ВЫСОКОМОЛЕКУЛЯРНЫЕ СОЕДИНЕНИЯ

Том (А) 33 1991 № 10

УДК 541.64

© 1991 г. Г. И. Церетели, О. И. Смирнова

КАЛОРИМЕТРИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ СТЕКЛОВАНИЯ ЖЕЛАТИНЫ

Методом ДСК в широком интервале температур (−50...130°) исследована температурная зависимость абсолютных значений теплоемкости кристаллической и аморфной желатин при различных концентрациях воды. При всех концентрациях связанной воды (5−30%) для аморфных желатин наблюдается скачок теплоемкости, обусловленный расстекловыванием (размягчением). Определена величина скачка теплоемкости 0,50±0,05 Дж/г·К. При увеличении содержания связанной воды температура стеклования понижается. Появление в системе свободной воды существенно меняет характер процесса расстекловывания (размягчения). Свободная вода в отличие от связанной пластификатором не является, а напротив, образует ледяную жесткую матрицу, препятствующую проявлению стеклования. Установлено, как проявляется процесс стеклования при нагревании кристаллических желатин с различными теплотами плавления. В желатинах с небольшими значениями теплот плавления ≤10 Дж/г стеклование практически не отличается от стеклования аморфных желатин той же влажности. В желатинах с бóльшими значениями теплот плавления (~30 Дж/г) размягчение приводит лишь к появлению в интервале стеклования небольшого дополнительного максимума на линейной зависимости теплоемкости от температуры, скачка теплоемкости при этом не наблюдается.

Известно, что желатина при охлаждении способна переходить в стеклообразное состояние, и этот переход зависит от содержания воды. Такие исследования были выполнены различными методами: термоупругими [1], термомеханическими [2], а также методами термического анализа [3] и калориметрии [4]. Однако все эти исследования осуществляли в относительно узком интервале концентраций и ограниченном диапазоне температур и, как правило, проводили в условиях непрерывно изменяющейся влажности, что существенно снижало экспериментальные возможности использованных методик.

Задача настоящей работы — исследование методами современной калориметрии перехода стеклования в кристаллических и аморфных желатинах в широком интервале концентраций в диапазоне температур, включающем в себя как плавление желатины, так и плавление свободной воды. Мы надеялись, что сравнительные исследования абсолютных значений теплоемкостей кристаллических и аморфных желатин и сопоставление полученных данных с результатами исследования нативного коллагена позволят получить новую информацию об особенностях процесса стеклования в этих сложных системах с различной надмолекулярной организацией.

Методика исследования и характеристика использованных образцов подробно изложены в работе [5]. В настоящей работе основное внимание сосредоточили на определении абсолютных значений теплоемкости желатин в широком интервале температур − 50...130°, в отличие от работы [5], где была определена температурная зависимость теплоемкости лишь в области фазового перехода − плавления геля. Использование дифференциального сканирующего калориметра ДСК-111 в сочетании с согласованным с ним вычислительным комплексом IN-50, фирмы «Setaram» (Франция) позволяет определять абсолютные значения теплоемкости с ошибкой, не превышающей 3%.

Наибольший интерес представляло изучение температурной зависимости абсолютных значений теплоемкости таких желатин, вся вода в кото-

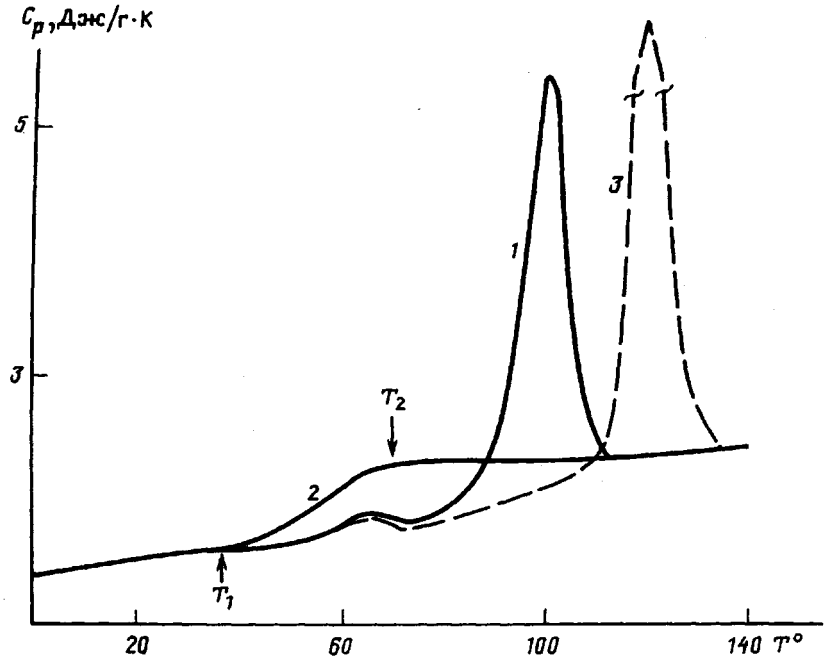

Рис. 1. Температурная зависимость теплоемкости кристаллической (*1*) и аморфной (*2*) желатины и нативного коллагена (*3*). Концентрация воды 14%. Скорость нагревания $v_н$=3 К/мин. Кристаллическая желатина получена высушиванием геля концентрации 5% (способ А)

рых связана. В первую очередь были исследованы кристаллические желатины, полученные высушиванием геля относительно низкой концентрации (способ А) [5]. Рассмотрим температурную зависимость теплоемкости таких желатин на примере образца с концентрацией связанной воды 14% (рис. 1). Кривая *1* соответствует первому нагреванию образца, кривая *2* — второму. Значение использованной скорости нагревания $v_н$= =3 К/мин. Перед вторым нагреванием образец охлаждался со скоростью $v_{охл}$=3 К/мин.

При первом нагревании на примерно линейной температурной зависимости теплоемкости желатины наблюдается интенсивное теплопоглощение, обусловленное плавлением высушенного геля. Поскольку образец содержит только связанную воду, пик теплопоглощения, соответствующий плавлению свободной воды, отсутствует. Кривая *2* характеризует температурную зависимость теплоемкости аморфной желатины. На этой кривой в области 30—70° наблюдается нарушение регулярности хода теплоемкости. От низких температур вплоть до температуры T_1 теплоемкость изменяется линейно. Выше T_1 теплоемкость резко увеличивается, а затем, начиная с температуры T_2 вновь устанавливается линейная зависимость теплоемкости от температуры, несколько отличающаяся от прежней. Таким образом, для аморфной желатины наблюдается скачок теплоемкости. Определим температуру скачка как точку перегиба кривой теплоемкости, а величину скачка ΔC_p как разность между высоко- и низкотемпературными значениями теплоемкости, экстраполированными область перехода, при $T=T_c$. Для аморфной желатины с концентрацией воды 14% ΔC_p= =0,50±0,05 Дж/г·К. Ниже температуры T_1 значения теплоемкостей кристаллической и аморфной желатин совпадают. Выше этой температуры вплоть до интервала плавления теплоемкость аморфной желатины выше, чем кристаллической. После плавления значения теплоемкостей при первом, втором и следующих нагреваниях одинаковы.

Наблюдаемое соотношение теплоемкостей аморфной и кристаллической желатины является типичным для аморфных и частично кристалли-

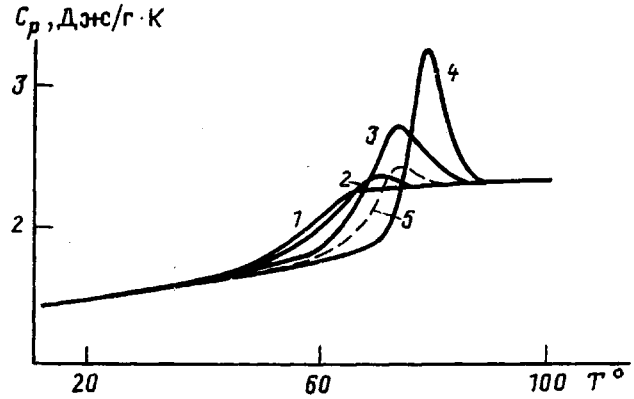

Рис. 2. Температурная зависимость теплоемкости отожженных образцов аморфной желатины при различных $v_н$. Время отжига 0 (*1*), 18 ч (*2*), 3 (*3*), 10 сут (*4*, *5*). Температура отжига 20°. Концентрация воды 14%. $v_н$=5 (*1–4*) или 1 К/мин (*5*)

ческих полимеров в интервале температур, включающем область стеклования, а наблюдаемая аномалия на температурной зависимости теплоемкости аморфной желатины соответствует скачку теплоемкости в процессе стеклования.

В этой связи представляло интерес проследить влияние скорости нагревания и тепловой предыстории образца на поведение теплоемкости в области скачка. Как показали проведенные исследования, при изменении $v_н$ с 1 до 5 К/мин значение температуры перехода смещается в сторону высоких температур на 4–5 К. Далее, отжиг исследуемых образцов вблизи T_1 (в нижней части интервала перехода) приводит к появлению дополнительного максимума на кривой температурной зависимости теплоемкости в области скачка теплоемкости. Чем продолжительнее отжиг, тем выше температура дополнительного максимума и больше его интенсивность (рис. 2). Известно, что в случае стеклования наблюдаемый дополнительный максимум имеет релаксационный, а не структурный характер. Это означает, что при уменьшении скорости нагревания интенсивность максимума должна уменьшаться. Именно такой результат и был получен при измерении теплоемкости отожженного образца при использовании более низкой $v_н$=1 К/мин. Таким образом, полученные результаты кинетических исследований поведения теплоемкости аморфных желатин в области аномалии показывают, что исследуемый переход имеет все признаки, характерные для процесса стеклования аморфных полимеров [6, 7].

Как показали дальнейшие исследования, описанный выше характер поведения температурной зависимости теплоемкостей аморфных и кристаллических желатин полностью сохраняется при изменении концентрации связанной воды в пределах 5–30%. При этом величина скачка теплоемкости, рассчитанная на сухой вес, в пределах ошибки эксперимента остается неизменной и составляет 0,50±0,05 Дж/г·К. В то же время значение температуры стеклования очень сильно зависит от концентрации воды (рис. 3, кривая *1*). Чем суше жалатина, тем более резкой оказывается эта зависимость. При изменении концентрации воды на 1% соответствующее изменение T_c может составлять 5–7 К. Из рис. 3 также видно, что в зависимости от способа приготовления кристаллической желатины (способ А или Б) [5] разница между температурами плавления и температурой стеклования может составлять или несколько, или десятки градусов.

Таким образом, связанная вода, составляя неотъемлемый элемент упорядоченной структуры желатины, в то же время является естественным пластификатором, понижающим значение температуры стеклования. В результате проделанной нами работы установили, что зависимость T_c от концентрации воды для α-желатины, а также для денатурированных коллагенов различного происхождения совпадают с приведенной кривой T_c для

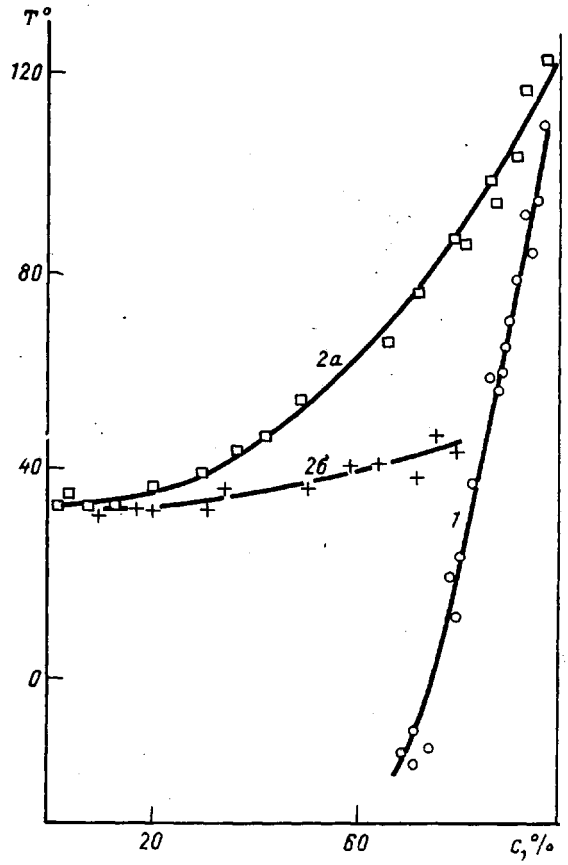

Рис. 3. Зависимость температур стеклования аморфной желатины T_c (*1*) и температур плавления гелей желатины $T_{пл}$ от концентрации для образцов, полученных высушиванием геля концентрации 5% – способ А (2*а*) или сформированных при высоких концентрациях по способу Б (2*б*)

желатины III с точностью до ошибки эксперимента. Более того, на эту же кривую ложатся значения температур стеклования и для целого ряда других денатурированных белков и нуклеиновых кислот, полученные в работах [8, 9]. Отсюда может быть сделан вывод о том, что полученная зависимость температуры стеклования от содержания воды является универсальной для всех денатурированных биополимеров. Денатурация разрушает уникальную нативную структуру белка, и денатурированные полимеры, по-видимому, можно рассматривать как статистические сополимеры, содержащие в своих цепях различные сочетания из аминокислотных остатков.

Рассмотрим далее вопрос о проявлении процесса стеклования в кристаллических желатинах. Возвращаясь к рис. 1 (кривая *1*), отметим, что скачок теплоемкости, обусловленный расстекловыванием, отсутствует на температурной зависимости теплоемкости исходной кристаллической желатины. Как показали проведенные ранее исследования [8, 9], на температурной зависимости теплоемкости нативного коллагена (такой же влажности) скачок теплоемкости также не наблюдается (рис. 1, кривая *3*). Однако как в том, так и в другом случаях в интервале стеклования присутствует небольшой дополнительный максимум. Тепловой эффект, соответствующий этим максимумам, невелик и в желатине и в коллагене. Мы установили, что процесс, соответствующий появлению этого максимума на кривых теплоемкости, не является обратимым. Если нагревание исследуемого образца (как коллагена, так и желатины) остановить на некоторой температуре, превышающей температуру максимума на несколько градусов, а затем вновь произвести измерение теплоемкости, то эти

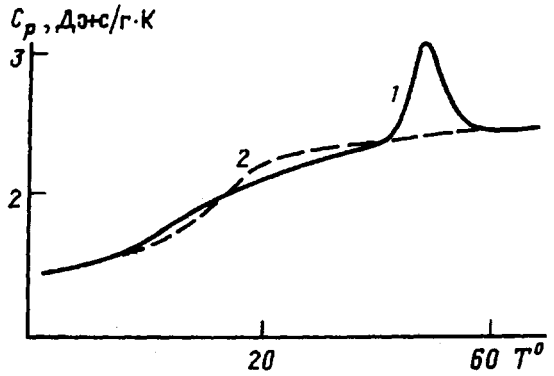

Рис. 4. Температурная зависимость теплоемкости кристаллической (*1*) и аморфной (*2*) желатины при концентрации воды 21%. $v_н$=3 К/мин

максимумы не воспроизводятся. Однако после длительного хранения указанных образцов при комнатной температуре максимумы восстанавливаются.

Интенсивность максимумов изменяется пропорционально времени хранения. Кроме того, было установлено, что при изменении степени влажности положение этих максимумов сдвигается вместе с интервалом стеклования. Таким образом, все сказанное выше позволяет утверждать, что появление дополнительных максимумов на температурной зависимости теплоемкости кристаллической желатины (или нативного коллагена) в интервале стеклования обусловлено расстекловыванием аморфной составляющей кристаллической желатины или нативного коллагена. По-видимому, в результате хранения этих объектов при комнатной температуре происходит отжиг аморфной фазы, что проявляется в виде релаксационного максимума при последующем измерении теплоемкости (рис. 2).

Известно, что на температурной зависимости теплоемкости частично кристаллических полимеров процесс стеклования проявляется далеко не всегда. В одних случаях наблюдается четко выраженный скачок теплоемкости и величина скачка пропорциональна доле аморфной фазы в исследуемом образце. В других случаях, в частности в волокнах и ориентированных полимерах с высокой степенью кристалличности, на температурной зависимости теплоемкости отсутствуют какие-либо аномалии, обусловленные стеклованием [6]. С этой точки зрения на температурной зависимости теплоемкости нативного фибриллярного коллагена скачок теплоемкости, обусловленный расстекловыванием, может и не проявляться. Отсутствие такого скачка в кристаллической желатине еще раз подтверждает, что структуры, формирующие в гелях с высокими значениями $Q_{пл}$ (по способу А) действительно являются коллагеноподобными, как это было показано в работе [5]. В то же время в кристаллических желатинах с малыми теплотами плавления, полученных способом Б, наблюдается совершенно другая картина.

На рис. 4 приведена температурная зависимость теплоемкости геля, сформированного при 30° в течение 7 сут при содержании воды 21%, $Q_{пл}$=12,5 Дж/г. Кривая *1* соответствует теплоемкости кристаллической желатины (первое нагревание), кривая *2* — теплоемкости аморфной желатины (второе нагревание). Как видно, температурная зависимость теплоемкости исследуемой кристаллической и аморфной желатины практически совпадают в интервале стеклования и ниже его, а также в области температур выше плавления. Величина скачка теплоемкости, температура стеклования остаются такими же, как и в аморфной желатине, наблюдается лишь некоторое размывание или расширение интервала стеклования как в область низких, так и высоких температур. Для гелей, формировавшихся в этих же условиях в этом же образце, но в течение меньшего времени, и, как следствие, имеющем меньшую теплоту плавления, эффект

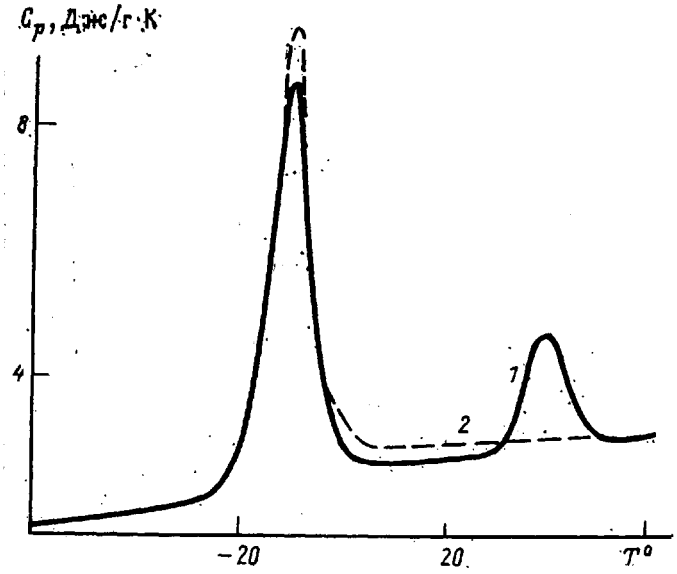

Рис. 5. Температурная зависимость теплоемкости кристаллической (*1*) и аморфной (*2*) желатины при концентрации воды 45%. $v_н$=3 К/мин

размывания практически незаметен. Таким образом, полученные результаты показывают, что при нагревании кристаллических желатин с малой теплотой плавления процесс расстекловывания может проявляться так же ярко, как и в аморфной желатине. По-видимому, в таких гелях аморфная фаза ведет себя практически независимо от упорядоченной коллагеноподобной.

Весь изложенный материал относился к тем случаям, когда вся вода в желатине была связанной. Рассмотрим далее, к каким изменениям температурной зависимости теплоемкости приведет присутствие в желатине свободной воды. На рис. 5 представлена температурная зависимость кристаллической (первое нагревание) и аморфной (второе нагревание) желатины при концентрации воды 45%. При таких концентрациях наблюдается плавление замороженной свободной воды, которое в аморфной и кристаллической желатине проходит примерно одинаково. Остановим свое внимание на температурной зависимости теплоемкости исследуемых образцов в интервале температур выше и ниже плавления льда. Выше 10°, как и следовало ожидать, теплоемкость аморфной желатины выше теплоемкости кристаллической. В то же время при низких температурах от −50 до −5° значения теплоемкостей аморфной и кристаллической желатины совпадают с точностью до ошибки эксперимента. При рассматриваемом значении влажности какие-либо особенности на кривых температурной зависимости теплоемкости, связанные с процессом стеклования, отсутствуют. Отсюда следует, что минимальное значение температуры стеклования, которое может быть получено в аморфных желатинах (−15°), соответствует максимальному содержанию связанной воды. В настоящей работе не рассматривались другие, помимо воды, пластификаторы желатины, такие как глицерин [1]. При охлаждении ниже 0° свободная вода образует ледяную матрицу, в которую встроены цепи желатины. Ледяная матрица делает невозможным проявление процесса стеклования, лишь после ее разрушения теплоемкость аморфной желатины может стать выше теплоемкости кристаллической. Таким образом, свободная вода в желатине в отличие от связанной выступает не в роли пластификатора, а в роли жесткой матрицы, мешающей проявлению процесса расстекловывания ниже 0°.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Джеймс Т. Х.* Теория фотографического процесса. Гл. II. Л., 1980.
2. *Gillman J. K.* // J. Appl. Polymer. Sci. 1966. № 2. P. 45.
3. *Jannas I. V.* // Macromolec. Sci. Rev. Macromolec. Chem. 1972. V. 7. P. 49.
4. *Годовский Ю. К., Мальцева И. И., Слонимский Г. Л.* // Высокомолек. соед. А. 1971. Т. 13. № 12. С. 2768.
5. *Церетели Г. И., Смирнова О. И.* // Высокомолек. соед. А. 1991. Т. 33. № 10.
6. *Годовский Ю. К.* Теплофизические методы исследования полимеров. М., 1976.
7. *Вундерлих Б., Баур Г.* Теплоемкость линейных полимеров. М., 1972.
8. *Церетели Г. И., Смирнова О. И.* // Биофизика. 1989. Т. 34. Вып. 5. С. 905.
9. *Церетели Г. И., Смирнова О. И.* // Биофизика. 1990. Т. 35. Вып. 2. С. 217.

Научно-исследовательский институт физики
при Ленинградском государственном университете

Поступила в редакцию
28.12.91

G. I. Tsereteli, O. I. Smirnova

CALORIMETRIC STUDY OF GLASS TRANSITION IN GELATIN

Summary

Temperature dependence of the absolute values of heat capacity of crystalline and amorphous gelatins has been studied by DSC method in the wide temperature range (−50-130°) for various water concentrations. For all concentrations of bound water (5-30%) for amorphous gelatins the heat capacity jump is observed related with devitrification (softening). The value of this jump has been determined being equal to 0.50±0.05 J/g·K. An increase of the content of bound water results in decrease of T_g. The appearence of free water in the system changes essentially the character of devitrification (softening) process. Free water unlike the bound one is not a plastifier, but forms the ice rigid matrix preventing the glass transition. In crystalline gelatins with small values of melting heats (~10 J/g) the glass transition process is practically the same as in amorphous ones with the same content of water. For melting heats above 30 J/g the softening results only in appearence of the small additional maximum on the linear dependence of the heat capacity on temperature without any jump.