

Лекция 4

Молекулярно-массовый состав гуминовых веществ

И.В. Перминова

Химический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова



Содержание

- Понятие о молекулярной массе и молекулярно-массовом распределении
- Способы описания распределений
- Методы определения молекулярных масс
- Проблемы определения молекулярных масс гуминовых веществ



ПОНЯТИЕ МОЛЕКУЛЯРНОЙ МАССЫ

Молекулярная масса – это сумма масс атомов, входящих в состав данной молекулы, выраженная в атомных единицах массы (а.е.м.), или дальтонах (D).

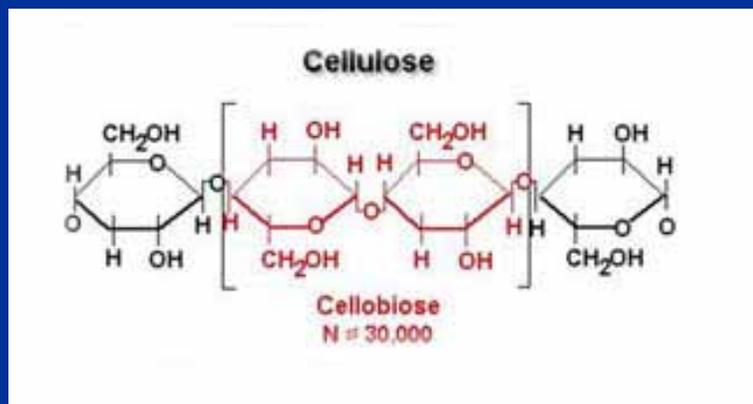
$$1 \text{ а.е.м.} = 1 \text{ D} = 1/12 \text{ массы атома } ^{12}\text{C} = 1,66057 \cdot 10^{-27} \text{ kg}$$

Абсолютная масса молекулы H_2O (ед. СИ):

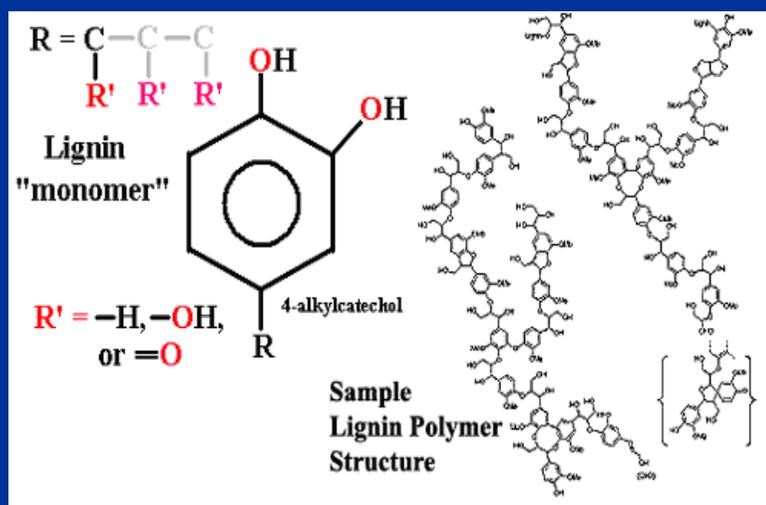
$$(1 \times 2 + 1 \times 16) \times 1,66057 \cdot 10^{-27} \text{ kg} = 29,89026 \cdot 10^{-27} \text{ kg}$$



МОЛЕКУЛЯРНАЯ МАССА МАКРОМОЛЕКУЛ



Понятие макромолекулы ввел Герман Штаудингер в 1920 г. – Лауреат Нобелевской премии 1953 г. за создание макромолекулярной химии

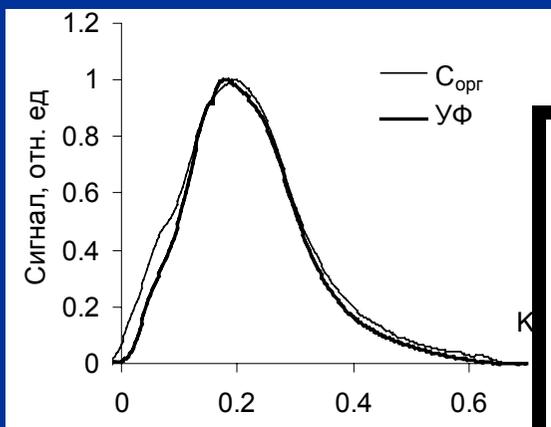


Все синтетические полимеры и многие природные полимеры (за исключением белков) представляют собой смесь молекул разного размера

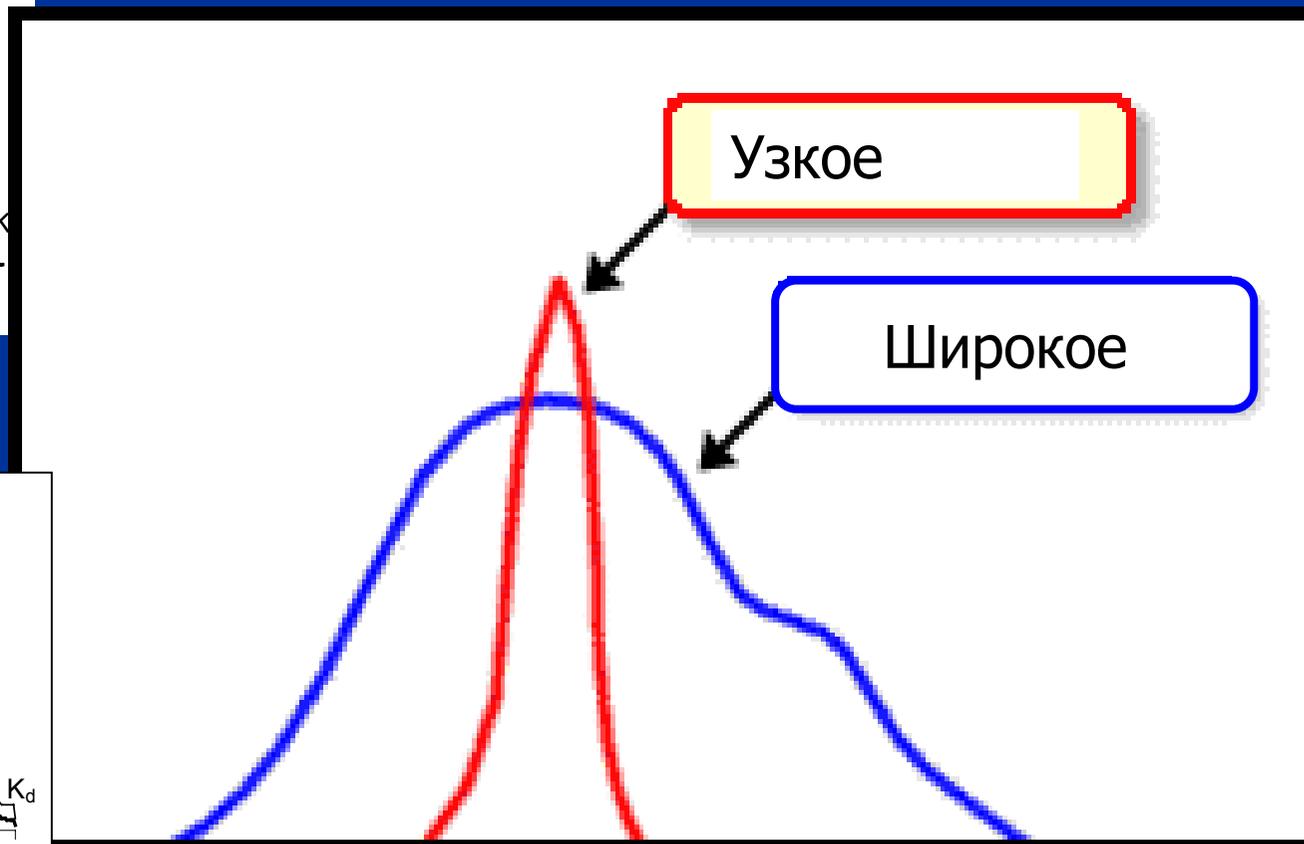
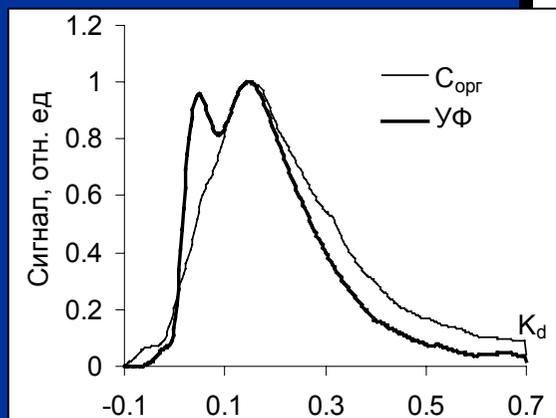
↓

Полимерам присуща полидисперсность

МОЛЕКУЛЯРНО-МАССОВОЕ РАСПРЕДЕЛЕНИЕ (ММР) ПОЛИМЕРОВ



ГВ



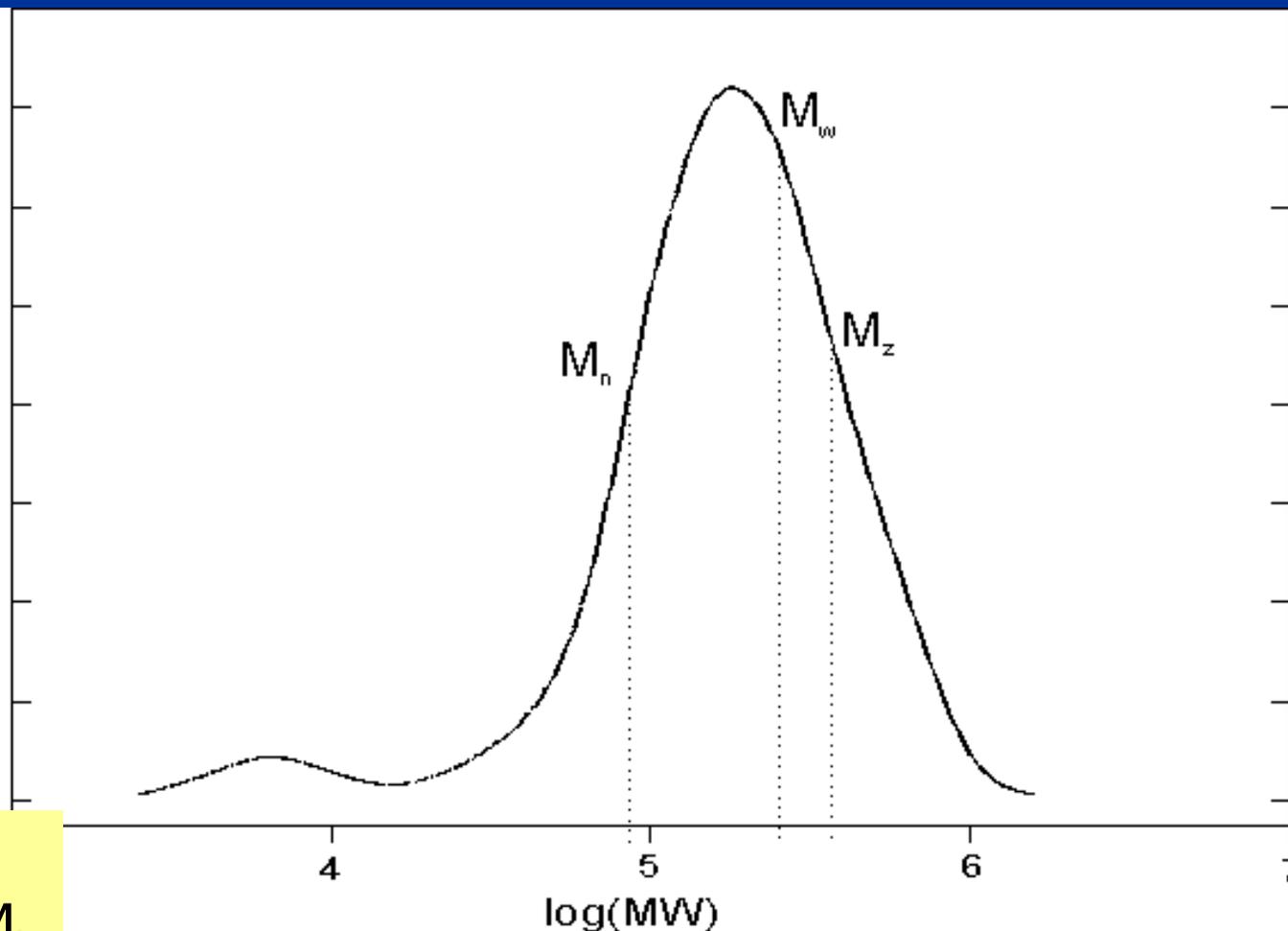
СРЕДНИЕ МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МАССЫ ПОЛИМЕРОВ

$$\bar{M}_n = \frac{\sum n_i M_i}{\sum n_i}$$

$$\bar{M}_w = \frac{\sum n_i M_i^2}{\sum n_i M_i}$$

$$\bar{M}_z = \frac{\sum n_i M_i^3}{\sum n_i M_i^2}$$

n_i – число i -тых
молекул с массой M_i



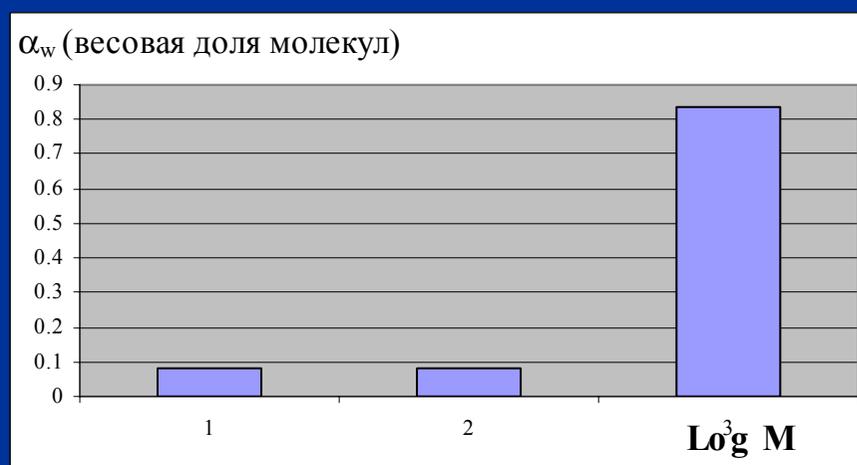
ПРИМЕРЫ РАСЧЕТА РАСПРЕДЕЛЕНИЙ МОЛЕКУЛЯРНЫХ МАСС



$$n_1 = 10; M_1 = 10$$

$$n_2 = 1; M_2 = 100$$

$$n_3 = 1; M_3 = 1000$$



ПРИМЕРЫ РАСЧЕТА СРЕДНИХ МОЛЕКУЛЯРНЫХ МАСС



$$n_1 = 10; M_1 = 10$$

$$n_2 = 1; M_2 = 100$$

$$n_3 = 1; M_3 = 1000$$

Среднечисленная молекулярная масса (M_n):

$$\bar{M}_n = \frac{10 \times 10 + 1 \times 100 + 1 \times 1000}{10 + 1 + 1} = 100$$

$$\bar{M}_n = \frac{\sum n_i M_i}{\sum n_i}$$

Средневесовая молекулярная масса (M_w):

$$M_w = \frac{10 \times 10^2 + 1 \times 100^2 + 1 \times 1000^2}{10 \times 10 + 1 \times 100 + 1 \times 1000} = 842.5$$

$$\bar{M}_w = \frac{\sum n_i M_i^2}{\sum n_i M_i}$$



ОПРЕДЕЛЕНИЕ СРЕДНЕЧИСЛЕННОЙ МОЛЕКУЛЯРНОЙ МАССЫ

M_n : зависит от общего числа молекул, а не от их размера =>
очень чувствительна к присутствию низкомолекулярных молекул
 M_n : определяют путем измерения *КОЛЛИГАТИВНЫХ СВОЙСТВ*

Коллигативные свойства: http://www.physchem.chimfak.rsu.ru/Source/PCC/Solutions_2.htm

Зависят от количества частиц в растворе

Используются для определения M_n

Методы, основанные на законах Рауля и Вант-Гоффа:

По давлению пара насыщенных растворов

По температуре замерзания (*Криоскопия*)

По температуре кипения (*Эбулиоскопия*)

По осмотическому давлению (*Осмометрия*)



ОПРЕДЕЛЕНИЕ СРЕДНЕЧИСЛЕННЫХ МОЛЕКУЛЯРНЫХ МАСС

Измерение давления насыщенного пара

✳️ (справедливо для неэлектролитов и разбавленных растворов)

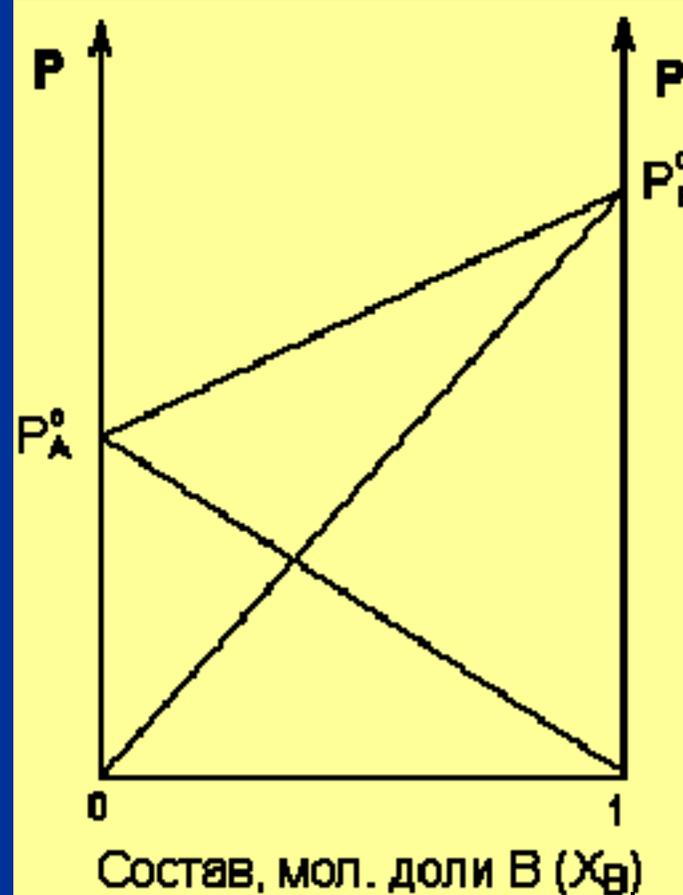
Первый закон Рауля:

Относительное понижение давления пара растворителя над раствором равно мольной доле растворенного вещества и не зависит от природы растворенного вещества

$$\frac{p_A^0 - p_A}{p_A^0} = x_B$$

Для 2-х компонентных растворов:

$$P = p_A^0 x_A + p_B^0 x_B = p_B^0 x_B + p_A^0 (1 - x_B) = p_A^0 - x_B (p_A^0 - p_B^0)$$



ОПРЕДЕЛЕНИЕ МОЛЕКУЛЯРНЫХ МАСС МЕТОДОМ КРИОСКОПИИ

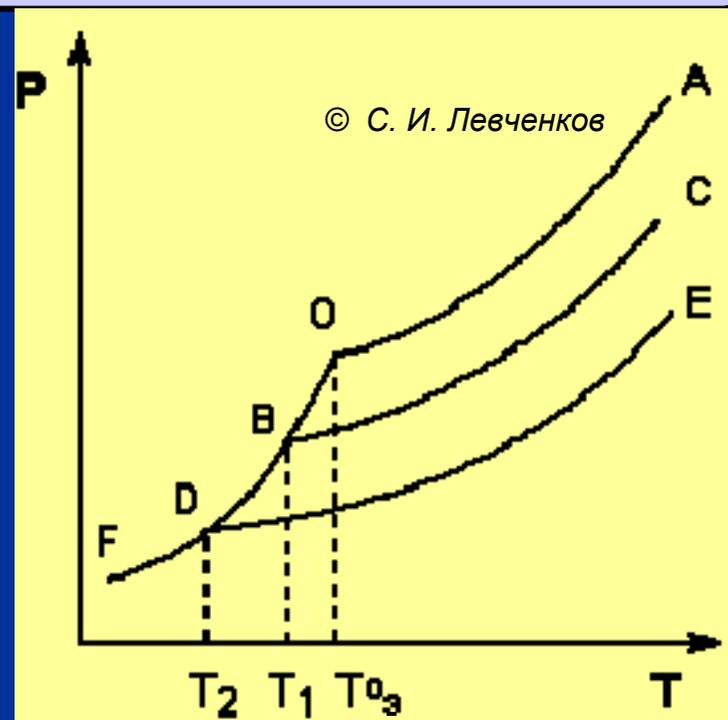
Измерение понижения температуры замерзания растворов

Второй закон Рауля:

Понижение температуры замерзания раствора $\Delta T_{\text{зам}}$ прямо пропорционально моляльной концентрации раствора

$$\Delta T_{\text{зам}} = K m$$

$$M = \omega_1 \cdot K \cdot 1000 / \omega_2 \Delta T_{\text{зам}}$$



K – криоскопическая константа растворителя;
m – моляльная концентрация раствора;
 ω_1 и ω_2 – масса растворенного вещества и растворителя, г



ОПРЕДЕЛЕНИЕ МОЛЕКУЛЯРНЫХ МАСС МЕТОДОМ ОСМОМЕТРИИ

Измерение осмотического давления разбавленных растворов

Давление, которое необходимо приложить к раствору, чтобы предотвратить перемещение растворителя в раствор через мембрану, разделяющую раствор и чистый растворитель, есть осмотическое давление π .

Осмотическое давление идеальных растворов линейно зависит от температуры и молярной концентрации раствора C и может быть рассчитано по уравнению:

$$\lim_{C \rightarrow 0} \frac{\pi}{C} = \frac{RT}{M_n}$$

ДЛЯ ЭЛЕКТРОЛИТОВ ВВОДИТСЯ ПОПРАВКА – изотонический коэфф.:

$$i = \frac{\pi^{\text{эксп}}}{\pi^{\text{теор}}} = \frac{\Delta T_{\text{кип}}^{\text{эксп}}}{\Delta T_{\text{кип}}^{\text{теор}}} = \frac{\Delta T_{\text{зам}}^{\text{эксп}}}{\Delta T_{\text{зам}}^{\text{теор}}}$$



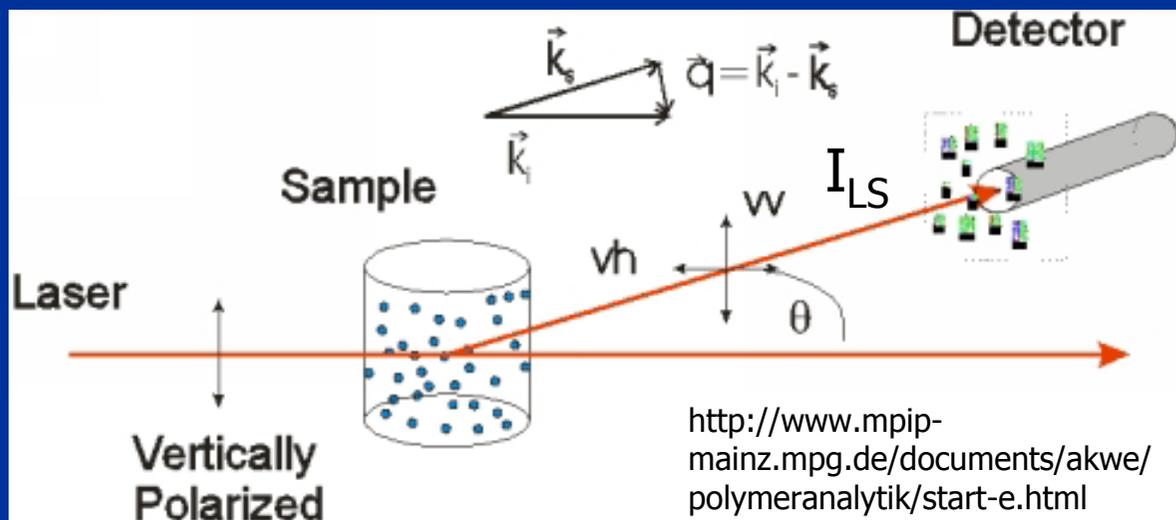
ОПРЕДЕЛЕНИЕ СРЕДНЕВЕСОВЫХ МОЛЕКУЛЯРНЫХ МАСС

Для определения средневесовых ММ используются методы светорассеяния и ультрацентрифугирования

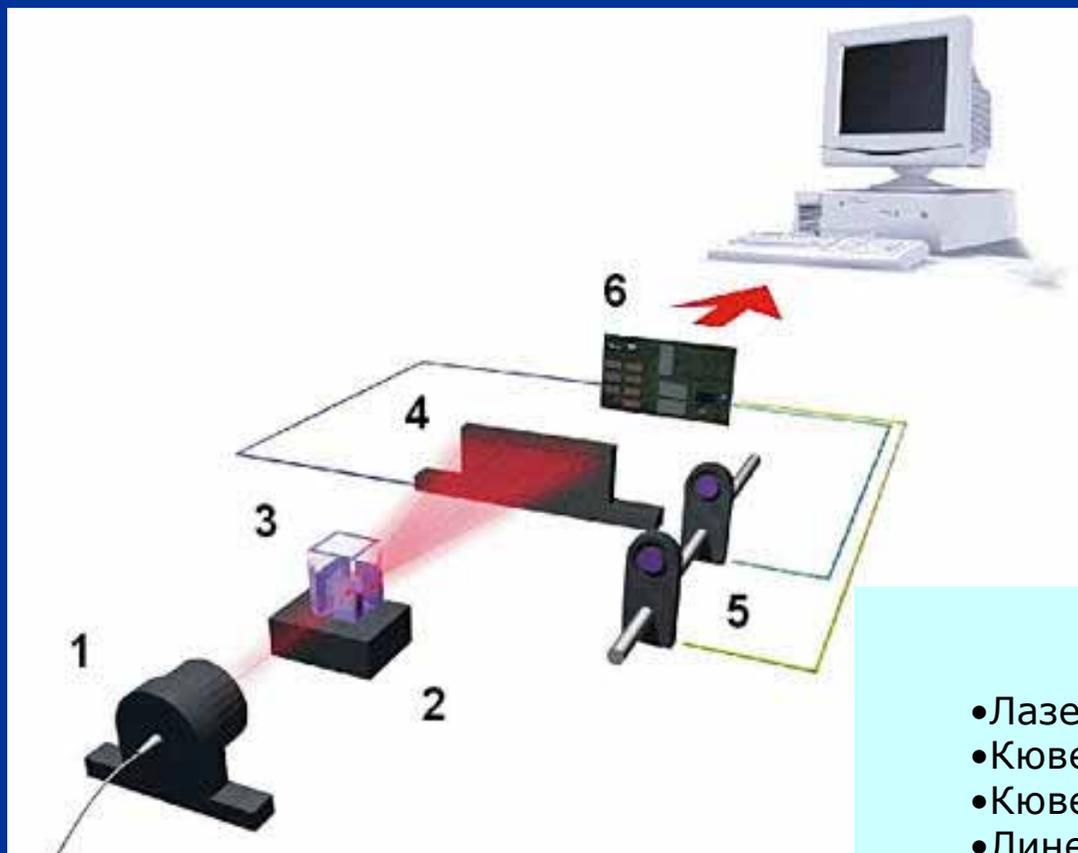
«Статическое» или «Рэлеевское» светорассеяние (MALLS) позволяет напрямую измерять молекулярные массы. Интенсивность рассеянного света (I_{LS}) пропорциональна произведению концентрации рассеивающих частиц (C) и их молекулярной массы (M_w): $I_{LS} \propto C \cdot M_w$

Метод работает до ~ 10 нм, потом - нужны измерения под разными углами. Очень чувствителен к присутствию больших молекул

$$20000 < M_w < 500000$$



ОПРЕДЕЛЕНИЕ МОЛЕКУЛЯРНЫХ МАСС МЕТОДОМ СВЕТОРАССЕЯНИЯ



Лазерный
анализатор
размера частиц
«ЛАСКА-1К»
(Люмекс, Россия)

<http://www.lumex.ru/rus/products/41.html>

- Лазерный диод (670 нм)
- Кюветное отделение
- Кювета с магнитным волчком
- Линейка фотодиодов (малые углы рассеяния)
- Фотодиоды (большие углы рассеяния)
- Контроллер



ОПРЕДЕЛЕНИЕ МОЛЕКУЛЯРНЫХ МАСС ПО ГИДРОДИНАМИЧЕСКИМ РАДИУСАМ

Используются методы динамического светорассеяния
и гель-хроматографии

«Динамическое» светорассеяние (DLS), известное как PCS – фотонно-корреляционная спектроскопия, основано на использовании рассеянного света для измерения скорости диффузии частиц (D).

Данные по скорости диффузии преобразуют для получения распределения по размерам частиц, где размер определяется радиусом Стокса или гидродинамическим радиусом (R_h). Указанные гидродинамические размеры зависят как от массы, так и от формы частиц. Достоинство DLS – способность анализировать образцы с очень широким распределением по молекулярным массам.

ВИСКОЗИМЕТРИЧЕСКОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ МОЛЕКУЛЯРНЫХ МАСС

Relative viscosity:

$$\eta_r = \frac{t}{t_0} = \frac{\eta}{\eta_0}$$

Specific viscosity

$$\eta_{sp} = \frac{t - t_0}{t_0} = \eta_r - 1$$

Reduced viscosity

$$\eta_{red} = \frac{\eta_{sp}}{c}$$

- The intrinsic viscosity $[\eta]$: $[\eta] = \lim_{c \rightarrow 0} \eta_{red}$

Уравнение Марка-Куна-Хаувинка:

$$[\eta] = KM^\alpha$$

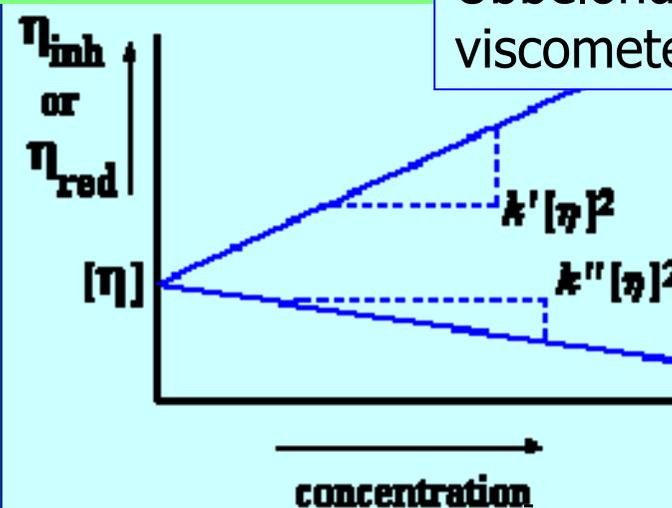
где K и α - константы Марка-Куна-Хаувинка,
Для каждого сочетания полимер—
растворитель - свои константы.

Наличие характеристической вязкости -
это иногда единственный способ сказать,
является ли полученное вещество
полимером или нет

$$M_v = \left[\frac{\sum_i N_i M_i^{1+a}}{\sum_i N_i M_i} \right]^{\frac{1}{a}}$$



Ubbelohde
viscometer



ВИСКОЗИМЕТРИЧЕСКОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ МОЛЕКУЛЯРНЫХ МАСС

$$M_v = \left[\frac{\sum_i N_i M_i^{1+\alpha}}{\sum_i N_i M_i} \right]^{\frac{1}{\alpha}}$$

**Для определения вискозиметрической ММ
необходимо знать – или определить из значений
гидродинамических радиусов –
K и α - константы Марка-Куна-Хаувинка**

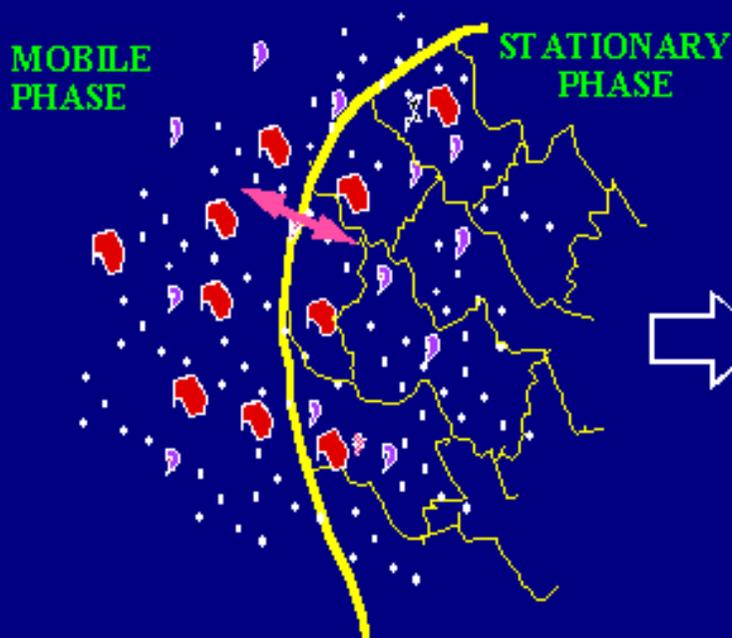


ОПРЕДЕЛЕНИЕ МОЛЕКУЛЯРНЫХ МАСС

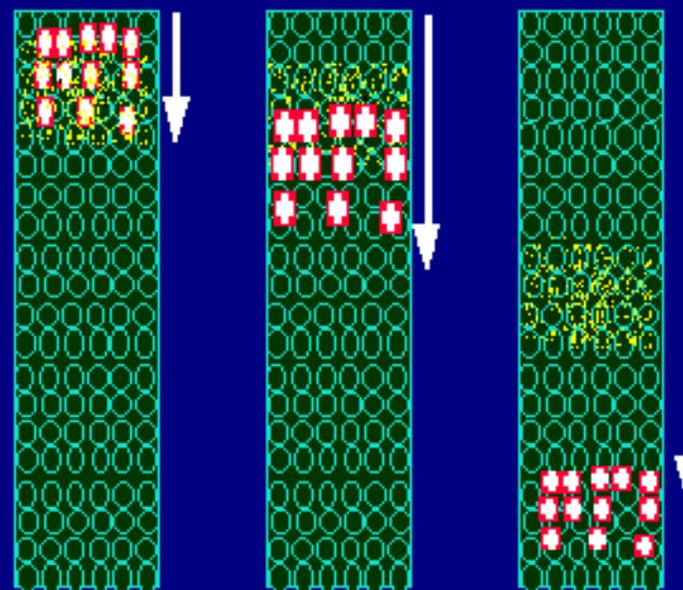
<http://www.forumsci.co.il/HPLC/gpc3.html>

SIZE EXCLUSION CHROMATOGRAPHY

PRINCIPLE OF SEPARATION



SEPARATION PROCESS:



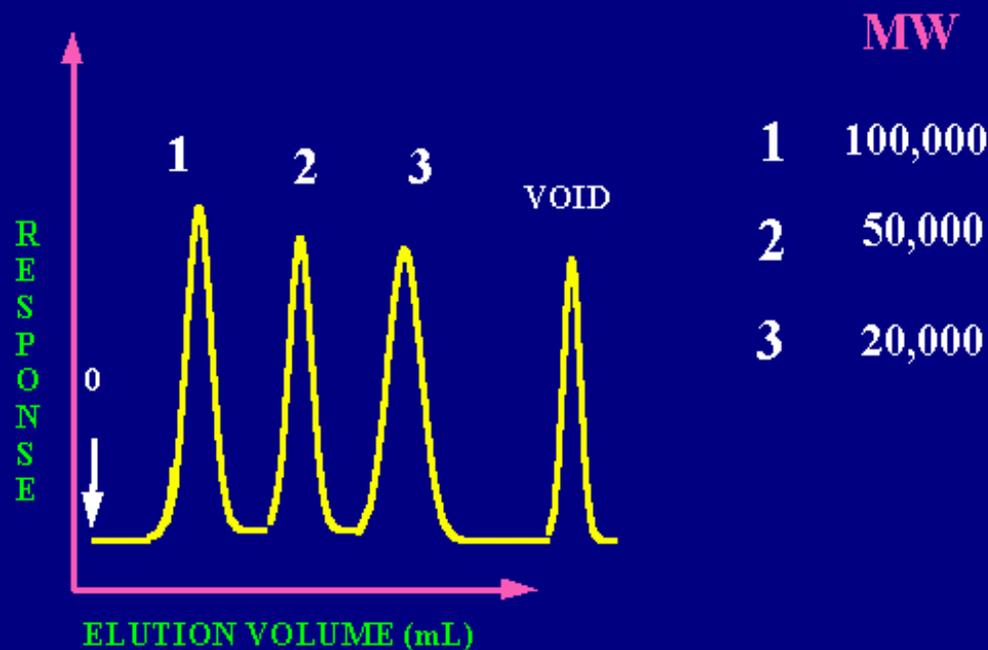
Молекулярная масса вычисляется по гидродинамическому объему с использованием калибровочных веществ



ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ ЭЛЮИРОВАНИЯ ФРАКЦИОНИРУЕМЫХ МОЛЕКУЛ

<http://www.forumsci.co.il/HPLC/gpc3.html>

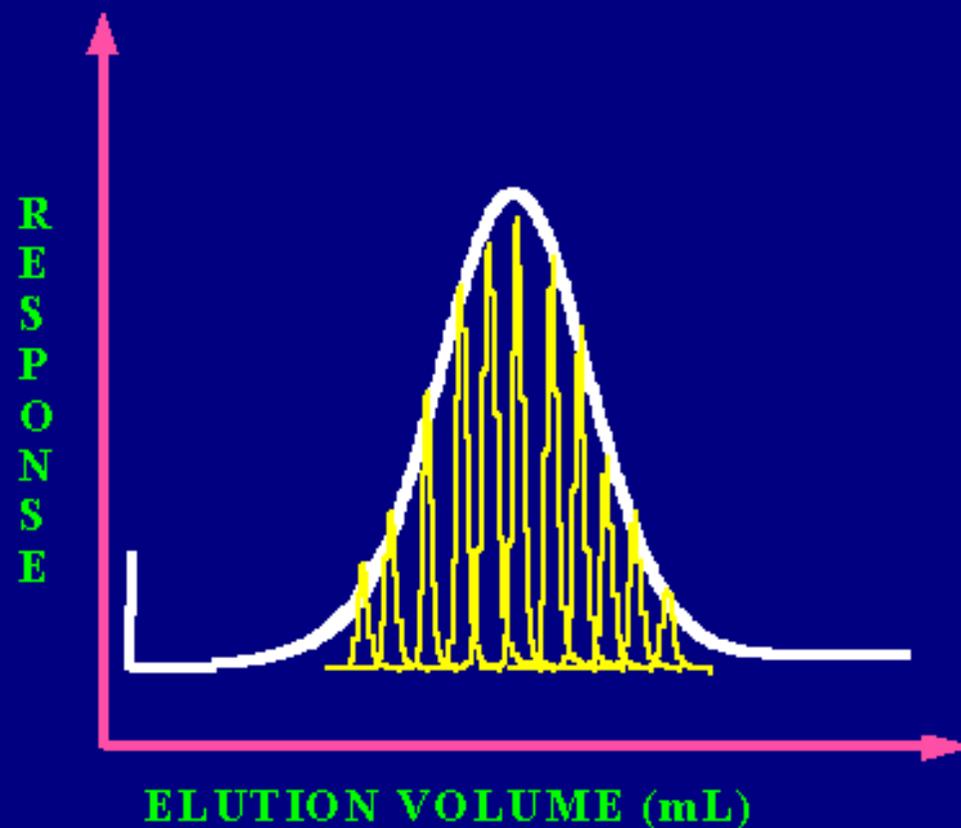
ELUTION ORDER IN SIZE EXCLUSION (GPC)



Сначала выходят большие молекулы, затем – маленькие

Но: это справедливо только для **ЭКСКЛЮЗИОННЫХ УСЛОВИЙ**, когда отсутствуют взаимодействия между гелем и аналитом

MOLECULAR WEIGHT DISTRIBUTION



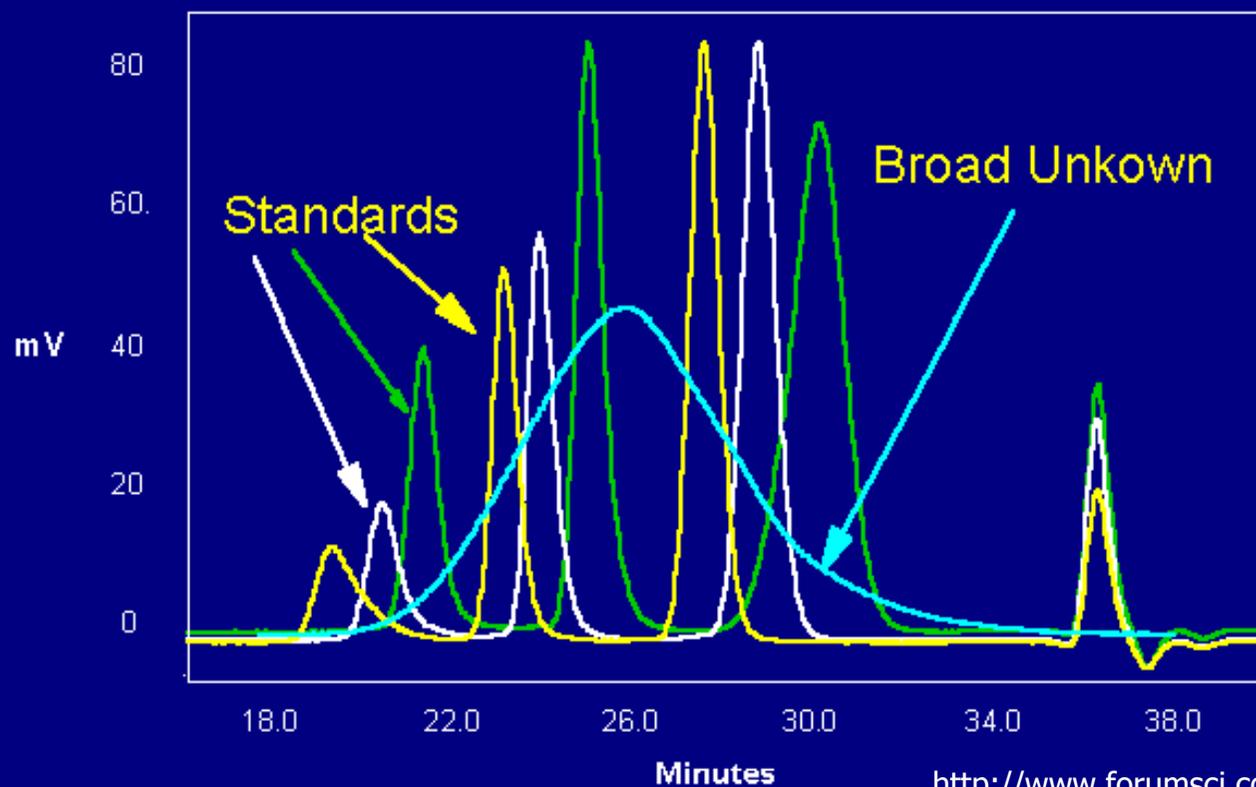
<http://www.forumsci.co.il/HPLC/gpc3.html>

Сложная смесь молекул дает перекрывающиеся пики
- образуется ММ распределение



КАЛИБРОВКА КОЛОНКИ УЗКИМИ СТАНДАРТАМИ

GPC Narrow Standards + Broad Sample

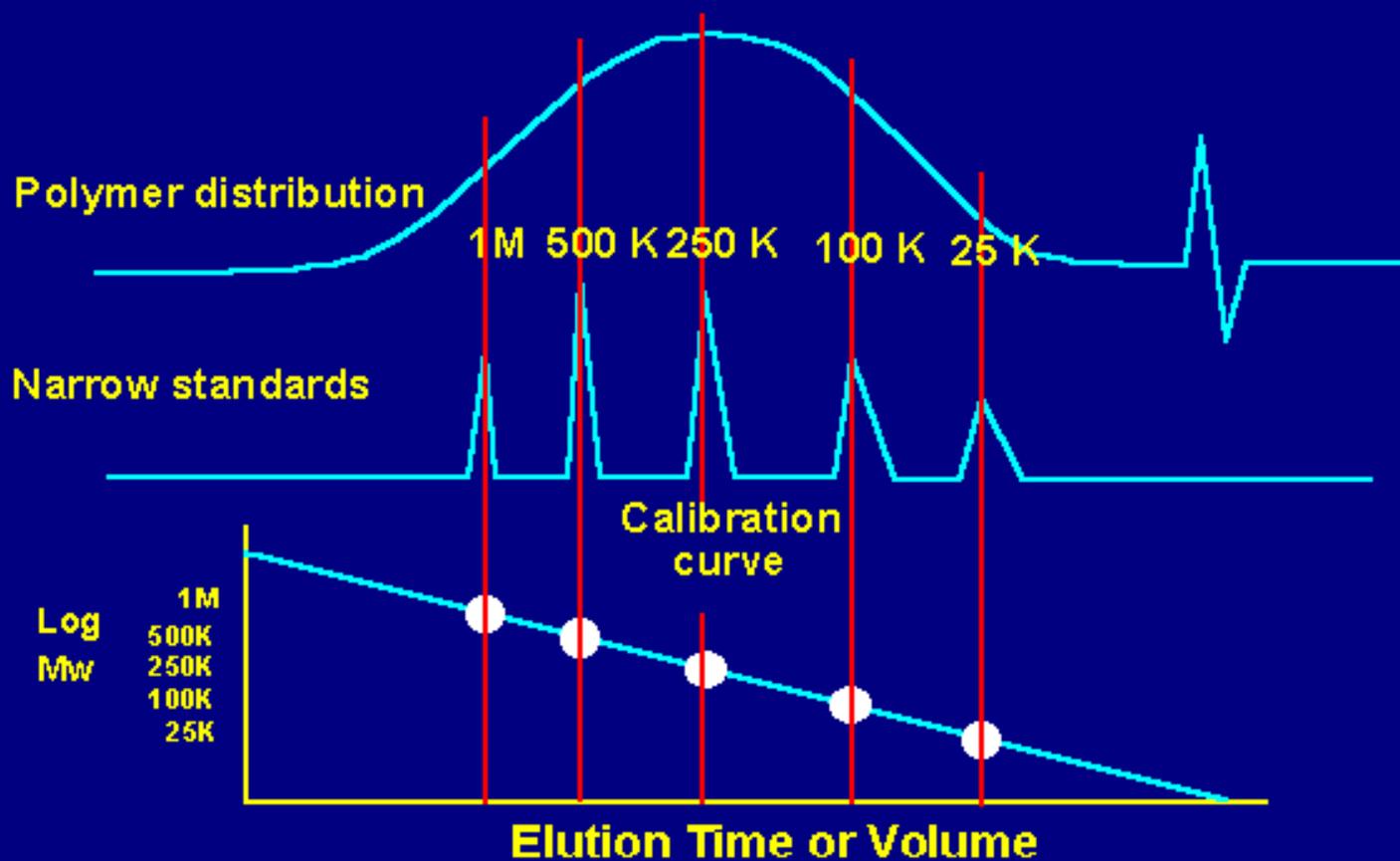


Пример: калибровка колонки полистиролами в диапазоне 2.8 млн - 2800 дальтон



ПОСТРОЕНИЕ КАЛИБРОВОЧНОЙ КРИВОЙ

Creation of a Calibration Curve

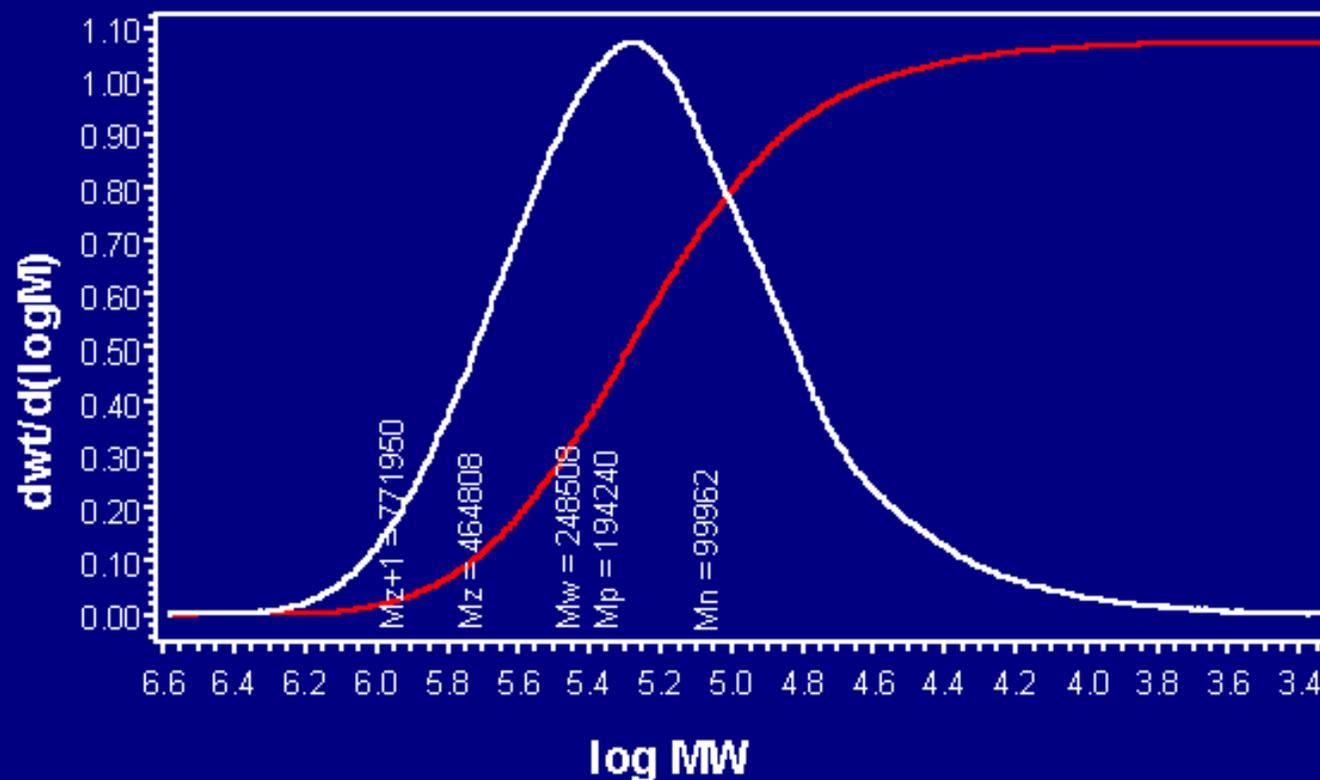


<http://www.forumsci.co.il/HPLC/gpc3.html>



ПОСТРОЕНИЕ КРИВОЙ ММР

Molecular Weight Distribution



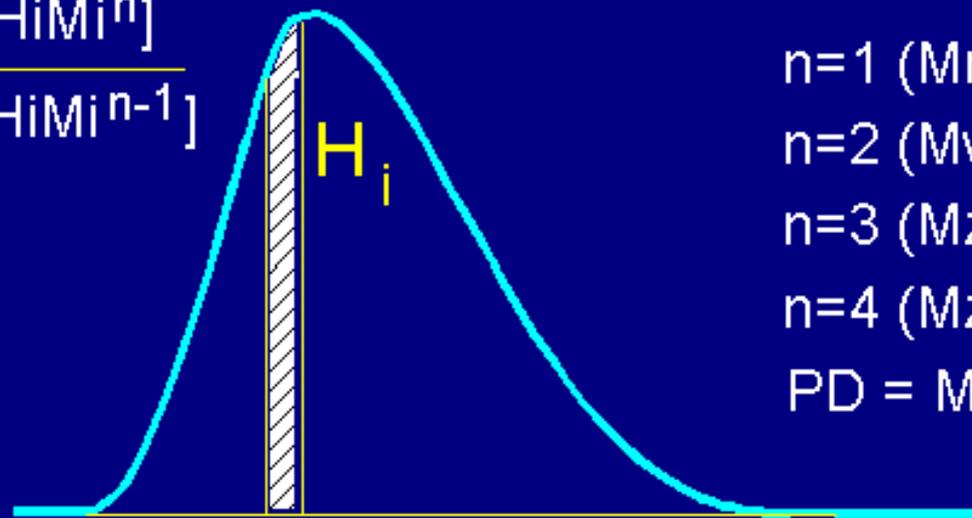
<http://www.forumsci.co.il/HPLC/gpc3.html>



РАСЧЕТ СРЕДНИХ МОЛЕКУЛЯРНЫХ МАСС

Calculation of MW Averages

$$M_x = \frac{\sum [H_i M_i^n]}{\sum [H_i M_i^{n-1}]}$$



n=1 (Mn)

n=2 (Mw)

n=3 (Mz)

n=4 (Mz+1)

PD = Mw/Mn

Retention Time (or Volume)

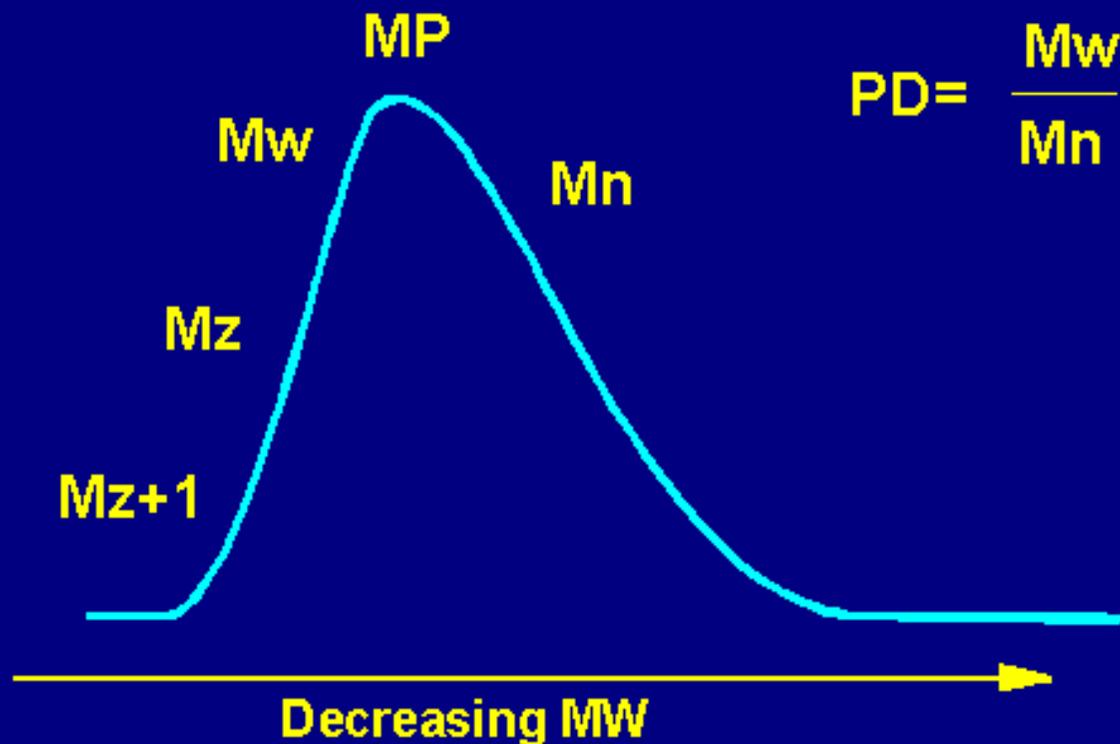
<http://www.forumsci.co.il/HPLC/gpc3.html>



LOMONOSOV MOSCOW STATE UNIVERSITY

ПОЛОЖЕНИЕ СРЕДНИХ НА КРИВОЙ ММР

Molecular Weight Distribution



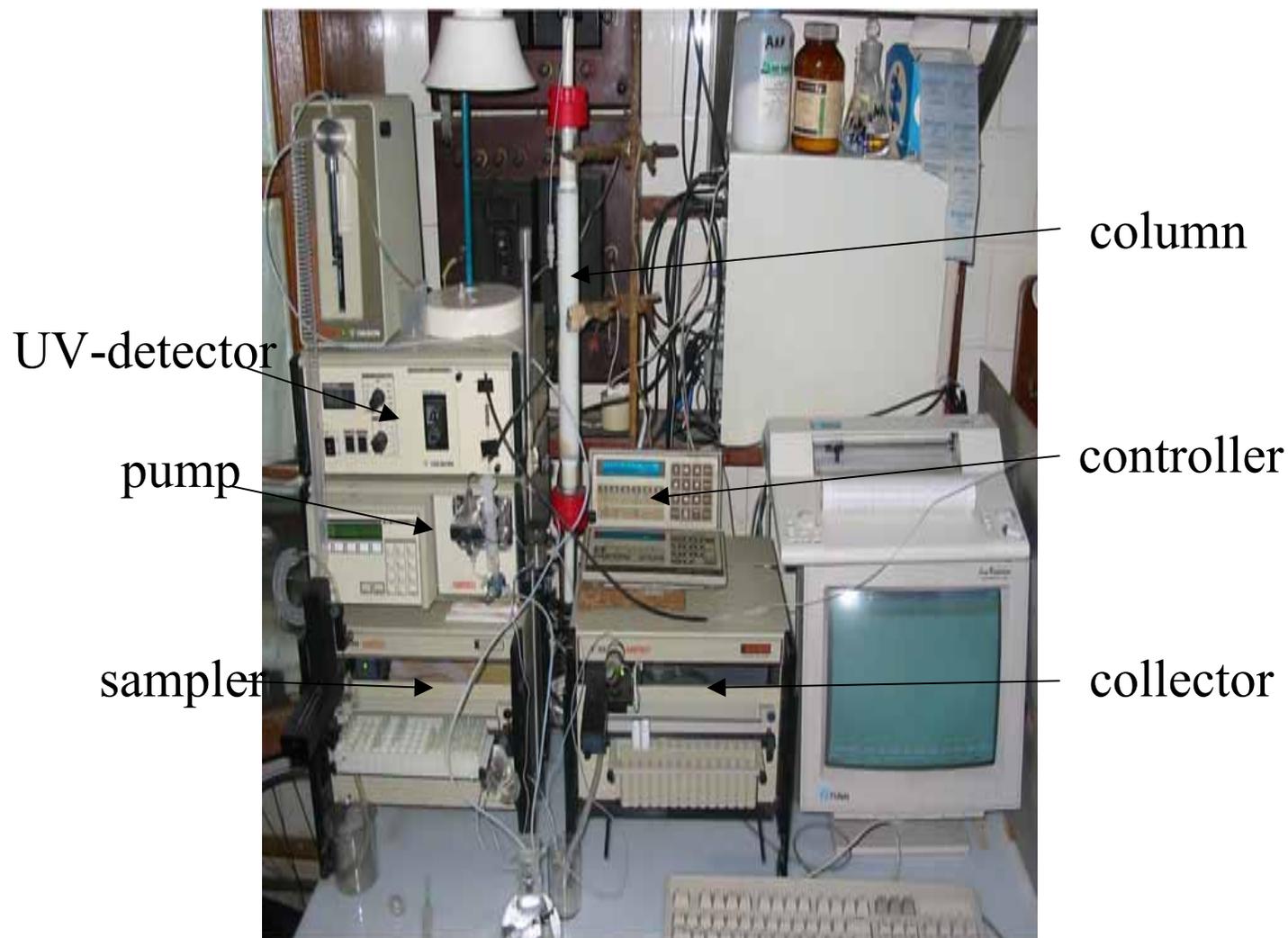
<http://www.forumsci.co.il/HPLC/gpc3.html>



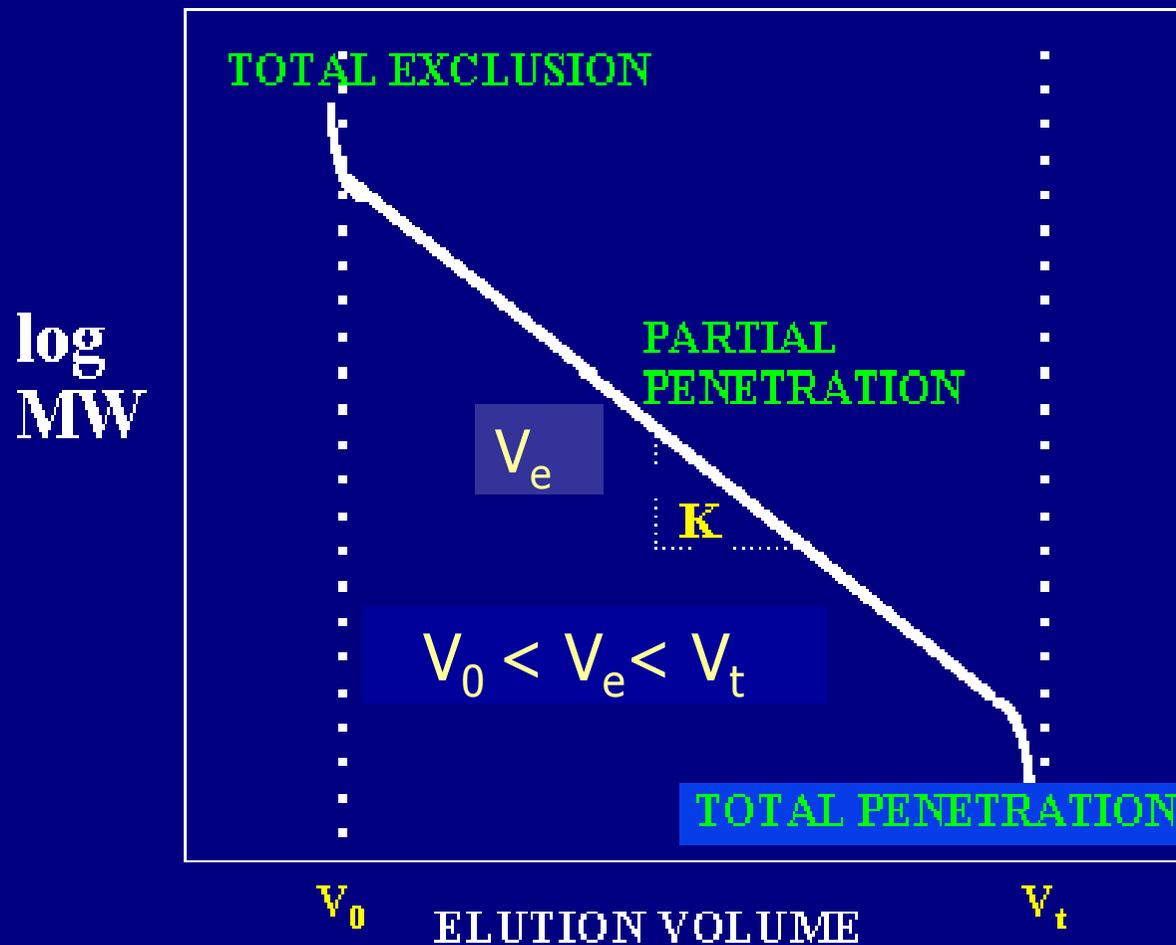
LOMONOSOV MOSCOW STATE UNIVERSITY

ПРИБОР ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ МОЛЕКУЛЯРНЫХ МАСС МЕТОДОМ ГЕЛЬ-ХРОМАТОГРАФИИ

ABIMED-HPLC-system



THEORETICAL CURVE OF THE STERIC EXCLUSION



$$\frac{V_e - V_0}{V_t - V_0} = K$$

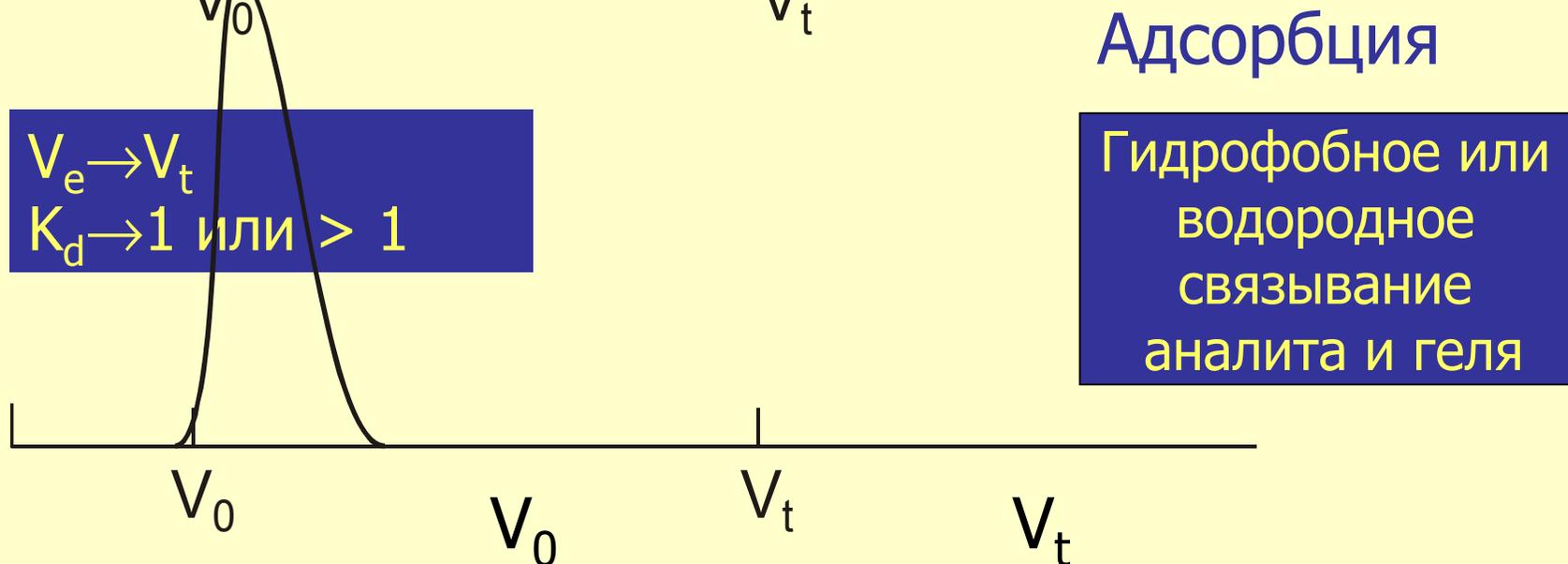
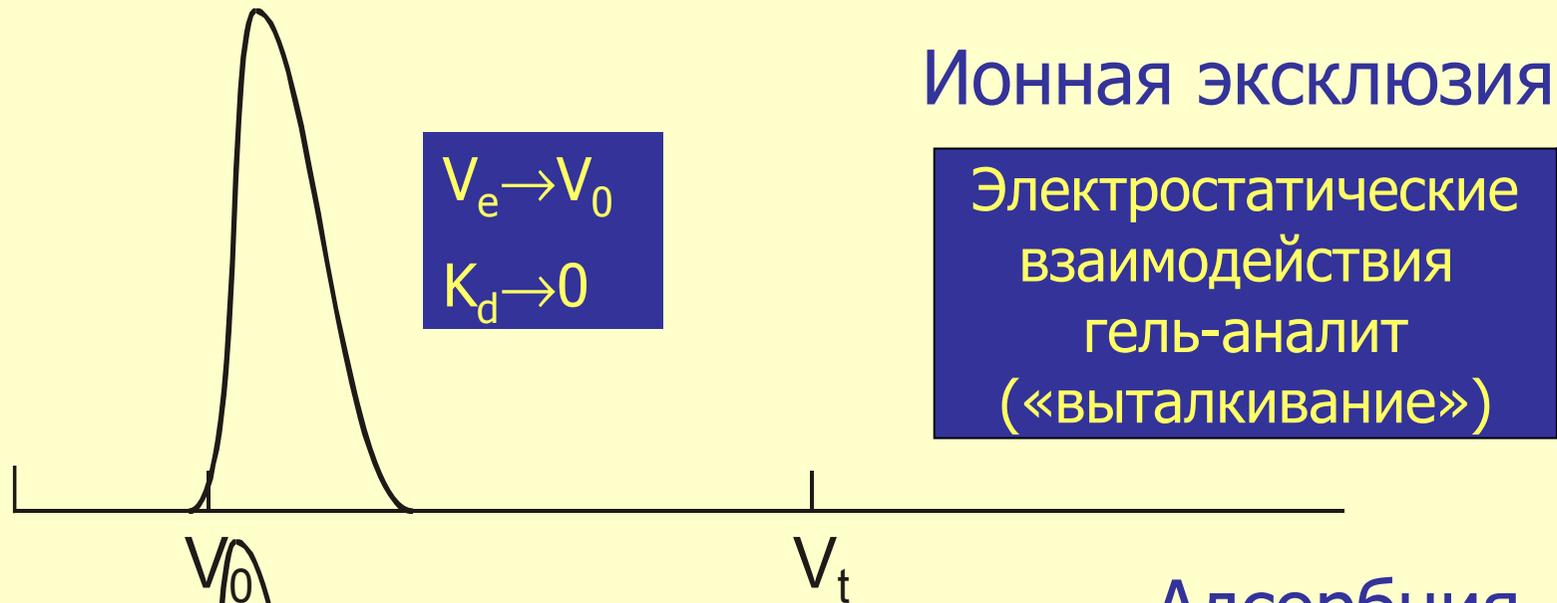
$$0 < K_d < 1$$

Если
 $K_d > 1$,
 или
 $K_d \rightarrow 0$?

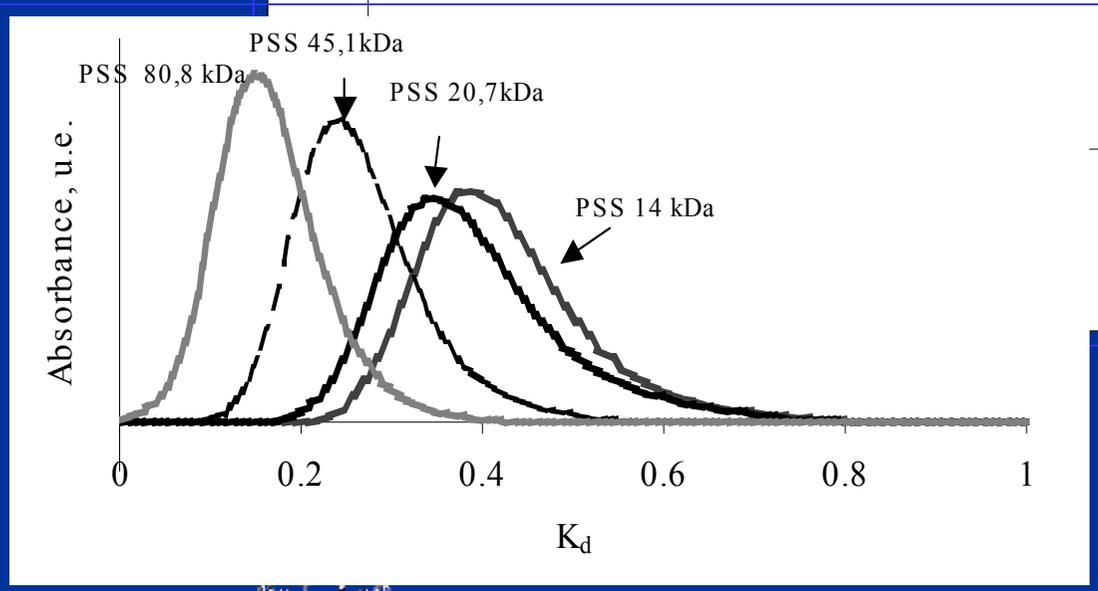
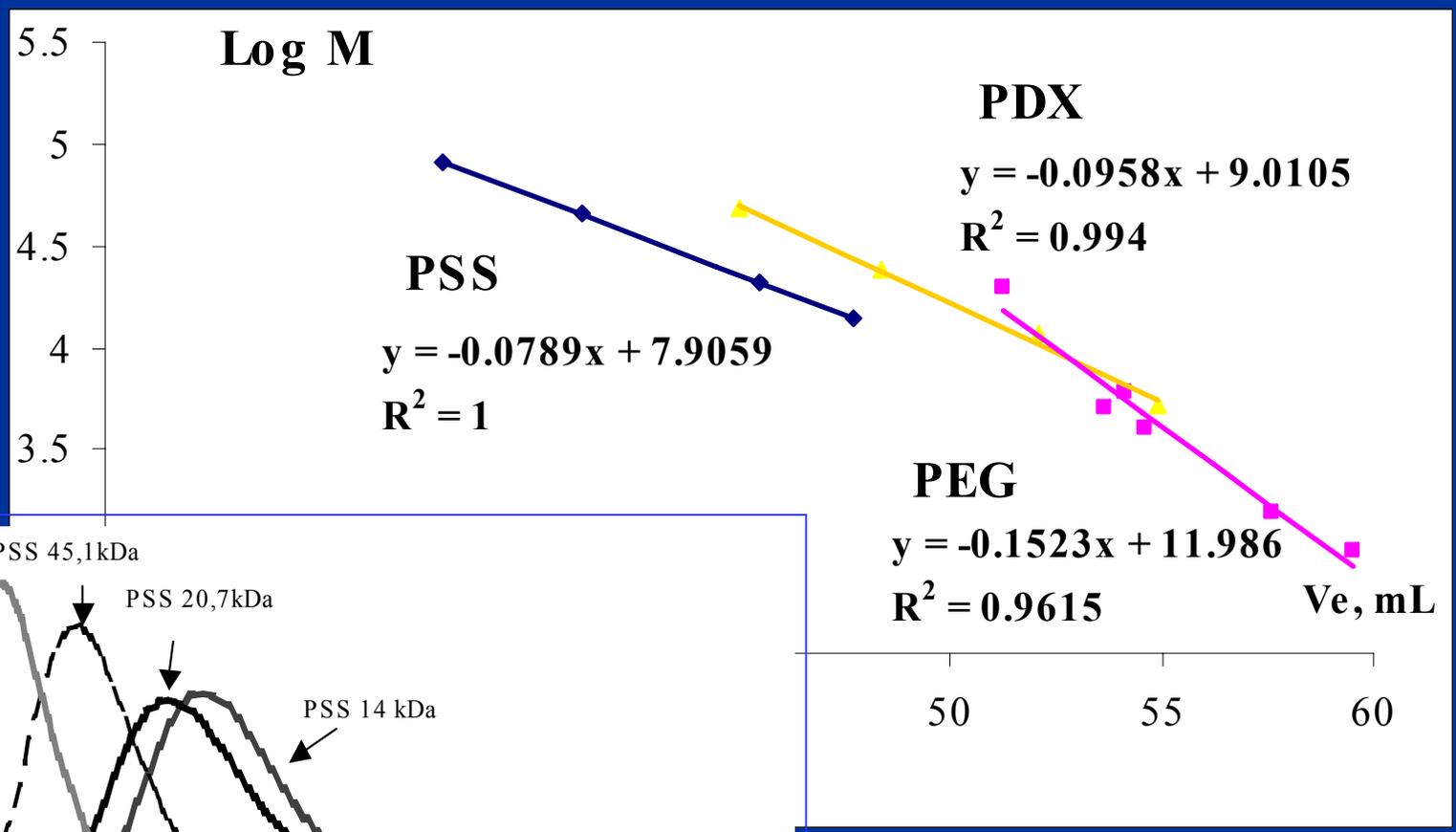
<http://www.forumsci.co.il/HPLC/gpc3.html>



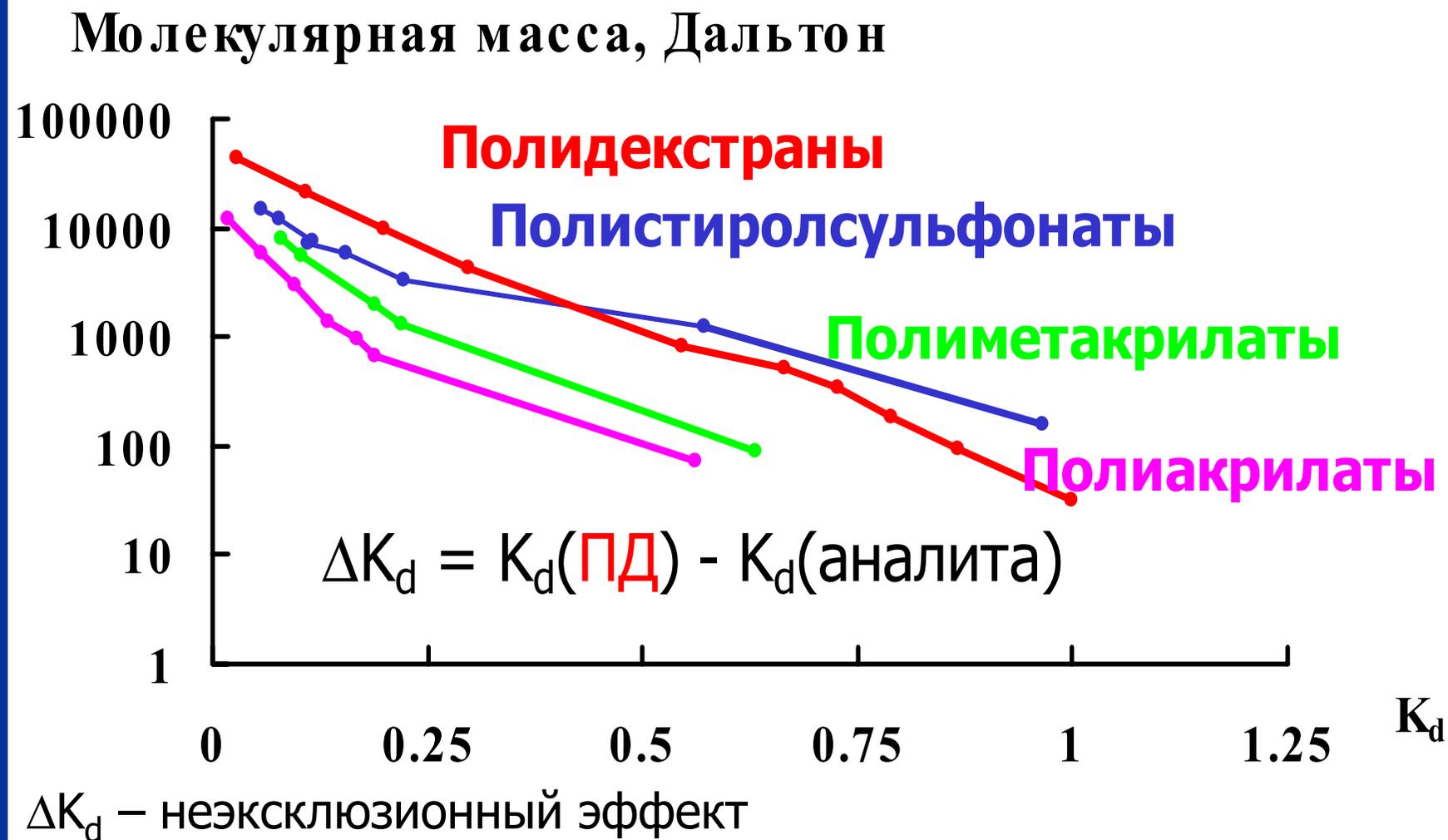
НЕЭКСКЛЮЗИОННЫЕ ЭФФЕКТЫ



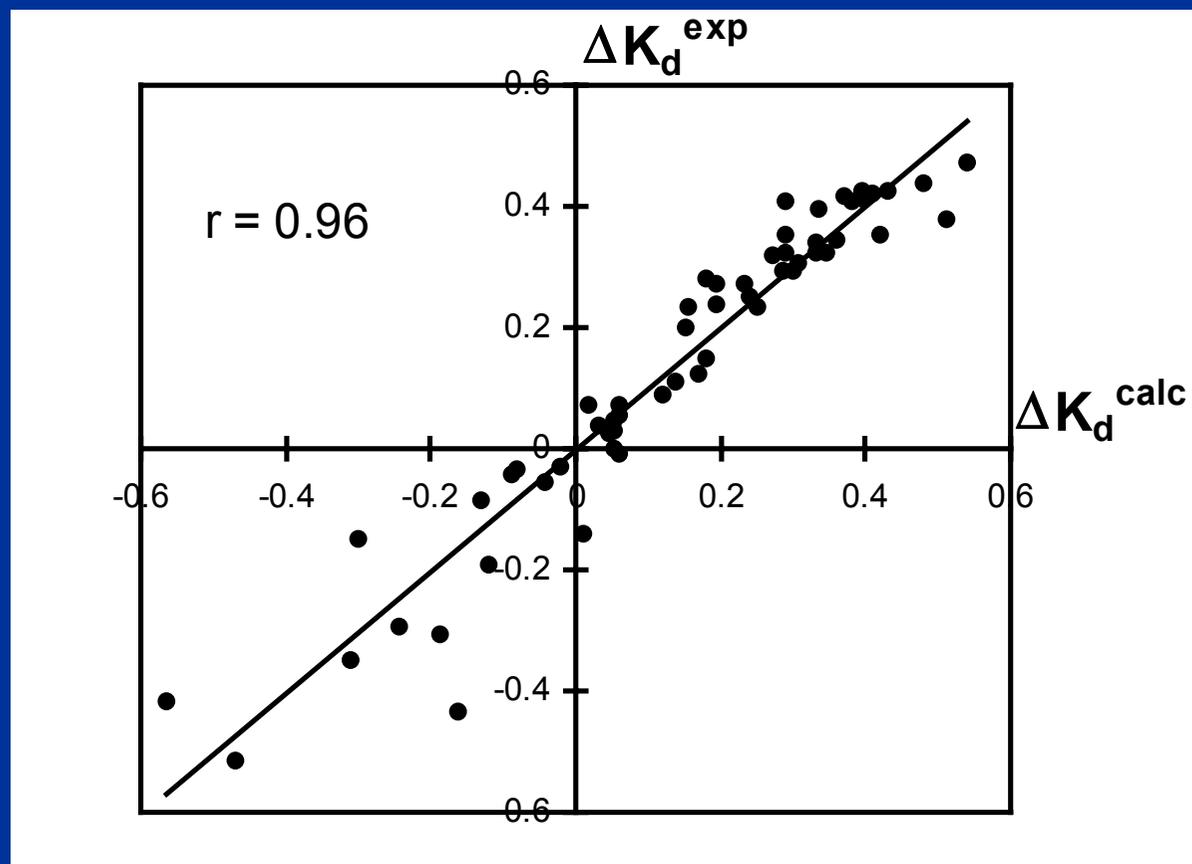
CALIBRATION OF SEC-COLUMN



КАЛИБРОВОЧНЫЕ КРИВЫЕ ДЛЯ ПОЛИЭЛЕКТРОЛИТОВ



ЗАВИСИМОСТЬ НЕЭКСКЛЮЗИОННОГО ЭФФЕКТА ОТ СТРУКТУРЫ АНАЛИТА



$$\Delta K_d = 0.21 - 1.24O_{\text{ArOH}}/O - 0.18C/O + 0.35O_{\text{COOH}}/O - 0.47(N+S)/C + 0.07C/H$$

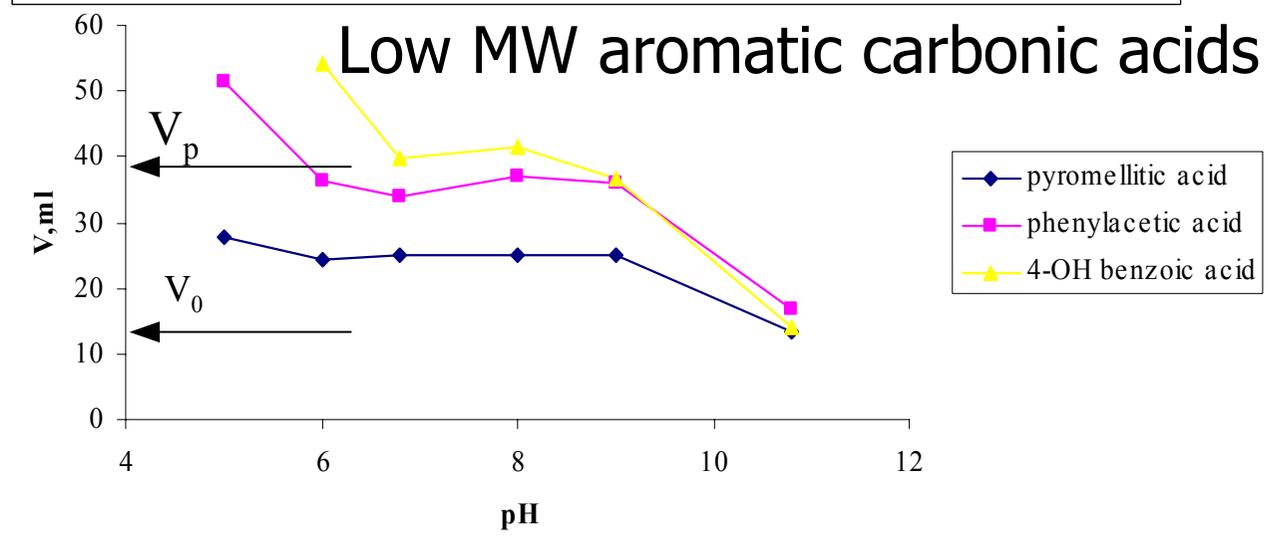
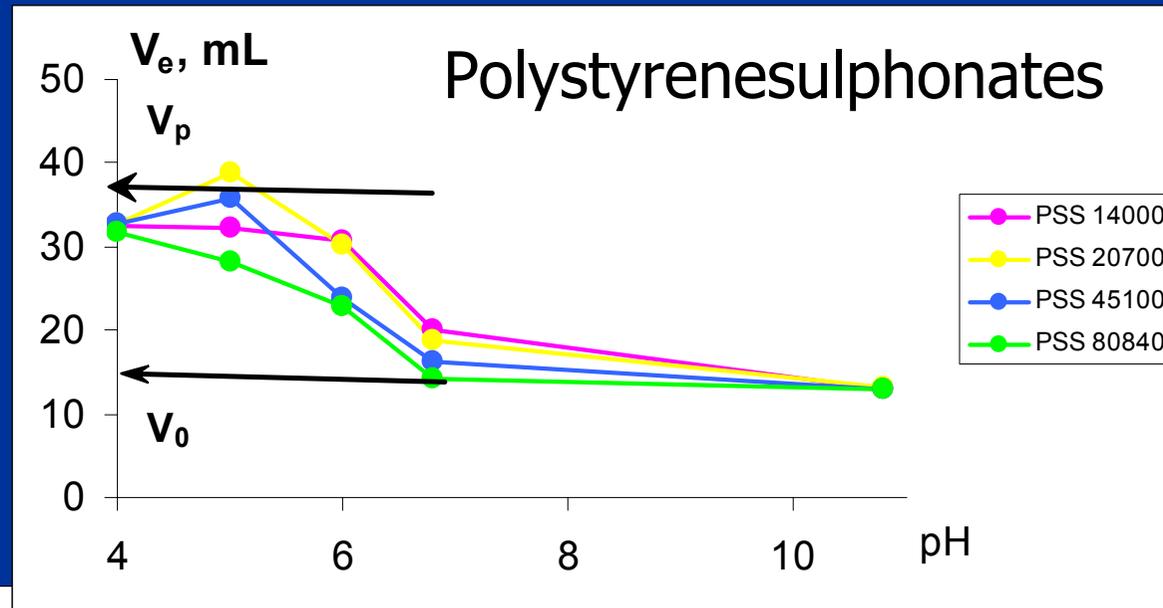


NON-EXCLUSION EFFECTS IN SEC-FRACTIONATION OF ORGANIC ACIDS: DEPENDENCE ON pH

Mobile phase:

Phosphate buffer,

I = 0.044 M

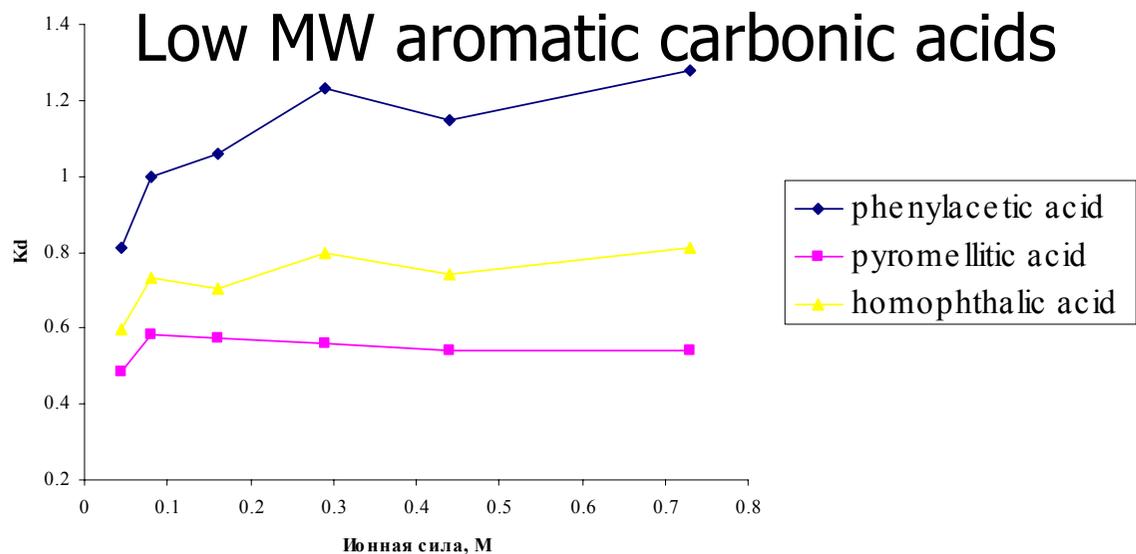
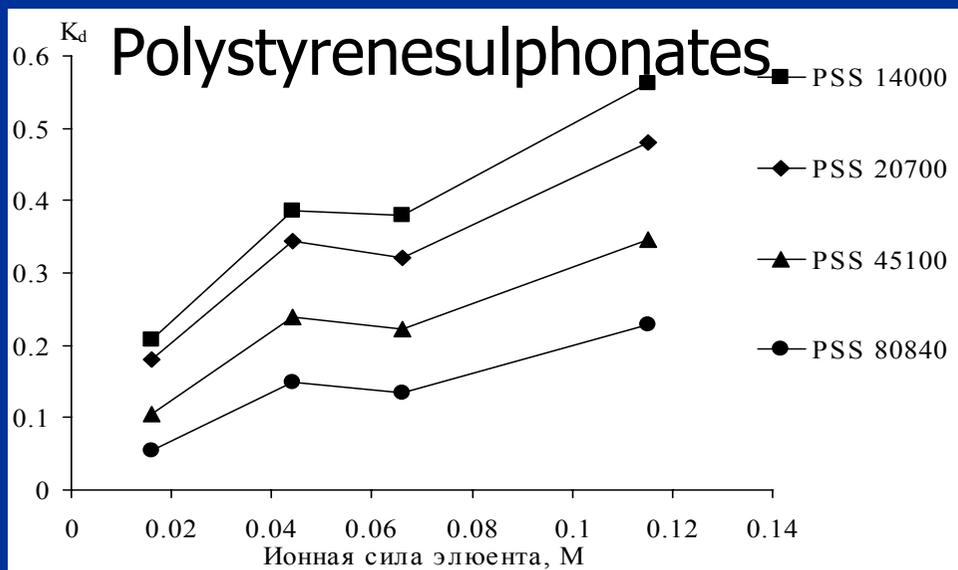


DEPENDENCE ON IONIC STRENGTH AT CONSTANT pH

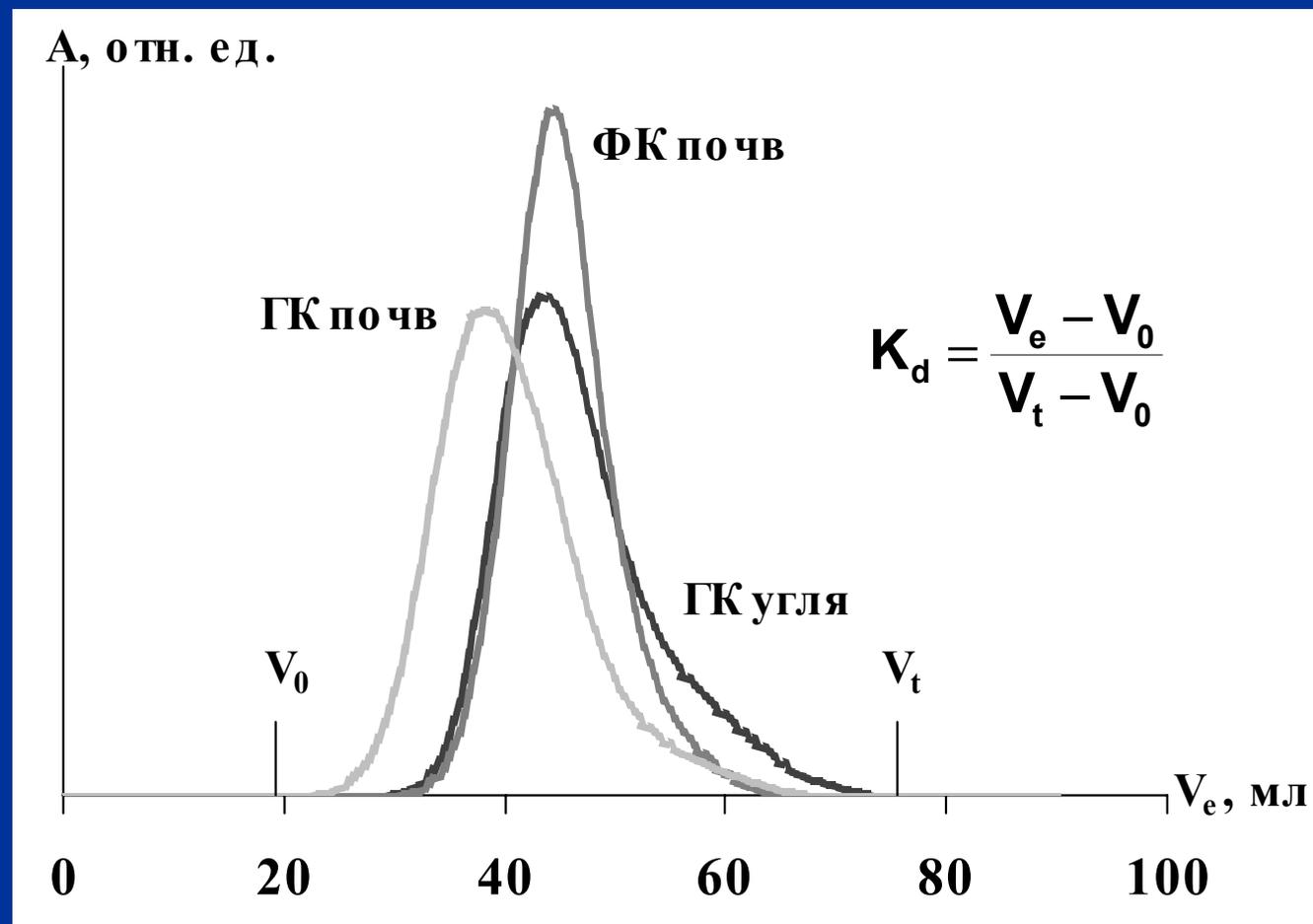
Mobile phase:

Phosphate buffer,

pH = 6.8



ГЕЛЬ-ХРОМАТОГРАММЫ ГВ



Гель: Toyopearl TSK HW-55S

Диапазон фракционирования: 1 – 200 КДа

Размеры колонки: $\varnothing 25$ мм, $L = 20$ см

Скорость элюирования: 1 мл/мин

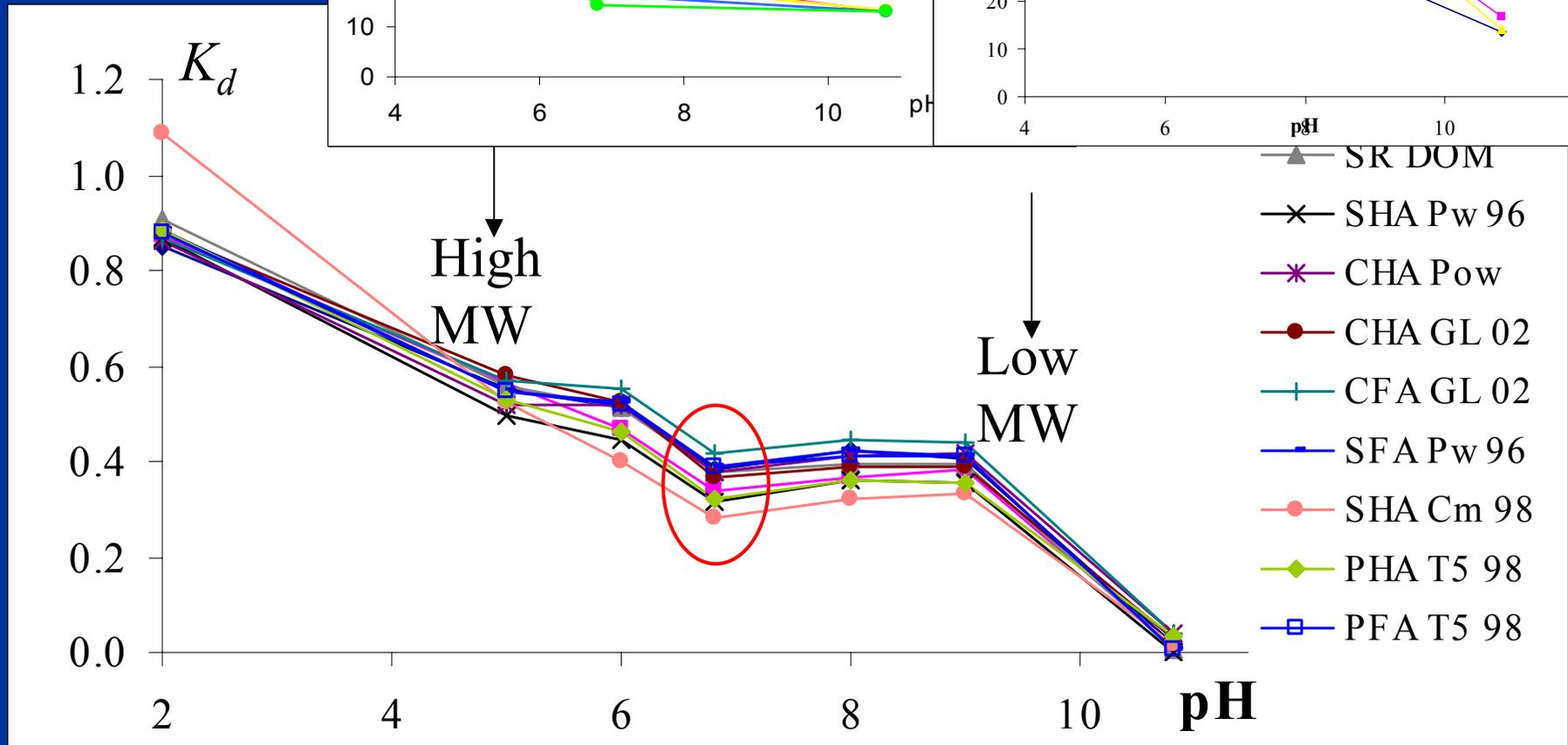
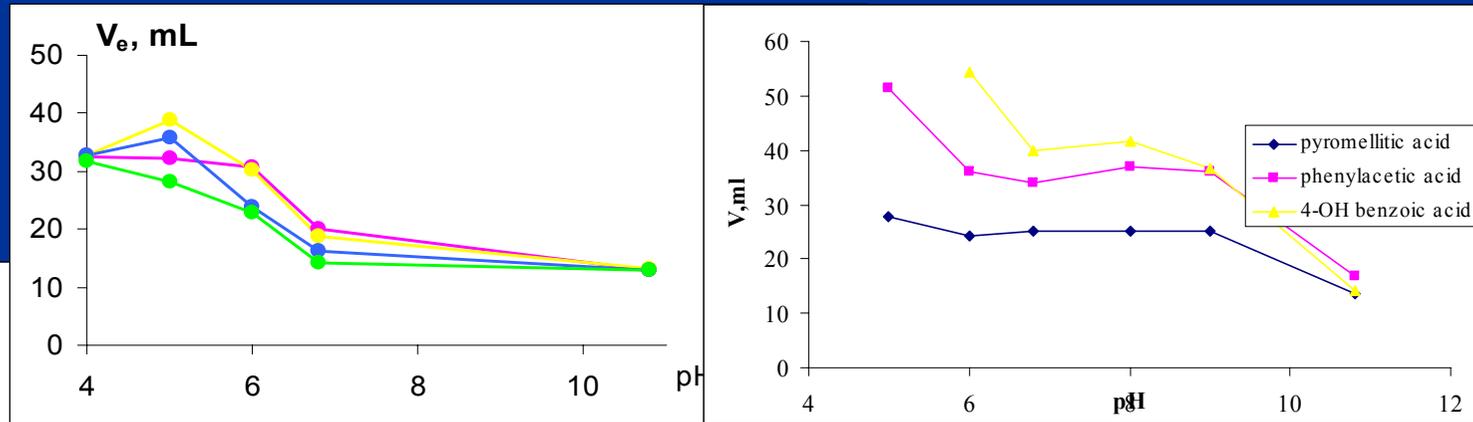
Элюент: фосф. буфер 0,01-0,16М

Объем пробы: 1 мл

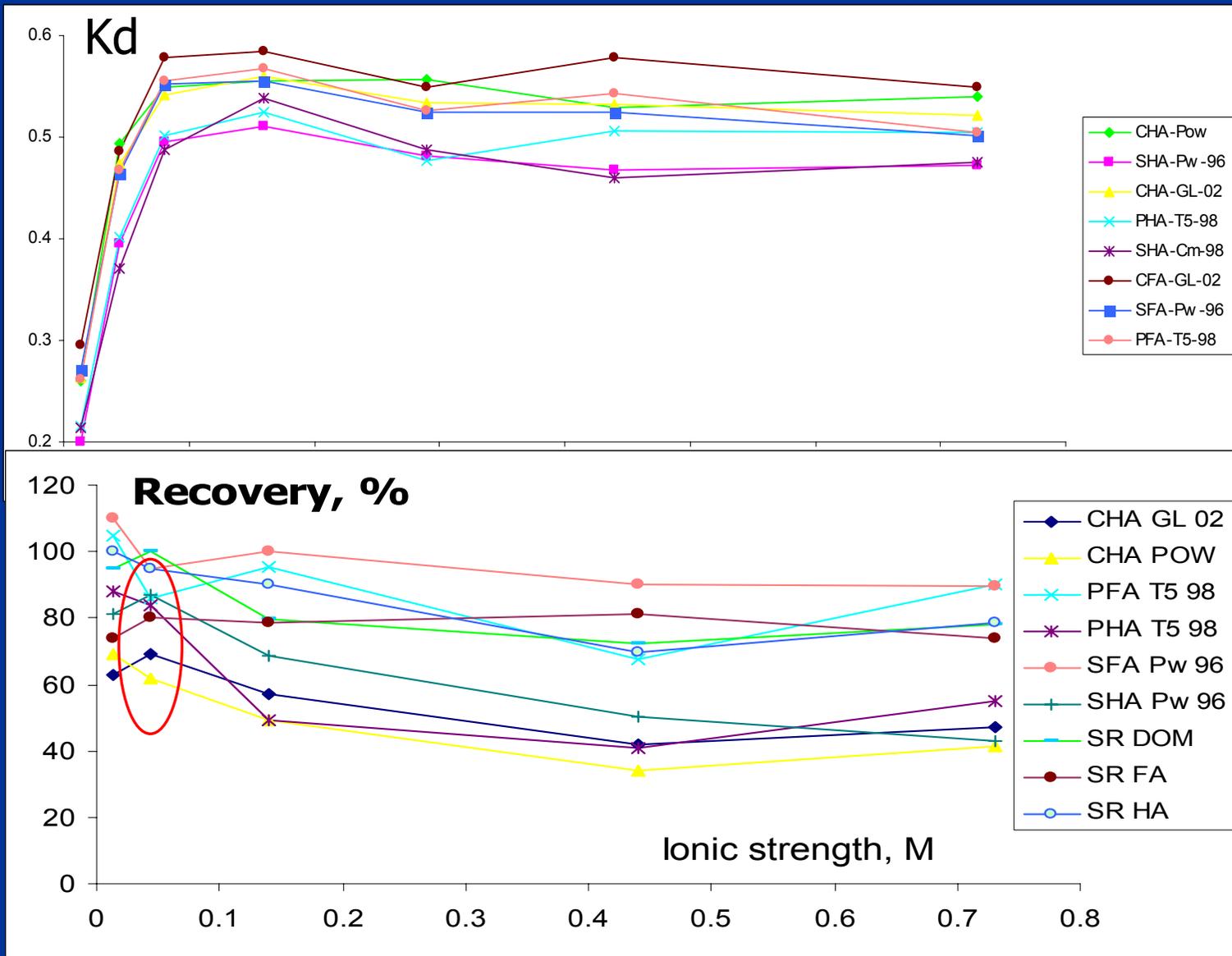
Концентрация ГВ: 50 мг/л

$\lambda = 254$ нм

pH-DEPENDENCE OF ELUTION BEHAVIOR OF HUMICS (I = 0.044 M)

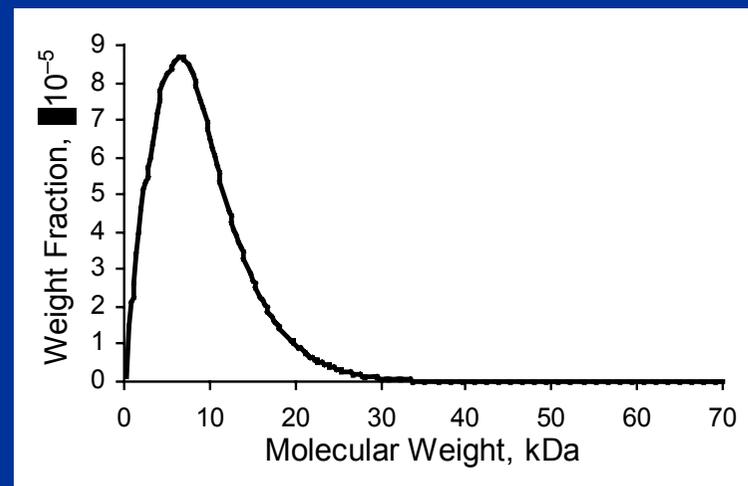
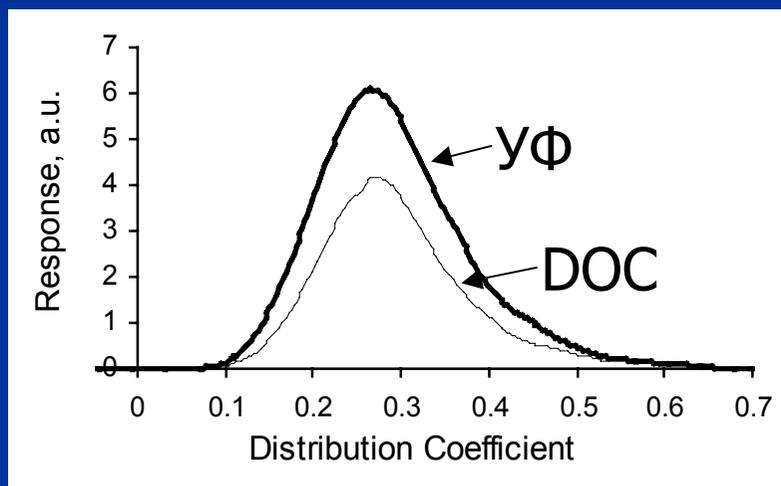


DEPENDENCE OF ELUTION BEHAVIOR OF HS ON IONIC STRENGTH (pH = 6.8)

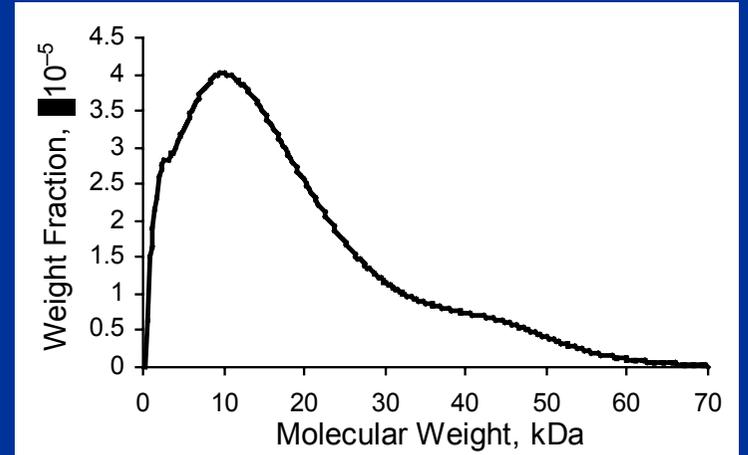
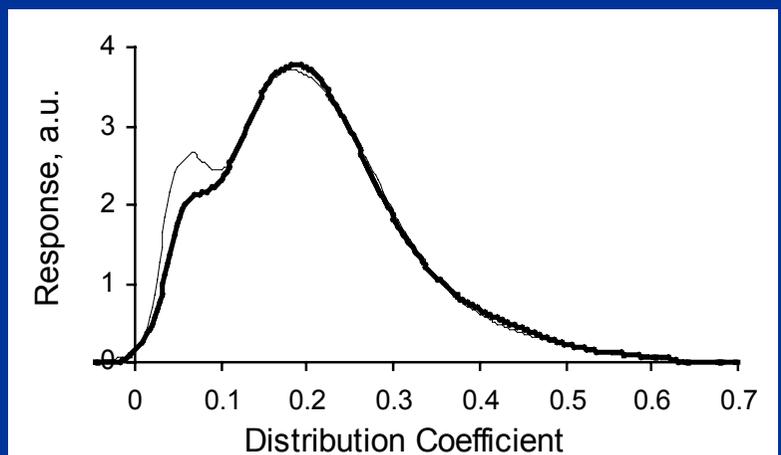


ТИПИЧНЫЕ ГЕЛЬ-ХРОМАТОГРАММЫ И ММР ГВ ВОД И ТОРФА

Гель-хроматограммы (слева) и ММР (справа) речных ГВ

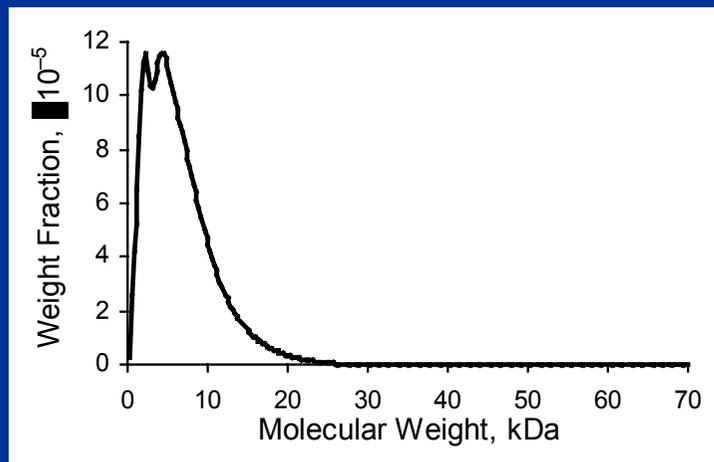
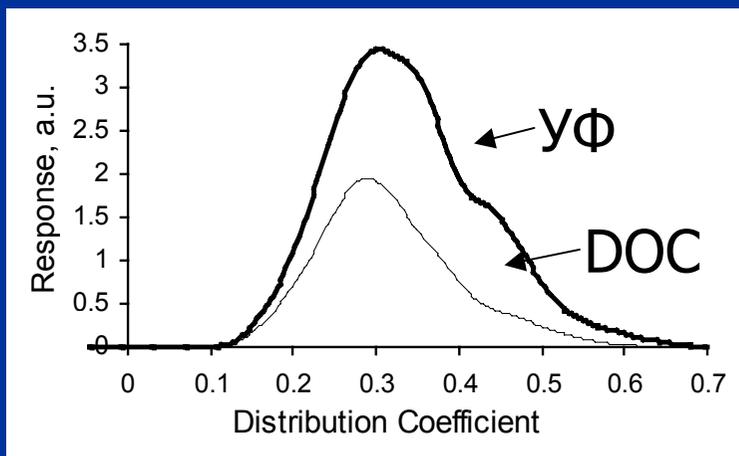


Гель-хроматограммы (слева) и ММР (справа) ГВ торфа

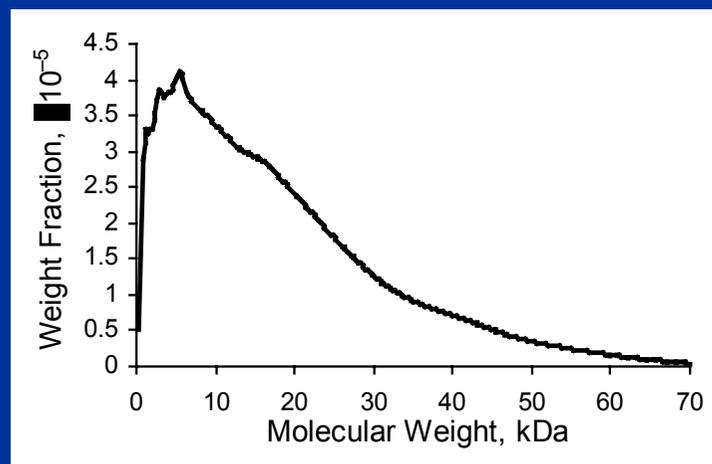
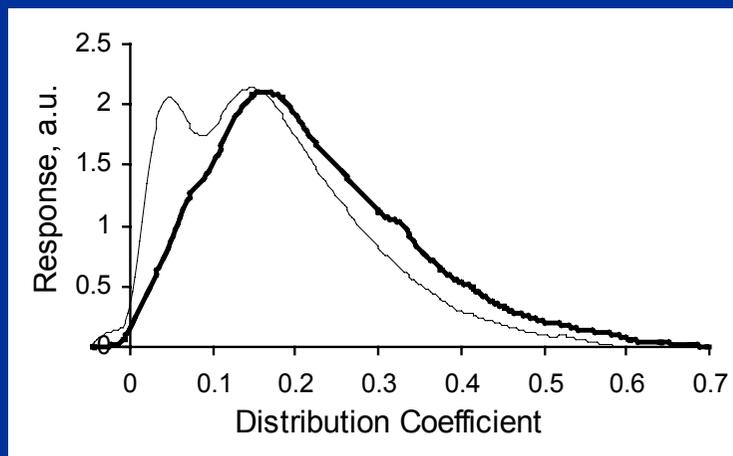


ТИПИЧНЫЕ ГЕЛЬ-ХРОМАТОГРАММЫ И ММР ФК И ГК ПОЧВ

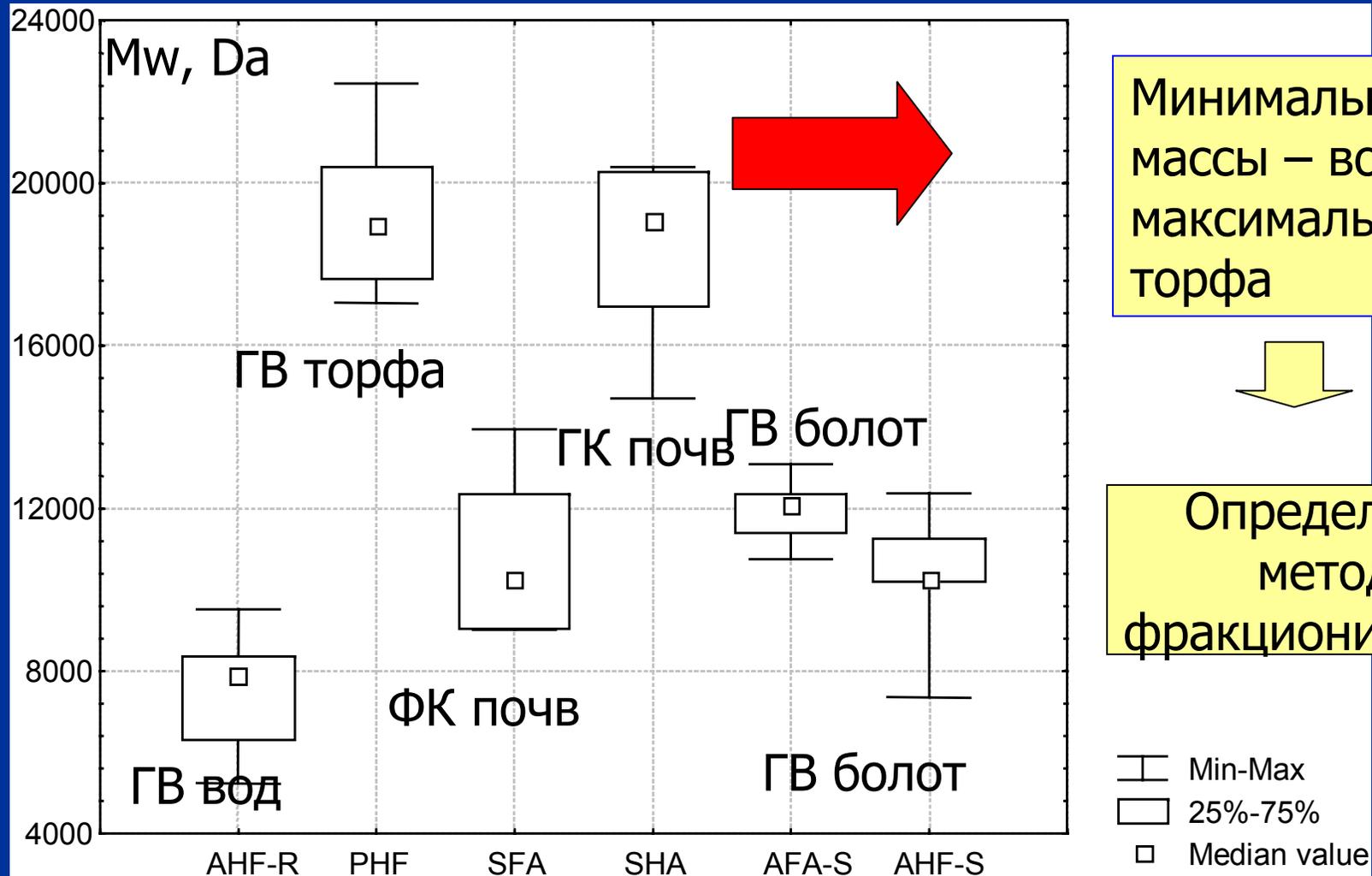
Гель-хроматограммы (слева) и ММР (справа) ФК почв



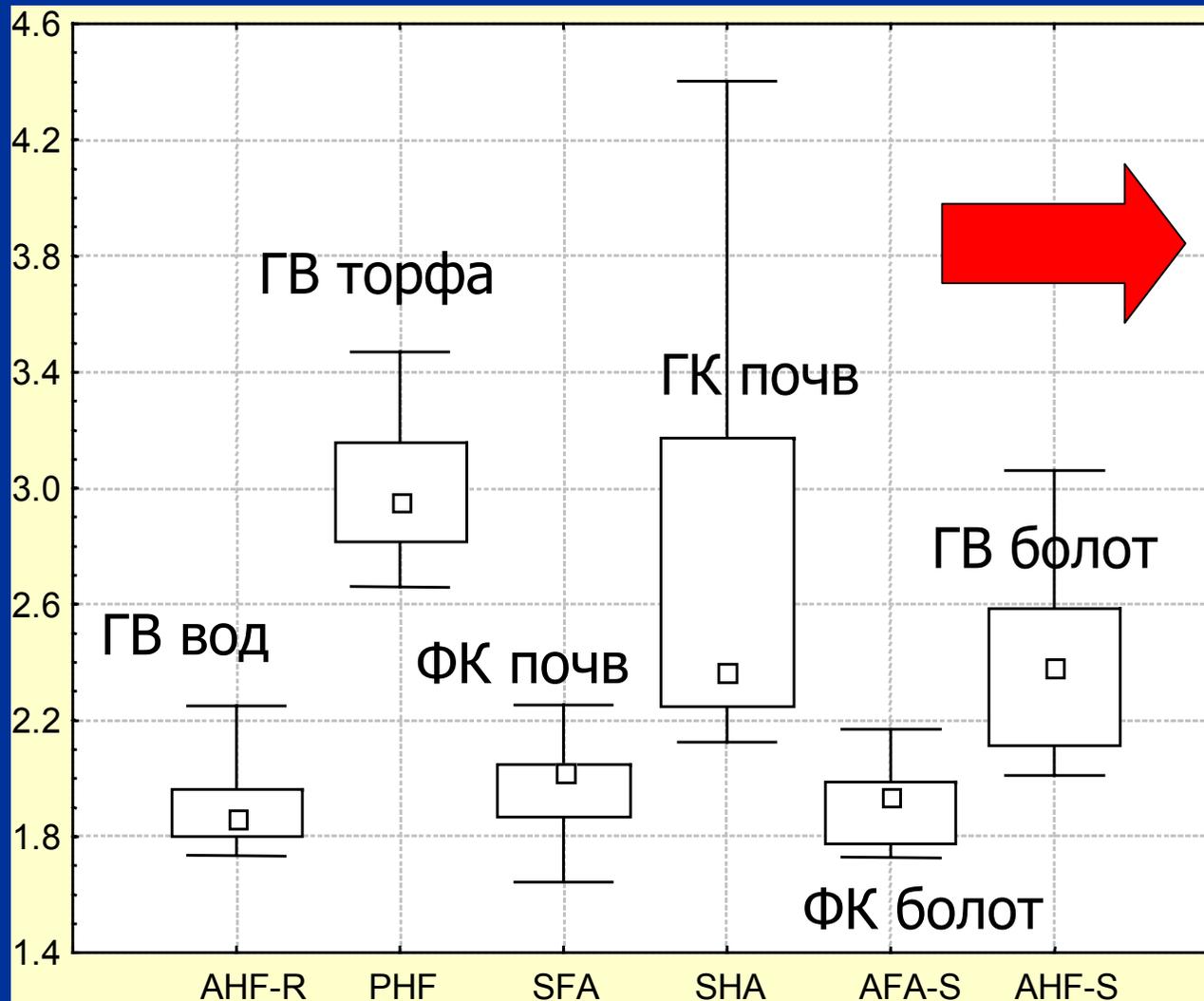
Гель-хроматограммы (слева) и ММР (справа) ГК почв



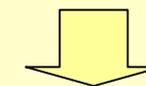
СРЕДНЕВЕСОВЫЕ ММ ГВ ИЗ РАЗЛИЧНЫХ ИСТОЧНИКОВ



ПОЛИДИСПЕРСНОСТЬ РАЗЛИЧНЫХ ФРАКЦИЙ ГВ



Минимальная
полидисперсность
для ФК



Определяется
методом
фракционирования!

—|— Min-Max
□ 25%-75%
□ Median value

ВЫВОДЫ

1. Определение молекулярных масс гуминовых веществ представляет собой сложную, многоуровневую проблему.
2. Залогом получения правильной информации о молекулярной массе полимера является выбор адекватного экспериментального метода.
3. При интерпретации результатов по определению молекулярных масс особое внимание должно уделяться ограничениям и диапазонам применимости метода.
4. Определение молекулярных масс гуминовых веществ осложнено их высокой полидисперсностью и отсутствием адекватных стандартов.
5. Необходимо применение комплекса различных методов определения молекулярных масс.



СПАСИБО ВСЕМ!



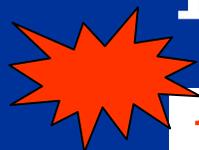
LOMONOSOV MOSCOW STATE UNIVERSITY

Следующая лекция:

*Масс-спектрометрия для исследования
сложных систем*

Лектор: Кононихин А.С.

14.04.2011, 15:30, ком. 446



**11 апреля – доклады Ивана Дубиненкова и
Александра Полякова на «Ломоносов-2011»**

