



УДК 539.19:532.782.086:547.233:57.043

© 2007

Е. Н. Животова, Л. Г. Кулешова, А. В. Зинченко, В. В. Чеканова

**Исследование физических состояний водных растворов  
оксиэтилированных производных ацетамида  
со степенью полимеризации  $n = 1$  и  $n = 7 \div 8$  методом  
оптической криомикроскопии**

(Представлено членом-корреспондентом НАН Украины В. М. Пузиковым)

*Ice crystal morphology in the binary systems water – oxyethylated acetamide (OEA) with polymerization degree  $n = 1$  and  $7 \div 8$  is studied by optical cryomicroscopy over the temperature range of 173–273 K. Fine ice crystals are formed at low (20% w/w) concentrations of OEA ( $n = 1$  and  $7 \div 8$ ). Dendrites of various orders are formed at medium concentrations (56% w/w). The systems remain in a completely amorphous state at high concentrations (80% w/w). One molecule of OEA ( $n = 1$ ) is able to strongly bind 3 water molecules, and one molecule of OEA ( $n = 7 \div 8$ ) is able to strongly bind 7–8 water molecules.*

Водные растворы гидрофильных веществ, способных образовывать разветвленную сетку водородных связей, обычно склонны к переохлаждению и к затвердеванию в аморфном стеклообразном состоянии [1]. Гидрофильные вещества значительно влияют на рост кристаллов льда и их морфологию и определяют склонность раствора к стеклованию, причем характер их влияния зависит от строения молекул растворенного вещества, в частности от количества гидрофильных групп и от их способности связывать воду [2, 3].

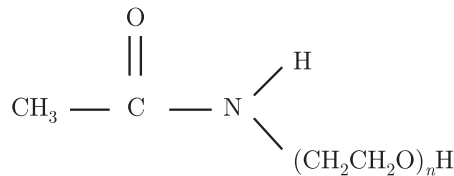
Помимо фундаментального значения в области молекулярной физики и физики конденсированного состояния, исследования влияния неэлектролитов на характер льдообразования в водных растворах имеют принципиальное значение для криобиологии. Межмолекулярные взаимодействия в водных растворах неэлектролитов определяют их криопротекторную эффективность при низкотемпературном консервировании биологических объектов в результате изменения характера кристаллизации льда [4], уменьшения механических напряжений в твердом состоянии [5] и возможности получения стеклообразного состояния [3]. Исследования в данном направлении могут быть полезны для разработки методик избежания кристаллизации льда в биологических системах, формирование которого является одним из основных факторов повреждения биологических объектов при криоконсервировании [6]. С этой целью синтезируются и исследуются новые криозащитные соединения.

Синтезированные в Институте проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины оксиэтилированные производные ацетамида (ОЭАц) со степенями полимеризации  $n = 1$  и  $7 \div 8$ , проявили себя как достаточно эффективные криопротекторы при криоконсервации различных биологических объектов [7]. Ранее нами было проведено исследование физических состояний водных растворов ОЭАц со степенью полимеризации  $n = 1$  и  $7 \div 8$  методом дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК) в диапазоне температур 123–273 К [7, 8].

Метод криомикроскопии, позволяющий визуально наблюдать кристаллизацию, плавление и стеклование исследуемых растворов в широком диапазоне температур с заданными скоростями охлаждения и нагрева [9, 10], дополняет данные ДСК-исследований фазовых состояний водных растворов при различных температурах.

Целью настоящей работы является исследование морфологии кристаллов и закономерности формирования стеклообразных фаз в водных растворах ОЭАц со степенью полимеризации  $n = 1$  и  $7 \div 8$  при охлаждении и нагреве в температурном диапазоне 173–273 К в зависимости от концентрации ОЭАц методом криомикроскопии.

**Материалы и методы.** Синтез ОЭАц ( $n = 1$  и  $7 \div 8$ ) проводили по методике, описанной в работе [7]. Ниже приведена структурная формула ОЭАц со степенью полимеризации  $n$ :



Растворы ОЭАц готовили на бидистиллированной воде. Концентрацию ОЭАц выражали в массовых процентах.

Криомикроскопические исследования проводили с использованием низкотемпературного комплекса, разработанного и изготовленного в Институте проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины [11]. Для устранения возможного переохлаждения в образцы вносили кристаллы AgI. Наблюдения вели при охлаждении образцов до 173 К со скоростью 30 К/мин и при последующем нагреве до 273 К со скоростью 5 К/мин. Температурный диапазон исследования водных растворов ОЭАц был выбран на основании данных ДСК о температурах фазовых переходов [7, 8]. Результаты наблюдений фиксировали фотографически при 100-кратном увеличении.

**Результаты и обсуждение.** Анализ диаграмм состояния бинарных систем вода–ОЭАц ( $n = 1$  и  $7 \div 8$ ) [7] позволил выделить три концентрационные зоны i–iii, имеющие определенный набор физических состояний (табл. 1). Исходя из этого, для криомикроскопических исследований бинарных систем вода–ОЭАц ( $n = 1$  и  $7 \div 8$ ) были выбраны растворы следующих концентраций ОЭАц: 20% (зона i), 56% (зона ii) и 80% (зона iii).

В табл. 2 приведены значения температур стеклования и фазовых переходов для растворов с концентрациями ОЭАц ( $n = 1$  и  $7 \div 8$ ) 20, 56 и 80% по данным работы [7].

Криомикроскопические исследования выявили следующие особенности кристаллизационных процессов в указанных системах. Кристаллизация 20%-ного водного раствора ОЭАц ( $n = 1$ ) происходила при температуре 253 К в виде мгновенного засева кристаллами льда всего поля зрения (рис. 1, а). Рост кристаллов наблюдался до температуры 246 К (рис. 1, б). Дальнейшее охлаждение образцов до температуры 173 К и нагрев до 253 К не приводили

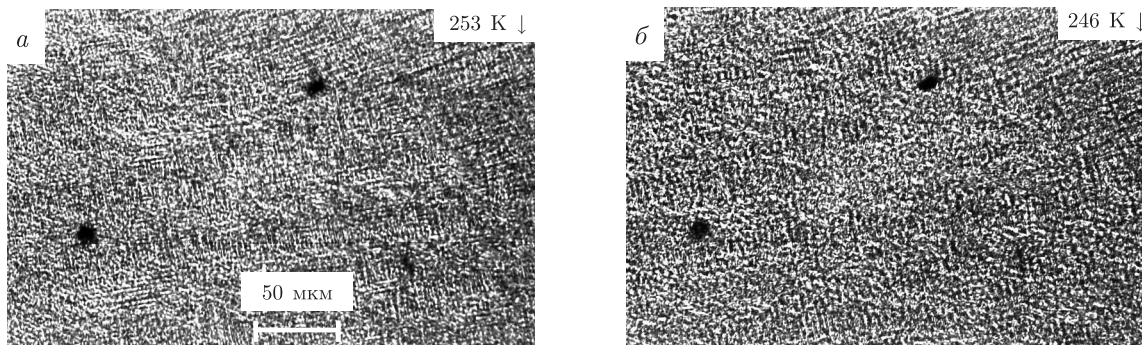


Рис. 1. Микрофотографии 20%-ного раствора ОЭАц ( $n = 1$ ) (зона i). Температура съемки: ↓ – охлаждение; ↑ – нагрев; крупные темные участки на микрофотографиях – кристаллы AgI. Увеличение одинаковое для всех микрофотографий

к значительным структурным изменениям. Плавление льда наблюдалось в температурном диапазоне 253–262 К.

Водный раствор ОЭАц ( $n = 1$ ) концентрацией 56% оставался оптически прозрачным на всем этапе охлаждения вплоть до температуры 173 К (рис. 2, а). На этапе нагрева при температуре 199 К наблюдалось высипание мелких кристаллов льда (рис. 2, б). Увеличение их размеров при дальнейшем повышении температуры позволило отчетливо фиксировать рост

Таблица 1. Концентрационные зоны с определенным набором физических состояний для водных растворов ОЭАц ( $n = 1$  и  $7 \div 8$ ) и количество молекул воды  $N$ , приходящихся на одну молекулу ОЭАц

Концентрационные зоны	Зона i	Зона ii	Зона iii
Процессы, протекающие в концентрационных зонах	Кристаллизация льда происходит при охлаждении и завершается при нагреве. Стеклообразная фаза существует в виде включений	Раствор затвердевает в аморфном состоянии. Кристаллизация льда происходит на этапе нагрева	Раствор не кристаллизуется ни при охлаждении, ни при нагреве
ОЭАц ( $n = 1$ ), молекулярная масса 103 а. е. м.			
Границы концентрационных зон, % (мас.)	0–41	42–64	65–100
$N$	$\geq 8$	7–3	$\leq 3$
ОЭАц ( $n = 7 \div 8$ ), средняя молекулярная масса 389 а. е. м.			
Границы концентрационных зон, % (мас.)	0–39	40–73	74–100
$N$	$\geq 33$ –34	33–34 $\div$ 7–8	7–8

Таблица 2. Значения температур расстеклования и фазовых переходов водных растворов ОЭАц ( $n = 1$  и  $7$ – $8$ ) различных концентраций

Переход	20% (зона i)		56% (зона ii)		80% (зона iii)	
	( $n = 1$ )	( $n = 7 \div 8$ )	( $n = 1$ )	( $n = 7 \div 8$ )	( $n = 1$ )	( $n = 7 \div 8$ )
Расстеклование	176	200	167	191	182	202
Кристаллизация воды при нагреве	–	–	200	222	–	–
Завершение кристаллизации воды при нагреве	196	213	–	–	–	–
Плавление льда	262	267	231	252	–	–

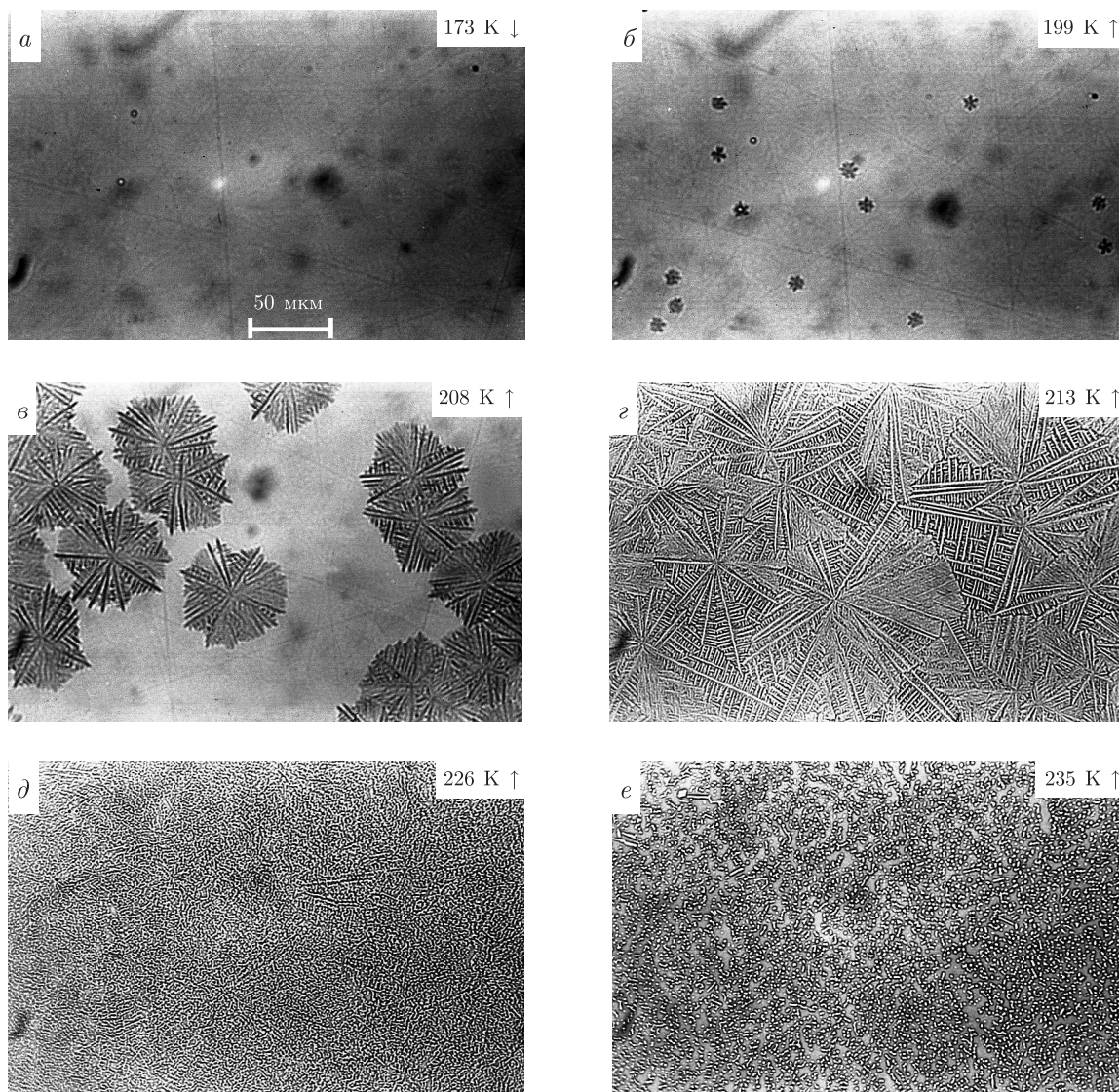


Рис. 2. Микрофотографии 56%-ного раствора ОЭАц ( $n = 1$ ) (зона ii)

основных осей дендрита из одного центра зародышеобразования и возникновение осей дендритов более высоких порядков (рис. 2, в), которые при температуре 213 К заполнили все поле зрения (рис. 2, г). Область плавления кристаллов льда (226–240 К) характеризовалась постепенным рассыпанием дендритов на многочисленные мелкие кристаллы.

При охлаждении и последующем нагреве 80%-ного раствора ОЭАц ( $n = 1$ ) (зона iii) не было выявлено признаков кристаллизации в системе, которая оставалась оптически прозрачной как на этапе охлаждения, так и на этапе медленного нагрева, что свидетельствует о ее стабильном твердоаморфном состоянии.

Общепринято считать, что определяющим фактором при формировании стеклообразных фаз в водных растворах неэлектролитов является их высокая степень вовлеченности в сетку межмолекулярных водородных связей [12]. Так склонность ОЭАц ( $n = 1$ ) к стеклованию может быть объяснена наличием в его молекулах полярных групп  $>C=O$ ,  $-N-H$

и –О–. Нами было определено количество молекул воды  $N$ , приходящихся на одну молекулу ОЭАц в каждой из концентрационных зон (см. табл. 1).

Как следует из калориметрических данных [7], растворы ОЭАц ( $n = 1$ ) концентрацией ниже 42% (зона i) содержат значительное количество свободной воды, молекулы которой способны к кристаллизации при охлаждении, что и наблюдалось в ходе криомикроскопии. В концентрационной зоне ii, в которой кристаллизация происходила при нагреве, на одну молекулу ОЭАц ( $n = 1$ ) приходится от 8 молекул воды при концентрации ОЭАц 42% до 3 молекул воды при концентрации ОЭАц 64% (см. табл. 1). Можно предположить, что в зоне ii практически все имеющиеся в растворе молекулы воды образуют связи различной прочности с гидрофильными группами молекул ОЭАц ( $n = 1$ ), в связи с чем им термодинамически невыгодно формировать центры кристаллизации при охлаждении при используемой нами средней скорости охлаждения 200 К/мин.

Таким образом, система переходит в метастабильное стеклообразное состояние, однако нагрев с достаточно низкой скоростью 0,5 К/мин способствовал выходу из метастабильного состояния посредством развития кристаллизации воды. При этом при концентрациях ОЭАц ( $n = 1$ ) выше 64% (зона iii) кристаллизация системы не регистрировалась ни при охлаждении, ни при нагреве, т. е. образец затвердевал в аморфном состоянии. На основании этого можно предположить, что стеклюющаяся кинетическая единица представляет собой молекулу ОЭАц ( $n = 1$ ) с не более чем тремя прочно связанными молекулами воды.

В случае 20%-ного раствора ОЭАц ( $n = 7 \div 8$ ) (зона i) в ходе криомикроскопических исследований кристаллизация льда происходила на этапе охлаждения при температуре 254 К. Морфологический характер образующихся кристаллов аналогичен таковому для 20%-ного раствора ОЭАц ( $n = 1$ ). Плавление льда в растворе ОЭАц ( $n = 7 \div 8$ ) наблюдалось в температурном диапазоне 262–268 К.

В 56%-ном растворе ОЭАц ( $n = 7 \div 8$ ) (зона ii) процесс кристаллизации развивался в виде формирования дендрита при температуре 240 К из единственного центра (рис. 3, а) и прекратился на этапе охлаждения при температуре 215 К (рис. 3, б). Таким образом, образец представлял собой двухфазную систему: кристаллы льда и высококонцентрированный раствор ОЭАц ( $n = 7 \div 8$ ) в виде аморфной фазы. Такое состояние системы сохранялось как при дальнейшем охлаждении до температуры 173 К, так и при нагреве вплоть до температуры 215 К. Следует отметить, что, согласно калориметрическим данным, 56%-ный раствор ОЭАц ( $n = 7 \div 8$ ) затвердевал при охлаждении в аморфном состоянии и кристаллизовался при нагреве при температуре 222 К.

Криомикроскопические исследования показали, что при температуре 215 К (на этапе нагрева) центры кристаллизации возникали как на границе раздела фаз, так и в аморфной зоне на кристаллах AgI (рис. 3, в). При дальнейшем повышении температуры наблюдалось продвижение фронта кристаллизации, а также развитие вновь образовавшихся центров (рис. 3, г), и при температуре 231 К вода полностью кристаллизовалась (рис. 3, д). В области плавления льда в диапазоне температур 243–253 К правильная гексагональная структура кристаллов постепенно разрушалась (рис. 3, е).

Некоторое различие между калориметрическими и криомикроскопическими исследованиями можно объяснить тем, что при используемой нами в ходе криомикроскопических исследований скорости охлаждения возможно зарождение одиночных дендритов, однако их дальнейший рост при температуре ниже 233 К является термодинамически невыгодным, что способствует переходу системы в метастабильное состояние. Последующий медленный

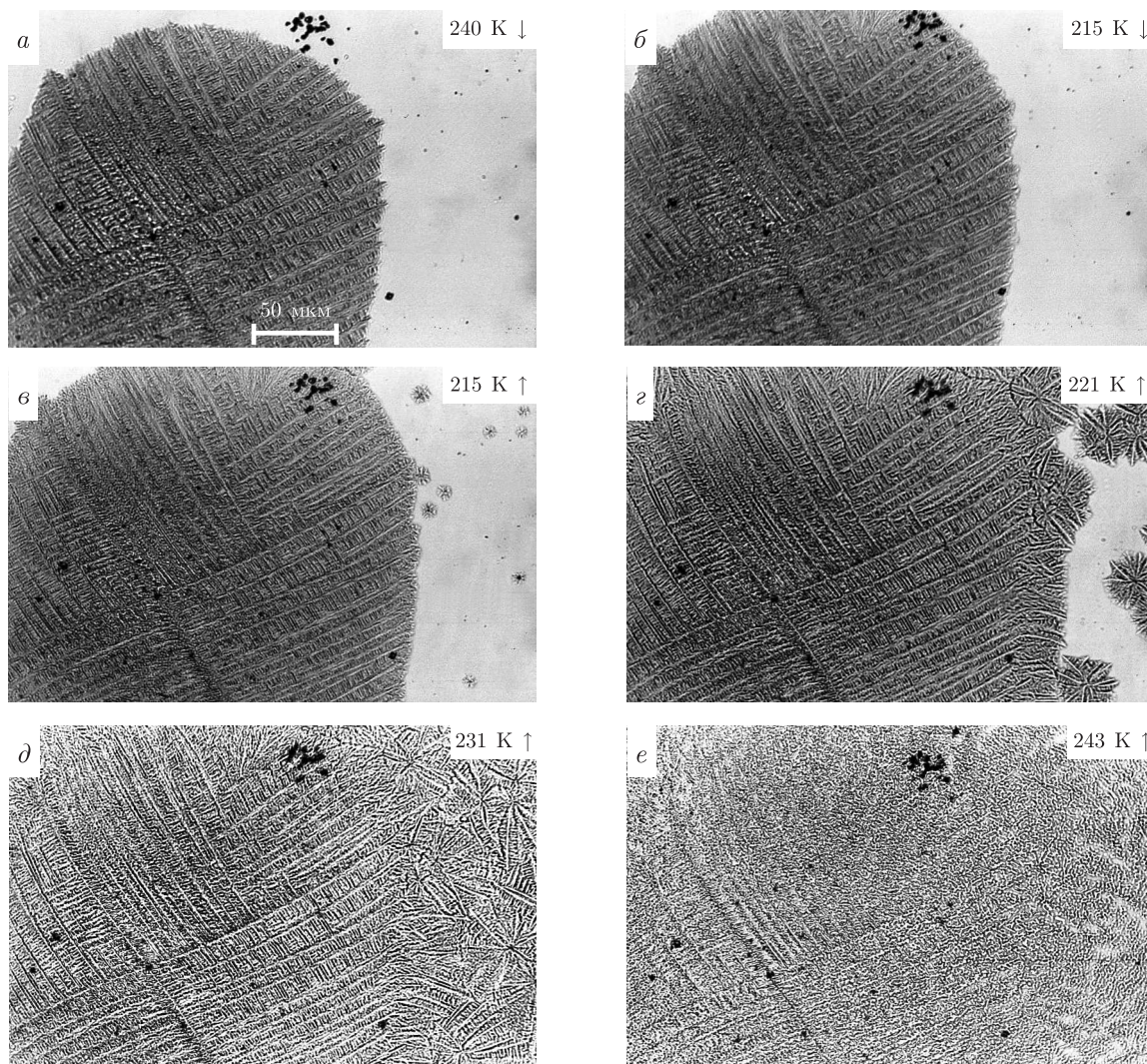


Рис. 3. Микрофотографии 56%-ного раствора ОЭАц ( $n = 7-8$ ) (зона ii).

нагрев создает необходимые условия для выхода системы из метастабильного состояния путем развития кристаллизации.

Как и в случае 80%-ного раствора ОЭАц ( $n = 1$ ), криомикроскопические исследования процесса замораживания 80%-ного раствора ОЭАц ( $n = 7 \div 8$ ) полностью подтвердили факт отсутствия кристаллизации, как на этапе охлаждения, так и на этапе нагрева.

На основании данных табл. 1 и рассуждений, приведенных для бинарной системы вода — ОЭАц ( $n = 1$ ), можно сделать вывод, что при используемых в ДСК-исследованиях скоростях охлаждения и нагрева молекула ОЭАц ( $n = 7 \div 8$ ) способна связывать 33–34 молекулы воды, из которых 7–8 являются прочно связанными и ни при каких режимах охлаждения и нагрева не участвуют в процессе кристаллизации.

Сравнивая результаты исследований бинарных систем вода — ОЭАц ( $n = 1$  и  $7 \div 8$ ) методами калориметрии и криомикроскопии, можно заключить, что процессы, зарегистрированные в каждой из выделенных в ходе ДСК-исследований концентрационных зон, обнаружены и в ходе криомикроскопических исследований. Значения температур фазовых пе-

переходов обеих бинарных систем, определенных методом ДСК, находятся в полном соответствии с данными криомикроскопических исследований. С ростом степени полимеризации наблюдается возрастание значений температур фазовых переходов. Криомикроскопические исследования позволили более полно охарактеризовать физическое состояние бинарных систем вода — ОЭАц ( $n = 1$  и  $7 \div 8$ ) при охлаждении и нагреве при температурах ниже 273 К. Полученные результаты подтверждают тот факт, что склонность водных растворов к стеклованию и стабильность аморфного состояния определяются степенью вовлеченности молекул растворенного вещества в водородные связи с водой.

1. *Water*, a comprehensive treatise. Vol. 7. Water and aqueous solutions at subzero temperatures. Ed. by F. Franks. — New York: Plenum Press, 1982. — 484 p.
2. *Зинченко А. В., Манж В. В., Мусеев В. А., Овчаренко Ф. Д.* Исследования низкотемпературных фазовых переходов в водных растворах полиэтиленгликолей // Докл. АН СССР. — 1978. — **240**, № 4. — С. 888–891.
3. *Зинченко А. В.* Исследование фазовых переходов и физических состояний водных растворов многоатомных спиртов в диапазоне температур  $-150\text{ }^{\circ}\text{C} - 0\text{ }^{\circ}\text{C}$ : Автореф. дис. ... канд. физ.-мат. наук. — Киев, 1983. — 20 с.
4. *Кулешова Л. Г.* Кинетика льдообразования в живых клетках и модельных системах: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. — Харьков, 1983. — 24 с.
5. *Зинченко А. В.* Физико-химические процессы в биологических системах при стекловании и в твердой фазе: Автореф. дис. ... докт. биол. наук. — Харьков, 1997. — 44 с.
6. *Белоус А. М., Грищенко В. И.* Криобиология. — Киев: Наук. думка, 1994. — 432 с.
7. *Зинченко А. В., Животова Е. Н., Чеканова В. В. и др.* Калориметрическое исследование водных растворов аддуктов N-ацетилэтанолamina // Вісн. ХНУ, № 665. — Біофіз. вісн. — 2005. — Вип. 1 (15). — С. 111–115.
8. *Zinchenko A. V., Zhivotova E. N., Zinchenko V. D.* Phase transitions and metastable states in the system water — N-acetyl ethanolamine and its adducts within the temperature range of 273–77 K // Phys. of Liquid Matter: Modern Problems: 3<sup>rd</sup> Internat. Conf., May 27–31, 2005. — Kyiv, Ukraine. — Abstracts. — P. 161.
9. *Reid D. S.* Cryomicroscopic studies of the freezing of model solutions of cryobiological interest // Cryobiology. — 1984. — **21**, No 1. — P. 60–67.
10. *Hey J. M., MacFarlane D. R.* Crystallization of ice in aqueous solutions of glycerol and dimethyl sulfoxide 2: Ice crystal growth kinetics // Ibid. — 1998. — **37**, No 2. — P. 119–130.
11. *Кулешова Л. Г.* Криомикроскопический комплекс для криобиологических исследований // Цитология. — 2004. — **46**, № 9. — С. 809–810.
12. *Немилов С. В.* Энтропия структурного беспорядка низкомолекулярных органических жидкостей, стеклование и стеклообразующих кристаллов и ее связь со строением молекул // Физика и химия стекла. — 1977. — **3**, № 3. — С. 423–433.

*Институт проблем криобиологии  
и криомедицины НАН Украины, Харьков*

*Поступило в редакцию 11.05.2007*