

ВЫСОКОМОЛЕКУЛЯРНЫЕ

Том (A) XXII

СОЕДИНЕНИЯ

№ 10

1980

УДК 541.(64+127):546(226+32)

КИНЕТИЧЕСКИЕ ЗАКОНОМЕРНОСТИ ДЕСТРУКЦИИ КОЛЛАГЕНА В ВОДНЫХ РАСТВОРАХ СЕРНОЙ КИСЛОТЫ И ГИДРООКИСИ КАЛИЯ

Привалова Л. Г., Константинова М. Л., Кулагин В. Н.,
Заиков Г. Е., Сорокин Е. Я., Дрейзеншток Г. С.

Исследована кинетика деструкции комплексных коллагеновых нитей, дубленных солями хрома, в воде и в водных растворах серной кислоты и гидроокиси калия в интервале pH 0–3 и 12–14 при 30–60°. Определен коэффициент диффузии паров воды в коллаген $K_d^{H_2O} = 7 \pm 0,5 \cdot 10^{-9} \text{ см}^2/\text{с}$. Показано, что процесс деструкции коллагена в кислотных и щелочных средах протекает во «внутренней» кинетической области и распад полимера осуществляется по закону случая. Получены значения эффективных констант скоростей гидролиза коллагена и показано, что эффективная энергия активации процесса практически не зависит от концентрации щелочи и кислоты и равна $20 \pm 1 \text{ ккал/моль}$.

Кетгутовые нити, основной составной частью которых является коллаген, широко используются в медицинской практике в качестве рассасывающегося шовного материала. Однако механизм процессов деструкции их в организме практически не изучен. В связи с этим представляется целесообразным исследовать деструкцию коллагена в модельной среде с целью установления основных кинетических закономерностей процесса. Эти данные необходимы для создания образцов с регулируемой скоростью рассасывания.

Для исследования использовали коллаген, исходным сырьем для которого служили сухожилия крупного рогатого скота. После предварительной обработки в растворе, содержащем 100 г/л NaOH и 142 г/л Na₂SO₄, и нейтрализации 3%-ной борной кислотой, проводили растворение коллагена в 1 M уксусной кислоте с получением 2%-ного прядильного раствора, который формовали в ацетоновую осадительную ванну, содержащую аммиак (0,07%) и формальдегид (0,15%). Дубление коллагена с целью увеличения сроков его рассасывания в организме, проводили в течение 3,5 час в 5%-ном водном растворе Na₂SO₄, содержащем хромовый экстракт, основностью 38% и концентрацией 5% (в пересчете на Cr₂O₃) при 25°. Исследуемые образцы представляли собой комплексную нить со средним диаметром 100 мкм. Опыты проводили в водных растворах серной кислоты и гидроокиси калия в интервалах pH 0–3 и 12–14 и в воде при 30–60°. В этих условиях коллаген не сваривается, а используемый дубитель не предохраняет его от кислотного [1] и щелочного [2] гидролиза.

За кинетикой деструкции следили по изменению веса образцов, для чего их через определенные промежутки времени извлекали из реакционной ячейки, промывали водой и высушивали в вакуумном эксикаторе до постоянного веса.

На рис. 1 в качестве примера представлены типичные кинетические кривые изменения веса образцов при деструкции в кислой и щелочной средах.

Сорбционные исследования показали, что при 25° коллаген быстро насыщается водой. Рассчитанный из экспериментальных данных коэффициент диффузии паров воды составляет $7 \pm 0,5 \cdot 10^{-9} \text{ см}^2/\text{с}$. Это позволяет предположить, что процесс деструкции протекает во «внутренней» кинетической области [3].

Из анализа данных по относительным скоростям распада дипептидов в кислой и щелочной средах (табл. 1) видно, что цептидные связи по своим реакционным способностям не сильно отличаются друг от друга и можно считать, что распад коллагена — высокомолекулярного полипептида — осуществляется по закону случая.

Если вероятность разрыва связи не зависит от ее положения в цепи макромолекулы, то при гомогенном гидролизе полимеров эффективная

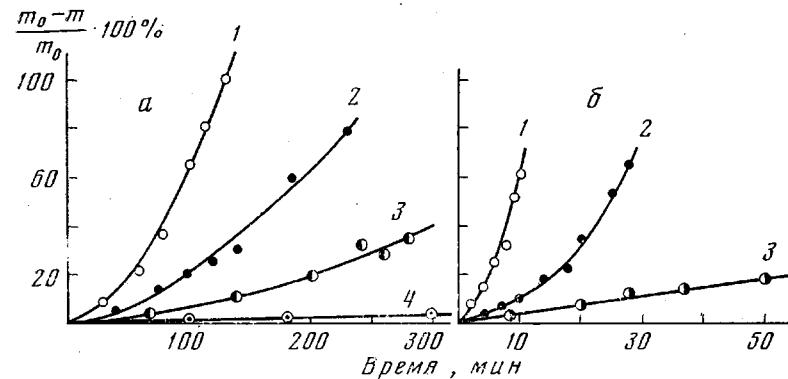


Рис. 1. Кинетические кривые потери веса образцов коллагена в 0,1 н. растворах серной кислоты (а) и гидроксида калия (б) при температурах: а — 58,5 (1), 55 (2), 50 (3) и 40° (4); б — 50 (1), 40 (2) и 30° (3)

константа скорости k определяется из уравнения [6]

$$-\ln \frac{P-1}{P} = -\ln \frac{P_0-1}{P_0} + kt, \quad (1)$$

где P_0 и P — средняя степень полимеризации полимера в начальный и текущий момент времени t . Весовая доля γ образующегося полимера с x звеньями рассчитывается по уравнению

$$\gamma_x = 2\alpha \frac{x}{P} (1-\alpha)^{x-1} + \alpha^2 \frac{x}{P} (1-\alpha)^{x-1} (P-x-1), \quad (2)$$

где $\alpha = 1 - e^{-kt}$ — вероятность разрыва связи; $1 - \alpha$ — вероятность сохранения связи.

Первый член в уравнении (2) учитывает распад полимёра с разрывом одной связи, а второй — с одновременным разрывом двух связей. Полагаем, что вероятность распада с одновременным разрывом двух связей мала по сравнению с разрывом одной связи и что $(1-\alpha)^{x-1} = 1$, так как изменение

Таблица 1

Относительные скорости гидролиза w дипептидов в кислых [4] и щелочных [5] средах ($w_{\text{глицил-глицина}} = 1$) *

№ пп	Дипептид	w	№ пп	Дипептид	w
1	DL-аланин-глицин	0,69	9	Лейцин-глицин	0,23
2	Аланин-лейцин	0,32	10	Серин-аланин	0,74
3	Глицин-L-аланин	0,37	11	Серил-серин	0,40
4	Глицин-D-аланин	0,40	12	Серин-глицин	0,40
5	Глицин-лейцин	0,34	13	Глицин-DL-лейцин	0,23
6	Глицин-тирозин	0,43	14	Глицин-DL-валин	0,14
7	Лейцин-аспарагиновая кислота	0,86	15	Глицин-DL-α-аланин	0,39
8	Лейцин-глутаминовая кислота	0,23			

* Условия гидролиза: 1—12=2н. HCl, 99°; 13—15=0,05 н. KOH, 88°.

Таблица 2

Эффективные константы скорости гидролиза коллагена в кислых и щелочных средах

T°	$\kappa_{\text{эфф}} \cdot 10^3 \text{ (мин}^{-1}\text{)} \text{ при заданных pH}$							
	0	1	2	3	7,4	12	13	14
30,0	—	—	—	—	—	2,19	10,7	49,0
37,7	—	—	—	—	0,05	—	—	—
40,0	3,03	0,83	0,45	0,12	—	6,3	28,7	133
50,0	7,7	2,1	—	0,36	0,08	16,4	76	300
50,7	—	—	0,41	—	—	—	—	—
55,0	14,0	4,2	0,64	—	—	—	—	—
57,0	15,7	—	—	—	—	—	—	—
58,5	—	—	1,18	—	—	—	—	—
60,0	—	—	—	—	0,17	—	—	—

ние веса образцов коллагена происходит за счет его деструкции, приводящей к образованию осколков с предельной степенью полимеризации x , переходящих в раствор. Тогда уравнение (2) приобретает вид

$$\gamma_x = 2\alpha \frac{x}{P} = 2 \frac{x}{P} (1 - e^{-kt})$$

или, учитывая уравнение (1), после преобразования получаем

$$\gamma_x = 2 \frac{x}{P} \left(\frac{1/P - 1/P_0}{1 - 1/P_0} \right) \quad (3)$$

В уравнении (3) величина $1/P_0 \ll 1$, так как $P_0 \gg 1000$ [1]. Поэтому

$$\gamma_x = 2 \frac{x}{P} \left(\frac{1}{P} - \frac{1}{P_0} \right)$$

Согласно формуле Куна

$$\frac{1}{P} - \frac{1}{P_0} = kt \quad (4)$$

Откуда

$$\gamma_x = 2 \frac{x}{P} \cdot kt \quad (5)$$

После подстановки в уравнение (5) величины P из выражения (4), получаем

$$\gamma_x = 2xk^2t^2 + 2 \frac{xkt}{P_0} \quad (6)$$

Учитывая, что второй член уравнения (6) мал по сравнению с первым, имеем

$$\gamma_x = 2xk^2t^2 \quad (7)$$

Из коллагена в раствор переходят продукты со степенью полимеризации от 1 до x . Поэтому уравнение (7) окончательно приобретает вид

$$\gamma_x = 2k^2t^2 S_x, \quad (8)$$

где S_x — сумма членов арифметической прогрессии. Как видно из рис. 2, в координатах $\gamma_x - t^2$ кинетические кривые спрямляются. Определенные из этих зависимостей значения эффективных констант скоростей гидролиза

Таблица 3

Константы скорости гидролиза пептидов в 2 н. HCl и коллагена в 1 н. H₂SO₄

T°	Константы скорости гидролиза $k \cdot 10^3, \text{мин}^{-1}$								
	$k_{\text{г}-\text{Ф}}$	$k_{\text{г}-\text{г}}$	$k_{\text{л}-\text{г}}$	$k_{\text{г}-\text{л}}$	$k_{\text{лг}-\text{Ф}}$	$k_{\text{г}-\text{гФ}}$	$k_{\text{л}-\text{гл}}$	$k_{\text{г}-\text{лг}}$	$k_{\text{к}}$
94,2	3,87	6,42	1,45	3,00	15,35	8,24	2,47	3,50	9,52
74,6	0,72	1,46	0,27	0,61	3,11	1,64	0,35	0,70	2,10
55,6	0,12	0,23	0,04	0,11	0,55	0,27	0,05	0,13	0,46

* г — глицин, ф — фенилаланин, л — лейцин, к — коллаген.

коллагена $k_{\text{аф}} = \sqrt{\lg \alpha / 2S_x}$ для различных условий проведения процесса приведены в табл. 2.

Согласно данным [7], средняя молекулярная масса осколков коллагена, переходящих в раствор при его гидролизе, мало зависит от температуры. Это позволяет рассчитать эффективную энергию активации процесса. Рассчитанные величины энергии активации распада коллагена практически не зависят от концентрации щелочи и кислоты и составляют $20 \pm 1 \text{ ккал/моль}$. Средняя молекулярная масса растворимых осколков коллагена в области pH 0–3 и 12–14 составляет 2500–3000 [7]. Если принять, что средняя молекулярная масса аминокислотных остатков равна 100, то степень полимеризации растворимых осколков коллагена должна составлять 1–30 звеньев. С учетом этой величины полученные нами значения эффективной константы скорости гидролиза коллагена удовлетворительно совпадают со значениями эффективных констант скоростей гидролиза пептидов [8].

В табл. 3 приведены значения констант скоростей гидролиза некоторых ди- и трипептидов при различных температурах. В этой же таблице для сравнения представлены величины констант скоростей гидролиза коллагена, вычисленные нами для этих же температур. Видно, что это величины одного порядка.

В разбавленных растворах кислот и оснований изменение эффективной константы скорости гидролиза амидов в зависимости от концентрации катализатора описывается уравнением

$$k_{\text{аф}} = k_{\text{ист}} \cdot c_{\text{кат}},$$

где $k_{\text{ист}}$ — константа скорости гидролиза, не зависящая от состава среды-катализатора; $c_{\text{кат}}$ — концентрация сольватированных ионов H^+ и OH^- .

Согласно этому уравнению, должна наблюдаться линейная зависимость $\lg k_{\text{аф}}$ от pH-среды, а тангенс угла наклона этой прямой должен равняться единице. Однако в случае гидролиза коллагена линейный характер зависимости сохраняется, но тангенс угла наклона для процесса гидролиза в кислой среде равен 0,5, а в щелочной — 0,7. Отличие этих значений от

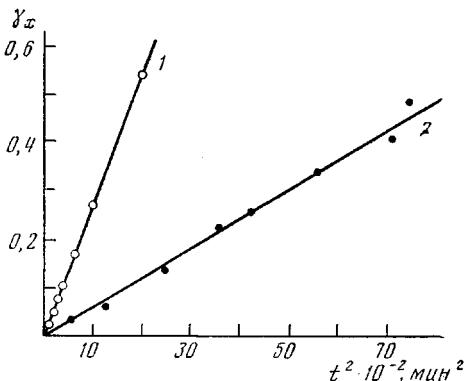


Рис. 2. Графическое решение уравнения (8): 1 — 0,01 н. KOH, 2 — 1 н. H₂SO₄; $\gamma_x = (m_0 - m) / m_0, 50^\circ$

единицы связано, по-видимому, с тем, что в полимерной матрице концентрация катализатора иная, чем в растворе, как было показано в работах Тенфорда [9].

Институт химической физики АН СССР
Ленинградский филиал Всесоюзного
научно-исследовательского института
искусственного волокна

Поступила в редакцию
27 IX 1979

ЛИТЕРАТУРА

1. A. H. Михайлов, Коллаген кожного покрова и основы его переработки, «Легкая индустрия», 1971, стр. 218, 356.
2. H. Batzer, H. Grünwald, Makromolek. Chem., 9, 116, 1953.
3. Ю. В. Мусеев, В. С. Маркин, Г. Е. Заиков, Успехи химии, 45, 510, 1976.
4. R. Hill, Advances protein chemistry, 20, 37, 1965.
5. И. Г. Орлов, Кандидатская диссертация, Москва, ИХФ АН СССР, 1966.
6. Н. М. Эмануэль, Д. Г. Кнорре, Курс химической кинетики, «Высшая школа», 1974, стр. 372.
7. G. Chirita, A. Ciobanu, Ind. usoara, 18, 605, 1971.
8. D. A. Long, T. G. Truscott, Trans. Faraday Soc., 59, 918, 1833, 2316, 1963; D. A. Long, J. E. Lillycrop, Trans. Faraday Soc., 59, 907, 1963.
9. Ч. Тенфорд, Физическая химия полимеров, «Химия», 1965.

KINETIC REGULARITIES OF COLLAGEN DEGRADATION IN AQUEOUS SOLUTIONS OF SULFURIC ACID AND POTASSIUM HYDROXIDE

*Privalova L. G., Konstantinova M. L., Kulagin V. N., Zaikov G. Ye.,
Sorokin Ye. Ya., Dreizenshtok G. S.*

Summary

The kinetics of the degradation of complex collagen fibers treated by chromium salts has been studied in water and in aqueous solutions of sulfuric acid and potassium hydroxide in the pH ranges 0-3 and 12-14 at 30-60°. The coefficient of the diffusion of water vapors into collagen was found being equal to $7 \pm 0.5 \cdot 10^{-9}$ cm²/sec. It has been shown that in acidic and alkaline media collagen is degraded in the «internal» kinetic field and that the decay of a polymer is a random process. The values of effective rate constants for the collagen hydrolysis were found. It has been shown that the effective activation energy of this process does not depend on the concentration of alkali and acid and is equal to 20±1 kcal/mol.
