

ИНФРАКРАСНЫЕ СПЕКТРЫ ЖЕЛАТИНЫ В ИНТЕРВАЛЕ
ТЕМПЕРАТУР ОТ — 160 ДО +250°

М. А. Салимов, В. А. Пчелин

Как было показано некоторыми авторами [5, 9, 15—17], инфракрасные спектры дают возможность исследовать изменения структур полiamидов [5, 15—17], а также полипептидов [5, 9] при их нагревании. Кроме обратимых изменений, возможны и необратимые процессы. Например, при действии тепла на воздушно-сухую желатину она теряет растворимость и способность к набуханию [23, 24]. Это свидетельствует о том, что при нагреве воздушно-сухой желатины в ней образуются дополнительные химические связи. Изучение инфракрасных спектров в широком интервале температур, по-видимому, даст возможность наблюдать более подробно как обратимые, так и необратимые изменения, претерпеваемые желатиной при сильном нагревании и охлаждении. Этому вопросу и посвящена настоящая работа.

Экспериментальная часть

Используемый в настоящей работе спектрометр и условия записи, а также применяемая для работы желатина охарактеризованы нами ранее [1].

Съемка спектров производилась при температурах —160°, +25°, +105°, +160°, +200°, +250°. Низкотемпературные измерения осуществлялись в кювете, аналогичной ранее описанной другими авторами [25]. Съемка спектров при высоких температурах производилась в специально сконструированной кювете с электрическим обогревом. Кювета имела окна из пластинок KCl, что обеспечивало надежную теплоизоляцию. Порядок съемки как в низкотемпературной, так и в высокотемпературной кювете был следующий: в начале опыта кусок пленки желатины (толщиной 6 μ ¹) приклеивали к оправе кюветы и регистрировали спектр при комнатной температуре (25°), после чего температуру кюветы доводили до желаемой, выдерживали в течение часа и регистрировали снова спектр поглощения. Затем температура кюветы вновь доводилась до комнатной, выдерживалась в течение часа при этой температуре и затем вновь регистрировался спектр поглощения. Запись спектра при комнатной температуре повторяли по истечении 20 час. Для каждой температуры проводили минимум 3—4 опыта, воспроизводимость результатов была вполне удовлетворительная. Результаты опытов для каждой температуры представлены в виде отдельного спектра, причем спектры поглощения, соответствующие различным стадиям опыта, нанесены на один и тот же график (т. е. спектр поглощения до нагревания, в нагретом состоянии, после охлаждений и т. д.). Кроме того, для сравнения результатов опытов, проведенных при температурах + 25 до + 250°, был составлен сводный график (рис. 6).

¹ В нашей предыдущей работе [1] было установлено, что 6 μ оптимальная величина для желатины.

Результаты и их обсуждение

Рассмотрение инфракрасного спектра желатины было сделано в нашей предыдущей работе [1]; при этом было показано, что частоты полученных полос поглощения желатины хорошо согласуются с данными о спектрах амидов, полипептидов и протеинов [2—18] и желатины, в частности [19—22].

Полученный в этой работе экспериментальный материал показывает, что понижение температуры до -160° вызывает в спектре ряд обратимых изменений:

1. Наблюдается некоторое сужение полосы 3330 см^{-1} .

2. Интенсивность полос 1555 , 1408 и 1345 см^{-1} несколько понижается, а у полос 1460 , 1085 , 1020 , 760 и 720 см^{-1} повышается (рис. 1).

Как известно, при понижении температуры, благодаря стеклованию, у полимеров усиливаются ассоциации молекул при помощи водородных связей [26—29]. Этим можно объяснить повышение интенсивности полос 760 и 720 см^{-1} . Увеличение интенсивности полос 1460 , 1085 и 1020 см^{-1} могло осуществиться благодаря поворотно изомерному превращению в пленке желатины при понижении температуры [25, 26].

Что касается сужения полосы 3330 см^{-1} , то, как это было замечено другими авторами, понижению температуры всегда сопутствует подобное изменение в спектре [28]. При доведении температуры пленки до комнатной спектр принимает прежний вид.

Если при охлаждении пленки желатины в спектре наблюдаются только обратимые изменения, то при нагревании имеют место как обратимые, так и необратимые изменения (рис. 2—6).

При рассмотрении спектров (рис. 2—5, кривые 2, а также рис. 6) наблюдаются следующие обратимые изменения:

1. Поглощение фона в области 4200 — 3500 см^{-1} по мере повышения температуры постепенно уменьшается и на месте ранее наблюдавшихся крыльев появляются слабые полосы 3660 и 3550 см^{-1} , а слабый выступ 3460 см^{-1} становится более резким (рис. 2—6).

2. Интенсивность полосы 3330 см^{-1} уменьшается.

3. У полосы 3090 см^{-1} также понижается интенсивность, исчезая совершенно при 250° (рис. 5 и 6).

4. Наблюдается увеличение интенсивности полос 2930 и 2860 см^{-1} .

5. На участке 2700 — 2200 см^{-1} поглощение фона несколько уменьшается.

6. При повышении температуры на участке 2000 — 650 см^{-1} наблюдается уменьшение интенсивности всех полос и одновременно с этим смещение некоторых полос в длинноволновую сторону, причем величина смещения зависит от температуры; при нагревании выше 200° дальнейшее смещение не наблюдается.

При 200° наблюдается следующее смещение полос:

полоса 1660 см^{-1}	смещается к	1626 см^{-1}
» 1555	»	1520 »
» 1460	»	1440 »
» 1408	»	1395 »
» 1260	»	1240 »

При этом полного исчезновения полос 1660 и 1555 см^{-1} не наблюдается, а замечается сохранение части поглощения на прежнем положении.

7. По мере повышения температуры интенсивность полос 760 и 720 см^{-1} резко уменьшается. При этом наблюдается также значительное ослабление фона на участке 1000 — 650 см^{-1} . Полоса 760 см^{-1} при 250° совершенно исчезает.

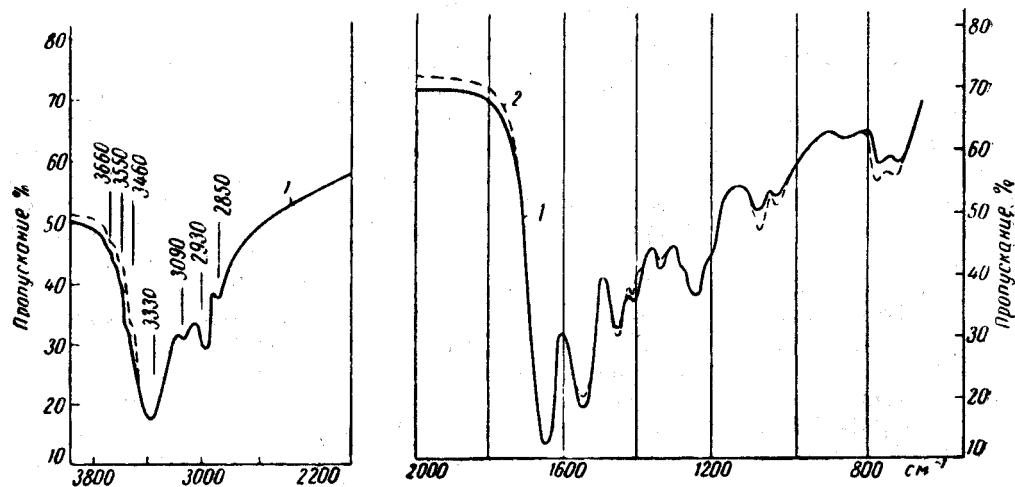


Рис. 1. Инфракрасный спектр желатины

1 — при 25°, 2 — при 160°

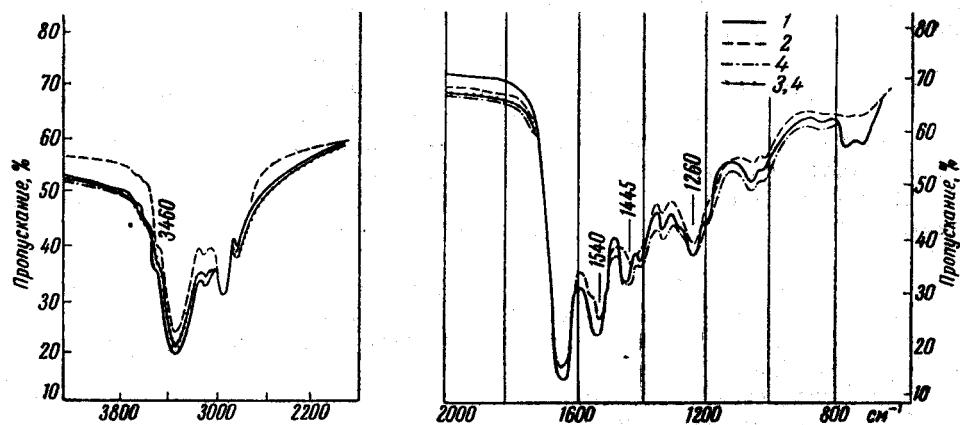


Рис. 2. Инфракрасный спектр желатины

— при 25°; 2 — при 105°; 3 — после охлаждения до 25°; 4 — через 20 час. после охлаждения

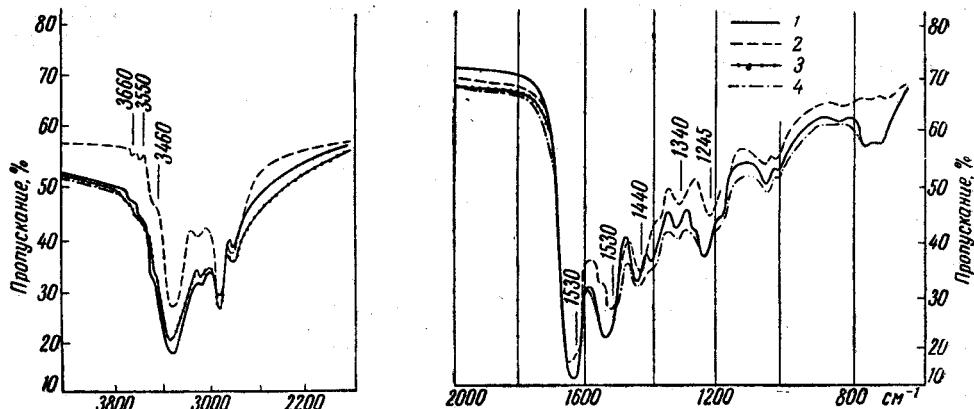


Рис. 3. Инфракрасный спектр желатины

1 — при 25°; 2 — при 160°; 3 — после охлаждения до 25°; 4 — через 20 час. после охлаждения

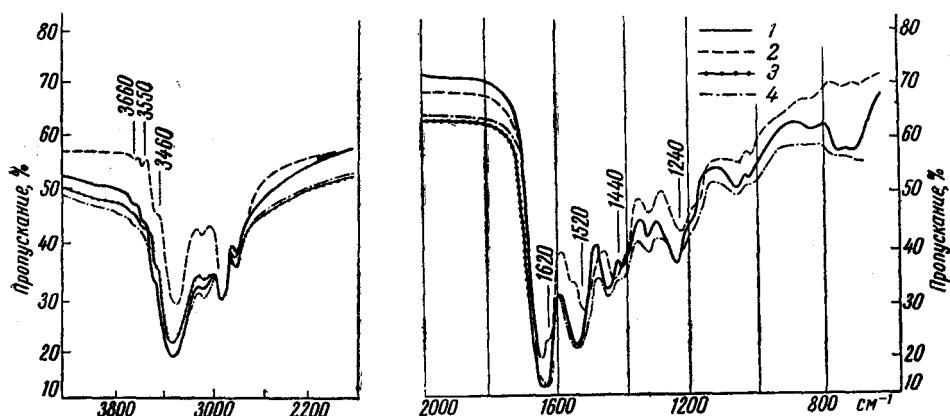


Рис. 4. Инфракрасный спектр желатины
1 — при 25° ; 2 — при 200° ; 3 — после охлаждения до 25° ; 4 — через 20 час. после охлаждения

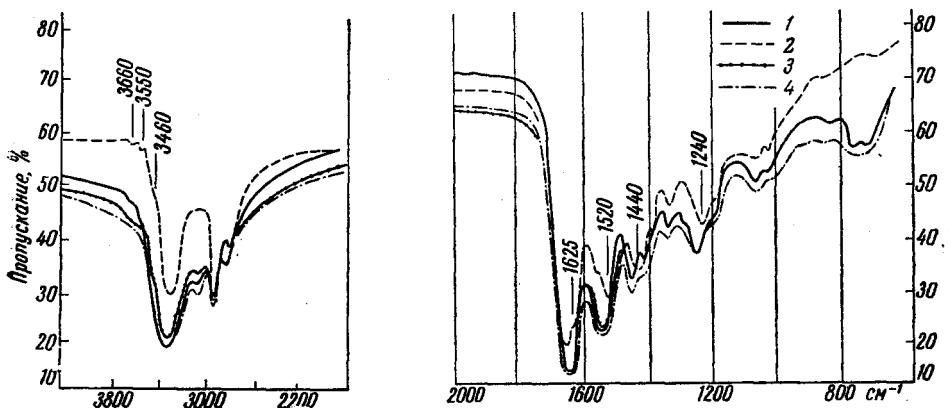


Рис. 5. Инфракрасный спектр желатины
1 — при 25° ; 2 — при 250° ; 3 — после охлаждения до 25° ; 4 — через 20 час. после охлаждения

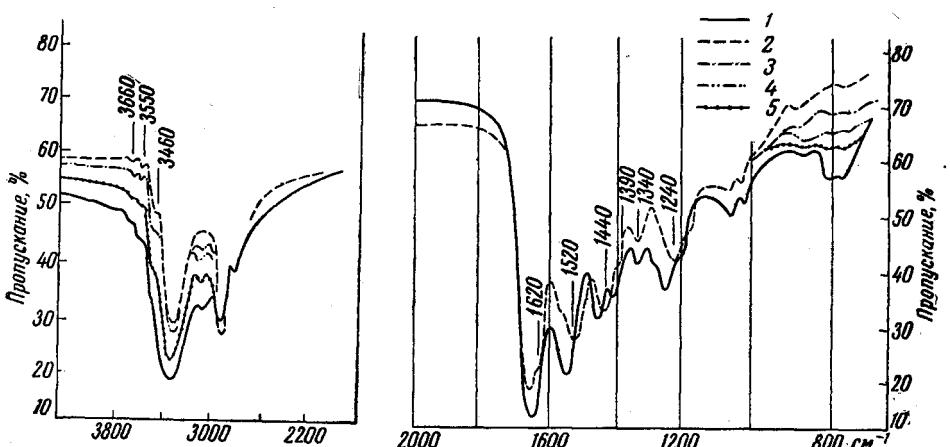


Рис. 6. Инфракрасный спектр желатины
1 — при 25° ; 2 — при 150° ; 3 — при 160° ; 4 — при 200° ; 5 — при 250°

Наряду с перечисленными обратимыми изменениями, нагревание вызывает появление в спектре ряда необратимых изменений (рис. 2—5, кривые 3, 4).

1. В результате нагревания (после охлаждения пленок) по всему спектру 4200—650 см^{-1} наблюдается усиление поглощения фона.

2. При этом наблюдается также заметное усиление интенсивности полос 2930; 2860; 1460 и 1408 см^{-1} .

Перейдя к обсуждению перечисленных выше обратимых изменений в спектре, необходимо сказать, что уменьшение поглощения фона и интенсивности полос, наблюдавшихся во всех опытах в спектрах нагретых образцов (кривые 2 на рис. 2—5, а также рис. 6), частично можно объяснить простым повышением температуры. С другой стороны, это может указывать на изменения, происходящие в структуре желатины при нагревании. Например, на месте ранее наблюдавшихся крыльев появляющиеся полосы 3660 и 3550 см^{-1} можно отнести к валентному колебанию OH-групп, не участвующих в водородной связи [3], так как известно, что при нагревании водородная связь разрушается и гидроксильные группы при этом освобождаются. Эти группы могут принадлежать оксипиролину, количество которого в коллагене и, следовательно, в желатине весьма высоко (иногда составляет $\sim 20\%$ [19, 23]). С другой стороны, гидроксильные группы могут относиться к полисахаридам, содержащимся в желатине [23]. Помимо этого OH-группа может принадлежать также кристаллизационной (или химически связанной) воде [34, 36], что спектральным путем обнаруживается с большим трудом [33, 35, 36]. При наличии сильной ассоциации полосы OH-группы вовсе не удается наблюдать, а вместо нее в спектре обнаруживается небольшое усиление фона [33]. В зависимости от того, насколько сильна ассоциация между группами, поглощение, вызываемое ими, может простираться от 3600 до 900—800 см^{-1} [33, 35, 36]. Так как известно, что при высушивании [34] и при мягкой дегидратации [36] кристаллизационная (или химически связанная) вода не удаляется и она связана при помощи водородных связей, то при нагревании эти связи также подвержены разрушению. Возможно этим объясняется ослабление в поглощении фона на участках 3600—3300; 2700—2200 и 1000—650 см^{-1} , наблюдавшееся в спектре нагретых пленок.

Едва заметный изгиб при 3460 см^{-1} , относящийся к свободной NH-группе [17], при нагревании становится более резким. Это свидетельствует об увеличении числа NH-групп, не связанных водородной связью. С этим хорошо согласуется уменьшение интенсивности полос 3330 и 3090 см^{-1} , относящихся к колебанию NH-групп, связанных водородной связью. Если при высоких температурах (250°) наблюдается полное исчезновение полосы 3090 см^{-1} , то полоса 3330 см^{-1} продолжает оставаться достаточно интенсивной, что говорит о большой прочности молекулярной ассоциации, вызванной водородной связью. При этом положение этой полосы сохраняется на прежнем месте, т. е. смещение в коротковолновую сторону не наблюдается. Исчезновение полосы 3090 см^{-1} наблюдалось также в полиамидных пленках другими исследователями [5, 15, 16]. Таким образом, можно с уверенностью сказать, что как в полиамидных пленках, так и в желатине водородная связь, имеющая *цис*-конфигурацию (полоса 3090 см^{-1}), менее прочна, чем *транс*-конфигурация. Если при повышении температуры в спектре нагретых образцов наблюдается понижение интенсивности фона и большинства полос (кривые 2 на рис. 2—5 и рис. 6), то полосы 2930 и 2860 см^{-1} , которые относятся к валентному колебанию — CH₂-связей, обнаруживают обратную тенденцию: их интенсивность увеличивается. Эта тенденция сохраняется и после охлаждения образцов до комнатной температуры. Относительная интенсивность других полос метиленовых групп (1460 и 1408 см^{-1}) также обнаруживает подобную тенденцию к росту. Этот факт можно было бы объяснить тем, что при нагревании имеют место ново-

роты отдельных фрагментов макромолекул относительно друг друга вокруг C—C и C—N-связей. После прекращения нагревания благодаря сшиванию звеньев макромолекул друг с другом относительное расположение отдельных участков в конечном счете может быть несколько иным, чем до нагревания. Возможно, этим объясняется увеличение интенсивности полос —CH_2 -группы, так как известно, что интенсивность инфракрасных полос различных групп весьма чувствительна к изменению пространственного расположения соседних участков молекулы [30].

В интервале 2000 — 650 см^{-1} помимо уменьшения интенсивности всех полос наблюдается смещение некоторых полос ($1660, 1555, 1460, 1408$ и 1260 см^{-1}) в длинноволновую сторону, причем эта тенденция усиливается с повышением температуры (кривые 2, рис. 2—5). Максимальное смещение полос достигается при 200° и дальнейшее повышение температуры до 250° заметного влияния на положение этих полос не оказывает. Тобин и Каррано [8] при исследовании влияния нагревания на найлон-6 и найлон-11 также наблюдали смещение некоторых полос. В частности, у найлона-6 при 200° полоса 1650 см^{-1} смещается к 1680 см^{-1} ; полоса 1560 к 1520 см^{-1} , полоса 1465 к 1450 см^{-1} . Как видно, в отличие от найлона-6, у нас смещение у полосы 1660 см^{-1} наблюдается в сторону меньших частот. Кроме того, в нашем случае наблюдается также смещение полосы 1260 см^{-1} . Это отличие, по-видимому, связано с тем, что аминокислотный состав и структура найлона-6 и желатины в значительной степени различны. Наблюдаемые изменения в спектре желатины при нагревании в основном, так же как в случае найлона-6, можно объяснить разрушением кристаллической фазы и увеличением аморфной фазы. С другой стороны, наблюдаемое смещение полос весьма похоже на изменение спектра при переходе α -формы в β -форму [10—12]. В литературе есть упоминание о том, что значения частот инфракрасных полос желатины и коллагена идентичны и сходны с теми, которые наблюдаются для свернутых форм протеинов [19—20]. Наблюдаемые смещения полос поглощения желатины можно было бы истолковать как свидетельство перехода свернутой формы в растянутую. Однако ввиду недостаточной ясности в вопросе структуры желатины такое утверждение нам кажется преждевременным. Следовательно, смещение полос нами в основном интерпретируется как переход кристаллической фазы в аморфную. Весьма существенные изменения наблюдаются в спектре нагретой желатины на участке 1000 — 650 см^{-1} (рис. 6). Рассмотрение сводного графика показывает, что по мере повышения температуры на участке 1000 — 650 см^{-1} наблюдается ослабление фона, а также резкое уменьшение интенсивности полос 760 и 720 см^{-1} , причем полоса 760 см^{-1} при 250° совершенно исчезает. Ход изменений интенсивности полос 760 и 720 см^{-1} почти совпадает с ходом изменений интенсивности полосы 3090 см^{-1} , и, очевидно, резкое ослабление интенсивности можно интерпретировать как результат разрушения водородных связей при повышении температуры [26, 27]. Можно предполагать, что они относятся к *цис*-форме водородных связей.

При понижении температуры до комнатной (25°) на участке 420 — 650 см^{-1} спектр приблизительно приобретает прежний вид (кривые 3 рис. 2—5); вновь появляется полоса 3090 см^{-1} , причем интенсивность ее несколько выше, чем до нагревания. Это объясняется увеличением поглощения фона. Полосы 3680 и 3550 см^{-1} исчезают и на их месте появляются прежние крылья. Полосы $1660, 1555, 1460, 1408$ и 1260 см^{-1} , которые были смещены, снова возвращаются на прежние места. На участке 1000 — 650 см^{-1} также наблюдается появление прежних полос 760 и 720 см^{-1} . Однако, помимо перечисленных обратимых изменений, в спектре наблюдается ряд необратимых изменений. Например, увеличение общего поглощения по всему спектру 4200 — 650 см^{-1} можно интерпретировать как доказательство увеличения густоты сетки [31, 32], что может явиться следствием

образования новых химических связей. В самом деле, при сопоставлении результатов опытов, проведенных при разных температурах, видно, что по мере повышения температуры эта тенденция усиливается (рис. 2—5, кривые 3, 4). После охлаждения образцов, подвергшихся нагреванию при 250° , процесс спшивания звеньев желатины не прекращается, о чем свидетельствует дальнейший рост общего поглощения на участке $4200-650 \text{ см}^{-1}$ по истечении 20 час. (рис. 5, кривая 4). У тех образцов, которые были нагреты до 105 и 160° , этот процесс почти не наблюдается.

Выводы

1. Исследованы инфракрасные спектры пленок желатины в широком температурном интервале ($-160; 25; 105; 200; 250^\circ$). При понижении температуры до -160° в спектре наблюдается небольшое обратимое изменение, связанное в основном с процессом стеклования. При высоких температурах ($160; 200$ и 250°) в спектре наблюдается ряд обратимых и необратимых изменений.

Обратимые изменения выражаются в том, что:

- при повышении температуры происходит частичное разрушение водородных связей (в основном цис-водородных связей), что выражается в понижении интенсивности и исчезновении ряда полос поглощения;
- в спектре нагретых пленок некоторые полосы смещены в длинноволновую область, что интерпретируется как результат убыли кристаллической и увеличение аморфной фазы. Перечисленные обратимые изменения исчезают при понижении температуры образцов до комнатной.

Необратимые изменения в спектре выражены увеличением общего поглощения. Эти изменения истолковываются как результат увеличения густоты молекулярной сетки в желатине.

Научно-исследовательская лаборатория
при Министерстве здравоохранения
Союза ССР

Поступила в редакцию
30 III 1959

ЛИТЕРАТУРА

1. В. А. Пчелин, М. А. Салимов, Высокомолек. соед., 1, 681, 1959.
2. Н. Lenormant, Compt. rend Acad. Sci. (Paris), 221, 58, 1945.
3. Г. Е. Павловская, А. Г. Пасынский, Коллоидн. ж., 14, 239, 1952; 17, 305, 1955.
4. Л. Беллами. Инфракрасные спектры молекул, Изд. ин. лит., М., 1957.
5. Д. Н. Шигорин, Н. В. Михайлов, О. А. Клюева, Ж. физ. химии, 30, 1951, 1956.
6. H. Lenormant, Nuovo Cimento Supp. al., 3, 601, 1955.
7. R. D. Fraser, J. Chem. Phys., 24, 89, 1956.
8. T. Miyazawa, T. Shimanouchi, S. I. Mizushima, 24, 408, 1956.
9. S. J. Mizushima, T. Shimanouchi, M. T. Suboi, R. Seudo, J. am. chem. Soc., 74, 270, 1952. S. J. Mizushima, T. Shimanouchi, M. T. Suboi, T. Arakana, J. am. Chem. Soc., 79, 5357, 1957.
10. C. B. Kretschmer, J. Phys. Chem., 61, 16, 2, 7, 1957.
11. A. Elliot, B. R. Malcolm, Trans Farad. Soc., 52, 528, 1956.
12. H. Lenormant, Trans Farad. Soc., 52, 549, 1956.
13. E. J. Ambrose, A. Elliot, R. B. Templi, Nature, 163, 859, 1949.
14. W. T. Astbury, C. E. Dalglish, S. E. Darmont, Sutherland, G. B. B. M. Nature, 162, 596, 1948.
15. M. C. Tobin, M. J. Cargano, J. Chem. Phys., 25, 1044, 1956.
16. P. Holiday, Disc. Faraday Soc., 9, 325, 1950.
17. D. S. Trifan, J. F. Terenzi, J. Polymer Sci., 28, 443, 1958.
18. H. K. Kessler, G. B. B. M. Sutherland, J. Chem. Phys., 21, 571, 1953.
19. E. M. Bradbury, R. E. Burge, J. T. Randall, G. R. Wilkinson, Discuss. Faraday Soc., No 25, 1958, стр. 173, J. T. Randall. Nature Structure of Collagen, New York, London, 1953.
20. E. J. Ambrose, A. Elliot, Proc. Roy Soc. (London), A, 206, 206, 1951.
21. F. H. C. Crick, J. Chem. Phys., 208, 75, 1951.
22. R. M. Badger, A. D. Pullin, J. Chem. Phys., 22, 347, 1954, 22, 1142, 1954.

23. А. Л. Зайдес, Диссертация ЦНИКП, М., 1957.
24. В. А. Пчелин, Поверхностные свойства белковых веществ. Гизлэгпром, М., 1951, стр. 123.
25. Ю. А. Пентин, В. М. Татевский, Докл. АН СССР, 108, 290, 1956.
26. М. В. Большеништейн, О. Б. Птицын. О поведении водородных связей при стекловании (статья в сб. «Материалы X Всесоюзного совещания по спектроскопии», том 10, стр. 437). Изд-во Львовского ун-та, 1957.
27. Н. Д. Соколов, УФН, 57, 205, 1955.
28. Г. С. Ландсберг, Ф. С. Барышанская, Изв. АН СССР, сер. физ. 10, 1946, 509.
29. Н. Журков, Б. Я. Лекин, Вестник Ленинградского ун-та, № 3, 45, 1950.
30. Т. Л. Бровн, Chem. Revs., 58, 581, 1958.
31. М. А. Салимов, А. Ф. Постовская, А. С. Кузьминский, В. М. Татевский, Вестник МГУ, 1957, № 1, стр. 164; № 3, стр. 257. А. Ф. Постовская, М. А. Салимов, А. С. Кузьминский, В. М. Татевский, Материалы по 10-му совещанию по спектроскопии, том. 1. стр. 423, Изд. Львовского ун-та, 1957.
32. Н. А. Словохотова, В. О. Карпов, Изучение химических изменений в полимерных веществах под влиянием ионизирующих излучений методом колебательных спектров (статья в сб.: «Сборник работ по радиационной химии», Изд. АН СССР, М., 1955, стр. 196 и 206).
33. N. Alberg, R. M. Badger, J. chem. Phys., 29, 1193, 1956.
34. А. В. Лыков, Теория сушки, Госэнергоиздат, М.—Л., 1950.
35. R. E. Rundle, M. Ragasol, J. chem. Phys., 20, 1487, 1952.
36. A. M. Buswell, K. F. Krebs, W. H. Rodebusch, J. Phys. chemistry, 44, 1127, 1940; A. M. Buswell, K. F. Krebs, W. H. Rodebusch. J. Amer. Chem. Soc., 59, 2603, 1937.

**INFRARED SPECTRA OF GELATINE IN THE TEMPERATURE
RANGE FROM -160 TO 250°C**

M, A. Salimov, V. A. Pchelin

Summary

The effect of temperature on gelatine films has been studied over a wide range of temperatures (-160, 25, 105, 200 and 250°C). On lowering the temperature to -160°C a small reversible change in the spectrum is observed, connected mainly with the vitrification process. At high temperatures (160, 200 and 250°) a number of reversible and irreversible changes in the spectrum occur. The reversible changes find expression in particular in a fall in intensity and disappearance of a number of absorption bands brought about by the partial destruction of hydrogen (largely *cis*-hydrogen) bonds with rise in temperature. Some of the bands in the spectra of the heated films are shifted towards the longer wave length region. This is interpreted as the result of diminution of the crystalline and growth of the amorphous phase. The reversible changes disappear on bringing the specimens to room temperature. The irreversible changes in the spectrum are manifested in an increase in the over-all absorption. They are interpreted as the result of an increase in the molecular network density of the gelatine xerogel.