

**ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОЦЕССОВ ПЕРЕНОСА
И СТРУКТУРООБРАЗОВАНИЯ В ПОЛИМЕРГОМОЛОГИЧЕСКОМ
РЯДУ ПОЛИАКРИЛОВОЙ КИСЛОТЫ И ФРАКЦИОНИРОВАННОЙ
ЖЕЛАТИНЫ**

*B. A. Каргин, P. V. Козлов, C. Я. Мирлина,
Z. A. Капралова, P. F. Чеботкевич*

Современные методы исследования позволили установить сложное структурное строение белковых частиц и подтвердили предположение о том, что молекулы белка состоят из мелких субъединиц [1—7].

В наших предыдущих работах [8, 10] по исследованию переноса желатины через непористые мембранны в процессе высоковольтного электрофореза, а также после действия на растворы желатины ультразвука и химических реагентов, было обнаружено возникновение фибриллярных структурных образований.

Было предположено, что указанные воздействия вызывают тонкое диспергирование белка на элементарные структурные субъединицы — блоки, способные к последующим процессам структурообразования. Нам казалось необходимым поставить контрольные исследования по проникновению через мембрану синтетических карбоцепных полимеров, где возможность распада цепей на подобные блоки в водных растворах и при обычных температурах совершенно исключается.

В качестве такого контрольного вещества была выбрана полиакриловая кислота (ПАК). Таким образом, в задачу данной работы входило получение сравнимых данных по переносу устойчивой ПАК и желатины через одни и те же мембранны в идентичных условиях эксперимента.

Методика

Объектами исследования являлись ПАК и образцы фракционированной желатины.

Полиакриловая кислота получалась двумя методами: а) фотополимеризацией 50%-ных растворов свежеперегнанной акриловой кислоты в атмосфере аргона при комнатной температуре. Облучение проводилось лампой мощностью 375 вт в течение 10 час. Полученная полиакриловая кислота растворялась в бидистилляте и фракционировалась методом последовательного растворения набухшей кислоты в кипящем бидистилляте.

Были получены растворы полиакриловой кислоты следующих молекулярных весов: 13 800; 21 800; 57 500; 85 300 и 127 600. Вязкость растворов измерялась вискозиметром типа Убеллоде. Молекулярный вес рассчитывался по формуле Штаудингера [12] $[\eta] = M \cdot 0,85 \cdot 10^{-5}$;

б) радикальной полимеризацией 24%-ных растворов полиакриловой кислоты, которая проводилась в присутствии инициатора — 1 и 2% перекиси водорода в запаянной ампуле в атмосфере аргона при температуре 60° в течение 200 час. Средний молекулярный вес полученной полиакриловой кислоты — $M = 1300$ (1% H_2O_2) и $M = 847$ (2% H_2O_2).

Образцы желатины перед фракционированием освобождались от низкомолекулярных примесей электродиализом их растворов.

Фракционирование желатины осуществляли следующим образом: вначале раствор желатины подвергался гидролизу кипячением, а затем желатина осаждалась этиловым спиртом. В зависимости от времени гидролиза (1,5 и 16 час.) были получены две фракции желатины с молекулярными весами соответственно 64 500 и 35 500 *.

Молекулярный вес желатины рассчитывался по формуле Пурадье и Вене [13]; $[\eta] = KM$, где $K = 1,30 \cdot 10^{-5}$ [11] и $\gamma = 0,855$. Электродиализ растворов ПАК и желатины проводили в высоковольтном пятикамерном электродиализаторе, подробно описанном в работах [12, 8], при температурах 37—40° при наложении разности потенциалов до 2,5 кв. В качестве мембранны была использована целлофановая пленка; толщина пленки 0,03 мм, степень набухания 58 %. Диализуемый раствор вводили в среднюю камеру, остальные четыре камеры заполняли бидистиллированной водой. При наложении разности потенциалов к электродам исследуемые растворы прежде всего очищались от присутствующих в них ионных примесей. Частая смена воды в дополнительных камерах, играющих роль «электрических ловушек», предотвращала обратную диффузию.

Растворы из боковых камер в конце каждого дня сливало для исследования. Ежедневно определяли количество и молекулярные веса поликариловой кислоты и желатины, перенесенных в боковые камеры; периодически определяли концентрацию и молекулярный вес растворов ПАК и желатины, находящихся в средней камере. Концентрацию растворов ПАК определяли высушиванием при 100° до постоянного веса, а растворов желатины лиофильной сушкой. Кроме того, растворы ПАК и желатины в средней камере, а также в боковых камерах исследовали под электронным микроскопом. В этой работе использовали электронный микроскоп типа JEM-5I при прямом электроннооптическом увеличении от $\times 15\,000$ до $\times 85\,000$. Образцы, нанесенные на коллоксилиновую подложку, оттеняли хромом на вакуумной установке ВУП-2.

Поликариловая кислота молекулярного веса 57 500 ($c = 0,08\%$) и 127 600 ($c = 0,09\%$) подвергалась облучению ультразвуком на специальной установке лаборатории анизотропных структур АН СССР. Используемая мощность $50\text{ вт}/\text{см}^2$ при времени воздействия 5 и 10 сек. и кратности воздействия 1, 5, 10 раз. Растворы охлаждались таким образом, чтобы в процессе облучения температура исследуемых растворов не превышала 20°. Растворы поликариловой кислоты исследовали под электронным микроскопом до и после облучения, а также определяли вязкость этих растворов.

Экспериментальные данные

Поликариловая кислота. Электродиализ растворов полимергомологического ряда поликариловой кислоты проводили с целью определения наибольшего молекулярного веса, при котором ПАК еще способна проникать через полимерную мембрану. Исследовали четыре фракции ПАК с молекулярными весами 127 600, 85 300, 21 800 и 13 860. Абсолютные количества ПАК, выносимые в анодную камеру, настолько малы, что исключали возможность периодического определения ее молекулярного веса. Чем меньше молекулярный вес ПАК, тем больше в ней выносимых низкомолекулярных фракций. Соответственно, молекулярный вес в средней камере после диализа увеличивался тем больше, чем большее выносилось низкомолекулярных фракций. Так, например, молекулярный вес для фракции ПАК $M=127\,600$ возрастал к концу диа-

* Фракционирование растворов желатины было произведено Р. В. Маркиной, за что авторы приносят ей большую благодарность.

лиза до 294 600 (в 2, 3 раза), а для фракции $M=13\,800$ до 565 000 (в 40 раз).

Для каждой фракции полиакриловой кислоты была исследована зависимость скорости переноса кислоты через мембрану (в $\text{г}/\text{час}$) от времени электродиализа. Чем меньше молекулярный вес ПАК, тем быстрее она переносится через мембрану. Однако вследствие различной начальной концентрации фракций полиакриловой кислоты не представлялось возможным установить зависимость скорости переноса кислоты от ее молекулярного веса. Поэтому была рассчитана скорость переноса полиакриловой кислоты на единицу исходного веса вещества $\text{г}/\text{час}/1 \text{ г ПАК}$.

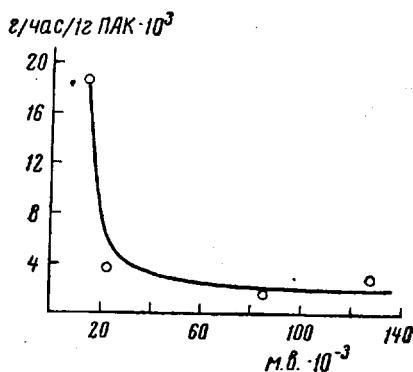


Рис. 1

Рис. 1. Зависимость скорости переноса 1 г ПАК от молекулярного веса кислоты в средней камере

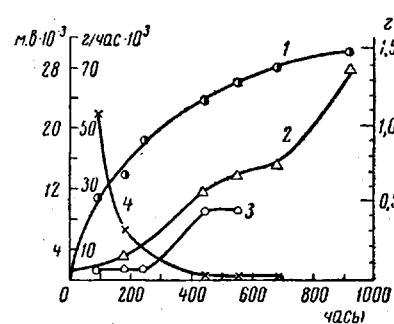


Рис. 2

Рис. 2. Электролиз раствора ПАК $M = 1300$:

1 — зависимость количества перенесенной ПАК от времени диализа; 2 — зависимость молекулярного веса ПАК в средней камере от времени диализа; 3 — зависимость молекулярного веса ПАК, вынесенной в боковую камеру, от времени диализа;
4 — зависимость скорости переноса кислоты от времени диализа

Значение скорости переноса ПАК в $\text{г}/\text{час}/\text{г ПАК}$ в зависимости от ее молекулярного веса приведены на рис. 1.

Можно видеть, что с увеличением молекулярного веса ПАК скорость переноса 1 г ее через мембрану уменьшается с $18,6 \cdot 10^{-3} \text{ г}/\text{час}$ для $M = 13\,800$ до $2,84 \cdot 10^{-3}$ для кислоты с $M = 127\,600$.

Затем проводили электродиализ нефракционированной полиакриловой кислоты молекулярного веса $M = 1\,300$. Электродиализ 19,1% раствора указанной полиакриловой кислоты проводили при температуре $35-40^\circ$ в течение 933,5 часа. Экспериментальные данные представлены на рис. 2.

Количество кислоты, прошедшее через мембрану за время диализа, составляло 96,3%; из них 84,2% — низкомолекулярные фракции, прошедшие в ловушки, и 12,1% — ПАК, прошедшая в анодную камеру. Молекулярный вес исходной полиакриловой кислоты, а также перенесенной через мембрану определяли через каждые 80—100 час. За время проведения электродиализа (933,5 часа) молекулярный вес ПАК в средней камере возрос с 1300 до 27 600, т. е. в 21 раз.

Из рассмотрения кривых рис. 2 можно прийти к следующему заключению.

С увеличением молекулярного веса кислоты в средней камере скорость ее переноса через мембрану резко уменьшается (кривая 4). Вынос ПАК в анодную камеру сначала увеличивается пропорционально времени электродиализа, а затем приближается к некоторому пределу (кривая 1). При напряжении выше 2 кв молекулярный вес ПАК в средней камере начинает очень быстро расти и через 250 часов достигает 27 600. Молекулярный вес кислоты, перенесенной в анодную камеру, растет во времени диализа до тех пор, пока не достигнет предельного значения

8900. При этом скорость переноса ПАК становится очень незначительной ($0,48 \cdot 10^{-3}$ г/час).

Для выяснения вопроса о том, происходит ли последующее структурообразование в растворах ПАК, прошедшей через мембрану, было проведено электронномикроскопическое исследование растворов полиакриловой кислоты, перенесенной в анодную камеру, а также раствора в средней камере в процессе электродиализа. Электронномикроскопические

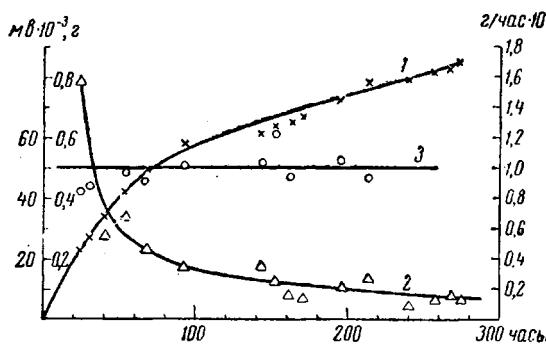


Рис. 3. Электродиализ желатины
 $M = 64\ 500$:
1 — количество желатины, прошедшее в боковую камеру, в зависимости от времени диализа; 2 — зависимость скорости переноса желатины от времени диализа; 3 — молекулярный вес желатины, прошедшей мембранный в течение электродиализа

снимки кислоты, прошедшей мембрану и взятой из средней камеры представляют собой хорошо образованные глобулы, характерные для полиакриловой кислоты [9].

Таким образом, при электродиализе в растворах полиакриловой кислоты с $M = 1300$, прошедшей мембрану, структурообразования не происходит. Электродиализ ПАК молекулярного веса $M = 847$ проводили с 12,19%-ными растворами кислоты при $37-40^\circ$ в течение 606 час. Концентрация ПАК через 606 час. составляла $0,36 \cdot 10^{-3}$ г/100 см³. Количество кислоты, прошедшее через мембрану, составляло 97,5 %. Молекулярный вес ПАК в средней камере после проведения электродиализа оказался равным 2300, а молекулярный вес кислоты, прошедшей в анодную камеру, около 800.

Таким образом, результаты этого опыта также показывают, что при электродиализе полиакриловой кислоты молекулярного веса $M = 847$ идет только процесс фракционирования.

Также не происходит структурообразования в растворах полиакриловой кислоты, подвергнутых облучению ультразвуком.

Электронномикроскопические снимки полиакриловой кислоты после облучения показали, что структура полиакриловой кислоты не отличалась от глобулярной структуры исходной ПАК.

Фракционированная желатина. В предыдущих работах явления переноса белков через непористые мембранны исследовались на ряде объектов, в том числе и на желатине [10].

Представляло интерес исследовать процессы переноса через такие же целлофановые мембранны и в тех же условиях в растворах фракционированной желатины для сравнения их с процессами, происходящими при электродиализе синтетических полиэлектролитов (ПАК). Как указывалось выше, исследованию подвергались две фракции желатины с $M = 64\ 500$ и $M = 35\ 500$.

а) Электродиализ 4,5% растворов желатины с $M = 64\ 500$ проводили при температуре $38-40^\circ$ в течение 272 часов. Экспериментальные результаты представлены на рис. 3.

Количество желатины, перенесенное через мембранны в боковые камеры, составляло 84,4 %.

Из рис. 3 видно, что количество желатины, прошедшее в катодную камеру, увеличивается в зависимости от времени диализа (кривая 1), а скорость переноса медленно уменьшается (кривая 2). Молекулярные

веса желатины, прошедшей в катодную камеру, колеблются за время диализа в пределах с 41 700 до 62 000 (кривая 3).

В средней камере молекулярный вес желатины уменьшился незначительно (с 64 500 до 64 000), хотя концентрация желатины уменьшилась с 4,5 до 0,7%.

б) Электродиализ 4,5% растворов желатины с $M=35\ 500$ проводили в течение 223,5 часа при температуре 38—40°. Интересно было выяснить

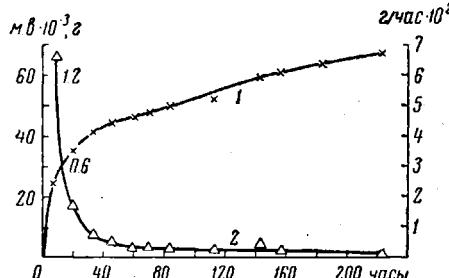


Рис. 4. Электродиализ желатины $M=35\ 500$:

1 — количество желатины, прошедшее в боковую камеру в зависимости от времени диализа; 2 — зависимость скорости переноса желатины от времени диализа.

в этом случае молекулярный вес желатины, переносимый в боковую камеру. Результаты исследования представлены на рис. 4.

Через 223,5 часа концентрация желатины в средней камере уменьшилась с 4,5 г/100 см³ до 0,39 г/100 см³, т. е. в 11,6 раза, а молекулярный вес изменился незначительно. За это время через мембранны перенесено 4,11 г желатины, т. е. 91,5%.

Вынос желатины со временем увеличивается (кривая 1) и приближается к некоторому пределу, когда концентрация желатины в средней камере становится незначительной (меньше 0,4 г/100 см³).

Молекулярный вес желатины, перенесенной в боковую камеру, колеблется в пределах 31 000—52 000. Очевидно, при электродиализе фракции желатины с $M=35\ 500$ происходит диспергирование желатины на субчастицы, способные соединяться с образованием более устойчивых частиц с молекулярным весом, кратным субчастице.

При наложении электрического поля независимо от молекулярного веса желатины происходит разрыв водородных связей и связей между ионогенными группами белка, что должно облегчить разделение частиц желатины на субъединицы — блоки.

Сложное строение частиц желатины, полученной из коллагена, обработанного щелочью, было доказано многими исследованиями. Так, например, Куртс и Стейнси [1] считают, что частицы желатины представляют собой как одиночные полипептидные цепи с молекулярным весом 60—70 000, так и продольно-ассоциированные частицы с молекулярным весом 300 000.

В то же время Геллоп и др. [3] показали, что частицы желатины можно расщепить на блоки с молекулярным весом 20 000, способные ассоциировать под действием водородных связей и при электростатическом взаимодействии ионогенных групп.

Перенос таких блоков через мембрану должен способствовать последующему образованию нитеобразных структур, стабилизирующихся в результате межмолекулярного взаимодействия. Это предположение подтверждено электронномикроскопическими фотографиями желатины, прошедшей в боковую камеру [10].

Выводы

В работе были исследованы процессы переноса через непористую мембрану при высоковольтном электродиализе и последующего структурообразования в синтетических полизэлектролитах (ПАК) и желатине.

Показано, что при электродиализе в синтетических полизэлектролитах идут процессы фракционирования по молекулярным весам. При этом

после переноса последующего структурообразования не происходит. Молекулярный вес перенесенной через мембрану фракции лимитируется молекулярным весом исходного полиэлектролита и в наших исследованиях не превышал 10 000 — 15 000.

При электродиализе белков (например, желатины) происходит диспергирование их с образованием субчастиц — блоков, способных к последующему структурообразованию. Поэтому молекулярный вес желатины, перенесенной через мембранны, не зависит от молекулярного веса исходной желатины.

Московский государственный
университет им. М. В. Ломоносова

Поступила в редакцию
15 VIII 1962

ЛИТЕРАТУРА

1. A. Coupts, G. Stainsly, Recent Advances in Gelatin and Glue Research, London, 1958.
2. A. G. Ward, J. Photogr. Sci., 9, 56, 1961; A. G. Ward, Angew. Chemie., 71, 704, 1959.
3. P. M. Gallop, S. Seifeit, E. Meilmann, Nature, 183, 1659, 1958.
4. S. T. S. Wright, Nature, 193, 335, 1962.
5. A. G. Hodge, Schmitt Proc. Nat. Acad. Sci., 44, 418, 1958.
6. E. Frederico, J. Amer. Chem. Soc., 79, 599, 1957.
7. В. А. Кргин, Т. И. Смирнова, А. В. Корякин, Биохимия, 26, 800, 1961.
8. В. А. Каргин, П. В. Козлов, С. Я. Мирлина, З. А. Капралова, Высокомолек. соед., 4, 167, 1962.
9. В. А. Каргин, Н. Ф. Бакеев, Коллоидный ж., 29, 133, 1957.
10. З. А. Капралова, С. Я. Мирлина, П. В. Козлов, В. А. Каргин, Л. Попова, Высокомолек. соед., 4, 321, 1962.
11. Б. В. Дерягин и С. М. Леви, Физ. химия нанесения тонких слоев на движущуюся подложку, Изд. АН СССР, стр. 90, 1959.
12. Г. Штадингер, Высокомолек. органич. соединения ГОНТИ, 1935.
13. G. Bougadier et A. M. Venet, J. Chim. phys., 47, 391, 1950.
14. В. А. Каргин, Т. А. Матвеева, Докл. АН СССР, 105, 294, 1955.

TRANSPORT AND STRUCTURATION PROCESSES IN THE POLYMEROHOMOLOGOUS SERIES OF POLYACRYLIC ACID AND FRACTIONATED GELATIN

*V. A. Kargin, P. V. Kozlov, S. Ya. Mirlina, Z. A. Kapralova,
P. F. Chebotkevich*

S u m m a r y

Mass transport through a semipermeable membrane during high-voltage electrodialysis and subsequent structuration of the transported particles has been investigated on synthetic polyelectrolytes polyacrylic acid (PA) and on gelatin. It has been shown that in the process of electrodialysis fractionation of the synthetic polyelectrolytes with respect to molecular weight takes place, no subsequent structuration occurring in the transported particles. The molecular weight of the fraction passing through the membrane is limited by the molecular weight of the initial polyelectrolyte, not exceeding in the present case 10 000—15 000. In the electrodialysis of proteins (for instance gelatin) dispersion takes place with the formation of sub-particulate blocks that are capable of subsequent structuration. Hence the molecular weight of gelatin transported through the membrane is independent of the molecular weight of the initial specimen.