

УДК 541.138:547.466:541.183

И.Е.Миронюк, О.С.Кругляк, Г.С.Шаповал

## ОСОБЕННОСТИ ЭЛЕКТРОХИМИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ ТИОЛСОДЕРЖАЩИХ АМИНОКИСЛОТ НА ЗОЛОТОМ КАТОДЕ

Электрохимические процессы с участием цистеина и ацетилцистеина на золотом катоде исследованы методами импедансометрии, дифференциальной импульсной и циклической вольтамперометрии. Установлены различия в механизме электрохимического восстановления сульфгидрильной группы цистеина и ацетилцистеина. Показано, что для цистеина первичным процессом является катодное восстановление S–H-связи с образованием и адсорбцией аниона  $RS^-$ , а для ацетилцистеина — специфическая адсорбция, сопровождающаяся расщеплением S–H-связи сульфгидрильной группы с дальнейшим восстановлением образовавшегося при этом протона. Рассчитанные энергии взаимодействия с подложкой при адсорбции ацетилцистеина имеют более низкие значения по сравнению с цистеином, а энергии латеральных взаимодействий адсорбированных молекул этих аминокислот имеют противоположные знаки. Обнаруженные особенности электрохимического поведения исследуемых аминокислот связаны с наличием нескомпенсированного отрицательного заряда на карбоксильной группе ацетилцистеина.

**ВВЕДЕНИЕ.** Неослабевающий интерес к электродным процессам на золоте обусловлен достаточно широкими возможностями его применения, в частности в качестве трансдьюсера в биосенсорах, в комбинированных имплантатах, в стоматологии, в кардиохирургии для защиты сердечной мышцы [1–3]. Такие уникальные свойства золота, как его инертность и способность адсорбировать биомолекулы, позволяют надеяться, что этот металл может быть с успехом использован для моделирования электрохимических процессов, протекающих в биосистемах с участием протеинов и входящих в их состав аминокислот [4, 5]. В большинстве опубликованных работ исследования электродных процессов аминокислот на золоте проведены в анодной области потенциалов [6, 7]. Однако при этом процесс осложнен возможностью анодного растворения и участия золота в электрохимических реакциях аминокислот [8]. В то же время незаслуженно мало внимания уделяется изучению электродных процессов на поверхности золота в отрицательной области потенциалов.

С нашей точки зрения, используя золото в качестве катода, можно моделировать электрохимические процессы, происходящие с участием аминокислот на отрицательно заряженной стороне биомембран. Исследование взаимодействия между аминокислотой и поверхностью отрицательно заряженного металла может открыть не то-

лько возможность более глубокого понимания механизма электрохимических реакций в биосистемах, но и способствовать изготовлению новых биоматериалов для медицинских и фармацевтических целей, а также созданию биосенсоров. В этом ключе представляют интерес аминокислоты, содержащие сульфгидрильную группу, способные к специфической адсорбции и образованию самоорганизующихся слоев на поверхности адсорбента [9, 10].

Известно, что электрохимические свойства тиолов, их способность к реакциям гетерогенного электронного переноса, механизм этого процесса и природа образующихся продуктов определяются как химическим строением органического радикала R молекулы RSH, так и склонностью атома серы к взаимодействию с металлом в случае адсорбции [11]. Существует мнение, что реакции электрохимического восстановления тиолсодержащих соединений удастся реализовать в доступной области потенциалов только при условии соответствующего строения остова R молекулы RSH [11].

Цель настоящей работы — исследование электрохимического поведения на золотом катоде двух аминокислот — цистеина и ацетилцистеина, достаточно близких по строению, но отличающихся наличием ацетильной группы и величиной кислотности, в растворе, моделирующем физиологическую среду биосистемы.

© И.Е.Миронюк, О.С.Кругляк, Г.С.Шаповал, 2015

**ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ.** Объекты исследования — L-цистеин (Fluka) и N-ацетил-L-цистеин (Merck) использовали без дополнительной очистки. Растворы аминокислот в 0.1 М водном растворе NaCl готовили непосредственно перед измерениями. Фоновый электролит (0.1 М раствор NaCl) готовили из дважды перекристаллизованного NaCl квалификации х.ч. в бидистиллированной воде.

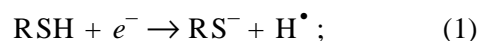
Дифференциальные вольтамперные кривые получали с помощью сопряженного с компьютером полярографа ПУ-1 в специальном импульсном режиме [12], циклические вольтамперограммы — на потенциостате ПИ-50. Все исследования проводили в трехэлектродной ячейке. Потенциал золотого рабочего электрода задавали относительно хлорсеребряного электрода сравнения, вспомогательным электродом служила платиновая спираль.

Адсорбцию исследуемых соединений на золотом катоде изучали методом спектроскопии импеданса (универсальная система АСМ Instruments Auto) по трехэлектродной схеме [13]. В качестве рабочего использовали золотой торцевой электрод, вспомогательным служила платиновая пластина, потенциал задавали относительно насыщенного хлорсеребряного электрода сравнения. Измерения выполняли после удаления из исследуемых растворов кислорода, для чего раствор в электрохимической ячейке продували аргоном в течение 60 мин. В процессе измерений осуществляли наддув аргона высшей очистки.

**ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ.** Рассмотрим вольт-амперные кривые восстановления цистеина на золотом электроде на фоне 0.1 М NaCl в воде в отрицательной области потенциалов. Как видно из рис. 1, на  $di/dE-E$  кривой при потенциале  $E = -0.9$  В наблюдается пик волны, который растет с увеличением концентрации цистеина. Эта волна характеризует электрохимическое восстановление сульфгидрильной группы, сопровождающееся расщеплением S-H-связи.

Подобное расщепление описано при восстановлении по одноэлектронному механизму на золотом электроде 1,3-пропандитиола, в результате чего на вольтамперной кривой авторы наблюдали два катодных пика, отвечающих последовательному катодному восстановлению двух сульфгидрильных групп и выделению водорода [14]. Реакции (1) и (2) соответствуют восстанов-

лению одной такой группы:



Этот механизм был предложен авторами [14] для электрохимической реакции в апротонном растворителе — ацетонитриле. В нашем случае восстановление в протонной слабокислой среде (pH 5.83), возможно, осложнено быстрым протонированием образовавшегося аниона:



что приводит к необратимости электрохимического процесса в целом. Судя по циклической вольт-амперной кривой (рис. 2, кривая 2), на которой наблюдается только катодный пик, процесс восстановления цистеина (реакция (1)), действительно, полностью необратим. Кроме того, он может быть осложнен специфической адсорбцией цистеина.

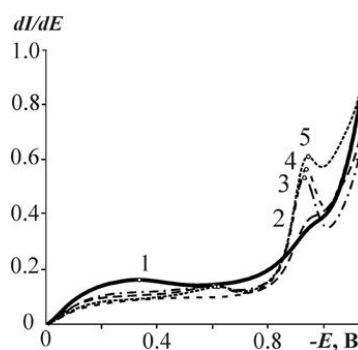


Рис. 1. Дифференциальные вольтамперограммы восстановления на золотом электроде на фоне 0.1 М раствора NaCl в воде (1) цистеина: 2 — 0.10; 3 — 0.19; 4 — 0.29; 5 —  $0.38 \cdot 10^{-3}$  моль/л.

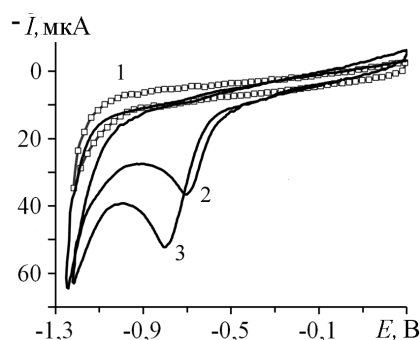


Рис. 2. Циклические вольтамперограммы золотого электрода на фоне 0.1 М NaCl (1) в присутствии  $1.9 \cdot 10^{-3}$  моль/л цистеина (2) и  $1.7 \cdot 10^{-3}$  моль/л ацетилцистеина (3).

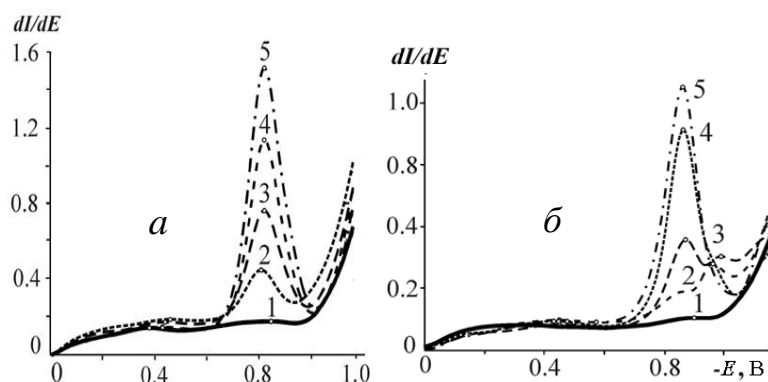


Рис. 3. Дифференциальные вольтамперограммы восстановления на золотом электроде на фоне 0.1 М раствора NaCl в воде (1) ацетилцистеина: 2 — 0.10; 3 — 0.19; 4 — 0.38; 5 —  $0.57 \cdot 10^{-3}$  моль/л (а) и соляной кислоты: 2 — 0.1; 3 — 0.19; 4 — 0.38; 5 —  $0.48 \cdot 10^{-3}$  моль/л (б).

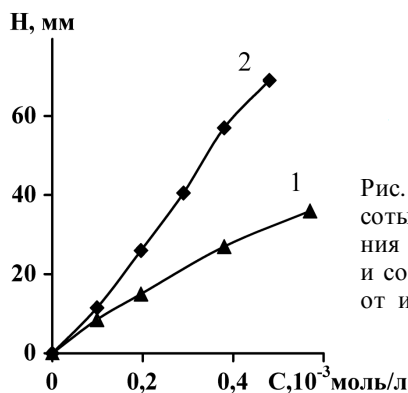
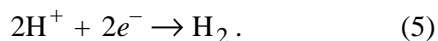


Рис. 4. Зависимость высоты пика восстановления ацетилцистеина (1) и соляной кислоты (2) от их концентрации.

При восстановлении ацетилцистеина, pH которого 3.2, на дифференциальной вольт-амперной кривой просматривается четкий, растущий с концентрацией ацетилцистеина пик восстановления при  $E = -0.82$  В (рис. 3, а).

С нашей точки зрения, этот пик соответствует восстановлению водорода, образующегося при диссоциации карбоксильной группы, а также при расщеплении сульфгидрильной группы ацетилцистеина:



Подтверждением сказанному может служить специально проведенный опыт по электрохимическому восстановлению водорода соляной кислоты на золотом электроде в наших условиях (рис. 3, б). В этом случае наблюдается картина, подобная той, которая характерна и для восстановления ацетилцистеина: растущий с концентра-

цией кислоты пик при  $E = -0.86$  В. Причем угол наклона кривой зависимости высоты пика соляной кислоты от ее концентрации больше, чем в случае ацетилцистеина, что отражает различия их констант диссоциации (рис. 4). Таким образом, пик на вольтамперограммах ацетилцистеина соответствует реакции (5). На циклических вольтамперограммах ацетилцистеин, как и цистеин, дает одну необратимую волну, при  $E \approx -0.80$  В, и сдвигает начало процесса восстановления водорода в положительную область потенциалов сильнее, чем цистеин (рис. 2, кривая 3).

Таким образом, наличие в ацетилцистеине способной к диссоциации карбоксильной группы, нескомпенсированной аминогруппой, приводит к изменению последовательности в реакции электрохимического восстановления сульфгидрильной группы.

Описанные выше процессы восстановления аминокислот происходят в двойном электрическом слое (ДЭС) на поверхности золотого электрода в отрицательной области потенциалов, где, как и в положительной области [10], могут адсорбироваться исследуемые аминокислоты. Действительно, и цистеин и ацетилцистеин адсорбируются на золотом катоде, о чем свидетельствует ряд данных, полученных методом импедансометрии (рис. 5, б).

Форма полученных для системы золотой электрод—цистеин диаграмм Найквиста (рис. 5, а) позволяет использовать для описания системы последовательно-параллельную схему Эршлера—Рендлса, включающую емкость двойного слоя, сопротивление раствора и поляризационное сопротивление [15]. Эта форма аналогична для цистеина и ацетилцистеина во всем диапазоне потенциалов. С увеличением концентрации цистеина поляризационное сопротивление золотого электрода возрастает (рис. 5, б), что подтверждает формирование на поверхности электрода адсорбционного слоя цистеина. При этом емкость ДЭС с увеличением концентрации цистеина также повышается во всем диапазоне отрицательных потенциалов (рис. 6, а). Аналогичное повышение емкости ДЭС серебряного электрода наблюда-

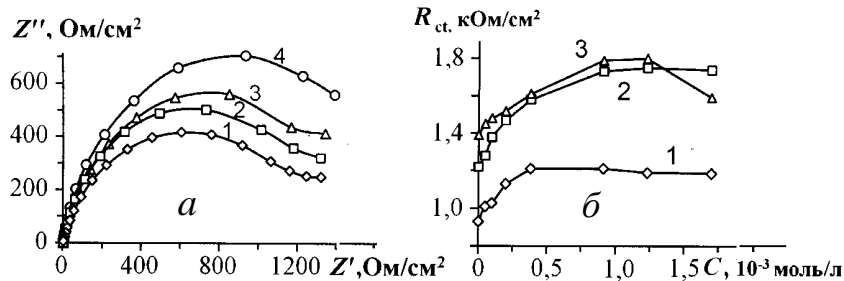


Рис. 5. Диаграммы Найквиста для цистеина на золотом электроде при потенциале  $-0.2$  В: 1 — фон  $0.1$  М NaCl; 2 —  $0.05$ ; 3 —  $0.20$ ; 4 —  $1.23 \cdot 10^{-3}$  моль/л (а). Поляризационное сопротивление золотого электрода в зависимости от концентрации цистеина при различных потенциалах: 1 — 0; 2 —  $-0.4$ ; 3 —  $-0.8$  В (б).

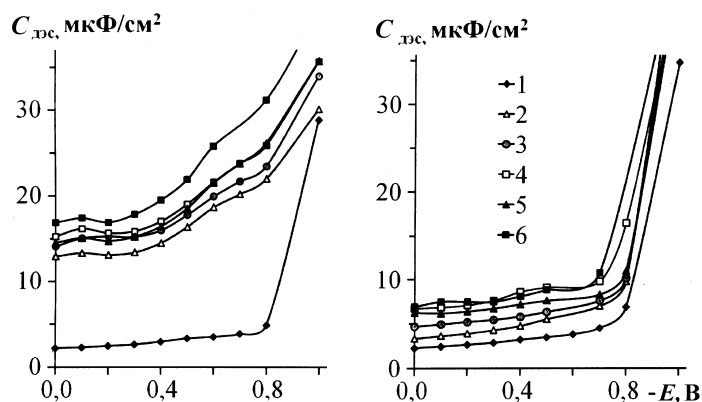


Рис. 6. Дифференциальная емкость золотого электрода в присутствии различных концентраций цистеина (а) и ацетилцистеина (б): 1 — фон  $0.1$  М NaCl; 2 —  $0.05$ ; 3 —  $0.20$ ; 4 —  $0.38$ ; 5 —  $0.91$ ; 6 —  $1.73 \cdot 10^{-3}$  моль/л.

ли в процессе адсорбции цистеина Хагер и Брло [16]. Возрастание емкости ДЭС с увеличением концентрации наблюдается и для ацетилцистеина (рис. 6, б).

Рост значений емкости ДЭС в присутствии цистеина и ацетилцистеина связан с наличием способной к специфической адсорбции якорной сульфгидрильной группы. Такой эффект, как было подчеркнуто выше, очевидно, обусловлен депротонированием сульфгидрильной группы (реакции (1), (4)) и адсорбцией цистеина в виде цвиттер-иона с последующим образованием аниона, и ацетилцистеина — в виде аниона.

Рассмотрим более подробно зависимость емкости ДЭС золотого электрода от концентрации цистеина и ацетилцистеина при различных потенциалах (рис. 7).

Цистеин вызывает достаточно резкое повышение емкости ДЭС уже при минимальной добавке ( $0.05 \cdot 10^{-3}$  моль/л) и дальнейшее увеличение его концентрации мало влияет на  $C_{дэс}$ , причем в области потенциалов  $0.0$  —  $-0.5$  В кривые  $C_{дэс}$  — с практически идентичны (рис. 7, а). Можно предположить, что благодаря способности тиольной группы цистеина к специфической адсорбции на золоте и сильным латеральным взаимодействиям между карбоксильной и аминогруппами, происходит формирование самоорганизованного адсорбционного слоя цистеина уже при малых его концентрациях в растворе.

Для ацетилцистеина в той же области потенциалов наблюдается плавное и менее значительное возрастание емкости ДЭС с концентрацией. Постоянное значение емкости достигается лишь при  $0.38 \cdot 10^{-3}$  моль/л (рис. 7, б). Таким образом, насыщение адсорбционного слоя ацетилцистеина, несмотря на наличие в нем тиольной группы, завершается при гораздо более высоких концентрациях, чем для цистеина. Это обусловлено тем, что молекулы цистеина в растворе присутствуют в форме электронейтральных цвиттер-ионов, тогда как ацетилцистеина — в виде анионов, поскольку его карбоксильная группа, не скомпенсированная аминной, диссоциирована ( $pK_a = 3.24$ ) и несет отрицательный заряд.

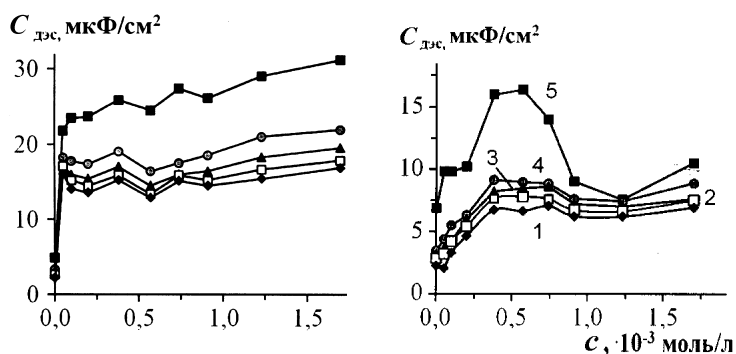


Рис. 7. Зависимость дифференциальной емкости золотого электрода от концентрации цистеина (а) и ацетилцистеина (б) при различных потенциалах, фон  $0.1$  М NaCl.

Максимальное повышение емкости ДЭС в области потенциалов 0 — -0,5 В составляет 12,7 для цистеина и 4,5 мкФ/см<sup>2</sup> для ацетилцистеина, что свидетельствует о значительно более плотной упаковке адсорбированных молекул цистеина. При  $E = -0,8$  В для цистеина и ацетилцистеина наблюдается значительный рост емкости, связанный, очевидно, с определенным вкладом описанного выше фарадеевского процесса (рис. 1—3).

**Свободная энергия адсорбции ( $-\Delta G_a$ ) и латеральных взаимодействий ( $-\Delta G_L$ ) цистеина и ацетилцистеина на золотом электроде при различных потенциалах ( $E$ )**

Аминокислота	$-E, \text{ В}$	$-\Delta G_a$	$-\Delta G_L$
		кДж/моль	
Цистеин	0	43.9	13.6
	0.4	42.6	11.7
	0.8	42.2	16.6
Ацетилцистеин	0	28.4	-1.4
	0.4	28.6	-0.2
	0.8	27.7	-7.8

Рассчитанные из полученных данных энергии адсорбции (таблица) показывают, что при всех исследованных потенциалах цистеин гораздо более прочно связывается с поверхностью электрода, чем ацетилцистеин, несмотря на то, что обе АК содержат якорную тиольную группу [17]. Вероятно, это вызвано электростатическим отталкиванием ацетилцистеина от золотого катода из-за отрицательно заряженной карбоксильной группы. Благодаря последней между адсорбированными молекулами ацетилцистеина преобладают силы электростатического отталкивания. Об этом свидетельствуют рассчитанные нами значения энергии латеральных взаимодействий боковых групп адсорбированных молекул  $-\Delta G_L$  (таблица). Если в случае цистеина полученные значения этих энергий характеризуют сильное притяжение соседних молекул, то для ацетилцистеина значения  $-\Delta G_L < 0$ .

Таким образом, в результате проведенных исследований обнаружены различия в механизме формирования адсорбционного слоя для цистеина и ацетилцистеина, связанные с нескомпенсированным отрицательным зарядом на карбоксильной группе ацетилцистеина, кото-

рый, с одной стороны, снижает энергию взаимодействия ацетилцистеина с подложкой по сравнению с цистеином, а с другой, вызывает преобладание сил отталкивания в латеральных взаимодействиях. Это и приводит к различию в последовательности их адсорбции и восстановления на поверхности золотого катода.

Обнаруженная специфика реакций переноса заряда и адсорбции цистеина и ацетилцистеина на золотом катоде может быть использована для расширения представлений об электрохимических процессах с участием таких аминокислот, протекающих на отрицательно заряженной стороне биомембран, а также для создания биосенсоров на их основе.

**ВЫВОДЫ.** Методом электрохимической импедансометрии установлено, что на золотом катоде наблюдается адсорбция цистеина и ацетилцистеина за счет якорной сульфгидрильной группы. Найдено, что при потенциалах -0,8 — -0,9 В наряду с адсорбцией происходит электрохимическое восстановление цистеина и ацетилцистеина, однако механизм этих процессов для обеих аминокислот различен. В случае цистеина первичным процессом является катодное восстановление сульфгидрильной группы с образованием аниона  $RS^-$ , адсорбция которого вызывает повышение емкости ДЭС. Для ацетилцистеина первичным процессом является специфическая адсорбция сульфгидрильной группы, сопровождаемая расщеплением S-H связи, с последующим восстановлением образовавшегося при этом расщеплении протона, а также протона карбоксильной группы.

Рассчитана энергия взаимодействия исследуемых АК с подложкой и энергия межмолекулярных взаимодействий адсорбированных молекул. Показано, что энергия адсорбции цистеина значительно выше, чем у ацетилцистеина, отрицательный заряд на карбоксильной группе которого не только уменьшает величину энергии взаимодействия с катодом, но и обуславливает отрицательные значения энергии латеральных взаимодействий.

**РЕЗЮМЕ.** Електрохімічні процеси за участю цистеїну та ацетилцистеїну на золотому катоді досліджено методами імпедансометрії, диференціальної імпульсної та циклічної вольтамперометрії. Встановлено відмінності в механізмі електрохімічного відновлення

сульфгідрильної групи цистеїну та ацетилцистеїну. Показано, що для цистеїну первинним процесом є катодне відновлення S–H-зв'язку з утворенням і адсорбцією аніона RS<sup>-</sup>, в той час як для ацетилцистеїну первинним процесом є специфічна адсорбція, яка супроводжується розщепленням S–H-зв'язку сульфгідрильної групи з подальшим відновленням утвореного при цьому розщепленні протона. Розраховані енергії взаємодії з поверхнею катода при адсорбції ацетилцистеїну мають більш низькі значення в порівнянні з цистеїном, а енергії латеральних взаємодій адсорбованих молекул цих амінокислот мають протилежні знаки. Виявлені особливості електрохімічної поведінки досліджуваних амінокислот пов'язані з наявністю незкомпенсованого негативного заряду на карбоксильній групі ацетилцистеїну.

**SUMMARY.** Electrochemical processes on the gold cathode involving cysteine and acetylcysteine were investigated by electrochemical impedance spectroscopy, differential pulse voltammetry, and cyclic voltammetry. The differences in the mechanism of electrochemical reduction of cysteine and acetylcysteine sulfhydryl groups are determined. Cathodic reduction of S–H bond with the formation and adsorption of RS<sup>-</sup> anion is shown to be the primary process for cysteine, while a specific adsorption is the primary process for acetylcysteine which accompanied by splitting of S–H bond of sulfhydryl group and reducing of formed proton. The calculated free adsorption energies characterizing interaction of acetylcysteine with the substrate have lower values in comparison with the energies obtained for cysteine. The energies of lateral interactions of the adsorbed molecules calculated for these amino acids have opposite signs. The discovered features of the electrochemical behavior of the studied amino acids are due to the presence of uncompensated negative charge on the carboxyl group of acetylcysteine.

Институт биоорганической химии и нефтехимии  
НАН Украины, Киев

## ЛИТЕРАТУРА

1. Maatouk F., Barhoumi H., Maaref A., Jaffrezic-Renault N. // *Sens. & Transduc.* -2014. -**27**, Special Issue, May. -P. 39–46.
2. Silva M.M., Cavalcanti I.T., Barroso N.F. et al. // *J. Chem. Sci.* -2010. -**122**, № 6. -P. 911–917.
3. Dykman L., Khlebtsov N. // *Chem. Soc. Rev.* -2012. -**41**, № 6. -P. 2256–2282.
4. Hamza S., Bouchemi M., Slincone N., Azari Z. // *Mat. Sci. & Eng.* -2013. -**33**, № 1. -P. 537–542.
5. Marques J.T., de Almeida R.F.M., Viana A.S. // *Electrochim. Acta.* -2013. -**126**. -P.139–150.
6. Barus C., Gros P., Comtat M. et al. // *Electrochim. Acta.* -2007. -**52**. -P. 7978–7985.
7. Sahli R., Fave C., Raouafi N. et al. // *Langmuir.* -2013. -**29**, № 17. -P. 5360–5368.
8. Дамаскин Б.Б., Петрий О.А., Цирлина Г.А. *Электрохимия.* -М.: Химия, 2006.
9. Shaojun D., Jinghong L. // *Bioelectrochem. & Bioenerg.* -1997. -**42**. -P. 7–13.
10. Hager G., Brolo A.G. // *J. Electroanal. Chem.* -2003. -**550–551**. -P. 291–301.
11. Томилов А.П. *Электрохимия элементоорганических соединений (элементы IV, V и VI групп периодической системы).* -М.: Наука, 1986.
12. Шаповал Г.С., Кругляк О.С. // *Журн. общ. химии.* -2011. -**81**, вып. 7. -С. 1092–1099.
13. Миронюк И.Е., Шаповал Г.С., Громовая В.Ф.и др. // *Теорет. и эксперимент. химия.* -2004. -**40**, № 2. -С. 105–109.
14. Howie J.K., Houts J.J., Sawger D.T. // *J. Amer. Chem. Soc.* -1977. -**99**, № 19. -P. 6323–6326.
15. Першина К.Д., Каздобін К.О. *Спектроскопія імпедансу електролітичних матеріалів.* -Київ: Освіта України, 2012.
16. Brolo A.G., Germain P., Hager G. // *J. Phys. Chem. B.* -20023. -**106**. -P. 5982–5987.
17. Maksymovych P., Voznyu O., Dougherty D.B. et al. // *Prog. Surf. Sci.* -2010. -**85**, № 5–8. -P. 206–240.

Поступила 25.03.2015