

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-Matematički Fakultet

Damjan Pelc, Sanjin Marion, Saša Petrović
Dinamika sol-gel prijelaza želatine

Zagreb, 2010.

Ovaj rad je izrađen na Fizičkom Odsjeku, Prirodoslovno-matematički fakultet, pod vodstvom doc. dr. sc. Marija Basletića te je predan na natječaj za dodjelu Rektorove nagrade u akademskoj godini 2009/2010.

Sadržaj

1	Uvod	1
2	Teorijska podloga	3
2.1	Fizika polimera	3
2.2	Polielektroliti	6
2.3	Struktura i svojstva želatine	9
2.4	Difuzija i relaksacije	12
2.5	Proces geliranja	20
3	Eksperimentalni postav i metode	23
3.1	Četverokontaktna ćelija	23
3.1.1	Dizajn ćelije	23
3.1.2	Temperaturna regulacija	28
3.1.3	Predpojačalo	31
3.1.4	Proces mjerenja	33
3.2	Polarimetrija	34
3.3	Uzorak	35
4	Rezultati i rasprava	37

5 Zaključak	49
Zahvale	51
Literatura	52
Sažetak/Summary	55
Kratak životopis autora	57

1 Uvod

Cilj ovog rada je proučavanje dinamike *sol-gel* prijelaza želatine. Želatina je specifičan primjer termoreverzibilnog polimera biološkog porijekla koji s porastom temperature (u području oko 25 °C) doživljava prijelaz iz uređenijeg stanja gela u neuređenije sol-stanje. Usprkos golemoj tehnološkoj i primijenjenoj važnosti želatine, proces geliranja razumijemo relativno slabo. Iako se tijekom vremena nakupilo dosta eksperimentalnih rezultata i više ili manje potpunih teorijskih modela, sol-gel prijelaz želatine nikad nije dobio veću pozornost fizičara. Sam proces geliranja je mnogo zastupljeniji i o njemu u zadnjih pedeset godina postoji mnoštvo radova, ali svejedno ne možemo reći da je nađen konsenzusa oko njegove prirode i dinamike[1]. Želatina je specifična po tome što se sastoji od nabijenih lanaca što je čini polielektrolitom; ta komplikacija otežava teorijsko modeliranje, naročito na većim koncentracijama otopine na kojima i dolazi do geliranja. Eksperimentalni rezultati su tijekom godina dobivani korištenjem više tehnika, od mjerenja viskoznosti[2, 3] i elastičnih modula[4] preko istraživanja magnetskom rezonancijom[5], elektronskom spinskom rezonancijom[6] i raspršenjem svjetlosti[7, 8, 9, 10] do električnih mjerenja[11, 12] i kalorimetrije[3, 8, 13, 14]. Ipak često nije dovoljno pažnje posvećivano integraciji tih rezultata u jedinstvenu sliku o prijelazu, pa su informacije prilično fragmentirane i ponekad proturječne. To naročito vrijedi za mjerenja električnih svojstava[11, 12].

Iz tog razloga je glavna eksperimentalna metoda od interesa u našem radu *dielektrična spektroskopija*. Riječ je o određivanju ovisnosti otpornosti i kapaciteta uzorka (kompleksne dielektrične konstante) u području frekvencija ispod mikrovalnog područja. Iz elementarnih razmatranja duljinskih i vremenskih skala u otopini želatine možemo naći da bi se zanimljivi efekti vezani uz globalnu strukturu proteinskih lanaca trebali vidjeti na niskim frekvencijama primijenjenog polja (tipično ispod 10 kHz pa sve do područja frekvencija manjih od 1 Hz). Koliko je nama poznato, zbog eksperimentalnih poteškoća se niti jedan rad ne bavi tim frekventnim područjem. Najveći eksperimentalni problem na frekvencijama manjim od 10 kHz je polarizacija elektroda[15, 16, 17] koja onemogućuje prepoznavanje bilo kakvih procesa u tom području i snažno ovisi o vrsti elektroda i elektrolita. Postoji nekoliko pristupa da se doskoči polarizaciji elektroda: oduzimanje pozadinskog doprinosa polarizacije[18], promjena udaljenosti između elektroda[19] i metoda četiri kontakta[15, 20, 21]. Na osnovu starijih rezultata za niskofrekventno ponašanje razrijeđenih otopina DNA i kolagena [15, 21] dobivenih modifika-

cijom metode četiri kontakta i dimenzijskih argumenata odlučili smo se upravo na tu tehniku pri niskim frekvencijama (ispod 10 kHz).

Rezultat našeg rada je pronalaženje dvije dosad neopažene niskofrekventne relaksacije vodljivosti koje pokazuju karakteristično temperaturno ponašanje u blizini sol-gel prijelaza. Da bismo dopunili informacije dobivene o dinamici na mikronskim skalama mikroskopskom slikom na razini fragmenata lanaca i da bismo rezultate stavili u kontekst relativno dobro istraženih i prihvaćenih modela o *coil-helix* prijelazu radili smo i mjerenja optičke aktivnosti. Korelacija rezultata dviju tehnika daje dodatnu dubinu raspravi i važnu potvrdu nekih ideja. Teorijske modele ćemo raspravljati unutar Tanakine teorije coil-helix prijelaza na lancima[22] i klasičnih de Gennesovih prikaza[23], uz dodatke koji obuhvaćaju nabijenost lanaca i dinamiku H^+ iona (protuiona) u otopini[24]. Sam sol-gel prijelaz se smatra perkolativnim fenomenom [25] što ćemo dovesti dovesti u vezu s mikroskopskim coil-helix prijelazima. Iako još ne postoji jedinstven model za sve efekte u blizini prijelaza i njihove međusobne utjecaje, naš rad teži tome da predstavi nove eksperimentalne podatke koji bi mogli doprinijeti boljem i sveobuhvatnijem razumijevanju prijelaza; niskofrekventne relaksacije vodljivosti dat će nam informacije o dinamici lanaca i protuiona nedostupne drugim tehnikama.

2 Teorijska podloga

Prije diskusije eksperimentalnih rezultata potrebno je postaviti teorijske temelje za ovaj rad. Stoga ćemo se pozabaviti općenitim teorijama baziranim na skaliranjima koje se primjenjuju na polimere (polielektrolite) te konstruirati jednostavan model vodljivosti koji je primjenjiv za naš uzorak. Također ćemo se dotaknuti i specifičnih kemijskih i fizikalnih svojstava našeg uzorka, želatine. U konačnici ćemo predstaviti nekoliko bitnijih teorija geliranja s naglaskom na teoriju coil-helix prijelaza.

2.1 Fizika polimera

Uzorci od interesa za dielektričnu spektroskopiju u ovom radu su otopine nabijenih polimera. Polimeri su dugački lanci sastavljeni od mnogo (red veličine tisuću) monomera povezanih kemijskim vezama. Ovdje ćemo iznijeti osnove fizike polimera onako kako se primjenjuju na nenabijene i vrlo slabo nabijene polimere[23].

Za polimere su poznata neka općenita svojstva koja su primjenjiva u širokom rasponu koncentracija i temperatura. Definišu se veličine koje će utjecati na makroskopsku fiziku; duljinu lanca ćemo povezati sa brojem monomera koji ga grade preko stupnja polimerizacije, N . Zbog nesavršenosti izrade i čuvanja uzoraka lanci će imati određenu polidisperznost, tj. postojat će neki srednji stupanj polimerizacije oko kojega se raspodjeljuje broj monomera (standardna devijacija stupnja polimerizacije). U našem radu uzimamo da je standardna devijacija oko srednje vrijednosti stupnja polimerizacije zanemariva pa ćemo u daljnjem tekstu poistovjetiti stupanj polimerizacije i srednju vrijednost stupnja polimerizacije. Kako je standardna devijacija stupnja polimerizacije mala, nećemo posebno razmatrati utjecaje te raspodjele na fiziku problema budući da nam je cilj dati kvalitativnu sliku koja time neće biti znatno promijenjena.

S obzirom na statičke osobine našeg polimera, poznato je da je riječ o fleksibilnom polimeru u kojem je energija potrebna za promjenu konformacije (kuta veze između dvaju polimera) manja od termičke energije dostupne sistemu. Također, zbog visokog stupnja polimerizacije lanac će na skali cijelog polimera biti elastičan[23]. Dinamička fleksibilnost polimera općenito je takva da je vrijeme potrebno za lokalnu promjenu konformacije na skali 10 ps. Budući da vre-

menske skale naših mjerenja odgovaraju vremenima dužim od 100 ns, u našim razmatranjima uzimamo da je lokalni odaziv lanca na vanjsku pobudu trenutna.

Također uvodimo radijus giracije (R_G - *Gyration radius*) koji je korijen srednje kvadratne udaljenosti jednog monomera od ostalih monomera u lancu, usrednjen po svim mogućim izborima ishodišnog monomera. Ova veličina je iznimno bitna jer nam govori koliko je lanac "nabubren". Općenito za radijus giracije vrijedi skaliranje

$$R_G \simeq N^{\nu}$$

gdje je eksponent ν moguće proračunati za dva bitna granična uvjeta.

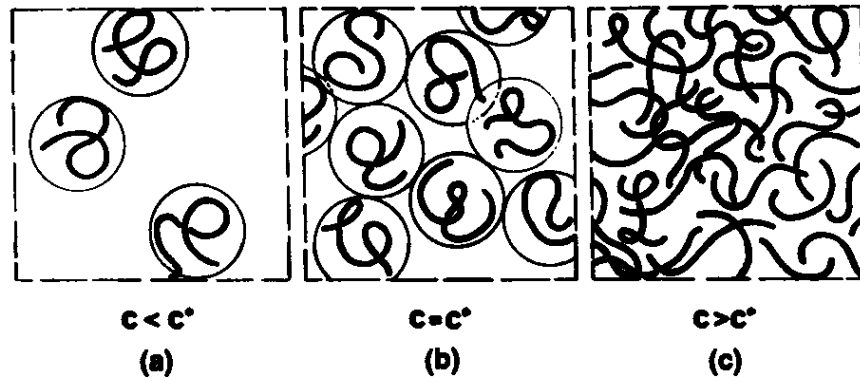
Promotrit ćemo jednostavni primjer polimera na kvadratnoj rešetci, budući da time ne gubimo na fizikalnoj slici, a pojednostavljujemo razmatranje. Prvi slučaj je primjer idealnog lanca. U idealnom lancu pretpostavljamo da su položaji dvaju susjednih monomera međusobno nekorrelirani osim u pogledu da se nalaze na susjednim položajima. Tada se polimer može modelirati jednostavnim nasumičnim šetačem na rešetci gdje se svaki novi monomer u lancu može naći bilo gdje (čak i na već zauzetoj poziciji). Kasnije ćemo pokazati kako se ovaj naizgled nefizikalni slučaj može pojaviti u realnoj situaciji. U navedenom slučaju može se jednostavnim računom naći radijus giracije R_G i to samo uz pretpostavku da su vektori pomaka među monomerima međusobno okomiti,

$$\mathbf{a}_i \cdot \mathbf{a}_j = \delta_{ij}$$

dok im je norma jednaka a , dimenziji jednog monomera. Tada računamo srednju kvadratnu udaljenost zadnjeg monomera u lancu usrednjeno s obzirom na sve moguće izbore početnog monomera:

$$R_G^2 = \left\langle \sum_{i,j=1}^N \mathbf{a}_i \cdot \mathbf{a}_j \right\rangle = \sum_{i=1}^N \langle \mathbf{a}_i^2 \rangle = Na^2$$

To nas vodi na eksponent $\nu = \frac{1}{2}$ u skaliranju radijusa giracije za idealni lanac. Ako uvedemo uvjet da dva monomera ne mogu okupirati isti položaj, to nas vodi na tzv. samoizbjegavajućeg nasumičnog šetača (SAW - *Self Avoiding Walk*). Budući da tu nije moguće napraviti jednostavan proračun uzimamo vrijednost iz literature[23] koja iznosi $\nu = 3/5$. To nas vodi na opažanje da su realni lanci jače nabubreni od idealnih lanaca budući da lanac sam sebe 'izbjegava'. Napominjemo samo zanimljivost kako su u jednoj i dvije dimenzije (npr. uz površinu) polimeri strogo segregirani (efektivna dimenzija putanje nasumičnog šetača je dva).



Slika 1: Različita karakteristična područja koncentracija polimera. a) razrijeđeni režim, b) kritična koncentracija, c) polurazrijeđeni režim. Preuzeto iz [23].

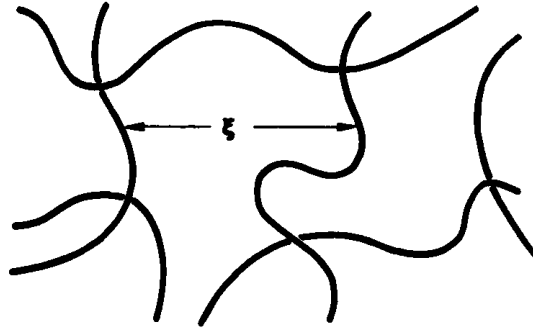
Tri su područja koncentracija u kojima susrećemo ova dva tipa ponašanja lanaca. Prvi je slučaj niskih koncentracija polimera u otopinama u kojima je razmak između lanaca veći od njihovog radijusa giracije te stoga ne može biti međusobnog prodiranja lanca u lanac (Slika 1a). Tada govorimo o idealnim lancima.

Drugi granični slučaj je situacija jako velikih koncentracija kod kojih ima više polimera nego otapala. U tom slučaju lanci međusobno jako prodiru jedan u drugoga (Slika 1c) te stoga svaki monomer ima znatan broj monomera s vlastitog i susjednih lanaca u svojoj blizini. Stoga za samoizbjegavajućeg šetača možemo reći da mora izbjegavati ne samo monomere sa svog već i sa susjednih lanaca, pa mu je zbog nastale 'gužve' svejedno da li ih izbjegava ili se pak ponaša kao idealni šetač.

Opisana dva granična slučaja su relativno jednostavna za teorijsko modeliranje, međutim područje našeg rada spada u srednje koncentracije koje su iznad kritične koncentracije preklapanja c^* (Slika 1b) gdje je je relativan odnos polimera s otapalom još uvijek malen. Koncentraciju preklapanja možemo jednostavno izvesti iz opažanja sa Slike 1b iz koje vidimo da je koncentracija polimera jednaka koncentraciji unutar radijusa giracije lanca. Stoga:

$$c^* \sim \frac{N}{V} \sim \frac{N}{R_G^3} \sim N^{-4/5}$$

U praksi je za naš uzorak kritična masena koncentracija manja od 0.5% što je utvrđeno opažanjem da uzorci sa manjom koncentracijom od te ne geliraju. Budući da je naše područje rada od 1.5% do 6% masene koncentracije, mi se očito nalazimo u polurazrijeđenom području.



Slika 2: Karakteristična dimenzija pora u polimeru. Preuzeto iz [23].

U daljnjim razmatranjima jedna od bitnih veličina će biti i karakteristična udaljenost između pojedinih lanaca polimera. To će ujedno biti i karakteristična dimenzija pora (Slika 2) u otopini (praznih prostora). Skaliranje te veličine je jednostavno izvesti u režimu teorije srednjeg polja i za slučaj dobrog otapala[23] koje je kod nas zbog hidrofilnosti lanaca opravdano kao dobro otapalo. Relevantno područje je polurazrijeđeno (Slika 1c) u kojem je koncentracija dovoljno velika da dolazi do znatnog preklapanja među lancima, ali tako da u prostoru veći volumen otpada na polimere nego li na otapala. Tada zaključujemo da za dimenziju pora ξ moraju biti zadovoljeni uvjeti: za koncentracije $c > c^*$ će ξ ovisiti samo o koncentraciji, ali ne i o stupnju polimerizacije N . Za koncentracije $c \approx c^*$ dimenzija pora mora biti usporediva sa radijusom giracije za idealni lanac. Ti argumenti vode na skaliranje

$$\xi(c) \sim R_G \left(\frac{c^*}{c} \right)^m$$

gdje eksponent m mora iznositi $-3/4$ kako bi ξ bio neovisan o stupnju polimerizacije N osim na koncentraciji preklopa. Stoga za konačno skaliranje vrijedi:

$$\xi(c) \sim c^{-\frac{3}{4}} \quad (2.1)$$

Kasnije ćemo vidjeti da je ovaj izraz za skaliranje dimenzija pora od velike važnosti za tumačenje eksperimentalnih podataka.

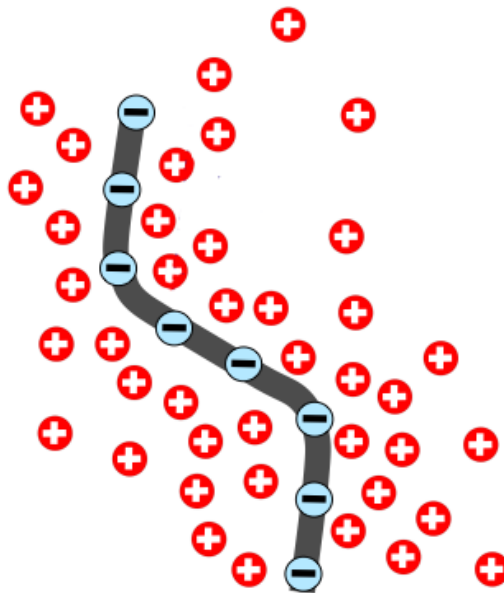
2.2 Polielektroliti

Polielektroliti su polimeri s monomerima koji imaju disocirajuće grupe[24]. Temeljna veličina koja određuje svojstva tako nabijenog lanca jest linearna gustoća naboja $\lambda = \frac{e}{b}$, gdje je e

jedinični naboj (u slučaju našeg uzorka je riječ o disocijaciji jednog H^+ iona po monomeru) a b udaljenost između susjednih monomera koji disociraju. Kod nas će b predstavljati srednju udaljenost između takvih monomera. Prije daljnje rasprave ćemo definirati *Bjerrumovu* duljinu[24] l_b kao duljinu na kojoj se termička energija otapala (vode) izjednačuje s elektrostatskim privlačenjem između suprotnih iona i dopušta njihovu disocijaciju. Ako izjednačimo termičku energiju kT a elektrostatskim privlačenjem dvaju iona dobivamo izraz:

$$l_b = \frac{e^2}{4\pi\epsilon_0\epsilon_r kT}$$

Ocjena Bjerrumove duljine za vodu na 25°C daje $l_b \approx 0.7 \text{ nm}$ [26].



Slika 3: Pojednostavljeni prikaz okoline polielektrolita u otapalu. Crvenom bojom su prikazani H^+ ioni, a plavom negativno nabijene grupe na monomerima lanca. Za lanac uzimamo da je lokalno ravan. Izmijenjena slika iz [26].

Relevantno pitanje je koliko će iona prilikom otapanja našeg polielektrolita ostati zarobljeno uz lanac, a koliko će disocirati u vodi. Ocjenu odgovora na to pitanje ćemo dati jednostavnim modelom. Zamislimo li naš polimer kao jednoliko nabijen štاپ (Slika 3) oko kojega plivaju pozitivno nabijeni H^+ ioni, očito je da će zbog elektrostatskog privlačenja neki od pozitivnih iona ostati zarobljeni u okolini štapa dok će drugi relativno slobodno 'plivati' u otapalu. Rješavanju tog problema pristupamo koristeći Laplaceovu jednadžbu

$$\Delta\varphi = -\frac{\rho}{\epsilon}$$

gdje je φ električni potencijal, ρ gustoća naboja, a ε permitivnost medija (vode). Kako bismo dobili rješenje ove jednačbe potrebno je odrediti raspodjelu naboja u prostoru. Za nju ćemo pretpostaviti da slijedi Boltzmanovu statistiku

$$\rho \sim e^{-\frac{e\varphi(\mathbf{r})}{kT}}$$

Napominjemo kako je u cjelini otopina neutralna (potrebno je zbrojiti doprinose pozitivnih i negativnih naboja) što nas uz prethodni izraz vodi na *Poisson-Boltzmanovu*[26] jednačbu

$$\Delta\varphi = -\frac{e}{\varepsilon}n \sum_{+naboji} e^{-\frac{e\varphi}{kT}} + \frac{e}{\varepsilon}n \sum_{-naboji} e^{\frac{e\varphi}{kT}}$$

gdje je n gustoća nosioca naboja. Jednačba je nelinearna, i nema analitičkog rješenja, već se njoj pristupa aproksimativnim metodama. Najjednostavniji pristup je *Debye-Hückel* aproksimacija u kojoj se linearizira eksponencijalna funkcija što vodi na izraz:

$$\Delta\varphi = \kappa^2\varphi$$

pri čemu se κ^{-1} zove Debyeova duljina zasjenjenja. Rješenje Debye-Hückel jednačbe u cilindričnom koordinatnom sustavu (uzimamo da je polielektrolit lokalno ravan) jest zasjenjeni potencijal oblika

$$\varphi \sim \frac{e^{-\kappa r}}{r}$$

koji nam govori kako je većina naboja lokalizirana na skali Debyeove duljine oko nabijenog lanca u ovoj aproksimaciji. Tipični iznos za Debyeovu duljinu je reda nekoliko nm. Postavlja se pitanje za koje linearne gustoće naboja na lancu može ovako jednostavan model dati točnu raspodjelu naboja oko nabijenog polimera. Odgovor na to pitanje se nalazi u *Manning-Oosawa-Onsager*[26, 27] teoriji kondenzacije koja predviđa da do kondenzacije velike većine naboja u uskom prostoru oko lanca dolazi ako vrijedi da je prostorni razmak nabijenih monomera usporediv s Bjerrumovom duljinom ($b \approx l_b$). U detaljne izvode nećemo ulaziti[26] budući da je opravdanje za ovaj uvjet lako naći u fizikalnoj intuiciji. Ukoliko je razmak između fiksnih naboja na lancu manji od Bjerrumove duljine, oni neće dopuštati pozitivnim nabojevima da napuste njihovu okolinu i disociraju. Većina disociranih naboja se tada nalazi vrlo blizu lanca što vodi na efektivno smanjenje gustoće b ; izvan područja kondenzacije raspodjela naboja se može opet modelirati Debye-Hückel linearnom teorijom uz efektivnu gustoću naboja.

Ispitivanjem sastava naše želatine[28] smo zaključili da je kod nas b reda veličine više nm te da smo relativno blizu područja u kojem dolazi do kondenzacije pa stoga Debye-Hückelova

aproksimacija nije primjenjiva. Taj međurežim[27] se odlikuje time da posjeduje oba karakteristična svojstva, tj. postoji naboj koji je kondenziran uz lanac polimera i slobodan disocirani naboj. To nas navodi na zaključak kako će H^+ ioni doprinosti vodljivosti na više načina. Prvi je doprinos vodljivosti slobodnih disociranih iona koji je analogan vodljivosti obične soli poput KCl, drugi je preskakivanje pozitivnih naboja po lancu, a treći je onaj u kojem pozitivni ioni 'preskaču' između dvaju lanaca. To preskakivanje mora biti izazvano nekom vanjskom prisilom (npr. električnim poljem) koje će odvojiti dio kondenziranog naboja i dovesti ga do drugog lanca. Ako imamo dobro definiranu mikroskopsku skalu praznog prostora oko lanca (u prethodnom poglavlju spomenutih pora) tada će ta vodljivost imati i dobro definirana karakteristična vremena do kojih ona može doprinosti.

Skaliranja raznih veličina u polielektrolitima[24] se razlikuju od onih u polimerima s kojima smo se bavili u prošlom poglavlju. U pravilu su kritični eksponenti skaliranja u polielektrolitima iznosom manji od onih u nenabijenim polimerima. Budući da mi imamo slabo nabijen polimer, pretpostavljamo da će pravila skaliranja ostati donekle ista kao i za nenabijene polimere uz korekciju zbog koje će ti eksponenti možda biti nešto manji od predviđanja iz prošlog poglavlja. U detalje nećemo ulaziti zbog kompleksnosti problematike[24, 26], već ćemo samo iznijeti pravilo skaliranja za dimenziju pora polielektrolita

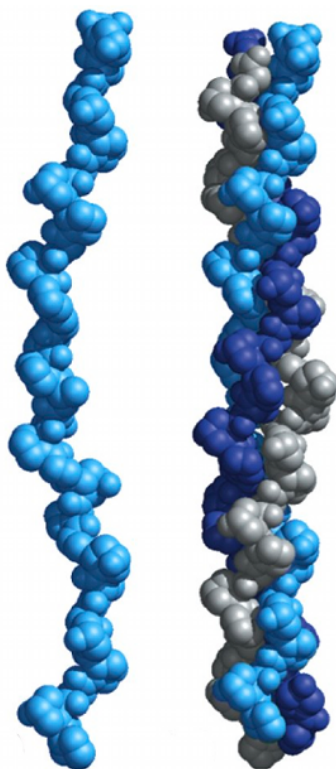
$$\xi(c) \sim c^{-\frac{1}{2}} \quad (2.2)$$

bez ulaženja u prirodu izvoda. Sam eksponent će u području od jakog do nenabijenog polimera imati nekakvu ovisnost o gustoći naboja b .

2.3 Struktura i svojstva želatine

Naš uzorak (želatina) dobiva se iz kolagena. Kolageni su skupina visoko karakterističnih nistastih proteina prisutnih kod svih mnogostaničnih životinja. Luče ih stanice vezivnog tkiva, ali i drugi tipovi stanica. Kao bitna komponenta kože i kostiju, najzastupljeniji su proteini kod sisavaca, čineći čak 25% ukupne proteinske mase tih životinja. Proteini su velike organske molekule građene od linearno poredanih aminokiselina povezanih peptidnom vezom. Strukturu proteina možemo promatrati na četiri razine. Prva je primarna struktura, koja nam govori o slijedu aminokiselina u proteinskom lancu. Sekundarna struktura podrazumijeva visoko ure-

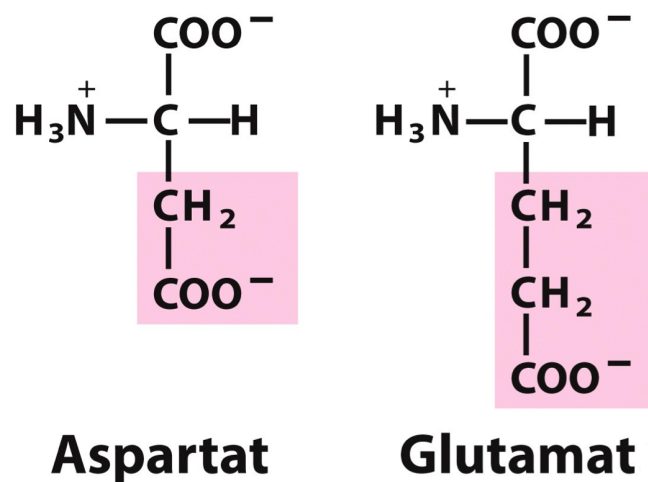
đene strukture poput α -lanca kolagena. Prostorni raspored tih struktura naziva se tercijskom, dok kvaternu strukturu imaju proteini koji se sastoje od više proteinskih molekula, koje funkcioniraju kao podjedinice većeg proteinskog kompleksa. Karakteristično obilježje kolagena je njegova kvaterna struktura – radi se o dugoj rigidnoj trostrukoj zavojnici, koju čine tri lijevo zavijena polipeptidna lanca (tzv. α -lanci) omotani jedan oko drugog poput užeta u desnu superzavojnicu (Slika 4). α -lanci dugački su oko 300 nm, a promjer im iznosi oko 1.5 nm. Svaki



Slika 4: Slika α -lanca (lijevo) i trostruke zavojnice kolagena (desno). Preuzeto s interneta.

α -lanac sadrži približno 1050 aminokiselina. Kolageni su bogati aminokiselinama glicinom (Gly), prolinom (Pro) i hidroksiprolinom (Hyp), koje su izuzetno važne za formaciju trostruke zavojnice. Općenito je za kolagene svih tipova karakterističan aminokiselinski slijed Gly-Pro-X ili Gly-Y-Hyp, gdje X i Y predstavljaju neku treću aminokiselinu. Prolin svojom prstenastom strukturom stabilizira helikalnu strukturu svakog lanca, dok glicin kao najmanja aminokiselina (bočna skupina je tek vodikov atom) omogućava α -lancima kompaktno slaganje u kolagenski superheliks. Superheliksi se agregiraju u više strukture zvane kolagenske fibrile te kolagenska vlakna. Dosad je identificirano oko 25 različitih kolagenskih α -lanaca, no samo 15 tipova molekula kolagena je pronađeno. Najčešći je tip I kolagen, koji se može naći u koži i kostima.[29]

Želatina je derivat kolagena, heterogena mješavina proteina visoke molekularne mase topi-



Slika 5: Prikaz monomera nosioca negativnih naboja u kolagenu. Preuzeto s interneta.

vih u vodi. Proteini se ekstrahiraju kuhanjem kože, ligamenata, kostiju, itd. u vodi. Želatina, tj. gel koji smo koristili u našem radu je Sigma G8150 gel za elektroforezu ekstrahiran iz svinjske kože. Nakon ekstrakcije vrši se obrada u kiselim uvjetima, koja razara terciarnu i kvaternu strukturu kolagena, što uzrokuje narušavanje sekundarne strukture proteina. Naime α -lanci su stabilni samo u obliku trostruke zavojnice, tj. desnog superheliksa, tako da u konačnici dobivamo molekule želatine – nabijene polimere duljine 300 nm. Polimeri se prema jednoj teoriji žele vratiti u svoju nativnu (i savršenu) strukturu trostruke zavojnice (superheliksa), no zbog termalnog gibanja to pri višim temperaturama nije moguće. Tada je želatina u sol stanju. Hlađenjem ispod određene temperature energija intramolekulskih privlačenja nadvlada termalnu energiju otapala te se lokalno formiraju trostruke zavojnice. Posljedica toga je uređenija struktura mreže polimera, tj. želatina je u gel stanju. Prema drugoj teoriji pri hlađenju nastaju intramolekulski heliksi koji omogućavaju povezivanje pojedinačnih molekula polimera elektrostatskim interakcijama. Dakle ne dolazi do lokalnog uspostavljanja trostruke zavojnice, već zavoj na jednom polimeru uspostavlja nekovalentnu interakciju sa zavojem drugog polimera. Na taj način također dolazi do stvaranja mreže polimera te želatina postupno prelazi u gel stanje.

Naš uzorak ima $78 - 80 \text{ mol/dm}^3$ slobodnih karboksilnih skupina na 100 g proteina i s izoelektričnom točkom od $7.0 - 9.0$. Naboj i izoelektrična točka molekula gela odraz su aminokiselinskog sastava, tj. količine karboksilnih, amino i gvanidinskih skupina. Pomoću Bloomovog broja navedenog u specifikaciji proizvođača (Sigma-Aldrich), ali i jednostavnim kemijskim ra-

čunom došli smo do podatka da je posječna molekularna masa naših polimera približno 100000. Glavni izvor negativnih i pozitivnih naboja su bočni ogranci asparaginske i glutaminske kiseline (Slika 5), te lizina i arginina. Amino i karboksilna skupina na krajevima lanca su zanemarive ako uzmemo u obzir broj monomera (oko 1050 aminokiselina), koji grade pojedini lanac. Maseni udio asparaginske kiseline (Asp) je 5.7%, glutaminske kiseline (Glu) 9.6%, lizina 7.7%, a arginina 0.9% [28]. Izmjereni pH uzorka u sol stanju iznosio je 5.2, što znači da su karboksilne skupine Asp i Glu ionizirane, dakle otpustile su vodikove ione, koji su nosioci pozitivnog naboja u otopini. Lanci su u sumi negativno nabijeni, jer je broj ioniziranih karboksilnih skupina veći od pozitivno nabijenih bočnih lanaca lizina i arginina.

2.4 Difuzija i relaksacije

U našim eksperimentalnim dielektričnim spektrima pojavile su se dvije relaksacije vodljivosti: jedna na vrlo niskim frekvencijama (reda 10 Hz), a druga u području oko 1 kHz. Donja relaksacija je bila očekivana budući da sličnu nalazimo kod drugih autora [15, 21]. Ta relaksacija se zbog velikih karakterističnih vremena gasi na vrlo niskim frekvencijama pa je stoga povezujemo s doprinosom gibanja masivnih nabijenih lanaca. Gornju relaksaciju smo pak u ovom radu tražili - pretpostavimo li da su nosioci naboja ioni H^+ , relaksacijska vremena reda 0.5 ms odgovaraju udaljenostima oko 500 nm, što je za naše područje koncentracija tipična udaljenost dva proteinska lanca. Ako tražimo dinamiku na tim prostornim skalama, očekujemo da ćemo je naći u kilohertznom frekventnom području. Mjerenjem parametara dviju relaksacija u ovisnosti o temperaturi i koncentraciji želatine potvrdit ćemo ove predodžbe te doći do dodatnih informacija o dinamici sol-gel prijelaza. Teorijska podloga relaksacija koju ćemo sada ukratko izložiti koristi jednostavne difuzijske modele i prije svega služi da povezuje i kvalitativno objašnjava pronađene relaksacije. Detaljnija kvantitativna teorija nije razvijana prije svega zbog složenosti, no pokazat će se da i naši primitivni modeli dosta dobro opisuju fizikalnu situaciju.

Za opisivanje gibanja protuiona H^+ kroz otopinu moramo se pozabaviti difuzijom i utjecajem struktura različitih prostornih skala na taj proces [30]. Jednostavna difuzija modelira se kao nasumični hod u kontinualnoj granici, no nas prije svega zanima koje su modifikacije na jednostavni model koje donosi električno polje (naročito u prisutstvu strukture lanaca). Običnu difuziju kroz vodu možemo prikazati kao termički aktiviran proces u kojem se ioni H^+ nalaze u

kvaziperiodičnom potencijalu i zbog termičkog gibanja mogu preskakivati iz jame u jamu. Takav model mnogo se koristi npr. u opisima vodljivosti poluvodiča[30]. Zbog velike mase iona (i visoke sobne temperature na kojoj radimo) kvantni efekti će biti znatno manji od termičkih, iako mogu biti važni za npr. vodikove veze. Bez vanjskog polja potencijal je homogen preko većih udaljenosti i pojedini ion ima jednaku vjerojatnost za preskok ulijevo i udesno. To je podloga promatranja difuzije kao nasumičnog hoda, a koeficijent difuzije govorit će nam koliko su česti preskoci. Iako su ioni nabijeni, pretpostavljamo da su dovoljno zasjenjeni (ili dovoljno daleko) pa njihovu interakciju možemo u prvom redu zanemariti i tretirati ih kao nezavisne čestice. Zbog relativno visoke temperature i velike mase iona klasična statistika je primjenjiva pa za vjerojatnost preskoka u jedinici vremena vrijedi

$$w \sim e^{-\frac{V}{kT}}$$

gdje je V tipična dubina potencijalne jame, a T temperatura. Iako smo u tekućini, zbog kratkosežnog reda na razini nekoliko molekula vode lokalni potencijal koji ion vidi će biti relativno stalan u vremenu i visina V prihvatljivo dobro definirana. Uvođenjem vanjskog homogenog električnog polja periodični potencijal će se 'nagnuti' i vjerojatnost preskoka će biti veća u jednom smjeru nego u drugom (Slika 6). Ako su nosioci naboja pozitivni, imat ćemo ukupnu struju u smjeru polja. Jednadžbu difuzije u polju možemo lako izvesti u kontinualnoj granici ako promatramo koliko iona ulazi i izlazi iz neke potencijalne jame u jedinici vremena. Ukupni tok se sastoji od četiri komponente; promotrimo na primjer tok iz promatrane jame niz polje. On će ovisiti o trenutnom broju iona u jami $C(x)$, frekvenciji pokušaja preskakanja barijere v i vjerojatnosti da preskok uspije:

$$F_1 = C(x)av e^{-\frac{V-e\phi}{kT}}$$

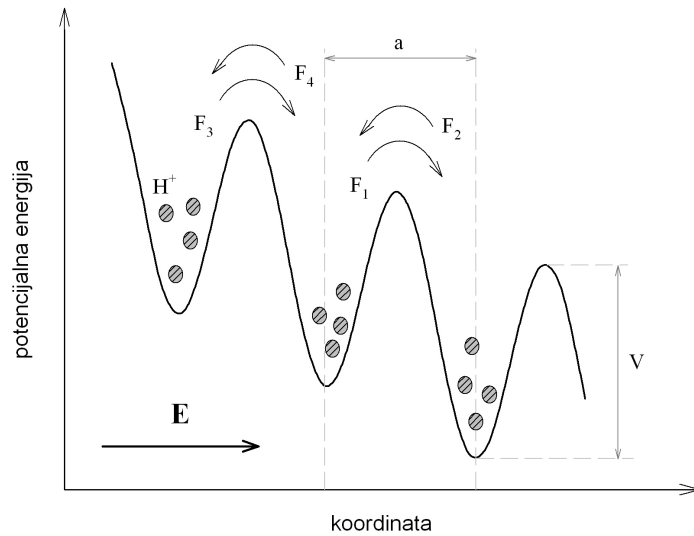
Sa ϕ smo označili električni potencijal, za koji pretpostavljamo da je linearan u koordinati (homogeno polje, $\phi = Ex$), a srednju udaljenost između jama označavamo s a . Kad napišemo i preostala tri toka i pretpostavimo da je $C(x)$ dovoljno sporo varirajuća da za susjedne jame možemo pisati

$$C(x \pm a) \approx C(x) \pm a \frac{\partial C}{\partial x}$$

izlazi za ukupni tok

$$F(x) = va^2 e^{-\frac{V}{kT}} \frac{\partial C}{\partial x} \cosh \frac{eaE}{2kT} + 2vaC e^{-\frac{V}{kT}} \sinh \frac{eaE}{2kT} \quad (2.3)$$

Taj izraz je u okviru našeg modela egzaktan, odnosno vrijedi i za velika polja. Naravno polje se ne smije približiti granici na kojoj bi moglo znatnije deformirati potencijal, no s obzirom



Slika 6: Shematski prikaz periodičkog potencijala u vanjskom polju s naznačenim parametrima relevantnim za difuzijski model.

na nanometarske dimenzije jama, tako velika polja nećemo razmatrati. Pretpostavimo li da vrijedi Fickov zakon, možemo u njega uvrstiti izračunati tok i dobiti difuzijsku jednadžbu u vanjskom polju. Za potencijal koji je mali u usporedbi s termičkom energijom (odnosno ako je $eLE/2kT \ll 1$) radimo razvoj hiperbolnih funkcija i difuzijska jednadžba u prvom redu postaje

$$\frac{\partial C}{\partial t} = -va^2 e^{-\frac{v}{kT}} \frac{\partial^2 C}{\partial x^2} + \frac{eva^2}{kT} E e^{-\frac{v}{kT}} \frac{\partial C}{\partial x} \quad (2.4)$$

i odmah možemo uvesti difuzijski koeficijent $D = va^2 e^{-\frac{v}{kT}}$ i mobilnost $\mu = \frac{e}{kT} D$ te pripadne članove u jednadžbi nazvati difuzijskim odnosno driftnim dijelom. Iako je naš model vrlo primitivan, iz njega je izašla i Einsteinova relacija između mobilnosti i koeficijenta difuzije i eksperimentalno dobro potvrđena ovisnost koeficijenta difuzije o temperaturi[31]. Ključno je da smo uspjeli dobiti predviđanje ovisnosti mobilnosti (a time i vodljivosti) o temperaturi za difuziju iona kroz vodu, koja će nam kasnije reći kojim putem u otopini želatine ide veći dio iona. Čitavo vrijeme pretpostavljamo da je karakteristično vrijeme promjene polja (odnosno period u monokromatskom eksperimentu) mnogo veće od karakterističnog vremena preskoka $1/v$. Približi li se frekvencija polja frekvenciji v , pojavit će se relaksacija i vodljivost će početi padati. Za frekvencije polja znatno veće od v modifikacija potencijala zbog polja bit će prebrza da bi znatnije utjecala na vjerojatnosti preskoka i ovakav model vodljivosti više neće biti dobar.

Provedeni račun dobro funkcionira za difuziju nezavisnih iona kroz vodu, no sad ćemo ga odvesti u krajnost uvodeći strukturu na skalama tisuću puta većim od a . Bitna pretpostavka

je da u izloženom modelu nema ovisnosti o specifičnom obliku potencijala (odnosno ona je apsorbirana u difuzijsku konstantu), pa možemo promatrati vjerojatnost preskoka između vrlo udaljenih 'šiljastih' jama. Takvim potencijalnim krajolikom upravo pokušavamo modelirati otopinu negativno nabijenih lanaca proteina između kojih nalazimo pore čija je karakteristična dimenzija reda 500 nm u našem rasponu koncentracija. Ako je promjena polja dovoljno spora, i dalje možemo difuzijsku jednadžbu (2.4) smatrati važećom, naravno uz drukčiji koeficijent difuzije. Pretpostavka može izgledati neobična, ali vidjet ćemo da joj različiti eksperimentalni rezultati idu u prilog. Posljedice velike udaljenosti jama su dosta zanimljive i ponekad se mogu mjeriti; najprije ćemo se pozabaviti nelinearnim efektima, odnosno uvjetom $eLE/2kT \ll 1$ (gdje je sada L karakteristična udaljenost između lanaca, koju smo prije zvali dimenzijom pora i označili s ξ). Zbog velikog L njega je sada puno teže zadovoljiti, pa ćemo u razvoju hiperbolnih funkcija zadržati i idući član. Dobivamo mobilnost ovisnu o polju

$$\mu(E) = \mu(0) \left[1 - \frac{1}{6} \left(\frac{eLE}{2kT} \right)^2 \right]$$

gdje smo s $\mu(0)$ označili mobilnost u polju $E \ll 2kT/eL$. Difuzijska konstanta će također imati korekciju, no ona nam je manje interesantna jer ju ne možemo direktno mjeriti. Kvadratna korekcija mobilnosti vodi na kubični član u driftnom dijelu difuzijske jednadžbe i njega imamo priliku pratiti promatrajući odziv na trećem harmoniku primijenjenog polja. Iako je efekt i dalje malen za dostupna polja, pomoću lock-in tehnike i stabilnog strujnog izvora uspjeli smo ga izmjeriti i napraviti usporedbu s izloženim jednostavnim modelom.

Drugi bitan efekt je ovisnost vodljivosti o frekvenciji polja. Kao što smo već spomenuli, ako period dođe blizu karakterističnom vremenu preskoka očekujemo gašenje vodljivosti s frekvencijom. Ako se sjetimo da ioni iz jame u jamu zapravo 'preskaču' običnom difuzijom kroz vodu (gdje provode većinu svog vremena), možemo karakteristično vrijeme procijeniti preko skaliranja karakterističnog za sve difuzijske procese $L^2 = D\tau$; tu je D opet uobičajeni koeficijent difuzije uveden na početku, a ne efektivni koeficijent u modelu lanaca. Smatramo li da su jedini nosioci ioni H^+ , možemo iz poznate difuzivnosti[31] za duljine reda 500 nm dobiti vremena oko 0.5 ms, pa na odgovarajućim frekvencijama očekujemo pad vodljivosti. Važnu potvrdu tog razmišljanja očekujemo iz ovisnosti karakterističnog vremena o koncentraciji jer znamo kako se dimenzija pora skalira s koncentracijom c . Osnovna zamjerka iznesenom modelu je činjenica da su lanci na prvi pogled praktički jednodimenzionalni, pa je vjerojatnost da ih u tri dimenzije ioni pogode vrlo mala. Tome možemo doskočiti pomoću dva efekta: postojanje ionskog oblaka

(odnosno dosega potencijala lanaca reda 10 nm) i termičko gibanje lanaca. Termičko gibanje će efektivno razmazati lance u prostoru i povećati im površinu koju vide ioni. Kako ipak radimo s velikim koncentracijama, efekt je dobro vidljiv te pad vodljivosti može dosegnuti i nekoliko postotaka ukupne vodljivosti. Tijekom geliranja se lanci povezuju u superstrukturu i fluktuacije postaju znatno manje, što se jasno vidi u temperaturnoj ovisnosti vodljivosti na frekvencijama manjim od $1/\tau$.

S obzirom da je naš model vrlo primitivan i praktički jednodimenzionalan, očekujemo samo kvalitativno slaganje s eksperimentima. Da bismo model učinili finijim, možemo dodavati različite poluempirijske korekcije kao raspodjelu karakterističnih duljina (koja ovisi i o termičkim fluktuacijama) i geometrijske faktore zbog trodimenzionalnosti sistema. Posebno je zanimljivo pitanje dimenzionalnosti strukture lanaca koja se za neke potrebe može smatrati fraktalom[25]. Na te probleme ćemo se vratiti i prilikom komentiranja rezultata za visokofrekventnu vodljivost. Sada nam predstoji kvantificirati ovisnost vodljivosti o frekvenciji, da bismo prilikom diskusije eksperimentalnih rezultata mogli baratati s konkretnim visinama i širinama relaksacija. Jasno je da će na frekvencijama polja znatno manjim od $1/\tau$ vodljivost biti gotovo konstantna, dok u blizini vremena τ očekujemo padanje. Taj efekt moramo proučavati prije puštanja difuzijske jednadžbe (2.4) u kontinualnu granicu, kada efektivno uzimamo da frekvencija ν ide u nulu (a L u beskonačno na način da produkt $D_{eff} = \nu L^2$ ostane konstantan). Promatramo zato tok usrednjen po vremenu dovoljno većem od $\tau = 1/\nu$, u granici malog električnog polja:

$$\langle F \rangle = \left\langle \frac{\partial C}{\partial x} \right\rangle \nu L^2 e^{-\frac{\nu}{kT}} - \frac{\nu e L^2}{2kT} e^{-\frac{\nu}{kT}} \langle C(t) E(t) \rangle$$

Taj tok će biti jednak već izvedenom toku u granici spore promjene polja jer tada ioni mogu pratiti polje i korelacija $\langle C(t) E(t) \rangle$ je jako velika. U suprotnoj granici vrlo velikih frekvencija je međutim korelacija praktički nula jer se ioni gibaju na intrinzičnoj skali $1/\nu$ dok polje oscilira mnogo brže. To vodi na efektivnu frekventno ovisnu mobilnost u difuzijskoj jednadžbi. Za korelaciju možemo uzeti standardnu jednostavnu pretpostavku eksponencijalnog ponašanja[32], ali uz uvjet da je korelacija maksimalna za niske frekvencije. To vodi na

$$\langle C(t) E(t) \rangle = \left(1 - e^{-t/\tau} \right) C(t) E(t)$$

i ako se prebacimo u frekventnu domenu dobit ćemo za monokromatsko polje mobilnost oblika

$$\mu(\omega) = \frac{\nu e L^2}{kT} e^{-\frac{\nu}{kT}} \frac{1}{1 + i\omega\tau}$$

Na taj način smo u difuzijsku jednadžbu uključili korekciju na višim frekvencijama. Kako je vodljivost produkt mobilnosti i broja nosioca, analognu formulu ćemo dobiti i tamo. Odmah vidimo da će realni dio imati stepenicu (na logaritamskoj skali - Slika 7) u blizini vremena τ ; uz korištenje difuzijske konstante i Einsteinove relacije imamo

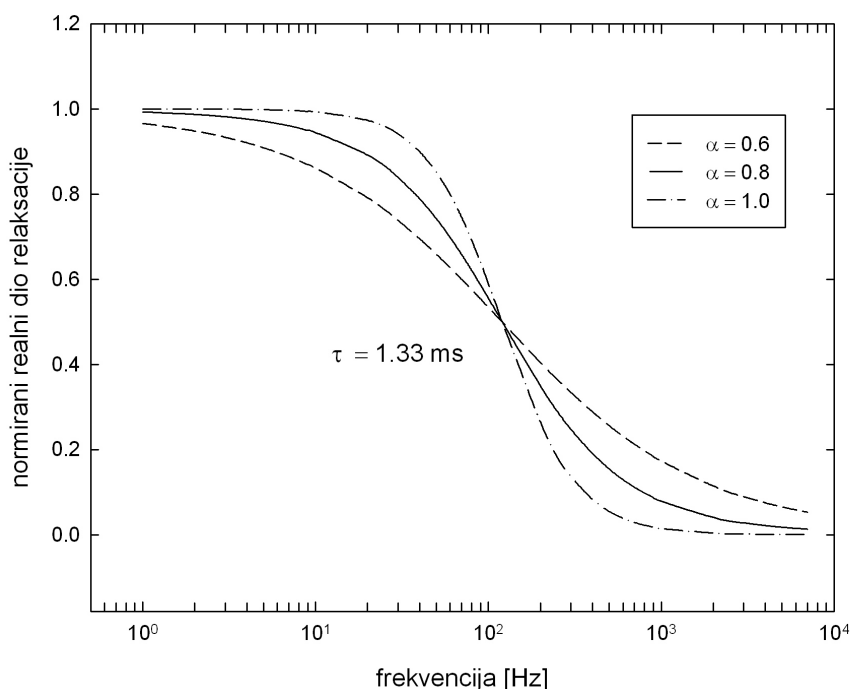
$$\operatorname{Re}(\hat{\sigma}) = \frac{ne^2D}{kT} \frac{1}{1 + (\omega\tau)^2} \quad (2.5)$$

gdje smo sa $\hat{\sigma}$ označili kompleksnu vodljivost. Takav funkcionalni oblik često se naziva Debye-ovom relaksacijom i iako hvata bitne zaključke o gašenju vodljivosti na velikim frekvencijama nije sasvim prikladan za našu eksperimentalnu situaciju. Glavni problem je što karakteristična duljina nije jedinstvena, već postoji prilično široka raspodjela oko neke srednje vrijednosti. Ovisnost vodljivosti o frekvenciji moramo u skladu s time modificirati, što možemo izvesti na uobičajen poluempirijski način. Naša relaksacija vodljivosti (2.5) ima analogiju u relaksacijama permitivnosti (koje se mnogo češće koriste) gdje je razvijeno nekoliko standardnih modifikacija. Za naše potrebe bit će dovoljno detaljnije opisati dvije modifikacije Debyeve relaksacije: Cole-Cole i Kohlrausch-Williams-Watts (KWW) funkcije. Obje uvode jedan dodatni parametar za opisivanje raspodjele relaksacijskih vremena oko nekog srednjeg vremena $\bar{\tau}$. Postoje i općenitije funkcije s više parametara (kao Havriliak-Negami relaksacija) no nećemo s njima raditi zbog dodatno otežane interpretacije parametara.

Cole-Cole proširenje izvodi se u frekventnoj domeni i umjesto Debyeovog izraza uvodi po-
općenje

$$\hat{\sigma} = \frac{\Delta\sigma}{1 + (i\omega\tau)^\alpha} \quad (2.6)$$

gdje je $\Delta\sigma$ općenita visina relaksacije. Dodani parametar α se kreće od nule do jedinice, i vidimo da proširuje relaksaciju; što je α bliže nuli, područje pada vodljivosti je šire. Raspodjela relaksacijskih vremena koja vodi na takav funkcionalni oblik nije jednostavna i najčešće nema izravno fizikalno tumačenje, no Cole-Cole (Slika 7) funkcija ipak dobro opisuje velik broj različitih sustava pa se kao empirijska formula koristi zbog jednostavnosti izraza u frekventnoj domeni. Na sličan način nastaje i Kohlrausch - Williams - Watts relaksacija, osim što je ona jednostavna u vremenskoj domeni dok je u frekventnoj poznata samo preko Fourierovog integrala. Naime umjesto da gledamo odziv na monokromatsko polje možemo promatrati odgovor na puls polja (idealizirano delta funkciju). Debyeova relaksacija će tada biti obični eksponencijalni pad $\Delta\sigma e^{-t/\tau}$, a KWW funkcija je jednostavno proširenje oblika $\Delta\sigma e^{-(t/\tau)^\beta}$. Ako je $0 < \beta < 1$ ta funkcija se naziva i rastegnutom eksponencijalom ('stretched exponential') i tako-



Slika 7: Ponašanje realnog dijela Cole-Cole relaksacije vodljivosti u ovisnosti o frekvenciji. Slučaj $\alpha = 1$ vodi na Debye relaksaciju.

đer je primjenjiva za velik broj realnih neuređenih sustava. Raspodjela relaksacijskih vremena ponovno nije trivijalna. Uglavnom smo u praksi za fitanje koristili Cole - Cole relaksaciju zbog jednostavnosti izraza u frekventnoj domeni, iako smo našli naznake da bi KWW funkcija možda bila prikladnija. No pošto nemamo čvrstu teorijsku podlogu za izbor jedne naspram druge, odabrali smo jednostavniju. Interpretacija parametra širine je uglavnom samo polukvantitativna jer je njegova veza s raspodjelom vremena komplicirana. Vidjet ćemo međutim da se prilikom sol-gel prijelaza upravo širina najjasnije mijenja.

Zbog različitih eksperimentalnih indikacija možemo smatrati da donju relaksaciju zaista uzrokuje gibanje lanaca u cjelini. Opis njihovog micanja ćemo provesti vrlo slično gornjem modelu za lagane protuione, samo što će dimenzije i dubine potencijala biti znatno drugačije. U svojevrsnom modelu srednjeg polja možemo zamisliti da se svaki lanac giba po kompliciranom energetskom krajoliku koji ugrubo predstavljamo kao periodični potencijal. U tekućem stanju je termička energija lanaca dovoljno velika da mogu relativno često preskakati iz jame u jamu, dok tokom geliranja zbog stvaranja globalne mreže lanaca nastaje prilično dobro definiran pozadinski potencijal i sve manje molekula ima slobodu gibanja. Ako za model vodljivosti uzmemo istu difuzijsku jednadžbu u polju (2.4) (naravno uz frekventno ovisnu mobilnost), možemo di-

skutirati što u slučaju lanaca određuje mikroskopske parametre v i V . Karakteristična duljina će nam i ovdje biti srednja udaljenost između lanaca, ali će koeficijent difuzije zbog njihove velike dužine ovisiti o položaju lanca u prostoru, to jest $V = V(\mathbf{r})$. Na taj način u model uvodimo 'zapatljanost' lanaca u otopini, odnosno njihovu protežnost (u suprotnosti s praktički točkastim ionima H^+). Difuzijska jednadžba nam se sada znatno komplicira i pojavljuju se dva dodatna člana koji su mikroskopske prirode pa ih ne možemo lako kontrolirati. Možemo si pomoći ako pretpostavimo da je varijacija V s položajem na relativno kratkim skalama u odnosu na L ; tada uzimanjem prosjeka dolazimo na difuzijsku jednadžbu sličnu onoj izvedenoj za male ione. Opravdanost takvog postupka je upitna, ali u duhu dosadašnjeg razmišljanja pokušat ćemo uzeti da za vodljivost lanaca ipak vrijedi relacija analogna (2.5) i vidjeti što će iz toga izaći. Iznos stepenice vodljivosti sada postaje $n_l q^2 \overline{D}_l / kT$ gdje smo s n_l označili broj pokretljivih lanaca, q im je efektivni naboj a \overline{D}_l prikladna srednja difuzijska konstanta. Srednje relaksacijsko vrijeme će kao i ranije biti $\tau_l = L^2 / \overline{D}_l$. Usprkos velikoj složenosti interakcija lanaca, očekujemo da će u blizini sol-gel prijelaza u vodljivosti dominirati član n_l budući da se kod prijelaza velik broj lanaca oslobađa iz superstrukture i može početi voditi struju. Zato smatramo da je u našem temperaturnom području dovoljno dobro uvesti srednju difuzijsku konstantu, bez mnogo razmišljanja o utjecajima dinamičkih komplikacija na izraz (2.5). Poznavajući tipičnu koncentraciju lanaca i srednju udaljenost, možemo napraviti i numeričku procjenu visine stepenice ako iskoristimo izmjereno relaksacijsko vrijeme za određivanje \overline{D}_l . Za vremena reda 1 s i koncentracije oko 3% dobiva se na sobnoj temperaturi $\Delta\sigma \sim 1 \mu\text{S/m}$, uz pretpostavku da svi lanci sudjeluju u transportu i da je efektivni naboj jednog lanca manji od 100 e. Goli naboj je veći za faktor 2 do 3 jer je u našem lancu otprilike svaka četvrta do peta aminokiselina negativno nabijena, ali radi zasjenjenja bi efektivni naboj mogao biti i manji od procjene 100 e. Brojčane vrijednosti i usporedbu dobivene visine s eksperimentom ćemo detaljnije diskutirati niže.

Zbog vrlo sretne okolnosti da smo uspjeli prilično pouzdano mjeriti dvije relaksacije, važno je diskutirati njihovu povezanost u kontekstu izloženih jednostavnih modela. Velik broj podataka - relaksacijskih vremena i visina - može nam dati cjelovitu iako za sada donekle grubu sliku zbivanja tijekom sol-gel prijelaza. Parametri dviju relaksacija sami po sebi nose dosta fizikalnih informacija, no možemo se i u izvjesnoj mjeri poslužiti mjerenjima donje relaksacije da bismo karakterizirali gornju. Zbog vrlo velikih vremena relaksacije (i brojčanih faktora o kojima će biti riječi kasnije) pretpostavljamo da donja relaksacija direktno mjeri odziv lanaca, što znači da možemo podatke o njenom intenzitetu iskoristiti da preko fluktuacijsko-disipacijskog teorema

izračunamo veličinu fluktuacija lanaca u ovisnosti o temperaturi. U gore izloženom modelu za gornju relaksaciju zaključili smo da bi njen intenzitet trebao u velikoj mjeri ovisiti upravo o toj fluktuaciji, pa se možemo nadati predviđanju intenziteta gornje relaksacije koristeći intenzitete i relaksacijska vremena donje. Takvo predviđanje dalo bi snažnu potvrdu izloženih teorijskih razmatranja a ovisnost o temperaturi bitne informacije o procesu geliranja. U području temperatura oko prijelaza dominantan efekt je smanjenje količine mobilnih lanaca radi udruživanja. Pošto se radi o prilično uskom temperaturnom rasponu u prvom redu će promjene intenziteta fluktuacija biti zanemarive u odnosu na promjenu broja fluktuirajućih lanaca. Visina donje relaksacije nam prema tome direktno mjeri taj broj. Utjecaj fluktuacija na gornju relaksaciju možemo najjednostavnije prikazati preko efektivnih površina koje vide protuioni. Lanci imaju neku površinu i dok su dio veće strukture; nazovimo tu površinu S_0 . Kada se neki lanac oslobodi, efektivna površina mu naraste na $S_0 + \Delta S$. Ako uzmemo da je intenzitet gornje relaksacije proporcionalan srednjoj efektivnoj površini lanaca u otopini dobit ćemo

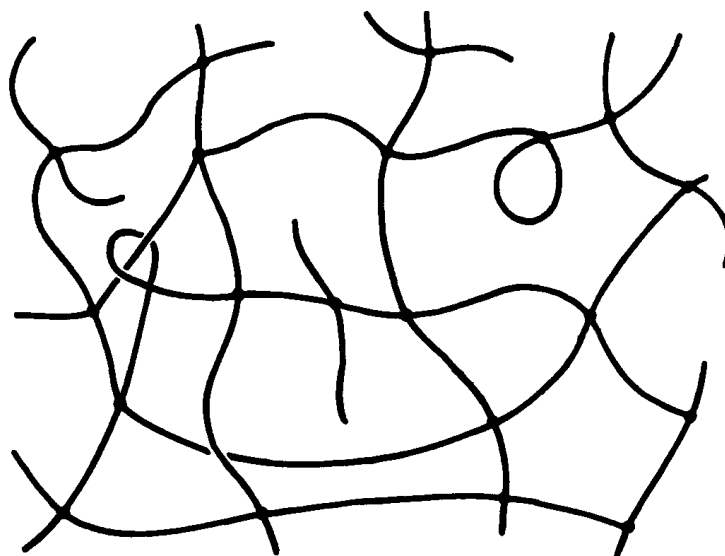
$$\Delta\sigma \sim S_0 + \frac{n}{N}\Delta S$$

gdje smo s N označili ukupan broj lanaca. Mjeru površine S_0 nam daje visina relaksacije na temperaturama mnogo nižim od temperature prijelaza; ostatak koji ovisi o broju slobodnih lanaca ćemo nazvati reduciranom visinom. S obzirom da je visina donje relaksacije proporcionalna n , vidimo da bi na temperaturama u blizini prijelaza omjer reducirane visine gornje relaksacije i visine donje relaksacije trebao biti konstantan. Bez detaljnije teorije ne možemo izračunati konstantu proporcionalnosti, ali već dobivanje konstantnog omjera bi značilo dodatnu potvrdu modela.

2.5 Proces geliranja

S makroskopskog stajališta želatina se odlikuje s dvije karakteristične 'faze', sol i gel. U ovisnosti o koncentraciji i tipu polimera koji izgrađuje gel postojat će temperatura T_g ispod koje će se sustav nalaziti u 'uređenijem', gel stanju. Sam prijelaz iz sol u gel stanje nije jasno temperaturno razlučljiv i eksperimentalno se očituje divergencijom viskoznosti otopljenog polimera sa snižavanjem temperature do T_g (reološki prijelaz). U sol stanju imamo mnoštvo polimera koji nisu međusobno (trajno) povezani te stoga nema izražene nikakve makrostrukture. Gel stanje pak ima definiranu makrostrukturu, moguće je putujući po lancima doći sa jednog kraja uzorka

na drugi. Veći dio lanaca je međusobno povezan (Slika 8) te zbog toga dolazi do divergencije viskoznosti te je moguće definirati modul elastičnosti. Sam proces prijelaza iz sustava nepoveza-

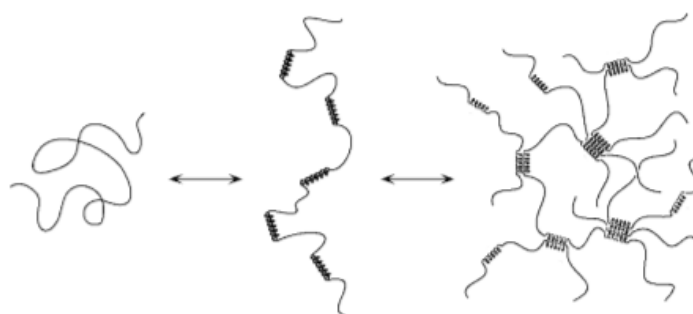


Slika 8: Prikaz dijela makrostrukture gela. Preuzeto iz [23]

nih lanaca sol stanja u gel se često objašnjava perkolacijom u temperaturi. Radi mikroskopskih razloga sniženjem temperature se lanci mogu povezivati i tvoriti nakupine čija karakteristična dimenzija također divergira kako se temperatura snižuje do temperature geliranja.

Dalje ćemo se ograničiti na razmatranja termoreverzibilnih gelova kod kojih je priroda povezivanja lanaca fizikalna, tj. ne dolazi do promjene u kemijskom sastavu polimera. Preptostavka je da se veze među lancima naizmjenice uspostavljaju i prekidaju ispod neke kritične termičke energije. Kako se približavamo temperaturi geliranja nakupine rastu dok se ne spoje u okolini temperature geliranja u jednu veliku makrostrukturu koja prožima cijeli uzorak.

Mikroskopska priroda tog povezivanja može biti različita. Bilo kakav fizikalni proces koji preferira povezivanje određenih dijelova na različitim lancima može voditi u proces geliranja. Primjeri takvih gelova su želatina i polisaharidi[23]. Klasične teorije[23] predviđaju tri načina uspostavljanja veza između lanaca: 1) Formiranje *heliksa* 2) Formiranje mikrokristala i 3) formiranje nodula. U slučaju želatine eksperimenti optičke rotacije[22] ukazuju na formiranje heličnih struktura na temperaturama iznad temperature geliranja. U literaturi nalazimo dva načina[23, 22] kojim se tumači povezivanje heliksa na različitim lancima. Prvo tumačenje je da je lanac termodinamički stabilniji kada postane heliks te da se tada zbog veće koncentracije



Slika 9: Prijelaz iz coil u heliks fazu i pojava makrostrukture. Preuzeto iz [22]

vodikovih skupina dva takva heliksa mogu povezati vodikovom vezom. Povezivanje 'ravnih' dijelova nije moguće jer je termička energija veća od energije vezanja zbog manje lokalne koncentracije vodikovih skupina (Slika 9). Drugi scenarij je da se dva ili tri lanca želatine na svojim krajevima lokalno povežu u superheliks koji se tada može povećavati ili seliti duž tih lanaca. Iako je vjerojatnost susretanja krajeva lanaca u otopini jako malena[23], u literaturi se pojavljuje i taj scenarij[14]. Mjerenja optičke rotacije radili smo upravo iz razloga da u želatini rasvijetlimo proces nastanka i spajanja heliksa.

Otvoreno je pitanje prirode faznog prijelaza želatine. Različite teorije ga svrstavaju u različite tipove faznog prijelaza: fazni prijelaz prvog reda[8], fazni prijelaz trećeg reda (Bose-Einstein kondenzacija)[33] i staklasti prijelaz[13]. Kalorimetrijski rezultati za želatinu[13, 14] ukazuju na to da nema singularnosti unutarnje energije oko temperature geliranja, već da postoji postepena promjena od viših temperatura koja je mjerenjima optičkih svojstva korelirana sa početkom stvaranja heliksa[3, 8]. Kalorimetrijska mjerenja također pokazuju kako je gel stanje želatine metastabilno[13] (svojstva joj ovise o starosti). Iz svega navedenog zaključujemo kako sol-gel prijelaz nije moguće kategorizirati niti kao klasični niti staklasti prijelaz.

3 Eksperimentalni postav i metode

Glavna eksperimentalna metoda ovog rada jest niskofrekventna dielektrična spektroskopija. Iako to nije uobičajeno, s obzirom da je eksperimentalni postav za dielektričnu spektroskopiju samostalno izrađen, objasniti ćemo uz postupak mjerenja i sam postav. Pred kraj ćemo se osvrnuti na polarimetrijska mjerenja i pripremu uzoraka.

3.1 Četverokontaktna ćelija

3.1.1 Dizajn ćelije

Ćelija za dielektričnu spektroskopiju izrađena je specifično za ovaj eksperiment, što je omogućilo prilagodbu dizajna i postizanje osjetljivosti i frekventnog raspona nedostupnog standardnim dvokontaktним ćelijama. S obzirom da se velik dio nama zanimljive fizike odvija na prostornim skalama od 100 do 1000 nm, odgovarajuća karakteristična vremena padaju u milisekundno područje (ili više). Zato se javila potreba za točnim mjerenjem kompleksne vodljivosti (naravno njenog realnog dijela, koji odgovara običnoj omskoj vodljivosti) u rasponu frekvencija od nekoliko Hz do približno 10 kHz. Na tim frekvencijama je mjerenje u dvokontaktnoj ćeliji praktički nemoguće radi efekata polarizacije elektroda, koji u tipičnoj konfiguraciji mogu nadmašiti otpor uzorka za nekoliko puta. Drugi veliki eksperimentalni problem je bila temperaturna kontrola; radi prirode sol-gel prijelaza morali smo biti u stanju mjeriti impedancije s različitim temperaturnim protokolima i s velikom preciznošću u temperaturi. Zadovoljavajuće rješenje smo pronašli u kompaktnoj četverokontaktnoj ćeliji s Peltierovim hlađenjem i grijanjem koju smo sami konstruirali.

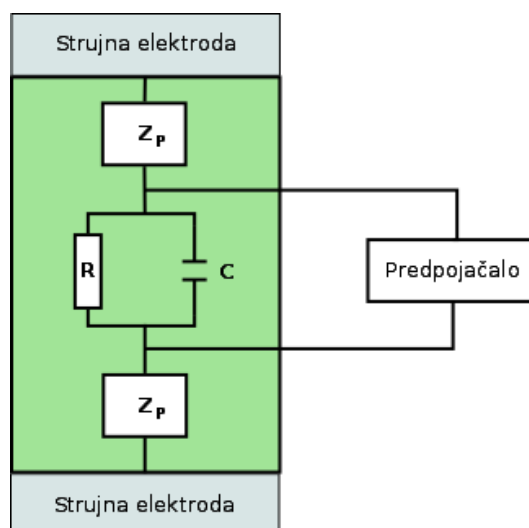
Ćelije za dielektričnu spektroskopiju tekućina korištene u mnogobrojnim eksperimentima [20, 15, 21, 26] mogu se uz rijetke iznimke podijeliti u dvije kategorije: dvokontaktne i četverokontaktne. Iako su u ranijim radovima četverokontaktne prilično zastupljene, potisnule su ih mnogo robusnije dvokontaktne. Njihove glavne prednosti su jednostavna geometrija uzorka i elektroda, mogućnost mjerenja i do nekoliko desetaka MHz i mali volumen uzorka, a s razvojem preciznih i pouzdanih analizatora impedancije njihova upotreba postala je vrlo jednostavna.

Upravo postojanje gotovih instrumenata koji direktno daju vodljivost i kapacitet uzorka dalo je dvokontaktim ćelijama dovoljan zamah da postanu dostupne i komercijalno. Takvi uređaji rade na principu samoustabiljujućeg mosta te bez znatnih zahvata ne mogu biti primjenjeni u četverokontaktim mjerenjima. Pokušaji prilagodbe[34] takvih uređaja nisu urodili plodom zbog kompleksnosti odračunavanja karakteristike elektronike koja prilagođava analizator impendancija za rad s četiri kontakta.

U bitnom se dvokontaktne ćelije sastoje od dvije paralelne metalne pločice između kojih se stavlja kapljica uzorka; uz male korekcije zbog rubnih efekata geometrija tada odgovara jednostavnom pločastom kondenzatoru. Pločice mogu biti izvedene s velikom preciznošću, a i lako je postići dobar termalni kontakt sa sustavom za termostatiranje. No unatoč prednostima dvokontaktne ćelije imaju velikih poteškoća s mjerenjem impedancije dobro vodljivih otopina na frekvencijama manjim od reda 1 kHz. Osnovni razlog je već spomenuta polarizacija elektroda, odnosno formiranje dvosloja iona u neposrednoj blizini površine elektrode. Ionski dvosloj ima relativno veliku impedanciju jer je prilično dobro vezan uz elektrode; problemi su najveći u kapacitetu zbog vrlo malih udaljenosti između slojeva iona pa niskofrekventni kapacitet može dostići i nekoliko μF . Iako se taj efekt uspješno upotrebljava u izradi elektrolitskih kondenzatora, on potpuno maskira kapacitet uzorka na niskim frekvencijama. Situacija je slična i s omskim dijelom, no tamo je efekt nešto manji (ovisno o omjeru površine elektroda i duljine uzorka, no tipično je otpor dvosloja desetak puta veći od otpora uzorka). Radi tromosti iona dvosloj se neće formirati na višim frekvencijama. Sve promjene impedancije samog uzorka superponiraju se na tu veliku varijaciju zbog polarizacije elektroda i postaju praktički nemjerljive.

Postoji nekoliko mogućnosti izlaza iz tog problema, no mi smo radi suprotstavljenih zahtjeva morali dizajnirati vlastitu ćeliju. Odabrana je četverokontaktna konfiguracija, ali uz znatne izmjene svih nama poznatih postava. Osnovna ideja realizacije potiče još od Schwana[20], a razvijena su različita poboljšanja i varijante[15, 21]. Sve te ćelije imaju vrlo velik volumen (nekoliko ml) i primitivnu temperaturnu regulaciju, a koriste se za znatno razrjeđenije otopine od naše tako da im je omjer omskog i kapacitivnog otpora povoljniji. Da bismo pomirili zahtjev za četiri kontakta s jedne i male volumene i prilagodljivu temperaturnu kontrolu s druge strane, morali smo se okrenuti nešto drukčijem dizajnu.

Za razliku od dvokontaktne, u četverokontaktnoj ćeliji postoje dva strujna i dva naponska

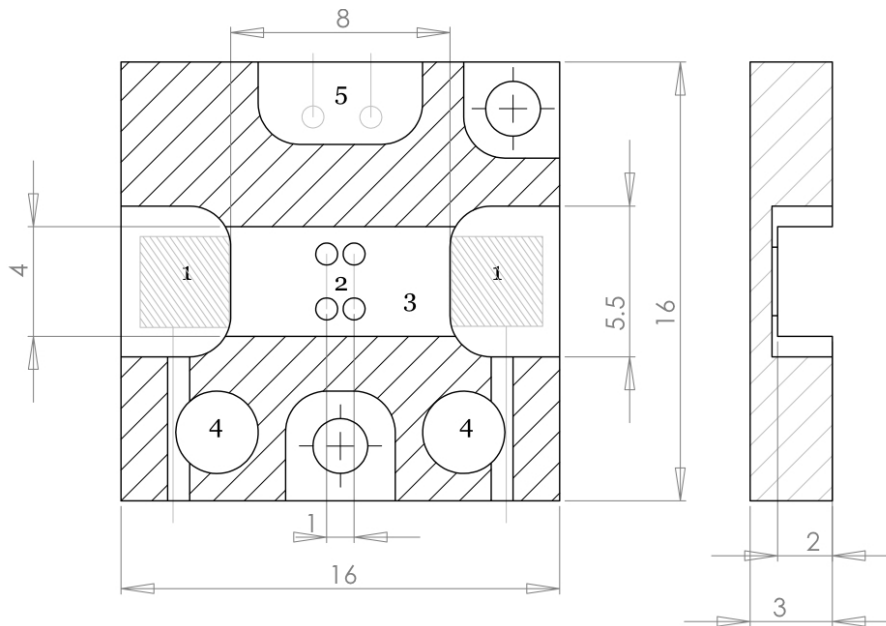


Slika 10: Ekvivalentna shema ćelije. Z_p su parazitske impedancije koje se metodom četiri-kontakta zaobilaze. R i C su mjerene veličine koje karakteriziraju *bulk* svojstva uzorka.

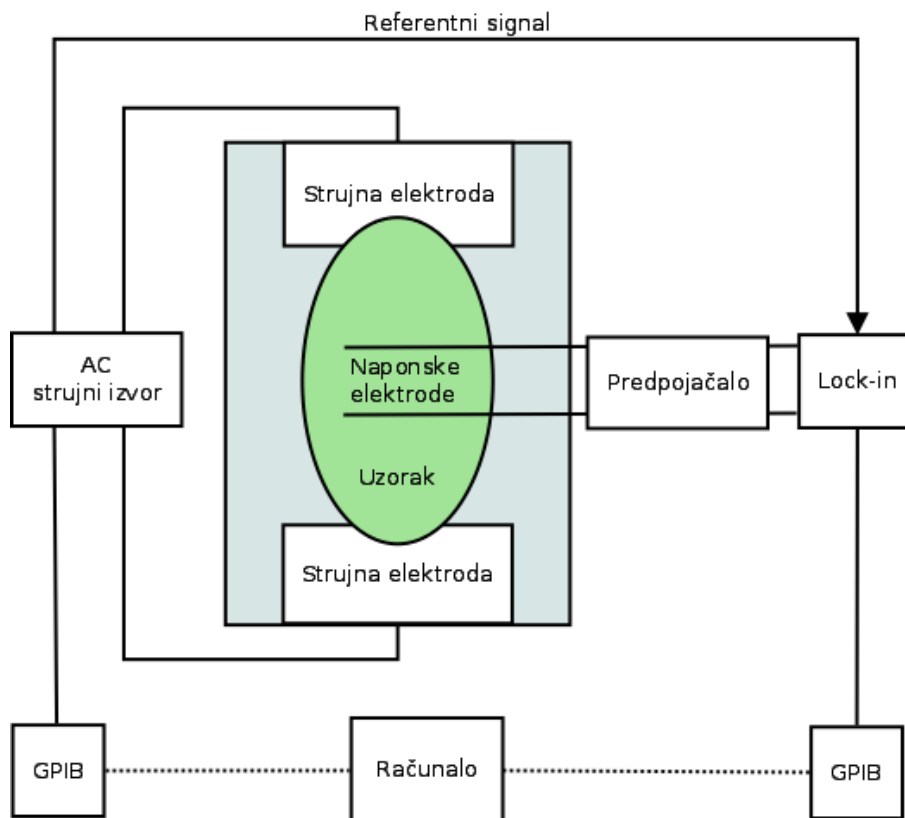
kontakta (Slika 10). Strujni kontakti služe samo za puštanje struje kroz uzorak i na njima se ne mjeri napon; polarizacija nastaje na njima, no s obzirom da je polarizacijska impedancija spojena u seriju s impedancijom uzorka struja je svugdje ista. Naponske elektrode su postavljene u uzorak i spojene na pojačalo vrlo visoke ulazne impedancije. Kako kroz njih teče zanemariva struja, polarizacija je vrlo slaba i možemo smatrati da one zaista mjere pravi potencijal na svom položaju u uzorku. Prema tome izlazi da nam je dovoljno znati razliku potencijala između naponskih elektroda i struju kroz uzorak da bismo znali njegovu impedanciju, bez ikakvog utjecaja polarizacije elektroda.

Iako izgleda jednostavno, kombinirati četverokontaktni princip s malim volumenom uzorka je relativno zahtjevan zadatak. Mali volumeni naime vode na male udaljenosti između elektroda što povećava parazitske kapacitete koji smanjuju efektivnu impedanciju ulaza pojačala, pa na višim frekvencijama struja ipak 'curi'. To je bio glavni izvor poteškoća u našoj ćeliji, pogotovo iznad 1 kHz. Također je bilo potrebno napraviti posebno prilagođeno diferencijalno predpojačalo visoke ulazne impedancije, s dobrom amplitudnom i faznom karakteristikom u čitavom frekventnom rasponu.

Komora za uzorak je izrađena u obliku kanalića izglodanog u bakelitnoj pločici (Slika 13 desno i 11); bakelit je odabran radi vrlo niske električne a relativno velike toplinske vodljivosti (na sobnoj temperaturi stotinjak puta veće od vodljivosti tipičnih plastika kao teflon ili polietilen). Na krajeve kanalića zalijepljene su pozlaćene bakrene pločice - strujne elektrode, dok su

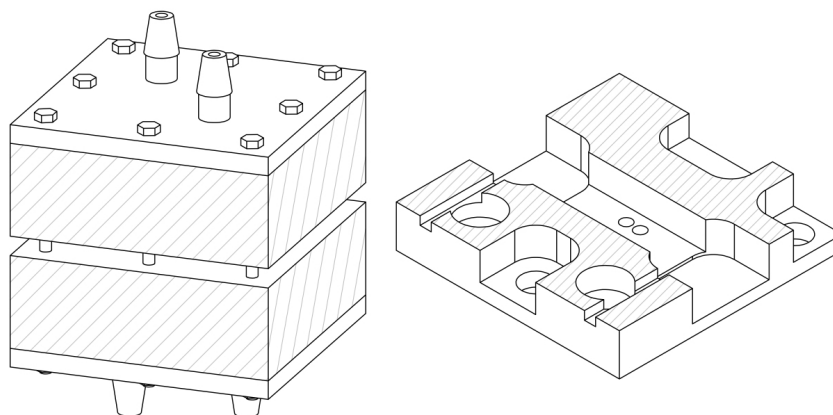


Slika 11: Shematski prikaz postolja za uzorak. 1) strujne elektrode, 2) naponske elektrode, 3) prostor za uzorak, 4) magneti za čvrsto zatvaranje komore s uzorkom, 5) odvodi za naponske kontakte



Slika 12: Blok-shema eksperimentalnog postava

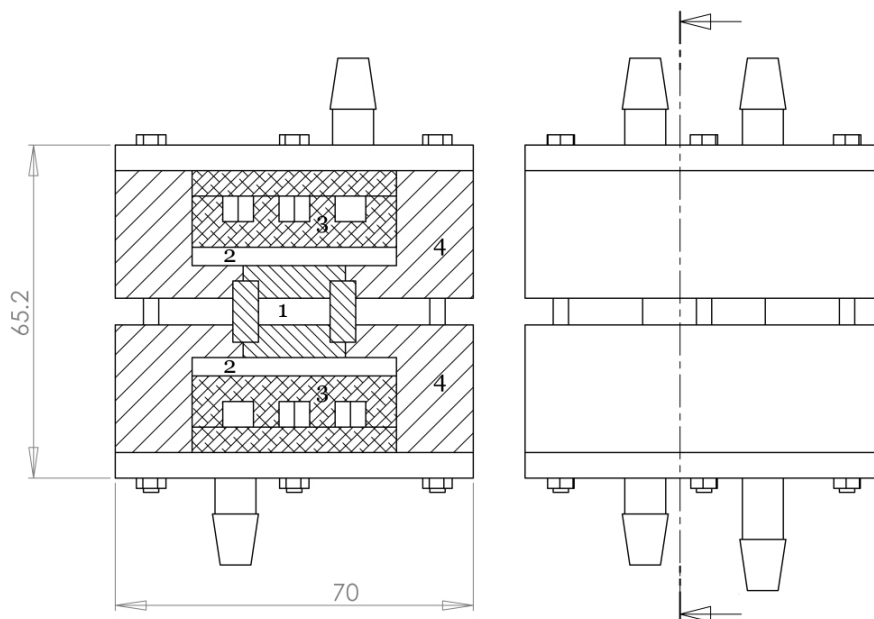
za naponske elektrode upotrijebljene dvije platinske žice promjera $25 \mu\text{m}$. Bakelitna pločica je vijcima pričvršćena za mjedeno kućište koje je slušilo kao Faradayev kavez i termički kontakt



Slika 13: 3D shematski prikaz zatvorene ćelije (lijevo) i komore za uzorak (desno).

na Peltierove elemente. Potreban volumen uzorka je bio $50 \mu\text{l}$, što je dovoljno malo da budemo sigurni u homogenost temperature unutar njega. Shematski prikaz eksperimentalnog postava je prikazan na Slici 12. Za puštanje struje korišten je AC strujni izvor (Keithley 6221), no radi utjecaja parazitskih impedancija struja je direktno mjerena skidanjem napona s otpornika od 100Ω . Otpornik je bio Vishay PTF56 metal film vrlo male tolerancije i dobrih visokofrekventnih svojstava (mali kapacitet i induktivitet). Pri određivanju linearnog odziva uzorka koristili smo struju od $1 \mu\text{A}$ što je odgovaralo naponima reda 30 mV preko cijelog uzorka. Usporedbom spektara za $1, 5$ i $10 \mu\text{A}$ utvrdili smo da u tom rasponu nema ovisnosti o struji i mogli smo isključiti eventualne efekte elektrolize. Za mjerenje napona korišteno je lock-in pojačalo SR830 uz posebno izrađenu sklopku za paralelno mjerenje napona i struje.

Karakteristike ćelije provjeravane su mjerenjem impedancije standarda vodljivosti - otopina KCl u vodi koncentracija od 0.002 mol/dm^3 do 0.01 mol/dm^3 . U nama značajnom frekventnom području od 1 Hz do reda 10 kHz karakteristika slane otopine bila je gotovo ravna, s padom reda 10% na navedenom rasponu. To je znatno poboljšanje u odnosu na dvokontaktno mjerenje, ali kako je naš efekt još pet do deset puta manji morali smo razraditi oduzimanje pozadine. Smatramo da do pada dolazi većim dijelom radi ćelije i elektronike (dio rada o predpojačalu) - tako da mjerenja sa slanim otopinama smatramo 'karakteristikom' same ćelije i elektronike. Nju odračunavamo jednostavno dijeljenjem spektara otopina želatine spektrom slane otopine, uz prilagodbu otpora na visokim frekvencijama. S obzirom da su spektri slanah otopina različitih koncentracija gotovo identični (do na apsolutne vrijednosti otpora) smatramo navedenu proceduru odračunavanja opravdanom. Uz micanje karakteristike ćelije imali smo na višim

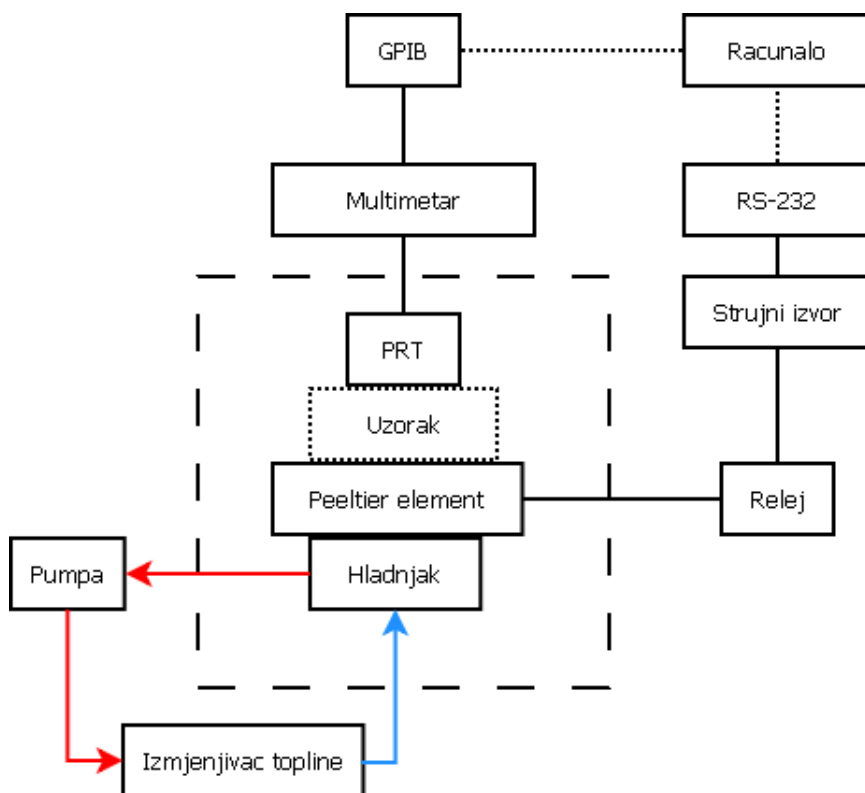


Slika 14: Shematski prikaz ćelije u bokocrtu i presjek. 1) prostor za uzorak, 2) Peltier element, 3) aluminijski hladnjaci, 4) poliacetalni blokovi

temperaturama i problema s temperaturnim *driftom*. Kako zatvorena ćelija nije savršeno brtvila, voda iz uzorka je polako isparavala mijenjajući otpor u vremenu. Iako je drift dio vrlo mali (manji od 0.1Ω u minuti na 45°C), zbog dugog snimanja jednog spektra i velike preciznosti morali smo ga kompenzirati. Drift je za svaki spektar određivan zasebno, ponavljanjem mjerenja na najnižoj frekvenciji i oduzimanjem vrijednosti otpora prije i nakon snimanja spektra. Poznavajući vrijeme čekanja za svaku mjernu točku i pretpostavljajući da je drift linearan u vremenu mogli smo ga jednostavno kompenzirati. Koristeći odračunavanje i vrlo stabilnu temperaturnu kontrolu bili smo u stanju precizno mjeriti efekte manje od 1%, što po našim saznanjima zasad nije postignuto za tako male volumene i velike vodljivosti uzorka.

3.1.2 Temperaturna regulacija

Sustav za temperaturnu regulaciju dielektrične ćelije prikazan je u pojednostavljenoj formi na Slici 15. Mesingano kućište s ćelijom i spojnim žicama montirano je na aparaturu za temperaturnu regulaciju (Slika 14). Ona se sastojala od dva simetrično postavljena Peltierova elementa; mijenjanjem polariteta struje kroz njih mogli smo postići i grijanje i hlađenje uzorka. Peltierovi elementi funkcioniraju kao reverzibilne toplinske pumpe, a snaga prenesena s jedne na drugu stranu elementa proporcionalna je struji kroz njega. Naši elementi su koristili visokoeffi-



Slika 15: Shematski prikaz sustava za temperaturnu regulaciju

kasne poluvodičke spojeve, a sastojali su se od 128 spojeva između dvije keramičke pločice. Mesingano kućište bilo je termovodljivom pastom zalijepljeno na keramiku, dok su kao spremnici topline (s druge strane elemenata) korišteni aluminijski blokovi s protokom izmjenjivačke tekućine. Aluminij je odabran zbog najpovoljnijeg omjera toplinske vodljivosti i kapaciteta, a vrlo finom završnom obradom površina osiguran je dobar toplinski kontakt između bloka i keramičke pločice. Metalni spremnici topline (hladnjaci) su postavljeni na Peltier elemente te je dobar termički kontakt uspostavljen primjenom termopaste na sve termičke kontakte. Kroz hladnjake protiče izmjenjivačka tekućina pomoću akvarijske pumpe protoka 5 l/min. Izmjenjivačka tekućina izmjenjuje toplinu sa okolinom na izmjenjivaču topline. Kao izmjenjivačka tekućina korištena je destilirana voda sa dodatkom antifrizu kako bi se smanjila korozija metalnih dijelova sustava za hlađenje te da se izbjegne nastanak bioloških kultura u sustavu.

Pomoću strujnog izvora ISO-TECH PS-405 kontrolira se rad Peltier elemenata. Peltier elementi nemaju znatne razlike u otporu pa su stoga direktno spojeni u seriju sa izvorom struje. Ovisno o tome da li se želi hlađenje ili grijanje uzorka smjer struje kroz Peltier elemente se postavlja pomoću sklopa koji komunicira s računalom preko Parallel Port-a. Sklop se sastoji od jednog elektromagnetskog preklopnika, LED indikatora trenutnog smjera i FE tranzistora

(FET). FET služi kao naponska sklopka budući da Parallel Port ima premalu izlaznu struju za napajanje preklopnika.

Kao osjetilni element za temperaturu korištena su dva platinska otpornika sa dobro poznatom karakteristikom (1000Ω na 0°C). Temperaturna karakteristika otpornika je linearna u širokom pojasu oko sobne temperature sa nagibom 3860 ppm/K . Termometri su bili montirani u izgledanim kanalićima u gornjem i donjem dijelu mesinganog kućišta, a dobar termički kontakt osiguran termovodljivom pastom. Otpor je mjereno digitalnim multimetrom Keithley 2000, uz preciznost od 0.01Ω i struju kroz otpornik od $100\mu\text{A}$ što je četiri puta manje od preporučene struje. Nakon što je ustanovljeno da je razlika otpora između gornjeg i donjeg termometra unutar njihovih tolerancija, mogli smo zaključiti da nemamo većih gradijenata temperature u uzorku i za mjerenja koristiti samo donji termometar. Izmjereni otpori su očitavani na računaru koje je s digitalnim multimetrom bilo povezano GPIB vezom. Nezavisnu provjeru odsutstva samozagrijavanja napravili smo mjerenjem temperature kroz duži vremenski period (reda 10 sati) u zatvorenoj prostoriji. Iako je platinski termometar vrlo mali, ipak ga nismo mogli montirati na sam uzorak ili u njegovu neposrednu blizinu; stoga ne možemo smatrati da nam očitavanje temperature u realnom vremenu prati temperaturu uzorka, već mora postojati kašnjenje. Zbog relativno male mase i velike vodljivosti mesinganog kućišta i ćelije smatramo kašnjenje relativno malim, no ipak su prije svakog mjerenog spektra uzorak i ćelija držani na ciljanoj temperaturi deset do petnaest minuta. Nakon čekanja nismo više primjećivali veće promjene otpora (osim neizbježnih malih fluktuacija zbog elektronike) tako da ta mjerenja smatramo kvazistatičkima. Mali volumen uzorka osiguravao nam je homogenost temperature i faze unutar njega.

U području temperatura oko sobne uočena je sukladno očekivanju linearna ovisnost izmjene topline sa propuštenom strujom kroz Peltier element. Stoga je pretpostavljena linearna ovisnost struje sa grijanjem/hlađenjem. Za temperaturnu kontrolu je korišten PID (Proporcionalno Integrativno Derivativni) algoritam. Tim algoritmom je dana veza između struje i razlike stvarne i željene temperature. Razliku temperatura zovemo funkcijom greške

$$e = T - T_0$$

pri čemu je T stvarna (trenutna) temperatura, a T_0 željena temperatura. Tada se za izlaznu struju može napisati:

$$I = C_p e + C_d \frac{\Delta e}{\Delta t} + C_i \int_{-\infty}^t e dt$$

Konstante C_p , C_d i C_i su namještene empirijski isprobavanjem ćelije sa uzorkom.

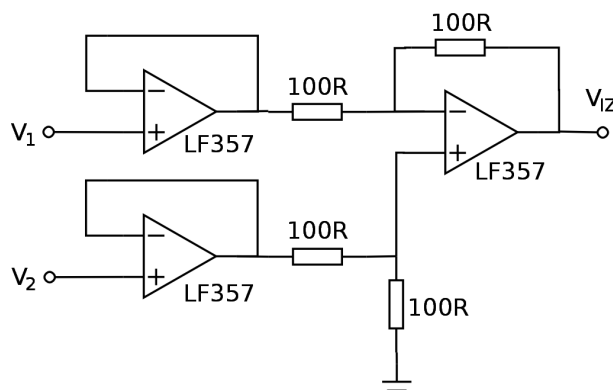
U praksi sustav za temperaturnu regulaciju može održavati temperaturu u rasponu od -10°C do 60°C sa srednjim kvadratnim odstupanjem od željene temperature 0.01° . Sustav nije testiran izvan tog raspona. Sustav se može koristiti i za nagle promjene temperature uzorka (*quenching*) te u tom režimu može spustiti temperaturu uzorka brzinom od $1^\circ\text{C}/\text{s}$.

Iako je relativna preciznost termometrije bila bolja od 0.01°C , baždarenje termometra na apsolutnu temperaturu bilo je teže napraviti precizno. Točna apsolutna temperatura nije nam u eksperimentu ni bila toliko važna, ali ipak smo uspjeli napraviti baždarenje do na 0.1°C . Baždarenje je vršeno pomoću mjerenja sobne temperature živinim termometrom uz isključen sustav za grijanje/hlađenje. Za apsolutnu temperaturu je uzeta sobna temperatura koja je izmjerena nakon što se ćelija par sati termalizirala sa okolinom. Također smo iskušali i metodu baždarenja dviju različitih ćelija s idejom nadopunjavanja naših mjerenja sa onima dobivenim dvokontaktним mjerenjem na višim frekvencijama. Tu je usklađivanje temperature od presudne važnosti. U tu svrhu isproban je kositar (IV) bromid, s talištem od 29°C [31], čiju smo vodljivost mjerili u malim temperaturnim koracima oko točke tališta. Talina ima nešto veću vodljivost, pa smo mjereći položaj skoka u otporu i kapacitetu mogli napraviti korespondenciju između naše i stvarne apsolutne temperature.

3.1.3 Predpojačalo

Kako bismo što više smanjili parazitske struje između naponskih elektroda metode četiri kontakta potrebno je da otpor između tih elektroda bude što veći. U tu svrhu konstruirano je *buffered* diferencijalno predpojačalo. Shema predpojačala prikazana je na Slici 16 (izostavljene su pomoćne komponente poput izvora napajanja i td.).

Predpojačalo je konstruirano pomoću operacionog pojačala LF357 koje je izabrano zbog svojih pogodnih karakteristika. LF357 je širokopojasno JFET (*Junction Field Effect Transistor*) pojačalo koje se odlikuje ulaznom impedancijom reda veličine $1\text{ T}\Omega$. Jedan LF357 je poslužio za diferencijalno pojačalo s četiri do na promil otpora jednaka ugljena otpornika. Korišteni su ugljeni otpornici zbog jednog od najmanjih iznosa parazitskih induktiviteta i kapaciteta u

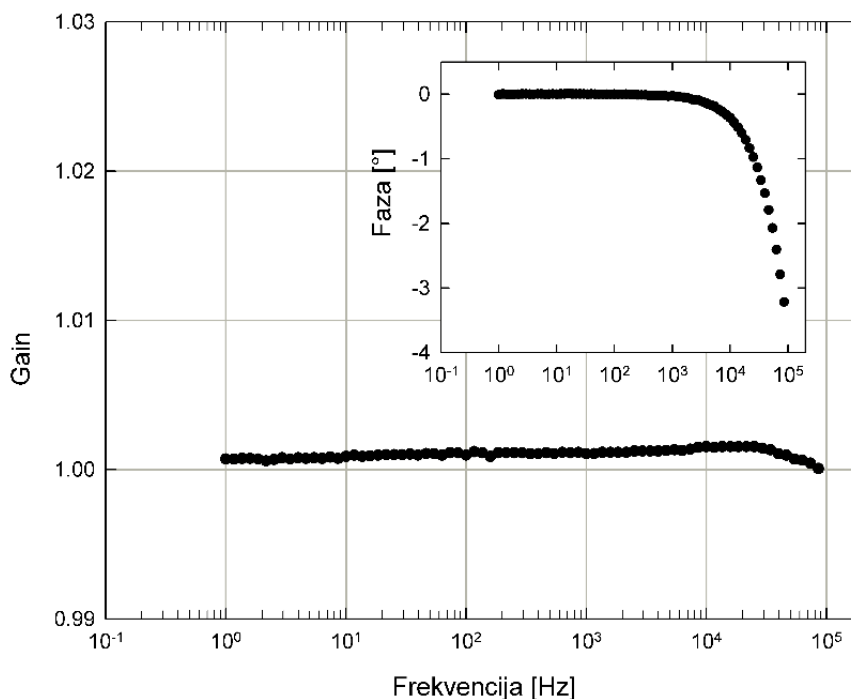


Slika 16: Shematski prikaz predpojačala

otporniku. Mana ugljenih otpornika je u za faktor 100 većem ljubičastom šumu od npr. *metal film* otpornika [35].

Ovako konstruirano predpojačalo je stavljeno u metalnu kutiju kako bi se smanjile smetnje iz okoline. Komponente su postavljene na tiskanu pločicu s time da su ulazni pinovi od oba *buffera* spojeni u zraku na BNC konektore. Razlog tome je kako bi izbjegli bilo kakvo 'curenje' struje preko pločice koje bi smanjilo ulaznu impedanciju predpojačala.

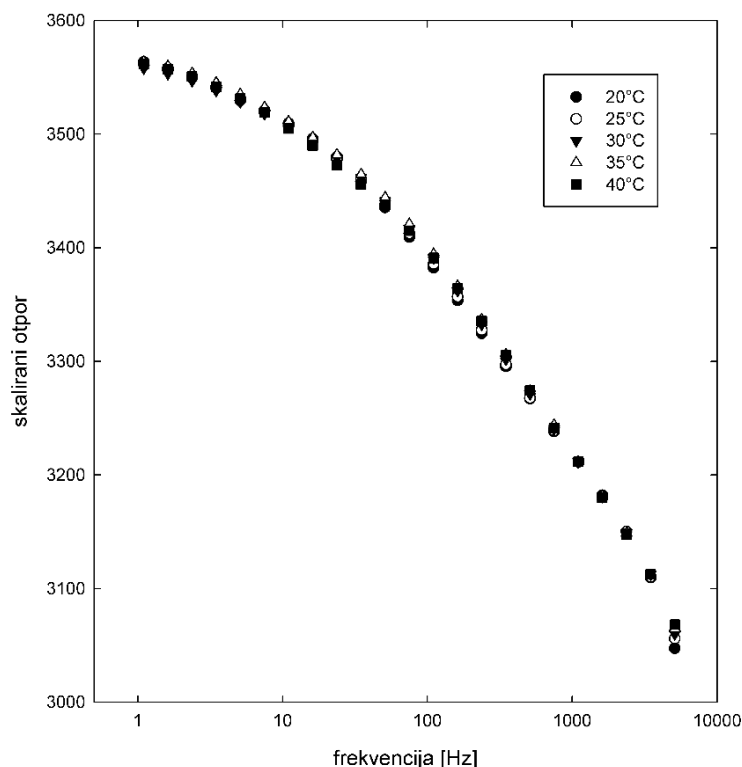
Naponska i fazna karakteristika predpojačala je prikazana na Slici 17. Karakteristika je takva da je točnost mjerenja do 10 kHz bolja od 0.1%. Glavna mana ovog predpojačala jest u relativno malenom CMRRu (*Common Mode Rejection Ratio* - Omjer odbijanja zajedničkog signala) koji je reda 10^4 (sam LF357 ima za faktor 100 veći) te u relativno velikom šumu. To je uzrokovalo i veliki ostatak (10% iznosa visokofrekventne vodljivosti) od polarizacije pri mjerenjima na niskim frekvencijama. Smatramo kako je razlog tome u otpornicima korištenim za diferencijalni dio predpojačala. Kao što je prije spomenuto, korišteni su ugljeni otpornici koji su bili izabrani iz stotinjak običnih otpornika tolerancije 5% tako da budu isti do na promil. Kako bi se u potpunosti iskoristila karakteristika LF357 bilo bi potrebno koristiti otpornike usuglašene u otporu do na 0.01% ili bolje. Također bilo bi potrebno koristiti metal film zbog manjeg intrinzičnog šuma. Ipak korišteni su ugljeni otpornici zbog nedostupnosti i visoke cijene metal film otpornika s tolerancijom boljom od 0.01%.



Slika 17: Frekventna karakteristika predpojačala

3.1.4 Proces mjerenja

Temperaturna kontrola i sva mjerenja kontrolirana su pomoću LabVIEW programa. Spektri su snimani na deset temperatura u rasponu od 20 do 42 °C za pojedinu koncentraciju želatine, uz jedno finije mjerenje s otopinom koncentracije 3%. Snimanje jednog spektra trajalo je oko 11 minuta. Razlog tome je dugo vrijeme filtriranja lock-in pojačala na nižim frekvencijama. To nam je omogućilo veliku stabilnost signala i osjetljivost od 1 u 10⁵ u mjerenju otpora. Iako smo fazu mogli mjeriti na 0.01 °, to nije bilo dovoljno za određivanje kapaciteta na niskim frekvencijama. Radi toga smo i odabrali konfiguraciju ćelije koja nije najpovoljnija za određivanje kapaciteta, s obzirom da nam je bilo važnije imati dobra mjerenja otpora. Neki autori su radili dvije identične ćelije te odračunavali elektrodne efekte i pozadinu uspoređujući uzorak sa nekom referencom[21], što im je omogućilo i precizno mjerenje kapaciteta. Alternativa je pomoću naših preciznih mjerenja otpora (realni dio odzivne funkcije) upotrebom Kramers-Kronigovih[32] relacija rekonstruirati imaginarni dio (odnosno kapacitet). Kramers-Kronig relacije bi također omogućile provjeru samosuglasnost izmjerenih relaksacija u otporu i kapacitetu, kada bismo ih mogli mjeriti. Glavni razlog za nemogućnost mjerenja kapaciteta jest u tome što je efekt kapaciteta na otpor uzorka potisnut s obzirom na frekvenciju, te tek na višim frekvencijama postaje sumjerljiv sa dijelom koji dolazi od otpornosti uzorka.



Slika 18: Rezultat skaliranja spektra na različitim temperatura istih soli na otpor najviše temperature.

Izmjereni pozadinski otpor je izbacivan tokom obrade sirovih podataka tako da su mjerenja skalirana na referentno mjerenje istog uzorka na višoj temperaturi od promatranih. Kako bi opravdali valjanost ove metode izmjerili smo spektar pozadine za sol u ovisnosti o temperaturi i skalirali sve vrijednosti na isti iznos (Slika 18). Iz navedenih rezultata je očito da je takav princip usporedbe (skaliranja) valjan za micanje pozadinskog otpora. Razlog što većina autora ne može iz dvokontaktnih mjerenja dobiti ovakve rezultate jest u tome što su tada relaksacije premalene u usporedbi sa pozadinom. Opravdanje za uspoređivanje dvaju uzoraka istih ili sličnih vodljivosti nalazimo i kod drugih autora[18, 21].

3.2 Polarimetrija

Polarimetrijska mjerenja temelje se na pojavi da plinovite, tekuće i krute tvari određene kemijske konstitucije zakreću ravninu polarizacije svjetlosti. Tvari koje posjeduju to svojstvo nazivaju se optički aktivnim tvarima, a instrument koji omogućava mjerenje kuta zakretanja svjetlosti je polarimetar. Optička se aktivnost često povezuje s prisutnošću asimetričnog ugljikovog atoma (na kojeg su vezane četiri različite kemijske skupine ili atoma) ili atoma nekog

drugog elementa. No ravninu polarizacije svjetla mogu zakretati i neki kristali te motivi sekundarne strukture biopolimera. Stupanj zakretanja može biti ovisan o valnoj duljini svjetlosti, temperaturi, građi i koncentraciji optički aktivne tvari te o debljini sloja kroz koje svjetlost prolazi. Linearno polariziranu svjetlost možemo prikazati kao zbroj dvije lijevo i desno cirkularno polarizirane zrake istog intenziteta; pri prolasku kroz kiralni uzorak jedna od njih će biti brža, a druga sporija. To rezultira relativnim pomakom u fazi između dva vala, koji vidimo kao zakretanje ravnine polarizacije. U našem uzorku pretpostavljamo da postoje dva izvora optičke aktivnosti: kiralnost α - ugljikovih atoma u aminokiselinama i sekundarna struktura (heliksi) koju želimo proučavati.

Polarimetar koji smo koristili kao izvor monokromatskog svjetla ima hladnu natrijevu žarulju ($\lambda = 589.3$ nm). Svjetlost od izvora prvo prolazi kroz polarizator kako bismo dobili linearno polariziranu svjetlost. Zatim prolazi kroz uzorak, koji je smješten u staklenom spremniku optičkog puta 100 mm ili 200 mm te konačno kroz pomični analizator, koji je povezan sa skalom na kojoj se izravno očitava kut skretanja u stupnjevima. Vidno polje podijeljeno je na tri dijela te se izjednačavanjem svjetline kut zakretanja svjetlosti može odrediti s preciznoću od pet stotinki stupnja. Prije svakog mjerenja uzorci su po petnaest minuta termostimirani u cirkulirajućoj vodenoj kupelji, uz mjerenje temperature živinim termometrom preciznosti 0.1°C . Zbog relativno velikog volumena uzorka (16.3 i 9.2 ml), debelih stjenki spremnika i kratkog trajanja očitavanja kuta zakretanja smatrali smo promjenu temperature tokom mjerenja zanemarivom.

3.3 Uzorak

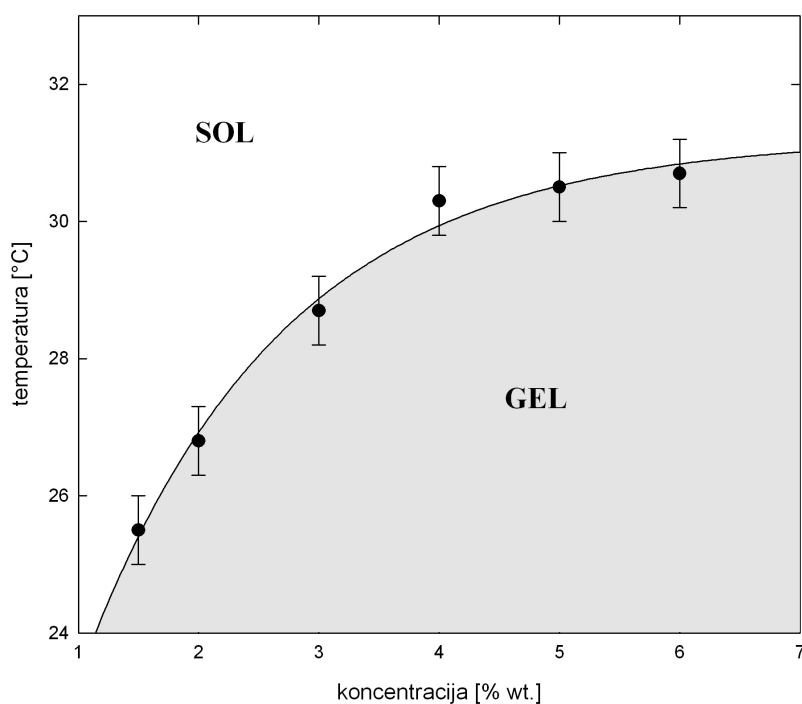
Uzorke gelova za mjerenja pripremali smo u rasponu masenih udjela od 1.5 % do 6.0 %. Određenu masu gela u prahu (Sigma-Aldrich G8150 gel iz svinjske kože za elektroforezu, tip A) otopili smo u deioniziranoj (Milli-Q) vodi te miješali na vrtložnoj miješalici, da bi se gel jednoliko otopio. Epruvete s uzorcima smo držali dva sata u električnom grijaču na 45°C . Nakon toga smo uzorke još jednom promiješali vrtložnom miješalicom te ih pohranili u hladnjak na 4°C . Prije nanošenja uzorka u ćeliju, zagrijavanjem 5 min na 60°C preveli smo uzorak u sol stanje pogodno za mikropipetiranje uz izbrisanu prošlost. U ćeliju smo pomoću mikropipete nanijeli $50 \mu\text{L}$ uzorka, koji se zbog površinske napetosti jednoliko rasporedio po komorici za mjerenje. Kontaminaciju uzoraka solima izbjegli smo temeljitim čišćenjem ćelije pri svakoj

promjeni uzorka deioniziranom vodom te višestrukim ispiranjem komorice. Za polarimetrijska mjerenja procedura je bila ista, osim što bi svakom mjerenju prethodilo zagrijavanje spremnika s uzorkom od 15 min u termostatiranoj cirkulirajućoj kupelji. Budući da uzorak na sebe vuče vodu, pri svakoj pripremi jedan referentni suhi uzorak smo grijali na temperaturi od 120°C kako bi iz njega izvukli navučenu vodu. Usporedbom mase uzorka prije i poslije izvlačenja uočili smo kako je promjena u masi zanemariva s obzirom na točnost drugih mjerenja te stoga te korekcije nismo uvodili u daljnji račun.

4 Rezultati i rasprava

Nakon izlaganja teorijske podloge i eksperimentalnih metoda sada smo u poziciji da ih usporedimo s različitim eksperimentalnim rezultatima koje smo prikupili. Prije svega nam je cilj uspostaviti koherentnu sliku zbivanja tijekom sol-gel prijelaza koristeći rezultate električnih mjerenja i dopunjujući ih polarimetrijskim. Kao što smo opisali, glavnina mjerenja su dielektrični spektri u frekventnom rasponu od 1 Hz do 10 kHz, u ovisnosti o temperaturi i koncentraciji. Promatrajući viskoznost i gibljivost uzorka u ovisnosti o koncentraciji utvrđen je fazni dijagram prikazan na Slici 19 koji je u skladu sa mjerenjima drugih autora[9]. Radi relativno slabe ovisnosti temperature geliranja o koncentraciji primarna varijabla nam je bila temperatura, dok su mjerenja na različitim koncentracijama uglavnom služila za provjeru teorijskih ideja kroz različita skaliranja i provjeru temperaturnih trendova. Izvedeno je jedno detaljno temperaturno mjerenje s otopinom koncentracije 3% i na tim rezultatima zasnivamo većinu rasprave i zaključaka. Također nam je bitno bilo mjerenje ovisnosti gornjeg relaksacijskog vremena o koncentraciji u gelu, koje nam daje vjerojatno najsnažniju potvrdu ideje da je gornja relaksacija efekt protuiona na skalama srednje udaljenosti lanaca. Mjeren je i nelinearni odziv (treći harmonik) za koncentraciju 5%, no zbog velikih eksperimentalnih poteškoća nismo uspjeli dobiti čitav spektar nego smo mjerenja ograničili na jednu frekvenciju. Ti rezultati nam služe kao dodatna potvrda modela ionske relaksacije. Polarimetrijska mjerenja daju strukturne informacije na kojima gradimo mikroskopsku sliku otopine želatine pa bi nam usporedba polarimetrije i dielektrične spektroskopije trebala reći kako i koliko procesi na razini nekoliko aminokiselina utječu na globalnu dinamiku. Na taj način možemo zaokružiti sliku u kojoj upravo specifične mikroskopske promjene dovode do makroskopske pojave - gela.

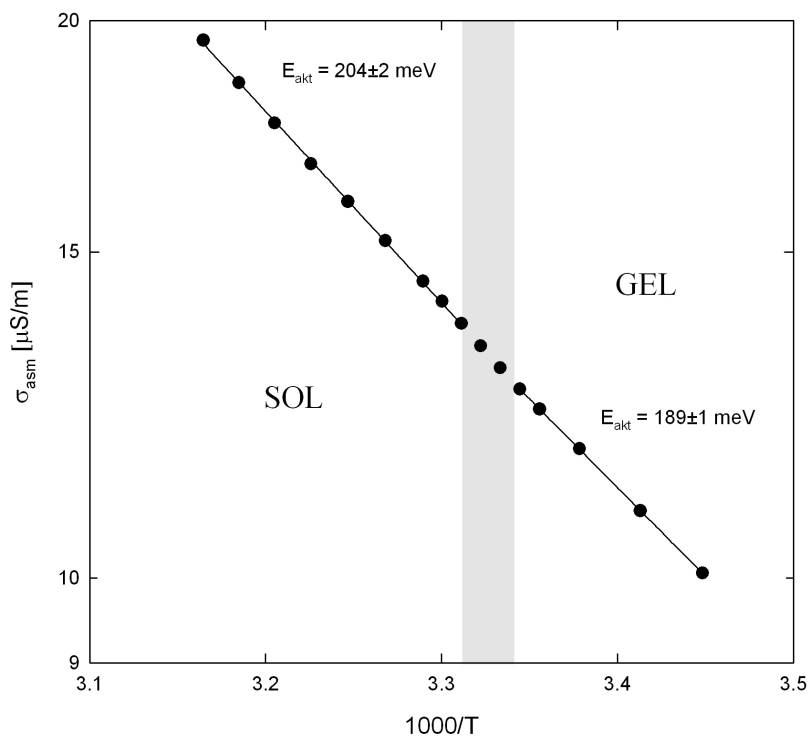
Prije razmatranja relaksacija u sol i gel stanju moramo se ipak pozabaviti onim što ostane nakon što niskofrekventni doprinosi na vodljivost utrnu - visokofrekventnom vodljivošću. Treba cijelo vrijeme imati na umu da su svi relaksacijski efekti koje ćemo u daljnjem tekstu diskutirati reda nekoliko postotaka ukupne vodljivosti pa za njihovo razumijevanje moramo shvatiti i zašto naš sistem uopće vodi struju. Za 'asimptotsku' vodljivost uzimamo vrijednost vodljivosti s isključenim niskofrekventnim relaksacijama budući da su istraživanja drugih autora[11] pokazala da je spektar vodljivosti ravan do visokih frekvencija. Jednom kada zanemarimo sva događanja na nižim frekvencijama možemo se pitati kuda zapravo ioni prolaze dok vode struju. Usprkos



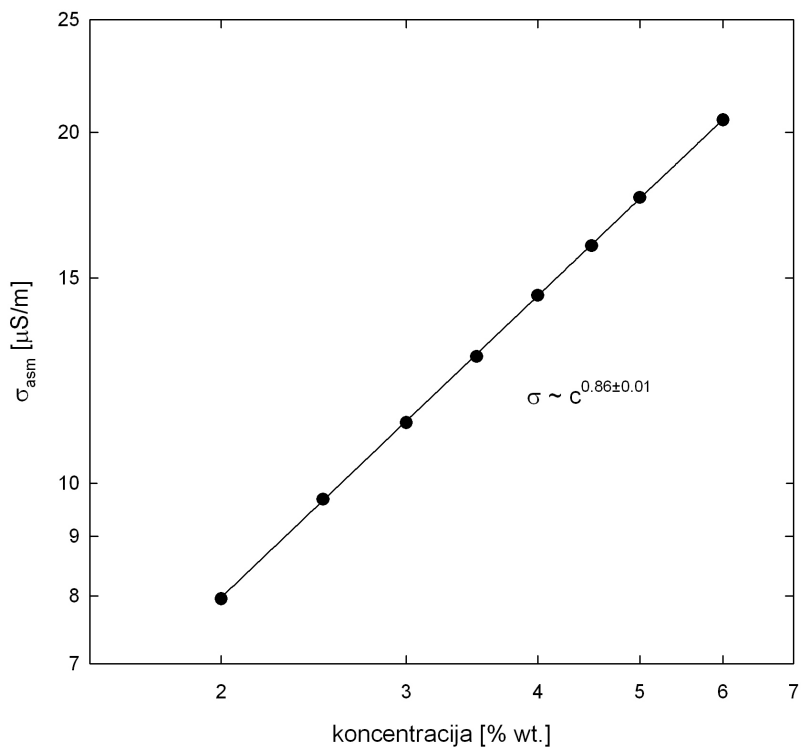
Slika 19: Reološki fazni dijagram želatine

relativno velikoj koncentraciji želatine, u otopini i dalje postoje ogromna područja koja su jednostavno voda te bi možda prvi zaključak bio da na visokim frekvencijama gledamo obično vođenje struje kroz vodu preko iona H^+ . Međutim iz mjerenja pH (pH oko 5.2 za cijeli raspon koncentracija) i numeričkih procjena broja slobodnih iona zaključujemo da je njihova koncentracija otprilike sto puta veća nego u čistoj vodi, što zbog neutralnosti mora značiti da imamo isto toliko negativnih naboja na lancima. Kao što smo već opisali, interakcija između njih dovodi do pojave sloja iona H^+ u blizini lanaca i zapravo ispada da je većina slobodnih protuiona unutar potencijalnih jama, koje tvore negativni lanci, dosega nekoliko Debyeovih radiusa. To znači da u golemim prostorima koje ispunjava voda koncentracija vodljivih iona nije mnogo veća nego u čistoj vodi. Sada možemo zamisliti dva scenarija: 1) ioni u polju napuštaju lance, ulaze u prostore između njih i vraćamo se na ideju o 'običnoj' vodljivosti vode, ili 2) ioni ostaju unutar oblaka i kreću se samo uzduž lanaca. Ako strukturu lanaca promatramo kao objekt s fraktalnom dimenzijom, drugi slučaj nas vodi na poznati problem vodljivosti fraktala[36]; tada jednostavno imamo vodljive kanale - oblake iona oko lanaca, dok vođenje kroz međuprostore daje tek mali doprinos. Odluku između dva scenarija moramo potražiti u eksperimentu.

Dvije osnovne informacije koje možemo dati o asimptotskoj vodljivosti su ovisnost o tem-



Slika 20: Arrheniusov dijagram za masenu koncentraciju 3%



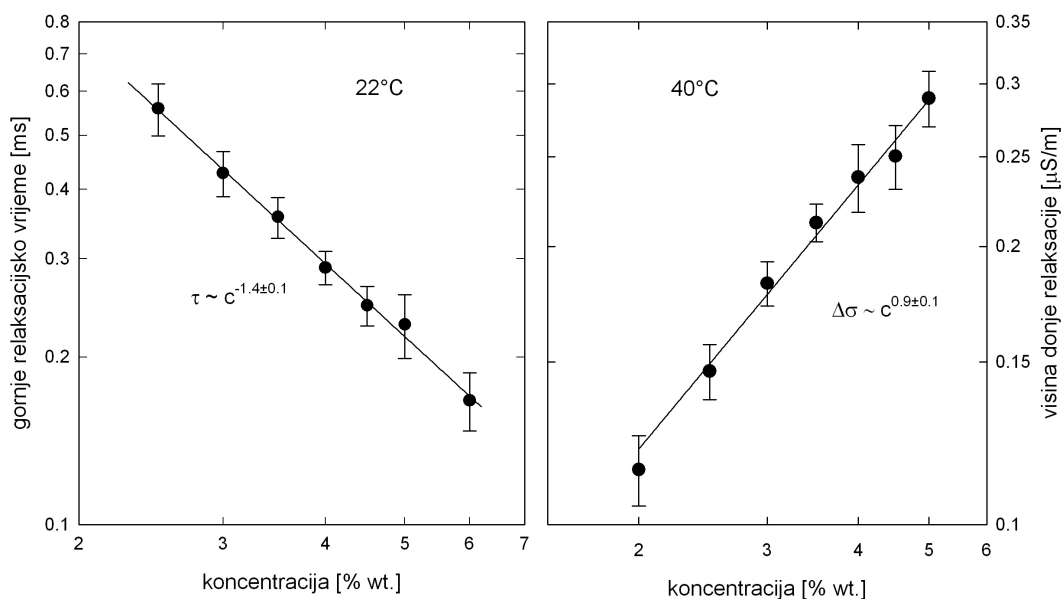
Slika 21: Asimptotska vodljivost u ovisnosti o koncentraciji na 22°C

peraturi za jednu koncentraciju i ovisnost o koncentraciji na odabranim temperaturama. Slika 20 prikazuje Arrheniusov dijagram (ovisnost vodljivosti o inverznoj temperaturi) za koncentraciju 3% i na njoj jasno vidimo aktivacijsku prirodu vodljivosti. Važno je da su aktivacijske energije različite u sol i gel stanju; razlika je tek nekoliko postotaka, ali je i dalje dovoljno veća od pogreške pri fitanju da je možemo dobro razlučiti. Zanimljiva je činjenica da je aktivacijska energija *manja* u gelu nego u solu, iz čega bi se moglo zaključiti da proces vođenja ima veze s prostornom strukturom lanaca čak i na visokim frekvencijama. U gelu je naime povezanost lanaca mnogo bolja i ioni mogu dugo putovati po strukturi bez da nalete na neku prazninu koju im je relativno teško preskočiti. Takva slika ide u prilog predodžbi o vođenju kroz 'vodljive kanale' u blizini lanaca.

Jaču potvrdu nam može dati ovisnost asimptotske vodljivosti o koncentraciji (Slika 21) na 22°C. Na toj temperaturi su sve promatrane koncentracije već daleko u gel-području i očekujemo da su eventualni strukturni efekti izraženiji nego na većim temperaturama. Izmjerena asimptotska vodljivost se skalira s koncentracijom kao $\sigma_{asm} \sim c^{0.86}$ što bi se moglo tumačiti kao efekt smanjene dimenzionalnosti vodljive mreže lanaca. S obzirom da imamo samo jednu vrstu slobodnih iona (negativni protuioni su lanci ogromne mase) vođenje kroz vodu bi trebalo davati linearnu ovisnost vodljivosti o koncentraciji, jer broj H^+ iona sigurno raste linearno s koncentracijom. Izmjereni eksponent manji od 1 daje naslutiti da bar dio iona ostaje u blizini lanaca. Iako proteinski lanci nemaju velik naboj po jedinici duljine, smatramo da je on ipak dovoljan da stvori potencijalnu jamu koja će zadržavati većinu iona u blizini lanca. Tako nastaje opisani energetski krajolik koji na nižim frekvencijama polja dovodi do ionske relaksacije. Bolji uvid u prirodu izmjerenog skaliranja bi nam dao izračun fraktalne dimenzije, iako je pitanje je li to moguće dobiti iz ovih mjerenja s obzirom da navedeno skaliranje predstavlja superpoziciju vodljivosti po lancima i vodljivosti slobodnih iona.

Iz mjerenih spektara mogli smo u za svaku relaksaciju izvući tri parametra: visinu, relaksacijsko vrijeme i parametar širine α u skladu s Cole-Cole funkcijom (2.6). Postojale su međutim praktične poteškoće koje su nekad onemogućavale određivanje parametara; tu je naročito problematična bila donja relaksacija koja potpuno nestane u gelu. Drugi problem su bile širine - nerijetko se događalo da bi nam i gornja i donja relaksacija djelomično izašle iz mjernog raspona pa je fitanje moralo biti izvršeno na nepotpune krivulje. No, zbog razlike izeđu gornjeg i donjeg relaksacijskog vremena od otprilike dvije dekade, mogli smo jasno razlučiti dvije stepe-

nice u vodljivosti. Zbog problema u određivanju parametara rađeno je mjerenje s relativno puno točaka u temperaturi, što vodi na veću pouzdanost fizikalnih zaključaka izvedenih iz mjerenja.

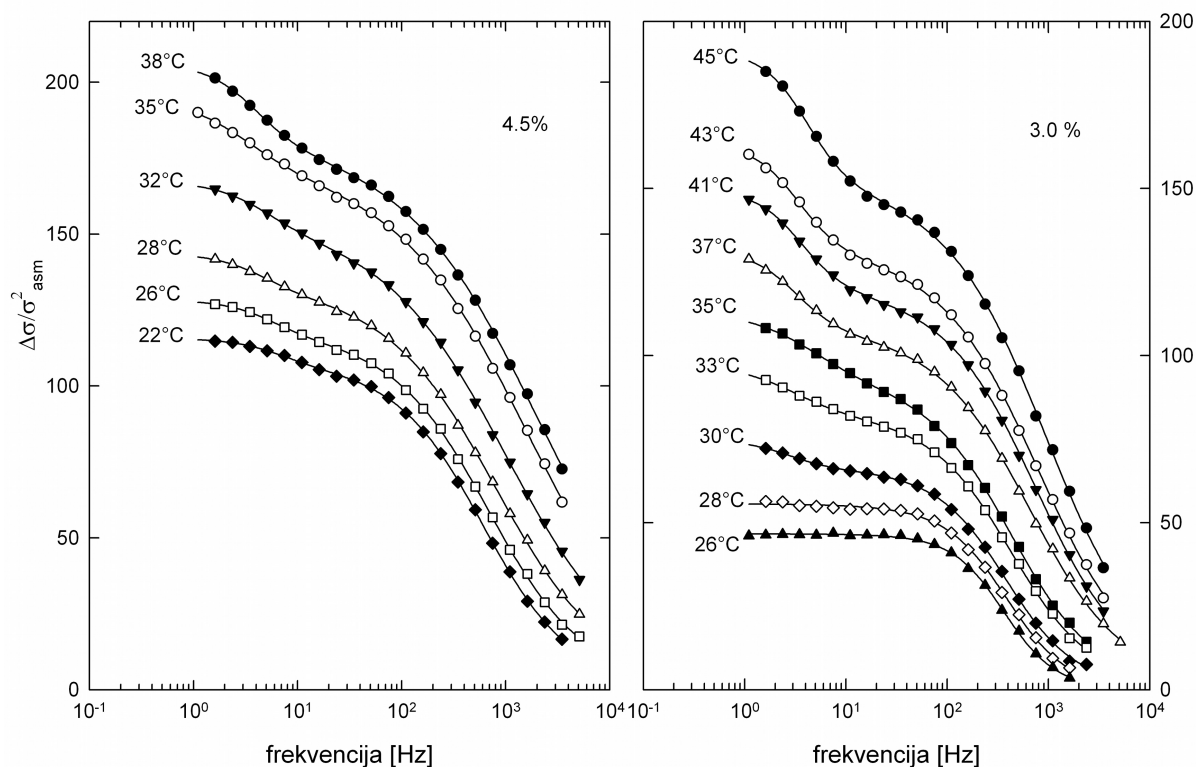


Slika 22: Skaliranje relaksacijskog vremena gornje i donje relaksacije na temperaturama 22°C i 40°C

Osnovna ideja koju smo morali provjeriti je bila pretpostavka o mehanizmu gornje relaksacije. Ako ona zaista predstavlja preskakanje iona H^+ s lanca na lanac, očekujemo dva bitna eksperimentalna rezultata: relaksacijska vremena koja vode na karakteristične duljine reda 500 nm u našem području koncentracija (i uz korištenje difuzijske konstante za slobodne vodikove ione [31]) te već spomenuto skaliranje karakteristične duljine pora s koncentracijom (2.1) kao $\xi \sim c^{-3/4}$, iz čega zbog univerzalnosti jednadžbe difuzije proizlazi skaliranje relaksacijskog vremena oblika $\tau \sim c^{-3/2}$. Oba rezultata smo uspjeli u velikoj mjeri reproducirati eksperimentalno. Slika 22 lijevo prikazuje ovisnost karakterističnog vremena o koncentraciji na 22°C iz kojeg slijedi skaliranje $\xi \sim c^{-0.70 \pm 0.05}$. Pogreške na grafu su uglavnom posljedica nepouzdanosti u fitanju i oduzimanju pozadina. Iako je teorijska vrijednost eksponenta unutar pogreške, srednja vrijednost je ipak nešto manja; smatramo da do te promjene dolazi radi nabijenosti lanca koja vodi na nešto veće udaljenosti od očekivanih sukladno teoriji za polielektrolite. Ipak, slaganje je dovoljno dobro da možemo vjerovati u naš protuionski model. Brojčane vrijednosti karakterističnih duljina su također u skladu s očekivanjima.

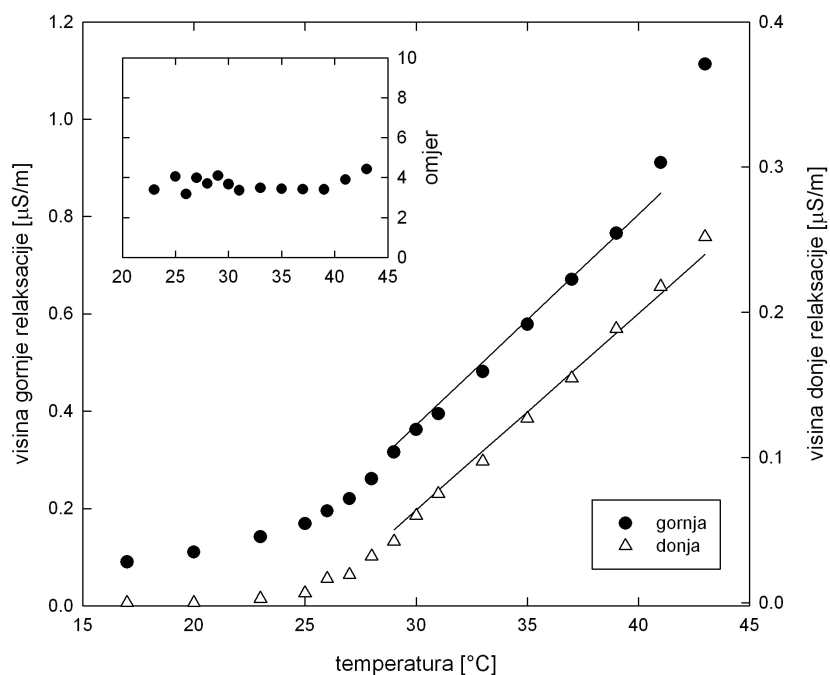
Dokaze valjanosti naših predodžbi o donjoj relaksaciji daje nam nekoliko eksperimentalnih rezultata. Možda najvažniji su njeno gašenje u gel-stanju i vrlo veliko relaksacijsko vrijeme

reda 1 s. Zbog relativno malog broja točaka i visina relaksacije manjih od 1% ukupne vodljivosti fitanje ponekad nije davalo pouzdane vrijednosti relaksacijskih vremena. Postoji jasno vidljiv porast s koncentracijom, dok je ovisnost o temperaturi slabija, ali sličnog trenda. Ovisnost visine o temperaturi je međutim mnogo drastičnija i njome ćemo se još pozabaviti kasnije. Koristeći tipične eksperimentalne vrijednosti za visinu od oko $0.2 \mu\text{S/m}$ na 40°C možemo iz usporedbe s teorijskim predviđanjem zaključiti da na toj temperaturi u vođenju sudjeluje nešto manje od četvrtine lanaca. Ta brojka je prilično osjetljiva i na efektivni naboj koji ne možemo dovoljno pouzdano procijeniti, tako da bi postotak mogao biti veći. U svakom slučaju smatramo da je slaganje s primitivnim modelom vodljivosti zadovoljavajuće, a u prilog mu ide i ovisnost visine relaksacije o koncentraciji, također na 40°C (Slika 22 desno). Dominantna ovisnost je po teoriji linearna, dok se mjerenja se skaliraju kao $c^{0.9}$ što je uz danu razinu greške gotovo linearno. Odstupanje je vjerojatno uzrokovano ovisnošću efektivne difuzijske konstante o koncentraciji iako relaksacijska vremena naznačuju da je ona prilično blaga.

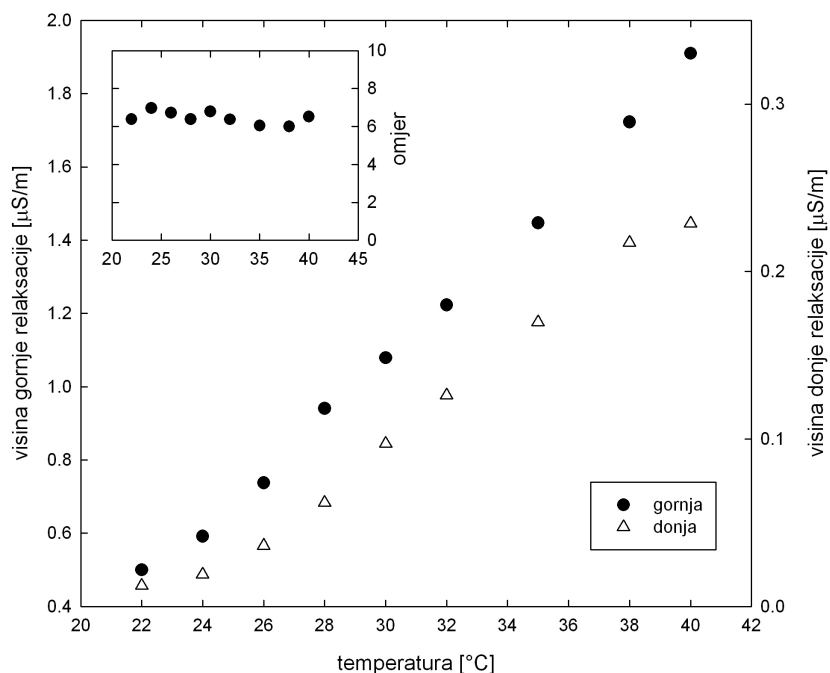


Slika 23: Spektri vodljivosti na različitim temperaturama za masene koncentracije 4.5% (lijevo) i 3% (desno).

Sada se možemo pozabaviti mjerenjima dielektričnih spektara u ovisnosti o temperaturi. Spektri za koncentracije 4.5% i 3% se nalaze na Slici 23. Ostale koncentracije izgledaju slično; bitne ovisnosti parametara o koncentraciji ćemo kasnije komentirati sa zasebnim grafovima. Na



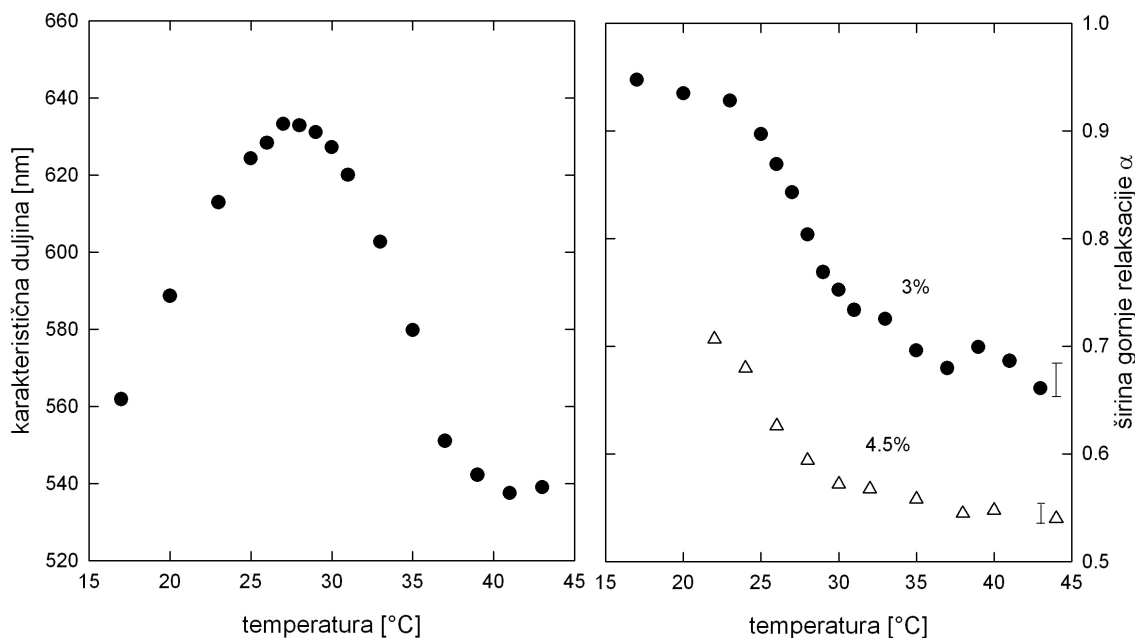
Slika 24: Usporedba visina relaksacija o temperaturi za koncentraciju 3%. ● – lijeva y os, △ – desna y os



Slika 25: Usporedba visina relaksacija o temperaturi za koncentraciju 4.5%. ● – lijeva y os, △ – desna y os

višim temperaturama jasno se vide dvije relaksacije, dok se sa snižavanjem temperature donja relaksacija gotovo u potpunosti gasi. Omjer razlike vodljivosti prema asimptotskoj vodljivosti i kvadrata asimptotske vodljivosti crtan je samo radi bolje preglednosti grafova i nema neko dub-

lje značenje. Ako promotrimo ovisnosti visina relaksacija o temperaturi (Slika 24 i 25) odmah uočavamo glavne trendove. Usporedbom s faznim dijagramom zaključujemo da u sol stanju obje relaksacije rastu približno linearno s temperaturom, dok ispod temperature geliranja donja relaksacija nestaje, a gornja pada na gotovo konstantnu vrijednost. Kada od visine gornje relaksacije oduzmemo tu konstantu i podijelimo visinom donje relaksacije, na čitavom temperaturnom rasponu dobivamo približno isti broj (umetnuti grafovi na Sl. 24 i 25). To je u skladu s idejom da donja relaksacija direktno mjeri broj pokretljivih lanaca, dok je gornja relaksacija znatno viša ako lanci fluktuiraju, jer im je efektivna površina koju ioni vide tada veća. Gornja relaksacija će i dalje postojati kad je većina lanaca 'smrznuta' jer efektivne površine i dalje ostaju konačne, no vidimo da je efekt oslobađanja lanaca prilično velik. Na temperaturama iznad 40 °C počinje omjer dviju visina odstupati od konstante; to možemo objasniti uzimajući u obzir da jačina fluktuacija raste s temperaturom (a donja relaksacija nam mjeri samo broj; formalno gledano do toga dolazi zbog faktora kT u vezi između fluktuacije i odziva). Taj rast je dosta sporiji od rasta broja pokretljivih lanaca blizu temperature geliranja pa je njegov efekt prekriven ispod 40 °C. No kako povećavamo temperaturu očekujemo sve veće odstupanje od konstantnog omjera, na što naša mjerenja i ukazuju.

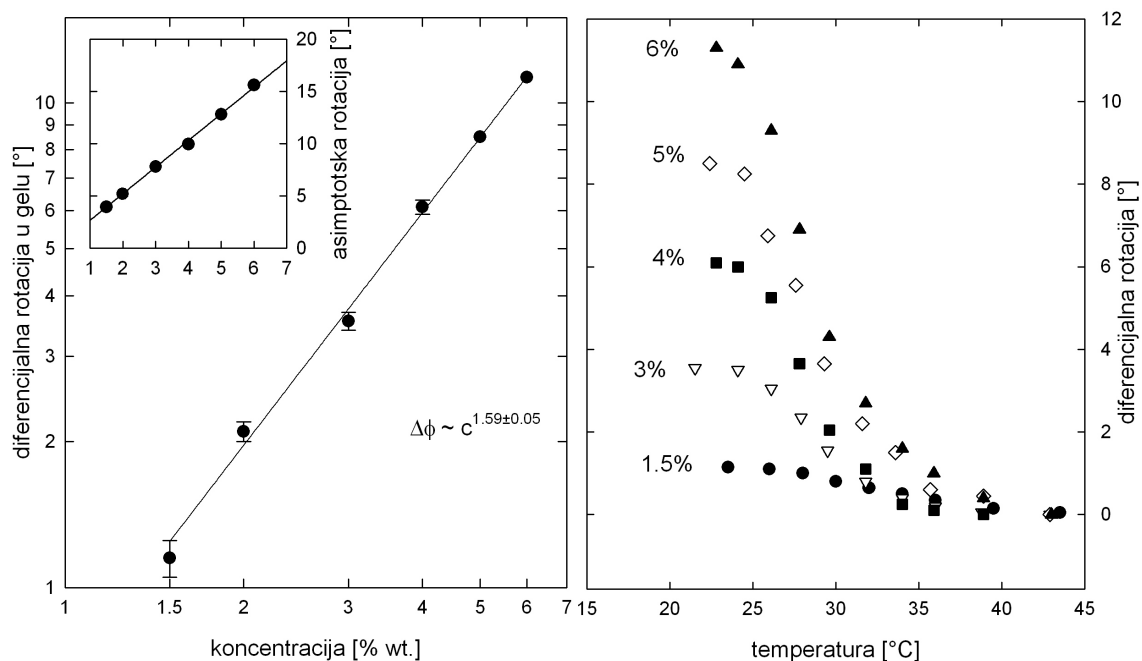


Slika 26: Karakteristična duljina za koncentraciju 3% (lijevo) i širina gornje relaksacije za koncentracije 3% i 4.5% (desno), pouzdanost mjerenja naznačena na desnoj strani.

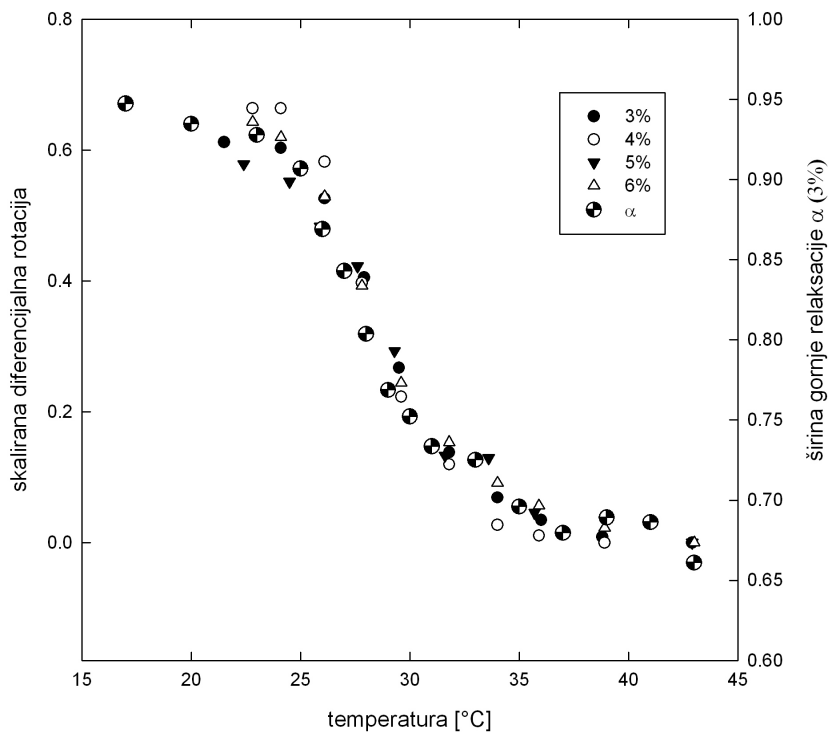
Približno linearno ponašanje visina relaksacije odmah iznad točke geliranja možemo koreli-

rati s ponašanjem viskoznosti[2], a obje pojave imaju jednostavno objašnjenje u našem modelu termički aktivirane difuzije. S porastom temperature sve veći broj lanaca ima dovoljnu termičku energiju da može početi šetati kroz brdoviti energetski krajolik - ta ovisnost ide kao $e^{-\frac{E_{akt}}{kT}}$, no u ograničenom temperaturnom rasponu koji promatramo, razvoj oko temperature prijelaza dat će u prvom redu linearnu ovisnost. To je dijelom posljedica činjenice da nam se prijelaz događa na visokoj temperaturi - tih deset stupnjeva je i dalje malo u usporedbi s 300K sobne temperature. Druga važna potvrda izloženog modela leži u ovisnosti širine gornje relaksacije o temperaturi (Slika 26 desno). To je veličina u kojoj se možda najjasnije vidi prijelaz, a izgled grafa objašnjavamo postojanjem velike disperzije udaljenosti između lanaca oko srednje udaljenosti (koju mjeri relaksacijsko vrijeme) kada lanci fluktuiraju. Smrzavanjem u stanje gela fluktuacije postaju znatno manje, a srednja duljina bolje definirana. Tumačenje ovisnosti relaksacijskog vremena o temperaturi je donekle otežano, jer i koeficijent difuzije ovisi o temperaturi pa ne možemo u skaliranju $L^2 = D\tau$ jednostavno upotrijebiti tabeliranu vrijednost za D . Ako kao mjeru ovisnosti D o temperaturi uzmemo produkt asimptotske vodljivosti i temperature (imajući na umu Einsteinovu relaciju) dobiva se karakteristična duljina gotovo neovisna o temperaturi. Za koncentraciju 3% ona iznosi oko 520 nm, no pojavljuje se i potencijalno vrlo zanimljiv maksimum u blizini prijelaza (Slika 26 lijevo). U njega ne možemo biti sigurni jer ne znamo koliko je pouzdana proporcionalnost između D i $kT\sigma_{asm}$, no takvo ponašanje bi moglo biti u skladu s nekim mjerenjima raspršenja svjetlosti [10].

Da bismo usporedbu eksperimenta s modelom difuzije i ionske relaksacije učinili čvršćom, radili smo i mjerenja nelinearnosti odziva na većim poljima. Korištena struja je bila $50 \mu\text{A}$, što je vodilo na napone reda stotina mV. Radi vrlo dugog vremena filtriranja nismo bili u mogućnosti snimati čitave spektre u trećem harmoniku, već smo se ograničili na frekvenciju 11.1 Hz. Omjer izmjerenog odziva na trećem harmoniku i linearnog odziva za otopinu koncentracije 5% bio je 8×10^{-5} na 30°C ; naš teorijski izraz za taj omjer daje $\frac{1}{6} \left(\frac{eLE_0}{2kT} \right)^2$, gdje smo s E_0 označili amplitudu polja. Koristeći poznati napon, udaljenosti elektroda i otpor uzorka možemo iz teorijskog izraza izračunati duljinu L . Za navedenu koncentraciju dobiva se $L \sim 1000 \text{ nm}$ što se do na faktor tri slaže s od vrijednošću dobivenom iz relaksacijskog vremena. Također je važno reći da je odziv na trećem harmoniku bio u fazi s pobudom i negativnog predznaka, kako model i predviđa. S obzirom na dobro slaganje numeričkih vrijednosti, možemo reći da se jednostavan model ionske relaksacije pokazao uspješnim.



Slika 27: Skaliranje optičke aktivnosti s koncentracijom na 22 °C (lijevo), umetnuti graf ukupna rotacija na 45 °C i optička aktivnost u ovisnosti o temperaturi (desno).



Slika 28: Skalirana optička aktivnost uz širinu gornje relaksacije

Sva niskofrekventna električna mjerenja nam govore o posljedicama udruživanja lanaca u superstrukturu, dok uzroke moramo tražiti na mikroskopskoj razini. Upravo zbog toga smo radili polarimetrijska mjerenja. Kao što smo vidjeli gore, iz mnogih prethodnih istraživanja[11, 22, 8] zaključeno je da geliranju prethodi nastanak lokalnih heliksa na proteinskim lancima čije udruživanje vodi nastanku superstrukture koju vidimo kao gel. U osnovi se proteinski sistem pokušava vratiti u prirodno stanje trostruke kolagenske uzvojnice, ali zbog nedostatka veza to uspijeva samo lokalno. Kako su svi heliksi orijentirani isto (lijevo), očekujemo optičku aktivnost otopine proporcionalnu broju heliksa. Naravno, takva aktivnost se pridodaje pozadinskoj aktivnosti zbog kiralnosti samih aminokiselina (koje su također lijeve).

Mjerenjem optičke aktivnosti u ovisnosti o temperaturi možemo direktno promatrati nastanak heliksa, dok nam relaksacije daju strukturalne posljedice njihovog nastanka i udruživanja. Slika 27 desno prikazuje optičku aktivnost u ovisnosti o temperaturi, za nekoliko koncentracija. Bitno je napomenuti da je na grafu crtana apsolutna vrijednost; smjer rotacije je zapravo negativan što odgovara predviđenoj lijevoj orijentaciji heliksa. Oduzeta je i pozadinska rotacija, za koju smo našli da je linearna koncentraciji kako i treba biti (umetnuti graf na Slici 27 lijevo). Ako nacrtamo rotaciju u gelu u ovisnosti o koncentraciji (Slika 27 lijevo), dobivamo zanimljivo skaliranje oblika $\Delta\varphi \sim c^{1.59}$ koje znači da koncentracija ima znatan utjecaj na formiranje heliksa. Iako bi takva interpretacija zahtijevala detaljnije izračune i mjerenja, eksponent 1.6 vjerojatno možemo dovesti u vezu s fraktalnom dimenzijom samoizbjegavajućeg nasumičnog šetača u tri dimenzije koja iznosi 1.66[37]. Logično je pretpostaviti da je vjerojatnost nastanka heliksa veća na mjestu dodira dvaju lanaca zbog njihove interakcije; tada dobrom aproksimacijom smatramo da je broj heliksa proporcionalan broju dodirnih točaka lanaca u otopini. Ako čitavu strukturu lanaca gledamo kao veliki samoizbjegavajući nasumični hod možemo procijeniti da će se broj točaka u kojima šetač dolazi u blizinu svoje putanje (dovoljno blizu da je mora izbjeći) približno skalirati isto kao i broj koraka šetača. Iz toga slijedi skaliranje broja dodirnih točaka s koncentracijom oblika $c^{1.66}$. Osim izmjerene vrijednosti eksponenta, izloženoj pretpostavci ide u prilog i neovisnost eksponenta o temperaturi (koju dokazuje činjenica da skalirane diferencijalne rotacije za različite koncentracije padaju na istu krivulju).

Temperaturna ovisnost je u skladu s prethodnim istraživanjima i generalnim pretpostavkama o procesu nastanka heliksa. Korelacija sa svojstvima relaksacija je međutim vrlo visoka, što dokazuje između ostalog Slika 28. Na njoj su prikazane skalirane temperaturne ovisnosti optičke

aktivnosti (svaka je dijeljena s $c^{1.59}$) i širina relaksacije za otopinu od 3%. Poklapanje je odlično i daje nam dodatnu potvrdu ispravnosti teorijskih ideja o podrijetlu relaksacija i procesu smrzavanja lanaca.

U svim mjerenjima vodljivosti se konzistentno pojavljuje činjenica da reološki sol-gel prijelaz predstavlja u bitnom tek početak procesa smrzavanja lanaca. Iz faznog dijagrama (Slika 19) vidimo da otopina prestaje teći nekoliko stupnjeva iznad temperature nestanka donje relaksacije, a znatnije odstupanje od linearne ovisnosti relaksacijskih visina o temperaturi počinje gotovo simultano s prestankom tečenja. Slična stvar se događa i na mikroskopskom nivou gdje se stvaraju heliksi na proteinskim lancima. Svi ti rezultati nas navode da definiramo područje sol-gel prijelaza od pojave viskoelastičnosti do nestanka (ili minimuma) donje relaksacije odnosno ustaljivanja optičke rotacije i širine relaksacija. To je područje širine od oko 5–10°C i možemo o njemu stvoriti sliku u kojoj je dovoljan broj lanaca međusobno povezan da postoji jedinstvena mreža koja ne može teći, no i dalje u otopini nalazimo relativno velik broj pokretljivih lanaca. Oni se s padom temperature postepeno pridružuju globalnoj mreži i nekoliko stupnjeva ispod reološkog prijelaza taj je proces završen. U temperaturnim ovisnostima visina relaksacija jasno se vidi promjena ponašanja upravo na točki reološkog prijelaza - tamo linearni rast postaje brži. Pokušali smo iz nekoliko točaka u tom rasponu izvući detaljnije ovisnosti o temperaturi i postoje naznake da se visine približno skaliraju kao $(T - T_s)^{1.5}$, gdje smo s T_s označili temperaturu na kojoj nestaje donja relaksacija. No da bi takav zaključak bio pouzdan potrebna su još preciznija i mnogo brojnija mjerenja u području prijelaza.

5 Zaključak

Koristeći električna i polarimetrijska mjerenja i teorijske ideje koje ta mjerenja podupiru možemo stvoriti zanimljivu sliku zbivanja u blizini i tijekom sol-gel prijelaza. Prije svega nam je cilj bio pokazati kako specifične mikroskopske konfiguracijske promjene na razini jednog lanca vode na pojavu globalne strukture s reološkim svojstvima gela. Najuočljivija promjena je upravo divergencija viskoznosti na temperaturi geliranja, ali nas je više zanimala dinamika u sol stanju koja vodi geliranju i procesi u gelu. Spajajući mikroskopski karakter polarimetrije i mogućnost promatranja dinamike lanaca pomoću relaksacija vodljivosti možemo reći da u temperaturnom području oko točke geliranja postoje tri područja.

U visokotemperaturnom dijelu iznad otprilike 45°C polarimetrija nam govori da heliksa gotovo nema, viskoznost se ponaša normalno aktivacijski i većina lanaca je pokretljiva. To je stanje koje je slično za sve otopine polielektrolita i vjerujemo da bi se s odgovarajućim eksperimentalnim postavom mogle vidjeti obje naše relaksacije, iako to ovisi i o naboju na lancima i pojavi jakog zasjenjenja zbog kondenzacije protuiona kojeg nema u našem sistemu. Kako spuštamo temperaturu počinju se stvarati heliksi i dolazi do nastanka nakupina. U tom pred-gel režimu vidimo nagli pad broja pokretnih lanaca i postupne promjene parametara gornje relaksacije poput širine i relaksacijskog vremena. Kad broj povezanih lanaca naraste preko nekog kritičnog broja nastaje superstruktura u čitavoj otopini i to je reološki sol-gel prijelaz. Prijelaz je vrlo sličan perkolaciji, ali postoje i neke razlike, prije svega temperaturni karakter pojave. Uobičajeno se perkolaciju gleda kao prijelaz s kritičnom koncentracijom, bez temperaturnih efekata. U našem sustavu su za nastanak superstrukture odgovorni heliksi, no intrinzično nemamo njihovu konstantnu koncentraciju, već ona raste s padom temperature. Tako možemo reći da nam ustvari temperatura uzrokuje perkolaciju.

Najzanimljivije nam se ipak pokazalo treće područje, ispod temperature geliranja do otprilike 22°C . Iako je otopina u stanju gela, dinamika lanaca ne umire odmah nego postoji znatno područje gašenja. Njega se jasno vidi i u mjerenjima relaksacija i u polarimetriji te nismo nigdje dosad u literaturi pronašli karakterizaciju tog područja. Zbog velikih eksperimentalnih poteškoća tamo je bilo najteže raditi mjerenja relaksacija.

Zaključujemo da smo spajanjem dobro proučenog i očekivanog efekta optičke aktivnosti sa

novim rezultatima niskofrekventnih dielektričnih relaksacija u otopini želatine uspjeli doći do dobrog iako ponešto grubog modela vodljivosti promatranog sistema i zanimljivih informacija o zbivanjima tokom sol-gel prijelaza. Različite tehnike mogle bi poslužiti za profinjavanje modela i dobivanje dodatnih podataka; prije svega tu su nuklearna magnetska rezonancija vodika za promatranje difuzije vode kroz gel-strukturu, rentgenska difrakcija za proučavanje heliksa u otopini i visokofrekventna električna mjerenja za daljnje istraživanje procesa vodljivosti po lancima. Uz poboljšanje postojeće niskofrekventne ćelije, sva ta mjerenja planiramo napraviti da bismo dobili potpunu sliku o nedovoljno istraživanom efektu sol-gel prijelaza želatine. Bolje razumijevanje dinamike lanaca i naboja u blizini prijelaza može biti značajno i u mnogim primjenama, od kapsula za lijekove do brzo rastuće industrije gel-elektrolita za baterije.

Zahvale

Zahvaljujemo se dr. sc. Silviji Tomić i dr. sc. Ivici Živkoviću s Instituta za fiziku na posuđenoj opremi te dr. sc. Tomislavu Vuletiću na pristupu laboratoriju i konstruktivnim diskusijama. Također puno hvala dr. sc. Borisu Rakvinu i dr. sc. Marini Ilakovac-Kveder s Instituta Ruđer Bošković te dr. sc. Dominiku Cinčiću sa Zavoda za opću i anorgansku kemiju Kemijskog odsjeka PMF-a na vremenu koje su izdvojili na nas. Prof. Dubravki Turčinović iz V. gimnazije u Zagrebu hvala na posudbi polarimetra, a prof. dr. sc. Miroslavu Požeku s Fizičkog odsjeka PMF-a zahvaljujemo na posuđenoj opremi i savjetima. Na kraju od srca zahvaljujemo našem mentoru doc. dr. sc. Mariju Basletiću na svemu što je učinio - na svom uloženom vremenu, trudu, strpljenju, kritikama te savjetima, kojima nas je usmjeravao od samog početka do kraja izrade ovog rada.

Literatura

- [1] P. J. Lu, E. Zaccarelli, F. Ciulla, A. B. Schofield, F. Sciortino, and D. A. Weitz, “Gelation of particles with short-range attraction,” *Nature*, vol. 453, pp. 499–503, 2008.
- [2] C. W. N. Cumper and A. E. Alexander, “The viscosity and rigidity of gelatin in concentrated aqueous systems,” *Australian Journal of Scientific Research, Series A*, vol. 5, pp. 146–153, 1951.
- [3] H. B. Bohidar and S. S. Jena, “Study of sol-state properties of aqueous gelatin solutions,” *Journal of Chemical Physics*, vol. 100, pp. 6888–6895, 1994.
- [4] F. Cardinaux, T. Gibald, A. Stradner, and P. Schurtenberger, “Interplay between spinodal decomposition and glass formation in proteins exhibiting short-range attractions,” *Physical Review Letters*, vol. 99, p. 118301, 2007.
- [5] R. Blinc, V. Rutar, I. Zupani, A. Zidanek, G. Lahajnar, and J. Slak, “Proton NMR relaxation of adsorbed water in gelatin and collagen,” *Applied Magnetic Resonance*, vol. 9, pp. 193–216, 1995.
- [6] P. C. Griffiths, C. C. Rowlands, P. Goyffon, A. M. Howe, and B. L. Bales, “EPR insights into aqueous solutions of gelatin and sodium dodecyl sulfate,” *Journal of the Chemical Society*, vol. 2, pp. 2473–2477, 1997.
- [7] H. B. Bohidar and S. S. Jena, “Light scattering observation of spinodal line of gelatin gels,” *Journal of Chemical Physics*, vol. 98, pp. 3568–3570, 1993.
- [8] H. B. Bohidar and S. S. Jena, “Kinetics of sol-gel transition in thermoreversible gelation of gelatin,” *Journal of Chemical Physics*, vol. 98, pp. 8970–8977, 1993.
- [9] T. Matsunaga and M. Shibayama, “Gel point determination of gelatin hydrogels by dynamic light scattering and rheological measurements,” *Physical Review E*, vol. 76, p. 030401, 2007.
- [10] T. Tanaka, S. Ishiwata, and C. Ishimoto, “Critical behavior of density fluctuations in gels,” *Physical Review Letters*, vol. 38, pp. 771–774, 1977.
- [11] H. B. Bohidar, S. S. Jena, S. Maity, and A. Saxena, “Dielectric behaviour of gelatin solutions and gels,” *Colloid Polymer Science*, vol. 276, pp. 81–86, 1998.

- [12] D. F. Vieira, C. O. Avellaneda, and A. Pawlicka, “Conductivity study of gelatin-based polymer electrolyte,” *Electrochimica Acta*, vol. 53, pp. 1404–1408, 2007.
- [13] G. I. Tseretely and O. I. Smirnova, “DSC study of melting and glass transition in gelatins,” *Journal of Thermal Analysis*, vol. 38, pp. 1189–1201, 1992.
- [14] A. Cesaro, F. Cuppo, D. Fabri, and F. Sussich, “Thermodynamic behaviour of mixed bi-polymers in solution and in gel phase,” *Thermochimica Acta*, vol. 328, pp. 143–153, 1999.
- [15] R. Hayakawa, H. Kanda, M. Sakamoto, and Y. Wada, “New apparatus for measuring the complex dielectric constant of a highly conductive material,” *Japanese Journal of Applied Physics*, vol. 14, pp. 2039–2052, 1975.
- [16] J. B. Bates, Y. T. Chu, and W. T. Stribling, “Surface topography and impedance of metal-electrolyte interfaces,” *Physical Review Letters*, vol. 60, pp. 627–630, 1988.
- [17] H. Sanabria and J. H. Miller, “Relaxation processes due to the electrode-electrolyte interface in ionic solutions,” *Physical Review E*, vol. 74, p. 051505, 2006.
- [18] S. Tomić, S. Dolanski-Babić, T. Vuletić, S. Krča, D. Ivanković, L. Griparić, and R. Podgornik, “Dielectric relaxation of DNA aqueous solutions,” *Physical Review E*, vol. 75, p. 021905, 2007.
- [19] C. Prodan, F. Mayo, J. R. Claycomb, and J. H. Miller, “Low-frequency, low-field dielectric spectroscopy of living cell suspensions,” *Journal of Applied Physics*, vol. 95, pp. 3754–3757, 2004.
- [20] H. P. Schwan and C. D. Ferris, “Four-electrode null techniques for impedance measurement with high resolution,” *Review of Scientific Instruments*, vol. 39, pp. 481–485, 1968.
- [21] J. C. Bernengo and M. Hanss, “Four-electrode, very-low-frequency impedance comparator for ionic solutions,” *Review of Scientific Instruments*, vol. 47, pp. 505–508, 1976.
- [22] F. Tanaka, “Thermoreversible gelation strongly coupled to coil-to-helix transition of polymers,” *Colloid and Surfaces B*, vol. 38, pp. 111–114, 2004.
- [23] P.-G. de Gennes, *Scaling Concepts in Polymer Physics*. Cornell University Press, Ithaca and London, 1979.

- [24] A. V. Dobrynin, R. H. Colby, and M. Rubinstein, “Scaling theory of polyelectrolyte solutions,” *Macromolecules*, vol. 28, pp. 1859–1871, 1995.
- [25] Y. Pineiro, M. A. Lopez-Quintela, J. Rivas, and D. Leisner, “Percolation threshold and scattering power law of gelatin gels,” *Physical Review E*, vol. 79, p. 041409, 2009.
- [26] S. Dolenski Babić, *Električna i dielektrična svojstva vodenih otopina genomske deoksiribonukleinske kiseline*. PhD thesis, Sveučilište u Zagrebu, 2008.
- [27] E. Trizac and G. Tellez, “Onsager-Manning-Oosawa condensation phenomenon and the effect of salt,” *Physical Review Letters*, vol. 96, p. 038302, 2006.
- [28] J. E. Eastoe, “The amino acid composition of mammalian collagen and gelatin,” *Biochemical Journal*, vol. 61, pp. 589–600, 1955.
- [29] B. Alberts, *Molecular Biology of the Cell*. Garland Science, New York, 2002.
- [30] A. S. Grove, *Physics and Technology of Semiconductor Devices*. John Wiley and Sons, Inc., New York, 1967.
- [31] D. R. Lide, ed., *CRC Handbook of Chemistry and Physics, 84th Edition*. CRC Press, 2004.
- [32] L. D. Landau and E. M. Lifshitz, *Statistical Physics, vol. 1*. Pergamon Press, 1980.
- [33] F. Tanaka, “Thermoreversible gelation is a Bose-Einstein condensation,” *Physical Review E*, vol. 73, p. 061405, 2006.
- [34] B. A. Mazzeo and A. J. Flewitt, “Two- and four-electrode, wide-bandwidth dielectric spectrometer for conductive liquids: theory, limitations, and experiments,” *Journal of Applied Physics*, vol. 102, pp. 104–106, 2007.
- [35] R. A. Dunlap, *Experimental Physics: Modern Methods*. Oxford University Press, New York, 1988.
- [36] H. E. Stanley, “Application of fractal concepts to polymer statistics and to anomalous transport in randomly porous media,” *Journal of Statistical Physics*, vol. 36, pp. 843–860, 1984.
- [37] H. J. Stapleton, J. P. Allen, C. P. Flynn, D. Stinson, and S. R. Kurtz, “Fractal form of proteins,” *Physical Review Letters*, vol. 45, pp. 1456–1459, 1980.

Sažetak

Dinamika sol-gel prijelaza želatine

Damjan Pelc, Sanjin Marion, Saša Petrović

U ovom radu smo korištenjem niskofrekventne dielektrične spektroskopije i mjerenjem optičke aktivnosti karakterizirali dinamiku tijekom sol-gel prijelaza želatine. U spektrima vodljivosti našli smo dvije dosad neopažene relaksacije koje objašnjavamo efektima na razini udaljenosti polimernih lanaca, dok mjerenja optičke aktivnosti daju vezu s mikroskopskim pojavama na samim lancima. U blizini temperature geliranja smo našli tri temperaturna područja: (i) visokotemperaturni dio, (ii) područje otprilike 10°C iznad temperature geliranja, u kojem počinje spajanje lanaca u veću strukturu i (iii) područje do otprilike 10°C ispod temperature geliranja u kojem globalna struktura postoji, ali još postoje slobodni lanci. Daljnjim snižavanjem temperature gotovo svi lanci se spajaju na globalnu strukturu. Takva općenita slika je u skladu s prijašnjim idejama o procesu geliranja, no pruža i nove informacije poput detaljnijeg opažanja područja (iii).

Ključne riječi: želatina, sol-gel prijelaz, dielektrična spektroskopija, polarimetrija

Summary

Dynamics of the sol-gel transition in gelatin

Damjan Pelc, Sanjin Marion, Saša Petrović

In this paper we present the characterisation of the dynamics during the sol-gel transition of gelatin, probed by dielectric spectroscopy and polarimetry. In the conductivity spectra we have observed two relaxations which to our knowledge weren't seen before; they are shown to be effects on the scale of distances between polymer chains. Polarimetric measurements give us a connection with microscopic processes on the chains themselves. Near the gelation temperature we have found three distinct regions: (i) the high-temperature range, (ii) a region cca. 10°C above the gelation temperature, where the aggregation of chains sets in, and (iii) a region cca. 10°C below the gelation temperature where a global structure exists, but free chains can still be found. By further lowering the temperature almost all chains join the structure. This general picture is in agreement with previous models, but also provides new information such as a detailed examination of region (iii).

Keywords: gelatin, sol-gel transition, dielectric spectroscopy, polarimetry

Kratak životopis autora

Sanjin Marion

Rođen je 8. srpnja 1987. godine u Rijeci gdje je 2006. god. završio Gimnaziju Andrije Mohorovičića. Trenutno je student četvrte godine istraživačkog studija fizike s prosjekom ocjena 4.97.

Damjan Pelc

Rođen je 28. svibnja 1987. godine u Zagrebu gdje je 2006. god. završio V. gimnaziju. Trenutno je student četvrte godine istraživačkog studija fizika s prosjekom ocjena 4.97.

Saša Petrović

Rođena je 15. lipnja 1989. godine u Zagrebu gdje je 2007. god. završila XV. gimnaziju. Trenutno je studentica treće godine molekularne biologije s prosjekom ocjena 4.72.