

ВЫСОКОМОЛЕКУЛЯРНЫЕ

Том (A) XXI

СОЕДИНЕНИЯ

№ 6

1979

УДК 541.64:668.317

ВЛИЯНИЕ СПОСОБА СОЗДАНИЯ ХИМИЧЕСКОЙ СЕТКИ НА СВОЙСТВА СТУДНЕЙ ЖЕЛАТИНЫ

*Роговина Л.З., Васильев В.Г., Малкис Н.И.,
Слонимский Г.Л., Титова Е.Ф., Белавцева Е.М.*

Проведено исследование влияния условий химической сшивки на механические свойства и надмолекулярную структуру студней желатины. Показано, что химическая сшивка в растворе не может привести к существенному возрастанию модуля упругости студня. Предотвращение спиралеобразования в результате образования химических связей в растворе препятствует студнеобразованию путем образования межмолекулярных связей и приводит к отсутствию надмолекулярной структуры студня. Наоборот, проведение химической сшивки готового студня, образованного межмолекулярными связями, существенно повышает его модуль упругости. Обнаруженная зависимость структуры и свойств сшитых студней желатины от конформации сшиваемой макромолекулы может иметь общее значение для сшиваемых в растворе полимерных систем.

Одним из возможных применений студней различных полимеров является использование их в качестве материалов, позволяющих моделировать распределение напряжений в горных породах, строительных конструкциях и других подобных системах [1]. Наиболее распространенным материалом, применяемым в течение ряда лет для этих целей, являются водно-глицериновые студни желатины. В настоящее время возникают задачи, требующие существенного улучшения некоторых свойств применяемых студней, а именно повышения их стабильности во времени и в более широком интервале температур, уменьшения ползучести, а также увеличения хрупкости студней. Для решения этих задач мы выбрали путь создания химической сетки в студнях желатины.

В данной работе исследованы вязкоупругие свойства и надмолекулярная структура химически сшитых водных студней желатины и зависимость структуры и свойств от условий образования пространственной сетки. При этом естественно было ожидать, что сшитые химическими связями студни обладают, по сравнению с обычными студнями желатины, образованными межмолекулярными связями, большим мгновенным модулем упругости вследствие увеличения общего числа узлов в сетке и меньшей необратимой ползучестью вследствие большей прочности этих узлов.

Однако в процессе исследования оказалось, что свойства сетки, возникающей при наличии в системе большого количества растворителя, зависят от конформации сшиваемой макромолекулы не в меньшей, а иногда даже в большей степени, чем от числа химических узлов в сетке. На изучении проявления этих особенностей мы и остановились в данной работе.

Наиболее распространенными сшивающими агентами для коллагена и желатины являются альдегиды [2]. В работе использован формальдегид в виде его 37%-ного водного раствора — формалина.

Как известно, взаимодействие альдегидов с белками протекает по основным группам белка [3, 4], которые в желатине составляют 4–5% [5]. Поэтому возрас-

тание степени спивки с увеличением количества формальдегида возможно только до тех пор, пока не исчерпаны все эти группы.

Однако реакция между альдегидом и аминогруппами может приводить к образованию не только межмолекулярных, но и внутримолекулярных связей, причем вероятность образования последних возрастает с уменьшением концентрации желатины в растворе. В работе [6] показано, что количество формальдегида, необходимое для начала студнеобразования, составляет для 20%-ного раствора 4 моль/л или 1,3 молекулы/моль желатины, или $6 \cdot 10^{-4}$ г/г сухой желатины; 6,3%-ного — 10 моль/л или 1,3 молекулы/моль желатины, или $6 \cdot 10^{-4}$ г/г сухой желатины, 3,2%-ного — 16 моль/л или 30,5 молекулы/моль желатины, или $2,4 \cdot 10^{-3}$ г/г сухой желатины, а в 2%-ном растворе желатины студень не образуется даже при очень большом содержании формальдегида.

Известно, что полнота и скорость реакции взаимодействия формальдегида с желатиной возрастают при увеличении pH раствора вследствие протонирования основных групп, а также при повышении температуры [4]. Поэтому в данной работе реакцию спшивания желатины проводили при температуре 60° и pH 9,18 в течение 3 час. Выбор температуры 60° определяли не только кинетическими соображениями,

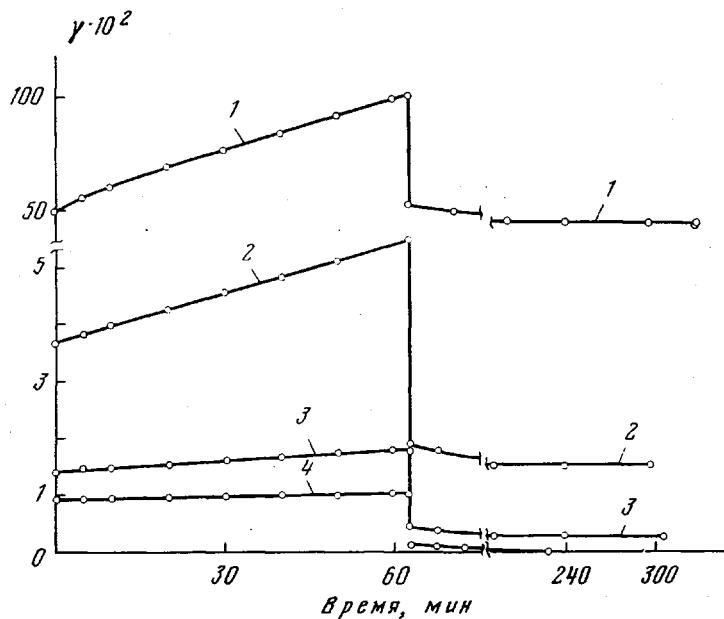


Рис. 1. Зависимость ползучести 5%-ных студней желатины, спитых и испытанных при 60°, от содержания формальдегида при его концентрации: 0,02 (1); 0,05 (2); 0,1 (3); 0,2 г на 1 г сухой желатины (4); γ — деформация в относительных единицах

по и тем, что она достаточно превышает температуру перехода клубок — спираль и температуру образования студня желатины за счет межмолекулярных связей, и в то же время при этой температуре еще не происходит деструкция макромолекул желатины.

Концентрация желатины в растворе составляла 5 и 20%, а концентрация формальдегида 0,02; 0,05; 0,1 и 0,2 г на 1 г сухой желатины, что соответствует 1; 2,5; 5 и 10 молям формальдегида на моль основных групп желатины.

Вязкоупругие свойства полученных студней исследовали в сконструированном нами ротационном вискозиметре постоянного напряжения сдвига [7] при напряжении 78 дин/см² и температурах от 60 до 20°, а также на эластопластометре. Оптическое вращение студней измеряли на поляриметре «POLAMAT» со специально изготовленной кюветой. Объекты для электронно-микроскопического исследования preparedиали методом замораживания — травления [8]. Снимки получали на просвечивающем электронном микроскопе ЭМЛ-100В при увеличении 10 000 с последующим оптическим увеличением.

Из рис. 1 видно, что при концентрации желатины 5% и непосредственно при температуре спшивки, равной 60°, увеличение концентрации формальдегида приводит к возрастанию модуля упругости и уменьшению ползучести студня. Возрастание модуля упругости свидетельствует об увели-

чении числа узлов в сетке. Наличие необратимой ползучести, несмотря на химическую свивку, свидетельствует о лабильности образовавшихся связей между желатиной и формальдегидом, частично разрушающихся под действием нагрузки. Только при возрастании содержания формальдегида до 0,2 г на 1 г сухой желатины частота сетки увеличивается настолько, что необратимая ползучесть полностью исчезает.

С понижением температуры, как это видно из рис. 2, необратимая ползучесть уменьшается, и при 40° даже при содержании формальдегида 0,05 г/1 г сухой желатины ползучесть полностью обратима. При дальней-

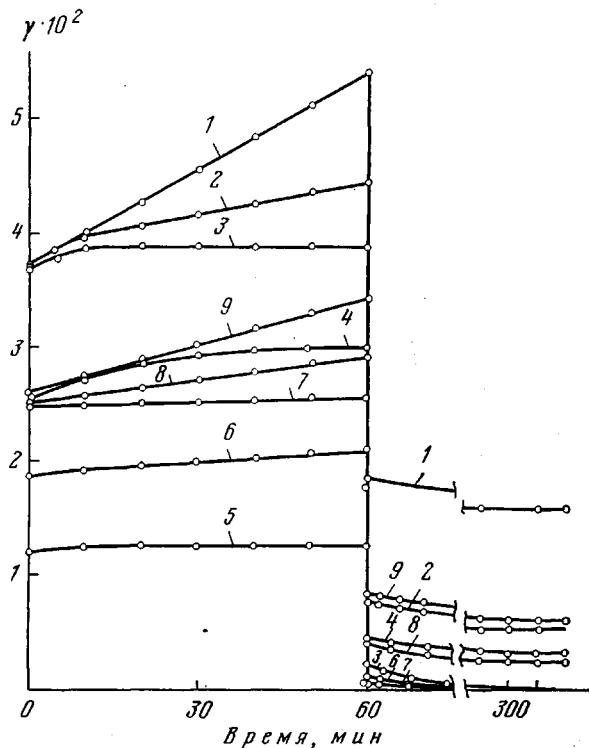


Рис. 2. Температурная зависимость ползучести спищих при 60° 5%-ных студней желатины при понижении температуры от 60 до 20° (кривые 1-5) и при повышении температуры от 20 до 60° (кривые 6-9): 1 - 60; 2 - 50; 3 - 40; 4 - 30; 5 - 20; 6 - 30; 7 - 40; 8 - 50 и 9 - 60°

шем понижении температуры с 30° вновь возникает необратимая ползучесть. Если же охлажденные до 20° и выдержаные при этой температуре студни исследовать в режиме возрастающей температуры, то, как видно из рис. 2, значение модуля упругости оказывается выше значений, измеренных при тех же температурах, но в режиме охлаждения спищего при 60° студня; кроме того, обнаруживается необратимость ползучести при температуре 40°, при которой в режиме охлаждения студня наблюдалась полная ее обратимость.

На рис. 3 показано изменение ползучести студней желатины, спищих при 60° при различном содержании формальдегида, охлажденных до 20°, выдержанных при этой температуре в течение 17 час. и испытанных также при 20°. Из рис. 4 можно видеть, что, хотя полученный из этих графиков модуль упругости возрастает с увеличением содержания формальдегида, но при малых концентрациях формальдегида его значение значительно ниже значения модуля упругости неспищего студня и даже при содержании формальдегида 0,1 г/1 г сухой желатины не достигает значения модуля упругости неспищего студня; при дальнейшем увеличении содержания формальдегида рост модуля упругости прекращается.

Из рис. 4 видно также, что возникновение минимума и появление горизонтальной площадки на графике зависимости модуля упругости от содержания формальдегида происходит не только при 20° , но и при 25° , т. е. начиная с той температуры, когда становится возможным образование межмолекулярных связей.

Полученные результаты указывают на большую роль конформации макромолекулы в формировании комплекса свойств сетки, образованной в растворе. Как известно, при 60° макромолекулы желатины имеют конформацию клубка, и поэтому в результате спшивки образуется сетка, между узлами которой расположены молекулы в конформации клубка. При по-

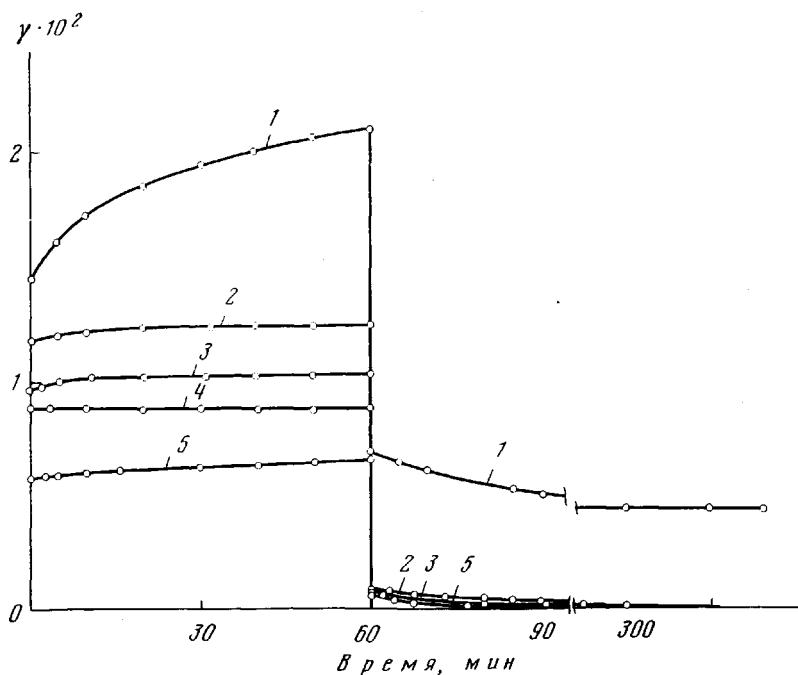


Рис. 3. Зависимость ползучести 5%-ных студней желатины, спищих при 60° , охлажденных до 20° и выдержанных в течение 17 час. и испытанных при 20° , от содержания формальдегида при его концентрации: 0,02 (1); 0,05 (2); 0,1 (3); 0,2 (4); и 0 (5) г на 1 г сухой желатины

нижении температуры ниже температуры перехода клубок — спираль (35°) макромолекула переходит в состояние спирали, и несколько ниже этой температуры становится возможным обычное студнеобразование желатины за счет образования пространственной сетки лабильными межмолекулярными связями. Согласно методике [9], пространственная сетка в студнях желатины образуется не солевыми или водородными связями между карбоксильными, аминными или гидроксильными боковыми группами, а главным образом при возникновении водородных связей между цептидными группами основных цепей макромолекул желатины.

Таким образом, ниже 30° на сетку химических связей в студне накладывается сетка межмолекулярных связей. Эти образующиеся межмолекулярные связи являются причиной дополнительного роста модуля упругости при понижении температуры от 30 до 20° , а также появления в этой области температур необратимой ползучести в результате разрушения межмолекулярных связей под действием нагрузки, что характерно для неспищих водных студней желатины [10].

Известно, что спшивка желатины формальдегидом в растворе препятствует процессу спиралеобразования и при определенной концентрации формальдегида полностью предотвращает спиралеобразование [11].

Из рис. 5 видно, что в интервале выбранных нами концентраций формальдегида оптическое вращение, характеризующее, как известно, степень спирализации макромолекул, возрастает при понижении температуры раствора, но с увеличением концентрации формальдегида оно не достигает значения оптического вращения неспищего студня, т. е. спиральные конформации в спищом охлажденном студне реализуются, но доля их уменьшается с увеличением степени спшивки. При концентрации формальдегида 0,2 г/1 г сухой желатины частота сетки достигает такой величины, что оптическое вращение остается почти неизменным при охлаждении студня, что означает практически полное отсутствие спиралеобразования. Следствием этого является почти полная независимость модуля упругости от температуры при охлаждении студня от 60 до 20° (кривые 4 на рис. 1

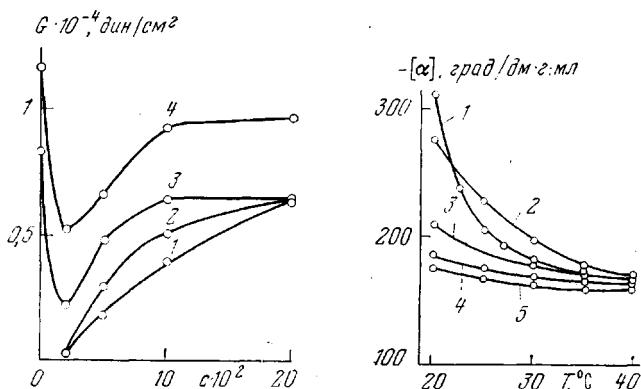


Рис. 4

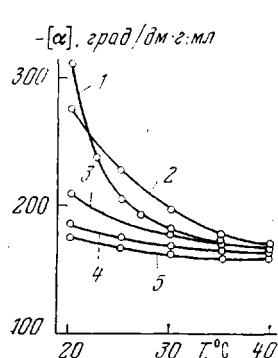


Рис. 5

Рис. 4. Зависимость модуля упругости 5%-ных студней желатины от содержания формальдегида (г на 1 г сухой желатины), спищих при 60° и испытанных при температурах 60 и 40 (1); 30 (2), 25 (3), 20° (4)

Рис. 5. Зависимость изменения оптического вращения 5%-ных студней желатины при понижении температуры от содержания формальдегида при его концентрации: 0 (1); 0,02 (2); 0,05 (3); 0,1 (4); 0,2 (5) г на 1 г сухой желатины

и 3) и полностью обратимая ползучесть при 20°, т. е. отсутствие сетки межмолекулярных связей. По-видимому, фиксированная наличием спицок конформация клубка препятствует образованию межмолекулярных связей между пептидными группами. Таким образом, предотвращение спиралеобразования путем химической спшивки позволило однозначно показать, что в отсутствие спиралеобразования обычное студнеобразование желатины за счет возникновения межмолекулярных связей невозможно.

Как следует из данных, приведенных на рис. 3 и 4, уменьшение доли спиральных конформаций, приводящее к снижению возможности образования межмолекулярных связей между пептидными группами, оказывает большее влияние на модуль упругости студня, чем возникновение дополнительного количества связей за счет химической спшивки. При содержании формальдегида 0,02 г на 1 г сухой желатины модуль упругости студня при 20° резко уменьшается по сравнению с неспищим студнем, хотя он существенно увеличивается по сравнению с модулем упругости этого же студня при 60°, что свидетельствует о возникновении в нем большого числа межмолекулярных связей. То же наблюдается и при 25°. По-видимому, даже незначительного нарушения спиральности, происходящего при данном содержании формальдегида, достаточно для резкого изменения условий образования межмолекулярной сетки. Только при содержании формальдегида 0,1 г/1 г сухой желатины число узлов, образованных химическими связями, оказывается достаточным, чтобы компенсировать, хотя и

не полностью, отсутствие узлов между пептидными группами по сравнению с неспищим студнем.

В этой связи интересно различие значений модулей упругости и хода кривых ползучести, полученных при охлаждении спищих при 60° студней до 25° и при повторном их нагревании до 60° (рис. 2). Нам представляется, что более высокое значение мгновенного модуля упругости и большая ползучесть студней, предварительно выдержаных при 20° , могут быть связаны с тем, что те узлы межмолекулярной сетки, которые смогли образоваться на спиральных участках макромолекулы благодаря наличию спишки, оказываются более упорядоченными, чем в неспищем студне, что выражается в большей их устойчивости к температуре, и поэтому выше 30° они еще частично сохраняются и постоянно разрушаются под действием приложенной нагрузки.

Важно отметить, что применяемые концентрации формальдегида являются только относительной мерой частоты спишки, поскольку часть введенного формальдегида вообще не вступает в реакцию, а часть идет на образование внутримолекулярных связей. В работе [12] показано, что отношение связанного формальдегида к дозированному составляет всего 0,0013 в 2%-ном растворе желатины при 20° и pH 9,0. Определение связанного формальдегида после отмычки водой и отгонки формальдегида в кислой среде методом иодометрического титрования [13] показало, что в наших условиях спишки связывает значительно большее количество формальдегида, а именно 75% от дозированного, сюда же входит и формальдегид, связанный внутримолекулярно. Истинное число узлов в сетке студня при 60° можно было бы оценить по формулам теории высокопластичности, поскольку в этом случае отсутствует, как будет видно ниже, надмолекулярная структура. Однако это возможно только в условиях равновесного набухания сетки.

Проведенные опыты показали, что равновесное набухание не удается реализовать, поскольку оно достигается в течение длительного времени, за которое происходит загнивание желатины. Ориентировочная оценка показывает, что число узлов в сетке весьма мало.

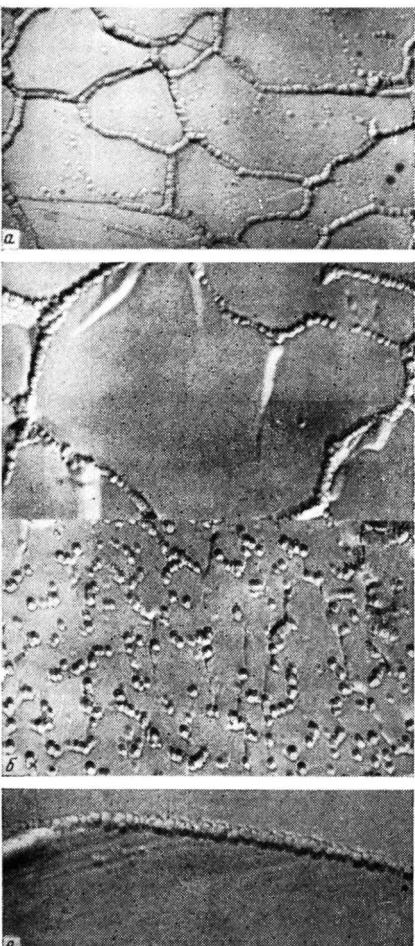


Рис. 6. Электронные микрофотографии 5%-ных студней желатины, спищих при 60° разным количеством формальдегида и охлажденных до 20° : *a* – 0; *b* – 0,1 (разные участки); *c* – 0,2 г формальдегида на 1 г желатины; $\times 20\,000$

Представляло большой интерес выяснение вопроса о том, как изменение конформаций макромолекул в сетке влияет на надмолекулярную структуру студня. На рис. 6 приведены электронные микрофотографии 5%-ных студней желатины (при 20°) при различном содержании формальдегида, а также 5%-ного студня, содержащего 10% формальдегида (при 60°), которые сопоставлены с опубликованными данными для неспищего 5%-ного

студня [14]. Оказалось, что студень, сшитый при 60° , характеризуется при этой температуре полной бесструктурностью, т. е. отсутствие спиральности позволяет получить студень с макромолекулярной сеткой. Однако сшитые студни, выдержаные при 20° , обладают надмолекулярной структурой. Студни, содержащие 5 и 10% формальдегида, имеют структуру пространственной сетки, образованной фибрillами, состоящими из глобулярных частиц, т. е. аналогичную структуре, установленной в последние годы для несшитых водных студней желатины. Кроме того, для 5%-ного студня желатины, содержащего 10% формальдегида, наблюдаются структуры, представляющие собой линейные агрегаты, состоящие из 2–5 глобулярных частиц. Однако число узлов в этой сетке уменьшается с возрастанием частоты химической сшивки, поскольку фиксируются узлы

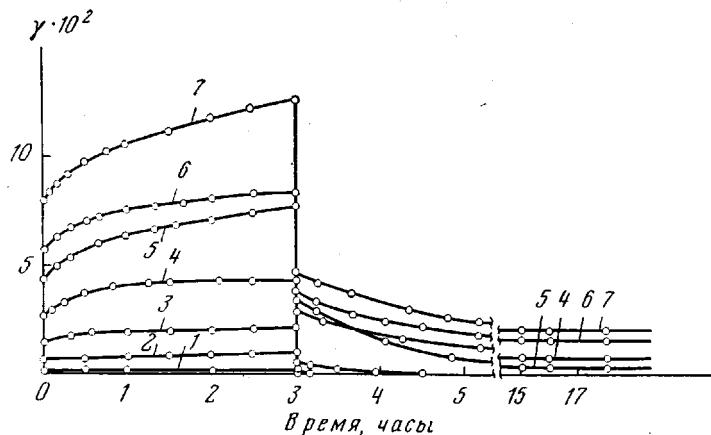


Рис. 7. Ползучесть 5%-ных студней желатины, химически сшитых погружением в 10%-ный раствор формальдегида студней, предварительно образованных в течение 17 час. при 5° ; сшивка при 20° в течение 14 суток (1), 24 (2); 3 (3); 1 (4); 0 (5) час. Для сравнения приведена ползучесть спицких в растворе при 60° студней при содержании формальдегида 0,20 (6) и 0,05 (7) г на 1 г желатины

между надмолекулярными образованиями, которые, очевидно, прямо связаны с долей спиральной конформации. Так, если в несшитом студне имеется $7 \cdot 10^{13}$ узлов/ см^3 , то в студнях, сшитых растворами, содержащими 0,02 и 0,05 г формальдегида на 1 г желатины, имеется $3,5 \cdot 10^{13}$ узлов/ см^3 , а при 0,1 г формальдегида – $2 \cdot 10^{13}$ узлов/ см^3 .

При малом содержании формальдегида (2%) сетка весьма близка к сетке несшитого студня, но число узлов в ней меньше. При очень большом содержании формальдегида (20%), когда, согласно приведенным выше данным, спиральная конформация практически полностью отсутствует, студень в значительной своей части бесструктурен и только на небольших участках наблюдаются отдельные цепочки глобул, представляющие незавершенную сетку, образование которой связано с наличием незначительного количества спиральных участков макромолекулы.

Таким образом, сопоставление результатов электронно-микроскопического исследования с данными по оптическому вращению и механическим свойствам студней позволило сделать весьма важный вывод о том, что надмолекулярная структура студней желатины является результатом упорядочения, возможного лишь при укладке макромолекул, находящихся в спиральной конформации; при этом узлы сетки также образуются на надмолекулярном уровне. В отсутствие спиральных конформаций надмолекулярная структура в растворе желатины не возникает, и возможно образование молекулярного студня, сетка которого должна подчиняться закономерностям статистической теории высокомеханическости.

Общим важным выводом из изложенных результатов является невозможность существенно увеличить число связей в сетке студня желатины и соответственно повысить как модуль упругости, так и хрупкость студня путем химической спивки макромолекул в состоянии клубка в растворе, когда число возникающих новых химических связей очень мало, но оно оказывается достаточным для препятствия образованию обычных межмолекулярных связей в студне.

Поэтому для достижения поставленной в работе цели мы перешли к другому способу введения химических связей в студень, а именно — к за-

дубливанию в растворе 10%-ного формальдегида при 20° готового студня желатины, предварительно образованного в течение 17 час. при 5°.

На рис. 7, на котором приведены кривые ползучести спитого таким образом в течение различного времени и неспитого 5%-ного студня желатины, можно видеть, что модуль упругости возрастает при спивке почти на порядок. Это означает, что упорядоченное состояние спиральных макромолекул в студне, образованном межмолекулярными связями, способствует образованию химических связей между желатиной и формальдегидом главным образом не внутримолекулярно, а межмолекулярно и, возможно, на надмолекулярном уровне с вовлечением в реакцию большинства основных групп желатины, и, таким образом, число химических спивок значительно больше, чем при спивании в растворе.

Сопоставление температурной зависимости модуля упругости неспитого и спитых различными способами 5%-ных студней, приведенное на рис. 8, показывает, что и спивка в растворе в значительной степени предотвращает резкую температурную зависимость модуля упругости неспитого студня, а при спивке по второму способу достигается практически полная независимость модуля упругости от температуры в исследованном интервале температур.

Таким образом, полученные результаты показывают существенное влияние конформации макромолекулы, подвергаемой химической спивке, на структуру и механические свойства образующихся студней. Можно думать, что установленные закономерности могут иметь общее значение и для других полимеров.

Институт элементоорганических соединений АН СССР

Поступила в редакцию
7 IV 1978

ЛИТЕРАТУРА

1. Д. Н. Осокина, Пластичные и упругие низкомодульные оптически активные материалы, Изд-во АН СССР, 1963.
2. J. H. Bowes, C. W. Carter, Biochim. Biophys. Acta, 168, 341, 1968.
3. H. Fraenkel-Conrat, H. S. Olcott, J. Amer. Chem. Soc., 70, 2673, 1948.
4. P. Davis, B. E. Tabor, J. Polymer Sci., A1, 799, 1963.
5. R. H. Gustavson, The Chemistry of Tanning Process, London — New York, 1956.
6. J. Pouradier, H. Chateau, J. chim. phys. et phys. chim.-biol., 53, 726, 1956.
7. В. Г. Васильев, О. А. Козлов, А. А. Константинов, С. К. Крашенинников, Л. З. Роговина, Г. Л. Слонимский, Колloidн. ж., 39, 938, 1977.

8. Е. М. Белавцева, Е. Ф. Титова, Высокомолек. соед., А14, 1659, 1972.
9. J. Bello, H. Bello, J. R. Vinograd, Biochim. Biophys. Acta, 57, 214, 1962.
10. Л. З. Роговина, Г. Л. Слонимский, Успехи химии, 43, 1102, 1974.
11. H. Coopres, J. Polymer Sci., 8, A-1, 1793, 1970.
12. С. С. Николаева, А. Н. Михайлов, Высокомолек. соед., В19, 297, 1977.
13. Д. Ф. Уокер, Формальдегид, Госхимиздат, 1957, стр. 426.
14. Е. F. Titova, E. M. Belavtseva, E. E. Braudo, V. B. Tolstoguzov, Colloid. and Polymer Sci., 252, 497, 1974.

THE EFFECT OF THE CHEMICAL NETWORK CREATION METHOD ON THE PROPERTIES OF GELATIN GELS

*Rogovina L. Z., Vasiliev V. G., Malkis N. I., Stonimsky G. L.,
Titova E. F., Belavtseva E. M.*

S u m m a r y

The effect of chemical crosslinking conditions on the mechanical properties and supermolecular structure of gelatin gels is studied. It is shown that chemical crosslinking in solution is not able to lead to essential increase of gel elasticity modulus. Prevention from helix formation as a result of the formation of chemical bonds inhibits gel formation by means of the formation of intermolecular bonds and as a result of the supermolecular structure of gel is not yet formed. Vice versa, chemical crosslinking of ready gel formed by intermolecular bonds essentially increases its elasticity modulus. The relationship found out between the structure and properties of crosslinked gelatin gels and the conformation of macromolecule under crosslinking can have a general meaning for the polymer systems being crosslinked in solution.
