 А. Частотные спектры осцилляций электропроводности водных растворов гистидина и фенилаланина. Для сравнения дан частотный спектр деионизованной воды

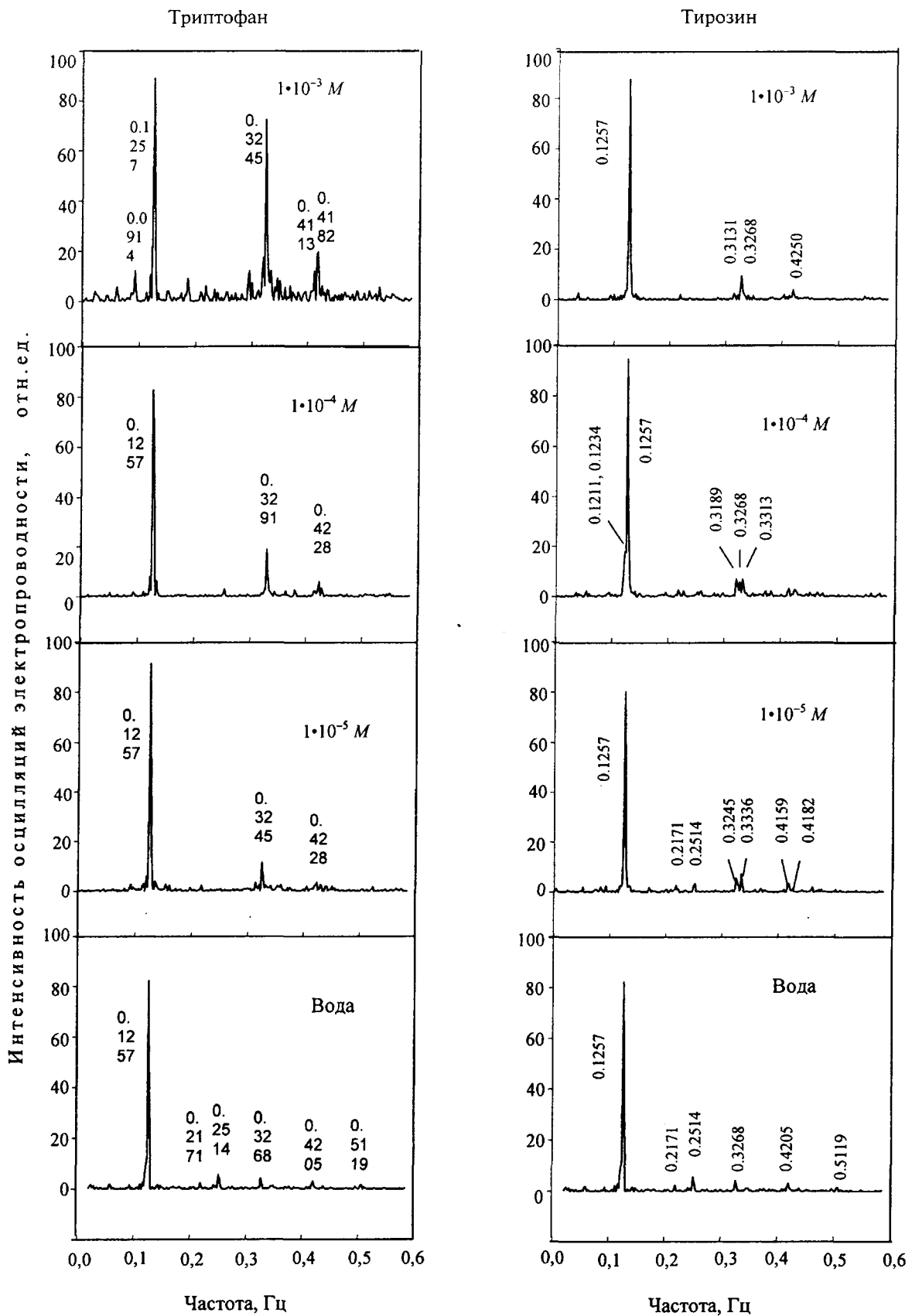


Рис. 5 Б. Частотные спектры осцилляций электропроводности водных растворов триптофана и тирозина.

Для сравнения дан частотный спектр деионизованной воды

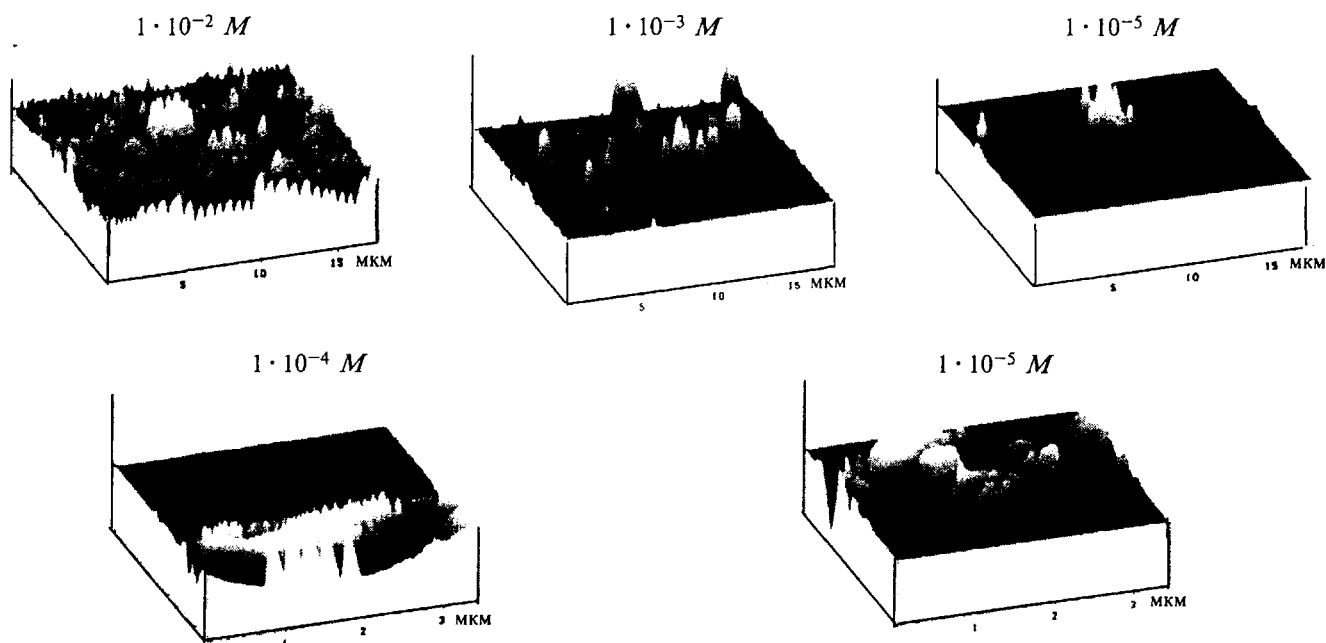


Рис. 6. Трехмерные АСМ-изображения образцов, полученных при выпаривании разбавленных растворов гистидина. Верхний ряд — площадь сканирования 17×17 мкм, нижний ряд — площадь сканирования 3×3 мкм

Видно, что имеют место сходство и различия в частотных спектрах исследуемых растворов, в которых концентрации аминокислот различаются на порядок. Полученные результаты также показывают, что взаимодействие молекул аминокислоты и воды в разбавленных растворах зависит от концентрации. Чем ниже содержание аминокислоты в растворе, тем меньше число пиков появляется в частотных спектрах. Пик при частоте 0,1257 Гц, характерный для деионизованной воды и очень разбавленных растворов NaCl (а также KCl), спектрах триптофана также наблюдается аналогичная картина изменения соотношения A_{196}/A_{220} и A_{196}/A_{280} при уменьшении концентрации аминокислоты. присутствует и в спектрах очень раз-

бавленных водных растворов аминокислот. Для очень разбавленных растворов ($10^{-5} M$) частотные спектры всех четырех изученных аминокислот имеют различия, что указывает на различие во взаимодействии их с молекулами воды.

Еще один этап работы был выполнен с использованием атомной сканирующей микроскопии. Для получения образцов наносили 20 мкл раствора исследуемой аминокислоты на свежеприготовленную слюдяную пластинку и выдерживали для высушивания в чистом обеспыленном помещении (комнатная температура, нормальное давление).

Видимые на АСМ-изображениях наноструктуры (рис. 6), вероятнее всего, построены из кластеров,

Таблица 2

Результаты измерений pH водных растворов аминокислот

C, M	Гистидин					Триптофан				
	pH-метр	EM 9582	EM 9587 или 9586	EM 9590	ΔpH^*	pH-метр	EM 9582	EM 9587 или 9586	EM 9590	ΔpH^*
$1 \cdot 10^{-2}$	7,67		7,5	7,5		6,17	5,2	5,3	5 +	0,97
$1 \cdot 10^{-3}$	7,17	6,2		6,5	0,97	5,86	5,3	5,3	5 +	0,56
$5 \cdot 10^{-4}$	7,12	6,1	6	6	1,02	6,13	5,3	5,3	5 +	0,83
$1 \cdot 10^{-4}$	6,94	5,6	5,5	6	1,34	5,75	5,3	5,3	5 +	0,45
$5 \cdot 10^{-5}$	6,55	5,3	5,5	5,5	1,25	6,30	5,2	5,3	5 +	1,10
$1 \cdot 10^{-5}$	6,03	5,3	5,3	5,5	0,73	6,10	5,3	5,3	5 +	0,8
Фенилаланин						Тирозин				
$1 \cdot 10^{-2}$	5,89	5,2	5,3	5	0,69	6,13	5,2	5,2	5	0,93
$1 \cdot 10^{-3}$	6,17	5,3	5,3	5	0,87	5,95	5,2	5,2	5	0,75
$5 \cdot 10^{-4}$	5,81	5,3	5,3	5	0,51	6,23	5,3	5,5	5,5	0,93
$1 \cdot 10^{-4}$	5,98	5,3	5,3	5	0,68	6,01	5,2	5,3	5,5	0,81
$5 \cdot 10^{-5}$	6,22	5,3	5,3	5	0,92	6,14	5,3	5,3	5,5	0,84
$1 \cdot 10^{-5}$	5,63	5,3	5,3	5	0,33	5,77	5,3	5,5	5,5	0,47

* $\Delta pH = pH_{\text{метр}} - pH_{EM9582}$

Результаты измерений pH буферных растворов и чистой воды

Среда	pH-метр	EM 9582	EM 9587 или 9586	EM 9590	ΔpH
Буферный раствор					
pH=6,97	6,981	7	7	7	Пренебрежимо мало
pH=4,10	4,100	4	4,2	4	—
Деионизованная вода	5,515	5,4	5,3	5,5	—
Бидистиллат	5,659	5,5	5,3	5,5	—

формирующихся из молекул гистидина и воды; эти кластеры образуют суспензию в растворе и остаются на поверхности при выпаривании. Все наблюдаемые структуры островковые, подобные тем, что получались из разбавленных растворов хлорида натрия, но непохожи на структуры, возникающие из концентрированного раствора NaCl. Фрактальный объем этих наноструктур уменьшается с 2,29 для 10^{-2} M раствора до 2,13 для 10^{-3} M и до 2,04 для 10^{-5} M раствора. Такое количественное изменение очень близко к наблюдающемуся для структур из разбавленных растворов хлорида натрия. Высота этих наноструктур составляет около 200 нм независимо от количества гистидина в растворе.

Наконец, двумя способами мы измеряли pH разбавленных аминокислотных растворов: с использованием pH-метра Accument 20 (его чувствительность 0,001 единиц pH) и с помощью индикаторной бумаги марок EM9582, EM9586 или 9587 и EM9590 (точность определения pH от 0,2 до 0,5 единиц pH). Отметим, что бумага EM 9582 предназначена для узкой области pH и особенно пригодна для определения pH растворов низкой концентрации. Три значения pH, полученные с использованием индикаторной бумаги всех марок, практически равны для каждой аминокислоты, но отличаются от значений, полученных на pH-метре. Результаты этих измерений представлены в табл. 2. Как видно из данных табл. 2, значения ΔpH для всех исследованных растворов гораздо выше 0,5 единиц pH, а иногда превышают единицу pH. Мы считаем эту разницу в pH значимой и называем ее аномальным значением pH. Происхождение аномального pH можно объяснить, если принять, что в растворах существуют водные кластеры с постоянным дипольным моментом [13]. Доказательством тому служат результаты аналогичных измерений для чистой воды и буферных растворов (табл. 3): в этом случае показания pH-метра хорошо согласуются с показаниями, полученными при использовании pH-бумаги.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Szent-Gyorgy* Perspectives in Biology and Medicine. 1971, p. 239.
2. *Robinson, Zhu S.B., Singh S., Evans M.W.* Water in Biology, Chemistry and Physics. World Scientific. 1996.
3. *Water: A Comprehensive Treatise. V. 1–4. Ed. F. Frank.* New-York: Plenum, 1972.
4. *Debenedetti P.G.* Metastable Liquid, Concepts and Principle. Princeton: University Press, 1996.
5. *Eisenberg D., Kauzmann W.* The Structure and Properties of Water. Oxford University Press, New-York, 1969.
6. *Stillinger F.H.* Science. 1980, v. 209, p. 451.
7. *Schindler T., Berg C., Niedner-Schatterburg G., Bondybey V.E.* Chem. Phys., 1995, v. 201, p. 491.
8. *Liu K., Cruzan J.D., Saybally R.J.* Science, 1996, v. 271, p. 929.
9. *Gruenloh C. J., Carney J. R., Arrington C. A., Zwier T.S., Iredeucks S. Y., Jordon K. D.* Science, 1997, v. 276, p. 1678.
10. *Barbour L.J., Orr G.W., Atwood J.L.* Nature, 1998, v. 393, p. 671.
11. *Buffey I.B., Byers Brown W., Gebbic H.A.* Chem. Phys. Lett., 1988, v. 148, p. 281.
12. *Lo S.Y.* Proceeding of the I International Symposium on Physical, Chemical and Biological Properties of Stable Water [ETM] Cluster. Eds: S.Y. Lo, B. Bonavida. World Scientific, 1998.
13. *Lo S.Y.* Mod. Phys. Lett. B, 1996, v. 10, p. 909.
14. *Lo S.Y., Lo A., Wenchong Li, Tianzhang Lin, Huihua Li, Geng Hi.* Ibid., 1996, v. 10.
15. *Chan K.Y.G., Inal F., Senkan S.* См. ссылку 12, p. 105.
16. *Bonavida B., Gan X.H.* См. ссылку 12, p. 167.
17. *Sinityn A.P., Berson O., Lo S.Y.* См. ссылку 12, p. 207.