

4. *Max-Figini, Solbeld O.* // Polym. Bull. 1982. V. 6. P. 501.
5. *Yamakawa H., Fujii M.* // Macromolecules. 1973. V. 6. № 3. P. 407.
6. *Norisuge T., Motoka M., Fujita H.* // Macromolecules. 1979. V. 12. № 2. P. 320.

Санкт-Петербургский филиал  
института машиноведения  
им. А. А. Благонравова  
Российской академии наук

Поступила в редакцию  
08.01.92

УДК 541.64 : 539.2

© 1992 г. Ю. Б. Мельниченко, Ю. П. Гомза, В. В. Шилов,  
С. И. Осипов

### О ПРИРОДЕ УЗЛОВ ФИЗИЧЕСКИХ СШИВОК В ЖЕЛАТИНОВЫХ ГЕЛЯХ

Методами оптического вращения и широкоугольной рентгеновской дифрактометрии изучены структурные особенности и изменение фазового состояния желатиновой матрицы при золь-гель-переходе и концентрировании желатиновых гелей. Показано, что закалка раствора приводит к быстрой ренатурации участков макромолекул желатины и к получению коллагеноподобных структур, образующих узлы физических сшивок полимерной сетки. Микрорекристаллиты в полимерной матрице желатиновых гелей не обнаружены, что свидетельствует об отсутствии агрегации ренатурированных спиралей и образования коллагеноподобных фибриллярных кристаллов. Кристаллическая фаза, однако, появляется при концентрировании геля путем высушивания или отбухания в осадителе.

Желатина является продуктом денатурации коллагена и может рассматриваться в качестве сополимера с полимодальным ММР [1]. В водных растворах при температуре выше 30° ее макромолекулы имеют форму статистического клубка. При охлаждении раствора ниже указанной температуры происходит конформационный переход клубок — спираль, в ходе которого макромолекулы желатины частично восстанавливают исходную коллагеновую структуру (три левосторонние спирали, скрученные в правостороннюю суперспираль [2]). Если концентрация желатины выше некоторого значения (~1 мас. %), то при охлаждении раствор превращается в гель.

Золь-гель-переход в растворах желатины исследован во многих работах [3–10]. С помощью ДСК было показано [3], что гелеобразование можно рассматривать как обычный процесс кристаллизации, предполагающий мгновенную первичную нуклеацию, сопровождаемую ростом кристаллитов. Этот вывод был подтвержден в работе [4] с использованием поляриметрии и поглощения ультразвука. Эта интерпретация предполагает существенное отличие температуры плавления полностью сформированного кристалла от таковой для одной коллагеноподобной спирали вследствие большей стабильности спиралей при их ассоциации в фибриллы [11]. Однако данные, полученные в работах [6–8], показывают, что тепловая стабильность узлов полимерной сетки не превышает таковую для тройной спирали коллагена. На фотографиях, полученных с помощью электронной микроскопии с использованием сверхбыстрого охлаждения образца, отсутствуют следы коллагеновых фибрилл, характерных для на-

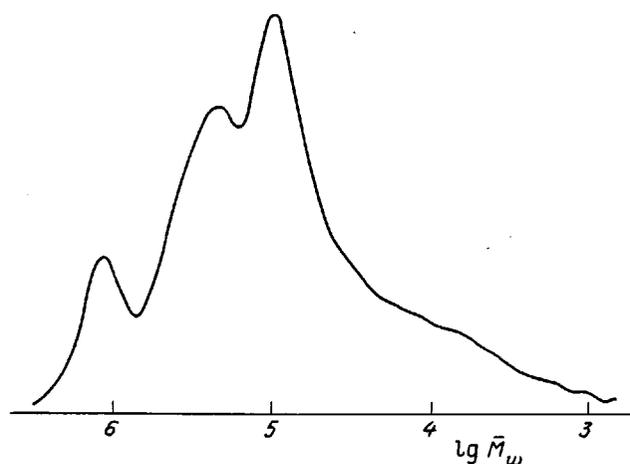


Рис. 1. Молекулярно-массовое распределение желатины

тивных соединительных тканей. Эти результаты, а также данные работы [10] позволили предположить, что образование сетки связано с конформационными изменениями без последующей агрегации ренатурированных спиралей.

Таким образом, в настоящее время существует два объяснения механизма ассоциации цепей, приводящей к образованию желатиновых гелей: кристаллизация (модель бахромчатых мицелл) или локальная ассоциация цепей вследствие конформационного перехода клубок – спираль и восстановления коллагеновой структуры без последующей агрегации и образования микрокристаллитов. В настоящей работе исследована структура желатиновых гелей с целью выяснения природы физических сшивок и предпочтительности одной из указанных моделей. Для этого, во-первых, методом оптической поляризации изучена кинетика роста ренатурированных спиралей при различных условиях и, во-вторых, с помощью широкоугольной рентгенографии исследованы изменения фазового состояния желатиновой матрицы при формировании геля, а также при его концентрировании путем высушивания и обработки осадителем (изопропанолом).

Для приготовления гелей использовали фотографическую желатину с вязкостью 10%-ного раствора в воде при  $40^\circ$   $2 \cdot 10^{-2}$  П·м<sup>-2</sup>·с и изоэлектрической точкой 4,7 и рН 6,2. ММР желатины, измеренное на жидкостном хроматографе «Du Pont 88 000», приведено на рис. 1.

Образцы готовили по следующей методике. Вначале сухая желатина набухала в определенном количестве дистиллированной воды в течение 2 ч. Затем смесь нагревали до  $45^\circ$  и тщательно перемешивали до полной гомогенизации. Полученный раствор заливали в кювету оптического поляриметра либо в кювету рентгеновского дифрактометра, температуру которых поддерживали равной  $45^\circ$ . После проведения калибровочных измерений растворы закамливали до требуемой температуры. Исследовали кинетику оптического вращения при изотермическом гелеобразовании раствора желатины с концентрацией  $c=4,7$  мас. % для температур закалки  $T_c=5; 10; 15; 20,5; 25^\circ$  а также растворов с  $c=2,94; 4,7; 6,79; 9,71$  и  $15,56\%$  при  $T_c=10^\circ$ . Кривые широкоугольного рассеяния рентгеновских лучей получали для 7,4%-ного раствора желатины при  $45^\circ$ , гелей, сформированных путем закалки этого раствора до  $25$  и  $10^\circ$ , высушенного геля, а также концентрированного геля, полученного при набухании в воде и отбухания в смеси вода+50% изопропанола и в чистом изопропанол.

**Оптическое вращение** измеряли с помощью поляриметра с улучшенной стабильностью параметров. Источником света служил гелий-неоновый лазер с рабочей длиной волны  $\lambda_p = 632,8$  нм. Рабочий диапазон углов поворота анализатора составлял  $\pm 3^\circ$ , минимальный шаг сканирования 4 угл. мин. Погрешность измерения угла оптического вращения не превышала  $\pm 5$  угл. с.

Горячий раствор желатины вводили шприцем в кювету поляриметра и выдерживали в течение 15 мин для достижения теплового равновесия. Термостабилизация образца с погрешностью не хуже  $\pm 0,1^\circ$  и закалка раствора до требуемой температуры со скоростью 15 град/мин обеспечивалась двумя термоэлектрическими батареями, работающими на принципе Цельтзе. Оптическая длина пути кюветы составляла 0,2 дм.

В ходе эксперимента измеряли временную зависимость угла поворота плоскости поляризации образцом  $\alpha(t)$ . Величину удельного вращения  $(\alpha)_\lambda$  определяли по формуле

$$(\alpha)_\lambda = \alpha / cl, \quad (1)$$

где  $\alpha$  — измеряемый угол оптического вращения в градусах,  $c$  — концентрация желатины, г/см<sup>3</sup>,  $l$  — оптическая длина пути, дм. Количество спиралей определяли по формуле

$$X = [(\alpha)_\lambda - (\alpha_{\text{клуб}})_\lambda] / [(\alpha_{\text{коллаг}})_\lambda - (\alpha_{\text{клуб}})_\lambda] \quad (2)$$

Входящие в уравнение (2) параметры  $(\alpha_{\text{коллаг}})_\lambda$  и  $(\alpha_{\text{клуб}})_\lambda$ , соответствующие удельному вращению полностью спирализованной коллагеновой структуры и денатурированного раствора при рабочей длине волны, рассчитывали по формуле Друде

$$(\alpha)_\lambda = A \lambda_0^2 / (\lambda^2 - \lambda_0^2) \quad (3)$$

при значениях  $A$ ,  $\lambda_0$ ,  $\alpha_{\text{коллаг}}$ ,  $\alpha_{\text{клуб}}$ , взятых из работы [7].

**Кривые широкоугольного рассеяния** рентгеновских лучей снимали на дифрактометре ДРОН-2,0. Использовали геометрию съемки «на просвет», излучение медного анода, никелевый фильтр в первичном пучке, сцинтилляционный счетчик. Съемку осуществляли в режиме автоматического шагового сканирования детектором в интервале углов рассеяния  $2\theta$  от 3 до  $40^\circ$  с шагом  $0,2^\circ$ .

Исследуемые растворы и гели находились в кювете толщиной 1 мм с прозрачными для рентгеновского излучения окнами из лавсана. Для исследования структуры сухой желатины в кювету помещали стопку из двух высушенных естественной сушкой гелей, каждый толщиной 0,1 мм. Затем кювету герметизировали, оставляя небольшое отверстие для заливки и смены жидкостей и регистрировали дифрактограмму сухого слоя. После этого кювету заполняли дистиллированной водой, через 30 мин избыточную воду откачивали и регистрировали картину рассеяния набухшего концентрированного геля. Далее в кювету вводили 50%-ный раствор изопропанола в воде (выдержка 30 мин, откачка избытка раствора, съемка) и чистый изопропанол (та же последовательность процедур). Набухание, отбухание и соответствующие измерения проводили при  $10^\circ$ .

На рис. 2 представлены кинетические кривые роста количества спиралей при различных  $T$ , для раствора с  $c = 4,7\%$ . Из рис. 2 следуют два основных вывода: понижение  $T$ , приводит к более быстрому росту  $X$ ; основное количество спиралей (порядка 80%) появляется на ранней стадии созревания геля в течение  $\sim 1$  ч, а последующее увеличение  $X$  является существенно более медленным.

На рис. 3 приведены кривые  $X(t)$ , полученные для  $T_s = 10^\circ$  при различных концентрациях исходных растворов. Как видно, изменение концентрации желатины в довольно широких пределах не оказывает сколько-

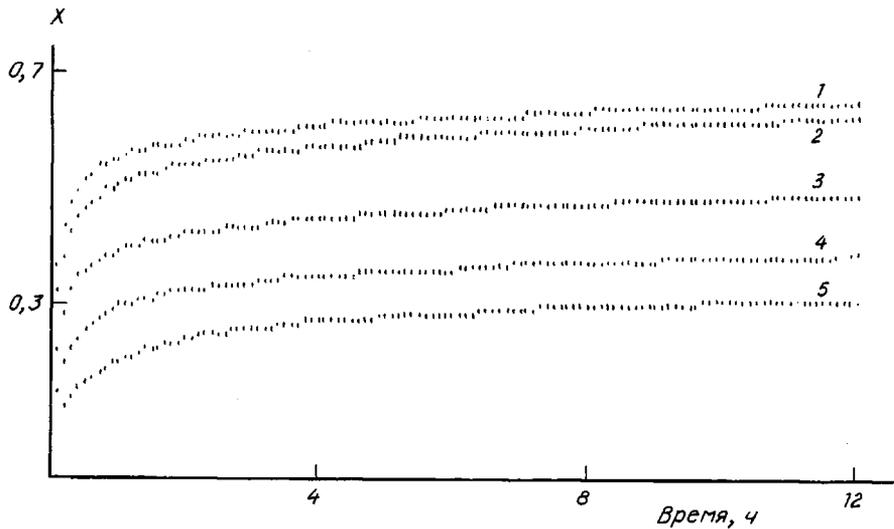


Рис. 2. Доля ренатурированных спиралей  $X$  как функция времени при  $T_3=5$  (1); 10 (2); 15 (3); 20,5 (4) и  $25^\circ$  (5).  $c=4,7$  мас. %

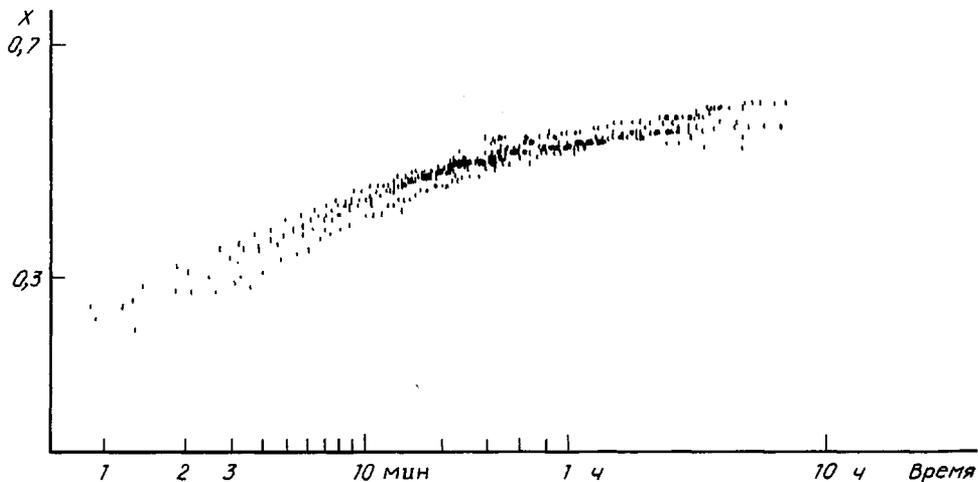


Рис. 3. Доля спиралей  $X$  как функция логарифма времени при концентрации раствора 2,91–15,56 мас. %. Температура закалки  $10^\circ$

небудь существенного влияния на кинетику роста и абсолютные значения величины  $X$  при указанной  $T_3$ .

Исходя из полученных данных, в качестве объектов изучения возможных изменений фазового состояния полимерной матрицы при золь-гель-переходе мы выбрали желатиновые гели, сформированные при  $T_3=10$  и  $25^\circ$  и времени созревания 12 ч. Соответствующие широкоугольные дифрактограммы представлены на рис. 4, а. Как видно, золь-гель-переход не вызывает существенного изменения профиля интенсивности рассеяния. На всех дифрактограммах имеются сходные диффузные максимумы и взлет интенсивности в малоугловой области. Закалка раствора до  $10^\circ$  приводит к смещению положения диффузного максимума в область меньших углов рассеяния и к уменьшению его полуширины (таблица), а также к понижению уровня рассеяния в области  $7^\circ \leq 2\theta \leq 20^\circ$  и увеличению малоуглового взлета в области  $3^\circ \leq 2\theta \leq 7^\circ$ . Гель, закаленный до  $25^\circ$ , в значительно

Параметры ближней упорядоченности желатиновых гелей

Образец	2θ°	d, нм	Δ2θ°	2θ°	d, нм	Δ2θ°	2θ°	d, нм	Δ2θ°
	первый максимум			второй максимум			третий максимум		
4,7%-ный водный раствор желатины при 45°	—	—	—	28,0	0,318	10,8	—	—	—
То же при 10°	—	—	—	27,5	0,324	10,7	—	—	—
То же при 25°	—	—	—	28,0	0,318	10,6	—	—	—
Высушенный гель	7,0	1,26	1,8	20,0	0,443	10,6	31,2	0,268	1,8
Гель, набухший в воде при 10° (c≈30%)	—	—	—	27,0	0,330	13,0	—	—	—
Гель, отбухший в 50%-ном водном растворе изопропанола	7,0	1,26	—	24,0	0,370	14,0	32,0	—	—
Гель, отбухший в чистом изопропаноле	7,0	1,26	3,0	20,0	0,443	9,6	32,0	—	3,6

большой степени сохраняет особенности исходного раствора. Смещение положения диффузного максимума не наблюдается, однако происходит небольшое уменьшение его полуширины и повышение интенсивности в области углов от 3 до 8°.

На рис. 4, б приведены дифрактограммы высушенного и набухшего в воде концентрированного геля (c≈30%). Кривая рассеяния сухой желатин характеризуется наличием интенсивного максимума рассеяния с вершиной, соответствующей углу 20° (межплоскостное расстояние  $d=0,44$  нм), и двух более резко выраженных, но меньших по интенсивности максимумов при углах 7,0° ( $d=1,26$  нм) и 31,2° ( $d=0,268$ ). Дифрактограмма набухшего геля напоминает таковые для 4,7%-ного раствора и гелей, полученных из него. Диффузный максимум сместился к углу рассеяния 27° ( $d=0,33$  нм), в области минимальных регистрируемых углов рассеяния наблюдается значительный малоугловой взлет. Единственным отличием данной дифрактограммы от приведенных на рис. 4, а является небольшое плечо на левом склоне диффузного максимума в области углов рассеяния 16–20°, которое свидетельствует о наличии в набухшем геле небольшого количества микрообластей, сохраняющих особенности ближней упорядоченности высушенного слоя.

Дифрактограммы, иллюстрирующие изменения структуры желатиновых гелей при обработке осадителем приведены на рис. 4, в. Воздействие на гель 50%-ным водным раствором изопропанола вызывает смещение диффузного максимума к меньшему углу рассеяния (таблица). На правом его склоне в области 31–33° появляется плечо. Величина малоуглового взлета практически не изменяется, однако на нем появляется перегиб в области 5–7°. Воздействие на этот гель чистым изопропаноном приводит к тому, что диффузный максимум возвращается в положение, соответствующее таковому для высушенного слоя; отчетливо видны пики при 7 и 31–32°.

На данных оптической поляризации видно, что закалка горячего раствора способствует относительно быстрой ренатурации фрагментов макромолекул желатин вследствие конформационного перехода клубок — спираль, отражающегося на повороте плоскости поляризации. Доля ренатурированных спиралей при закалке до 10 и 25° после 12 ч созревания геля соответственно составляет  $X \approx 0,6$  и 0,3, что свидетельствует о высокой степени ассоциации цепей, особенно в случае глубокой закалки [10]. Для выяснения физической природы образующихся ассоциатов мы вос-

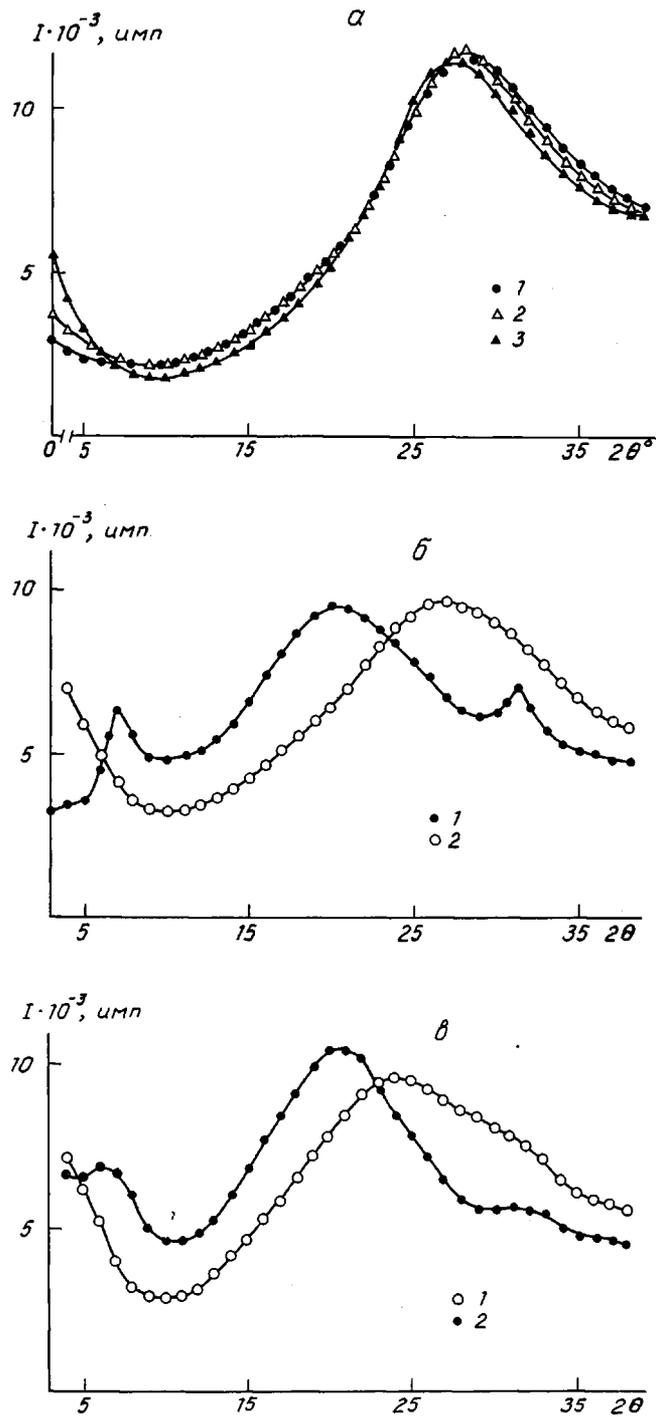


Рис. 4. Широкоугольные дифрактограммы, иллюстрирующие изменения при гелеобразовании (*a*), при набухании (*б*) и при набухании в осадителе (*в*). *a*: 1 – раствор желатинны при  $45^\circ$ , 2, 3 – желатиновые гели, полученные закалкой до  $25^\circ$  (2) и  $10^\circ$  (3); *б*: 1 – высушенный желатиновый гель, 2 – набухший в воде желатиновый гель; *в*: 1 – желатиновый гель, отбухший в 50%-ном водном растворе изопропанола, 2 – гель, отбухший в чистом изопропаноле

пользовались рентгеновской дифрактометрией, так как возможная агрегация ренатурированных участков в коллагеноподобные фибриллы является эффектом по крайней мере второго порядка для оптического вращения. Профиль широкоугольного рассеяния рентгеновских лучей для высушенного желатинового геля (рис. 4, б, кривая 1) может интерпретироваться как картина аддитивного рассеяния небольшого количества кристаллических областей, распределенных в разупорядоченной структуре из полипептидных цепей [12]. Наиболее интенсивный диффузный максимум соответствует средней ближней упорядоченности аморфной части материала, а два узких пика при  $7$  и  $31,2^\circ$  характеризуют структуру микрокристаллитов. Первый из них отвечает за периодичность кристаллических плоскостей, расположенных параллельно осям коллагеноподобных фибриллярных кристаллов, а второй — за периодичность плоскостей, перпендикулярных этому направлению. Оценка объемной доли кристаллической фазы в высушенном геле по методу Метьюза [13] дает величину  $8,5\%$ . Данные, приведенные на рис. 4, а, б (кривая 2), однако, указывают на полное отсутствие пиков при  $7$  и  $31^\circ$  и, следовательно, микрокристаллической фазы в желатиновых гелях, полученных при различных условиях. Это позволяет сделать вывод о неадекватности трактовки гелеобразования в желатиновых гелях как процесса кристаллизации и несправедливости модели бахромчатых мицелл.

Полученные данные свидетельствуют о том, что кристаллическая фаза в исследуемых объектах образуется лишь в процессе концентрирования гелей в ходе сушки и отбухания при обработке осадителем. Оценка объемной доли микрокристаллитов в последнем случае дает величину  $11,6\%$ , что примерно на треть выше соответствующего значения для высушенного геля. Такой результат, по-видимому, связан с более равномерным уплотнением желатиновой матрицы при обработке осадителем, а также с тем, что, как отмечено выше, набухший гель сохраняет определенную «память» о ближней упорядоченности высушенного слоя. Наблюдаемое рассеяние в области малых углов, особенно сильно проявляющееся для гелей, полученных набуханием и закалкой до  $10^\circ$ , можно связать с образованием в окрестности физических сшивок полидисперсных ассоциатов с повышенной концентрацией полимера. Наличие таких ассоциатов приводит к формированию на их основе зародышей кристаллической фазы, возникающей в ходе того или иного способа концентрирования геля.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Вейс А. Макромолекулярная химия желатины. М., 1971. 283 с.
2. Джеймс Т. Теория фотографического процесса. Л., 1980. 672 с.
3. Godard P., Biebuyck J. J., Daumeric M., Naveau H., Mereier J. P. // J. Polym. Sci., Polym. Phys. Ed. 1978. V. 16. № 10. P. 1817.
4. Durand D., Einery J. R., Catellier J. Y. // Faraday Symp. 1983. № 18. P. 137.
5. Szucs M. // Hangtechnika. 1984. V. 30. № 5. P. 129.
6. Djabourov M., Papon P. // Polymer. 1983. V. 24. № 4. P. 537.
7. Djabourov M., Maquet J., Theveneau H., Leblond J., Papon P. // Brit. Polym. J. 1985. V. 17. № 2. P. 169.
8. Djabourov M., Leblond J., Papon P. // J. phys. (France). 1988. V. 49. № 2. P. 319.
9. Djabourov M. // Contemp. Phys. 1988. V. 29. № 3. P. 273.
10. Busnel J. P., Morris E. R., Ross-Murphy S. S. // Int. J. Biol. Macromol. 1989. V. 11. № 2. P. 119.
11. Borchard W., Bremer W., Keese S. // Colloid Polym. Sci. 1980. V. 258. № 5. P. 516.
12. Katz J. R., Derksen J. C., Bon W. F. // Rec. trav. Chim. 1931. V. 50. № 1. P. 725.
13. Matthews J. L., Peiser H. S., Richards R. B. // Acta Crystallogr. 1949. V. 2. № 1. P. 85.

Институт химии высокомолекулярных соединений Академии наук Украины,  
Киев

Поступила в редакцию  
20.01.92

Киевский государственный университет  
им. Т. Г. Шевченко