



УДК 539.196.3:57.043.086.2:547.42

© 2007

Е. Н. Животова, Л. Г. Кулешова, А. В. Зинченко, В. В. Чеканова

**Исследование физических состояний бинарных систем
вода — оксиэтилированный глицерин со степенью
полимеризации $n = 5$ и 25 при температурах ниже
 273 К методом криомикроскопии**

(Представлено членом-корреспондентом НАН Украины М. А. Стржеземечным)

Binary systems water — oxyethylated glycerol (OEG) with the polymerization degree $n = 5$ and 25 have been investigated by optical cryomicroscopy within the temperature range 173 – 273 K at a cooling rate of 30 K min^{-1} and a warming rate of 5 K min^{-1} . Cryomicrographs demonstrating the morphology of the crystalline and/or amorphous phases at different contents of OEG depending on temperature on cooling or warming are given. It has been shown that the systems with low (0 – 45%) and medium (46 – 72%) contents of OEG ($n = 5$) crystallize, and the high OEG ($n = 5$)-content systems (73 – 100%) remain wholly amorphous. A similar situation is observed for the system water — OEG ($n = 25$) with insignificant differences in the concentration ranges. The fundamental distinction between the two systems consists in that the system water — OEG ($n = 25$) of the high OEG ($n = 25$) concentration (more than 77%) forms an ordered structure in contrast to the system water — OEG ($n = 5$).

Исследования водных растворов многоатомных спиртов важны для изучения межмолекулярных взаимодействий в системах с водородными связями, склонных к стеклованию при охлаждении. Благодаря свойству переходить в твердоаморфное состояние при низких температурах некоторые многоатомные спирты применяются как криопротекторы при низкотемпературном консервировании биологических объектов. Наиболее широкое практическое применение в качестве криопротектора нашел глицерин, в связи с чем его водные растворы при температурах ниже 273 К исследовались рядом авторов [1–3]. Поиск новых криопротекторов относится к числу актуальных задач криобиологии, причем один из путей состоит в химической модификации многоатомных спиртов, обладающих криопротекторными свойствами.

Добавление оксиэтильной цепочки $(-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-)_n$ (оксиэтилирование) к первичной гидроксильной группе молекулы глицерина позволило получить набор оксиэтилированных соединений с различной молекулярной массой в зависимости от степени полимеризации

n [4]. Проведенные ранее калориметрические исследования фазовых переходов и физических состояний бинарной системы вода — оксиэтилированный глицерин (ОЭГ) со значительно различающимися значениями степени полимеризации ($n = 5$ и 25) выявили существенные качественные и количественные различия в термическом поведении этих систем в диапазоне температур 123–273 К [5]. Так, на термограммах ДСК при концентрациях ОЭГ ($n = 25$) выше 77% (мас.) наблюдались экзо- и эндотермические пики, которые были идентифицированы нами как кристаллизация и плавление ОЭГ ($n = 25$). Эти процессы не происходили в системе вода — ОЭГ ($n = 5$) в том же диапазоне концентраций. Кроме того, наблюдалось значительное повышение температуры всех фазовых переходов и стеклования с ростом степени полимеризации.

Результаты, полученные с помощью дифференциальной сканирующей калориметрии в работе [5], могут быть существенно дополнены криомикроскопическим исследованием. Совместное использование этих методов позволяет получить более достоверную информацию о физических состояниях систем при различных температурах при охлаждении и нагреве [6–8].

Целью настоящей работы является исследование характера затвердевания водных растворов ОЭГ ($n = 5$ и 25) в зависимости от концентрации ОЭГ методом оптической криомикроскопии в диапазоне температур 173–273 К.

Материалы и методы. Оксигэтирование глицерина проводили по методу, описанному в работе [5]. Растворы ОЭГ готовили на дистиллированной воде. Концентрацию растворов ОЭГ выражали в массовых процентах.

Криомикроскопические исследования проводили на установке, позволяющей визуально наблюдать морфологию растворов на этапе замораживания до 173 °К и на этапе нагрева [9]. Каплю исследуемого раствора ОЭГ помещали в рабочую камеру криостоллика и накрывали покровным стеклом. Для устранения возможного переохлаждения в образец вносили кристаллы AgI. Охлаждение осуществляли со скоростью 30 К/мин, нагрев — 5 К/мин. Кинетику процессов фиксировали фотографически при 100-кратном увеличении.

Результаты и обсуждение. Ранее нами были построены диаграммы физических состояний бинарных систем вода — ОЭГ ($n = 5$ и $n = 25$) [5], на основании анализа которых были выделены области, ограниченные определенными значениями температуры и концентраций. Для каждой области характерны физические состояния раствора с различным соотношением кристаллической и аморфной фаз. В соответствии с этим на диаграмме выделены концентрационные зоны (табл. 1) с определенным набором физических состояний и переходов между ними (табл. 2).

Для криомикроскопических исследований нами были выбраны по одному представителю каждой зоны следующих концентраций ОЭГ ($n = 5$ и 25): 30% (зона i), 58% (зона ii), 70% (зона iii) и 90% (зона iv). В табл. 2 приведены значения температур расстеклования и фазовых переходов растворов этих концентраций, полученных методом ДСК [5].

Результаты криомикроскопических исследований водных растворов ОЭГ приведены на рис. 1–3. Кристаллизация 30%-ного раствора ОЭГ ($n = 5$), относящегося к зоне i, на этапе охлаждения сопровождалась формированием в поле зрения двух фронтов кристаллизации, движущихся навстречу друг другу, с формированием между ними концентрационного включения в виде протяженного оптически прозрачного канала, соответствующего стеклообразным включениям (рис. 1, a). Видно, что затвердевший в ходе охлаждения образец в зоне i представляет собой смесь кристаллов льда и стеклообразных включений концентрированного раствора ОЭГ ($n = 5$), что согласуется с калориметрическими данными [5].

Переход незакристаллизовавшихся включений из твердоаморфного состояния в состояние переохлажденной жидкости, наблюдаемый калориметрически в виде скачка теплопоглощения на термограммах ДСК, криомикроскопически не наблюдался, поскольку как стеклообразное состояние, так и состояние переохлажденной жидкости, являются оптически прозрачными.

При нагреве в температурном интервале 200–233 К отмечали постепенное сужение канала, свидетельствующее о продвижении фронтов кристаллизации, а, следовательно, о продолжении кристаллизационных процессов, которые начались при охлаждении (рис. 1, б). Этот процесс соответствует экзотермическим пикам слабой интенсивности, наблюдаемых на термограммах ДСК при температуре 201 К [5]. Дальнейшее повышение температуры приводило к рекристаллизации основной кристаллической матрицы (рис. 1, в). При этом размер канала не изменялся. Область интенсивного плавления характеризовалась отодвиганием фронтов и расширением канала (рис. 1, г).

Для замороженного 30%-ного раствора ОЭГ ($n = 25$) характерна мелкокристаллическая структура льда (рис. 1, д). Нагрев не приводит к визуальному изменению характера структуры вплоть до области интенсивного плавления (рис. 1, е).

Охлаждение 58%-ного раствора ОЭГ ($n = 5$) (зона ii) сопровождалось формированием многочисленных линейных кристаллических структур. Концентрированные жидкие включения при этом представляли собой тонкие прослойки (рис. 2, а). На этапе нагрева кристаллизационные процессы, которые были зафиксированы калориметрически в области 207 °К, криомикроскопически не наблюдались. Кристаллическая структура визуально оставалась

Таблица 1. Границы концентрационных зон (% (масс.)) с определенным набором физических состояний для водных растворов ОЭГ различной степени полимеризации (n)

Зона	Границы концентрационных зон		Характер физического состояния раствора
	$n = 5$	$n = 25$	
i	0–45	0–47	Кристаллизация льда происходит на этапе охлаждения и продолжается на этапе нагрева. Стеклообразная фаза существует в виде включений
ii	46–72	48–65	Раствор затвердевает в аморфном состоянии. Кристаллизация льда происходит на этапе нагрева
iii	73–100	66–76	Раствор не кристаллизуется ни при охлаждении, ни при нагреве
iv	—	77–100	Кристаллизуется ОЭГ. Стеклообразная фаза существует в виде включений

Таблица 2. Значения температур (К) расстеклования и фазовых переходов водных растворов ОЭГ ($n = 5$ и 25) различных концентраций

Переход	30% (зона i)		58% (зона ii)		70% (зона iii)		90% (зона iv)	
	$n = 5$	$n = 25$	$n = 5$	$n = 25$	$n = 5$	$n = 25$	$n = 5$	$n = 25$
Расстеклование	183	198	173	193	182	198	196	206
Кристаллизация воды при нагреве	—	—	207	214	208	—	—	—
Завершение кристаллизации воды при нагреве	203	207	—	—	—	—	—	—
Плавление воды	263	267	238	239	221	—	—	—
Кристаллизация ОЭГ	—	—	—	—	—	—	—	216
Плавление ОЭГ	—	—	—	—	—	—	—	264

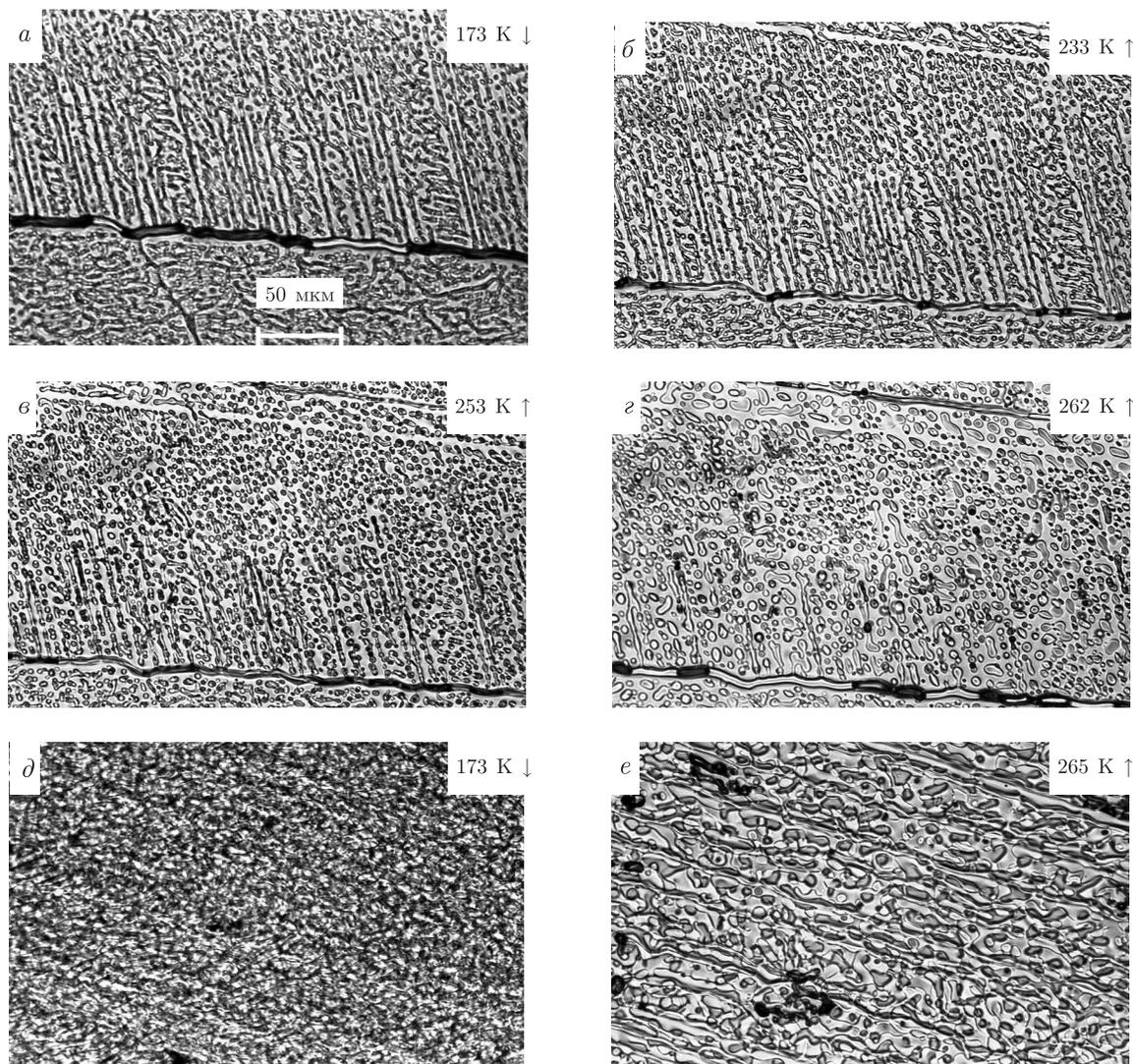


Рис. 1. Микрофотографии 30%-ных растворов ОЭГ ($n = 5$) (а-г) и ОЭГ ($n = 25$) (д-е) (зона i). На микрофотографиях указаны температуры съемки, ↓ — охлаждение, ↑ — нагрев. Увеличение одинаково для всех фотографий

стабильной вплоть до области предплавления, начало которой совпадало с калориметрическими данными. Об интенсивном плавлении свидетельствовало укрупнение каналов и постепенное измельчение структуры (рис. 2, б).

Согласно данным ДСК, этот раствор принадлежит к зоне ii, для которой характерно формирование кристаллической структуры на этапе нагрева при скоростях охлаждения 200 К/мин и нагрева 0,5 К/мин. Используемая в криомикроскопии скорость охлаждения (30 К/мин), по-видимому, была недостаточной для предотвращения кристаллизации при охлаждении, в результате чего линия кристаллизации 2 на фазовой диаграмме сдвинулась в сторону более высоких концентраций. Поэтому нами были проведены криомикроскопические исследования раствора, принадлежащего зоне ii, но имеющего более высокую концентрацию — 68%. Данный раствор оставался оптически прозрачным на всем этапе охлаждения вплоть до 173 К, но на этапе нагрева при температуре 213 К наблюдалось зарождение

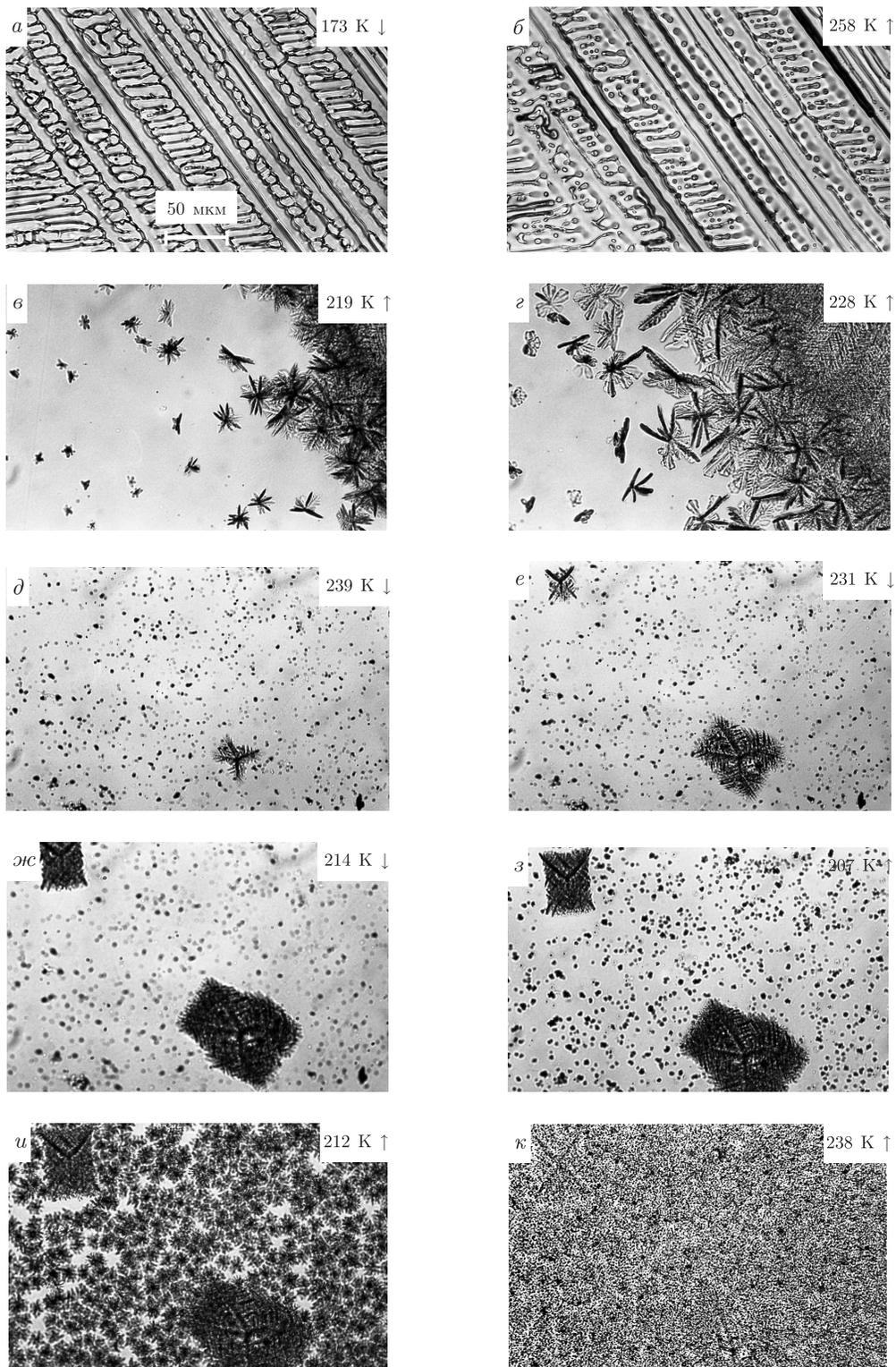


Рис. 2. Микрофотографии 58%-ных растворов ОЭГ ($n = 5$) (а-б) и ОЭГ ($n = 25$) (д-к) и 68%-ных растворов ОЭГ ($n = 5$) (б-з) (зона ii). На микрофотографиях указаны температуры съемки, ↓ — охлаждение, ↑ — нагрев

кристаллов льда в форме дендритов [9] и увеличение их размеров с ростом температуры (рис. 2, в, з) до 228 К. С началом плавления при 231 К происходило разрушение дендритов и размытие кристаллов. Данная картина полностью соответствует результатам, полученным методом ДСК для зоны ii.

Начало образования кристаллов льда в 58%-ном растворе ОЭГ ($n = 25$) (зона ii) наблюдалось в ходе охлаждения при температуре 239 К в виде возникновения единичных локальных центров кристаллизации, разрастание которых происходило путем выброса дендритных игл в четырех различных направлениях (рис. 2, д). Дальнейший рост сопровождался формированием осей дендрита первого, второго и более высокого порядка, заполняющих пространство между главными стволами дендрита. В результате такого развития процесса сформировались достаточно крупные поликристаллические конгломераты правильной геометрической огранки (рис. 2, е). При температуре 214 К рост кристаллов прекратился (рис. 2, ж), что, по-видимому, обусловлено ограничением доступа молекул воды к растущим граням кристаллов в результате значительного возрастания вязкости. Остальная масса образца оставалась оптически прозрачной, будучи в аморфном состоянии. Линейные размеры образовавшихся при охлаждении кристаллических фрагментов сохранялись как при дальнейшем охлаждении образца до температуры 173 К, так и при нагреве вплоть до температуры 207 К. При данной температуре было зафиксировано массовое высыпание из переохлажденной жидкости новых кристаллических зародышей (рис. 2, з). При дальнейшем повышении температуры отмечался их активный рост в виде гексагональных структур (рис. 2, и) с постепенным вовлечением в кристаллизационный процесс всего образца. Размеры кристаллов, образовавшихся при нагреве, значительно меньше кристаллов, образовавшихся при охлаждении, так как первые кристаллизуются из более концентрированного раствора, что способствует образованию мелкодисперсного льда. При температуре 238 К началось плавление кристаллов льда (рис. 2, к), которое завершилось при температуре 248 К.

Растворы зоны iii (ОЭГ ($n = 5$) — 90% и ОЭГ ($n = 25$) — 70%) сохраняли оптическую прозрачность, как при охлаждении вплоть до 173 К, а также при последующем нагреве, что свидетельствует об отсутствии рассеивающих частиц, какими являются кристаллы. В данном случае имело место стеклование, что полностью соответствует calorиметрическим данным для концентрационной зоны iii.

Кристаллизация 90%-ного раствора ОЭГ ($n = 25$) (зона iv) характеризовалась появлением при 256 К едва различимой “сетки” в виде тонких нитей (рис. 3, а), которая практически не претерпевала никаких изменений как при понижении температуры до 173 К (рис. 3, б), так и при последующем ее повышении до 243 К (рис. 3, в). При нагреве при 267 К “сетка” исчезала, и система переходила в жидкое состояние, о чем свидетельствовало интенсивное перемещение кристалликов AgI в поле зрения (рис. 3, г). Формирование “сетки” идентифицируется нами как кристаллизация ОЭГ ($n = 25$).

Таким образом, результаты исследования физических состояний бинарных систем вода — ОЭГ ($n = 5$) и вода — ОЭГ ($n = 25$) в диапазоне температур 173–273 К показали, что при низких (зона i) и средних (зона ii) концентрациях ОЭГ наблюдалось формирование как кристаллической, так и аморфной фаз, соотношение которых зависит от концентрации. Причем в зоне ii формирующиеся кристаллы имели вид дендритов первого, второго и более высоких порядков. В зоне iii системы затвердевали в полностью аморфном состоянии и сохраняли ближний порядок при нагреве. В зоне iv, характерной только для второй системы, наблюдалась кристаллизация ОЭГ ($n = 25$) в виде формирования сетчатой структуры.

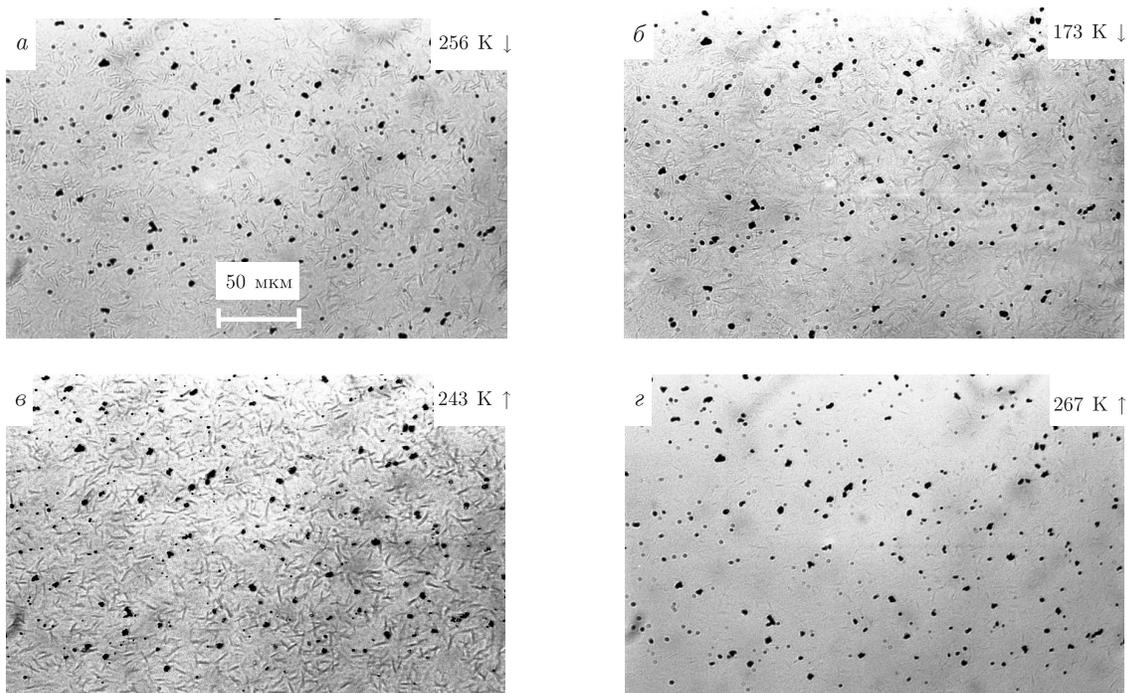


Рис. 3. Микрофотографии 90%-ного раствора ОЭГ ($n = 25$) (зона iv). На микрофотографиях указаны температуры съемки, ↓ — охлаждение, ↑ — нагрев

Следует отметить, что результаты, полученные методом оптической криомикроскопии в контрольных концентрационных зонах, достаточно хорошо согласуются с проведенными ранее калориметрическими исследованиями фазовых переходов и физических состояний указанных систем [5].

1. *Vigier G., Vassoille R.* Ice nucleation and crystallization in water-glycerol mixture // *Cryobiology*. – 1987. – **24**. – P. 345–354.
2. *Chang Z. H., Baust J. G.* Physical aging of glassy state: dsc study of vitrified glycerol systems // *Ibid.* – 1991. – **28**. – P. 87–95.
3. *Chang Z. H., Baust J. G.* Further inquiry into the cryobehavior of aqueous solutions of glycerol // *Ibid.* – P. 268–278.
4. *Матвеец Н. И.* Оксигилирование глицерина – метод создания криозащитных веществ // *Современные проблемы криобиологии*. – Киев: Наук. думка, 1976. – С. 15–19.
5. *Животова Е. Н., Зинченко А. В., Чежанова В. В., Компаниец А. М.* Термический анализ бинарных систем вода – оксигилированный глицерин (степень полимеризации $n = 5$ и 25) при температурах ниже 273 К // *Доп. НАН України*. – 2006. – № 9. – С. 74–79.
6. *Reid D. S.* Cryomicroscopic Studies of the Freezing of Model Solutions of Cryobiological Interest // *Cryobiology*. – 1984. – **21**. – P. 60–67.
7. *Water*, a comprehensive treatise. Water and aqueous solutions at subzero temperatures. Edited by F. Franks. Vol. 7. – New York: Plenum Press, 1982. – 484 p.
8. *Зинченко А. В., Манж В. В., Овчаренко Ф. Д. и др.* Строение и фазовые состояния водно-глицериновых растворов // *Докл. АН УССР. Сер. Б.* – 1982. – № 8. – С. 38–42.
9. *Кулешова Л. Г.* Криомикроскопический комплекс для криобиологических исследований // *Цитология*. – 2004. – **46**, № 9. – С. 809–810.
10. *Козлова О. Г.* Рост и морфология кристаллов. 3-е изд. – Москва: Изд-во Моск. ун-та, 1980. – 368 с.

*Институт проблем криобиологии
и криомедицины НАН Украины, Харьков*

Поступило в редакцию 09.11.2006