

## ВЛИЯНИЕ КВЕРЦЕТИНА, НАНОКРЕМНЕЗЕМА И ОРГАНИЧЕСКИХ РАСТВОРИТЕЛЕЙ НА ГИДРАТАЦИЮ КРАХМАЛА

В.В. Туров, В.М. Гунько, В.Н. Барвинченко, А.А. Турова, А.А. Ругаль,  
П.П. Горбик

*Институт химии поверхности им. А.А. Чуйко НАН Украины  
ул. Генерала Наумова, 17, 03164, Киев-164*

*Методами низкотемпературной  $^1\text{H}$  ЯМР спектроскопии, ЯМР-криопорометрии и квантовохимического моделирования исследовано состояние, структурные характеристики воды, связанной крахмалом, и влияние на них иммобилизованного на поверхности кверцетина, нанокремнезема и органических растворителей (хлороформа и диметилсульфоксида). Установлено, что межфазная вода находится в кластерном состоянии, причем в присутствии слабополярной среды  $\text{CDCl}_3$ , твердая фаза стабилизирует формирование кластеров слабоассоциированной воды (WAW), концентрация которой составляет 3–4% от общей концентрации воды. Без добавок ДМСО вся WAW является сильносвязанной, а в смешанных растворителях часть ее становится слабосвязанной, что свидетельствует о значительной перестройке под влиянием ДМСО структуры связанной воды. ДМСО уменьшает взаимодействие кластеров SAW с поверхностью.*

### Введение

Основными компонентами сырья, используемого для приготовления фитопрепаратов на основе лекарственных растений, являются целлюлоза и крахмал [1 – 6]. Биоактивные вещества входят в состав сырья в виде сложных композиций (которые лишь в наиболее простых случаях могут быть полностью идентифицированы), связанных в супрамолекулярных структурах полисахаридов. Их извлечение осуществляется экстракцией водой или водно-органическими смесями [7–9], в процессе которой возможно изменение структуры биоактивных компонентов, обусловленное окислением кислородом воздуха, изомеризацией, нарушением оптимального соотношения концентраций компонентов или строения некоторого биоактивного комплекса. Перспективным направлением в конструировании фитопрепаратов может стать создание композитов, включающих нативные растительные компоненты и высокодисперсные минеральные адсорбенты-носители, способствующие повышению биоактивности препаратов в результате перевода их в наноструктурированное состояние. Биоактивность таких композитов может зависеть и от особенностей формирования водно-органических кластерных структур на границах раздела, облегчающих транспорт веществ от полисахаридной/оксидной матрицы в слизистую оболочку желудка (кишечника) или ткани кожного покрова [10].

Одним из немногих методов, позволяющих анализировать особенности кластерного строения воды в гетерогенных системах, является  $^1\text{H}$  ЯМР спектроскопия [10–14]. По энергии взаимодействия с окружением (твердой фазой, макромолекулами) вода может быть разделена на сильно- (SBW, изменение энергии Гиббса  $\Delta G < -0,5$  кДж/моль) и слабо- (WBW,  $\Delta G > -0,5$  кДж/моль) связанную, а по структуре водородных связей – на сильно- (химический сдвиг протонов  $\delta_{\text{H}} > 3$  м.д.) и слабо- ( $\delta_{\text{H}} = 1 \dots 2$  м.д.) ассоциированную (соответственно SAW и WAW,) воду [10–12]. Снижение величины  $G$  граничного слоя воды в результате адсорбционных взаимодействий в порах

сопровождается понижением температуры замерзания, а изменение среднего числа водородных связей, приходящихся на каждую молекулу воды ( $n$ ), – к изменению величины  $\delta_H$ . Поскольку при переходе от неассоциированного (газовая фаза или раствор в неполярных растворителях) к тетраординированному состоянию (лед) молекул  $H_2O$  величина  $\delta_H$  изменяется от 1 – 1,4 до 7 м.д., то по ней можно оценить величину  $n$ . Конечно,  $\delta_H$  зависит и от прочности водородных связей (т.е. от переноса электронной плотности, что изменяет тензор экранирования протонов) [15]. Однако измерения показывают, что для воды, растворенной в таких растворителях, как ацетонитрил, ацетон и диметилсульфоксид (ДМСО), характеризуемых разными электроно-донорными свойствами [16], величина  $\delta_H$  возрастает от 2,5 до 3,5 м.д., т.е. не сильно отличается от  $\delta_H$  для димера воды (3,97 м.д., расчет методом GIAO/B3LYP/6-311++G(3df,3pd)). Поэтому можно считать, что независимо от типа центров связывания молекул воды в первом приближении  $\delta_H$  является функцией  $n$ .

При относительно низком уровне гидратации систем вода, образуя кластеры, локализуется в местах с максимальным адсорбционным потенциалом вблизи полярных адсорбционных центров. Большинство систем как минерального, так и органического происхождения являются структурно и энергетически неоднородными. Поэтому строение кластеров воды, адсорбированных на разных центрах поверхности, может существенно отличаться. Если скорость молекулярного обмена воды, входящей в состав разных кластеров, меньше времени поперечной релаксации ядерных спинов (условие медленного обмена в шкале времени ЯМР [17]), то сигналы молекул воды, образующих эти кластеры, будут регистрироваться в спектрах отдельно с химическими сдвигами, зависящими от числа  $n$  и других условий, например, полярности и поляризуемости центров адсорбции. Таким образом, наличие в  $^1H$  ЯМР спектрах нескольких сигналов воды указывает на формирование разных типов кластеров, находящихся в разном окружении. Использование метода ЯМР-криопорометрии позволяет оценить структурные особенности этого окружения (например, распределение пор по размерам), а теоретические расчеты ЯМР спектров – более детально интерпретировать экспериментальные данные [10,12].

Цель настоящей работы – изучение методами низкотемпературной  $^1H$  ЯМР спектроскопии, ЯМР-криопорометрии и квантовой химии гидратации крахмала (St), влияния на нее слабополярных (хлороформ ( $CDCl_3$ )) и полярных (ДМСО) растворителей, условий перехода воды, связанной крахмалом, в кластерное состояние, влияния взаимодействия биомакромолекул с природным антиоксидантом – кверцетином (Qc) и нанокремнеземом А-300.

## Материалы и методы исследований

Использовали St (Fluka), содержащий в исходном сухом состоянии около 0,03 г воды, и дейтерированные растворители:  $CDCl_3$  и ДМСО (Aldrich) квалификации «для ЯМР спектроскопии» при содержании D не менее 99,5 %, что облегчало анализ  $^1H$  ЯМР спектров связанной воды.

Адсорбцию Qc осуществляли методом импрегнирования St водно-спиртовым раствором Qc (с последующей сушкой при 60 °C), что обеспечивало содержание Qc 5 % по отношению к сухому St. Нанокремнезем А-300 (удельная поверхность 297 м<sup>2</sup>/г, Калушский опытно-экспериментальный завод Института химии поверхности им. А.А. Чуйка) перед приготовлением образцов прокаливали при 400 °C в течение 4 ч. Композиты на основе St и А-300 готовили путем гомогенизации водной суспензии St и А-300 (20:1), которую высушивали при 70 °C в течение 6 ч.

**$^1H$  ЯМР спектроскопия.** Спектры снимали на ЯМР спектрометре высокого разрешения Varian Mercury 400 с рабочей частотой 400 МГц при 90° зондирующем

импульсе длительностью 2 мкс. Для предотвращения переохлаждения связанной воды спектры  $^1\text{H}$  ЯМР записывали при нагревании образцов, предварительно охлажденных до 200 К. Температуру образцов регулировали, используя термоприставку Bruker VT-1000, с точностью  $\pm 1$  К. Интегральные интенсивности сигналов определяли с точностью  $\pm 10\%$ .

Определение характеристик связанной воды с помощью  $^1\text{H}$  ЯМР спектроскопии подробно изложено ранее [10–14]. Эта методика базируется на сильном влиянии поверхности твердого тела либо полимеров на температуру фазового перехода связанной воды в лед. Свободная энергия льда с понижением температуры изменяется практически по линейному закону в использованном температурном диапазоне [18]. Изменение свободной энергии Гиббса ( $\Delta G$ ) и температура фазового перехода связаны соотношением:

$$\Delta G = -0,036(273,15 - T) \quad (1)$$

Температурная зависимость концентрации незамерзающей связанной воды  $C_{uw}(T)$  может быть определена путем сравнения интегральных интенсивностей сигнала воды до и после замораживания (размораживания) исследуемого образца и образца сравнения с известной концентрацией воды. Площадь, ограниченная графиком  $\Delta G(C_{uw})$ , полученным из сопоставления двух температурных функций  $\Delta G(T)$  и  $C_{uw}(T)$ , определяет величину межфазной энергии ( $\gamma_s$ ), которая равна модулю суммарного понижения свободной энергии связанной воды, обусловленному эффектами на границах раздела фаз:

$$\gamma_s = K \int_0^{C_{uw}^{\max}} \Delta G dC_{uw}, \quad (2)$$

где  $C_{uw}^{\max}$  – концентрация незамерзающей воды при  $T = 273$  К, а  $K$  – размерный коэффициент ( $K = 1/18$  при  $\gamma_s$  в Дж/г).

На зависимостях  $\Delta G(C_{uw})$  обычно могут быть выделены участки, относящиеся к слабосвязанной (WBW) и сильносвязанной (SBW) воде. WBW соответствует той части воды, которая не замерзает при  $250 < T < 273$  К, свободная энергия которой лишь незначительно понижена в результате адсорбционных взаимодействий с поверхностью адсорбентов или биополимеров. SBW не замерзает при  $T < 250$  К [10,11]. Количественные (концентрации SBW ( $C_{uw}^s$ ) и WBW ( $C_{uw}^w$ )) и энергетические (изменения свободной энергии  $\Delta G^s$  и  $\Delta G^w$  для SBW и WBW соответственно) характеристики связанной воды могут быть получены экстраполяцией соответствующих линейных участков функции  $\Delta G(C_{uw})$  к осям координат.

Расчеты методом ЯМР-криопорометрии выполнены по методологии, описанной ранее [10,11], с использованием соотношения Гиббса–Томсона, согласно которому снижение температуры замерзания ( $\Delta T$ ) связанной воды обратно пропорционально радиусу ( $R$ ) цилиндрических пор:  $\Delta T = k/R$ , где  $k$  – константа.

Теоретические расчеты ЯМР спектров методами *ab initio* или DFT требуют адекватных базисных наборов (не хуже чем 6-31G(d,p)) и соответствующих молекулярных или кластерных моделей. В случае биоактивных молекул, которые взаимодействуют с водой и поверхностью адсорбента, модельные системы включают 1–2 тысячи атомов. Для расчетов ЯМР спектров необходимо полностью оптимизировать геометрию этих систем, что является сложной задачей, лобовое решение которой возможно только с использованием суперкомпьютеров. Эта задача была решена с использованием упрощенного подхода, который предполагал: 1) расчет ЯМР спектров для малых систем методом GIAO/B3LYP/6-31G(d,p) (Gaussian 03 [19]); 2) расчет тех же систем методом PM3 [19, 20] (который хорошо воспроизводит строение водородных связей); 3) нахождение корреляционной зависимости химического сдвига протонов

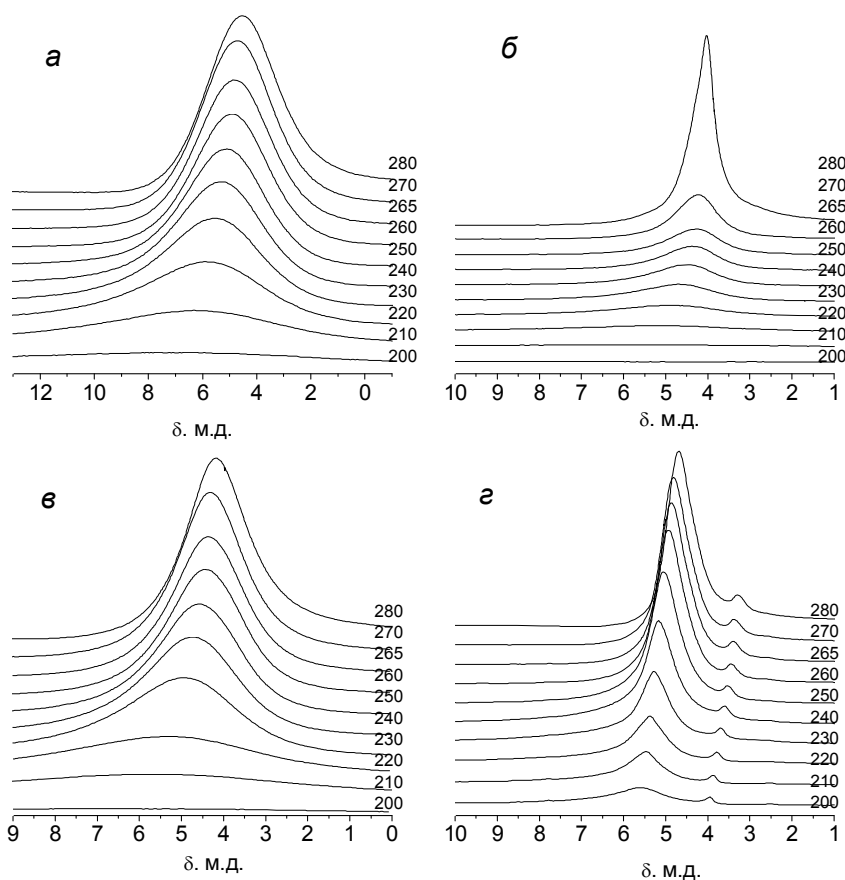
(GIAO [19]) от зарядов на атомах  $q_H$  (PM3) как  $\delta_H = a + bq_H$  (величины  $a$  и  $b$  постоянные только для однопольных систем), например,  $\delta_{H,w} = -19.1372 + q_H \cdot 95.27608$  (м.д.) для свободных кластеров воды до  $12H_2O$ ; или  $\delta_{H,w} = -18.81135 + q_H \cdot 92.83742$  (м.д.) для воды при адсорбции водно-метановых смесей на полимерном адсорбенте; 4) расчет больших системы с оптимизацией геометрии методом PM3; 5) расчет величин  $\delta_H$  по корреляционному уравнению; 6) расчет модельных спектров (функций распределения  $f(\delta_H)$  величин химического сдвига протонов) с использованием гауссовских функций и параметров дисперсии пиков из экспериментальных ЯМР данных (или теоретических оценок) по уравнению

$$f(\delta_H) = (2\pi\sigma^2)^{-0.5} \sum_j \exp[-(\delta_j - \delta_H)^2 / 2\sigma^2], \quad (3)$$

где  $j$  – номер атома Н в системе,  $\sigma^2$  – дисперсия распределения,  $\delta_j$  – химический сдвиг  $j$ -го атома Н. Такой подход позволил достаточно надежно рассчитывать модельные ЯМР  $^1H$ -спектры сложных систем для более детального анализа и интерпретации экспериментальных ЯМР спектров. В рамках этого подхода можно исследовать и влияние жидкой среды (водной или органической) на ЯМР спектры.

### Результаты и обсуждение

На рис. 1 приведены  $^1H$ ЯМР спектры воды, связанной в гидратированных порошках (рис. 1, а, в, г) и заваренном геле St (рис. 1, б), снятые в температурном диапазоне 200 – 280 К. Спектры представляют собой уширенный одиночный сигнал с химическим сдвигом  $\delta_H$  в диапазоне 4,5–6,5 м.д.

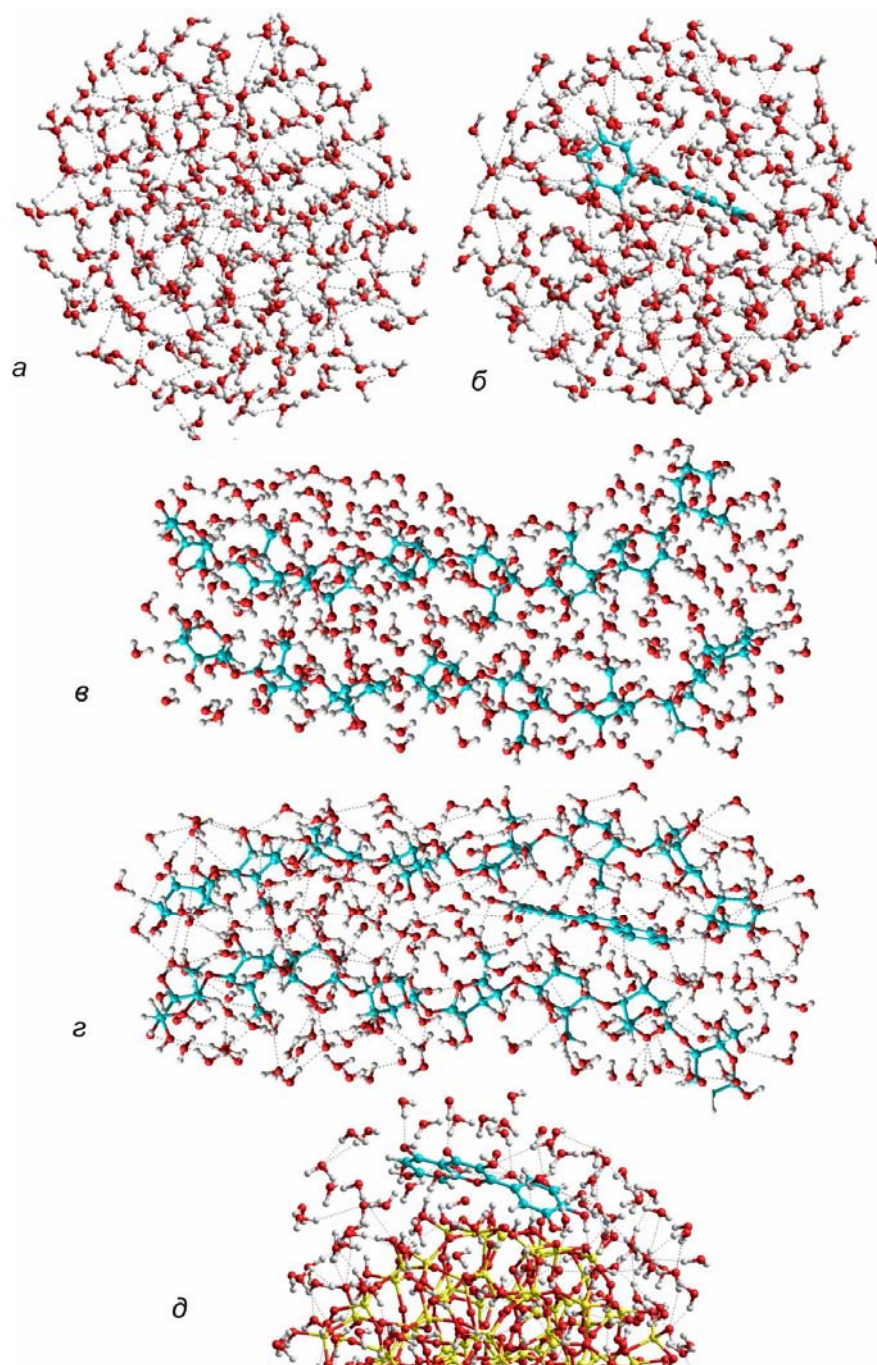


**Рис. 1.** Спектры  $^1H$  ЯМР незамерзающей воды в гидратированных порошках ( $h = 0,3$  г/г) (а, в, г, в заваренном геле ( $h = 1$  г/г) (б), в среде  $CDCl_3$  (в) и  $CDCl_3/DMCO$  (2:1) (г). Температура указана в К.

Полученные значения  $\delta_H$  близки к химическим сдвигам жидкой воды и соответствуют  $n = 2,5 \dots 3$ . С понижением температуры интенсивность сигнала уменьшается вследствие частичного вымораживания связанной воды, а химический сдвиг увеличивается в результате большего влияния поверхности на более близкие к ней молекулы воды (т.е. характеризующиеся большей поляризацией, что соответствует снижению электронного экранирования протонов и сдвигу сигнала в слабое поле). Среда  $\text{CDCl}_3$  (рис. 1, *в*) слабо влияет на форму спектров воды. При использовании смеси  $\text{CDCl}_3/\text{DMCO}$  (2:1) (рис. 1, *з*) в спектрах появляется дополнительный сигнал воды при  $\delta_H = 3,5 \dots 4$  м.д., обусловленный Н-комплексами  $\text{HO}\cdots\text{H}\cdots\text{O}=\text{S}(\text{CH}_3)_2$  для воды, растворенной в смеси органических растворителей. Эти комплексы сольватированы органическими молекулами, что обуславливает при понижении температуры некоторое смещение сигнала протонов воды в область слабых магнитных полей. Интенсивность этого сигнала определяется соотношением свободных энергий связывания воды с St и ее растворения в смеси растворителей. В соответствии с данными рис. 1, *б* для геля St интенсивность сигнала воды при повышении температуры от 270 до 280 К изменяется не более чем вдвое. Это свидетельствует о сильном связывании воды макромолекулами, обусловленном наличием в них большого количества гидроксильных групп, образующих прочные Н-связи (рис. 2).

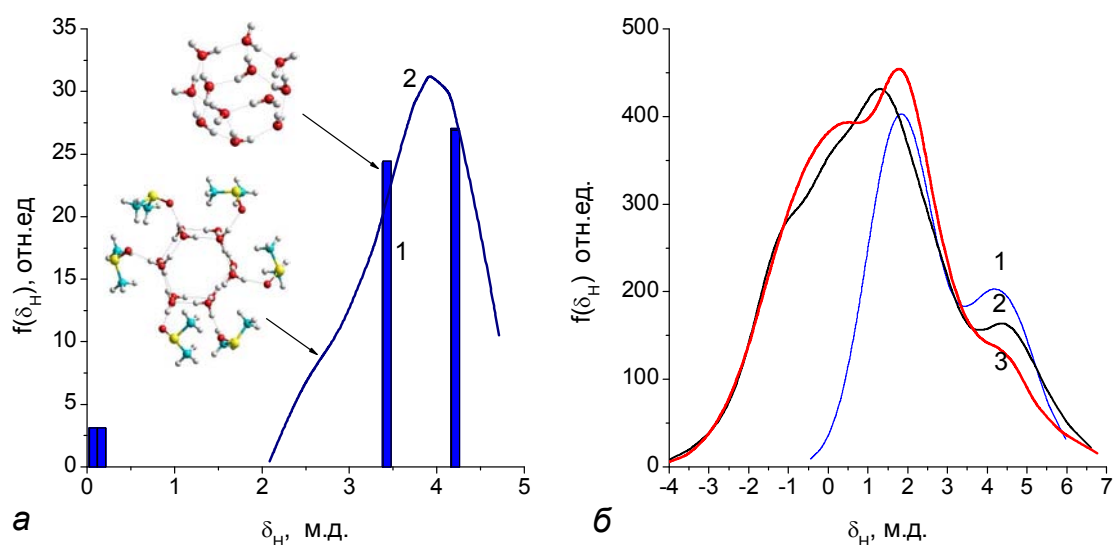
Теоретические расчеты  $^1\text{H}$  ЯМР спектров сложных систем (рис. 2) по методике, описанной выше, показывают, что происходит уширение спектров нанодоменов воды в присутствии  $\text{DMCO}$ ,  $\text{Qc}$  или  $\text{St}$  (рис. 3). В целом изменение ближнего порядка (например, длин Н-связей, рис. 4) при попадании одной молекулы  $\text{Qc}$  в нанодомен из 275 молекул воды незначительно, поскольку первый (O–H при 0,095 нм) и второй пики (O $\cdots$ H в области 0,17 нм, рис. 4) идентичны для систем, показанных на рис. 2, *а* и *б*. Однако наблюдается некоторое изменение строения нанодомена в целом, что отражается на последующих пиках распределения  $f(R_{\text{OH}})$ . Это видно и при сравнении структур, показанных на рис. 2, *а* и 2, *б* – для последнего нанодомена упорядоченность снижается. В случае гидратированных фрагментов амилозы (рис. 2, *в* и *з*) эффект появления одной молекулы  $\text{Qc}$  заметен по изменению распределения  $f(\delta_H)$  (рис. 3, *б*). Следовательно, строение воды является весьма чувствительным даже к небольшим концентрациям растворенных веществ.

На рис. 5 показаны рассчитанные на основании спектральных характеристик воды в соответствии с методикой, описанной ранее [10, 11], температурные зависимости концентрации SAW ( $C_{\text{SAW}}(T)$ ) (рис. 5, *а*), химического сдвига SAW (рис. 5, *з*), изменения концентрации SAW, обусловленные присутствием органического растворителя (рис. 5, *б*), и соотношение между величинами  $\Delta G$  и  $C_{\text{SAW}}$ . Соответствующие характеристики суммированы в таблице. Как видно из данных рис. 5, среда оказывает значительное влияние на состояние SAW в гидратированных порошках St, которое наиболее наглядно проявляется в температурных зависимостях разницы интенсивностей сигнала SAW в присутствии и в отсутствие органической компоненты ( $\Delta C = C_{\text{SAW},o} - C_{\text{SAW},0.3}$ ). Слабополярный  $\text{CDCl}_3$  при  $T < 240$  К уменьшает взаимодействие SAW с крахмалом ( $\Delta C < 0$ ). Максимальный эффект наблюдается при 220 К (рис. 5, *б*). В среде смешанных растворителей в разных диапазонах температур величина  $\Delta C$  может принимать как отрицательные, так и положительные значения. Понижение  $\Delta C$  при  $T > 260$  К обусловлено частичным переходом воды из адсорбированного в растворенное состояние. Присутствие органической среды несколько уменьшает величину химического сдвига SAW (рис. 5, *з*). В среде хлороформа он скачкообразно уменьшается на 0,5 м.д. при слабом изменении угла наклона зависимости  $\delta(T)$  к оси ординат.

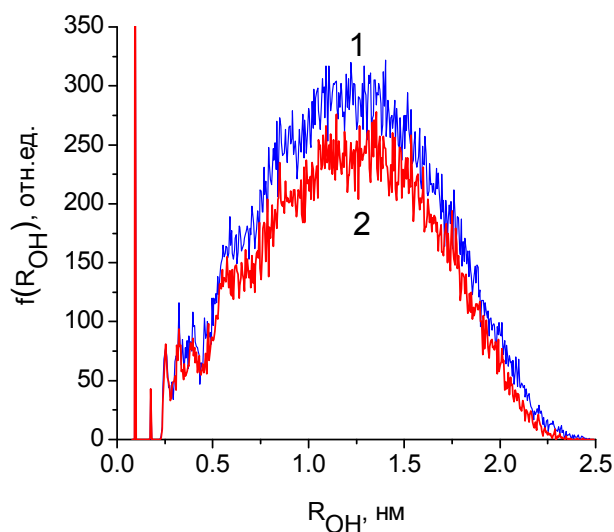


**Рис. 2.** Модельные системы, использованные в квантовохимических расчетах: нанодомен воды (275  $\text{H}_2\text{O}$ ) (а), тот же домен с молекулой Qc (б), два гидратированных фрагмента St (амилозы) (в) плюс молекула Qc (г) и молекула Qc, взаимодействующая с наночастицей гидратированного А-300 (д).

В среде смешанных растворителей уменьшается тангенс угла, образованного зависимостью  $\delta(T)$  и осью температур. Следует отметить, что в отличие от  $\Delta C$  энергия  $\gamma_S$  для изученной серии образцов изменяется слабо. Это обусловлено сложным видом зависимости  $\Delta G(C_{uw})$ .

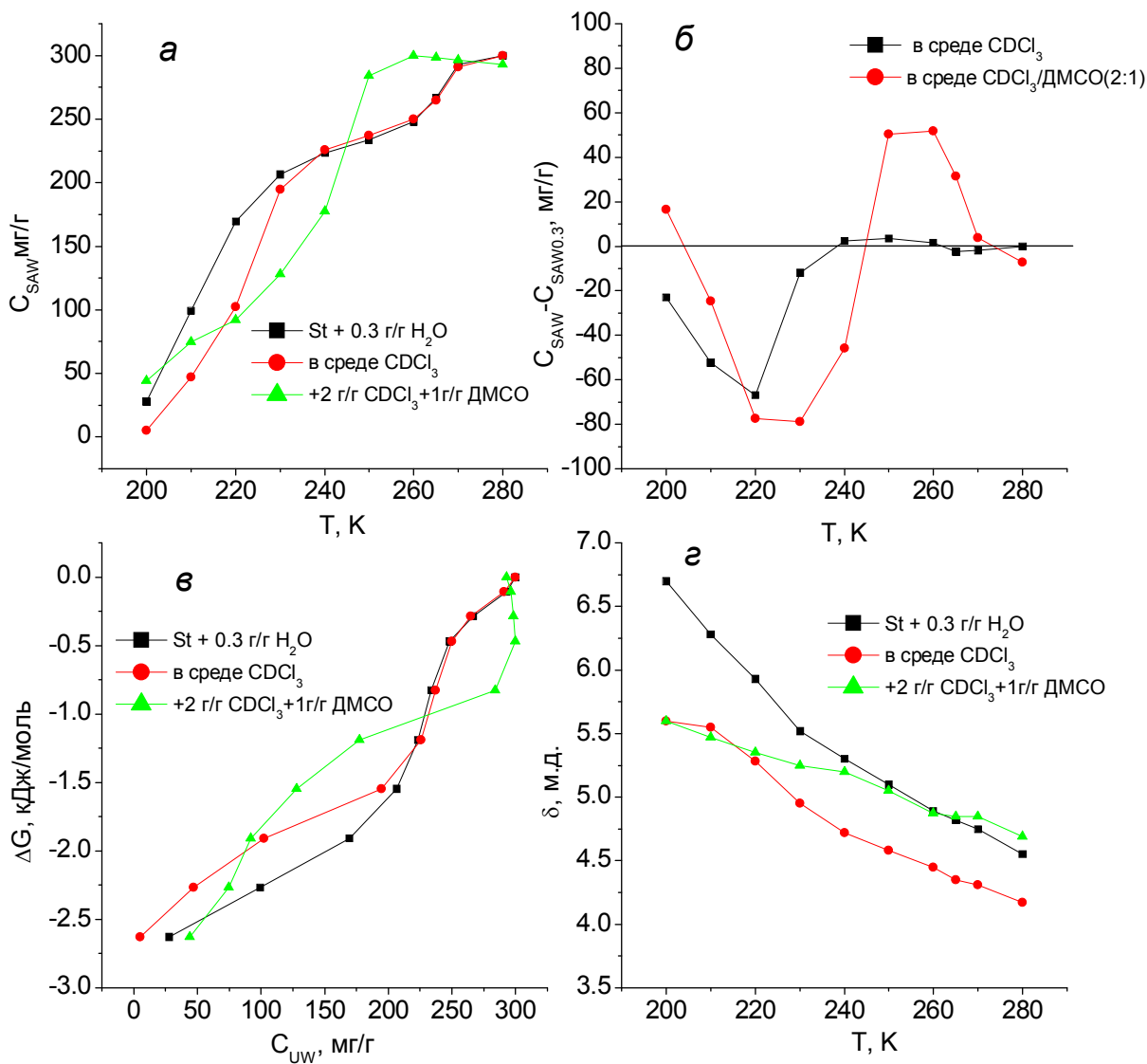


**Рис. 3.** Величины  $\delta_H$  для молекул воды в кластере  $12H_2O$  (1) и распределение  $f(\delta_H)$  для  $12H_2O*6((CH_3)_2SO)$  (только для воды) (2) (метод GIAO/B3LYP/6-31G(d,p)//6-31G(d,p)) (а) и распределения  $f(\delta_H)$  для нанодомена с молекулой Qc (кривая 1, рис. 2, б), гидратированных фрагментов крахмала (2, рис. 2, в) плюс Qc (3, рис. 2, з), рассчитанные по корреляционной зависимости (геометрия оптимизирована методом PM3).



**Рис. 4.** Распределение длин связей O–H и O...H в нанодомене воды (кривая 1, рис. 2, а) плюс Qc (2, рис. 2, з) (PM3 геометрия).

Полученные результаты могут быть объяснены тем, что SAW в гидратированных порошках St находится в виде доменов. Среднее число водородных связей, в которых принимает участие каждая молекула воды, близко к таковому для жидкой воды ( $n = 2,5 \dots 3$ ). С полисахаридными структурами эти кластеры связаны прочными H-связями. В пространстве между кластерами воды вблизи биомолекул (рис. 2) могут локализоваться молекулы  $CDCl_3$ . При этом взаимодействие водных кластеров с полимером, как и упорядоченность супрамолекулярной системы St/вода, может уменьшаться. Понижение температуры способствует усилению адсорбционных взаимодействий молекул  $CDCl_3$ , что приводит к ослаблению взаимодействий вода–St. В результате максимальное ослабление взаимодействия воды с крахмалом регистрируется при 220 К.



**Рис. 5.** Влияние органических растворителей на содержание сильноассоциированной воды (а и б), изменение ее химического сдвига (в) и свободной энергии Гиббса (з) в гидратированных порошках St.

Положительные значения  $\Delta C$  в присутствии ДМСО свидетельствуют об увеличении энергии взаимодействия SAW с St (и ДМСО), которое может быть обусловлено дроблением доменов адсорбированной воды, формированием кластеров вода/ДМСО и переходного слоя, обогащенного молекулами ДМСО, образующими водородные связи с периферийными молекулами воды в доменах и кластерах, несвязанными с гидроксильными группами биополимера.

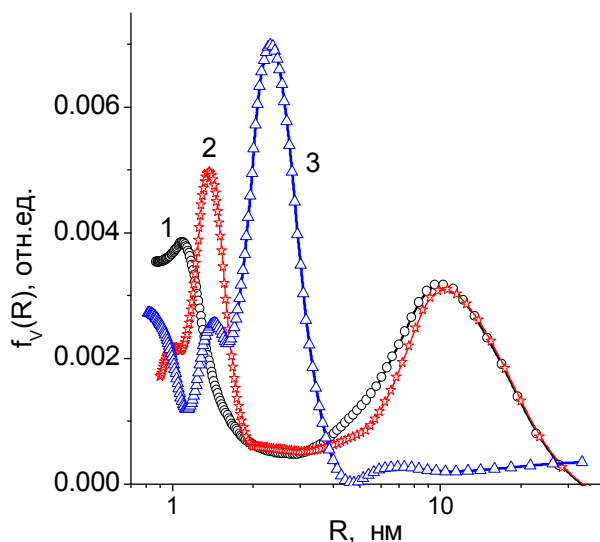
Изменение взаимодействия воды с St под влиянием органического растворителя соответствует изменению параметров заполненных водой полостей или соответствующих размеров кластеров и доменов воды, локализованных там (рис. б).



**Таблица 1.** Характеристики воды, связанной в порошках St и композитных системах на основе St, Qc и A-300.

| Образец | Твердая фаза | $C_{H_2O}$ ,<br>г/г | $C_{CDCl_3}$<br>г/г | $C_{DMCO}$ ,<br>г/г | $-ΔG^s$ ,<br>кДж/моль | $C^s$ ,<br>мг/г | $C^w$ ,<br>мг/г | $γ_s$ ,<br>Дж/г | $S$ ,<br>м <sup>2</sup> /г | $S_{мик}$<br>м <sup>2</sup> /г | $S_{мез}$<br>м <sup>2</sup> /г | $V_{мик}$<br>см <sup>3</sup> /г | $V_{мез}$<br>см <sup>3</sup> /г |
|---------|--------------|---------------------|---------------------|---------------------|-----------------------|-----------------|-----------------|-----------------|----------------------------|--------------------------------|--------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|
| 1       | St           | 0,3                 | -                   | -                   | 2,75                  | 240             | 60              | 29,3            | 182                        | 145                            | 37                             | 0,068                           | 0,226                           |
| 2       | St           | 0,3                 | 4,5                 | -                   | 2,67                  | 240             | 60              | 26,6            | 100                        | 57                             | 43                             | 0,027                           | 0,265                           |
| 3       | St           | 0,3                 | 2                   | 1                   | 2,98                  | 280             | 0               | 27,6            | 206                        | 142                            | 64                             | 0,064                           | 0,232                           |
| 4       | St           | 1                   | -                   | -                   | 2,49                  | 250             | 250             | 29,3            | 57                         | 24                             | 31                             | 0,012                           | 0,438                           |
| 5       | St+Qc        | 1,5                 | -                   | -                   | 2,45                  | 360             | 440             | 38,4            | 51                         | 2                              | 45                             | 0,001                           | 0,655                           |
| 6       | St+Qc        | 1,5*                | -                   | -                   | 2,28                  | 260             | 380             | 30,5            | 48                         | 0                              | 44                             | 0                               | 0,655                           |
| 7       | St+Qc+A-300  | 2,3                 | -                   | -                   | 2,45                  | 370             | 580             | 47,7            | 72                         | 0                              | 66                             | 0                               | 0,946                           |
| 8       | St+Qc+A-300  | 0,1                 | -                   | -                   | 2,66                  | 85              | 15              | 8,3             | 25                         | 11                             | 14                             | 0,005                           | 0,094                           |
| 9       | St+Qc+A-300  | 0,2                 | -                   | -                   | 2,72                  | 200             | 0               | 19,5            | 77                         | 39                             | 38                             | 0,018                           | 0,185                           |
| 10      | St+Qc+A-300  | 0,2                 | 4,5                 | -                   | 2,70                  | 190             | 0               | 19,2            | 65                         | 41                             | 24                             | 0,019                           | 0,171                           |
| 11      | St+Qc+A-300  | 0,2                 | 3                   | 0,5                 | 3,02                  | 120             | 45              | 11,3            | 61                         | 37                             | 25                             | 0,015                           | 0,149                           |
| 12      | St+Qc+A-300  | 0,2                 | 3                   | 1                   | 3,30                  | 150             | 30              | 16,1            | 149                        | 135                            | 14                             | 0,053                           | 0,089                           |

\*После кипячения образца в течение 3 мин.

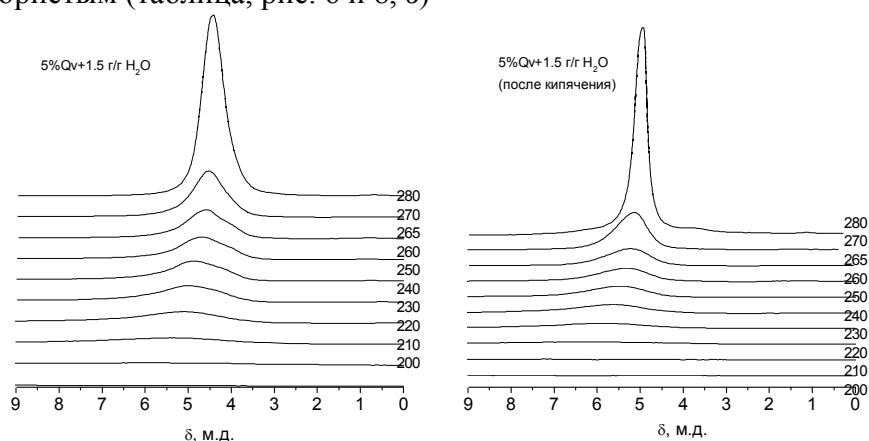


**Рис. 6.** Распределение по размерам водных структур в гидратированных порошках St и влияние на него органических растворителей: (1)  $h = 0,3$  г/г  $H_2O$ , (2) в  $CDCl_3$  и (3)  $CDCl_3/DMCO$  (2:1) при той же величине  $h$ .

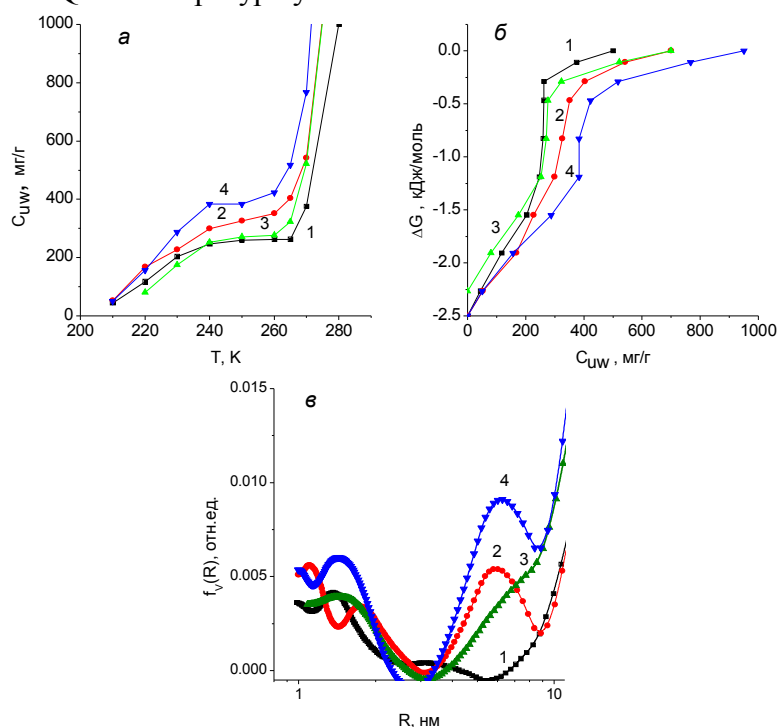
В порошке St при  $h = 0,3$  г/г вода сосредоточена в структурах с достаточно широким распределением пор по размерам (рис. 6, кривая 1): максимумы распределения отвечают структурам с радиусом 1 и 10 нм. При этом около 23 % воды сосредоточено в порах радиусом менее 1 нм. Среда  $CDCl_3$  практически не влияет на параметры больших доменов воды (рис. 6, пики при 10 нм на кривых 1 и 2 совпадают), поскольку хлороформ с водой не смешивается в объеме, но приводит к перераспределению кластеров малых размеров и смещению первого пика на 0,5 нм. По-видимому, сказывается взаимодействие  $CDCl_3$  с St. Еще больше указанное смещение проявляется в среде смешанных растворителей ( $CDCl_3+DMCO$ ), которые могут взаимодействовать более сильно как с St, так и с водой по сравнению с индивидуальным  $CDCl_3$ . При этом наблюдается рост количества наиболее малых кластеров при  $R < 1$  нм (таблица), поверхность ( $S_{\text{мик}}$ ) и объем ( $V_{\text{мик}}$ ) микропор, заполненных связанной водой, растут и имеем три пика  $f_v(R)$  при  $R = 0,8, 1,4$  и  $2,3$  нм. Подобное усложнение строения водных структур наблюдали при взаимодействии водно-органических смесей с углеродными, полимерными и оксидными адсорбентами [10].

Qc плохо растворим в воде, поэтому он не переходит в водную среду даже при кипячении. Однако сравнение спектров воды (рис. 7, а, б) показывает, что после кипячения образца спектральные характеристики связанной воды существенно изменяются. Сигнал воды при 280 К сужается и появляется слабоинтенсивный сигнал WW при  $\delta = 4$  м.д., который исчезает при  $T < 250$  К. Межфазная энергия  $\gamma_s$  уменьшается примерно на 20 % (таблица), что обусловлено уменьшением количества как сильно-, так и слабосвязанной воды. Следовательно, в процессе импрегнирования St Qc происходит перестройка полисахаридной матрицы, влияющая на характеристики системы при гелеобразовании. Вязкость образца после кипячения не увеличивается (т.е. существенного разворачивания макромолекул не происходит) и после нагревания сохраняется опалесценция, которая свидетельствует о наличии крупных (микронного размера) зерен St. Уменьшение концентрации связанной воды при кипячении может быть обусловлено процессами, вызванными адсорбцией молекул Qc в зазорах между биополимерными цепями (рис. 2), т.е. часть воды вытесняется в объемную фазу. На графиках  $\Delta G(C_{uw})$  имеются вертикальные участки (рис. 8), обусловленные отсутствием замерзания связанной воды в широком диапазоне температур. Такой вид зависимостей характерен для микро- или мезопористых твердых тел [10, 21]. Аналогичные формы зависимостей  $\Delta G(C_{uw})$  были получены ранее для водных суспензий или гелей St и

микрористаллической целлюлозы [22–24]. Изученные системы также относятся к микро/мезопористым (таблица, рис. 6 и 8, в)

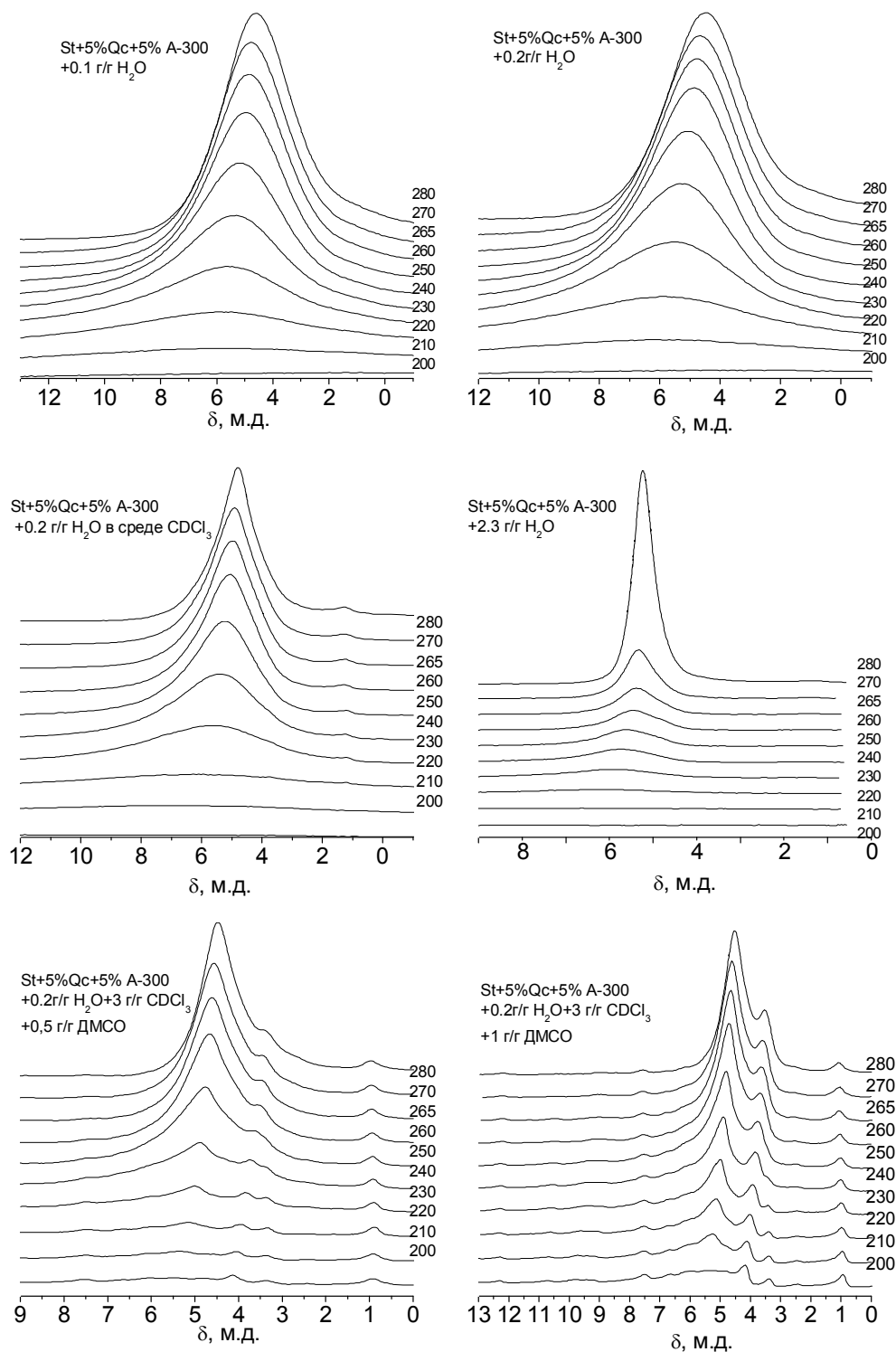


**Рис. 7.** Температурные изменения спектров  $^1\text{H}$  ЯМР воды в водных суспензиях St, импрегнированного Qc. Температура указана в К.



**Рис. 8.** Температурные зависимости концентрации незамерзающей воды в гидратированном крахмале при  $h = 1$  г/г (1), St, импрегнированного Qc при  $C_{Qc} = 0,05$  % (кривые 2–4) при  $h = 1,5$  г/г (кривые 2 и 3) и 2,3 г/г и 5 % А-300 (4) (а), построенные на их основе зависимости  $\Delta G(C_{uw})$  (б) и распределения по размерам структур связанной воды (в).

Таким образом, гидратация биополимерных молекул в водных концентрированных суспензиях St зависит от многих факторов, в частности от концентрации твердой фазы, наличия адсорбированных веществ и температурной обработки. Полученные сведения о лабильности исследованных систем согласуются с данными для водных суспензий микрористаллической целлюлозы [21] и St [22,23] с разной концентрацией твердой фазы.



**Рис. 9.** Спектры воды в системах, содержащих St, импрегнированный 5% Qc и A-300 (5%) и органические добавки. Температура указана в К.

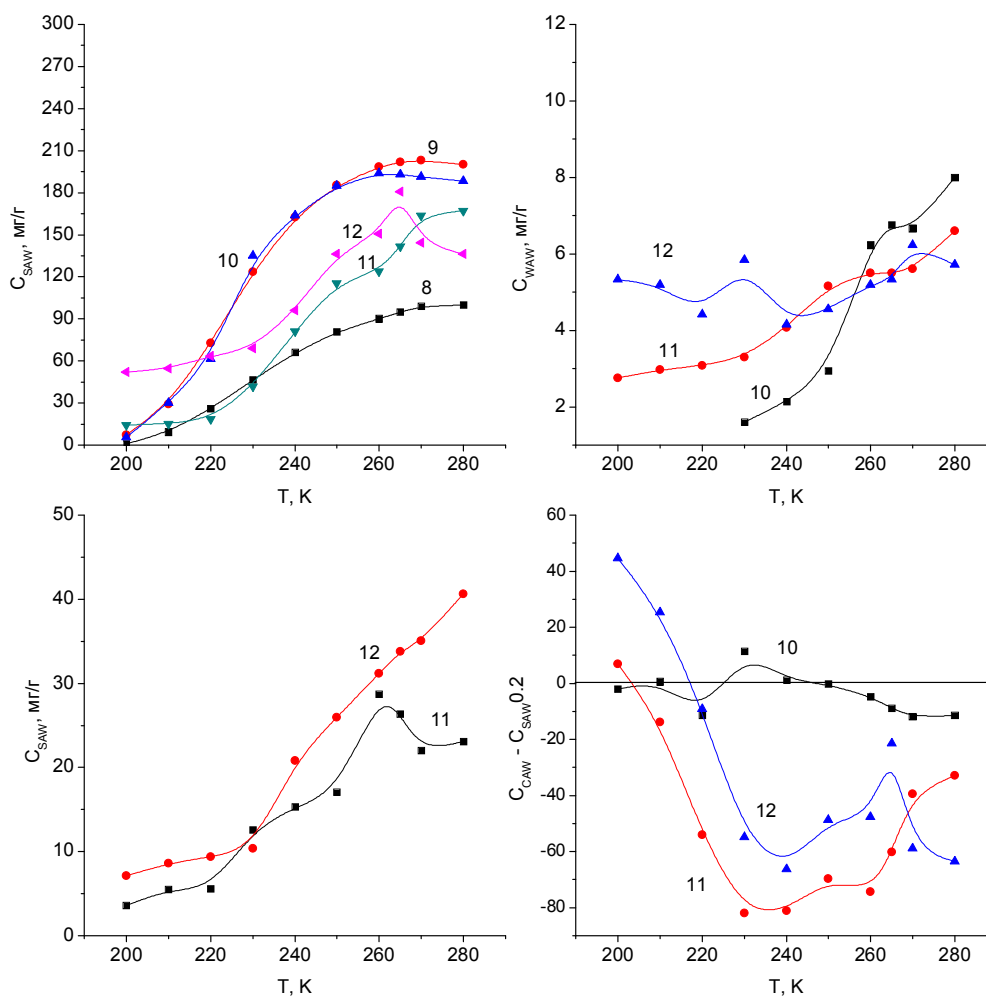
В отсутствие органических растворителей  $^1\text{H}$  ЯМР спектры (рис. 9, а) визуально слабо отличаются от полученных без нанокремнезема (рис. 1, а). Однако в среде  $\text{CDCl}_3$  появляется сигнал WAW с химическим сдвигом  $\delta = 1,3$  м.д (рис. 9, в). При добавлении к системе ДМСО (рис. 9, д, е) интенсивность этого сигнала увеличивается почти вдвое. Одновременно в области  $\delta = 3,5 \dots 4$  м.д. появляются один или два сигнала воды (SAW), растворенной в смеси органических растворителей. Наличие двух сигналов

растворенной воды свидетельствует о наличие двух типов пространственно разделенных водно-органических структур разного состава. С повышением температуры вследствие ускорения молекулярного обмена между этими структурами сигнал растворенной воды усредняется и регистрируется как один сигнал с химическим сдвигом  $\delta = 3,7$  м.д. (т.е. близко к сигналу воды, растворенной в ДМСО). При избытке органических растворителей наличие двух сигналов, относящихся к комплексам типа  $\text{HO}-\text{H}\cdots\text{O}=\text{S}(\text{CD}_3)_2$ , может быть обусловлено возможностью их формирования как в объеме органической среды, так и в нанополостях (рис. 8), образованных частицами нанокремнезема и St. Поскольку с ростом температуры происходит увеличение интенсивности сигнала в более слабых магнитных полях, можно предположить, что именно он отвечает воде, находящейся в объеме жидкой органической фазы.

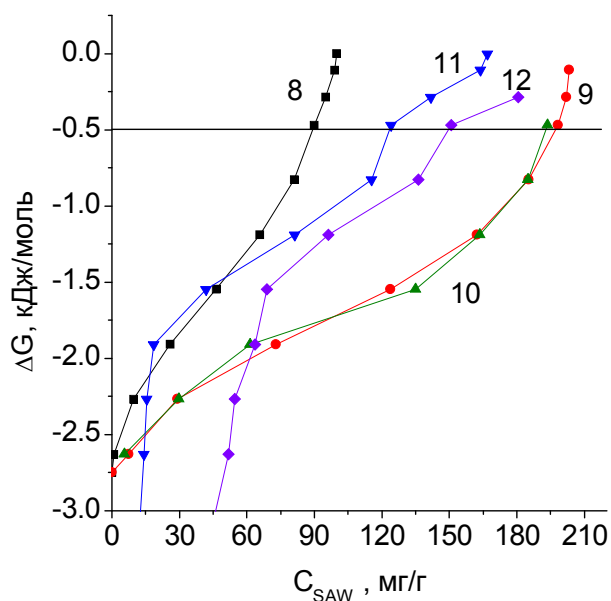
Температурные зависимости интенсивности сигналов SAW, WAW и воды, растворенной в органических растворителях, а также разности концентраций SAW, обусловленной присутствием этих растворителей, зависимость изменения свободной энергии Гиббса от концентрации незамерзающей SAW показывают (рис. 10, таблица), что WAW составляет всего 1–8 % от концентрации SAW. В среде  $\text{CDCl}_3$   $C_{\text{WAW}}$  изменяется относительно слабо и вся WAW является сильносвязанной. Введение ДМСО может как увеличивать, так и уменьшать количество WAW в зависимости от температуры. Уменьшение  $C_{\text{WAW}}$  с понижением температуры показывает, что значительная часть WAW в присутствии ДМСО становится слабосвязанной, т.е. ДМСО вытесняет воду с поверхности твердой фазы.

Среда чистого  $\text{CDCl}_3$  практически не влияет на вид зависимости  $\Delta G(C_{\text{SAW}})$  (рис. 10, а). Некоторое уменьшение концентрации SAW при  $T > 260\text{K}$  обусловлено переходом части воды в слабоассоциированное состояние (рис. 9, в). Смесь хлороформа с ДМСО в целом уменьшает взаимодействие кластеров SAW с поверхностью. Это проявляется, прежде всего, в отрицательных значениях  $\Delta C$  (рис. 10, г). Одновременно должно происходить уменьшение величины межфазной энергии. В соответствии с данными таблицы, для образца, содержащего смесь 4:1  $\text{CDCl}_3/\text{ДМСО}$ , величина  $\gamma_s$  уменьшается на 60 %. Однако с ростом концентрации ДМСО до 1 г/г, несмотря на отрицательные значения  $\Delta C$  в широком температурном интервале, величина  $\gamma_s$  снова возрастает (таблица). Поскольку  $\gamma_s$  является интегральной величиной, в соответствии с данными рис. 10, г ее увеличение следует относить на счет того температурного диапазона, в котором величина  $\Delta C$  положительна. Вероятно, при  $T < 230\text{K}$  термодинамически более выгодным становится формирование кластеров SAW меньшего размера или слоистых кластеров SAW, в которых внешняя оболочка образована водой, обогащенной молекулами ДМСО. Об изменении структуры кластеров воды в присутствии ДМСО свидетельствует и то, что некоторая часть SAW становится слабосвязанной (таблица, рис. 11). Поскольку величина  $\Delta G^s$  характеризует изменение свободной энергии Гиббса в ближайшем к границе раздела монослое воды [10], ее уменьшение для образцов, содержащих ДМСО, может быть вызвано тем, что наряду с кластерами SAW присутствуют кластеры и нанодомены вода/ДМСО, для которых условия вымерзания воды отличаются от условий замерзания исходных кластеров SAW.

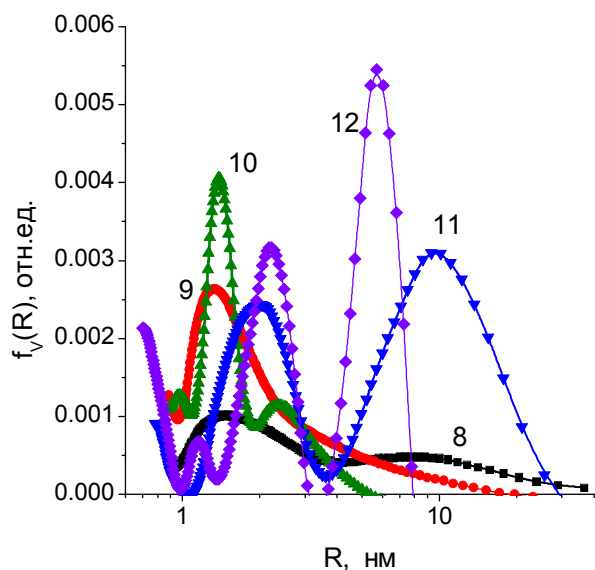
На рис. 12 приведены распределения по размерам структур SAW в смеси порошков St, импрегнированного Qc, и кремнезема, гомогенизированных путем тщательного растирания в фарфоровой ступке содержащих разное количество адсорбированной воды. Измерения проводили на воздухе и в среде органических растворителей. Увеличение концентрации ДМСО приводит к увеличению вклада более мелких кластеров воды. В целом в системах присутствует набор различных структур, что и обуславливает усложнение соответствующих  $^1\text{H}$  ЯМР спектров по сравнению с гидратированным St.



**Рис. 10.** Температурные зависимости концентраций сильно- (а), слабоассоциированной (б) и растворенной в смеси органических растворителей (в) воды, а также изменения концентрации SAW, обусловленного присутствием органической среды для систем содержащих St, импрегнированный Qc (5 %), при 5 % А-300 (номера кривых соответствуют номерам образцов в таблице).



**Рис. 11.** Зависимости изменения свободной энергии Гиббса от концентрации SAW в композитных системах, содержащих St, импрегнированный Qc (5 %), при 5 % А-300 при варьировании содержания воды и органических добавок (номера кривых соответствуют номерам образцов в таблице).



**Рис. 12.** Распределения по размерам водных структур в композитных системах, содержащих St, импрегнированный Qc (5 %), при 5 % А-300 при варьировании содержания воды и органических добавок (номера кривых соответствуют номерам образцов в таблице).

### Выводы

Гидратированные порошки St, как и его гели, могут содержать значительное количество связанной воды, сопоставимое с массой биополимера. Если в порошке St содержится до 30 % воды, то практически вся она является сильно связанной, т.е. замерзает при температуре ниже 250 К. В концентрированном геле St ( $h = 1$  г/г) примерно половина воды остается в почти свободном состоянии (т.е. замерзает вблизи 273 К), а остальная – поровну распределяется между структурами сильно- и слабосвязанной воды.

Гидратированность St сложным образом зависит от концентрации твердой фазы, что обусловлено сильными взаимодействиями между его частицами, процессами набухания и разворачивания макроцепей амилозы и амилопектина. При импрегнировании St кверцетином (полифенолом растительного происхождения) гидратированность частиц St увеличивается, что, вероятно, обусловлено дополнительным разупорядочением супрамолекулярной структуры St. При  $T > 250$  К среда  $CDCl_3$  слабо влияет на взаимодействие воды ( $h = 0,3$  г/г) с поверхностью частиц St, а при более низких температурах взаимодействие воды с полисахаридными структурами сильно уменьшается. Это обусловлено кластерным и доменным строением воды и возможностью встраивания молекул слабополярной компоненты в зазоры между кластерами воды и поверхностью кремнезема или макромолекулами St. В случае смеси  $CDCl_3$  с ДМСО часть адсорбированной воды переходит в раствор, образуя прочные H-связи с молекулами ДМСО, и ее строение существенно изменяется за счет формирования кластеров и доменов в широком диапазоне размеров.

Для композитных систем, включающих St и нанокремнезем, в присутствии слабополярной среды  $CDCl_3$ , твердая фаза стабилизирует формирование кластеров WAW, концентрация которой составляет 3–4% от концентрации SAW. Без добавок ДМСО вся WAW является сильно связанной, а в смешанных растворителях часть ее становится слабосвязанной, что свидетельствует о значительной перестройке под влиянием ДМСО структуры связанной воды. ДМСО уменьшает взаимодействие кластеров SAW с поверхностью. При этом часть ее переходит в растворенное состояние и при низких температурах возможна раздельная регистрация сигналов воды, растворенной в объеме ДМСО и находящейся в наноразмерных полостях, образованных частицами твердой фазы.

*Авторы благодарны УНТЦ (грант № 3832) за финансовую поддержку.*

## **Литература**

1. Hatakeyama H., Hatakeyama T. Interaction between water and hydrophobic polymers // *Termochim. Acta.* – 1998. – V. 308. – P. 3 – 22.
2. Heiner A.P., Teleman O. Interaction between monoclinic crystalline cellulose and water: breakdown of the odd/even duplicity // *Langmuir.* – 1997. – V. 13, № 3. – P. 513 – 518.
3. Levis S.R., Deasy P.B. Production and evaluation of size reduced grades of microcrystalline cellulose // *Int. J. Pharm.* – 2001. – V. 213. – P. 13–24.
4. Beery K.E., Ladisch K.E. Chemistry and properties of starch based desiccants. // *Enz. Microb. Technol.* – 2001. – V. 28. – P. 573–581.
5. Katopo H., Song Y., Jane J.-L. Effect and mechanism of ultrahigh hydrostatic pressure on the structure and properties of starch // *Carbohydrate Polym.* – 2002. – V. 47. – P. 233–244.
6. Szymonska J., Krok F. Potato starch granule nanostructure studied by high resolution non-contact AFM // *Int. J. Biol. Macromol.* – 2003. – V. 33. – P. 1–7.
7. Иванова С.А., Вайнштейн В.А., Каухова И.Е. Особенности массопереноса липофильных БАВ при экстрагировании сырья двухфазной системой экстрагентов // *Хим.-фарм. журн.* – 2003. – Т. 37, №8. – С.30–33.
8. Способ приготовления и фармакологические свойства настойки из листьев женьшеня / С.А. Минина, А.Б. Легостева, Н.В. Сыровежко, Н.Е. Тушина и др. // *Хим.-фарм. журнал.* – 2000, №9. – С. 31– 37.
9. Минина С.А., Каухова И.Е. Химия и технология фитопрепаратов. – М., Наука. – 2004. – 560 с.
10. Гунько В.М., Туров В.В., Горбик П.П. Вода на межфазной границе – К.: Наук. думка, 2009. – 694 с.
11. Turov V.V., Leboda R. Application of <sup>1</sup>H NMR spectroscopy method for determination of characteristics of thin layers of water adsorbed on the surface of dispersed and porous adsorbents // *Adv. Coll. Interf. Sci.* – 1999. – V. 79. – P. 173 – 211.
12. Unusual properties of water at hydrophilic/hydrophobic interfaces / V.M. Gun'ko, V.V. Turov, V.M. Bogatyrev, V.I. Zarko, R. Leboda, E.V. Goncharuk, A.A. Novza, A.V. Turov, A.A. Chuiko // *Adv. Coll. Interf. Sci.* – 2005. – V. 118. – P. 125 – 172.
13. A method for determination of free surface energy and adhesion forces. Highly dispersed oxides, mesoporous and microporous materials / V.V. Turov, V.M. Gun'ko, R. Leboda, V.V. Brei // *Annal. Univ. Marie Curie-Sklodowska. Chemia.* – 2001. –V.56. – P. 209 – 241.
14. Gun'ko V.M., Turov V.V. Structure of hydrogen bonds and <sup>1</sup>H NMR spectra of water at the interface of oxides // *Langmuir.* – 1999. – V. 15. – P. 6405 – 6415.
15. Гурьянова Е.Н., Гольдштейн И.П., Перепелкова Т.И. Полярность и прочность межмолекулярной водородной связи // *Успехи химии.* – 1976. – Т. 45, № 9. – С. 1568–1593.
16. Райхардт К. Растворители и эффекты среды в органической химии. – М.: Мир, 1991. – 763 с.
17. Попл Дж., Шнейдер В., Бернштейн Г. Спектры ядерного магнитного резонанса высокого разрешения – М.: Изд-во иностр. лит. – 1962. – 430с.
18. Термодинамические свойства индивидуальных веществ / Под ред. В.П. Глушкова. – М.: Наука, 1978. – 495с.
19. Gaussian 03, Revision E.01 / M.J. Frisch, G. W. Trucks, H. B. Schlegel et al. Wallingford,, Gaussian, Inc., CT, 2004.
20. GAMESS 1993 / M.W. Schmidt; K.K. Baldridge, J.A. Boatz et al // *J. Comput. Chem.* – 1993. – V. 14. – P. 1347–1363.



21. Shulga O.V., Kerchhoff J., Turov V.V. The influence of the dispersed oxides on the interface energy of the microcrystalline cellulose in water suspension, mesoporous and microporous materials // Chemistry, Physics and Technology of Surface. – 2001. – № 4–6. – P. 267–274.
22. Связанная вода в гидрогелях крахмала, содержащих добавки высокодисперсного кремнезема / В.В. Туров, А.А. Новза, Р. Лебода, Я. Скубишевска-Зиеба и др. // Пробл. криобиол. и криомедицины – 2005. – Т. 15. – С. 636–644.
23. Interfacial phenomena in starch/fumed silica at varied hydration levels / V.M. Gun'ko, P. Pissis, A. Spanoudaki et al // Coll. Surf. A – 2008. – V. 320. – P.247–259.

## **EFFECT OF QUERCETINE, NANOSILICA AND ORGANIC SOLVENTS ON STARCH HYDRATION**

**V.V. Turov, V.M. Gun'ko, V.N. Barvinchenko, A.A. Turova, A.A. Rugal, P.P. Gorbyk**

*Chuiko Institute of Surface Chemistry, NAS of Ukraine  
General Naumov street 17, 03164, Kyiv-164*

*State and structural characteristics of water bound to starch and an influence of nanosilica, quercetin immobilized on nanosilica's surface and organic solvents (chloroform and dimethylsulfoxide) were studied using low-temperature  $^1\text{H}$  NMR spectroscopy, NMR-cryoporometry and quantum chemistry methods. It was established that interfacial water was in a cluster state. Additionally, solid phase stabilized clusterization of weakly associated water (3 – 4 % of total water concentration) in the presence of weakly polar chloroform medium. All interfacial water appeared to be strongly bound without addition of dimethylsulfoxide and a portion of this water transforms into weakly bound in a mixture of solvents that testify significant re-organization of bound water structure in the presence of dimethylsulfoxide.*

## **ВПЛИВ КВЕРЦЕТИНУ, НАНОКРЕМНЕЗЕМУ ТА ОРГАНІЧНИХ РОЗЧИННИКІВ НА ГІДРАТАЦІЮ КРОХМАЛЮ**

**В.В. Туров, В.М. Гунько, В.Н. Барвинченко, А.А. Турова, А.А. Ругаль, П.П. Горбик**

*Інститут хімії поверхні ім. О.О. Чуйка НАН України  
вул. Генерала Наумова, 17, 03164, Київ-164*

*Методами низькотемпературної  $^1\text{H}$  ЯМР спектроскопії, ЯМР-криопорометрії та квантово-хімічного моделювання досліджено стан, структурні характеристики води, зв'язаної крохмалем, і вплив на них іммобілізованого на поверхні кверцетину, нанокремнезему і органічних розчинників (хлороформу і диметилсульфоксиду). Встановлено, що міжфазна вода знаходиться в кластерному стані, причому в присутності слабополярного середовища хлороформу, тверда фаза стабілізує формування кластерів слабоасоційованої води, концентрація якої складає 3 – 4 % від загальної концентрації води. Без добавок диметилсульфоксиду вся слабоасоційована вода є сильнозв'язаною, а в змішаних розчинниках частина її стає слабозв'язаною, що свідчить про значну перебудову під впливом диметилсульфоксиду структури зв'язаної води.*