

Член-корреспондент НАН Украины Ю. И. Тарасевич,  
М. Ю. Трифонова, А. И. Маринин, С. А. Доленко,  
М. Л. Малышева

## Адсорбционный подход к определению размера и массы молекул гуминовых кислот

*Проведено исследование состояния гумата натрия фирмы “Aldrich” в водном растворе и на твердых поверхностях с применением комплекса методов. Показано, что гумат натрия в водном растворе при нейтральном рН и низкой ионной силе находится в ассоциированном состоянии. Установлено, что данный препарат содержит молекулы массой 1, 3–6 и 15 кДа. Предложен новый адсорбционный подход к определению размера и массы молекул гуминовых кислот; диаметр наименьшей молекулы равен 2,3 нм, а наибольшей — 9,0 нм.*

Гуминовые кислоты (ГК) играют исключительную роль во многих геохимических, биологических и биохимических процессах, а также используются человеком в различных практических и научных целях. Поэтому в научной литературе уделяется много внимания разностороннему изучению ГК. Однако многие фундаментальные вопросы, в частности о молекулярной природе ГК, все еще остаются открытыми. При этом литературные данные о молекулярных массах и размерах молекул ГК весьма противоречивы. Так, молекулярная масса ГК фирмы “Aldrich”, определенная гельпроникающей хроматографией, по разным источникам составляет от 1 до 100 кДа (см., например, [1, 2]). Причем, в научной публикации [2] полученное значение средней молекулярной массы (21 кДа) подтверждено методом вискозиметрии. Согласно другому исследованию [3], этот же препарат путем последовательной ультрафильтрации разделили на две фракции: 30–100 и >100 кДа. По-видимому, указанный разброс молекулярных масс связан не только с возможной неоднородностью данного препарата, но и с условиями эксперимента. Ранее [4] было показано, что ионная сила раствора, рН и заряд катиона влияют на кажущуюся молекулярную массу ГК, рассчитанную из хроматограмм.

Аналогичная картина складывается и в отношении размера молекул ГК. Полученные различными методами [5–8] величины варьируют в пределах от 5 до 850 нм. При этом часто нет уверенности, что измеренные в том или ином исследовании частицы ГК являются именно отдельными молекулами, а не надмолекулярными образованиями. Очевидно, что определение размера молекул, также как и молекулярной массы ГК, осложнено следующим: для гуминовых кислот характерны явления самоорганизации [9, 10]. В предыдущей работе [11] нами показано, что уже при концентрациях на 3–4 порядка ниже критической концентрации мицеллообразования (ККМ) ГК способны связывать анионные органические соединения; это объяснено образованием надмолекулярных структур. Таким образом, в настоящее время остаются актуальными исследования, посвященные изучению состояния ГК в растворах и на твердых поверхностях, молекулярного состава и основных характеристик молекул ГК. В настоящем сообщении предложен разработанный нами адсорбционный метод определения массы и размера молекул ГК.

---

© Ю. И. Тарасевич, М. Ю. Трифонова, А. И. Маринин, С. А. Доленко, М. Л. Малышева, 2014

**Экспериментальная часть.** В процессе исследования использовался препарат натриевой соли ГК фирмы “Aldrich” без дополнительной очистки, водные растворы которого готовили на дистиллированной воде без добавления электролитов.

Изучение адсорбции гумата натрия (ГNa) из очень разбавленных растворов проводили на каолините Глуховского месторождения (Сумская обл., Украина), отличающемся высокой чистотой (содержание минерала в пробе 99%), который был исследован ранее [12]. Воздушно сухие навески каолинита массой 0,1 г фракции <0,2 мм заливали 50 см<sup>3</sup> водных растворов ГNa, pH 6,0. После двенадцатичасового встряхивания дисперсий твердую фазу отделяли от жидкой путем центрифугирования со скоростью 8000 об/мин. Содержание ГNa в водной фазе устанавливали спектрофотометрическим методом при  $\lambda = 260$  нм.

Размер и электрокинетический потенциал частиц ГNa в водном растворе определяли соответственно методами динамического и электрофоретического светорассеяния на анализаторе Zetasizer (Malvern Instruments, Великобритания) с He-Ne лазером ( $\lambda = 633$  нм, максимальная мощность 4 мВт) при использовании программного обеспечения Vertion 6.20. Измерения проводили в диапазоне концентраций от 0,32 мг/дм<sup>3</sup> до 20 г/дм<sup>3</sup> при температуре 25 °С, pH 6,0. Каждое измерение повторяли пять раз, полученные результаты усредняли для дальнейшего анализа.

Электронные микрофотографии ГNa получали при помощи трансмиссионного (просвечивающего) электронного микроскопа JEM JEOL 1230 (Япония) при ускоряющем напряжении 100 кВ и цифровой фотокамеры Gatan. Для приготовления препаратов на поверхность медной бленды, покрытой формваровой пленкой, предварительно напыленной углеродом, наносили фиксированный объем (50 мм<sup>3</sup>) раствора ГNa концентрации 0,32 и 20,16 мг/дм<sup>3</sup>, pH 6,0. Через 10 мин основную часть раствора удаляли с поверхности бленды фильтровальной бумагой, а остаток высушивали в потоке теплого воздуха.

Молекулярно-массовое распределение (ММР) ГNa проводили методом высокоэффективной жидкостной хроматографии на жидкостном хроматографе HP1050/DAD фирмы Hewlett-Packard в варианте гелепроникающей хроматографии на термостатируемой колонке фирмы Waters, заполненной гелевым сорбентом Ultrahydrogel<sup>TM</sup> 250 при 25 °С. Для проведения анализа 5 см<sup>3</sup> водного раствора ГNa концентрации 80 мг/дм<sup>3</sup> разбавляли 5 см<sup>3</sup> ацетонитрила и 5 см<sup>3</sup> натрий-фосфатного буфера (pH 8,6), затем аликвоту (1 см<sup>3</sup>) разбавляли подвижной фазой (натрий-фосфатного буфера с 10% объемных ацетонитрила, pH 6,6) в объемном отношении 1 : 1, и немедленно регистрировали хроматограмму.

**Результаты и их обсуждение.** Распределение частиц ГNa по размерам в водных растворах исследовано методом динамического светорассеяния в широком диапазоне концентраций ( $C_{\text{ГNa}}$ ) для правильной идентификации измеренных частиц гумата (табл. 1). Как показано в таблице, характерные размеры и объемное соотношение частиц гумата изменяются в зависимости от концентрации раствора. Самые крупные обнаруженные частицы (микрочастицы,  $d = 1,6\text{--}5,6$  мкм, см. табл. 1) являются мицеллами ГNa. На это указывает рост  $\zeta$ -потенциала (кривая 1 на рис. 1) и коррелирующее с ним падение поверхностного натяжения раствора [11] (см. кривую 2) с появлением и увеличением объемной доли таких частиц в растворе (см. табл. 1,  $C_{\text{ГNa}} \geq 20$  мг/дм<sup>3</sup>). Следует отметить, что микрочастицы (мицеллы) обнаруживаются в растворе ГNa уже при концентрации на 2,5 порядка ниже КKM (8 г/дм<sup>3</sup>).

Частицы субмикронных размеров являются, судя по всему, надмолекулярными ассоциатами гумата. Как индивидуальные молекулы можно было бы идентифицировать наименьшие обнаруженные в растворе частицы ГNa (наночастицы,  $d \geq 30$  нм, см. табл. 1). Однако

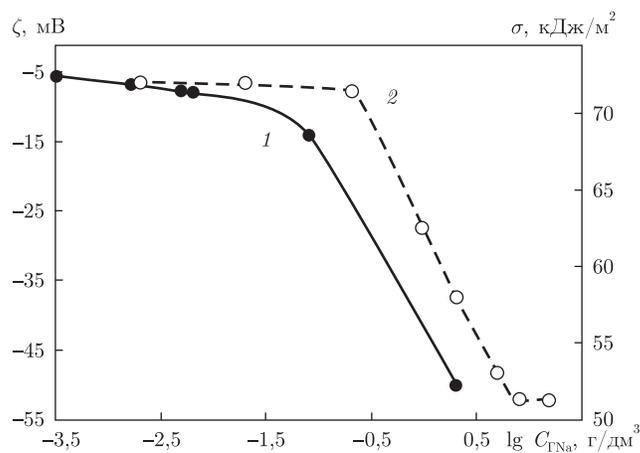


Рис. 1. Зависимости  $\zeta$ -потенциала поверхности частиц гумата натрия (1) и поверхностного натяжения раствора ГNa (2) от концентрации раствора

они, по-видимому, также представляют собой надмолекулярные ассоциаты ГК, поскольку имеют довольно большие для индивидуальных молекул размеры.

В подтверждение данного предположения на электронных микрофотографиях наряду с относительно крупными частицами размером от 40 нм до нескольких микрометров (см. рис. 2, а), при малых концентрациях исследуемого раствора ГNa видны частицы диаметром  $<10$  нм (см. рис. 2, б). Последние, очевидно, являются результатом диспергирования более крупных частиц (надмолекулярных ассоциатов) гумата при адсорбции на твердой поверхности бленды. Таким образом, к индивидуальным молекулам ГК следует относить частицы именно такого размера. Однако следует принимать во внимание, что при высушивании и вакуумировании образцов частицы ГNa могут несколько уменьшаться вследствие дегидратации связанной воды, а, с другой стороны, размеры частиц могут увеличиваться вследствие слипания. Указанные возможные осложнения, а также недостаточная четкость изображения при большом увеличении не позволяют по полученным микрофотографиям точно и достоверно определить размеры первичных частиц (молекул) гумата.

Более определенными являются данные о величинах молекулярных масс гумата, полученные хроматографическим методом. Необходимо учесть, что правильность определения молекулярных масс гумата зависит от величины ионной силы исследуемого раствора [4].

Таблица 1

$C_{\text{ГNa}},$ мг/дм <sup>3</sup>	Наночастицы		Субмикрочастицы		Микрочастицы	
	характерный диаметр частиц $d_1$ , нм	объемная доля частиц	характерный диаметр частиц $d_2$ , нм	объемная доля частиц	характерный диаметр частиц $d_3$ , нм	объемная доля частиц
0,32	30–55	0,37	202–467	0,63	—	—
3,20	35–80	0,33	254–492	0,67	—	—
4,80	32–64	0,31	273–409	0,69	—	—
6,40	30–116	0,29	277–582	0,71	—	—
20,16	60–100	0,32	217–312	0,65	4,9–5,6	0,03
80,00	44–149	0,42	256–536	0,54	5,0–5,6	0,04
2000	62–114	0,17	546–695	0,67	2,9–4,6	0,16
20000	56–95	0,06	269–540	0,13	1,6–4,3	0,81

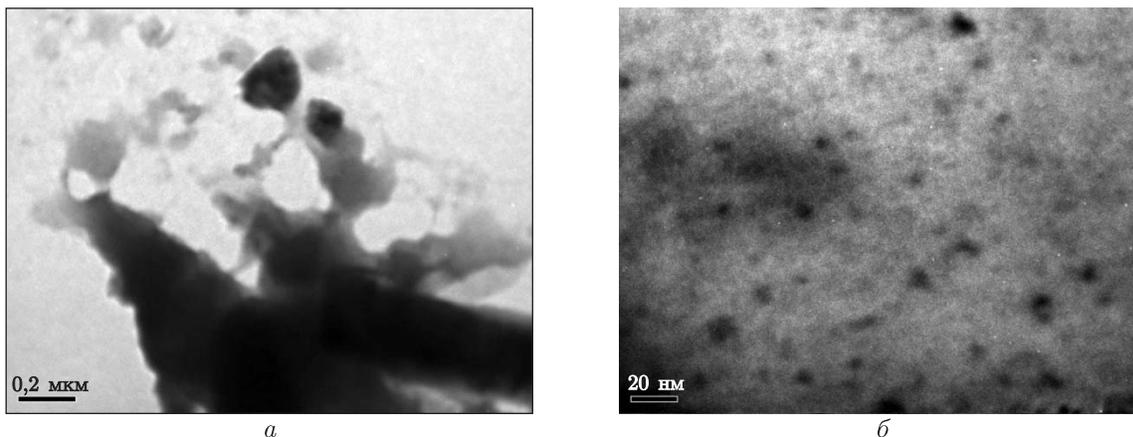
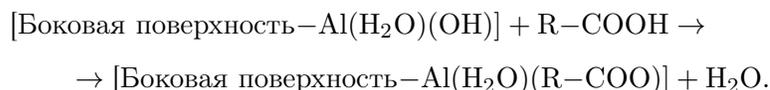


Рис. 2. Электронные микрофотографии ГNa при  $C_{\text{ГNa}}$ , мг/дм<sup>3</sup>: *a* – 0,32; *б* – 20,16

С целью подавления диссоциации кислотных групп и диспергации частиц гумата до молекулярного состояния в процессе пробоподготовки ГNa для проведения ММР в раствор были добавлены высокие концентрации электролитов, содержащие одновалентные катионы. Таким образом, на хроматограмме зафиксированы пики: 1 кДа, серия небольших пиков 3–6 кДа и 15 кДа. Очевидно, что такие молекулы должны быть относительно небольших размеров, что согласуется с данными электронной микроскопии (см. выше).

Принимая во внимание влияние пробоподготовки на результаты ММР, было проведено дополнительное исследование размера частиц ГNa методом динамического светорассеяния в условиях, аналогичных хроматографическому исследованию. Обнаруженные в таких условиях наименьшие частицы размером 2,3 нм вероятнее всего соответствуют молекулярной массе 1 кДа. Однако определить размеры молекул с большими массами таким способом не удалось.

Учитывая указанные выше проблемы с определением размера и массы первичных частиц (молекул) ГК, предлагаем новый, простой, не требующий использования дорогостоящего оборудования, адсорбционный подход. Он заключается в адсорбции ГК из очень разбавленных растворов на подложке с известной поверхностью, например, на каолините Глуховского месторождения, удельная поверхность боковых граней которого, по данным электронномикроскопических измерений [13], составляет  $S_{\text{б.г.}} = 6,0 \text{ м}^2/\text{г}$ . Гуминовые кислоты при нейтральном pH ведут себя как отрицательно заряженные (анионные) полиэлектролиты [14]. Поэтому при низких концентрациях адсорбцию ГК на каолините можно рассматривать как анионный обмен между OH-группами боковых граней минерала и кислотными группами ГК по схеме:



Начальный участок изотермы адсорбции ГNa на каолините приведен на рис. 3, *a*. Не вызывает сомнения, что в интервале низких концентраций (до резкого перегиба) будут адсорбироваться индивидуальные ионы ГNa, так как они обладают максимальным сродством к поверхности. Перегиб на изотерме (при  $C_{\text{ГNa}} \approx 5 \text{ мг/дм}^3$ ) указывает на начало адсорбции ассоциатов ГNa.

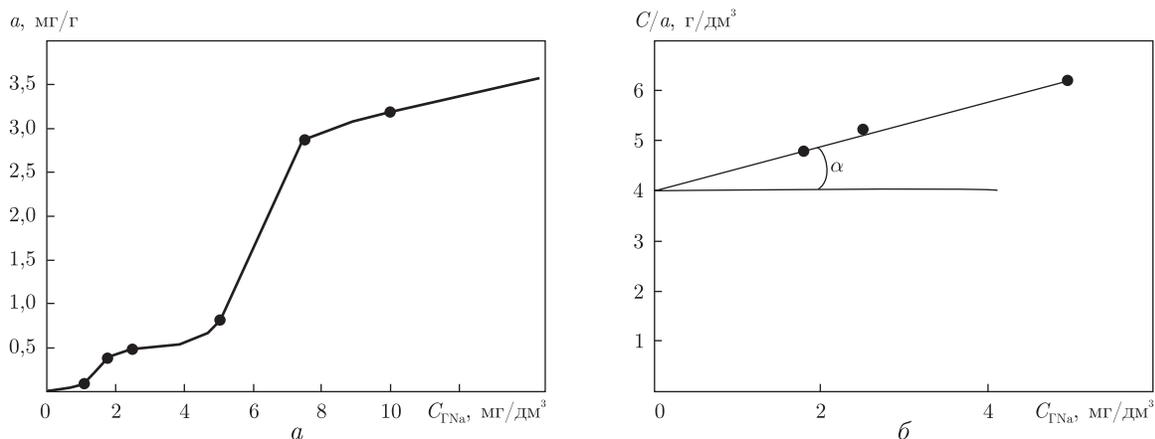


Рис. 3. Начальный участок изотермы адсорбции гумата натрия на каолините (а) и его обработка в рамках уравнения Ленгмюра (б),  $\alpha$  — угол наклона прямой к оси абсцисс

Обработка начального участка полученной изотермы в рамках уравнения Ленгмюра (см. рис. 3, б) позволяет рассчитать емкость условного монослоя:  $a_m = 1/\operatorname{tg} \alpha = 1/0,43 = 2,33$  мг/г. Концентрация ГNa на боковых гранях каолинита составляет:  $[C] = a_m/S_{6,г} = 2,33/6,0 = 0,388$  мг/м<sup>2</sup> =  $3,88 \cdot 10^{-22}$  г/нм<sup>2</sup>. На площадке  $S = 4,15$  нм<sup>2</sup>, соответствующей площади наименьшей частицы гумата ( $d = 2,3$  нм), адсорбируется  $P = [C] \cdot S = 3,88 \cdot 10^{-22} \cdot 4,15 = 16,1 \cdot 10^{-22}$  г гумата. Молекулярная масса такой молекулы ГК равна  $M = P \cdot N_A = 16,1 \cdot 10^{-22} \cdot 6,023 \cdot 10^{23} = 969,8$  г/моль или Да. Эта величина очень близка к наименьшей молекулярной массе 1 кДа, по данным ММР.

При обратном расчете масса одной молекулы при наибольшей молекулярной массе (15 кДа), по данным ММР, составляет:  $P = M/N_A = 15000/6,023 \cdot 10^{23} = 2490,45 \cdot 10^{-23}$  г; площадь, занимаемая такой молекулой на поверхности каолинита, —  $S = P/[C] = 2490,45 \times 10^{-23}/3,88 \cdot 10^{-22} = 64,19$  нм<sup>2</sup>; радиус молекулы —  $R = \sqrt{S/\pi} = \sqrt{64,19/3,14} = 4,52$  нм, диаметр молекулы —  $d = 9,04$  нм. Эти данные уточняют приблизительные размеры первичных частиц (молекул) ГNa, которые определяли с помощью трансмиссионного электронного микроскопа (<10 нм).

Таким образом, предложенный в работе адсорбционный подход позволяет с учетом размера молекулы гумата установить его молекулярную массу или, наоборот, из массы молекулы найти ее размер. Вычисленные размеры и молекулярные массы гумата натрия хорошо согласуются с данными, полученными хроматографическим и электронно-микроскопическим методами.

*Авторы выражают благодарность д-ру хим. наук М. В. Милюкину за проведение молекулярно-массового распределения образца гумата натрия и сотрудникам Института ботаники им. Н. Г. Холодного НАН Украины канд. биол. наук Д. А. Климчуку и Н. Н. Щербатюку за помощь в проведении электронно-микроскопического исследования ГNa.*

*Работа выполнена при поддержке целевой комплексной программы фундаментальных исследований “Фундаментальные проблемы создания новых веществ и материалов химического производства”.*

1. Ochs M., Cosovic B., Stumm W. Coordinative and hydrophobic interaction of humic substances with hydrophilic Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> and hydrophobic mercury surfaces // Geochim. Cosmochim. Acta. — 1994. — **58**, No 2. — P. 639–650.

2. Vermeer A. W. P., Koopal L. K. Adsorption of humic acids to mineral particles. 2. Polydispersity effects with polyelectrolyte adsorption // *Langmuir*. – 1998. – **14**, No 15. – P. 4210–4216.
3. Tanaka T. Functional groups and reactivity of size-fractionated Aldrich humic acid // *Thermochemica Acta*. – 2012. – **532**. – P. 60–64.
4. Murphy E. M., Zachara J. M., Smith S. C. Interaction of hydrophobic organic compounds with mineral-bond humic substances // *Environ. Sci. Technol.* – 1994. – **28**, No 7. – P. 1291–1299.
5. Osterberg R., Mortensen K. Fractal dimension of humic acids. A small angle neutron scattering study // *Eur. Biophys. J.* – 1992. – **21**, No 3. – P. 163–167.
6. Baalousha M., Motelica-Heino M., Galaup S., Coustumer P. L. Supramolecular structure of humic acids by TEM with improved sample preparation and staining // *Microscopy Res. and Techniq.* – 2005. – **66**, No 6. – P. 299–306.
7. Manning T. J., Bennett T., Milton D. Aggregation studies of humic acid using multiangle laser light scattering // *Sci. Total Environ.* – 2000. – **257**, No 2-3. – P. 171–176.
8. Kawahigashi M., Sumida H., Yamamoto K. Size and shape of soilhumic acids estimated by viscosity and molecular weight // *J. Colloid and Interface Sci.* – 2005. – **284**. – P. 463–469.
9. Piccolo A. The supramolecular structure of humic substances // *Soil. Sci.* – 2001. – **166**, No 11. – P. 810–832.
10. Baigorri B., Fuentes M., Gonzalez-Gaitano G., García-Mina J. M. Simultaneous presence of diverse molecular patterns in humic substances in solution // *J. Phys. Chem. B.* – 2007. – **111**, No 35. – P. 10577–10582.
11. Тарасевич Ю. И., Доленко С. А., Трифонова М. Ю., Алексеенко Е. Ю. Ассоциация и коллоидно-химические свойства гуминовых кислот в водных растворах // *Коллоид. журн.* – 2013. – **75**, № 2. – С. 230–236.
12. Тарасевич Ю. И. Строение и химия поверхности слоистых силикатов. – Киев: Наук. думка, 1988. – 248 с.
13. Русько Ю. А. Каолинизация и каолины Украинского щита. – Киев: Наук. думка, 1976. – 159 с.
14. Theng B. K. G. Formation and Properties of Clay-Polymer Complexes. – Amsterdam: Elsevier Sci., 2012. – 528 p.

*Институт коллоидной химии и химии воды  
им. А. В. Думанского НАН Украины, Киев  
Национальный университет пищевых  
технологий, Киев*

*Поступило в редакцию 17.03.2014*

**Член-корреспондент НАН України Ю. І. Тарасевич, М. Ю. Трифонова,  
А. І. Маринін, С. О. Доленко, М. Л. Малишева**

### **Адсорбційний підхід до визначення розміру та маси молекул гумінових кислот**

*Проведено дослідження стану гумату натрію фірми “Aldrich” у водному розчині і на твердих поверхнях із застосуванням комплексу методів. Показано, що гумат натрію у водному розчині при нейтральному рН та низькій іонній силі знаходиться в асоційованому стані. Встановлено, що даний препарат містить молекули масою 1, 3–6 та 15 кДа. Запропоновано новий адсорбційний підхід до визначення розміру та маси молекул гумінових кислот; діаметр найменшої молекули препарату дорівнює 2,3 нм, а найбільшій — 9,0 нм.*

Corresponding Member of the NAS of Ukraine **Yu. I. Tarasevich, M. Yu. Tryfonova, A. I. Marynin, S. A. Dolenko, M. L. Malysheva**

### **Adsorption approach to the determination of the size and weight of humic acid molecules**

*The investigation of the state of sodium humate from “Aldrich” in an aqueous solution and on solid surfaces is performed using a complex of methods. It is shown that sodium humate in an aqueous solution at neutral pH and low ionic strength is in the associated state. It is found that the substance under study contains molecules with mass of 1, 3–6, and 15 kDa. A new adsorption approach to the determination of the size and the weight of humic acid molecules is proposed. The diameter of the smallest molecule is 2.3 nm, and the largest – 9.0 nm.*