

УДК 541.64.532.77:539.2

СКЕЙЛИНГОВОЕ ПОВЕДЕНИЕ, КЛАСТЕРНАЯ СТРУКТУРА И КОНЦЕНТРАЦИОННЫЕ ЗАВИСИМОСТИ ОТНОСИТЕЛЬНОЙ ВЯЗКОСТИ ЖЕЛАТИНЫ В ВОДНЫХ РАСТВОРАХ ВБЛИЗИ ПОРОГА ГЕЛЕОБРАЗОВАНИЯ

© 1995 г. А. Н. Красовский*, Б. П. Николаев**, А. М. Шляков**, С. С. Мнацаканов*

*Санкт-Петербургский институт кино и телевидения
191126 Санкт-Петербург, ул. Правды, 13

**Государственный научно-исследовательский институт особо чистых биопрепаратов
197110 Санкт-Петербург, ул. Пудожская, 7

Поступила в редакцию 21.02.94 г.

Представлены результаты количественного анализа концентрационных зависимостей относительной вязкости $\eta_{отн}$ водных растворов желатины вблизи точки перехода золь-гель, а также температурных зависимостей пиковой интенсивности линии 0.93 м. д. протонов метильных групп аминокислотных остатков желатины в ЯМР-спектрах высокого разрешения в области перехода спираль-клубок для образцов желатины, различающихся способом получения и природой исходного коллагена. В рамках представлений о протекании в трехмерных системах получены скейлинговые соотношения, связывающие гидродинамический объем фрактальных кластеров размерностью D , число кластеров и $\eta_{отн}$. Показано, что на ветви перколоционного кластера ($D = 2.5$) $\eta_{отн}$ зависит от характеристической вязкости $[\eta]_0$ макромолекул, концентрации c и числа частиц s , составляющих кластер, а приведенное время перехода τ золь-гель определяется выражением $(1 + \tau)^{3/2} = \ln \eta_{отн} ([\eta]_0 c)$. Получены выражения, определяющие вероятность образования бесконечного кластера, концентрацию и средние размеры конечных кластеров. Ширина перехода золь-гель и критические параметры гелеобразования в растворе (концентрация, размер кластеров по вязкостным данным), а также ширина перехода спираль-клубок $\Delta T/T^*$, по данным ЯМР-спектроскопии, определяются гидродинамическим объемом V_0 макромолекул, причем наблюдается корреляция между параметрами кооперативности сегментальной подвижности макромолекул по Брэггу-Зимму и V_0 .

Особенностью переходов свернутый клубок (СК)-развернутая цепь (РЦ) является то, что объем макромолекулы в состоянии СК в $N^{1/2}$ раза (N – число куновских сегментов) больше объема макромолекулы в состоянии РЦ [1]. Принято считать, что в разбавленных растворах желатины основной причиной резкого перехода СК–спираль ($T_g = 301$ К) служит превращение непротекаемого клубка в полностью проницаемый [2 - 5]. В водных растворах желатины при 308 К макромолекулярный клубок частично проницаем для растворителя (константа a Марка-Куна-Хаувинка равна 0.885 [3]), причем для типичных образцов желатины N конечно ($\sim(1 - 2) \times 10^2$) и по кинетическим причинам эффективного разворачивания макромолекул может не происходить, поэтому степень спиральности макромолекул желатины можно определить по ширине интервала на температурной шкале [2, 5].

С некоторыми коррективами такой подход применим к описанию гидродинамического поведения желатины в полуразбавленных и концентрированных растворах, в частности вблизи порога гелеобразования ($T \sim T_g$), при этом необходи-

мо учитывать агрегацию макромолекул [6, 7] и различную способность к образованию кластеров макромолекул, отнесенных к разным конформационным типам [8]. В этой связи практически важно выяснить причины различий кооперативности сегментальной подвижности [5] макромолекул желатины разного происхождения, отличающихся друг от друга шириной перехода спираль-клубок и числом куновских сегментов N .

В настоящей работе представлены результаты количественного анализа концентрационных зависимостей относительной вязкости $\eta_{отн}$ водных растворов желатины вблизи перехода золь-гель. На основе представлений [9, 10] о протекании в трехмерных системах в рамках решеточной модели с помощью скейлинговых соотношений из вязкостных данных для образцов желатины, различающихся как способом получения, так и природой исходного коллагена, получены критические показатели гелеобразования, которые ставятся в зависимость от параметров структуры и кооперативности макромолекул, определенных методом ЯМР-спектроскопии.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Концентрационные зависимости относительной вязкости $\eta_{\text{отн}}$ растворов желатины получены с помощью вискозиметра Уббелоде (градиент скорости 103 с⁻¹, время истечения воды 303 с, 298 К). Водные растворы желатины с концентрацией $c = 0.05 - 3.0$ дл/г, приготовленные в бидистилляте воды (как с добавлением 0.15 моль/л NaCl, так и в отсутствие соли), предварительно перед измерением вязкости в интервале 293 - 333 К прогревали в течение 15 - 30 мин на водяной бане при 330 К. Временные зависимости перехода золь-гель получены в результате измерений соответствующих значений времени t (мин) течения растворов желатины, отвечающих интервалам минимальной и максимальной вязкости. Изучены образцы желатины, в том числе фотожелатины, полученные как щелочным, так и кислотным способами, различающиеся природой исходного коллагена (табл. 1). Первые два образца практически не содержат фракций олигопептидов, остальные различаются по фракционному составу и по ММ.

Для двух первых образцов желатины ранее установлено [8], что каждый из них содержит макромолекулы различного конфигурационного типа, и этим типам макромолекул соответствует свой закон вязкости [3], что отражается на абсолютных значениях характеристической вязкости $[\eta]_0$ [11, 12] и на зависимостях $[\eta]_0$ от температуры и градиента скорости (рис. 1).

Таблица 1. Характеристики образцов желатины

Образец №	Способ получения образца	Тип коллагена	Содержание олигопептидов, %	$M_\eta \times 10^5$	$[\eta]_0, \text{дл/г (308 К)}$	$\sigma^{1/2} \times 10^{-2}$
1	Инертный "Rousselot"	Костный	-	1.16	0.55	1.8
2	Кислотный	Кожевенный	5 - 10	1.06	0.45	3.6
3	Инертный щелочной	Костный	5	1.05	0.46	-
4	Щелочной	Кожевенный	10	0.92	0.50	2.4
5	Кислотный	Костный	25	0.55	0.31	4.1
6	Ихтиожелатина	Пузырь	-	0.49	0.26	4.5
7	"	Чешуя	-	0.43	0.21	5.6

Примечание. Способ получения образца 1 неизвестен, образец идентичен опытной серии инертных щелочных желатин ("Полимерфото", Казань) [31]. Образцы фотожелатины 2 - 5 подробно изучены в работах [8, 31]. $\sigma^{1/2} \sim \Delta T/T^*$.

МЕТОДИКА ЯМР-СПЕКТРОСКОПИИ

ЯМР-спектры высокого разрешения регистрировали на мультиядерном спектрометре фирмы "Брукер" CXP-300 на частотах резонанса протонов - 300.13 МГц и ¹³C - 75.47 МГц. Спектры образцов получали для 6 и 40%-ных растворов в D₂O ("Изотоп", 98% ²H). При регистрации ПМР-спектров растворы желатины помещали в тонкостенные цилиндрические ампулы диаметром 5 мм, по центру которых находился цилиндрический капилляр с CCl₄ – такое расположение образца обеспечивало однородное температурное поле по всему объему.

Измерения проводили в интервале температур 273 - 318 К в режиме накопления (время накопления 16 с) с фазовой альтернацией импульсов, период между 40-градусными импульсами составляет 1 с. В качестве измеряемых параметров рассматривали химический сдвиг, ширину и интенсивность крайней высокополевой линии 0.93 м. д. (относительно стандарта – тетраметилсилона), которая относится к перекрывающимся сигналам метильных групп Val, Leu, Ile [13 - 15]. При изучении перехода спираль-клубок измеряли температурную зависимость пиковой интенсивности I этой линии шириной ~30 Гц [15, 16]. Последовательность регистрации ПМР-спектров образцов желатины определялась следующей схемой эксперимента: растворы желатины предварительно прогревали при 323 К в течение $t \geq 15$ мин, затем быстро охлаждали до 273 К (~45 с) и отжигали при 293.5 К. После проведения кратковременного (15 с) либо длительного (41 - 43 ч) отжига образцов изучали температурный ход интенсивности I линии 0.93 м. д., скорость нагревания составляла 2.5 - 5.0 град/мин.

Все изученные образцы желатины, как следует из данных табл. 1, различаются по ширине $\Delta T/T^*$ и интенсивности I (амплитуде) перехода спираль-клубок.

Спектры ЯМР ¹³C регистрировали в режиме фазовой альтернации импульсов и квадратурного детектирования сигнала с обратным импульсным шумовым подавлением ¹³C = {¹H} для исключения влияния ядерного эффекта Оверхаузера на интенсивность линий спектра. Сравнение спектров двух первых образцов желатины в растворе показало, что они имеют вид совокупности хорошо разрешенных линий, причем положение сигналов ¹³C коррелирует с химической природой отдельных групп аминокислотной последовательности полипептида [17, 18]. В результате нормирования величины пиковой интенсивности C^δ-группы пролина оказалось, что в основном качественный и количественный составы образцов, различающихся природой исходного коллагена, совпадают, за исключением содержания групп, соответствующих сигналам GlnC^δ, GluC^δ, AspC^γ,

AsnC γ , GlnC γ , GluC γ (изменения в положении и интенсивности линий 182.02, 181.8, 178.5, 43.15 м. д. [17, 18], сигнал внешнего эталона CHCl₃ – 77.7 м. д.). В спектре геля при 293.5 К по сравнению с раствором наблюдается перераспределение интенсивностей линий ^{13}C за счет изменения вкладов в резонанс групп полимера, входящих в спиральные и клубковые структуры, причем аминокислотные группы, кроме триад Gly-Pro-Hyp [14], локализованы преимущественно в клубковой части геля, в которой сегментальная подвижность макромолекул достаточно высока [17].

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Кластерная модель

В разбавленных растворах желатины при концентрациях $c \approx c_{kp}$ (<301 К) макромолекулы желатины агрегируют [6] с образованием кластеров конечных размеров [7] и по мере увеличения концентрации ($c > c_{kp}$) агрегаты ассоциируют друг с другом по механизму кластер-кластерной ассоциации [19, 20].

Нахождение зависимостей типа $\bar{s}(c)$, где \bar{s} – среднее число частиц (макромолекул), составляющих кластер, в принципе возможно по данным квазиупругого рассеяния света [6, 7, 10], поскольку гидродинамический радиус агрегатов $\langle R \rangle$ удовлетворяет скейлинговому соотношению

$$\bar{s} = (\langle R \rangle / R_0)^D, \quad (1)$$

где R_0 – гидродинамический радиус макромолекулы, D – размерность фрактального кластера [7].

Более полное описание гидродинамического поведения агрегатов желатины в водных растворах можно получить из вискозиметрических данных на основе представлений [9, 10] о протекании в трехмерных системах. Эти представления сводятся к трактовке перехода золь–гель как переколяции по занятым и свободным узлам решетки, например в приближении простой кубической решетки (ПКР). В переколяционной модели оба типа узлов образуют бесконечный кластер фрактальной размерностью $D = 2.5$ в диапазоне значений вероятности $p_c < p < (1 - p_c)$, где p_c – порог протекания, равный 0.3117 (ПКР) [10]. При $p \approx p_c$ доля узлов решетки, занятых молекулами воды, превосходит соответствующую долю узлов, приходящихся на молекулы желатины [10]. Для $p \approx (1 - p_c)$ доля узлов, отнесенных к молекулам воды, значительно меньше, чем в первом случае.

Средний размер кластера \bar{s} на пороге протекания с увеличением размера решетки L растет медленнее, чем величина наибольшего кластера $s(\text{макс})$

$$\bar{s} = L^{2D-E}, \quad (2)$$

$$s(\text{макс}) = L^D. \quad (3)$$

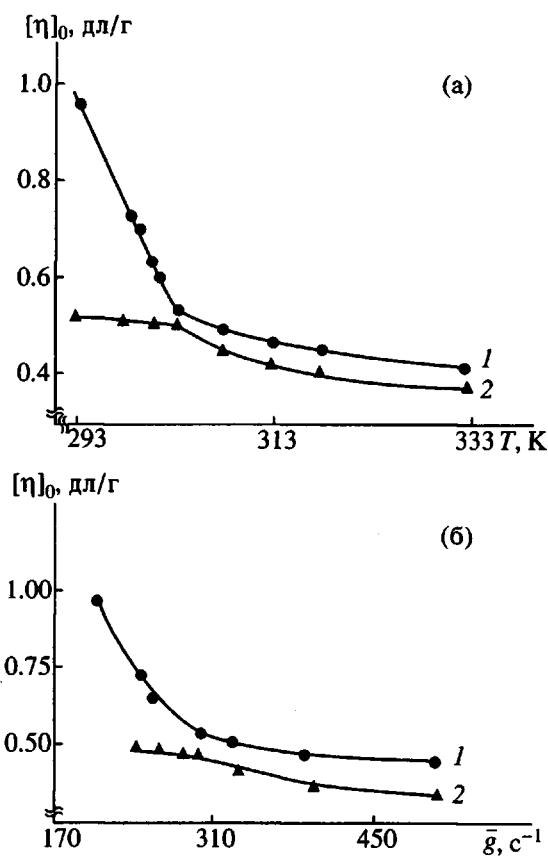


Рис. 1. Зависимости характеристической вязкости $[\eta]_0$ растворов желатины в воде от температуры (а) и скорости сдвига \bar{g} (б) для образцов 1 и 2 (табл. 1); $T = 293$ К.

Здесь E – евклидова размерность пространства, в котором находится решетка [10].

В результате численного моделирования на конечной решетке со стороной L установлено [10], что число кластеров N_s зависит от L . С учетом этого можно предположить, что размер решетки равен

$$L = \ln \eta_{\text{опт}} / ([\eta]_0 c), \quad (4)$$

где $[\eta]_0 c$ – параметр кратности заполнения гидродинамического объема [3]. Вывод соотношения (4) приведен в работе [8].

Гидродинамическое поведение макромолекул желатины в растворе ниже порога протекания

Макромолекулы сами по себе являются фракталами [9], и в случае превращений типа СК–РЦ мы имеем дело с фрактальными переходами фрактал- \bar{d}_i -фрактал- \bar{d}_j , поэтому, следуя работам [21, 22], найдем связь между размерностью макромолекулы \bar{d} и типом подрешетки в макроскопически однородной среде, в которой она

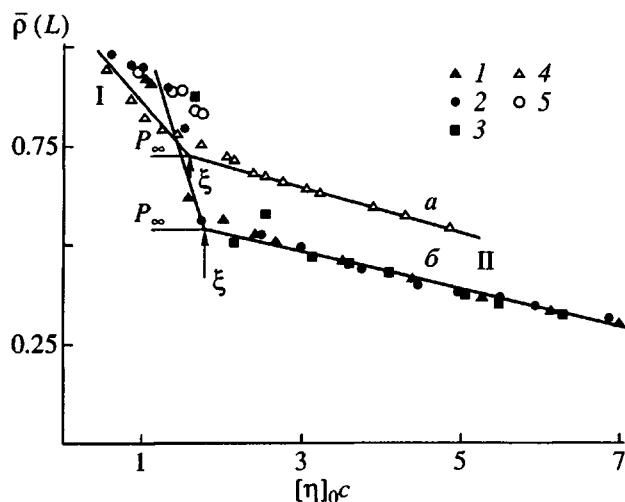


Рис. 2. Зависимость плотности узлов кластера $\bar{\rho}(L)$ от параметра $[\eta]_0 c$ для растворов желатины в воде при 308 К (а) и ПС в бромоформе при 298 К (б) в разбавленной (I) и полуразбавленной (II) концентрационных областях для образцов ПС (1-3) и желатины (4, 5). $M_w = 3 \times 10^6$ (1); 1.45×10^6 (2); 4.7×10^5 (3), $M_n = 1.16 \times 10^5$ (4); 1.06×10^5 (5).

находится (табл. 2). Для протекаемого клубка $\bar{d} = 3/2$ и $E = 3$ [22] и в соответствии с соотношением (2) $L^0 \equiv 1$, т.е. “своя” подрешетка отсутствует и для линейных макромолекул справедливо $L^{3/2}$ (табл. 2). Тогда, согласно работам [10, 21], плотность узлов кластера максимального размера равна $\bar{\rho}(\xi) = L^{3/2}$, ξ – корреляционная длина [5].

Рисунок 2 иллюстрирует зависимость $\bar{\rho}$ от параметра $[\eta]_0 c$ для водных растворов желатины в условиях, когда температура несколько превышает T_g ($T - T_g = 7$ К) и константа в формуле Марка–Куна–Хаувинка a близка к единице [3, 11]. Расчет значений $\bar{\rho}(L)$ проведен по соотношению (4) из экспериментальных зависимостей $\ln \eta_{\text{отн}}(c)$, полученных в работе [8], и с учетом данных табл. 2. Как видно из рис. 2, вблизи значения $[\eta]_0 c \approx 1.3$ обнаруживается переход, который обусловлен [10, 21] изменением размера решетки. Поскольку для $[\eta]_0 c = 1.3$ $\bar{\rho} = 0.68$ и при $p = p_c + \Delta p$ в соответствии с теорией протекания ($p - p_c = \bar{\rho}^{5/2}$ [10]), то $p = 0.38 + 0.31 = 0.69$. Таким об-

разом, при $T - T_g = 7$ К система находится очень близко к порогу протекания $p = 1 - p_c$ вблизи ξ , однако с ростом концентрации полимера в растворе удаляется от него [5, 22, 23].

Для сравнения в случае клубков в хорошем растворителе – ПС в бромоформе при 298 К – аналогичная зависимость $L^{5/3}([\eta]_0 c)$ расположена ниже и также характеризуется резким переходом вблизи значения $[\eta]_0 c = 1.6$ [24] (рис. 2, табл. 2). Для $\bar{\rho}(\xi) = 0.53$ можно получить $p = 0.51$, т.е. в сравнении с растворами желатины при 308 К макромолекулы ПС в растворе находятся ниже порога протекания $p = 1 - p_c$ и в этом состоянии характеризуются низкой плотностью сегментов, а их относительный объем слишком велик для чисто температурного перехода в гель [1] и при повышении концентрации ПС в растворе, вероятно, имеет место нефрактальный переход в θ -клубок [5, 22, 24].

Напротив, с понижением температуры для макромолекулы желатины в растворе в состоянии протекаемого клубка значения $\bar{\rho}(\xi)$ вблизи $[\eta]_0 c = 1$ заметно увеличиваются (в пределе $\bar{\rho} \sim L$) и при $T_g - T > 0$ плотность узлов кластера $\bar{\rho}$ возрастает скачком до величины, необходимой для чисто температурного перехода в гель и образования бесконечного кластера [9, 10, 21] (рис. 2, 3).

Скейлинговое описание гидродинамического поведения желатины в водных растворах вблизи точки перехода золь–гель ($c \geq c_{kp}$, $T_g - T \geq 0$)

Для $L > 1$ можно показать [25], что существует взаимосвязь между эффективным гидродинамическим объемом \bar{V} фрактальных кластеров, их размерностью D , числом кластеров N_s в растворе и относительной вязкостью $\eta_{\text{отн}}$

$$\ln \eta_{\text{отн}} = \bar{V}(\langle R \rangle) N_s = V_0(R_0)^{5/2 - (E - D)} \bar{c}_s, \quad (5)$$

где V_0 – гидродинамический объем “простой” частицы, \bar{c}_s – средняя концентрация кластеров, равная $\bar{c}_s = c/\bar{s}$ [10].

Существенно, что соотношения (2), (3) и (5) совместно удовлетворяют условию $D = 2.5$ и $E = 3$, тогда можно получить

$$\ln \eta_{\text{отн}} = [\eta]_0 \bar{s}^{1/2} c = [\eta]_0 \bar{s}^{3/2} \bar{c}_s. \quad (6)$$

Выражение (6) определяет зависимость относительной вязкости $\eta_{\text{отн}}$ водного раствора желатины на ветви перколоационного кластера (геля) вблизи перехода золь–гель или закон вязкости как функцию концентрации “простых” частиц, характеристической вязкости $[\eta]_0$ макромолекул и числа частиц \bar{s} , составляющих кластер (рис. 3).

Как следует из данных, представленных на рис. 3 для двух образцов желатины при 299 и 293 К,

Таблица 2. Связь между размерностью \bar{d} макромолекулы и типом подрешетки

Состояние макромолекулы	\bar{d} [22]	L^{2D-E}	L^D
Клубок	$5/3$	$L^{1/3}$	$L^{5/3}$
Протекаемый клубок	$3/2$	L^0	$L^{3/2}$
Развернутая цепь	1	L^{-1}	L^1

зависимости $\ln \eta_{\text{отн}} - [\eta]_0 c$ расположены выше касательной, проведенной из начала координат под углом 45° . Таким образом, на ветви геля значения текущей характеристической вязкости $[\eta]_c$ [24] превышают величину $[\eta]_0$, измеренную обычным образом [3], а на ветви золя (раствора) выполняется условие $[\eta]_c < [\eta]_0$.

Время перехода золь–гель

Время t перехода золь–гель зависит как от температуры раствора желатины, так и от концентрации полимера [8], а также в существенной степени определяется величиной гидродинамического объема макромолекул, равного $V_0 = [\eta]_0 M_0$ [3] (рис. 3 и 4).

Нетрудно показать, что гидродинамический радиус агрегатов $\langle R \rangle$ может быть определен как

$$\langle \langle R \rangle / R_0 \rangle = (1 + \tau)^{2/5}, \quad (7)$$

где $\tau = \gamma t$ – приведенное время перехода, γ – зависящая от температуры кинетическая постоянная [7]. Данные, представленные на рис. 4, свидетельствуют о том, что значения $\langle \langle R \rangle / R_0 \rangle$ в зависимости от τ ложатся на одну кривую и удовлетворяют условию

$$L = \ln \eta_{\text{отн}} / ([\eta]_0 c) = (1 + \tau)^{3/2}, \quad (8)$$

и, таким образом, кластеры желатины фрактальны [10].

Результаты проверки скейлинговых соотношений (2) – (6)

Для проверки полученных соотношений были использованы литературные данные [6] независимых вискозиметрических измерений и квазиупругого рассеяния света для одних и тех же концентраций растворов и образцов желатины при 290.8 К (табл. 3). Для предкритических и критических концентраций желатины ($c_{kp} \approx 0.3$ г/дл) наблюдается вполне удовлетворительное согласие значений \bar{s} , рассчитанных по соотношению (6), и величин s , полученных методом рэлеевского рассеяния света (по значениям ММ агрегатов [6]). Как и следовало ожидать [9, 10], с ростом концентрации “простых” частиц ($c > c_{kp}$) заметный вклад в гидродинамическое поведение желатины в растворе на ветви геля вносят кластеры наибольшего размера ($s \sim L^{5/2}$), и именно поэтому значения s (макс) лучше согласуются с величинами s , полученными методом рэлеевского рассеяния света.

Вероятность образования бесконечного кластера

Вероятность того, что узел решетки L не занят “простой” частицей [10], может быть представлена как

$$p = 1 - p(\bar{s})p(s \text{ (макс)}), \quad (9)$$

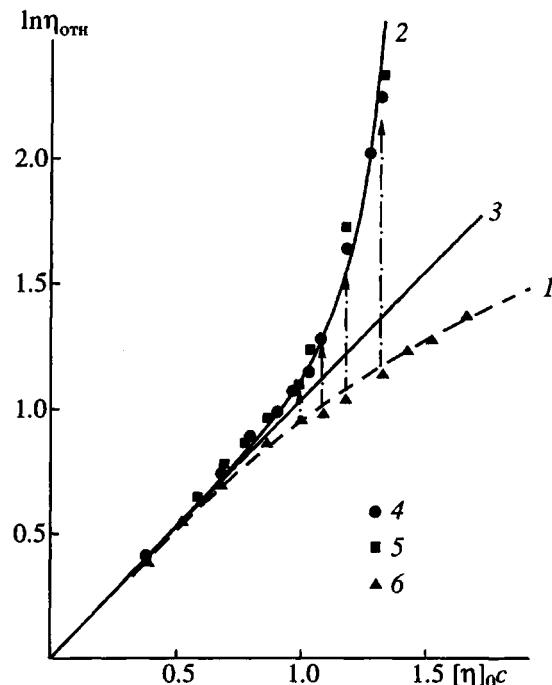


Рис. 3. Концентрационная зависимость относительной вязкости $\eta_{\text{отн}}$ растворов желатины в воде в полулогарифмических координатах $\ln \eta_{\text{отн}} - [\eta]_0 c$ на ветви золя (1), геля (2) и временные переходы 1–2 (3 – касательная к ветви геля) для образцов с $M_\eta = 1.16 \times 10^5$ (4, 6), 298 К; 1.906×10^5 (5), 293 К.

где $p(\bar{s})$ и $p(s \text{ (макс)})$ – соответственно вероятности образования кластеров, содержащих \bar{s} и $s \text{ (макс)}$ частиц, которые в свою очередь пропорциональны соответствующим концентрациям \bar{c}_s и $c_{s \text{ (макс)}}$.

Рисунок 5 иллюстрирует основные закономерности роста бесконечного кластера в растворах желатины для двух полимерных образцов и представленные зависимости $p([\eta]_0 c)$ имеют типичный вид для фазовых переходов второго рода [4, 5]. Наличие точки перегиба на этих зависимостях обязано тому, что при $p < p_c$ в системе имеются только кластеры конечного размера (рис. 6), а при $p \geq (1 - p_c) = 0.69$ и $[\eta]_0 c \geq 1$ построение бесконечного кластера завершено, причем кластеры конечного размера могут находиться только в объеме полостей переколяционного кластера [10, 25]. Именно поэтому количество кластеров конечного размера должно резко убывать при $[\eta]_0 c > 1$ (рис. 6).

Интервал (ширина) перехода золь–гель предопределен значениями вероятности $p_c < p < (1 - p_c)$ и соответствующими величинами $[\eta]_0 c$, а также $c_{kp}(p_c)$, $c_{kp}(1 - p_c)$ (рис. 5, табл. 4). Для образцов желатины с близкими значениями ММ ширина перехода $c_{kp}(1 - p_c) - c_{kp}(p_c)$, как следует из

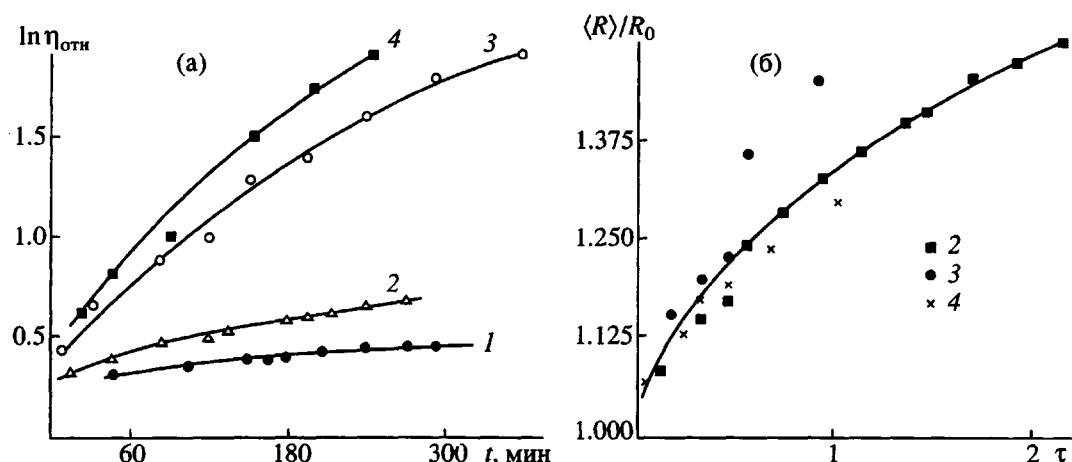


Рис. 4. Кинетические кривые 1 - 4 перехода золь-гель в водных растворах желатины в координатах $\ln \eta_{\text{отн}} - t$ (а) и зависимость отношения гидродинамических радиусов $\langle R \rangle / R_0$ от приведенного времени τ (б) для образца с $M_\eta = 1.05 \times 10^5$; $c = 0.48$ (1), 0.59 (2), 0.89 (3), 1.04 г/дл (4); 299 К, $\gamma = 6.2 \times 10^{-5}$ с⁻¹ (б).

данных табл. 4, изменяется антибатно с гидродинамическим объемом макромолекул V_0 .

Из рис. 6 видно, что концентрация кластеров конечного размера \bar{c}_s достигает предельного значения при $[\eta]_0 c = 1$, т.е. тогда, когда имеет место перекрывание гидродинамических координационных сфер [26], а с ростом концентрации желатины в растворе в полном соответствии с предсказаниями теории [10] \bar{c}_s уменьшается. Представленная зависимость $\bar{c}_s([\eta]_0 c)$ позволяет объяснить необычный вид зависимости приведенной интенсивности квазиупругого рассеяния света в растворах желатины от концентрации полимера, обнаруженной ранее [6] вблизи значений $c_{kp}(1 - p_c)$.

Кластеры критических размеров

Диапазон значений \bar{s} и средних радиусов $\langle R \rangle$ кластеров, рассчитанных по соотношениям (1) и (2) для концентраций желатины, превышающих $c_{kp}(1 - p_c)$, довольно широк и составляет, напри-

мер, для макромолекул спирализующегося конфигурационного типа интервал $\langle R \rangle = 30 - 52$ нм ($c = 1.9 - 2.4$ г/дл, 299 К). Эти значения хорошо согласуются с размерами надмолекулярных образований, обнаруженными при электронно-микроскопических исследованиях водных гелей желатины в интервале концентраций 1 - 10 г/дл и равными 30 - 200 нм [27]. Напротив, размерам кластеров вблизи критической концентрации $c_{kp}(1 - p_c)$ соответствует довольно узкий диапазон значений $\langle R \rangle = 22 - 35$ нм (табл. 4). Существенно, что критические размеры кластеров определяются значениями гидродинамического объема макромолекул V_0 .

Кооперативность сегментальной подвижности макромолекул желатины вблизи перехода спираль-клубок

Из полученных температурных зависимостей пиковской интенсивности I линии 0.93 м. д. в спектрах ПМР водных растворов желатины следует, что в

Таблица 3. Средние размеры кластеров желатины в водных растворах по данным вискозиметрии и рэлеевского светорассеяния [6], 290.8 К

Образец	c , дл/г	$[\eta]_0$, с	$\ln \eta_{\text{отн}}$	\bar{s}	s (макс)	s [6]	$\langle R \rangle^*$, нм	$\langle R \rangle^{**}$, нм	$\langle R \rangle^{***}$, нм
1	0.087	0.036	0.053	2.14	2.59	2.14	22.4	24.1	22.4
2	0.203	0.085	0.17	3.8	5.4	4.9	28.3	32.3	31.1
3	0.386	0.16	0.50	9.6	16.8	12.4	40.7	51.0	45.2
4	0.539	0.23	1.08	22.7	49.7	60.8	57.5	78.7	85.3
5	0.75	0.30	0.88	8.7	14.9	18.8	41.5	51.5	56.6
6	0.90	0.36	1.14	10.0	17.9	20.0	44.0	55.5	58.0

Примечание. Образцы 1 - 4 для желатины "Р" в водном растворе (0.15 M NaCl, pH 5.1): $R_0 = 16.5$ нм, $[\eta]_0 = 0.42$ дл/г, $M_w = 9.7 \times 10^4$. Образцы 5, 6 для желатины "В" в водном растворе (0.15 M NaCl, pH 3.1): $R_0 = 17.5$ нм, $[\eta]_0 = 0.403$ дл/г, $M_w = 8.8 \times 10^4$.

* Радиусы кластеров по соотношению $\langle R \rangle = \bar{s}^{1/D} R_0$ и ** $\langle R \rangle = s$ (макс) $^{1/D} R_0$.

*** Значения по данным светорассеяния [6].

изученном ряду образцов макромолекулы желатины проявляют различную способность по отношению к спирализации на уровне всей макропептидной цепи, которая выражается в соответствующих изменениях интенсивности ΔI и ширины перехода $\Delta T/T^*$ спираль-клубок при вариации ММ ($(0.5 - 1.2) \times 10^5$) и гидродинамического объема макромолекул V_0 (рис. 7, табл. 1).

Способность к спирализации на уровне элементарных звеньев цепи полипептида была изучена путем анализа распределения интенсивностей соответствующих сигналов в спектрах ЯМР ^{13}C образцов желатины в растворе и геле. В геле при 293 К нами обнаружено, что степень спиральности участков макропептидной цепи, содержащих Thr, Ile, Ser, Gln, Asn, Asp, Lys, Glu, Arg, зависит как от способа получения желатины, так и от типа исходного коллагена, причем для макромолекул с близкими значениями $M \sim 10^5$ относительная степень спиральности этих аминокислотных групп ниже, чем у Pro, Gly. Абсолютное количество аминокислотных групп, проявляющих более высокую способность к спирализации, несколько выше в образцах, полученных щелочным способом из костного коллагена, в сравнении с образцами желатины из кожевенного коллагена, полученными кислотным методом.

Параметры S и σ Брэгга-Зимма [2]

Эти параметры позволяют связать между собой экспериментально определяемые из спектров ПМР величины – ширину переходного интервала $\sigma^{1/2} \sim \Delta T/T^*$ ($T^* = 305$ К), пиковую интенсивность I линии 0.93 м. д. и степень спиральности θ^* макромолекул – с помощью выражений [2, 4, 5]

$$\theta^* = \frac{1}{2} + \frac{s-1}{2} [(S-1) + 4\sigma s]^{1/2}, \quad (10)$$

$$\theta^* = 1 - I = n_h / (n_h + n_c),$$

где n_h, n_c – соответственно количество элементарных звеньев в спиральной и клубковой конформациях, а $(S-1) \sim (T-T^*)/T^*$ в области малых изменений температуры вблизи T^* – температуры перехода при $\theta^* = 1/2$.

Из соотношений (10) следует, что степень спиральности θ^* как функция параметра S в области перехода спираль ($S > 1$)–клубок ($S < 1$) в предельных случаях соответствует значениям параметра кооперативности $\sigma = 1$ и 0 [5]. Согласно работе [2], эти два предельных значения параметра кооперативности σ отражают возможные изменения длины кунновского сегмента: в первом случае при слабой кооперативности, равной пяти-семи элементарным звеньям или ~1.8 нм (СК), и ~200 нм (спираль, $N = 1$) во втором случае при сильной кооперативности [5].

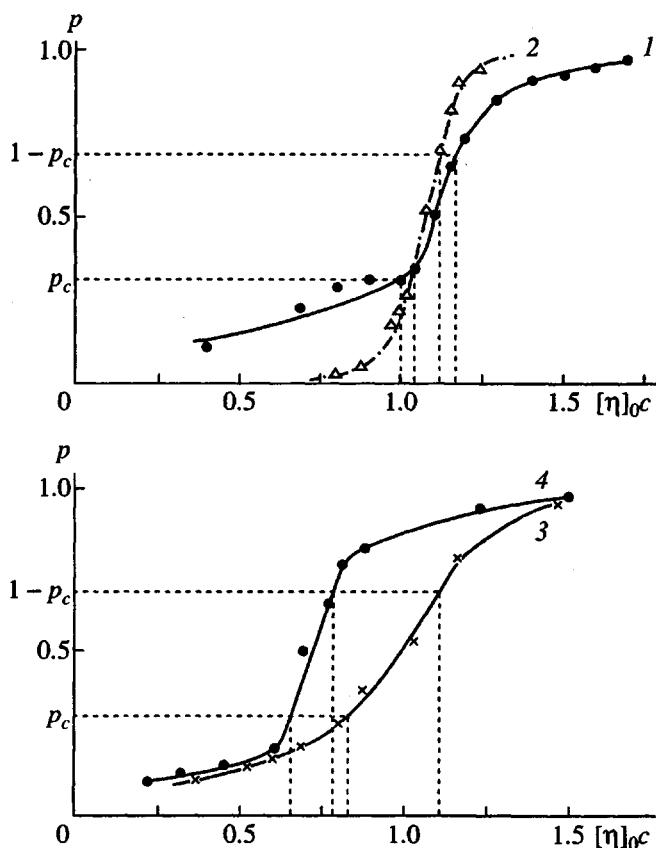


Рис. 5. Вероятность p образования бесконечного кластера в водных растворах желатины как функция параметра $[\eta]_0 c$ вблизи (1, 3) (299 К) и ниже (2, 4) (293 К) температурной точки перехода золь–гель (301 К) для образцов с $M_\eta = 1.16 \times 10^5$ (1, 2) и 1.06×10^5 (3, 4).

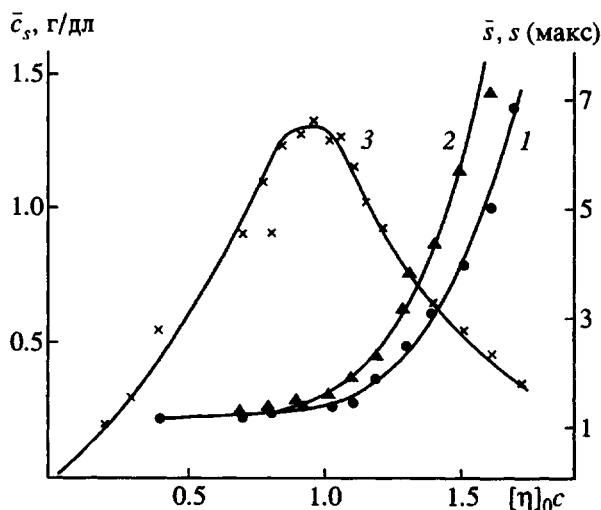


Рис. 6. Зависимости среднего размера кластеров \bar{s} (1), размеров наибольшего кластера $s_{\text{макс}}$ (2) и средней концентрации кластеров \bar{c}_s (3) от параметра $[\eta]_0 c$, полученные для кластеров с фрактальной размерностью $D = 2.5$; $M_\eta = 1.16 \times 10^5$, 299 К.

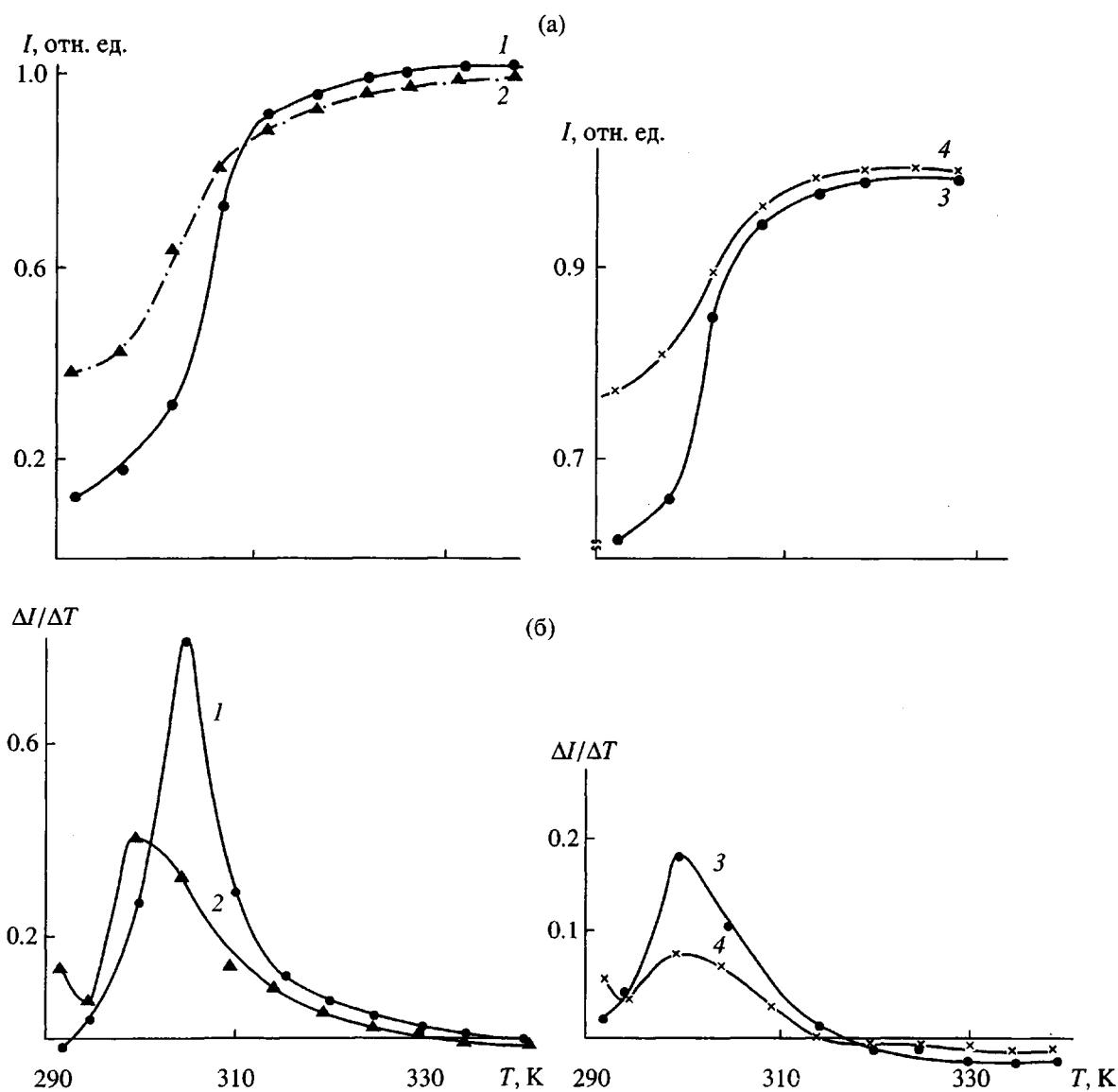


Рис. 7. Температурные зависимости относительной интенсивности I (а) и производной $\Delta I / \Delta T$ (б) линии 0.93 м. д. в спектрах ЯМР ^1H растворов желатины в D_2O для образцов фото- (1, 2) и ихтиожелатины (3, 4); скорость нагревания 5 град/мин, концентрация 40%.

В реальной ситуации конечных значений $N > 1$ и σ ($0 < \sigma < 1$) для всех изученных образцов желатины переход спираль–клубок происходит в интервале значений $\sigma^{1/2} \sim 10^{-2} - 10^{-1}$, причем эти значения $\sigma^{1/2}$ тем меньше, чем меньше параметр кооперативнос-

ти σ и выше ММ макромолекул (табл. 1). Независимо от условий проведения спектроскопического эксперимента (при кратковременном или длительном отжиге образцов при 293.5 К) параметры кооперативности σ макромолекулы желатины

Таблица 4. Параметры кластеров в водных растворах желатины для полимерных образцов 1 - 3 (табл. 1), pH 5.1

Образец	$[\eta]_0$, дл/г	$c_{kp}(p_c)$, г/дл	$c_{kp}(1-p_c)$, г/дл	\bar{c}_s , г/дл	$s(1-p_c)$	s (макс)	$\langle R \rangle$, нм
1	0.70/0.95	1.4/1.05	1.70/1.20	1.20/0.96	1.87/1.90	2.56/2.62	26 - 29/30 - 35
2	0.50/0.51	2.2/1.35	2.90/1.57	1.80/1.10	1.90/1.96	2.62/2.74	24 - 27/24 - 28
3	0.54/0.64	- / 1.30	1.80/ -	1.60/1.05	1.67/1.91	2.16/2.64	23 - 25/24 - 27

Примечание. В числителе приведены значения для $T = 299$ К, в знаменателе – для 293 К. Расчет средних радиусов $\langle R \rangle$ проведен для значений \bar{z} и s (макс) и величин R_0 , заимствованных из работы [6].

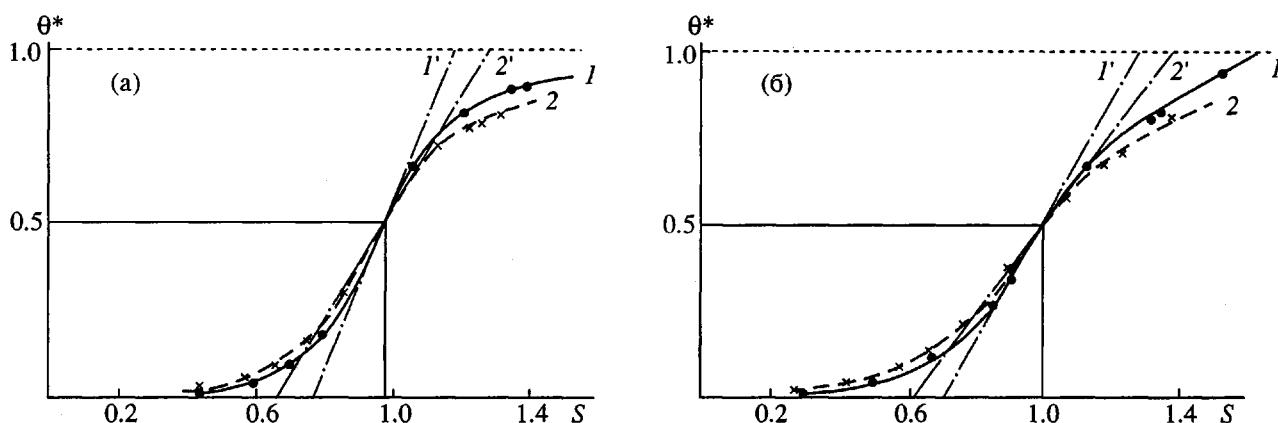


Рис. 8. Степень спирализации θ^* как функция параметра S в области перехода спираль–клубок по данным ЯМР ^1H -спектроскопии для образцов фотожелатины инертного “Rousselot” (1) и кожевенного типа (2) при длительном (а) и кратковременном (б) предварительном отжиге образцов; а: $\sigma = 0.15$ (1) и 0.26 (2); б: $\sigma = 0.23$ (1) и 0.30 (2); Γ , Γ' – касательные к точке $\theta^* = 1/2$, скорость нагревания 2.5 град/мин.

заметно отличаются друг от друга, если гидродинамические объемы V_0 этих макромолекул различны (рис. 8).

Для изученных образцов желатины обнаружены простые соотношения между параметрами кооперативности σ , определенными из спектров ПМР при предварительном отжиге образцов (15 с, 293.5 К), гидродинамическим объемом V_0 (298 К) и характеристической вязкостью $[\eta]_0$ (308 К) макромолекул (рис. 9, табл. 1). При экстраполяции полученной зависимости $\sigma([\eta]_0)$ к значению $\sigma = 0$, соответствующему случаю сильной кооперативности, можно получить $[\eta]_0 = 0.96$ дл/г. Этому значению $[\eta]_0$ отвечает $M = 2.4 \times 10^5$, что близко к величине ММ коллагена ($M = 2.85 \times 10^5$ [28, 29]), а расчет характеристической вязкости коллагена этой ММ по соотношению $[\eta]_0 = 1.66 \times 10^{-5} M^{0.885}$ [3, 11, 12] дает величину 1.1 дл/г (308 К). Таким образом, зависимости $\sigma([\eta]_0)$ и $\sigma(V_0)$ отражают корреляцию между параметрами σ , которые принимают значения 0.15 - 0.50, и изменением числа куновских сегментов $N = 1 - 40$ в изученном ряду образцов желатины.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Вторичные структуры желатины, как известно [28], стабилизируются внутримолекулярными водородными связями в пептидной цепи, поэтому блокирование этих водородных связей приводит к снижению регулярности [28, 30] и повышению σ и N , т.е. к снижению способности макромолекул к спирализации. К этому же результату могут приводить полимераналогичные превращения в аминокислотных остатках коллагена [28] и желатины [30] при кислотной и щелочной обработке [31]. Выше отмечено, что при гидролизе кожевенного коллагена, согласно данным ЯМР-спектроскопии, глутаминовые и аспаргиновые заместители превращаются в соответствующие кис-

лоты и их соли. И рост параметров $\sigma^{1/2}$ и кооперативности σ в изученном ряду образцов желатины по отношению к коллагену ($\sigma^{1/2} \sim 10^{-4}$, $\sigma = 0$) в значительной степени предопределяется возможными конфигурационными дислокациями в первичной аминокислотной последовательности, зависящими от природы сырья и от способа получения желатины (табл. 1, рис. 8 и 9).

Обнаруженные корреляции между характеристиками кластерной структуры и критически-ми показателями желатины вблизи порога гелеобразования в растворе обусловлены взаимосвязью параметров V_0 и σ макромолекул. Здесь, вероятно, следует указать на определенную аналогию зависимостей $p([\eta]_0 c)$ (рис. 5) и $\theta^*(S)$ (рис. 8), поскольку каждая из них характеризует вероятность образования бесконечного кластера на пороге протекания при вариации $[\eta]_0 c$ и S , а соответствующие ширины переходов золь–гель

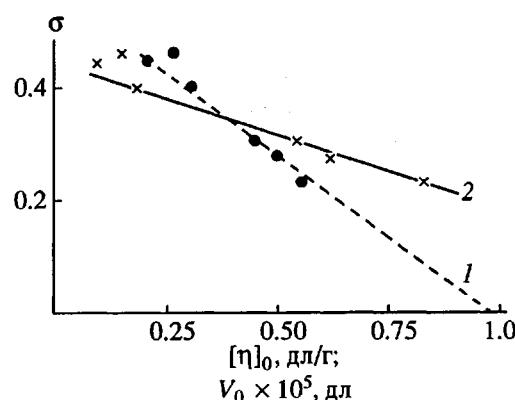


Рис. 9. Зависимости параметра кооперативности σ от характеристической вязкости $[\eta]_0$ при 308 К (1) и гидродинамического объема V_0 при 299 К (2) макромолекул желатины для образцов 1, 2, 4 - 7 (табл. 1).

$(c_{kp}(1 - p_c) - c_{kp}p_c)$ и спираль–клубок ($\Delta T/T^*$) могут быть определены из параметров макромолекул желатины $V_0([\eta]_0)$ и σ (рис. 9).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Баранов В.Г., Френкель С.Я., Бресткин Ю.В., Саддиков И.С. // Докл. АН СССР. 1985. Т. 281. № 2. С. 345.
2. Zimm B., Bragg J. // J. Chem. Phys. 1959. V. 31. P. 526.
3. Цветков В.Н., Эскин В.Е., Френкель С.Я. Структура макромолекул в растворах. М.: Наука, 1964.
4. Doi M., Edwards S.F. Theory of Polymer Dynamics. New York: Acad. Press, 1986.
5. Гросберг А.Ю., Хохлов А.Р. Статистическая физика макромолекул. М.: Наука, 1989.
6. Boedtke H., Doty P. // J. Phys. Chem. 1954. V. 58. P. 968.
7. Feder J., Jossang T., Rosenqvist E. // Phys. Rev. Lett. 1984. V. 53. P. 1403.
8. Красовский А.Н., Баранов В.Г., Бочко Е.П., Мнацаканов С.С. // Журн. прикл. химии. 1993. Т. 66. № 3. С. 796.
9. De Gennes P.G. Scaling Concepts in Polymer Physics. Ithaca: Cornell Univ. Press, 1979.
10. Feder J. Fractals, Department of Physics, University of Oslo. New York; London: Plenum Press, 1988.
11. Pouradier J., Venet A. // J. Chem. Phys. 1950. V. 47. P. 391.
12. Nishihara T., Doty P. // Proc. Nat. Acad. Sci. 1958. V. 44. P. 411.
13. Нарышкина Е.П., Волков В.Я., Долининий А.И., Измайлова В.Н. // Коллоид. журн. 1982. Т. 44. № 2. С. 356.
14. Измайлова В.Н., Ямпольская Г.П., Сумм Б.Д. Поверхностные явления в белковых системах. М.: Химия, 1988.
15. Maquet J., Thevenear H., Djabourov M., Leblond J., Papon P. // Polymer. 1986. V. 27. P. 1103.
16. Walter J., Hope A.B. // Austr. J. Biol. Sci. 1971. V. 24. P. 497.
17. Finer E.G., Franks F., Phillips M.C., Suggett A. // Biopolymers. 1975. V. 14. P. 1995.
18. Saito H., Ishida M., Yokoi M., Asarura T. // Macromolecules. 1990. V. 23. № 1. P. 83.
19. Meakin P., Jullien R. // J. Chem. Phys. 1988. V. 89. P. 246.
20. Смирнов Б.М. Физика фрактальных кластеров. М.: Наука, 1991.
21. Ельяшевич А.М. Препринт докл. на совещ. "Проблемы теории полимеров в твердой фазе". Черноголовка, 1985. С. 7.
22. Баранов В.Г., Френкель С.Я., Бресткин Ю.В. // Докл. АН СССР. 1986. Т. 290. № 2. С. 369.
23. Бирштейн Т.М., Скворцов А.М., Сарiban А.А. // Высокомолек. соед. А. 1977. Т. 19. № 1. С. 63.
24. Баранов В.Г., Бресткин Ю.В., Поддубный В.И., Агранова С.А., Пинкевич В.Н. // Высокомолек. соед. А. 1987. Т. 29. № 12. С. 2516.
25. Красовский А.Н., Николаев Б.П., Шляков А.М., Мнацаканов С.С. // Коллоид. журн., 1994. Т. 56. № 3. С. 371.
26. Flory P. Principles of Polymer Chemistry. New York: Cornell Univ. Press, 1971.
27. Титова Е.Ф., Белавцева Е.Н. // Биофизика. 1984. Т. 29. № 2. С. 334.
28. Veis A. The Macromolecular Chemistry of Gelatin. London; New York: Acad. Press, 1964.
29. Завлин П.М., Нусс П.В., Овчинников А.Н., Сакварелидзе М.А., Ямпольская Г.П. // Журн. прикл. химии. 1993. Т. 66. № 3. С. 615.
30. Красовский А.Н., Варламов А.В., Езепова Н.В., Чезлов И.Г., Поляков Д.Н., Мнацаканов С.С., Баранов В.Г. // Журн. прикл. химии. 1991. Т. 64. № 8. С. 1743.
31. Красовский А.Н., Мнацаканов С.С., Гусева Е.Г., Андреева А.И., Марянина Е.В., Устинова Л.Н. // Журн. прикл. химии. 1993. Т. 66. № 4. С. 811.

Aqueous Solutions of Gelatin Near the Gelation Threshold: Scaling Behavior, Cluster Structure, and Concentration Plots for Relative Viscosity

A. N. Krasovskii*, B. P. Nikolaev**, A. M. Shlyakov**, and S. S. Mnatsakanov*

*St. Petersburg Institute of Cinema and Television, ul. Pravdy 13, St. Petersburg, 191126 Russia

**State Research Institute of High-Purity Biopreparations, ul. Pudozhskaya 7, St. Petersburg, 197110 Russia

Abstract – Plots of relative viscosity η_{rel} versus gelatin concentration in aqueous solution were subjected to quantitative analysis near the sol–gel transition. Peak intensity of the high-resolution NMR line at 0.93 ppm associated with the protons of methyl groups of amino acid residues in gelatin was also examined near the helix–coil transition. Gelatins from various sources and isolated by various procedures were studied. Within the framework of concepts treating draining in three-dimensional systems, scaling relationships relating hydrodynamic volume of fractal clusters of dimensionality D , the number of clusters, and η_{rel} were obtained. It was demonstrated that on the branch of a percolation cluster ($D = 2.5$), η_{rel} is controlled by the intrinsic viscosity $[\eta]_0$, concentration c , and the number of particles \bar{s} comprising the cluster; the reduced time τ for the sol–gel transition is given as $(1 + \tau)^{3/2} = \ln \eta_{rel} ([\eta]_0 c)$. Expressions describing the variation of probability for the formation of an infinite cluster, and those for concentration and mean size of finite clusters were obtained. The width of the sol–gel transition and critical parameters of gelation in solution (concentration, cluster size as deduced from viscosity measurements) and the width $\Delta T/T^*$ of the helix–coil transition according to NMR spectroscopy were found to be controlled by hydrodynamic volume V_0 of macromolecules. Moreover, correlation between the parameters of cooperativity of segmental mobility according to Zimm–Bragg and V_0 was observed.