



МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М. В. Ломоносова

ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ

На правах рукописи
УДК 547.992.2

Данченко Наталья Николаевна

**ФУНКЦИОНАЛЬНЫЙ СОСТАВ ГУМУСОВЫХ КИСЛОТ:
ОПРЕДЕЛЕНИЕ И ВЗАИМОСВЯЗЬ С РЕАКЦИОННОЙ
СПОСОБНОСТЬЮ**

02.00.03 – Органическая химия
11.00.11 – Охрана окружающей среды и рациональное
использование природных ресурсов

Научные руководители:
доктор химических наук, профессор
В. С. Петросян
кандидат химических наук
И. В. Перминова

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Москва-1997

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	4
1.1. Общая характеристика гумусовых кислот	6
1.2. Элементный состав гумусовых кислот и методы его определения	8
1.2.1. Характеристика элементного состава гумусовых кислот	8
1.2.2. Определение элементного состава ГФК.....	10
1.3. Функциональный состав гумусовых кислот и методы его исследования.....	16
1.3.1. Краткая характеристика функционального состава гумусовых кислот.....	16
1.3.2. Методы определения функциональных групп ГФК, основанные на химической модификации.....	19
1.3.3. Методы определения кислотных функциональных групп ГФК, основанные на нейтрализации сильными и слабыми основаниями	26
1.4. Протолитические свойства гумусовых кислот и способы их описания.....	31
1.5. Взаимодействие гумусовых кислот с тяжелыми металлами	37
1.5.1. Механизмы взаимодействия гумусовых кислот с тяжелыми металлами	38
1.5.2. Способы описания комплексообразования гумусовых кислот с металлами	39
1.5.3. Экологические последствия комплексообразования ионов ТМ с ГФК.....	45
2. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ	48
2.1. Выделение и общая характеристика препаратов гумусовых кислот	49
2.1.1. Выделение препаратов и их физические свойства	49
2.1.2. Характеристика препаратов гумусовых кислот методами элементного анализа и ИК-спектроскопии	50
2.2. Исследование функционального состава ГФК	56
2.2.1. Количественное определение гидроксильных и карбоксильных групп гумусовых кислот путем их химической модификации	57

2.2.2. Определение карбоксильных и фенольных гидроксильных групп в гумусовых кислотах с помощью реакций с гидроксидом бария и ацетатом кальция.....	61
2.2.3. Функциональный состав выделенных препаратов гумусовых кислот и распределение кислорода по основным структурным фрагментам	72
2.3.Определение характеристик реакционной способности гумусовых кислот	77
2.3.1. Исследование распределения ионогенных групп препаратов гумусовых кислот по константам кислотной диссоциации	78
2.3.2. Определение количественных характеристик комплексообразующей способности гумусовых кислот	85
2.4. Установление количественных соотношений между функциональным составом и реакционной способностью гумусовых кислот	89
2.5. Использование препаратов гумусовых кислот для иммобилизации тяжелых металлов в слое загрязненных почв	95
3. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ	101
3.1. Материалы и реактивы	101
3.2. Техника эксперимента	105
ВЫВОДЫ.....	115
СПИСОК ЦИТИРУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ.....	116
ПРИЛОЖЕНИЯ	127

ВВЕДЕНИЕ

Гумусовые кислоты представляют собой наиболее обширный и реакционноспособный класс природных соединений, входящих в состав органического вещества почв, природных вод и твердых горючих ископаемых. Наличие в молекулах гумусовых кислот широкого спектра кислородсодержащих функциональных групп, таких как карбоксильные, гидроксильные, карбонильные и др. в сочетании с присутствием ароматических фрагментов обуславливает их способность вступать в ионные и донорно-акцепторные взаимодействия, образовывать водородные связи, активно участвовать в сорбционных процессах. В силу указанных свойств гумусовые кислоты играют исключительно важную роль в процессах миграции тяжелых металлов, контролируя их геохимические потоки в окружающей среде. Следовательно, создание моделей биогеохимических циклов тяжелых металлов в окружающей среде невозможно без учета взаимодействия с гумусовыми кислотами.

Данное обстоятельство определяет важность и актуальность изучения функционального состава гумусовых кислот как основы их реакционной способности в отношении тяжелых металлов и установления количественных взаимосвязей между структурой и свойствами гумусовых кислот. При этом, вследствие нестехиометричности состава и нерегулярности строения макромолекул гумусовых кислот, до сих пор не разработаны надежные методы получения количественных данных об их функциональном составе. Кроме того, отсутствуют способы характеристики реакционной способности гумусовых кислот, которые бы учитывали присущую им неоднородность свойств. Особую сложность представляет разработка данных подходов для анализа структуры и реакционной способности нефракционированных препаратов гумусовых кислот, представляющих собой природную смесь сходных по строению, но различных по молекулярно-массовому составу гуминовых и фульвокислот.

Целью работы было определение основных функциональных групп (карбоксильных и гидроксильных) в нефракционированных препаратах гумусовых кислот и установление количественных взаимосвязей между

функциональным составом гумусовых кислот и их протолитическими и комплексообразующими свойствами.

Для достижения поставленной цели необходимо было решить следующие задачи:

- Осуществить количественное определение основных функциональных групп, обуславливающих реакционную способность гумусовых кислот в отношении ионов металлов.
- Охарактеризовать протолитические и комплексообразующие свойства гумусовых кислот с учетом неоднородности химического окружения функциональных групп.
- Разработать способы получения структурных дескрипторов на основе данных элементного и функционального состава гумусовых кислот с целью их дальнейшего использования для корреляционно-регрессионного анализа.
- Осуществить корреляционно-регрессионный анализ блока данных по содержанию функциональных групп, протолитическим и комплексообразующим свойствам гумусовых кислот для установления количественных взаимосвязей между функциональным составом и реакционной способностью гумусовых кислот.

1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Общая характеристика гумусовых кислот

Гумусовые кислоты (от латинского “гумус” – земля, почва) представляют собой наиболее реакционноспособную часть обширного класса природных соединений, объединяемых под названием гуминовые вещества (ГВ). Гуминовые вещества составляют от 60 до 80% органического вещества водных и почвенных сред [1-5].

Образование ГВ в природных средах происходит в результате химического и биологического разложения растительных и животных остатков [1,2]. В основе данного процесса лежит отбор устойчивых к биодegradации структур и соединение их в макромолекулы. В отличие от синтеза биополимеров, протекающего по заданному генетическому коду, процесс образования гуминовых веществ подчиняется статистическим принципам [6-8]. По этой причине ГВ представляют собой смесь макромолекул переменного состава и нерегулярного строения [9,10].

Общепринятая классификация ГВ [8,9,11] основана на различии в их растворимости в кислотах и щелочах. Согласно этой классификации ГВ подразделяют на три основные составляющие: гумин – неизвлекаемый остаток, нерастворимый ни в щелочах, ни в кислотах; гуминовые кислоты (ГК) – фракция ГВ, растворимая в щелочах и нерастворимая в кислотах; фульвокислоты (ФК) – фракция ГВ, растворимая в щелочах и кислотах. Под термином "гумусовые кислоты" понимают сумму гуминовых и фульвокислот. В нашей работе для сокращенного обозначения гумусовых кислот мы использовали аббревиатуру ГФК.

О строении гумусовых кислот известно, что макроэлементами, образующими молекулы ГФК, являются углерод, водород и кислород. Азот и сера содержатся в ГФК на уровне 1-3% [1-3], обязательной составной частью ГФК являются микроэлементы и вода [2].

Макромолекулы гумусовых кислот состоят из “каркасной” (негидролизуемой) и периферической (гидролизуемой) части [2,3,9,10]. Каркасная часть представлена высокозамещенными ароматическими

фрагментами, соединенными алкильными, эфирными и др. мостиками. Преобладающими заместителями являются кислородсодержащие функциональные группы: карбоксильные, фенольные и спиртовые гидроксильные, карбонильные и метоксильные [2,8,12,13]. Периферийная часть представлена углеводно-протеиновым комплексом, ковалентно связанным с каркасной частью. Гипотетический структурный фрагмент нативных ГФК приведен на рис. 1.1 [14].

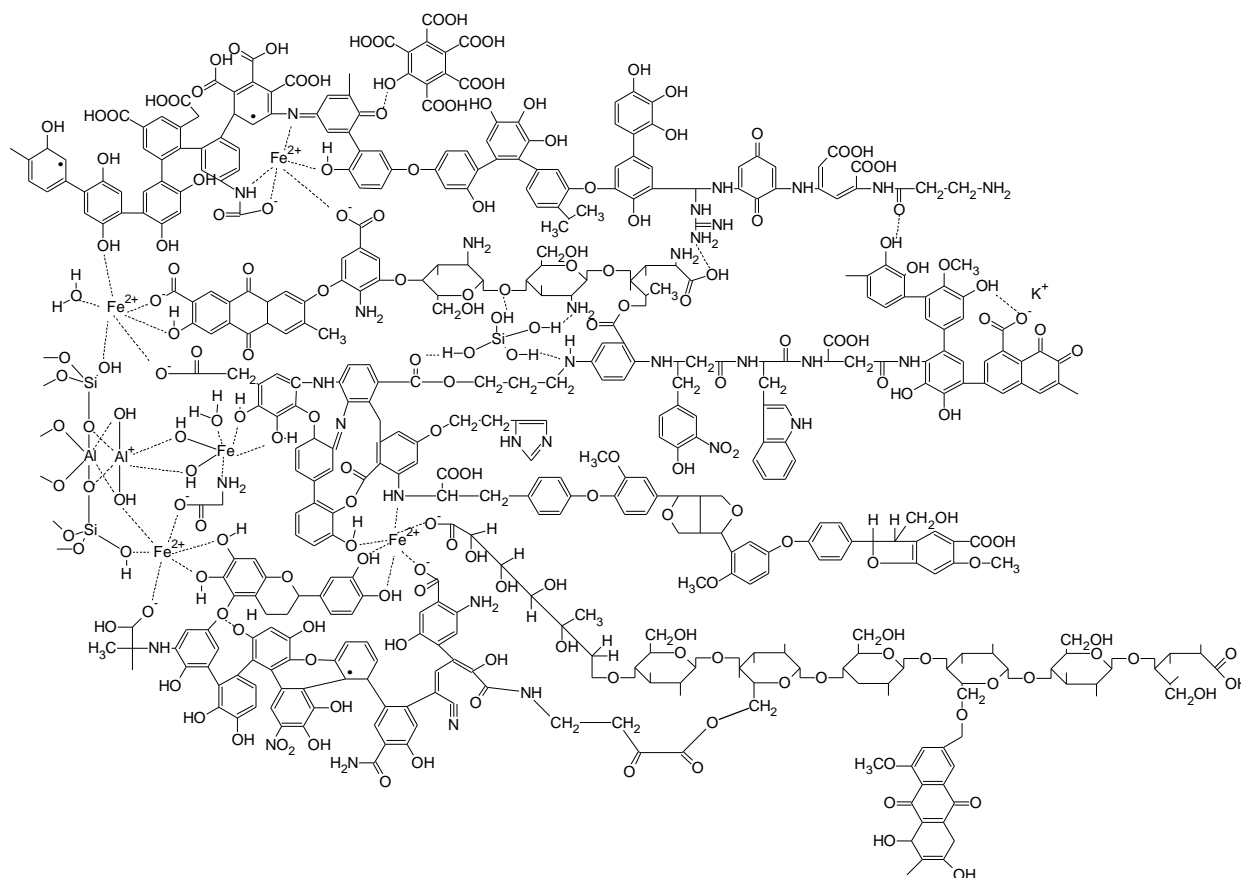


Рис. 1.1. Гипотетическая структура нативных гумусовых кислот почвы [14].

С нашей точки зрения данная модель структуры наиболее адекватна перечисленному выше комплексу структурных характеристик ГФК.

Структура ГФК обуславливает их способность к широкому спектру химических взаимодействий, обуславливающих многообразие их функций в окружающей среде. Так, ГФК выполняют функции своеобразных депо питательных веществ и микроэлементов, способствуют их транспорту в растения, участвуют в структурировании почвы [2], повышают ее катионообменную и буферную емкость. Кроме того в настоящее время все большее значение приобретает защитная функция ГФК, а именно, их способность

взаимодействовать с различными типами загрязняющих веществ, снижая их подвижность и токсичность для живых организмов [6-10].

Повсеместное распространение гумусовых кислот в биосфере обуславливает необходимость изучения взаимосвязи между структурой и реакционной способностью ГФК в реакциях различных типов. Отсюда вытекает задача надежного определения структурных характеристик ГФК и, в первую очередь, элементного и функционального состава.

1.2. Элементный состав гумусовых кислот и методы его определения

1.2.1. Характеристика элементного состава гумусовых кислот

Данные по элементному составу ГК и ФК, полученные авторами [15] в результате усреднения опубликованных результатов элементного анализа для более чем четырехсот проб, приведены в табл. 1.1.

Таблица 1.1. Средний элементный состав ГК и ФК различного происхождения [15]

Тип ГФК	Содержание элементов, % (масс.)					Ненасы*- щенность U
	C	H	N	O	S	
Гуминовые кислоты						
Почвенные	56-57	5.0-5.3	3.9-4.2	35-36	0.5-0.6	3.3
Торфяные	58-59	5.0-5.2	3.3-3.5	36-37	1.9-2.1	3.5
Поверхностных вод	51-52	4.7-4.9	1.9-2.2	40-41	0.6-2.0	3.0
Донных отложений	56-58	5.1-5.4	3.0-3.8	32-36	2.2-2.5	3.1
Фульвокислоты						
Почвенные	50-51	4.8-5.0	0.7-1.0	44-45	0.2-0.4	2.8
Торфяные	54	4.9	2.2	39	0.6	3.1
Поверхностных вод	45-46	4.2-4.4	1.8-2.3	48-50	1	2.7
Донных отложений	45	6.1	4.5	44.5	2.1	1.9

*Рассчитана из данных таблицы согласно [16]

Как видно из табл. 1.1, несмотря на химическую гетерогенность и статистический принцип формирования молекул ГФК, изменению элементного состава в зависимости от источника происхождения и фракционного состава (ФК или ГК) присуща внутренняя закономерность. Содержание углерода в гуминовых кислотах в среднем выше чем в фульвокислотах [17]. Для содержания кислорода наблюдается обратная

тенденция. Расчет степени ненасыщенности структурных единиц, которые удовлетворяли бы данным табл. 1.1, показывает, что в среднем ФК содержат больше алифатических фрагментов, тогда как ГК обогащены ароматическими. Наибольшей ненасыщенностью среди ГФК различного происхождения характеризуются торфяные ГК и ФК, что свидетельствует об высоком вкладе в их структуру ароматических фрагментов.

Гуминовые и фульвокислоты различного происхождения существенно отличаются по элементному составу. Так, например, элементный состав ФК поверхностных вод существенно отличается от ФК почв, а почвенных гуминовых кислот от гуминовых кислот торфа [18,19].

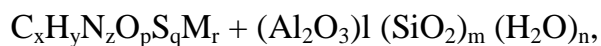
Как показано в работах [20,21] различия в структурах и элементном составе ГФК разных природных сред непосредственно связаны с источниками гумусообразования в этих системах. Так, в торфах, почвах и пресных водах основными предшественниками ГФК являются продукты разложения лигнина, полифенолы и производные фенолов, синтезируемые микроорганизмами, то есть вещества, обогащенные ароматическими структурами [22]. ГФК морских вод и донных отложений образуются, преимущественно, из остатков водорослей и планктона, главными компонентами которых являются липиды, полисахариды и пигменты - соединения алифатического и алициклического характера [23,24].

Известно также, что элементный состав ГФК одинакового происхождения может варьировать в зависимости от конкретного источника: различного типа почв [15], вод [4] и т.д.

Таким образом, определение элементного состава является одним из ключевых этапов при анализе структурных и генетических особенностей ГФК [25,26].

1.2.2. Определение элементного состава ГФК

На основе сведений, приведенных в предыдущем разделе, в общем виде брутто-формулу ГФК можно записать следующим образом:



где М – ионы металлов.

При анализе вещества такого состава могут возникать следующие проблемы:

1) Необходимость определения остаточного содержания в образце ГФК минеральных компонентов и корректировки первичных данных элементного анализа.

2) Возможное завышение результатов определения содержания кислорода и водорода из-за присутствия в препаратах воды.

3) Трудность точного определения количества N и S, обусловленные их низким содержанием по сравнению с С, Н и О.

Несмотря на широкое использование данных элементного анализа ГФК, опубликованы лишь единичные работы, посвященные изучению количественности стандартных методов, применяемых для элементного анализа ГФК [27-31]. В связи с этим ниже будут рассмотрены основные методы определения содержания элементов в ГФК, и источники систематических ошибок при их использовании.

Определение С, Н, N и S

Для определения С, Н, N в ГФК, как правило, используют метод автоматического микроанализа, позволяющий определять одновременно содержание трех элементов из навески 1.5-2 мг [27]. Процесс определения в анализаторе можно схематично разбить на три стадии: 1) окислительный пиролиз образца, 2) разделение продуктов (CO_2 , H_2O и N_2), 3) детектирование [32]. На рис. 1.2 приведены схемы автоматического определения содержания С, Н, N и S.

сложно подобрать подходящий стандарт для одновременного определения С, Н и N в ГФК. Несоответствие же между содержанием элемента в образце и стандарте всегда приводит к значительным ошибкам определения [32].

Серу в гумусовых веществах определяют как автоматически, так и вручную. Автоматическое определение серы включает те же стадии, что и анализ на С, Н, N, при этом детектируемой формой является SO_2 .

Ручной метод, как правило, включает сожжение в колбе с кислородом, поглощение оксидов слабым раствором перекиси водорода (доокисление SO_2 до SO_3) и последующее определение сульфат-иона с помощью ионной хроматографии или титрования солью бария в присутствии металлоиндикатора [27].

Данные по содержанию серы отличаются крайне низкой воспроизводимостью, но благодаря малому вкладу в элементный состав ГФК, они не вносят существенной ошибки в определение содержаний основных элементов. Однако при решении специальных задач, например, при изучении взаимодействия с тиофильными элементами, необходимо тщательно подбирать условия определения серы.

Определение кислорода

В настоящее время существуют два основных подхода к определению кислорода в органических веществах:

1) Определение по разности между массой образца и суммарной массой всех остальных элементов, входящих в его состав ($100\% - \sum(\%C, \%H, \%N, \dots)$). Недостатком этого метода является то, что на полученную величину накладываются ошибки определений содержания всех остальных элементов и зольности.

2) Прямое определение. Основные стадии этого метода, предложенного в 1939 г Шютце [33] и детально разработанного в ИНЭОС АН СССР в 40-х годах [34], показаны на рис. 1.3.

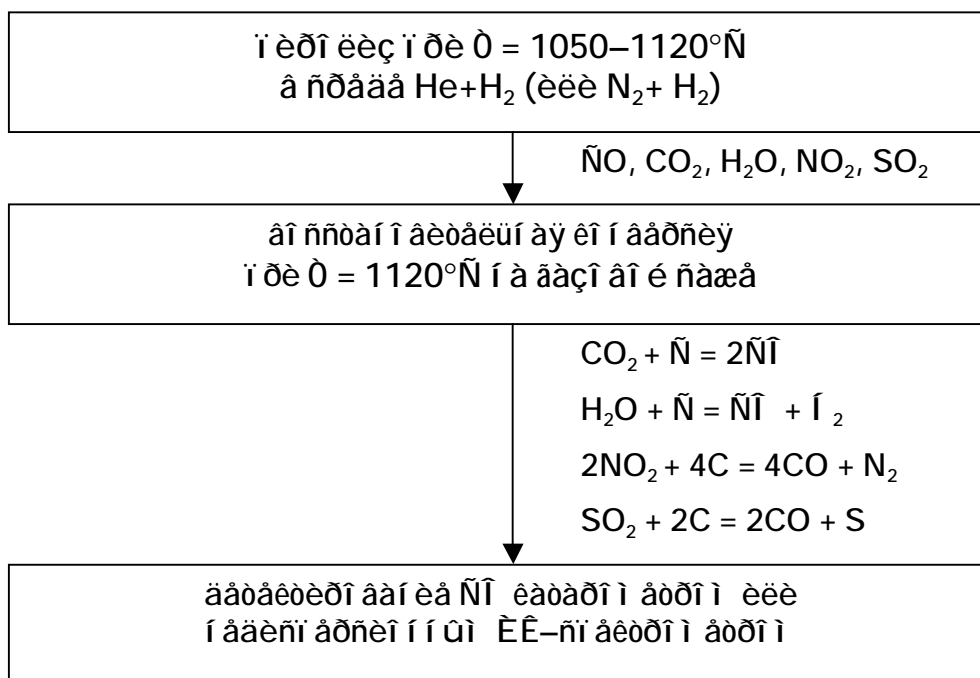
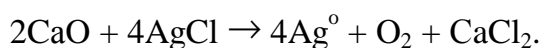


Рис. 1.3. Схема прямого определения кислорода в органических веществах.

Как видно из приведенной схемы, для правильного определения содержания кислорода в органическом веществе прямым методом необходимо количественное превращение всех продуктов восстановительного пиролиза в CO. Однако в слое газовой сажи возможно образование комплексов углерода и кислорода состава C_xO_y , где $x \gg y$ [32]. Такие комплексы довольно медленно разлагаются с выделением CO, внося ошибку в результаты анализа. Для получения правильных результатов необходимо постоянство условий анализа и однотипность анализируемых проб.

Описанный метод хорошо зарекомендовал себя для анализа беззольных органических веществ [27]. Если же в препарате присутствуют металлы, то необходимо внесение агентов, восстанавливающих или вытесняющих металлы из оксидов. В работе, посвященной определению кислорода в солях органических кислот [35], в качестве такого агента был использован хлорид серебра, выполняющий роль донора хлорид-иона:



Кроме того, как уже обсуждалось выше, результаты определения содержания кислорода сильно зависят от влажности анализируемого образца. В монографии [17] отмечается, что неодинаковые условия сушки могут приводить к существенным ошибкам в определении элементного состава. Однако, как было показано [27], для получения правильных значений

недостаточно соблюдать одинаковые условия сушки. Высушенные образцы ГФК при контакте с воздухом быстро набирают потерянную воду. Поэтому при подготовке образцов ГФК для элементного анализа правильнее уравнивать их с влагой воздуха, а затем определять влажность воздушно-сухого образца.

Определение влажности ГФК

Для определения влажности обычно используют один из двух основных методов: а) титриметрическое определение воды по методу Фишера; б) определение воды по потере веса образца при высушивании или обратному набору веса высушенного образца при экспонировании атмосферной влаге [27].

Метод Фишера основан на окислительно-восстановительной реакции между двуокисью серы и иодом, которая протекает только в присутствии воды в среде метанола [36]. Достоинством данного метода является то, что определяется только не входящая в структуру вещества вода. К числу недостатков можно отнести малую устойчивость реагента, необходимость изолирования от влаги воздуха всей установки, а также мешающее влияние примесей, которые могут реагировать с иодом, внося ошибку в определение. К числу таких примесей относятся активные карбонильные соединения, хиноны и меркаптаны [27], т.е. группировки, которые могут присутствовать в структуре ГФК. Еще одна причина, ограничивающая применимость метода Фишера для веществ гумусовой природы, – их недостаточная растворимость в безводном метаноле.

Для определения влажности согласно второму подходу образец ГФК высушивают при повышенной температуре (40-60°C) над P_2O_5 до постоянного веса или вакуумируют при нагревании до тех же температур в течение длительного времени (24 часа) и регистрируют потерю веса [27]. Применяют также этот метод в несколько модифицированном виде. После тщательного высушивания образец подвергают экспонированию атмосферной влаге, и регистрируют зависимость обратного набора веса образца от времени [31]. Такая зависимость в довольно большом временном интервале носит линейный характер. Поэтому, экстраполируя ее на момент времени $t=0$,

можно определить вес сухого образца. По разности между весом воздушно-сухого и абсолютно-сухого образца находят его влажность.

Методы потери-набора веса менее трудоемки, чем метод Фишера, и не чувствительны к присутствию веществ, активных по отношению к иоду. Однако практически невозможно подобрать оптимальную температуру для высушивания ГФК, поскольку зависимость потери веса образца ГФК от температуры не выходит на плато (рис. 1.4) [27].

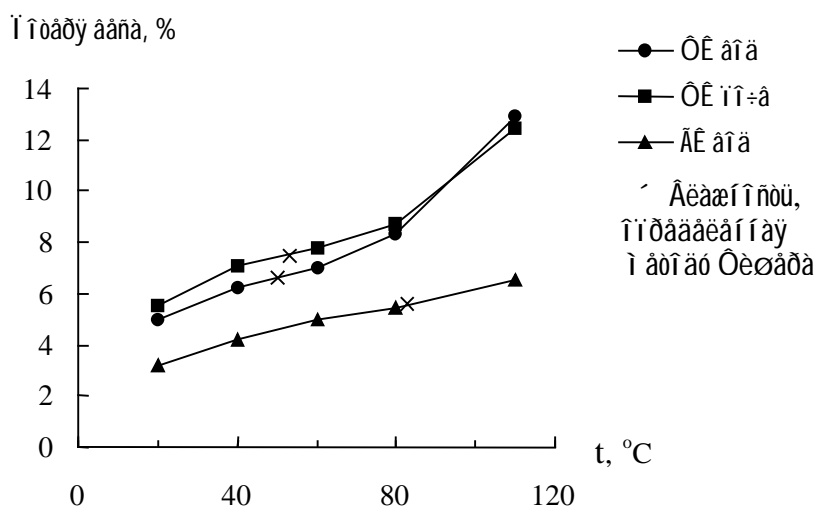


Рис. 1.4. Потери веса при высушивании образцов гумусовых кислот [27].

Потери веса медленно возрастают при повышении температуры высушивания до 80°C, а после достижения этой температуры наблюдается некоторый скачок. Такой характер зависимости говорит, вероятно, о последовательной десорбции все более прочно связанных молекул воды с переходом к элиминированию воды, входящей в структуру ГФК. Тем не менее, при сравнении результатов определения содержания воды в образцах ГФК по потере веса и по методу Фишера было установлено, что между ними наблюдается достаточно хорошее соответствие, если высушивание образцов ГФК проводится при температурах 40-60°C [27].

Таким образом, не существует абсолютного метода для определения влажности образцов ГФК, но второй метод более прост в исполнении и получил более широкое распространение.

Определение зольности

При анализе индивидуальных металлоорганических соединений определение зольности используется для расчета количества специфического

металла, входящего в состав вещества. В случае нестехиометрических соединений, таких как ГФК, зольность служит мерой общего содержания минеральных компонентов.

Зольность препаратов ГФК определяется по весу минерального остатка после полного сжигания образца на воздухе или в токе кислорода. Однако далеко не всегда уделяется внимание достижению полноты сжигания. Так, в работе [27] приведены результаты определения зольности образцов ГФК четырьмя различными лабораториями. Каждая лаборатория выполняла определение зольности, придерживаясь индивидуальных условий сжигания (время и температура). В результате для одного и того же высокзолного образца разброс значений составил более 20% от величины. Такая ошибка в определении зольности может привести к значительному искажению соотношения О/С, если кислород определяется по разности.

Следовательно, для высокзолных образцов некорректно определенная величина зольности может привести к существенному искажению значений содержаний основных конституционных элементов.

Резюмируя рассмотрение методических аспектов элементного анализа ГФК, можно сказать, что важнейшим источником систематических ошибок в определении элементного состава ГФК являются неучет зольности и влажности образцов, а также ошибки в их определении.

1.3. Функциональный состав гумусовых кислот и методы его исследования

1.3.1. Краткая характеристика функционального состава гумусовых кислот

В настоящее время в гумусовых кислотах обнаружено более десяти различных типов функциональных групп: карбоксильные, фенольные и спиртовые гидроксильные, карбонильные, хинонные, метоксильные, сложноэфирные, енольные, амино-, амидо- и имидогруппы, сульфо-, тиольные и дисульфидные группы [8]. Поскольку суммарное содержание серы

и азота в ГФК обычно не превышает 5% (п. 1.1, табл. 1), можно считать, что химическое поведение гумусовых кислот определяется, в основном, кислородсодержащими функциональными группами. Обобщенные сведения о распределении кислорода по различным функциональным группам в ГФК приведены в табл. 1.2.

Таблица 1.2. Распределение кислорода между функциональными группами в молекулах почвенных гумусовых кислот [2,8,13]

Общее содержание кислорода, %	COOH	ArOH	ROH	C=O	Учтенный кислород, %
	----- % кислорода -----				
Почвенные гуминовые кислоты					
37.2	24	33	10	8	75
36.8	26	25	15	7	74
35.4	18	38	13	4	73
Почвенные фульвокислоты					
47.3	58	19	12	6	95
44.8	65	12	13	9	99
47.7	61	9	16	4	90

Как видно из табл. 1.2, около 75% кислорода в молекулах ГК и около 95% – в ФК распределено между четырьмя типами функциональных групп: карбоксильными, фенольными и спиртовыми гидроксильными, и карбонильными, причем вклад этих групп в общее содержание кислорода различен для гуминовых и фульвокислот. Доля кислорода, входящего в состав карбоксильных групп, существенно выше для фульвокислот.

Обращает на себя внимание тот факт, что в ФК доля кислорода, входящего в состав перечисленных в таблице групп, значительно выше, чем в ГК. Это может быть связано, с одной стороны, с наличием в структуре гуминовых кислот большего количества других кислородсодержащих групп (главным образом, эфирных и сложноэфирных); с другой, – со значительными стерическими и конформационными эффектами, препятствующими полному определению карбоксильных и гидроксильных групп в гуминовых кислотах методами функционального анализа [8]. До настоящего времени однозначно не установлено, какая из указанных причин является основной.

Методом ^{13}C -ЯМР-спектроскопии определяют более высокие содержания карбоксильных и гидроксильных групп в ГФК [37,38], однако, неоднозначность количественной интерпретации ^{13}C -ЯМР-спектров гумусовых кислот не позволяет безоговорочно полагаться на эти данные.

Тот факт, что более 50 кислорода в ГК и более 70% - в ФК входит в состав карбоксильных и фенольных гидроксильных групп, указывает на определяющую роль этих групп для кислотно-основных и комплексообразующих свойств ГФК [2].

Содержание функциональных групп в ГФК, как и в других нестехиометрических соединениях, выражают в миллимолях или миллиэквивалентах на единицу массы, обычно - на грамм (ммоль/г) [13].

Согласно литературным данным [11,39,40], содержание функциональных групп в ГФК варьирует в зависимости от источника происхождения. Препараты водного происхождения, как правило, характеризуются повышенным содержанием карбоксильных групп [41]. Однако более отчетливо прослеживается уже отмеченная тенденция: независимо от источника происхождения, ФК характеризуются более высоким содержанием карбоксильных групп, чем ГК.

Для определения карбоксильных и гидроксильных групп в ГФК используют различные методы: органический функциональный анализ [42-45], титриметрические методы [45-47], ЯМР-спектроскопию и др. [48-50]. Однако все традиционные методы функционального анализа лишь ограниченно применимы для исследования ГФК, что обусловлено низкой растворимостью ГФК в нейтральных водных средах и большинстве органических растворителей, а также протеканием побочных процессов (окисление, дегидратация и др.) [8,13].

Методы, применяемые для определения карбоксильных и гидроксильных групп в ГФК можно разделить на две основные группы [39]:

а) основанные на химической модификации функциональных групп и позволяющие определять как кислотные, так и не проявляющие кислотных свойств функциональные группы;

б) основанные на нейтрализации кислотных групп ГФК сильными и слабыми основаниями, позволяющие определять только кислотные группы.

Данное разделение и было положено в основу рассмотрения основных методов определения карбоксильных и гидроксильных групп ГФК, которые приводятся ниже.

1.3.2. Методы определения функциональных групп ГФК, основанные на химической модификации

Для определения карбоксильных групп в ГФК используют реакции алкилирования реагентами, вводящими метильные, триметилсилильные и другие группы. Для определения гидроксильных групп используют как алкилирование, так и ацилирование, переводя гидроксильные группы как в простые, так и в сложные эфиры.

Метилирование

Метилирование широко используется для анализа многих карбоксил- и гидроксилсодержащих природных и синтетических соединений: углеводов [51,52], жирных кислот [53], лигнинов [54].

Для модификации ГФК используют метилирующие агенты, традиционные для анализа углеводов и жирных кислот: diazometan [55-60], метилиодид в присутствии окиси серебра [55,60-62], метанол в присутствии HCl или BF_3 [39,63], и диметилсульфат [13,55,64]. Рис. 1.5 иллюстрирует использование перечисленных реагентов для определения кислородсодержащих функциональных групп ГФК.

Из приведенной схемы видно, что в зависимости от используемого реагента и последующей обработки производного с помощью метилирования можно определить:

- 1) сумму всех карбоксильных и гидроксильных групп;
- 2) сумму карбоксильных и фенольных гидроксильных групп;
- 3) только карбоксильные группы;
- 4) сумму фенольных и спиртовых гидроксильных групп.

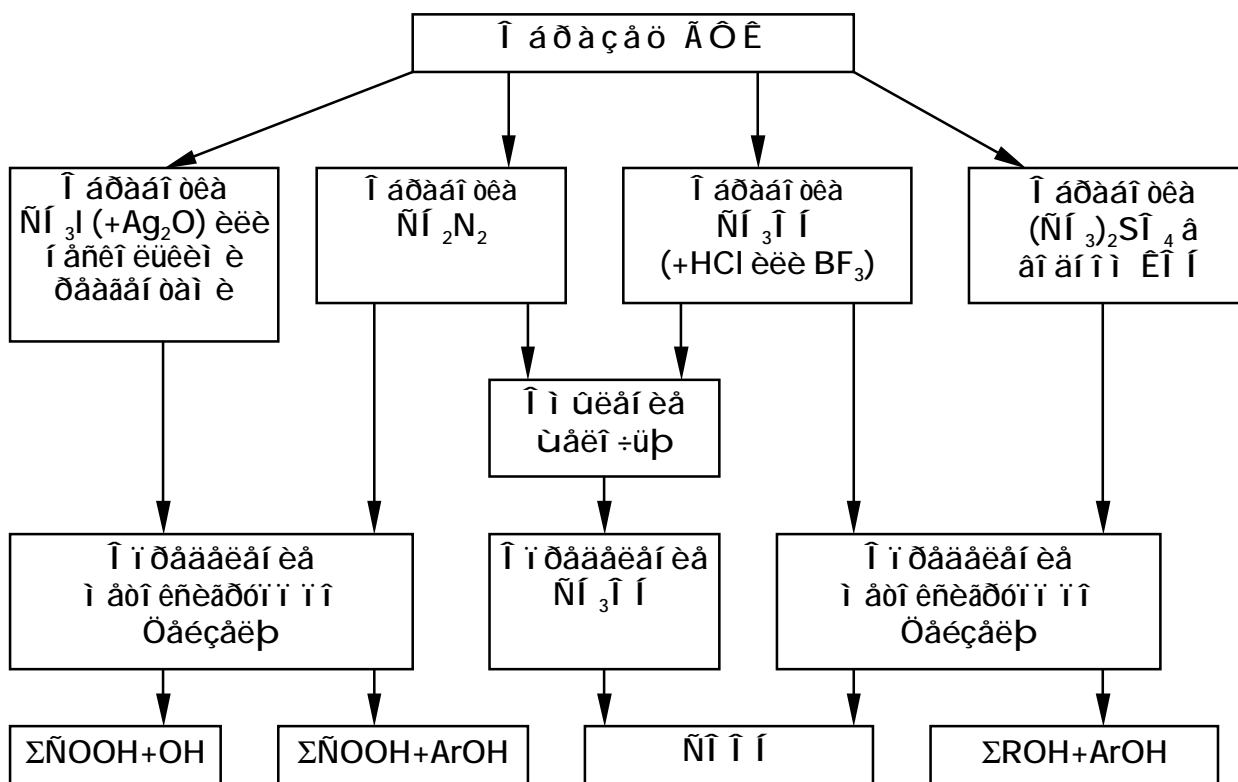


Рис. 1.5. Использование метилирования в анализе гумусовых кислот.

Метилирующие агенты, как правило, неселективны. Поэтому для определения карбоксильных групп в ГФК прибегают к дополнительной стадии – щелочному гидролизу этерифицированных производных [13].

Кратко остановимся на особенностях использования отдельных реагентов. Большим преимуществом диазометана перед другими реагентами являются мягкие условия проведения реакции (комнатная температура) и возможность использования разных растворителей, включая воду [65]. Метилиодид (в присутствии Ag_2O или $NaNH$) и метанол (в присутствии кислот Льюиса) также позволяют использовать достаточно мягкие условия, однако, очень чувствительны к присутствию воды [55,60,66,67]. Диметилсульфат требует проведения реакции при нагревании в среде 30%-ной водной щелочи, что может приводить к протеканию побочных реакций и частичной деструкции ГФК [8,13]. Поэтому для определения общего содержания гидроксильных групп в ГФК чаще используют ацетилирование.

Общей проблемой методов, включающих стадию метилирования, является достижение полноты превращения. Так, в работе [68] на основе сравнения ИК-спектров гумусовых кислот, подвергнутых метилированию различными реагентами, было установлено, что независимо от используемого

метода и реагента, максимальная степень превращения не превышала 80-85%. Для получения воспроизводимых данных все методы метилирования требуют многократного повторения обработки (до 8-11 раз) [39,59,66].

Традиционным методом количественного определения функциональных групп, подвергшихся метилированию, является оценка содержания метоксильных групп в исходных и метилированных образцах по Цейзелю [69]. Метод основан на расщеплении метиловых эфиров йодной кислотой с образованием метилиодида. Последний окисляют до иода и определяют титрованием тиосульфатом. Метод универсален для простых и сложных метиловых эфиров. К числу его недостатков можно отнести многостадийность и необходимость использования больших количеств вещества.

Недавно был предложен экспрессный метод определения карбоксильных групп в ГФК, сочетающий метилирование и газохроматографический анализ [59]. Согласно этому методу метилированный диазометаном образец гидролизуют, а выделившийся метанол этерифицируют пропионилхлоридом. Количество образовавшегося в результате метилпропионата определяют газохроматографически. Метод позволяет провести определение с малым количеством вещества (4-16 мг), однако его воспроизводимость не превышает $\pm 15-20\%$, а применимость показана лишь для ФК.

Ацетилирование

Наиболее универсальный метод определения гидроксильных групп заключается в ацилировании уксусным ангидридом в пиридине с последующим титриметрическим определением непрореагировавшего ангидрида в реакционной смеси. Уксусный ангидрид реагирует с гидроксильными соединениями всех типов. Исключение составляют третичные спирты и пространственно затрудненные фенолы (тризамещенные и более) [70].

Для определения общего содержания гидроксильных групп в ГФК был предложен следующий вариант метода [8,71]. После ацилирования производные промывают и высушивают над пятиокисью фосфора, затем гидролизуют кипячением с крепкой щелочью. После гидролиза реакцию

смесь подкисляют и отгоняют образовавшуюся свободную уксусную кислоту. Количество последней определяется титрованием. Данная методика достаточно универсальна, но весьма трудоемка и требует больших количеств ГФК (~100 мг).

В работе [45] предложена методика определения, в которой ацетилированные производные переэтерифицируются бутанолом, а количество образовавшегося бутилацетата определяется газохроматографически. Стадии ацилирования и переэтерификации проводятся в герметичных ампулах, что позволяет избежать потерь при кипячении. В таком варианте метода существенно сокращается как время анализа, так и требуемое для определения количество вещества (до 5-15 мг), что делает данную методику особенно привлекательной для анализа большого количества образцов ГФК. Однако она была разработана для анализа образцов водных ГК и о ее применимости для ГК и нефракционированных препаратов не сообщается.

В целом, методы, основанные на химической модификации не нашли широкого применения в анализе ГФК. Однако в последнее время они все чаще используются в сочетании с методом ЯМР-спектроскопии на различных ядрах [57]. Примеры такого комбинированного подхода будут рассмотрены в следующем разделе.

Методы функционального анализа ГФК, сочетающие химическую модификацию и ЯМР-исследования

Спектроскопическое исследование химически модифицированных образцов ГФК обладает значительными преимуществами перед анализом исходных проб. Модификация ослабляет водородные связи и другие ассоциативные взаимодействия, приводящие к уширению и перекрыванию соседних полос в ЯМР-спектрах ГФК [37,57]. Это облегчает количественную интерпретацию спектров. Модификация с помощью реагентов, содержащих гетероэлемент (F, Si), и регистрация спектров на ядрах соответствующего гетероатома является наиболее эффективным методом устранения перекрывания сигналов атомов разных химических типов. Рассмотрим

конкретные примеры использования данного подхода для изучения функционального состава ГФК.

Авторы [60] успешно применили для определения СООН- и ОН-групп ^{13}C ЯМР-спектроскопию ГФК, метилированных метилиодидом и диазометаном, обогащенными изотопом ^{13}C . Однако метод очень дорог.

В отличие от спектров ^{13}C -ЯМР, при регистрации ПМР-спектров метилирование не исключает перекрывание сигналов – не достигается разрешение сигналов метильных групп в простых эфирных и сложноэфирных группировках [57]. Для преодоления этого препятствия в работе [63] использовали следующий подход. Образец сначала ацетиловали, а затем метилировали: сигналы ацетильной и метоксильной групп хорошо разрешаются в ПМР-спектре. Для количественных расчетов вычитали из спектра образца, метилированного и ацетилованного обычными реагентами, спектр препарата, обработанного полностью дейтерированными уксусным ангидридом и метанолом. Недостатком такого метода можно считать многостадийность обработки и сопряженные с этим потери образца.

Для определения активных фенольных гидроксидов в работе [63] использовали ацилирование уксусным ангидридом в среде гидрокарбоната натрия по Шоттену-Бауману [73]. Общее содержание гидроксидов определяли по ПМР-спектрам образца, ацетилованного в пиридине в присутствии 4-диметиламинопиридина в качестве катализатора.

Еще один метод определения суммарного содержания гидроксильных групп – триметилсилилирование образцов ГФК (как таковое и в сочетании с метилированием) с последующей регистрацией и обработкой ^{29}Si ЯМР-спектров [50,74]. В работе [50] получено хорошее совпадение результатов определения функциональных групп в ГФК водного происхождения с помощью силилирования гексаметилдисилазаном с результатами потенциметрического титрования. Для разделения сигналов силилированных гидроксильных и карбоксильных групп проводили предварительное метилирование диазометаном в присутствии катализатора. По разности интегралов необработанной и метилированной пробы определяли содержание гидроксильных групп. Метод позволяет определить все важнейшие функциональные группы ГФК. Существенным недостатком такого метода

являются необходимость длительного накопления спектров, а также сложность их количественной интерпретации [57].

Следует отметить, все вышеописанные методы, сочетающие дериватизацию и ЯМР-спектроскопию, разработаны для образцов ГФК водного происхождения или ФК, характеризующихся более низкой средней молекулярной массой и имеющих более высокую растворимость. Поэтому при всей информативности и привлекательности данных методов можно констатировать, что их применимость на сегодняшний день, к сожалению, показана лишь для образцов указанного типа.

Результаты анализов гумусовых кислот с использованием химической модификации приведены в табл. 1.3.

Таблица 1.3. Функциональный состав ГФК по данным методов, основанных на химической модификации

Тип ГФК	Определяемые группы	Метод определения		Содержание, ммоль/г	Лит.
		реагент	колич. метод		
ГК почв	COOH	CH ₃ OH+HCl	Цейзеля	2.1-3.1	[39]
		CH ₂ N ₂	Цейзеля	4.7-7.2	[42]
	COOH+ArOH	CH ₂ N ₂		5.7-8.7	[75]
		CH ₃ I+Ag ₂ O		6-9	[76]
		(CH ₃) ₂ SO ₄	Цейзеля	3.7-8.3	[77]
ArOH+ROH	(CH ₃) ₂ SO ₄		7.8-10.1	[75]	
ГК угля	COOH	Ac ₂ O+Py	титрование	6.9-9.2	[71]
		CH ₃ OH+HCl	Цейзеля	2.0-3.2	[66]
	ArOH+ROH	(CH ₃) ₂ SO ₄	Цейзеля	3.8-4.3	[66]
ФК почв	COOH	CH ₃ OH+HCl	Цейзеля	2.6-3.0	[39]
	COOH+ArOH	CH ₂ N ₂	Цейзеля	5.3-5.8	[39]
	ArOH+ROH	Ac ₂ O+Py	титрование	6.7-10	[71]
ФК поверхност- ных вод	COOH	CH ₂ N ₂	ГЖХ	3.8-4.3	[59]
		CH ₂ N ₂	¹ H-ЯМР	6.8-7.6	[63]
	ArOH+ROH	(CH ₃ Si) ₂ NH	²⁹ Si-ЯМР	5.8	[50]
		Ac ₂ O+Py	ГЖХ	13	[45]
		Ac ₂ O+Py	¹ H-ЯМР	4.4	[63]
		(CH ₃ Si) ₂ NH	²⁹ Si-ЯМР	6.6	[50]
ArOH	Ac ₂ O+NaHCO ₃	¹ H-ЯМР	1.4	[63]	

Как видно из таблицы, в некоторых случаях при использовании метилирования получают заниженные по сравнению с обычно приводимыми средними данными содержания карбоксильных групп и суммарного содержания карбоксильных и фенольных гидроксильных групп, например в ФК почв и поверхностных вод. Достаточно низкими представляются также результаты определения суммы всех гидроксильных групп и фенольных гидроксидов методом ацилирования в сочетании с ЯМР. В целом достаточно трудно выявить какую-либо тенденцию и сделать однозначные выводы о пригодности методов химической модификации для определения функциональных групп в ГФК без сравнения с результатами параллельных определений независимыми методами.

1.3.3. Методы определения кислотных функциональных групп ГФК, основанные на нейтрализации сильными и слабыми основаниями

Потенциометрическое титрование

Потенциометрическое титрование является общепринятым методом определения содержания кислотных групп [70]. Однако использование этого простого метода для анализа ГФК сопряжено со значительными трудностями. Во-первых, кривые титрования ГФК не содержат четких перегибов (рис. 1.6), поэтому для установления конечной точки титрования требуется их математическая обработка [78].

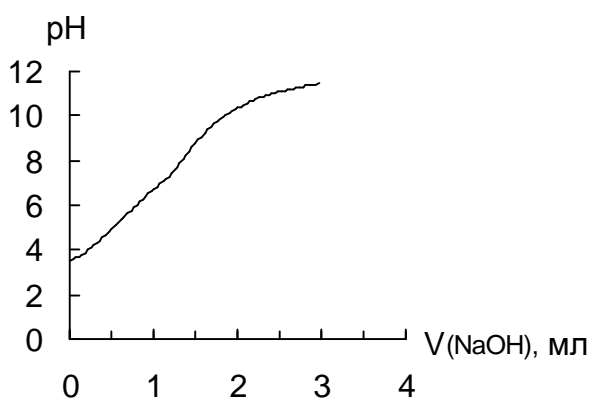


Рис. 1.6. Типичная кривая потенциометрического титрования ГФК [40].

Во-вторых, для полноты определения слабокислотных групп требуется достижение очень высоких концентраций щелочи, при которых точные измерения pH раствора затруднены [40,79]. Несмотря на указанные проблемы, данный метод широко используется для оценки кислотности ГФК [80-82].

Наиболее распространенный способ определения точки эквивалентности при анализе ГФК заключается в титровании до фиксированного значения pH [47,81-83]. Обычно pH 7.0 считают окончанием титрования карбоксильных групп, а pH 10.2-10.3 – всех кислотных групп [47,80,84]. Очевидно, что такой способ определения вклада карбоксильных групп весьма условен, т.к. pH точки эквивалентности при титровании многих органических кислот лежит выше 7 [79], а слабых фенольных гидроксидов – выше 11.

Другой способ заключается в подборе с помощью какой-либо математической модели минимального набора типов кислотных групп и их

концентраций, удовлетворительно описывающих экспериментальную кривую титрования [40] (более подробно этот вопрос будет рассмотрен в главе о протолитических равновесиях). Суммарное содержание групп с более низкими значениями pK полагают равным содержанию карбоксильных групп [85]. Такой способ, вероятно, более объективен при условии использования адекватной математической модели.

Результаты определения кислотных групп ГФК потенциометрическим титрованием, как правило, существенно ниже данных других методов [83]. Вероятно, это связано с неполной диссоциацией фенольных гидроксидов в условиях титрования.

Для более полного определения кислотных групп ГФК используют потенциометрическое титрование в неводных средах [45,46,62], так как органические растворители способствуют уменьшению pK слабых кислот и дифференциации близких pK [86]. В результате получают кривые титрования ГФК с более выраженными одним или даже двумя перегибами [46]. В качестве растворителей используют пиридин, этилендиамин, ДМФА [45,62] и ДМСО [46]; в качестве титранта – растворы алкоголята натрия в безводном спирте или гидроксида тетрабутиламмония в изопропанолу.

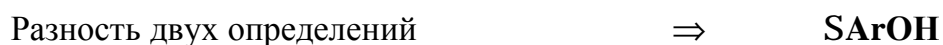
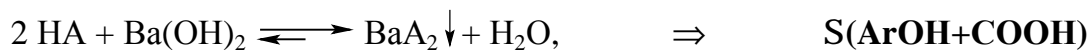
Следует отметить, что широкого распространения метод титрования в неводных средах не получил, что связано с низкой растворимостью большинства образцов ГФК в органических растворителях и невыполнимостью основного требования метода – отсутствия в анализируемой системе воды [70] (ГФК практически всегда содержат химически связанную воду).

Помимо потенциометрического для определения содержания кислотных групп в ГФК используются и другие виды титрования: термометрическое [87,88], кондуктометрическое [89], осадительное с цетилтриметиламмонием [90]. Однако ввиду сложного аппаратного оформления либо трудоемкости они не получили широкого распространения.

Баритовый и Са-ацетатный методы

Гумусовые кислоты образуют со щелочноземельными металлами малорастворимые соли [8,66]. Данное свойство используется в традиционных

методах определения кислотных групп в образцах ГФК по реакциям с гидроксидом бария и ацетатом кальция:



(A – кислотный остаток гумусовых кислот)

Для оценки числа прореагировавших групп после осаждения гуматов в баритовом методе избыток $\text{Ba}(\text{OH})_2$ титруется HCl , в Ca-ацетатном – определяется количество уксусной кислоты, высвободившейся в результате реакции. Несмотря на образование малорастворимых соединений, обе реакции в значительной степени обратимы [40], и для достижения полноты превращения необходим существенный избыток реагента. В связи с этим в обоих случаях реагент берется в избытке. Удаление ГФК из раствора в виде осадка гуматов бария или кальция приводит к сдвигу равновесия вправо и, следовательно, более полному определению групп по сравнению с потенциметрическим титрованием.

Баритовый и Ca-ацетатный методы были разработаны в 30-х годах Стадниковым и сотр. [66,91-96] для анализа препаратов ГК углей. Авторами было показано, что предельное количество бария, поглощаемого гумусовыми кислотами из раствора гидроксида, соответствовало количеству метоксильных групп, определяемых в ГК после исчерпывающего метилирования. Предельное количество Ca, поглощаемого из раствора $\text{Ca}(\text{OAc})_2$ и, соответственно, количество выделившейся уксусной кислоты, хорошо согласуется с содержанием карбоксильных групп, определенным метилированием образца метанолом в присутствии HCl [66,94]. Данный факт был интерпретирован как подтверждение количественности баритового и Ca-ацетатного методов [91,92].

Авторами было также установлено, что простые эфиры ГФК, полученные метилированием диметилсульфатом, поглощают столько же кальция, как и исходный образец. Сложные эфиры ГФК (обработка метанолом в присутствии HCl) – проявляют некоторую остаточную реакционную способность, обусловленную обменом реагента с фенольными гидроксилами, более активными в отсутствие свободных карбоксильных

групп; тогда как ГФК, подвергнутые исчерпывающему метилированию диазометаном, вообще не реагируют с ацетатом кальция [66]. Данные факты позволили авторам рекомендовать сочетание баритового и Са-ацетатного методов в качестве простого и доступного способа определения содержания фенольных гидроксиллов и карбоксильных групп в ГК угля. Применимость данных методов для анализа ФК и нефракционированных препаратов ГФК авторами не рассматривалась.

Позднее было предложено множество модификаций данных методов, направленных в основном на уменьшение количества препарата, необходимого для анализа [87,88,97-101]. Однако не были решены основные проблемы баритового и Са-ацетатного методов – четко не определены условия количественного протекания реакций разных препаратов с обоими реагентами [40].

При использовании данных методов для анализа ГФК возникают три основных проблемы:

1) Выбор количественных соотношений реагент/субстрат – в различных вариантах методик без обоснования рекомендуются различные соотношения [8,66,100].

2) Правильность определения точки эквивалентности при количественном определении избытка $\text{Ba}(\text{OH})_2$ или выделившейся уксусной кислоты [40,88].

3) Влияние на результаты определения образования растворимых гуматов и фульватов Ва и Са [81,87,88].

Заключая рассмотрение баритового и Са-ацетатного методов можно сказать, что они являются доступными и достаточно универсальными для анализа ГФК почв и углей, тогда как определение границ и условий их применимости для анализа водных и других образцов должны составить предмет дополнительного исследования.

Данные о содержании кислотных групп в ГФК различного происхождения, полученные с помощью потенциометрического титрования, баритового и Са-ацетатного методов приведены в табл. 1.4.

Таблица 1.4. Общее содержание кислотных групп и содержание карбоксильных групп в ГФК по данным методов, основанных на нейтрализации

Тип ГФК	Определяемые группы	Метод	Содержание, ммоль/г	Лит.
ГК почв	COOH	потенц. (вода)	3.4	[102]
		Са-ацетатный	1.5-4.7	[8,83]
	COOH+ArOH	потенц. (вода)	3.0-6.0	[82,83]
ГК торфяных	COOH	Са-ацетатный	2.3-4.6	[39]
	COOH+ArOH	баритовый	6.2-8.5	[39]
ГК угля	COOH	Са-ацетатный	2.0-3.6	[66,94]
	COOH+ArOH	баритовый	7.2-8.7	[92]
ГК донных отложений	COOH	Са-ацетатный	2.2-3.9	[100]
	COOH+ArOH	баритовый	3.7-5.8	[100]
ФК почв	COOH	Са-ацетатный	8.5-9.1	[13,99]
	COOH+ArOH	баритовый	9-14	[13,99]
ФК поверхностных вод	COOH	потенц. (вода)	4.7	[45]
		потенц. (ДМФА)	4.8	[45]
		Са-ацетатный	4.6-10.1	[100]
	COOH+ArOH	потенц. (вода)	6.7	[78]
		потенц. (ДМФА)	6.1	[45]
		баритовый	12.2	[100]
ФК грунтовых вод	COOH	потенц. (ДМФА)	4.2-5.6	[45]
	COOH+ArOH	потенц. (вода)	4.8-5.4	[45]
		потенц. (ДМФА)	5.0-8.1	[45]
ФК морских вод	COOH	Са-ацетатный	4.4-8.9	[100]
	COOH+ArOH	баритовый	5.3-13.4	[100]

Из табл. 1.4 видно, что диапазоны содержаний кислотных групп в ГФК различного происхождения перекрываются. Четко прослеживается лишь одна тенденция – более высокое содержание кислотных групп в ФК, по сравнению с ГК.

Из сравнения данных таблиц 1.7 и 1.8 можно сделать вывод о том, что методы, основанные на модификации, дают в среднем более низкие результаты. Это, по-видимому связано с большим влиянием стерических факторов в реакциях с органическими реагентами, чем при взаимодействии с ионами металлов, и сдвигом равновесия реакций солеобразования за счет образования малорастворимых соединений.

Проведенный анализ литературных данных показывает, что несмотря на обилие экспериментальных подходов к определению кислородсодержащих функциональных групп в препаратах ГФК, трудно выбрать метод, дающий

наиболее адекватные результаты для любого типа образцов. По-видимому, наиболее перспективным является использование нескольких независимых методов исследования.

1.4. Протолитические свойства гумусовых кислот и способы их описания

Для описания и прогнозирования взаимодействия гумусовых кислот с ионными веществами при различных условиях среды необходимы характеристики их протолитических свойств: значения констант кислотной диссоциации [40]. Непосредственным способом изучения протолитических равновесий и определения констант диссоциации является кислотно-основное потенциометрическое титрование [79]. Однако количественная интерпретация кривых титрования гумусовых кислот, обычно не содержащих явных перегибов (разд. 1.3.3), является весьма сложной и неоднозначной задачей. Причинами тому – наличие большого числа химически неидентичных кислотных групп (химическая гетерогенность) и полиэлектролитные эффекты [40,103,104].

В отличие от низкомолекулярных электролитов диссоциация ионогенных групп в полиэлектролитах (ПЭ) происходит не независимо друг от друга. Диссоциация каждой последующей группы происходит в электрическом поле уже продиссоциировавших групп [105]. В связи с этим кислотные свойства ионогенных групп ПЭ невозможно охарактеризовать одной константой диссоциации K или набором ступенчатых констант $\{K_1, K_2, \dots, K_n\}$, поскольку при достаточно большом n экспериментальное определение n констант невозможно и малоэффективно. Для описания протолитических свойств ПЭ пользуются величиной, называемой кажущейся константой диссоциации. Рассчитывают ее по кривой титрования ПЭ так же, как это делается для низкомолекулярных кислот [105,106]:

$$K = \frac{[A^-][H^+]}{[HA]} = [H^+] \frac{a}{1-a} \quad (1.1)$$

или в логарифмической форме:

$$pK = pH - \lg \frac{a}{1-a} \quad (1.2)$$

В отличие от низкомолекулярных протолитов, константы диссоциации которых не зависят от α , кажущиеся константы диссоциации ПЭ сложным образом зависят от α [105]. Вид зависимости pK от α определяется природой ПЭ, ионной силой, температурой раствора и другими факторами. Существуют факторы, способствующие увеличению pK' с ростом a (химическая гетерогенность [107,108], электростатические взаимодействия групп [105-111]), и те, действие которых ведет к уменьшению pK' с ростом a (наличие конформационных переходов [106]). Причем отдельный учет их вкладов в изменение pK крайне затруднителен [105].

Математические модели описывающие протолитические свойства гумусовых кислот

Существуют два основных подхода к описанию протолитических свойств ПЭ. Согласно одному из них [105,109,112] рассчитывают характеристические константы диссоциации pK^0 индивидуальных ионогенных групп путем экстраполяции зависимости pK от a к нулевой степени диссоциации. Наибольшее внимание при этом уделяется результатам, получаемым при высоких ионных силах, когда полиэлектролитный эффект ослабляется, и значение pK приближается к pK соответствующих мономеров [106].

Однако для определения характеристических констант прибегают к экстраполяции, и точность получаемых значений зачастую невелика. При определении характеристических констант каждого типа ионогенных групп ПЭ со сложным химическим составом часто приходится прибегать к сложным искусственным приемам [113], что дополнительно снижает точность рассчитываемых значений. Поэтому использование рассматриваемого подхода оправдано главным образом для простых по составу полиэлектролитов.

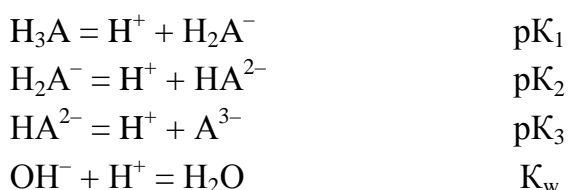
Метод характеристических констант, несмотря на упомянутые ограничения, достаточно часто используется для описания титрования карбоксильных групп ГФК. Например, таким методом из потенциометрических данных рассчитаны характеристические константы для

двух типов карбоксильных групп в коммерческом образце ГК (pK^0 3.03 и 5.12) [114]; и речных ФК ($pK^0 = 2.2-2.35$) и ГК ($pK^0 = 2.5-2.6$) [115].

Второй подход заключается в максимально адекватном описании кривой титрования с помощью минимально возможного числа параметров (констант диссоциации и концентраций ионогенных групп). Их расчет производят методом наименьших квадратов (МНК) (линейным или нелинейным). Такой подход достаточно универсален и его рассмотрению посвящен следующий раздел.

Модель химических реакций

Модель представляет собой наиболее общий случай, когда допускают наличие в растворе произвольных химических форм и реакций. В качестве пробной модели задают некоторый набор реакций, например [116]:



Учтя все уравнения связи (уравнения материального баланса и электронейтральности), записывают уравнение для pH в каждой точке кривой. Полученную систему уравнений решают, задавая начальные приближения значений K_i . Затем значения констант уточняют с помощью МНК.

В работе [117] таким методом моделировали протолитические свойства препаратов ФК, выделенных в разное время из вод р. Москва. “Мономеры” ФК рассматривали как многоосновные кислоты. В табл. 1.5 приведены наборы констант диссоциации, адекватно описывающие кривые титрования трех образцов.

Таблица 1.5. Наборы pK_i , описывающие протолитические свойства ФК р.Москва [117]

Образец	pK_1	pK_2	pK_3	pK_4	pK_5
1	2.59	5.03	8.95	–	–
2	~ 2	4.18	9.02	9.84	–
3	не опр.	4.43	5.68	9.49	9.33

Как видно из таблицы, для описания кривых титрования ФК в рамках данной модели достаточно учесть три-четыре реакции. Однако не понятно, какой структурный фрагмент в ФК может соответствовать четырех- и более

основной кислоте. Достоинство данной модели – простота: максимальное соответствие эксперименту можно достичь при учете минимума равновесий. Недостаток – трудность физической интерпретации полученных равновесий и констант, то есть, чисто формальный подход.

Модель смеси одноосновных кислот

В 1926 г. Симмсом [118] было показано, что в ряде случаев протолитические равновесия в растворах ПЭ можно описать моделью смеси одноосновных кислот. Основным критерий применимости такой модели – выполнение условия: $K_1 > K_2 > \dots > K_n$. Уравнение кривой титрования смеси N одноосновных кислот может быть записано в виде:

$$\alpha = \sum_{i=1}^N \frac{q_i K_i}{K_i + [H^+]} \quad (1.3)$$

Здесь α – средняя степень диссоциации, q_i – мольная доля кислоты с константой диссоциации K_i в смеси. Набор пар значений (q_i, pK_i) называется рК-спектром, а метод моделирования протолитических свойств с помощью рК-спектра – рК-спектроскопией [119]. При небольших N расчет с помощью МНК приводит к дискретному рК-спектру (формальный учет химической гетерогенности и пренебрежение электростатическими эффектами).

Построение дискретного рК-спектра использовали для описания протолитических равновесий ГФК в работах [108,120,121]. С помощью данного метода кривые титрования ФК и ГК хорошо описываются наборами из 4-6 пар значений (s_i, pK_i). Однако в решении часто содержатся значения рК, которые трудно соотнести с конкретными структурными фрагментами ГФК [121].

Предельным случаем модели смеси одноосновных кислот является модель непрерывного рК-спектра, предполагающая отсутствие двух идентичных групп в молекуле ПЭ. Кислотно–основные свойства ПЭ в этом случае описываются непрерывными функциями распределения констант диссоциации. При $N \rightarrow \infty$ уравнение кривой титрования (1.3) принимает интегральный вид:

$$a = \int_{-\infty}^{+\infty} p(pK) \frac{K}{K + [H^+]} dpK = 0.4343 \int_{-\infty}^{+\infty} \frac{p(pK)}{K + [H^+]} dpK \quad (1.4)$$

$p(pK)$ – дифференциальная функция распределения констант диссоциации.

Существуют разные методы численного решения интегрального уравнения (1.4), но наиболее часто используют четыре основных метода: 1) *априорный выбор вида распределения* (распределения Гаусса [27] и Сипса [122]); 2) *аппроксимация интегрального уравнения суммой* [119]; 3) *метод конечных разностей* [117,119,123,124]; 4) *метод регуляризации* [117,125]. Каждый из перечисленных методов опирается на собственную систему допущений и налагает свои ограничения. Наиболее адекватными сложности задачи построения рК-спектра ГФК считаются 1-й и 2-ой методы [40].

Главным достоинством моделей непрерывного рК-спектра является возможность учета совместного влияния химической гетерогенности ПЭ и электростатических эффектов.

Модель непрерывного рК-спектра для описания протолитических свойств ГФК использовали многие исследователи [85,101,103,104,114-117,119]. В варианте априорного выбора вида распределения, как правило, задают бимодальное Гауссово распределение [85,101,114], исходя из предположения о наличии двух типов кислотных групп: карбоксильных и фенольных гидроксильных. Так например, кривую титрования речных ФК авторы [85] описали моделью распределения, включающую два гауссиана с центрами при рК 3.66 и 12.5 и близкими площадями под кривой. Положение и величина первого из них согласуется с присутствием значительного количества карбоксильных групп в структуре водных ФК. Тогда как для второго гауссиана значение рК для центра распределения представляется завышенным.

В работе [114] для моделирования кислотных свойств препарата ГК были проверены разные варианты нормального распределения: от моно- до тримодального, но наилучшее совпадение с экспериментальными данными получилось для бимодального (параметры приведены в таблице 1.6). Как видно из таблицы, при увеличении ионной силы возрастает общее число диссоциирующих групп (от 4.97 до 8.02 мэкв/г) и их кислотность, что объясняется уменьшением электростатических эффектов за счет экранирования заряда полииона. Необъяснимым с точки зрения представлений о природе влияния электростатических эффектов является тот факт, что S также растет с увеличением ионной силы.

Таблица 1.6. Параметры распределения ионогенных групп ГК по рК при различной ионной силе (бимодальное Гауссово распределение) [114]

Ионная сила, M	Параметр*	Номер пика в спектре	
		1	2
0.063	pK_{\max}	5.09	7.90
	q_i	3.55	1.42
	s	0.81	1.07
0.328	pK_{\max}	3.95	6.42
	q_i	5.2	2.01
	s	1.2	1.36
1.018	pK_{\max}	3.44	5.98
	q_i	5.82	2.20
	s	1.22	1.46

*Здесь pK_{\max} – значение рК в максимуме соответствующего гауссиана; q_i - содержание групп данного типа в ГК (мэкв/г); s - дисперсия рК_i.

При высокой ионной силе нивелируются различия в рК близких по природе групп, и, следовательно, s должна уменьшаться. Авторы объясняют этот факт изменением конформации ГК и диссоциацией дополнительно высвободившихся групп. Однако такое объяснение представляется не вполне удовлетворительным, так как на примере расчетов для полиметакриловой кислоты было показано [126], что дисперсия уменьшается с ростом ионной силы и при наличии конформационного перехода. По-видимому, предложенное решение нуждается в оптимизации.

Априорный выбор формы функции распределения повышает устойчивость решения интегрального уравнения (2) и дает возможность физической интерпретации получаемых величин. Однако не существует доказательств того, что в реальных молекулах ГФК группы распределены по кислотности согласно нормальному закону или функции Сипса. Поэтому автоматическое исключение из рассмотрения других возможных видов распределений можно считать основным недостатком метода.

Этого недостатка лишен метод аппроксимации для решения интегрального уравнения (2), который был использован для описания кривых титрования ФК в работе [119]. Линейным МНК с ограничениями на неотрицательность решения авторы получили спектр, состоящий из двух полос ($pK_1=3.9$, $pK_2=6.3$) при использовании разрешения 0.4 единицы рК. Для сравнения был рассчитан “спектр сродства” с помощью метода конечных

разностей. Положение полос согласовалось с первым методом, но сильно зависело от выбираемого значения параметра a и степени сглаживания исходных данных. Соотношение долей групп двух типов было противоположным.

Приципиально иной подход для описания протолитических свойств ГФК разработан авторами серии работ [45,127-130]. Он базируется на модельном представлении ГФК в виде полиэлектролитного геля с сетчатой структурой, выделяющегося из фазы раствора. Однако справедливость такого представления не доказана.

Подводя итог можно сказать, что все существующие модели описания протолитических свойств ГФК имеют свои ограничения. Достоинством более формальных моделей (модель химических реакций и дискретного рК-спектра) является их простота, тогда как более содержательные модели дают параметры, имеющие более ясный химический смысл. Наиболее перспективным представляется метод построения непрерывного рК-спектра, так как он учитывает и химическую гетерогенность и электростатические эффекты.

Хорошими возможностями для построения непрерывного рК-спектра обладает метод аппроксимации с использованием линейного МНК с ограничениями на неотрицательность решения. Метод дает более устойчивое решение интегрального уравнения кривой титрования (2) и не накладывает априорных ограничений на вид функции распределения рК, поэтому может быть использован для сложных природных полиэлектролитов, каковыми являются гумусовые кислоты.

1.5. Взаимодействие гумусовых кислот с тяжелыми металлами

Функциональный состав ГФК определяют их способность к связыванию ионов различных металлов [1-5,8-11]. Наибольший интерес с точки зрения экологии вызывает взаимодействие ГФК с тяжелыми металлами (ТМ), являющимися одним из опаснейших классов загрязняющих веществ. В

данной главе будут рассмотрены основные механизмы связывания ионов ТМ с ГФК, способы количественного описания такого связывания и роль взаимодействия ГФК с металлами в процессах, протекающих в природных экосистемах.

1.5.1. Механизмы взаимодействия гумусовых кислот с тяжелыми металлами

Весь спектр взаимодействий ГФК с металлами по характеру связи ГФК-металл в образующихся соединениях можно разделить на три основных типа [1,3,11]:

1) Образование соединений солевого типа с ионной связью между анионом ГФК и катионом металла (гуматы и фульваты щелочных щелочноземельных металлов).

2) Образование соединений с преимущественно ковалентным характером связи ГФК-металл. По данному типу ГФК связываются с поливалентными катионами (Al, Fe, Si), входящими в структуру глинистых частиц.

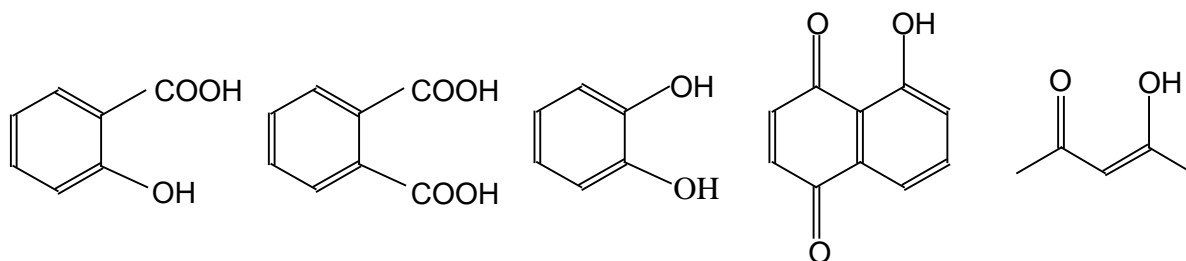
3) Образование комплексных соединений с координационной связью ГФК-металл. Данный тип связывания с ГФК характерен для переходных металлов.

В большинстве соединений связь носит смешанный характер с преобладанием того или иного типа в зависимости от природы катиона [2].

Тяжелые металлы (ТМ) относятся к числу переходных и для них характерен третий тип связывания с ГФК. Поэтому в данной главе будут подробно рассмотрены процессы комплексообразования в системе ГФК-ТМ.

Единого взгляда на природу комплексообразующих центров ГФК до сих пор не существует [11]. Это связано со сложностью качественной и количественной интерпретации данных тех методов, которые применимы для исследований ГФК и дают информацию о типе образующихся комплексов.

Однако, основываясь на исследованиях функционального состава ГФК, а также ИК- и ЭПР-спектров комплексов ТМ с ГФК, полагают, что за взаимодействие гумусовых кислот с ТМ ответственны следующие структурные фрагменты [11]:



Считается также возможным участие в данном процессе групп, содержащих гетероциклический или аминный азот [2,8,11]. Однако, ввиду низкого процентного содержания азота, этот тип связывания не может играть существенной роли.

Согласно данным работ [11,16,131], в металло-гуматном взаимодействии определяющую роль играют карбоксильные группы, входящие в состав двух основных типов связывающих центров: салицилатных и фталатных. В то же время в работах [45,147] указывается на существенный вклад группировок типа пирокатехина.

Рассмотренные связывающие центры характерны для ГФК терригенного происхождения с высоким содержанием ароматических структур. Для ГФК аквагенного происхождения, отличающихся преобладанием в углеродном скелете алифатических фрагментов, взаимодействие ГФК с ТМ определяется, в основном, карбоксилат-ионами, эфирными группами, и комбинациями различных групп [22,24]. Следовательно, доля хелатных взаимодействий для аквагенных ГФК существенно меньше, что, возможно, и является причиной более низкой устойчивости их комплексов [24].

1.5.2. Способы описания комплексообразования гумусовых кислот с металлами

Реакцию образования комплексов ГФК с металлами в общем виде можно записать следующим образом:



где М - ион металла. Согласно закону действующих масс равновесие (1.5) может быть охарактеризовано соответствующей константой, которая в данном случае называется константой устойчивости комплекса. Для комплексов состава (1:1) выражение для константы будет иметь вид:

$$\beta = \frac{[M-ГФК]}{[M][ГФК]}, \quad (1.6)$$

где $[M-ГФК]$, $[ГФК]$, $[M]$ - равновесные концентрации комплекса, свободных гумусовых кислот и свободных ионов металлов, соответственно. Однако, в отличие от низкомолекулярных комплексов, определяемая по уравнению (1.6) величина, строго говоря, не является константой, так как зависит не только от рН и ионной силы, но и от следующих факторов [132]:

1. Соотношение ГФК/ТМ. По мере возрастания концентрации ТМ в комплексообразование могут вовлекаться все более слабые центры [134,135].

2. Способ выражения мольной концентрации ГФК. Средний молекулярный вес ГФК определяется неточно, и определить структуру усредненного элементарного звена ГФК – весьма сложно [136]. Более правильным представляется использование мольной концентрации связывающих центров [5].

3. Метод обработки данных. Как и для протолитических характеристик принятая математическая модель и способ расчета сильно влияют на величину K .

4. Источник происхождения ГФК. Различия в структуре и функциональном составе ГФК различного происхождения обуславливают их разную комплексообразующую способность.

Влияние перечисленных факторов на константу характерно для химически гетерогенных полиэлектролитных лигандов. Различные модели описания комплексообразующих свойств ГФК в различной степени учитывают перечисленные факторы.

Для количественного описания комплексообразования ГФК с металлами применяют те же основные подходы, что и при описании протолитических свойств: распределение центров связывания по величинам b задают дискретным или непрерывным [135,137]. Рассмотрим основные типы моделей в порядке их усложнения.

А. В простейшем случае предполагают образование только одного типа комплексов состава (1:1) и из экспериментальных данных по уравнению (1.6) находят усредненную (по всем участвующим центрам) константу. Такая константа характеризует связывание при фиксированных значениях рН,

ионной силы и соотношения ГФК/ M^+ [138]. Сравнить такие константы для разных образцов можно только при полной идентичности условий.

Б. Допускают образование моноядерных комплексов с одним типом связывающих центров состава 1:1 и 1:2. Пример реализации такого подхода – ионообменный метод Шуберта [139-141]. По условиям данного метода используют низкие соотношения металл/ГФК, и определяют константы устойчивости комплексов с наиболее сильными центрами связывания [142,143]. Константы устойчивости рассчитывают из данных о распределении свободных ионов металла между раствором и катионитом в отсутствие и в присутствии лиганда. Единственной распределяемой формой являются свободные ионы металла, тогда как комплексы полностью остаются в растворе [142].

Коэффициент распределения λ_0 ионов металла между смолой и раствором в отсутствие лиганда определяется следующим равновесным соотношением:

$$\lambda = \frac{[M_r^+]}{[M^+]}, \quad (1.7)$$

где $[M^+]$ – концентрация ионов металла в растворе (моль/л), а $[M_r^+]$ – число молей ионов металла в фазе катионита на единицу веса смолы. Коэффициент распределения λ в присутствии лиганда рассчитывают по формуле:

$$\lambda = \frac{[M_r^+]}{[M_c] + [M^+]}, \quad (1.8)$$

где $[M_c]$ – концентрация закомплексованного металла в растворе (моль/л). Комбинация уравнений (1.7) и (1.8) дает следующее выражение:

$$\frac{\lambda_0}{\lambda} - 1 = \frac{[M_c]}{[M^+]} = \frac{[ML_n]}{[M^+]}, \quad (1.9)$$

где $[ML_n]$ – концентрация комплекса состава (1:n). Выразив последнюю дробь в (1.9) через константу устойчивости β_n , и прологарифмировав (1.9), получим:

$$\lg\left(\frac{\lambda_0}{\lambda} - 1\right) = \lg\beta_n + n \lg[L] \quad (1.10)$$

Уравнение (1.10) – основное уравнение метода Шуберта. Построив по экспериментальным данным зависимость $\lg\left(\frac{\lambda_0}{\lambda} - 1\right)$ от $\lg[L]$, по углу наклона определяют n , по координате точки пересечения с осью ординат – $\lg \beta_n$.

Метод Шуберта часто используется в исследовании комплексообразования ГФК благодаря доступности и относительной простоте интерпретации результатов [138,143-147]. Существенным ограничением метода является применимость для достаточно узкого интервала соотношений металл/ГФК [143].

В. Допускают наличие двух типов центров связывания ионов металлов с ГФК, образующих комплексы состава (1:1) [134]. Для построения таких моделей необходимо проведение эксперимента в широком диапазоне концентраций металла. В качестве примера можно привести графический метод Скетчарда [148], заимствованный из химии биополимеров. Метод базируется на следующем уравнении:

$$\frac{\bar{v}}{[M^+]} = K(n - \bar{v}), \quad (1.11)$$

где $\bar{v} = \frac{[M - \text{ГФК}]}{[\text{ГФК}]}$, n_i – среднее число центров i -того типа на моль ГФК,

а β_i – соответствующая константа устойчивости комплексов. Используя экспериментальные \bar{v} , строят зависимость $\frac{\bar{v}}{[M^+]}$ от \bar{v} и графически

определяют искомые величины [149] (рис. 1.7).

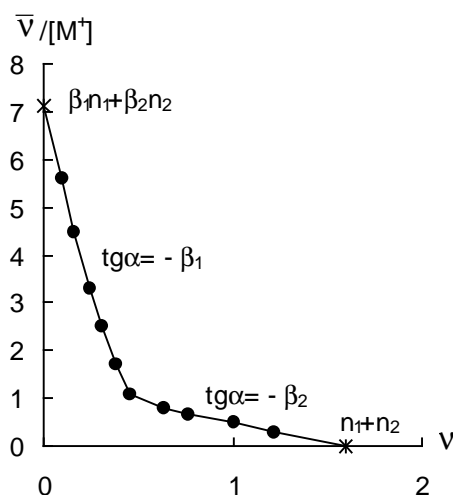


Рис. 1.7. График Скетчарда для связывания ионов металла двумя типами центров гумусовых кислот [149]. β_1 и n_1 относятся к “сильным” центрам, β_2 и n_2 – к “слабым”.

Расчеты по моделям такого типа достаточно хорошо согласуются с экспериментальными данными [150,151] и используются наиболее часто [132,135,149-157].

Г. Принимают модели дискретного распределения связывающих центров и описывают комплексообразование набором констант и долей групп, характеризуемых данной величиной константы [134,135,158,159].

Д. Наиболее сложные – модели непрерывного распределения связывающих центров, аналогичные непрерывным рК-спектрам [134,135,160-165]. Для использования таких моделей требуется большой массив экспериментальных данных в широком диапазоне соотношений ГФК/металл. При этом точность измерений концентрации свободных ионов металла должна быть сопоставима с точностью измерения рН стеклянным электродом [166,167]. К сожалению, лишь немногие методы удовлетворяют данным требованиям. Поэтому большинство исследователей используют усредненные константы для одного или двух типов центров связывания при фиксированных рН и ионной силе, определенные по методу Шуберта или Скетчарда.

Для реализации расчетов, описанных в данном разделе необходимы точные измерения концентраций компонентов, входящих в уравнение (4). Для этой цели используют целый комплекс аналитических методов, основные сведения о которых приведены в Приложении 1.

Значения констант устойчивости комплексов различных гумусовых кислот с ионами Cu(II), Pb(II) и Cd(II), определенные различными методами, приведены в таблице 1.7.

Таблица 1.7. Условные константы устойчивости комплексов ГФК различного происхождения с ионами тяжелых металлов

Тип ГФК	рН	$\lg b_1$	Метод детекции	Ист
<i>Cu</i>				
Почвенные ГК	6.8	7.8	Вольтамперометрия	[5]
	6.8	6.2(K ₁), 5.1(K ₂)	Диализ и ААС	[5]
	3.0-4.5	5.07-5.25	Ионометрия	[156]

Тип ГФК	pH	lg b ₁	Метод детекции	Ист
Почвенные ФК	7.0	5.4	Флуоресцентный	[168]
	4.0	4.0	Ионометрия	[156]
	6.0	6.3		
	5.0	8.7	Ионный обмен + ААС	[138]
Торфяные ГК	5.0	3.9-4.9 (K ₁)	Потенциометрия	[170]
	6.0	6.2-8.0 (K ₂)		
		6.5 (K ₁), 5.6 (K ₂)	Ионный обмен+ААС	[157]
Торфяные ФК	3.9	<u>5.9</u>	Ионный обмен+ААС	[5]
		12.5-12.7		
	8.0	8.5(K ₁), 7.2(K ₂)	Гель-хроматография +ААС	[152]
ФК поверхност- ных вод	8.0	8.8	Гель-хроматография	[152]
	8.0	8.6	Ионный обмен+ААС	[169]
	6.1	6.4	Ионометрия	[155]
<i>Cd</i>				
Почвенные ГК	4.0-6.0	3.26-4.02	Поляррография	[5]
	3.0-5.8	4.74-5.08	Ионометрия	[156]
Почвенные ФК	5.7-6.7	5.3-6.0	Ионометрия	[5]
	4.0-8.0	3.2-4.6	Диализ+ионометрия	[132]
	6.0	3.6	Ионометрия	[137]
Торфяные ГК	4.0-6.0	3.29-3.64	Поляррография	[5]
	3.0-5.8	4.9-5.2	Потенциометрия	[171]
Торфяные ФК	8.0	4.54	Гель-хроматография +ААС	[152]
<i>Pb</i>				
Почвенные ГК	7.0	8.7	Ионометрия	[172]
	6.8	<u>4.0-6.1</u>	Дифференциальная	[5]
		14.8	пульсполяррография	
Почвенные ФК	5.0	6.1	Ионный обмен+ААС	[173]

Примечания: K₁, K₂-константы для разных типов комплексообразующих центров; числитель - комплекс 1:1; знаменатель комплекс 1:2.

Как видно из таблицы, значения констант устойчивости, полученные различными методами, довольно хорошо согласуются между собой. Устойчивость комплексов меди и свинца с ГФК существенно выше, чем комплексов кадмия, как и для большинства известных низкомолекулярных лигандов. Сравнивая данные по комплексообразованию гумусовых кислот различного происхождения (торфяных, почвенных и пресноводных), можно отметить, что значения констант устойчивости металло-гуматных комплексов близки для всех трех типов ГФК и сравнимы с соответствующими константами для низкомолекулярных хелатирующих лигандов, таких как

салициловая и лимонная кислота, пирокатехин. Можно отметить в целом несколько большую комплексообразующую способность торфяных препаратов.

1.5.3. Экологические последствия комплексообразования ионов ТМ с ГФК

Взаимодействие гумусовых кислот с ТМ является одним из основных факторов, влияющих на поведение этого класса токсикантов как в водной, так и в почвенной среде. ГФК в значительной степени определяют миграционную способность и биодоступность ТМ, способствуют повышению буферности экосистем по отношению к этим загрязнителям [1-3].

Влияние ГФК на подвижность металлов в почвах и водах определяют два конкурирующих процесса: сорбционное концентрирование за счет образования нерастворимых комплексов с ГК и увеличение миграционной способности при комплексообразовании с ГК [174].

Так, например, авторами [175] было установлено, что миграционная способность фульватов Mn в почве в 1,5-3 раза выше чем ионных форм, а вымывающее действие ГК в 3-5 раз эффективнее по сравнению с дистиллированной водой. В то же время в работе [176] было показано, что ГК активно фиксируют ТМ наряду с другими компонентами почвы (глинами, полуторными оксидами и др.), причем сорбционная способность ГК гораздо выше таковой для минеральных компонентов почвы. Как следствие, из минеральных почв растения поглощают больше тяжелых металлов, чем из богатых органическим веществом, при одинаковом валовом содержании ТМ [177].

С другой стороны, ГФК оказывают влияние на токсичность ТМ в почвенном растворе, переводя их в низкотоксичную закомплексованную форму. Согласно данным [] около 90% меди и 70% кадмия дезактивированы в присутствии природных концентраций ГК. Следует отметить, что особенно сильное детоксицирующее действие проявляют низкомолекулярные ГК, характеризующиеся более высоким содержанием функциональных групп.

Таким образом ГФК участвуют в регулировании соотношения подвижных (доступных растениям) и неподвижных (недоступных растениям)

форм тяжелых металлов, воздействуя таким образом на процессы биоаккумуляции и токсические эффекты ТМ [178]. Данное свойство ГФК, вероятно, наиболее сильно выражено у обогащенных кислородсодержащими функциональными группами активированных препаратов, что может быть использовано для разработки методов детоксикации и рекультивации почв, загрязненных ТМ, с помощью таких препаратов.

Рассмотренный литературный материал позволяет сделать следующие выводы:

- Элементный состав отражает особенности генезиса и строения ГФК различного происхождения и, следовательно, рассчитанные на его основе параметры могут служить характеристиками структурных особенностей препаратов ГФК.
- Реакционная способность ГФК по отношению к ионным соединениям (протолитические и комплексообразующие свойства) определяется как абсолютными, так и относительными содержаниями трех основных типов кислородсодержащих функциональных групп: карбоксильных, фенольных и спиртовых гидроксильных.
- Для достоверного определения перечисленных групп необходимо использовать несколько независимых методов.
- Для получения количественных характеристик реакционной способности ГФК необходимо использовать методы, учитывающие химическую гетерогенность данного объекта.
- Высокая комплексообразующая способность ГФК позволяет предположить возможность использования гумусовых препаратов для рекультивации территорий, загрязненных тяжелыми металлами.

2. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Нефракционированные препараты ГФК как объект исследования

Основными объектами настоящего исследования являются нефракционированные препараты гумусовых кислот различного происхождения. Выбор данного объекта был обусловлен тем фактом, что любое фракционирование веществ, характеризующихся непрерывным распределением свойств, весьма условно. Характеризуя гумусовые кислоты в целом, а не фракции гуминовых или фульвокислот, можно судить о свойствах, присущих всему веществу, а не его отдельным компонентам. Данный подход облегчает перенесение закономерностей, полученных в лабораторных условиях, на уровень реальных систем.

Для исследования были использованы нефракционированные препараты ГФК, выделенные из торфов, почвы и вод. При этом особое внимание было уделено характеристике ГФК торфов, различающихся по своему генезису и геоботаническому составу. Интерес к торфяным ГФК обусловлен тем, что, во-первых, торф является доступным и недорогим сырьем, запасы которого у нас в стране велики; во-вторых, в настоящее время разработан и запущен в промышленное производство целый ряд гуминовых препаратов и сорбентов на основе торфа для применения в сельском хозяйстве, обработке промышленных стоков и рекультивации загрязненных территорий [179-181]. При этом известно, что гумусовые кислоты являются основным компонентом, определяющим высокую обменную и сорбционную емкость торфов [179].

Выбор в качестве объекта исследования нефракционированных препаратов ГФК определил методические сложности работы, так как большинство методик функционального анализа ГФК разработаны либо для гуминовых, либо для фульвокислот. Поэтому необходимо было модифицировать существующие методики, адаптируя их для выбранного объекта. Спецификой объекта были обусловлены и трудности в интерпретации экспериментальных результатов.

Высокая полидисперсность и химическая гетерогенность нефракционированных препаратов ГФК вызвала дополнительные сложности в интерпретации результатов по определению функционального состава и количественных характеристик реакционной способности. Так, особое внимание необходимо было уделить учету неоднородности химических свойств данного объекта, что потребовало широкого использования методов математического моделирования и статистического анализа.

2.1. Выделение и общая характеристика препаратов гумусовых кислот

2.1.1. Выделение препаратов и их физические свойства

Для проведения исследований по стандартным методикам были выделены в препаративных количествах и охарактеризованы 12 образцов гумусовых кислот: из восьми различных торфов, предоставленных Тверским политехническим институтом, (обозначены Т1-Т8), Ставропольской черноземной почвы (обозначены П), и трех природных вод – реки Москва, эстуария Белого моря, болотной воды из Шатурского района Московской области – (обозначены В1-В3, соответственно). Для извлечения гумусовых кислот из торфов и почв использовали щелочную экстракцию (0.1 М NaOH), из вод – сорбционное концентрирование на макроситовой смоле Амберлит XAD 2.

Твердые препараты гумусовых кислот представляли собой аморфные порошки от темно-желтого до коричневого цвета, более светлая окраска была характерна для образцов водного происхождения. Высушенные препараты гумусовых кислот исключительно гигроскопичны. Определение влажности препаратов, уравновешенных с атмосферной влагой, показало содержание от 6 до 9% воды (табл. 2.1).

Таблица 2.1. Влажность воздушно-сухих препаратов ГФК

Препарат	Влажность, %	Препарат	Влажность, %
T1	8.0	T7	8.3
T2	7.2	T8	9.2
T3	7.9	П	6.9
T4	7.4	B1	6.3
T5	8.9	B2	6.4
T6	7.9	B3	6.3

Исследование растворимости препаратов показало, что они практически нерастворимы в бензоле, хлороформе, хлористом метиле, пиридине, ТГФ, ограниченно растворимы в полярных апротонных растворителях (ДМСО и ДМФА) и дистиллированной воде, но обладают значительной растворимостью в растворах щелочей (до 20 г/л). Препараты не имели фиксированной точки плавления и разлагались при нагревании выше 150⁰С.

Средние молекулярные массы выделенных гумусовых кислот, по данным гель-хроматографии, составили для торфяных ~ 18000, почвенных ~ 13500, водных ~ 6300 г/моль.

2.1.2. Характеристика препаратов гумусовых кислот методами элементного анализа и ИК-спектроскопии

Для характеристики элементного состава для каждого образца необходимо было выполнить 5 определений: C, H, N; O; S; H₂O и зольность. Так как сухие препараты ГФК гигроскопичны, для определения элементного состава использовали уравновешенные с влагой воздуха образцы и учитывали их влажность при корректировке первичных данных элементного анализа.

Определение зольности

Зольность исследуемых препаратов гумусовых кислот определяли путем сжигания образцов по различным регламентам. Было установлено, что условия, стандартно используемые в анализе металлоорганических соединений (750⁰С, 40 мин [32]), не обеспечивают полноту сгорания гумусовых кислот – необходимо “дожигание” в кислороде до постоянного веса в течение 1.5 часов. В табл. 2.2 приведены для сравнения результаты

определения зольности по стандартной методике и с доведением до постоянного веса для трех из исследуемых образцов.

Таблица 2.2. Результаты определения зольности препаратов гумусовых кислот по разному регламенту

Препарат ГФК	Зольность, %	
	по станд. методике	с дожиганием
T1	11	4.7
П	18.6	8.7
B2	30	23

С учетом этих результатов зольность остальных образцов была определена с доведением до постоянного веса и составила от 0.5 до 23% для разных образцов (табл. 2.3).

Таблица 2.3. Зольность выделенных препаратов ГФК

Препарат	Зольность, %	Препарат	Зольность, %
T1	0.5	T7	2.1
T2	1.5	T8	1.4
T3	3.0	П	8.7
T4	3.3	B1	2.4
T5	2.0	B2	23
T6	1.6	B3	19

Определение С, Н, N и S

Анализ на содержание С, Н, N был выполнен с использованием двух автоматических элементных анализаторов, отличающихся устройством некоторых узлов, составом каталитического наполнения реакторов и рабочими температурами зон сжигания, восстановления и хроматографического разделения (детали в эксп. части). Полученные результаты приведены в табл. 2.4.

Как видно из таблицы, для большинства образцов первичные данные по содержанию углерода и водорода, полученные с помощью двух приборов, достаточно хорошо согласуются между собой: средние величины абсолютных отклонений составили 1.2 и 0.2%, соответственно. Допустимой ошибкой определения в органическом элементном анализе принято считать величину 0.3 абсолютных процента [32]. Однако для соединений нерегулярного строения полученную воспроизводимую можно считать вполне приемлемой,

поскольку химическая неоднородность образца при использовании для анализа малых навесок неизбежно приводит к некоторому разбросу данных. Отсюда вытекает требование возможно более тщательной гомогенизации образца перед анализом.

Таблица 2.4. Сравнение результатов определения содержания С, Н, N* в препаратах ГФК с помощью двух элементных анализаторов

Препарат ГФК	С, %			Н, %			N, %		
	1	2	Δ_{1-2}	1	2	Δ_{1-2}	1	2	Δ_{1-2}
Т о р ф я н ы е									
T1	48.0	48.5	0.5	5.4	5.1	0.3	1.8	1.9	0.1
T2	48.0	48.4	0.4	4.9	5.1	0.2	2.4	2.1	0.3
T3	47.9	48.6	0.7	4.8	5.0	0.2	2.2	2.0	0.2
T4	48.5	48.1	0.4	4.6	4.8	0.2	1.1	1.2	0.1
T5	48.0	47.6	0.4	4.7	4.8	0.1	1.8	1.4	0.4
T6	48.9	48.0	0.9	4.5	4.7	0.2	2.1	3.1	1.0
T7	49.6	47.8	1.8	4.6	4.5	0.1	2.4	2.3	0.1
T8	49.4	48.7	0.7	4.7	4.8	0.1	2.1	1.6	0.5
П о ч в е н н ы е									
П	42.5	41.0	1.5	4.8	4.6	0.2	3.2	3.3	0.1
В о д н ы е									
B1	41.8	41.1	0.7	4.3	4.5	0.2	2.0	1.6	0.4
B2	33.0	–**	–	3.0	–	–	2.5	–	–
B3	31.0	32.4	1.4	3.6	3.7	0.1	1.1	1.4	0.3
Среднее Δ :	абсолютное 1.2 относительное 2.8%			абсолютное 0.2 относительное 5.3%			абсолютное 0.3 относительное 15%		

*Каждое значение в таблице - среднее из двух определений.

**Определение на втором приборе не выполнялось.

Обозначения: 1 – анализатор фирмы “Carlo Erba”; 2 – фирмы “Heraeus”;
 Δ_{1-2} – разница между средними результатами определений на двух приборах.

Сравнение данных по содержанию азота показывает их более низкую воспроизводимость, тем не менее при выполнении более двух определений, как правило, удается добиться согласования результатов в пределах 5% от измеряемой величины.

Содержание серы в ГФК было определено сжиганием в колбе с кислородом по Шенигеру [32] (табл. 2.5). Полученные результаты согласуются с обычно приводимыми в литературе [16].

Таблица 2.5. Содержание серы в выделенных образцах ГФК

Препарат	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	П	B1	B2	B3
S, %	2.8	1.1	1.0	1.9	2.8	1.4	1.6	1.4	2.4	2.7	2.0	1.8

Определение кислорода

Содержание кислорода в выделенных препаратах определяли двумя способами: прямым определением кислорода и расчетом по разности между массой навески и суммой массовых содержаний всех остальных конституционных элементов (C, H, N, S).

Прямое определение кислорода обладает тем неоспоримым преимуществом перед определением по разности, что является независимым методом. Однако надежность получаемых данным методом результатов зависит от очень многих факторов. В частности, для получения правильных результатов количество продуктов пиролиза должно быть примерно постоянным. Соблюдение данного условия обеспечивается, если содержание кислорода в навесках (включая используемый стандарт) укладывается в довольно узкий диапазон [32]. Нами были проведены автоматические определения кислорода с калибровкой по сульфаниловой кислоте (27.71% O). Результаты определения приведены в табл. 2.6, там же для сравнения приведены данные, рассчитанные по разности:

$100\% - \Sigma(\%C, \%H, \%N, \%S, \text{скорректированные на зольность влажность})$.

Таблица 2.6. Содержание кислорода в образцах ГФК по данным прямого определения и рассчитанное по разности

Препарат	Содержание кислорода, %*		
	Прямое определение	По разности	Δ_{2-1}
T1	41.5	41.3	-0.2
T2	40.7	42.1	1.4
T3	43.0	42.4	-0.6
T4	42.3	42.0	-0.3
T5	40.9	41.4	0.5
T6	42.7	42.2	-0.5
T7	43.0	40.6	-2.4
T8	42.6	41.6	-1.0
П	42.0	42.6	0.6
B1	41.4	48.2	6.8
B2	46.0	50.5	4.5
B3	46.5	51.8	5.3

*Без поправки на влажность

Как видно из таблицы, для большинства препаратов наблюдается хорошее соответствие между данными, полученными прямым определением и рассчитанными по разности. Исключение составляют водные препараты, для которых прямым методом определяются значительно меньшие содержания кислорода. Это может объясняться несколькими причинами. Во-первых, недоопределение кислорода в данных образцах, характеризующихся высокой зольностью, может происходить из-за неполного пиролиза проб [32]. Во-вторых, может сказываться более существенная разница между содержанием кислорода в калибровочном стандарте (сульфаниловая кислота) и анализируемом веществе. В пользу того, что кислород в водных образцах недоопределяется прямым методом свидетельствует и тот факт, что зольность данных препаратов ГФК, рассчитанная с учетом определенного содержания кислорода, оказалась на 6-9% выше определенной экспериментально. Учитывая это, для расчета скорректированного элементного состава водных образцов использовали содержание кислорода, рассчитанное по разности.

Проведенные анализы позволили определить элементный состав выделенных препаратов ГФК в расчете на беззольное и безводное органическое вещество (табл. 2.7).

Таблица 2.7. Элементный состав выделенных препаратов гумусовых кислот в расчете на беззольное, безводное вещество

Препарат	Содержание элементов, % (масс.)					Ат. отношения	
	С	Н	N	О	S	О/С	Н/С
Т о р ф я н ы е							
T1	52.3	4.5	2.0	37.2	3.1	0.52	1.03
T2	52.6	4.5	2.6	39.1	1.2	0.56	1.03
T3	53.8	4.4	2.5	38.2	1.1	0.53	0.98
T4	54.3	4.2	1.3	38.1	2.1	0.53	0.93
T5	53.9	4.2	2.0	36.8	3.1	0.51	0.93
T6	54.0	4.0	2.3	38.1	1.5	0.53	0.89
T7	55.4	4.1	2.7	36.1	1.7	0.49	0.89
T8	55.3	4.1	2.3	36.8	1.5	0.50	0.89
П о ч в е н н ы й							
П	48.5	4.5	3.5	40.7	2.8	0.63	1.1
В о д н ы е							
B1	45.7	4.0	2.4	45.4	2.5	0.79	1.04
B2	43.8	4.2	1.6	48.5	1.8	0.85	1.14
B3	43.2	3.1	3.0	48.6	2.0	0.83	1.21

Как видно из таблицы, гумусовые кислоты различного происхождения характеризуются различным элементным составом. Для торфяных образцов

характерны атомные соотношения O/C ~ 0.5; H/C ~ 0.95; для водных - O/C ~ 0.8; H/C ~ 1.13; почвенный образец занимает промежуточное положение: O/C ~ 0.6; H/C ~ 1.1.

ИК-спектры препаратов ГФК

Выделенные препараты гумусовых кислот охарактеризованы также методом ИК-спектроскопии. Типичные спектры приведены на рис. 2.1.

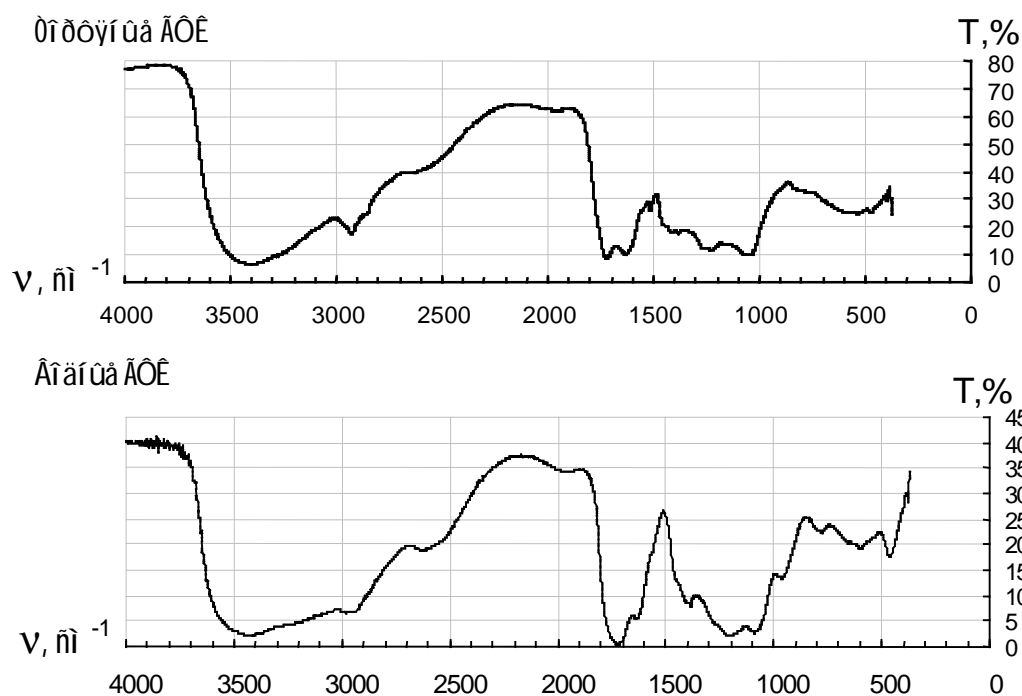


Рис. 2.1. Типичные ИК-спектры выделенных препаратов гумусовых кислот.

В спектрах наблюдались следующие полосы поглощения (в см^{-1}):

3690-3330 – валентные колебания несвязанных водородной связью фенольных и спиртовых ОН-групп;

3400-3000 – валентные колебания ОН-групп, связанных водородной связью;

2950-2850 – валентные колебания алифатической С-Н связи;

1750-1680 – колебания связи С=О в карбоксильных и карбонильных группах;

~1630 – колебания скелетных связей ароматического кольца;

1460-1350 – деформационные колебания алифатической С-Н связи, колебания СОО-групп;

~1200 – колебания С-О связей в карбоксильных группах;

860-730 – колебания С-Н ароматических связей.

Таким образом, элементный состав и ИК-спектры выделенных препаратов ГФК указывают на преобладание кислородсодержащих функциональных групп в их структуре. Следующим этапом исследования было определение основных кислородсодержащих групп в выделенных образцах.

2.2. Исследование функционального состава ГФК

Для объяснения и прогнозирования химического поведения ГФК и их реакционной способности по отношению к полярным и ионным соединениям необходима информация о количественном содержании основных функциональных групп. Как уже отмечалось, основными функциональными группами ГФК являются карбоксильные, фенольные и спиртовые гидроксильные группы. Определению их содержания в выделенных препаратах гумусовых кислот посвящена данная глава.

С целью повышения надежности количественного определения функциональных групп в выделенных препаратах ГФК был использован набор принципиально различных методов анализа. Такой подход позволяет преодолеть ограничения и неточности отдельных методов, что крайне важно при анализе вещества нерегулярного строения, когда нельзя проверить истинность получаемых данных с помощью стандартов. Для этой цели нами была использована схема анализа, сочетающая химическую модификацию с дальнейшим исследованием продуктов физико-химическими методами, а также методы, основанные на реакциях солеобразования. В общем виде схема исследования приведена на рис. 2.2.

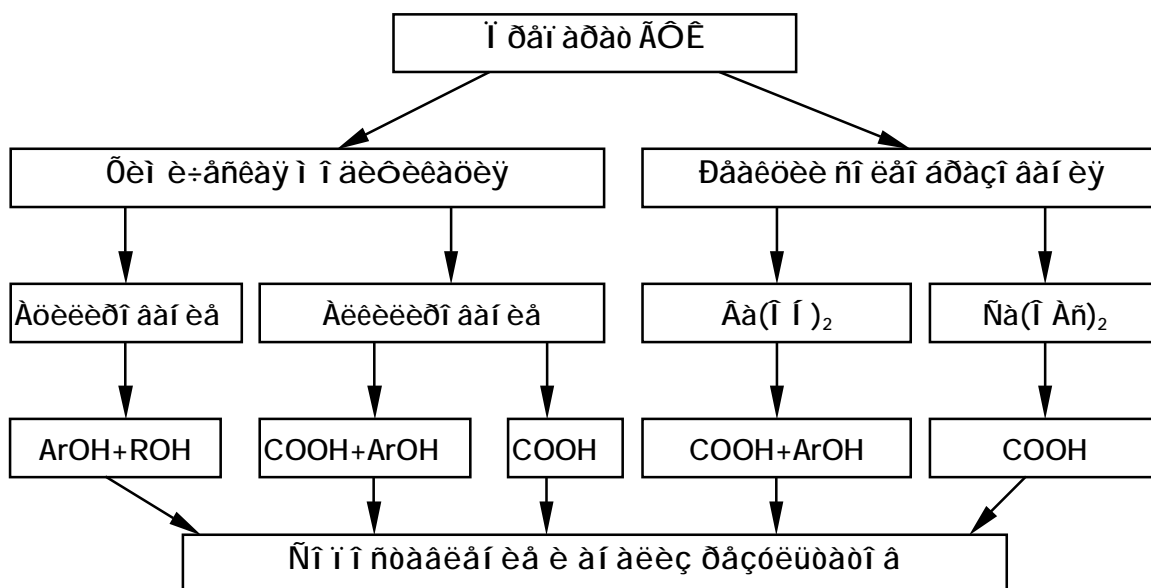


Рис. 2.2. Схема количественного определения основных функциональных групп гумусовых кислот.

2.2.1. Количественное определение гидроксильных и карбоксильных групп гумусовых кислот путем их химической модификации

Для исчерпывающего анализа всех типов карбоксильных и гидроксильных групп в препаратах гумусовых кислот была опробована схема исследования, основанная на их модификации реагентами, действующими в мягких условиях и способными вводить в структуру группировки с характерными химическими сдвигами в ^1H и ^{19}F ЯМР-спектрах.

Тип модификации Определяемые группы

- | | |
|--|-----------------------------------|
| 1) силилирование Me_3SiCl или $\text{Et}_2\text{N-SiMe}_3$ | $\Sigma(\text{OH}+\text{COOH})$ |
| 2) метилирование CH_2N_2 | $\Sigma(\text{ArOH}+\text{COOH})$ |
| 3) метилирование $\text{BF}_3 \cdot \text{CH}_3\text{OH}$ | ΣCOOH |
| 4) ацилирование трифторацетилимидазолом | $\Sigma(\text{ArOH}+\text{ROH})$ |

Это могло бы позволить регистрировать продукты методом спектроскопии ЯМР.

Применение некоторых из перечисленных реагентов было ранее описано для фульвокислот [45,57,60,63]. Нами была проверена применимость данных методов для исследования нефракционированных образцов ГФК.

В качестве модельных соединений для проверки корректности схемы эксперимента нами были выбраны гидроксibenзойные кислоты (салициловая

и β -резорциловая) и циклогексанол. Обработкой данных соединений диазометаном удалось достичь количественного превращения карбоксильных и фенольных гидроксильных групп в эфиры, за исключением орто-гидроксильных. С помощью $\text{VF}_3 \cdot \text{CH}_3\text{OH}$ количественно метилировались только карбоксильные группы. Ацилированию трифторацетилимидазолом подвергались в основном только гидроксильные группы, однако некоторое количество смешанных ангидридов (~10%) также было зафиксировано. Таким образом было показано, что такая схема пригодна для определения карбоксильных и гидроксильных групп.

Обработке перечисленными агентами были подвергнуты в общей сложности 15 проб разных препаратов нефракционированных ГФК. (Образцы метилированных препаратов охарактеризованы методом элементного анализа, см. Приложение 3, остальные производные получали непосредственно в ампулах для ЯМР-спектроскопии и не выделяли). Однако после обработки образцы имели настолько низкую растворимость в органических растворителях (включая ДМСО), что в спектрах присутствовали практически только сигналы растворителя и следов реагентов. Облучение ампул с дериватизованными ГФК ультразвуком не привело к растворению. По-видимому, удаление подвижных протонов нарушает механизм сольватации гумусовых кислот диметилсульфоксидом и в то же время не обеспечивает достаточную гидрофобизацию для растворения в менее полярных растворителях.

В связи с изложенным схема исследования была изменена. Для определения суммарного содержания гидроксильных групп был использован метод, позволяющий детектировать количество прореагировавших групп в нерастворимом продукте.

Нами был выбрано ацилирование в пиридине, протекающее в относительно мягких условиях. Необходимость использования мягких условий обусловлена тем, что при температурах выше 100°C может происходить термическая деструкция ГФК [13]. Метод включает три последовательные стадии ($\text{R} = \text{Alk}$ или Ar):



2) Переэтерификация бутанолом: $\text{ROAc} + n\text{-BuOH} \xrightarrow{\text{H}^+} \text{ROH} + n\text{-BuOAc}$

3) Экстракция и хроматографическое определение бутилацетата.

Однако указанный метод определения гидроксильных групп был разработан для образцов водных фульвокислот [45], отличающихся высокой растворимостью. О его применимости для анализа высокомолекулярной фракции ГФК – гуминовых кислот – и нефракционированных препаратов авторы не сообщают.

Попытка использования описанной методики без изменений не привела к успеху: маслянистые продукты ацилирования было невозможно количественно перенести из реакционной ампулы в емкость для отгонки избытка реагентов, как того требует методика. Дополнительно вносимые растворители (гексан или бензол) также не смывали дериватизованные ГФК со стенок ампулы. Следовательно, полнота определения гидроксильных групп в нефракционированных ГФК не может быть достигнута при использовании такого варианта методики.

В связи с этим в аппаратное оформление методики были внесены следующие изменения: во-первых, обе синтетические стадии анализа проводили в одной и той же ампуле с длинной трубкой, позволяющей запаивать ее дважды; во-вторых, удаляли избыток реагентов после ацилирования упариванием на песчаной бане (50°C) в токе аргона, а затем вакуумировали при нагревании на водяной бане. Наш вариант оформления методики позволил исключить две стадии переноса продуктов реакции из емкости в емкость и гарантировал 100%-ное введение ацилированных продуктов в реакцию переэтерификации.

Для проверки количественности такого способа определения гидроксильных групп была проанализирована салициловая кислота. Полученное для нее содержание гидроксильных групп 7.6 ± 0.4 ммоль/г хорошо согласуется с теоретическим 7.24 ммоль/г.

Однако из-за низкой растворимости большинства исследуемых препаратов гумусовых кислот в смеси уксусный ангидрид-пиридин их ацилирование протекает в гетерофазной системе. Следствием этого может быть, с одной стороны, завышение результатов определения вследствие адсорбции ацилирующего агента на субстрате; с другой стороны, –неполнота

ацилирования гидроксильных групп. Часть ОН-групп может также оказаться нереакционноспособной вследствие стерических затруднений.

Для проверки возможного влияния на результаты определения адсорбции уксусного ангидрида на ГФК были проведены эксперименты по ацилированию в тех же условиях, но в отсутствие пиридина. Было найдено, что количество образующегося при этом бутилацетата составляет не более 3% от получаемого в присутствии пиридина, то есть адсорбция уксусного ангидрида на ГФК не вносит существенного вклада в результаты анализа. Для проверки полноты протекания реакции было проведено ацилирование трех препаратов ГФК в тех же условиях с выделением продуктов, которые были охарактеризованы методом ИК-спектроскопии с Фурье преобразованием. Типичный спектр приведен на рис. 2.3. Получить ПМР-спектры ацелированных образцов не удалось вследствие их чрезвычайно малой растворимости в органических растворителях (включая ДМСО).

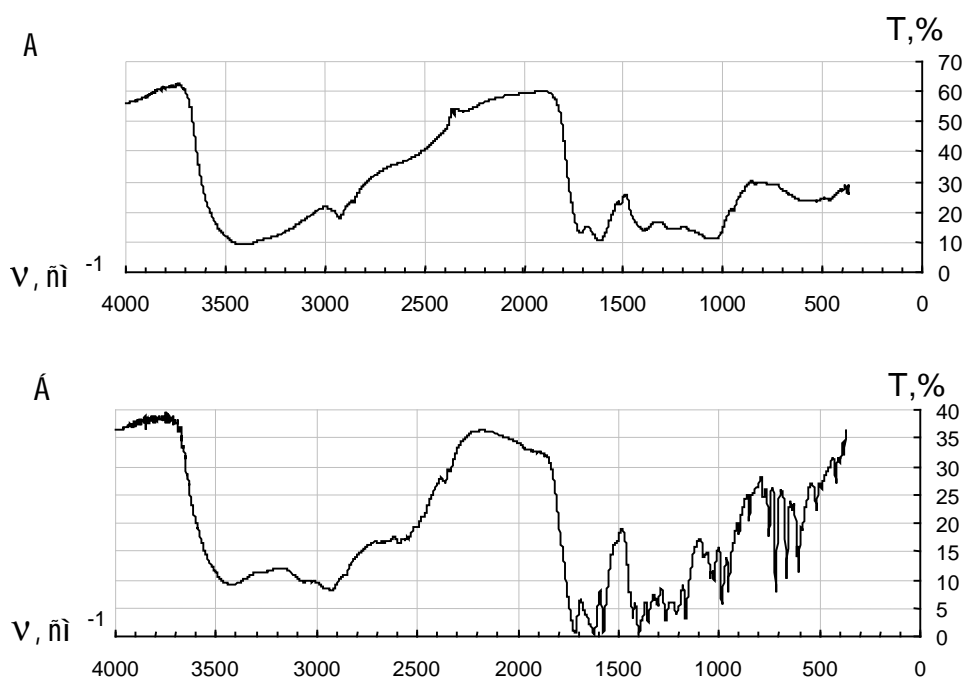


Рис. 2.3. Типичные ИК-спектры исходных (А) и ацелированных (Б) препаратов ГФК.

ИК-спектры ацелированных образцов показали, что сигналы связанных водородной связью гидроксильных групп около $3550\text{--}3200\text{ см}^{-1}$ не исчезают полностью после обработки препаратов смесью $(\text{AcO})_2\text{O}$ и Py . Остаются практически без изменений полосы около $2690\text{--}2500\text{ см}^{-1}$, характерные для валентных колебаний связей О-Н в карбоксильных группах, связанных водородной связью [182]. К сожалению, с помощью ИК-спектров

практически невозможно количественно оценить полноту протекания реакции ацилирования. Важно подчеркнуть, что в спектрах ацилированных образцов отсутствуют полосы поглощения около $1795-1775\text{ см}^{-1}$, соответствующие колебаниям С=О-связей в ангидридах.

Следовательно, на основе изучения ИК-спектров ацилированных образцов ГФК можно сделать следующие выводы: 1) при ацилировании уксусным ангидридом в пиридине в реакцию вступают не все гидроксильные группы; 2) не образуется сколько-нибудь значительных количеств смешанных ангидридов.

Содержание гидроксильных групп в исследуемых препаратах ГФК, определенное описанным методом, приведено в табл. 2.8.

Таблица 2.8. Содержание гидроксильных групп в выделенных образцах торфяных ГФК

	Образец											
	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	П	B1	B2	B3
ОН-групп, ммоль/г	2.4	4.4	5.0	3.4	9.5	2.7	6.4	6.9	3.4	6.1	4.2	3.7
$\Delta\pm$	0.1	0.8	1.0	0.6	0.8	0.5	0.6	0.8	0.7	0.7	0.8	0.6

В целом, полученные результаты по содержанию гидроксильных групп согласуются с данными других авторов. Так, в работах Шнитцера с сотр. [8,71] приведено содержание (3.2-5 и 9-10 ммоль/г) гидроксильных групп для нефракционированных ГФК подзолистых почв (данные получены согласно методике [8]). Тищенко и Рыдалевская [183] методом метилирования определили содержание гидроксильных групп в ГК черноземных (7.12-7.49 ммоль/г) и торфяно-болотных (7.0 ммоль/г) почв.

2.2.2. Определение карбоксильных и фенольных гидроксильных групп в гумусовых кислотах с помощью реакций с гидроксидом бария и ацетатом кальция

Фенольные гидроксилы и карбоксильные группы являются основными центрами связывания металлов в молекулах ГФК, и их содержание представляет собой важнейшую характеристику состава и реакционной способности препаратов ГФК.

Одними из наиболее распространенных методов определения общего содержания кислотных групп ($\Sigma \text{ArOH} + \text{COOH}$) и содержания карбоксильных групп, являются, соответственно, баритовый и Са-ацетатный методы, основанные на взаимодействии кислотных групп ГФК с Ba(OH)_2 либо Ca(OAc)_2 . Однако, как уже отмечалось в обзоре литературы, при использовании обоих методов возникает ряд проблем, существование которых вызывает сомнения в количественности данных методов.

Первая проблема связана с обратимостью обеих реакций. Несмотря на образование малорастворимых соединений, обе реакции в значительной степени обратимы [94], и для достижения количественного протекания реакций необходим достаточный избыток реагента. Рекомендуемые количественные соотношения реагент/субстрат сильно варьируют у авторов разных вариантов методик (табл. 2.9).

Таблица 2.9. Количественные соотношения реагент/ГФК, рекомендуемые в различных вариантах баритового и Са-ацетатного методов в ммоль/г

$\text{Ba(OH)}_2/\text{ГФК}$	$\text{Ca(OAc)}_2/\text{ГФК}$	Автор
7.5-30	75-200	Сысков, Кухаренко [93]
40-80	100-200	Шнитцер, Кан [8]
20-40	20-40	Гиллам, Райли [100]

Систематические исследования по влиянию соотношения реагент/ГФК на величину определяемого содержания COOH - и ArOH -групп для угольных ГФК были осуществлены авторами [91-96]. Однако в работах, где используют эти реакции для характеристики гумусовых кислот почвенного и водного происхождения, обоснование рекомендуемых соотношений не приводится. Следует подчеркнуть, что по составу и свойствам ГФК угля существенно отличаются от почвенных и водных. Они обогащены ароматическими фрагментами, а полисахаридные в них практически отсутствуют [184]. Для ГФК угля характерна более низкая растворимость и взаимодействие с Ba(OH)_2 и Ca(OAc)_2 протекает для них как хемисорбция [93].

Вторая проблема связана с образованием растворимых солей низкомолекулярных фракций и нефракционированных препаратов гумусовых кислот с Ва и Са. Оставаясь в растворе, ГФК могут вносить ошибку в определении содержания групп при титровании избытка Ba(OH)_2 или

выделившейся уксусной кислоты. В связи с этим часто ставится под сомнение применимость данных реакций для плохо осаждаемых данными реагентами препаратов [40,88,101].

Отдельной проблемой является определение точки эквивалентности при титровании избытка $\text{Ba}(\text{OH})_2$ в баритовом методе и выделившейся уксусной кислоты – в Са-ацетатном методе. Разные авторы используют для этой цели либо фиксированные значения рН, соответствующие теоретическим значениям для соответствующих растворов $\text{Ba}(\text{OH})_2$ и $\text{Ca}(\text{OAc})_2$ [87], либо определяют точку перегиба кривой титрования графическими методами [100].

В связи с вышесказанным необходимо было найти экспериментальные условия, обеспечивающие надежность получаемых результатов. С этой целью было исследовано влияние на количество определяемых по данным реакциям групп следующих факторов:

- 1) способ определение точки эквивалентности при титровании – избытка $\text{Ba}(\text{OH})_2$ и образующейся уксусной кислоты;
- 2) выбор количественных соотношений реагент/субстрат;
- 3) наличие в реакционной смеси растворимых гуматов бария и кальция.

Влияние способа определения точки эквивалентности

Поскольку от способа определения точки эквивалентности зависят все последующие результаты, его влияние необходимо было выяснить в первую очередь. Для этого было проведено потенциометрическое титрование избытка $\text{Ba}(\text{OH})_2$ и уксусной кислоты после осаждения гуматов Ва и Са. Для всех исследованных образцов полное осаждение гуматов Ва и Са не достигалось. Супернатант содержал значительное количество окрашенного вещества (низкомолекулярные фракции ГФК).

Тем не менее большинство полученных кривых потенциометрического титрования супернатанта при определении и баритовым и Са-ацетатным методом были достаточно симметричными и содержали один явно выраженный перегиб. Данный факт свидетельствует о том, что при определении баритовым методом перегиб на кривой соответствует оттитровыванию избытка реагента, Са-ацетатным – выделившейся уксусной кислоты, тогда как слабокислотные группы неосаждаемой фракции ГФК не

титруются вместе с уксусной кислотой. Типичные кривые титрования для обоих методов приведены на рис. 2.4.

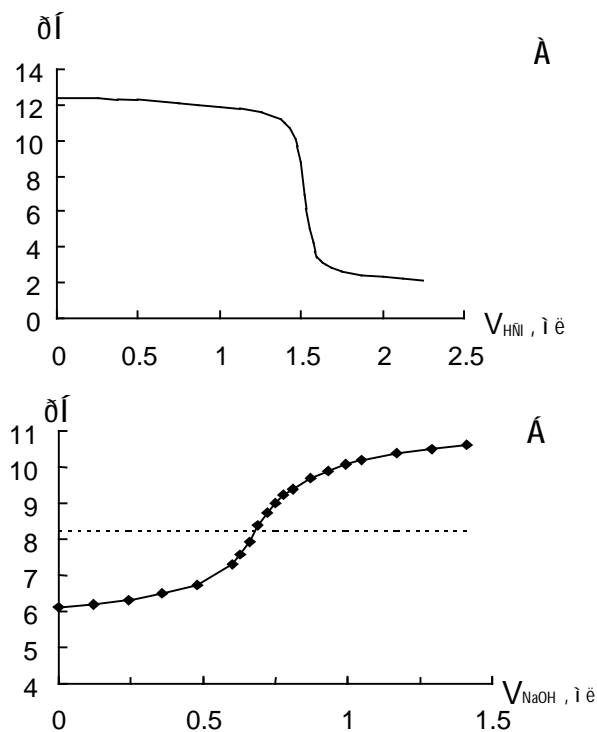


Рис.2.4. Типичные кривые потенциметрического титрования реакционной смеси $[\text{Ba}(\text{OH})_2 + \text{ГФК}]$ – (А) и $[\text{Ca}(\text{OAc})_2 + \text{ГФК}]$ – (Б) после осаждения гуматов Ва и Са.

Как видно из рисунка, для кривой титрования при использовании баритового метода характерно наличие резкого скачка вблизи точки перегиба. Следовательно, небольшие ошибки определения рН точки перегиба не приведут к существенным отклонениям в определении эквивалентного объема титранта, и точку эквивалентности можно определять по индикатору (например, фенолфталеину).

Для Са-ацетатного метода наблюдается иная ситуация (рис. 2.3.Б). Вблизи точки перегиба кривой титрования резкого скачка не наблюдается, и поэтому неточность в определении точки перегиба может привести к значительным ошибкам определения эквивалентного объема титранта. Для точного определения точки перегиба нами был использован расчетный метод, описанный в экспериментальной части. Результаты расчета приведены в табл. 2.10.

Таблица 2.10. Рассчитанные значения рН в точке перегиба на кривых титрования супернатанта при определении карбоксильных групп в препаратах ГФК

Препарат ГФК	рН	Препарат ГФК	рН
T1	8.03	T7	8.51
T2	8.15	T8	8.22
T3	8.54	П	8.38
T4	8.44	B1	8.26
T5	8.55	B2	8.75
T6	8.35	B3	8.48

Каждое определение выполнялось три раза.

Как следует из таблицы 2.10, для всех исследованных образцов ГФК точки перегиба лежат в диапазоне рН 8.03-8.75, что ниже рекомендуемых в работах [8,87,88,99] рН 8.9 и 9.8. Расчет с использованием рекомендуемых значений рН для определения точки эквивалентности привел бы к завышению результатов определения карбоксильных групп на 10-30%. Следовательно, точность определения точки эквивалентности является одним из ключевых факторов для получения правильных результатов Са-ацетатным методом. Можно предположить, что наблюдаемое многими авторами [87,88,101] завышение результатов по сравнению с другими методами является следствием неправильного определения точки эквивалентности.

Для проверки данного предположения мы провели аналогичные эксперименты с модельными соединениями – полигидроксibenзойными кислотами. Для большинства кислот, образующих растворимые соли с Ва и Са, на кривых титрования реакционной смеси наблюдается два явно выраженных перегиба (рис. 2.5).

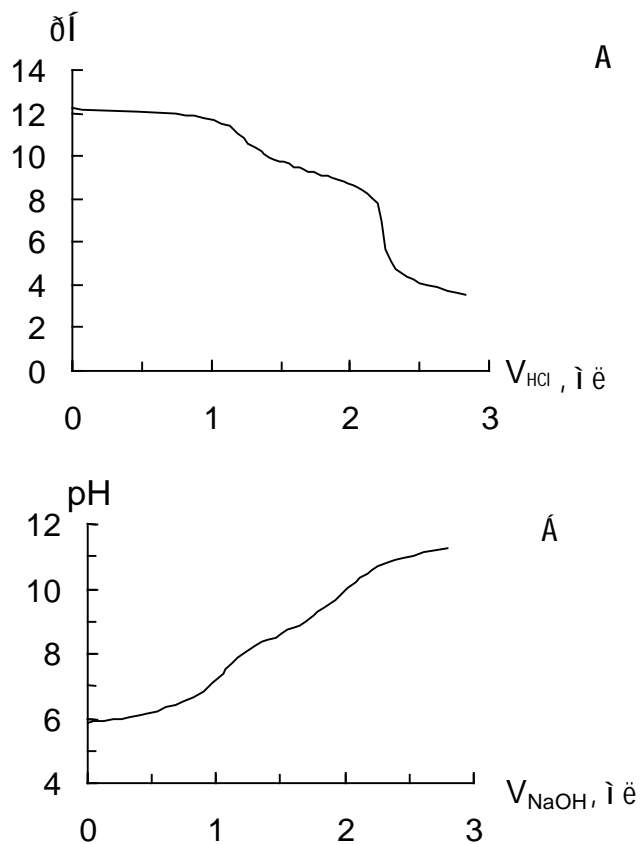


Рис. 2.5. Кривые титрования реакционной смеси при анализе 2,4-дигидроксibenзойной кислоты баритовым (А) и Са-ацетатным (Б) методами.

Первый перегиб соответствует конечной точке титрования избытка $\text{Ba}(\text{OH})_2$ (А) или AcOH (Б), второй – ароматических OH -групп анализируемой кислоты. При этом точкам перегиба соответствуют значения pH 10 ($\text{Ba}(\text{OH})_2$) и pH 7 (AcOH). Очевидно, что использование в качестве точки эквивалентности pH 8.9 и 9.8 в таких случаях приведет к получению неправильных результатов. Действительно, авторами [99], использовавшими данных подход, были получены завышенные результаты для 2,4- и 2,5-дигидрокси- и 3,4,5-тригидроксibenзойных кислот по Са-ацетатному и заниженные – по баритовому методу.

Для всех исследованных образцов гумусовых кислот при анализе баритовым методом наблюдался лишь один перегиб на кривой титрования, аналогично приведенной на рис. 2.5 (Б). Следовательно, в отличие от модельных кислот, для анализа ГФК данным методом можно использовать визуальную индикацию.

Проведенное исследование позволяет заключить, что при анализе ГФК баритовым методом способ определения точки эквивалентности, как правило,

не играет большой роли, тогда как для Са-ацетатного метода он является весьма важным фактором. Использование теоретических значений рН для определения точки эквивалентности в Са-ацетатном метода может привести к получению некорректных результатов и не может быть рекомендовано для количественных определений.

Влияние количественных соотношений реагент/субстрат на определяемое содержание карбоксильных и фенольных гидроксильных групп

Вследствие нестехиометричности гумусовых кислот невозможно при определении задать точное значение мольного соотношения реагент/субстрат. Поэтому необходимо было найти диапазон значений соотношения, в котором определяемая величина остается постоянной для различных образцов. Для этого были получены зависимости количества определяемых кислотных групп от количественных соотношений реагент/ГФК в реакционной смеси на примере препаратов гумусовых кислот торфа (рис. 2.6).

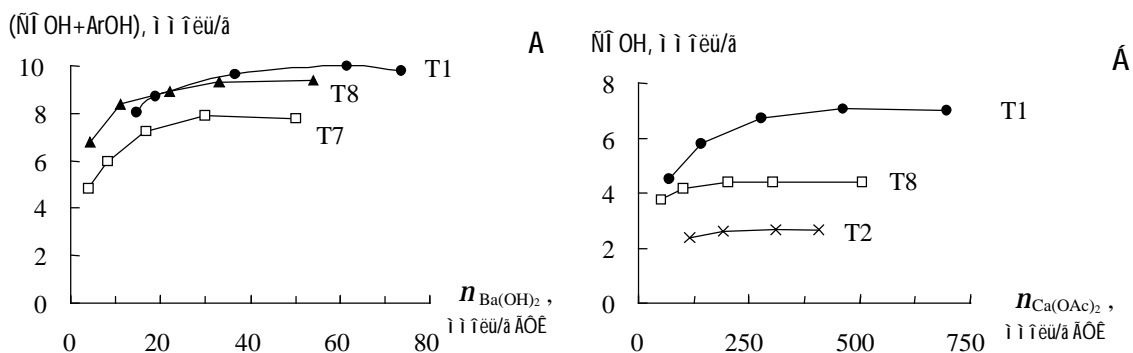


Рис. 2.6. Влияние количественных соотношений реагент/ГФК на определяемое методами содержание кислотных групп в препаратах гумусовых кислот торфа баритовым (А) и Са-ацетатным (Б).

Как видно из рисунка, на начальных участках кривых определяемые величины существенно зависят от концентрации реагента. Подавление обратной реакции и постоянство определяемого содержания кислотных групп (плато на кривых) при использовании баритового метода наблюдалось при соотношениях 30-60 ммоль Ba(OH)_2 на 1 г ГФК, что соответствует 6-кратному и выше избытку по отношению к общему содержанию кислотных групп (7-10 ммоль/г). Для Са-ацетатного метода соответствующие плато наблюдались при соотношениях 250-500 ммоль Ca(OAc)_2 на 1 г субстрата.

Следовательно, для получения надежных результатов по содержанию фенольных и карбоксильных групп в препаратах гумусовых кислот с использованием рассмотренных реакций необходимо придерживаться следующих количественных соотношений: 35-40 и 250-400 ммоль/г ГФК – для баритового и Са-ацетатного методов, соответственно. Использование большего избытка нецелесообразно, поскольку при этом возрастает ошибка определения.

Помимо соотношения реагент/ГФК было также изучено влияние полиэлектролитной природы ГФК (возможных конформационных и ассоциативных эффектов при изменении концентрации в растворе) на результаты анализа. Для этой цели при постоянстве соотношения реагент/ГФК варьировали степень разбавления реакционной смеси. Полученные результаты (табл. 2.11) показывают, что при соблюдении указанного выше избытка реагента определяемые значения не зависят от разбавления. Следовательно, в изученном диапазоне концентраций наличие достаточного избытка реагента по отношению к ГФК обеспечивает полноту определения кислотных групп ГФК независимо от степени разбавления смеси.

Таблица 2.11. Определяемое содержание кислотных групп в препарате Т8 при постоянстве избытка Ва(ОН)₂ (40 ммоль/г ГФК) и различной концентрации ГФК

Концентрация ГФК в смеси, г/л	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0	1.2	1.4
Концентрация Ва(ОН) ₂ в смеси, ммоль	5	10	15	20	25	30	35
(СООН+АгОН)*, ммоль/г	7.8	8.3	8.1	7.9	8.0	7.8	7.9

*Доверительные интервалы значений – ±(0.3-0.5).

Влияние образования растворимых гуматов Ва и Са на определяемое содержание карбоксильных и фенольных групп

Для оценки влияния фактора образования растворимых гуматов Ва и Са на полноту протекания реакции карбоксильных и фенольных групп с Ва(ОН)₂, а также полноту и селективность протекания реакции с Са(ОАс)₂ были проведены определения в описанных условиях для модельных органических кислот. На основе литературных данных о структуре ГФК и природных полимерах, встречающихся в растительном сырье [1-3,185] был выбран ряд

кислот, моделирующих отдельные структурные фрагменты. Результаты определения баритовым методом приведены в табл. 2.13.

Таблица 2.13. Полнота протекания реакций модельных кислот с гидроксидом бария

Кислота	(COOH+ArOH), групп/молекулу		pK ₂ [186]
	теор.	эксп.	
Бензойная	1	1	–
Салициловая	2	1	13.0
3-Гидроксибензойная	2	2	9.79
4-Гидроксибензойная	2	2	9.14
2,4-Дигидроксибензойная	3	2	8.98
3,5-Дигидроксибензойная	3	2	9.54
2-Гидроксифенилуксусная	2	1	>10
4-Гидрокси-3-метоксибензойная	2	1	10.1
4-Гидрокси-3,5-диметоксибензойная	2	2	9.21

Как видно из таблицы, с гидроокисью бария не реагируют гидроксильные группы в орто-положении к карбоксильным в моно- и дигидроксибензойных кислотах. pK их кислотной диссоциации ≥ 13 [186]. Из двух гидроксигрупп в мета-положении друг к другу определяется лишь одна, что связано с невозможностью зафиксировать перегиб на кривой титрования, соответствующий третьей группе. Согласно [187] условие существования перегиба на кривой титрования можно записать так:

$$c_a K_a \geq 2.7 \cdot 10^{-3} \quad (2.1),$$

где c_a и K_a – концентрация и константа диссоциации кислоты, соответственно. В нашем случае концентрации кислот не превосходят $5 \cdot 10^{-3} - 10^{-2}$ М. Следовательно, теоретически возможно зарегистрировать перегиб для фенольных гидроксидов с $pK \leq 9.7 - 10.6$ в зависимости от концентрации кислоты.

Согласно уравнению Хендерссона-Хассельбаха, связывающему константу диссоциации кислоты, степень диссоциации и pH:

$$pK = pH + \lg \frac{\alpha}{1 - \alpha}, \quad (2.2)$$

pK диссоциации равен pH, при котором диссоциирована половина кислотных групп. Отсюда следует, что при pH 12.7, характерном для определений баритовым методом, в кислотах, образующих растворимые соли с барием, будет диссоциировано около половины групп с pK близким к 13.

Согласно данным табл. 2.12 из 10 фенольных групп, присутствующих в эквимолярной смеси гидроксibenзойных кислот, приведенных в таблице, баритовым методом определяются пять. Отсюда в достаточно грубом приближении можно считать, что максимальная степень недоопределения фенольных гидроксиллов в растворимых фракциях ГФК не должна превысить 50%.

Чтобы определить, сколько это составит по отношению ко всему препарату ГФК, мы оценили массовую долю фракций гумусовых кислот, неосаждаемых гидроксидом бария. С этой целью раствор после осаждения гуматов бария отделяли от осадка и обессоливали пропуская через колонку с катионитом в Н-форме. Обессоленный раствор упаривали на роторном испарителе досуха, и определяли взвешиванием массу сухого остатка. Доля таких фракций для различных препаратов ГФК составила от 10 до 20 массовых %. Таким образом, если предположить, что половина фенольных групп в неосаждаемых фракциях не реагирует с гидроксидом бария, то даже в этом случае суммарная степень недоопределения фенольных групп в препарате ГФК по данной реакции не будет превышать 10%.

Следовательно, при использовании оптимальных соотношений реагент/субстрат по реакции с гидроксидом бария могут быть определены все карбоксильные и порядка 90% фенольных гидроксильных групп гумусовых кислот.

В отличие от баритового метода, реакции всех исследованных полигидроксibenзойных кислот с ацетатом кальция протекали количественно по карбоксильным группам. Это означает, что при определении карбоксильных групп Са-ацетатным методом не происходит завышение результатов даже для кислот, образующих растворимые соли с Са. Однако данный вывод справедлив только в том случае, когда точку эквивалентности рассчитывают из экспериментальной кривой титрования.

Таким образом, проведенное исследование позволило обосновать выбор количественных соотношений реагент/субстрат, обеспечивающих надежность результатов определения содержания фенольных и карбоксильных групп в гумусовых кислотах по реакциям с $\text{Ba}(\text{OH})_2$ и $\text{Ca}(\text{OAc})_2$, а также показать пригодность баритового и Са-ацетатного методов для анализа

нефракционированных образцов гумусовых кислот, не полностью осаждающихся в виде гуматов кальция и бария.

Результаты применения обоих методов для анализа двенадцати препаратов гумусовых кислот приведены в табл. 2.11.

Таблица 2.11. Содержания кислотных групп в исследуемых препаратах ГФК, определенные баритовым и Са-ацетатным методом (n=3, P=95%)

Препарат	(COOH+AgOH), ммоль/г	COOH, ммоль/г	AgOH (по разности), ммоль/г
Т о р ф я н ы е			
T1	9.9±0.5	7.1±0.3	2.8±0.8
T2	6.6±0.4	2.7±0.2	3.9±0.6
T3	9.0±0.9	3.1±0.3	5.9±1.3
T4	7.0±0.6	3.1±0.1	3.9±0.7
T5	8.2±0.6	2.9±0.1	5.3±0.7
T6	9.0±1.0	3.1±0.2	5.9±1.2
T7	7.9±0.4	4.0±0.2	3.9±0.6
T8	9.4±0.5	4.0±0.4	5.4±0.9
П о ч в е н н ы й			
П	9.0±0.4	3.9±0.3	5.1±0.7
В о д н ы е			
B1	10.9±0.6	7.1±0.6	3.3±1.2
B2	9.6±1.4	6.7±0.6	1.9±2.2
B3	12.4±0.7	5.0±0.6	7.4±1.3

Как видно из таблицы, суммарное содержание кислотных групп в исследованных образцах ГФК лежит в пределах 6-11 ммоль/г. Содержание карбоксильных групп, определенное Са-ацетатным методом, составляют от 40 до 70% от этой величины. Средние величины для образцов, выделенных из водных сред, выше чем для торфяных и почвенных ГФК, что согласуется с представлениями о большем вкладе в их структуру кислородсодержащих функциональных групп [8,13].

В целом, результаты определения соответствуют диапазонам величин, обычно приводимым в литературе [1,5,7-10]. Средняя ошибка определения составила около 7%.

Для того, чтобы более наглядно представлять велико или мало содержание карбоксильных и фенольных гидроксильных групп в гумусовых кислотах, выразим в ммоль/г содержание соответствующих групп в некоторых индивидуальных органических соединениях:

Вещество	Содержание групп, ммоль/г	
	COOH	OH
Бензойная кислота	8.2	
Гидроксibenзойные кислоты	7.2	7.2
Дигидроксibenзойные кислоты	6.5	13.0
Полиакриловые кислоты	13.9	–
Полиметакриловые кислоты	11.6	–

Из приведенных примеров ясно, что ГФК, включающие в свою структуру как ароматические, так и алифатические фрагменты, характеризуются достаточно высокими содержаниями функциональных групп.

2.2.3. Функциональный состав выделенных препаратов гумусовых кислот и распределение кислорода по основным структурным фрагментам

Полученные в предыдущих разделах данные о содержании карбоксильных и разных типов гидроксильных групп в выделенных образцах гумусовых кислот обобщены в табл. 2.14.

Таблица 2.14. Содержание карбоксильных, фенольных и спиртовых гидроксильных групп в исследуемых препаратах гумусовых кислот, ммоль/г

Препарат	COOH-групп	ArOH-групп (по разности)	OH-групп (ацилирование)
Т о р ф я н ы е			
T1	7.1±0.3	2.8±0.8	2.2±0.2
T2	2.7±0.2	3.9±0.6	4.4±0.8
T3	3.1±0.3	5.9±1.3	5±1
T4	3.1±0.1	3.9±0.7	3.4±0.6
T5	2.9±0.1	5.3±0.7	9.5±0.8
T6	3.1±0.2	5.9±1.2	2.7±0.5
T7	4.0±0.2	3.9±0.6	6±1
T8	4.0±0.4	5.4±0.9	7±1
П о ч в е н н ы й			
П	3.9±0.3	5.1±0.7	3.4±0.7
В о д н ы е			
B1	7.6±0.6	3.3±1.2	6.1±0.7
B2	7.7±0.8	1.9±2.2	4.2±0.8
B3	5.0±0.6	7.4±1.3	3.7±0.6

Как видно из таблицы, среднее содержание карбоксильных групп для образцов, выделенных из водных сред, выше, чем для торфяных и почвенных. Это согласуется с характерным для них более высоким отношением О/С, рассчитанным из данных элементного анализа (табл. 2.4). Соответствующей зависимости от источника происхождения ГФК для ArOH-групп и гидроксильных групп, определенных ацилированием, не прослеживается.

Сравнение результатов ацилирования с содержанием фенольных групп, рассчитанным по разности определений баритовым и Са-ацетатным методами, показывает неколичественность ацилирования гидроксильных групп ГФК избранным методом. Данный факт можно объяснить пространственной затрудненностью фенольных гидроксильных групп в гумусовых кислотах. Так, например, известно, что фенолы с пространственно экранированной гидроксильной группой (тризамещенные и более) реагируют с уксусным ангидридом неколичественно [70]. Принимая во внимание высокую степень замещения ароматических колец в гумусовых кислотах (от 3 до 5) [41], можно предположить, что ацилированию уксусным ангидридом подвергаются, в основном, спиртовые группы гумусовых кислот.

Для проверки правильности использованных методов полученные данные о количестве основных кислородсодержащих групп сравнивали с

имеющимися в нашем распоряжении результатами, полученными методами ^1H и ^{13}C ЯМР-спектроскопии (рис. 2.7).

Как видно из рисунка, для большинства образцов наблюдается хорошее соответствие результатов определения карбоксильных групп всеми использованными методами, что свидетельствует в пользу правильности этих результатов. Ввиду нерегулярности строения ГФК невозможно подобрать стандарт, позволяющий оценить точность и правильность результатов анализа ГФК, поэтому совпадение результатов исследования различными методами может служить единственным критерием правильности данных.

Результаты определения фенольных гидроксильных групп, полученные различными методами, плохо согласуются между собой. Возможными причинами этого могут служить ненадежность отнесения областей сигналов фенольных углеродов в ^{13}C ЯМР-спектрах и наложение ошибок при определении фенольных групп по разности. Тем не менее, несмотря на все сложности количественного определения, для 7 из 12 препаратов данные по содержанию фенольных гидроксильных групп, полученные баритовым методом и ^{13}C ЯМР спектроскопией достаточно близки.

Сравнение результатов ацетилирования и имеющихся в нашем распоряжении данных по содержанию спиртовых групп, рассчитанных из ПМР-спектров для семи препаратов, подтвердило наше предположение о том, что ацетилированию подвергаются, в основном, спиртовые гидроксилы ГФК.

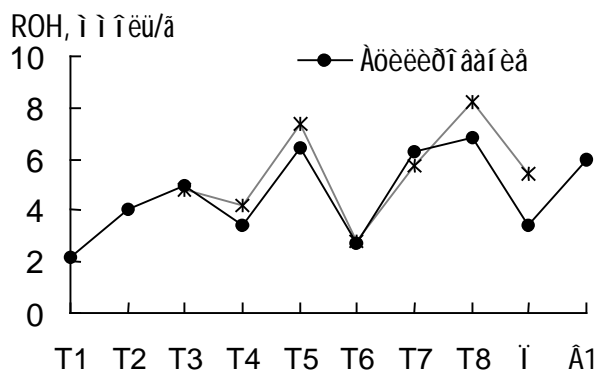
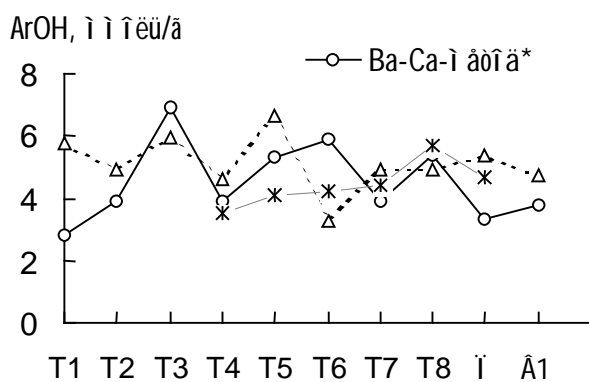
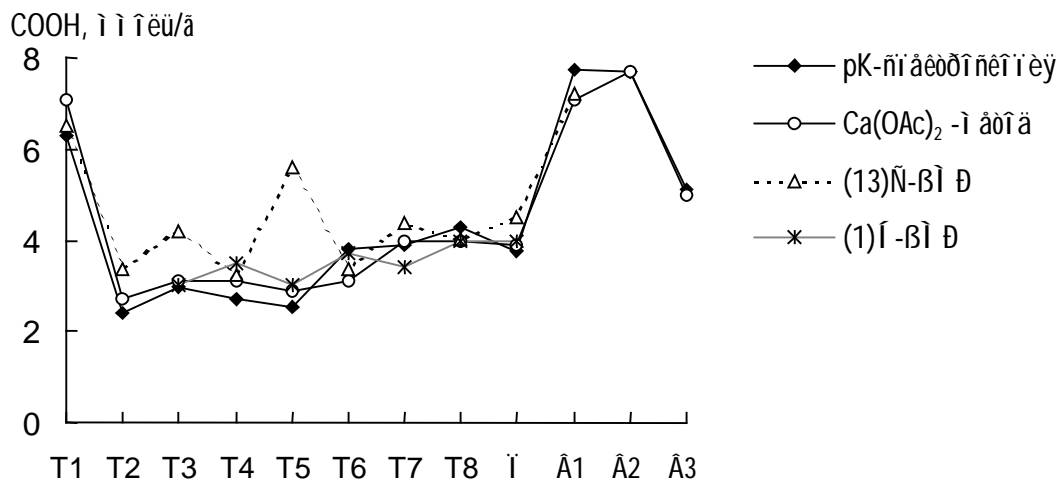


Рис. 2.7. Сопоставление результатов определения карбоксильных и гидроксильных групп в образцах ГФК различными методами. (Серия данных, полученных методом рК-спектроскопии – см. след. раздел).

Сопоставление полученных данных по содержанию карбоксильных и фенольных групп с количеством ароматического углерода, рассчитанным из ¹³C ЯМР-спектров, показало, что в среднем на одно ароматическое кольцо в структуре торфяных и почвенных гумусовых кислот приходится 1.3 карбоксильных и 1.6 фенольных групп, тогда как в для водных – 3,5 карбоксильных и 1 фенольная группа. Так как каждое ароматическое кольцо в

структуре гумусовых кислот для образования полимерной структуры должно быть соединено с другими фрагментами в среднем двумя мостиковыми группами, можно сделать вывод о том, что в структуре гумусовых кислот водного происхождения присутствует достаточно много ароматических колец, замещенных более чем двумя карбоксильными группами и некоторое количество карбоксильных групп, не соединенных непосредственно с ароматическими кольцами.

Распределение кислорода по основным структурным фрагментам ГФК

Совместный анализ данных по элементному и функциональному составу исследуемых препаратов ГФК позволил рассчитать распределение кислорода по основным структурным фрагментам (табл. 2.15).

Таблица 2.15. Распределение кислорода по основным структурным фрагментам гумусовых кислот

Препарат	% О (от общего содержания) в составе групп			
	СООН	АгОН	Углеводн.*	Другие
Т о р ф я н ы е				
T1	57	11	15	17
T2	22	16	35	27
T3	26	25	35	14
T4	26	16	34	24
T5	25	23	37	15
T6	26	25	19	30
T7	35	17	38	10
T8	35	24	35	6
П о ч в е н н ы й				
П	31	20	22	27
В о д н ы е				
B1	47	13	33	6
B2	46	6	21	27
B3	30	22	20	28

*Общее содержание кислорода в углеводных фрагментах с учетом циклической структуры, рассчитанное по данным ацилирования.

Согласно полученным результатам, в структуре ГФК в состав карбоксильных и гидроксильных (фенольные+спиртовые) групп входит 75-

85% кислорода, что подтверждает определяющую роль данных типов групп для проявляемых химических свойств ГФК. 15-25% кислорода использованными методами не определялись. По-видимому, они содержатся в виде метоксильных, сложноэфирных, пептидных и карбонильных групп [3,8].

Данные по распределению кислорода, усредненные по образцам одинакового происхождения, приведены в виде диаграммы на рис. 2.8.

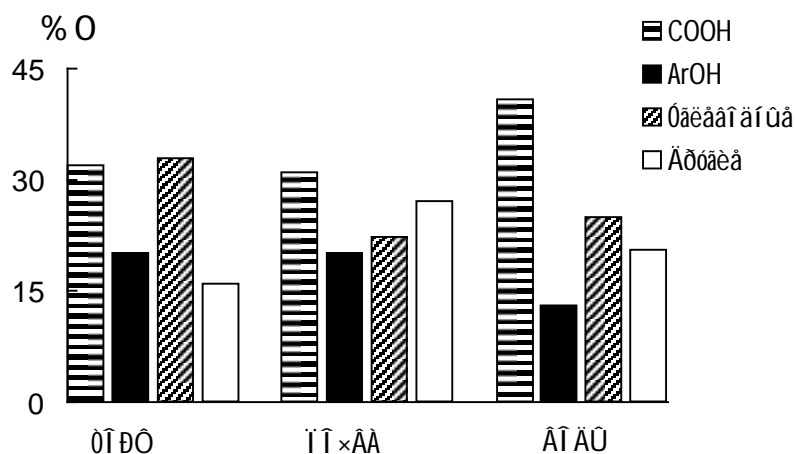


Рис. 2.8. Распределение кислорода по основным структурным фрагментам гумусовых кислот различного происхождения.

Приведенная диаграмма наглядно демонстрирует различия в распределении кислорода по перечисленным фрагментам для гумусовых кислот различного происхождения. Торфяные гумусовые кислоты отличаются наиболее высоким вкладом углеводных фрагментов, водные - доминированием карбоксильных групп, почвенные - более равномерным распределением кислорода между рассматриваемыми фрагментами. Можно предположить, что такое различие между препаратами гумусовых кислот, выделенными из разных источников, должно определять и особенности их химического поведения.

2.3. Определение характеристик реакционной способности гумусовых кислот

Химическая гетерогенность (присутствие в структуре различных по химическому окружению карбоксильных и гидроксильных групп) и полиэлектролитная природа ГФК приводит к тому, что функциональные группы одного типа проявляют различную способность к кислотной

диссоциации и комплексообразованию с переходными металлами. Поэтому наиболее адекватно протолитические и комплексообразующие свойства ГФК описываются распределениями ионогенных групп и комплексообразующих центров по проявляемой реакционной способности. В связи с этим нами был использован именно такой подход для характеристики реакционной способности.

2.3.1. Исследование распределения ионогенных групп препаратов гумусовых кислот по константам кислотной диссоциации

Целью данной части исследования было получить количественные характеристики протолитических свойств препаратов ГФК.

Как уже отмечалось в разделе 1.4, диссоциацию кислотных групп высокомолекулярных электролитов нельзя описать одной или двумя константами. Вследствие электростатических эффектов величины констант зависят от степени диссоциации поликислоты [105]. Поэтому для наиболее адекватного описания кислотных свойств ГФК нами использована модель непрерывного распределения ионогенных групп по константам кислотности (непрерывный рК-спектр) [85].

Для характеристики кислотных свойств исследуемых препаратов ГФК был выбран метод рК-спектроскопии, с решением интегрального уравнения кривой титрования линейным МНК с ограничениями на неотрицательность решений [119]. Метод ранее был протестирован и показал хорошие результаты на смесях низкомолекулярных электролитов, модельных рК-спектрах с различными типами распределений ионогенных групп по рК и полиэлектролитах известного состава [188].

Получение рК-спектров препаратов ГФК

Для всех исследуемых препаратов ГФК были получены кривые прямого потенциометрического титрования в бессолевых растворах. Поддерживающий электролит не использовался, так как было установлено, что воспроизводимость рК-спектров ГФК, рассчитанных по данным титрования в растворах с высокой ионной силой, очень низка. Типичные кривые потенциометрического титрования ГФК приведены на рис. 2.9.

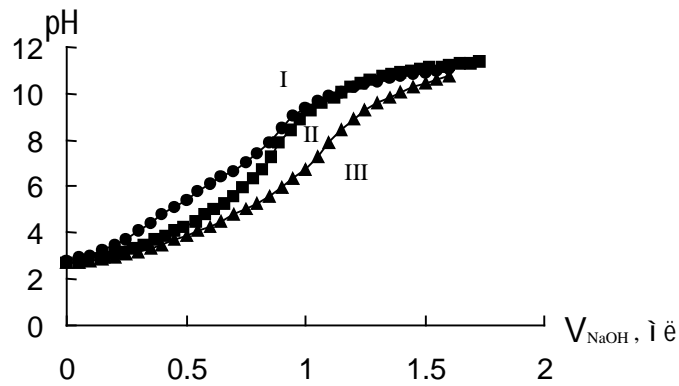


Рис. 2.9. Типичные кривые прямого потенциометрического титрования ГФК: I - торфяные, II - водные, III - почвенные.

Как видно из рис. 2.9, на кривой титрования торфяных ГФК наблюдается два слабо выраженных перегиба, соответствующих, вероятно, последовательной нейтрализации карбоксильных и фенольных групп. В то же время на кривых титрования почвенных и водных ГФК различим лишь один перегиб.

С помощью компьютерной обработки, детали которой изложены в работе [188], экспериментальные кривые титрования были преобразованы в кривые распределения кислотных групп исследуемых образцов ГФК по величинам pK – pK -спектры. Для абсолютного большинства препаратов наблюдалась хорошая воспроизводимость pK -спектров, рассчитанных из данных параллельных титрований (рис. 2.10).

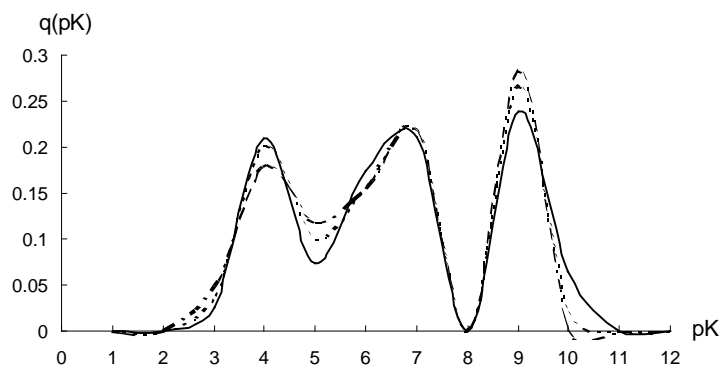


Рис.2.10. Воспроизводимость pK -спектров на примере препарата Т5 (q – мольная доля групп с данным значением pK).

Типичные pK -спектры исследуемых препаратов ГФК различного происхождения приведены на рис. 2.11. pK -спектры всех препаратов даны в Приложении 4.

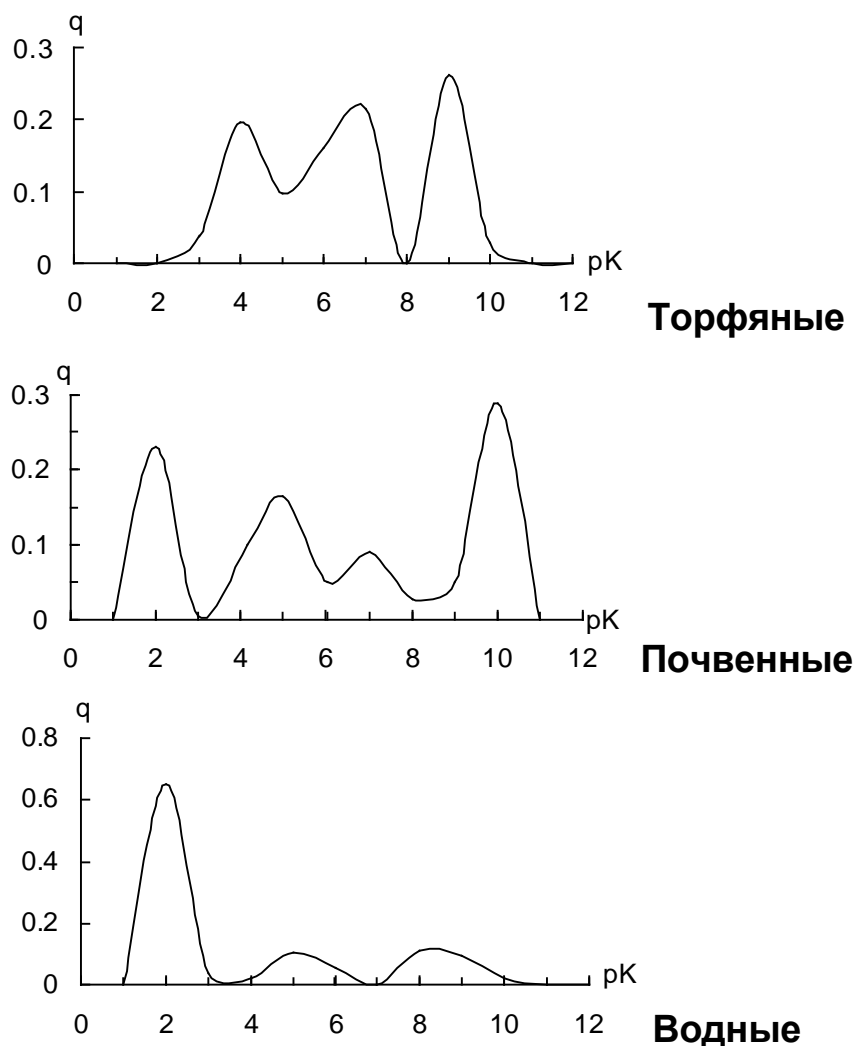


Рис. 2.11. Типичные рК-спектры ГФК различного происхождения (q- мольная доля групп с данным рК).

Форма рК-спектров большинства препаратов торфяных ГФК близка к изображенному на рис. 2.10. Однако, торфяные препараты Т1 и Т6 обладали резко отличающейся формой спектра: очень большой пик при рК 4 и очень маленький при $pK \geq 8$. Эти препараты отличались от остальных также по данным элементного анализа (табл. 2.4) и Са-ацетатного метода (табл. 2.13).

Полученные рК-спектры торфяных ГФК характеризуются наличием трех или четырех максимумов в следующих интервалах значений рК: 2-3; 3-5; 6-8 и 8-10, тогда как для всех образцов водных ГФК наблюдается три максимума в интервалах рК: 2-2.5, 5-7, 8.5-10 с существенно большим вкладом наиболее сильноокислотных групп. Данный факт согласуется с литературными [16] и полученными в данной работе данными о большем содержании карбоксильных групп в молекулах водных ГФК. В целом,

наличие нескольких полос в рК-спектрах отражает как наличие различных типов кислотных групп, так и неоднородность их химического окружения.

Количественные характеристики рК-спектров всех исследованных препаратов ГФК обобщены в табл. 2.16.

Таблица 2.16. Характеристики рК-спектров исследуемых образцов ГФК

Препарат	Параметр	Номер пика в спектре			
		1	2	3	4
Т1	рК	–	3.8	5.9	8.3
	q*	–	0.48	0.28	0.26
Т2	рК	1.8	4.1	6.4	9.2
	q	0.14	0.21	0.38	0.27
Т3	рК	1.0	5.1	6.8	9.6
	q	0.16	0.23	0.20	0.41
Т4	рК	1.0	–	6.0	9.5
	q	0.28	–	0.37	0.35
Т5	рК	–	4.0	6.4	9.1
	q	–	0.28	0.43	0.29
Т6	рК	1.0	4.7	8.3	9.9
	q	0.06	0.72	0.11	0.11
Т7	рК	1.0	5.2	7.2	10.3
	q	0.20	0.21	0.24	0.36
Т8	рК	1.0	4.6	6.7	9.1
	q	0.19	0.40	0.23	0.18
П	рК	1.0	4.6	7.0	9.9
	q	0.21	0.29	0.14	0.36
В1	рК	1.1	5.2	8.6	–
	q	0.65	0.18	0.22	–
В2	рК	1.0	5.4	8.3	–
	q	0.47	0.33	0.2	–
В3	рК	1.0	–	7.0	9.9
	q	0.39	–	0.05	0.56

Соотнести полосы, наблюдаемые в рК-спектре с типом и характером химического окружения кислотных групп достаточно сложно, потому что рК в максимуме полосы в рК-спектре полиэлектролита несколько выше рК мономера и соответствует значению рН, при котором диссоциирована половина ионогенных групп, относящихся к данной полосе спектра [105].

Тем не менее можно предположить, что максимумы полос в рК-спектрах гумусовых кислот смещены не более чем на единицу относительно рК низкомолекулярных аналогов, поскольку плотность заряда на полиионе ГФК не очень высока. Так, для полиакриловой кислоты содержание легко

диссоциирующих карбоксильных групп составляет 14 ммоль/г и сдвиг рК в максимуме распределения относительно рК мономера (пропионовой кислоты) составляет в бессолевом растворе 2 единицы рК (6.9 и 4.9 [126], соответственно). Содержание легкодиссоциирующих карбоксильных групп в ГФК, как было показано в предыдущем разделе работы, составляет 3-7 ммоль/г, следовательно, и плотность заряда на макромолекуле будет в 2-4 раза меньше.

Наличие в рК-спектрах практически всех исследованных препаратов ГФК минимума при рК 8 позволяет предположить, что полосы рК-спектра, лежащие при рК ниже этого значения относятся к карбоксильным группам, а единственная полоса, лежащая выше рК 8 – к фенольным. Наличие 2-3 разрешенных или неполностью разрешенных пиков в области рК < 8, вероятно, связано с присутствием в структуре карбоксильных групп, имеющих различное химическое окружение: различным способом замещенные ароматические кольца, углеводные и алифатические фрагменты. Мономодальное распределение фенольных групп можно объяснить их достаточно близкой природой в ГФК.

Наличие двух-трех типов карбоксильных групп в ГФК отмечается также и другими исследователями [8,170]. При этом обычно полагают, что наиболее сильноокислотные карбоксильные группы в ГФК могут быть следующих типов: ароматические с гидроксильной группой в орто-положении (салицилатный фрагмент) [8,13], алифатические с β-кето-группой а также полизамещенные фуранкарбоновые кислоты [189]. Однако строгих доказательств присутствия данных структур в молекулах ГФК на сегодняшний день не получено.

Более слабые карбоксильные группы (полоса при рК 4-6), по-видимому, представлены ароматическими и алифатическими группами, не имеющими акцепторных заместителей в ближайшем окружении [170]. Присутствие в рК-спектрах полос при рК 6-8, с нашей точки зрения, может быть связано с ослаблением силы кислот из-за полиэлектролитных и конформационных эффектов.

Особо следует отметить, что в рК-спектрах практически всех исследованных препаратов ГФК наблюдался минимум при рК_а ~ 7-8. Это

позволило отнести все пики при $pK \leq 8$ к карбоксильным группам, а пик при $pK \geq 8$ – к фенольным. На основании такого отнесения полос суммированием долей всех групп, входящих в указанные интервалы, были рассчитаны содержания карбоксильных и фенольных групп, а также средневзвешенные pK для них.

В табл. 2.17 величины общего содержания кислотных групп и содержания карбоксильных групп в исследуемых препаратах ГФК, рассчитанные из pK -спектров, сопоставлены с данными баритового и Са-ацетатного методов.

Таблица 2.17. Содержание кислотных групп в выделенных образцах ГФК по данным титриметрических методов, ммоль/г

Препарат	(COOH+ArOH)-групп*		COOH-групп*	
	(Барит. мет.)	(pK -спектр)	(Са-ацетатн.)	(pK -спектр)
T1	9.9±0.8	7.9±0.4	7.1±0.3	6.3±0.3
T2	6.6±0.4	3.4±0.1	2.7±0.2	2.4±0.1
T3	10±1	5.1±0.3	3.1±0.3	3.0±0.2
T4	7.0±0.6	3.6±0.1	3.1±0.1	2.7±0.2
T5	8.2±0.6	5.0±0.3	2.9±0.1	3.0±0.3
T6	9±1	8.7±0.4	3.1±0.2	7.0±0.5
T7	9.4±0.3	5.0±0.3	4.0±0.4	4.1±0.2
T8	7.9±0.4	6.0±0.1	4.0±0.2	4.0±0.2
П	7.2±0.4	5.8±0.3	3.9±0.3	3.9±0.2
B1	10.9±0.6	10.0±0.4	7.6±0.6	7.7±0.8
B2	12.4±0.7	11.6±0.2	5.0±0.6	5.1±0.2
B3	9.6±1.4	9.63	7.7±0.8	7.7±0.7

* $n=3$; $P=0.95$

Как видно из таблицы, содержание кислотных групп, рассчитанное из pK -спектра, существенно ниже определенного баритовым методом. Это, вероятно, связано с невозможностью надежного определения методом pK -спектроскопии очень слабокислотных групп (с $pK \geq 11$) [40], в то время как баритовым методом такие группы определяются (равновесие сдвигается влево за счет образования малорастворимого соединения).

В то же время, для большинства образцов ГФК наблюдается хорошее совпадение значений карбоксильной кислотности, полученных Са-ацетатным методом и рассчитанных из pK -спектров. Расхождения лежат в пределах 3-

10%. Исключение составляет образец Тб. Возможно это связано с большим временным интервалом между определениями.

Наблюдаемая хорошая сходимость результатов определения карбоксильных групп двумя методами позволяет предположить, что полученное некоторыми авторами существенное завышение содержания карбоксильных групп при использовании Са-ацетатного метода по сравнению с прямым потенциометрическим (а также термометрическим) титрованием, как указывается, например, в работах [87,88], вероятно, связано не столько с титрованием неосаждаемой фракции или комплексообразованием с Са, сколько с неправильным выбором точки эквивалентности и количественных соотношений реагент/субстрат.

Итак, в качестве характеристик реакционной способности препаратов ГФК в реакции кислотной диссоциации должны выступать величины, учитывающие неоднородность распределения кислотных свойств и относящиеся ко всему препарату в целом. Нам представляется, что такими величинами могут служить средне-взвешенные $p\bar{K}$ карбоксильных и фенольных групп, а также всех ионогенных групп. $p\bar{K}$, рассчитанные нами по формуле:

$$p\bar{K} = \frac{\sum q_i pK_i}{\sum q_i} \quad (2.3)$$

приведены в табл. 2.18.

Таблица 2.18. Усредненные значения рК кислотных групп исследуемых препаратов ГФК

Образец ГФК	Средневзвешенные \overline{pK}		
	COOH-групп	ArOH-групп	по всему спектру
T1	4.6	8.2	5.5
T2	4.9	9.2	6.0
T3	4.5	9.6	6.6
T4	4.3	9.5	5.9
T5	5.5	9.1	6.5
T6	4.9	9.0	5.3
T7	4.4	9.0	5.2
T8	4.5	10.3	6.5
П	3.9	9.9	5.9
B1	1.9	8.6	3.4
B2	2.8	8.4	3.9
B3	1.8	9.9	6.3

Как видно из таблицы, $\overline{\delta E}$ карбоксильных, фенольных и суммы ионогенных групп существенно различаются для различных препаратов ГФК. Значения $\overline{\delta E}$ карбоксильных групп для торфяных ГФК лежат в пределах 4.9-5.5, фенольных групп – 8.2-10.3. Препараты водных ГФК вследствие большего вклада сильнокислотных групп характеризуются самыми низкими $\overline{\delta E}$ карбоксильных групп 1.8-2.8.

2.3.2. Определение количественных характеристик комплексообразующей способности гумусовых кислот

Наряду с кислотностью, которая обуславливает рН-буферность гумусовых кислот, важнейшим для природных сред свойством кислородсодержащей функциональной периферии ГФК является их комплексообразующая способность по отношению к ионам тяжелых металлов [1-5,8]. Количественными характеристиками комплексообразующей способности являются константы устойчивости комплексов. Поэтому следующей задачей работы было определить константы устойчивости комплексов выделенных препаратов ГФК с ионами тяжелых металлов.

В качестве модельного металла была выбрана медь. Медь входит в список приоритетных загрязнителей окружающей среды [5] и для нее в литературе приводятся наиболее высокие значения констант устойчивости гуматных и фульватных комплексов (табл. 1.7).

Как уже отмечалось в разд. 1.5.2, существуют различные методы и подходы к изучению комплексообразующих свойств ГФК. Для достижения целей, поставленных в нашей работе, был выбран метод Шуберта [139-141], с помощью которого комплексообразование исследуется в условиях большого избытка лиганда. Так как именно этот случай наиболее часто реализуется в природных условиях, где тяжелые металлы содержатся в следовых количествах.

На величины констант устойчивости комплексов $\beta_n = \frac{[\text{CuL}_n]}{[\text{Cu}][\text{L}]^n}$ (2.4),

определяемых из экспериментальных зависимостей $\lg\left(\frac{\lambda_0}{\lambda} - 1\right)$ от $\lg[\text{L}]$, влияют все реализуемые в исследуемых условиях типы связывания металла с ГФК. То есть такие константы являются средневзвешенными по всем связывающим центрам и могут, как и средневзвешенные рК, служить интегральной характеристикой реакционной способности препаратов ГФК.

Для исключения мешающего влияния гидролиза ионов Cu^{2+} константы устойчивости комплексов меди(II) с исследуемыми препаратами гумусовых кислот определяли при рН 5. Концентрацию лиганда выражали двумя различными способами: через массовую концентрацию гумусовых кислот и молярную концентрацию карбоксильных групп в растворе, поскольку известно, что именно карбоксильные группы вносят наибольший вклад в комплексообразование ГФК.

Результаты эксперимента были получены в виде величин $\lg(\lambda_0/\lambda-1)$ для соответствующей концентрации ГФК ($\lg[\text{L}]$). На рис. 2.12 приведен типичный вид зависимости $\lg(\lambda_0/\lambda-1)$ от логарифма концентрации ГФК ($\lg[\text{L}]$) для исследованных препаратов и уравнение прямой построенной по экспериментальным данным с помощью МНК.

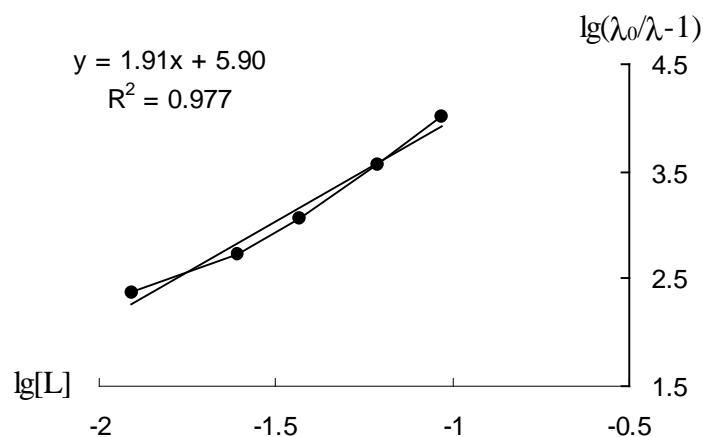


Рис. 2.12. Типичный график для определения констант комплексообразования препаратов ГФК в координатах метода Шуберта.

Как видно из рисунка, экспериментальные точки образуют вогнутую кривую, а не прямую линию. Если экспериментальную зависимость попытаться описать прямой линией, угловой коэффициент такой прямой, отражающий стехиометрию образующихся комплексов (уравнение (10)), будет иметь для большинства исследуемых образцов нецелочисленные значения в интервале от 1 до 2. Это с равной степенью вероятности может означать и образование комплексов разного состава (1:1 и 1:2) с одним типом центров, и присутствие двух типов связывающих центров, для одного из которых характерна стехиометрия (1:1), для другого – (1:2) [142,143]. Координата точки пересечения прямой с осью ординат в таком случае не равна величине константы. Поэтому методом линейного регрессионного анализа мы рассчитали константы для двух типов комплексов, используя уравнение для случая образования двух типов комплексов: $y = (\lambda_0 / \lambda - 1) / [L] = \beta_1 + \beta_2[L]$ (2.5). Полученные значения констант приведены в табл. 2.19.

Таблица 2.19. Значения условных констант устойчивости комплексов меди(II) с препаратами гумусовых кислот

Препарат	$\lg\beta_1^*$	$\pm\Delta$	$\lg\beta_2^*$	$\pm\Delta$	$\lg\beta_1(\text{COOH})^*$
Т о р ф я н ы е					
T1	4.2	0.4	5.3	1.5	6.3
T2	4.5	0.5	4.9	0.9	7.0
T3	3.9	0.2	4.8	1.2	6.4
T4	4.6	0.2	5.3	0.4	7.1
T5	4.5	0.6	5.4	1.5	7.0
T6	4.4	0.3	6.1	0.4	6.9
T7	4.2	0.2	4.5	0.7	6.6
T8	4.4	0.2	4.8	0.7	6.8
П о ч в е н н ы й					
П	4.0	0.3	5.2	0.7	6.4
В о д н ы е					
B1	4.2	0.3	4.9	0.9	6.4
B2	3.8	1.5	5.4	0.4	5.4
B3	4.2	0.6	5.5	0.6	6.5

*В расчете на массовую концентрацию ГФК.

**В расчете на молярную концентрацию карбоксильных групп

Как видно из таблицы, константы устойчивости комплексов ГФК с медью(II) для центров первого типа (или по первой ступени) имеют очень близкие величины для разных препаратов. Это говорит о наличии в ГФК различного происхождения близких по своей природе и свойствам центров связывания. Соотнести полученные величины с константами устойчивости комплексов меди с лигандами известного строения позволяют величины $\lg\beta_1$, определенные в расчете на мольную концентрацию карбоксильных групп (последний столбец табл. 2.19). (Так как содержание функциональных групп в органическом веществе всегда имеет порядок 10^{-3} моль/г вещества, такой способ оценки относительной силы связывания вполне оправдан.)

Величины $\lg\beta_1$ в расчете на концентрацию карбоксильных групп оказались для большинства препаратов сравнимыми и несколько выше таковой для салициловой кислоты (при pH 5 ее $\lg\beta_1$ равен 6.0). Следовательно, независимо от источника происхождения ГФК обладают сильными хелатирующими свойствами и могут быть использованы для закрепления либо мобилизации металлов в почве.

Поскольку в ГФК может существовать большое число вариантов химического окружения группировок одного и того же типа, полученные величины $\lg\beta_1$ и $\lg\beta_2$ по сути являются средне-взвешенными по всем центрам, принимающим участие в комплексообразовании в исследуемых условиях:

$$\beta_1 = \frac{\sum_{i=1}^N \beta'_{1i} c_i}{\sum_{i=1}^N c_i} \text{ и } \beta_2 = \frac{\sum_{j=1}^N \beta'_{2j} c_j}{\sum_{j=1}^N c_j}, \quad (2.6)$$

где β_{1i} , и c_i – константа и концентрация для центров i -ого типа; β_{1j} , и c_j – константа и концентрация для центров j -ого типа.

То есть полученные константы устойчивости комплексов как и средневзвешенные pK характеризуют интегральное свойство вещества.

Как следует из табл. 2.19, независимо от источника происхождения гумусовых кислот, константы устойчивости их комплексов с медью (II) имеют достаточно высокие величины для всех препаратов. Следовательно, гумусовые кислоты можно рассматривать как хелатирующие агенты природного происхождения и использовать препараты ГФК для того, чтобы направленно влиять на подвижность и биодоступность металлов в природных средах. Исследованию влияния внесенных гумусовых кислот на подвижность тяжелых металлов в почве будет посвящен последний раздел работы.

2.4. Установление количественных соотношений между функциональным составом и реакционной способностью гумусовых кислот

Определение элементного и функционального состава проводится практически при любых исследованиях ГФК. Широко используются и различные способы описания их кислотных и комплексообразующих свойств. Однако, результаты исследования элементного и функционального состава обычно используются только для сравнительной характеристики ГФК и построения структурных моделей.

Нам встретился единичный пример использования корреляционных соотношений для прогнозирования содержания кислотных групп в ГФК угля на основе данных об элементном составе [190]. Есть публикации, где данный

метод использовали для установления зависимости детоксицирующего действия ГФК на загрязняющие вещества от структуры токсиканта [191]. Но, насколько нам известно, до сих пор не предпринималось попыток установить количественные взаимоотношения структура-свойство для самих гумусовых кислот.

Для получения зависимостей “структура-свойство” обычно применяют метод корреляционных соотношений. Данный метод основан на проведении корреляционно-регрессионного анализа между блоком параметров, описывающих структуру исследуемых соединений (так называемых структурных дескрипторов), и физико-химическими параметрами, характеризующими прогнозируемое свойство. Для этих целей используют дескрипторы состава (атомные отношения и молекулярные массы), химико-топографические (количества, длины и углы связей и др.) и квантово-механические. В связи с нестехиометричностью состава и нерегулярностью строения ГФК применение двух последних типов дескрипторов для описания их структуры практически невозможно. Нами было сделано предположение, что в этих целях могут быть использованы дескрипторы состава, расширенные за счет характеристик распределения элементов между основными функциональными группами.

Безусловно, такой способ представления структуры является грубым и приближенным, однако, с его помощью можно дать некое интегральное описание структуры ГФК.

Первостепенной задачей было найти способ построения структурных дескрипторов на основе данных элементного и функционального состава. Исходя из имеющихся данных и значимости исследованных функциональных групп для проявляемых ГФК кислотных и комплексообразующих свойств нами использовался следующий *набор дескрипторов*:

Атомные соотношения:

O/C, H/C и U/C (ненасыщенность в расчете на один атом углерода)

Распределение кислорода:

COOH/O, ArOH/O и ROH/O (доли кислорода в соответствующих группах).

В качестве **прогнозируемых свойств** были взяты:

а) средневзвешенные константы кислотной диссоциации карбоксильных групп, фенольных гидроксидов и всех ионогенных групп – $\overline{pK}_{\text{COOH}}$, $\overline{pK}_{\text{ArOH}}$, \overline{pK} ;

б) константы устойчивости комплексов ГФК с медью – $\lg\beta_1$ и $\lg\beta_2$.

Для проверки принципиальной возможности описания средневзвешенных \overline{pK} карбоксильных групп с помощью перечисленных выше структурных дескрипторов, не учитывающих пространственные и другие тонкие эффекты, был составлен блок соответствующих данных для ряда низкомолекулярных ароматических и алифатических карбоновых кислот, замещенных только алкильными и кислородсодержащими группами (всего 56 кислот, список в Приложении 9). Значения \overline{pK} карбоксильных групп усредняли для различных пространственных изомеров, включая орто-изомеры для замещенных бензойных кислот. Для кислот, имеющих более одной карбоксильной группы, рассчитывали среднее \overline{pK} карбоксильных групп. После указанных усреднений список модельных кислот содержал 41 наименование.

Исходный массив структурных данных и полученных усредненных значений \overline{pK} сначала подвергался корреляционному анализу, по результатам которого отбирались параметры, показавшие наиболее высокую степень корреляции с величинами \overline{pK} и независимые друг от друга. Корреляционные матрицы приведены в Приложении 10. Затем проводили регрессионный анализ, оценивая значимость регрессионных уравнений по критерию Фишера (F). Наиболее значимым оказалось следующее регрессионное уравнение (табл. 2.20).

Таблица 2.20. Характеристики корреляционного уравнения для расчета среднего \overline{pK} кислотной диссоциации карбоновых кислот

Дескриптор	Коэффициент регрессии	R^2
Свободный член	3.6 ± 0.2	
O/C	-0.15 ± 0.11	0.15
U/C	-1.7 ± 0.3	0.24
COOH/O	2.0 ± 0.2	0.36
ArOH/O	1.3 ± 0.4	0.36

На рис 2.13 сопоставляются исходные и рассчитанные по полученному корреляционному уравнению pK для обработанного списка карбоновых кислот.

Как видно из рис. 2.13, усредненные pK карбоксильных групп модельных карбоновых кислот можно рассчитать с точностью до 0.3 единицы pK , используя структурные дескрипторы состава, построенные на основе данных об элементном и функциональном составе.

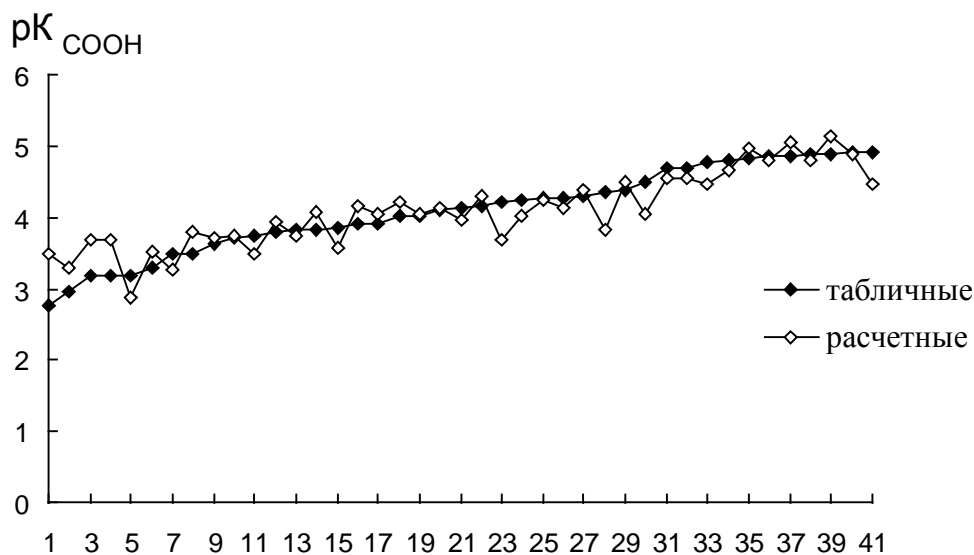


Рис. 2.13. Корреляция между табличными и рассчитанными по регрессионному уравнению значениями pK кислотной диссоциации карбоновых кислот. $r^2=0.8$; $F_{\text{расч}}=30.5 > F_{\text{табл}}=3.25$.

Для повышения значимости искомых корреляций набор образцов ГФК был расширен за счет фульвокислот (Ф1-Ф3) почвенного и водного происхождения, предоставленных кафедрой водной химии Университета Карлсруэ (ФРГ). По своим структурным характеристикам они занимают промежуточное положение между нашими торфяными и водными ГФК.

Аналогичная описанной выше обработка массива данных для препаратов ГФК привела к регрессионным уравнениям для $\overline{pK}_{\text{сооН}}$ и $\lg\beta_2$, параметры которых показаны в табл. 2.21.

Таблица 2.21. Характеристики корреляционных уравнений для расчета \overline{pK}_{COOH} и $lg\beta_2$ ГФК

Прогнозируемая величина	Дескриптор	Коэффициент регрессии	R^2 регрессии
\overline{pK}_{COOH}	Свободный член	6.0 ± 1.0	0.85
	O/C	-6.2 ± 0.8	
	U/C	3.5 ± 1.7	
$lg\beta_2$	Свободный член	5.4 ± 0.3	0.86
	ОН/О	-3.3 ± 0.8	
	COOH/O*ArOH/O	9 ± 3	

На рис. 2.14 приведены для сравнения экспериментальные и рассчитанные по приведенным уравнениям \overline{pK}_{COOH} и $lg\beta_2$ препаратов ГФК.

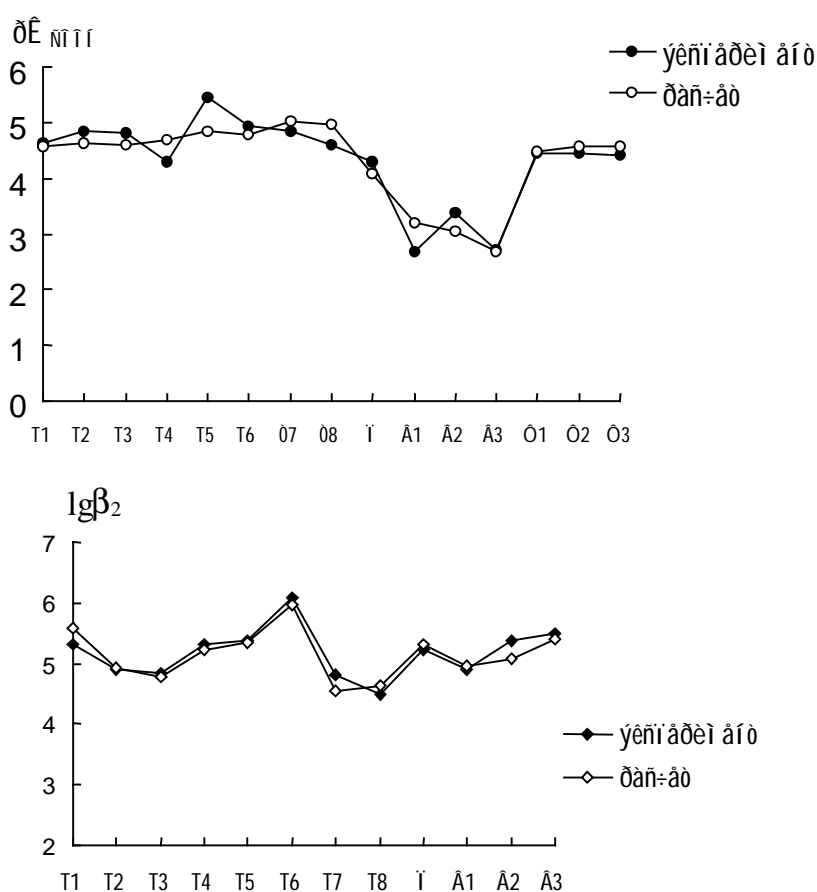


Рис. 2.14. Сопоставление экспериментальных и расчетных значений \overline{pK}_{COOH} и $lg\beta_2$ для выделенных препаратов ГФК ($\Delta pK = \pm 0.3$; $F_{расч} = 34 > F_{табл} = 3.3$; $\Delta lg\beta_2 = \pm 0.3$; $F_{расч} = 13.4 > F_{табл} = 5.2$).

Как видно из рисунка, найденные регрессионные уравнения правильно отражают основные тенденции зависимости \overline{pK}_{COOH} и $lg\beta_2$ от элементного и функционального состава ГФК. В то же время для \overline{pK} , \overline{pK}_{ArOH} и $lg\beta_1$ получить

удовлетворительные корреляции не удалось. По-видимому, это связано с неполным определением фенольных гидроксиллов методом рК-спектроскопии и малыми различиями в величинах $\lg\beta_1$ для разных образцов.

С нашей точки зрения, простота найденной регрессии свидетельствует о достаточно тесной взаимосвязи $\overline{pK}_{\text{COOH}}$ с выбранными структурными параметрами. Например, линейной зависимостью от О/С можно описать рК для гомологических рядов алифатических карбоновых и дикарбоновых кислот, алициклических гидроксизамещенных кислот и др. То есть такими зависимостями может быть описана кислотность соединений, в которых небольшие изменения дескрипторов состава не приводят к скачкообразному изменению свойств.

Обобщая результаты, полученные в данной главе можно сказать следующее:

- Несмотря на приближенность использованного метода построения зависимостей структура-свойство для ГФК на основе параметров состава, он позволяет правильно описать тенденции изменения протолитических и комплексообразующих свойств в зависимости от элементного и функционального состава. Следовательно, предложенный подход может оказаться перспективным для прогнозирования реакционной способности ГФК по отношению к тяжелым металлам на основании известных данных об элементном и функциональном составе препаратов ГФК.
- Для работы с этим методом при компоновке набора препаратов необходимо выбирать образцы достаточно сильно отличающиеся по структурным параметрам. Однако надо избегать и другой крайности, когда рассматриваемые образцы образуют две группы, сильно различающиеся по свойствам. В этом случае полученная высокая корреляция не будет иметь никакого химического смысла.
- При работе с ГФК одинакового происхождения, и обладающими близкими характеристиками, для получения достоверных корреляций нужна достаточно большая выборка препаратов (>30).

Применение вышеизложенного подхода можно расширить для выбора наиболее эффективных препаратов для решения задач, связанных с детоксикацией природных сред. Пример использования данного подхода в практических целях охраны окружающей среды приведен в заключительной главе диссертации.

2.5. Использование препаратов гумусовых кислот для иммобилизации тяжелых металлов в слое загрязненных почв

Известно, что ГФК играют важную роль в распределении тяжелых металлов (ТМ) по различным формам существования, с одной стороны, и по почвенному профилю, с другой. Как уже отмечалось в гл. 1.5, основным механизмом взаимодействия ГФК-ТМ является комплексообразование. В то же время до сих пор не исследовалось, как может повлиять на сложившееся распределение металлов внесение в почву водорастворимых препаратов гумусовых кислот.

Высокая комплексообразующая способность и полидисперсность молекулярных масс гумусовых кислот позволяет предположить два возможных механизма влияния их водорастворимых препаратов на миграционную способность ТМ в почвах:

1) увеличение подвижности ТМ за счет образования мобильных комплексов с фульвокислотами (более легкой фракцией ГФК);

2) снижение концентрации подвижных форм в результате сорбции на почве высокомолекулярной фракции ГФК и связывания с ней подвижных форм ТМ.

Целью данной части работы было выяснить характер изменений, происходящих в распределении ТМ в почве при внесении водорастворимых препаратов ГФК и оценить возможность их использования для рекультивации почв, загрязненных ТМ.

При постановке экспериментов по иммобилизации тяжелых металлов путем обогащения загрязненного слоя почв гумусовыми кислотами перед

нами стояла задача выбора наиболее эффективных водорастворимых препаратов ГФК. Как следует из полученного регрессионного уравнения (Табл. 6), максимальной способностью к связыванию ионов меди(II) обладают гумусовые кислоты с минимальным содержанием углеводных фрагментов. В связи с этим в качестве природных концентратов водорастворимых препаратов ГФК нами были выбраны два типа болотных вод (БВ1 и БВ2), содержание углеводных фрагментов в ГФК которых существенно ниже по сравнению с торфяными, а также гуминовый препарат (ГП), представляющий собой продукт кислотного гидролиза торфа, практически не содержащий полисахаридов.

Чтобы получить ответы на поставленные вопросы были проведены эксперименты по промыванию колонок, содержащих образец почвы (табл. 2.22), загрязненной тяжелыми металлами в естественных условиях.

Таблица 2.22. Содержание ТМ (по вытяжке 1 М HNO₃) в образце почвы, использованном для приготовления колонок и ПДК соответствующих металлов в почве

Содержание металла в почве, мг/кг	Cu	Pb	Cd	Cr(IV+VI)
Исслед. образец	146	15.3	2.6	34
Фоновый уровень	15-30	20-40	0.1-0.3	
ПДК (над фоном)	100	20	3	–

В качестве элюентов использовали: а) дистиллированную воду; б) болотную воду; в) раствор промышленного гуминового препарата на основе торфа. Предварительно проведенные определения содержания ТМ в болотной воде и растворе гуминового препарата показали фоновые значения по всем контролируемым металлам для обоих элюентов.

Протекающие в ходе промывания процессы контролировали двумя путями:

- анализом фракций элюата на содержание Cu, Pb, Cd и Cr (контроль за вымываемым количеством металлов);
- анализом материала исходной и промытой почвенной колонки на содержание кислоторастворимых и подвижных форм тех же металлов

(контроль за перераспределением металлов по формам существования и по почвенному профилю).

К числу подвижных (доступных растениям форм) относят все формы металлов, извлекаемых из почвы ацетатно-аммонийным буфером с pH 4.8. Содержание кислоторастворимых форм определяется по вытяжке 1M HNO₃ и составляет около 90% общего содержания металла в почве [178].

Анализ фракций элюата

Кривые элюирования ТМ с почвенных колонок при промывании перечисленными растворами ГФК были качественно идентичны. Содержание Cu, Pb и Cd в элюате проходит через максимум (соответствующий 4-6 кратному увеличению концентрации относительно исходного фонового значения) при объеме элюата равном 1.2-1.5 поровым объемам колонки или 0.5 почвы в колонке. По сравнению с дистиллированной водой вымывалось в 3-4 раза больше ТМ. Типичные кривые приведены на рис. 2.15. Содержание Cr в элюате в течение всего процесса промывания оставалось на уровне фонового значения.

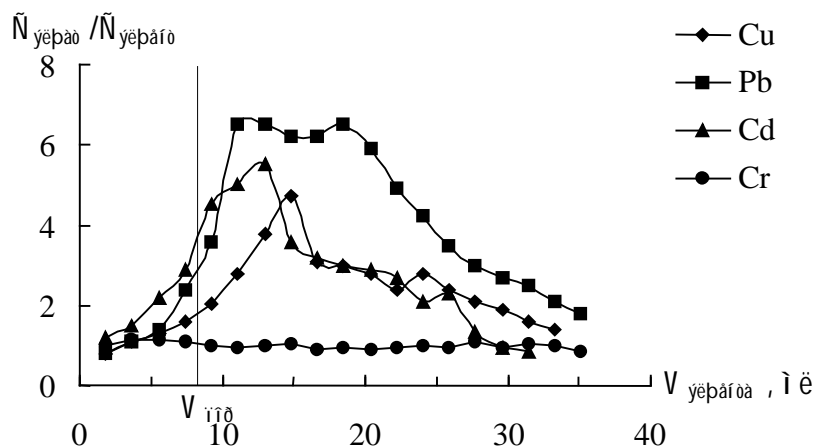


Рис. 2.15. Кривые элюирования ТМ из почвенной колонки. Элюент – БВ 1 ($C_{\text{ГФК}}=60$ мг/г) с фоновыми концентрациями ТМ: $C_{\text{Cu}}=34$ мкг/л; $C_{\text{Pb}}=1.4$ мкг/л; $C_{\text{Cd}}=0.7$ мкг/л; $V_{\text{пор}}$ - поровый объем колонки.

Гуминовый препарат показал несколько более высокую мобилизующую способность по отношению к Cu, чем болотные воды (рис. 2.16).

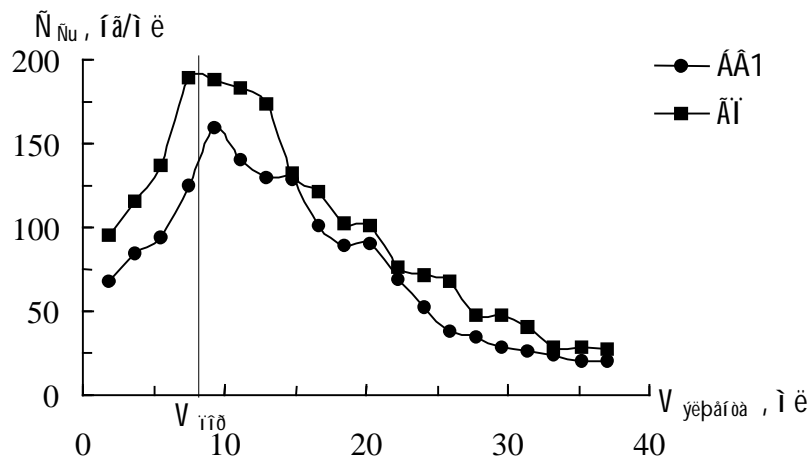


Рис. 2.16. Кривые элюирования меди с почвенной колонки под действием болотной воды (БВ1) и раствора гуминового препарата (ГП).

Предварительное длительное (1-2 сут) замачивание колонок в элюирующем растворе позволило увеличить вымываемое количество ТМ, в среднем, в 1.5-3 раза (рис. 2.17).

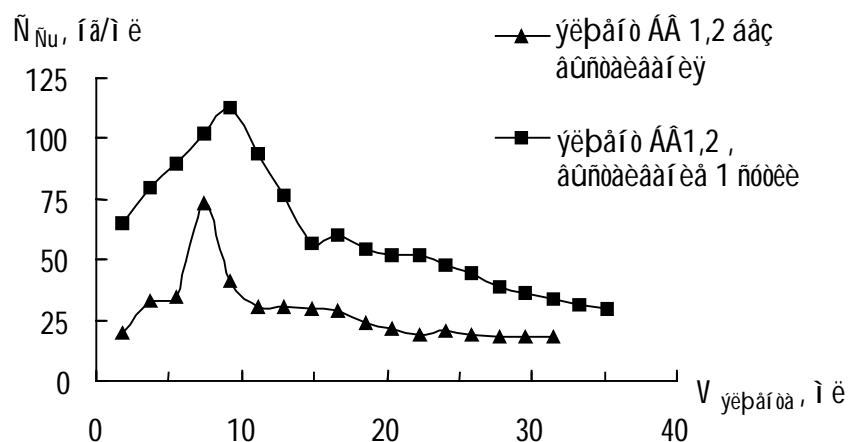


Рис. 2.17. Влияние предварительного замачивания на профиль элюирования Cu с почвенной колонки.

Однако, общее количество вымытого металла, найденное суммированием содержания во всех собранных фракциях, составило 0.03% и меньше от содержания кислоторастворимых форм и около 0.2% от содержания подвижных форм в исходной почве (табл. 2.23).

Таблица 2.23. Сравнение количества металла, вымытого в процессе элюирования с содержанием кислоторастворимых и подвижных форм (в мкг)

Количество	Металл		
	Cu	Cd	Cr
Кислоторастворимых форм в колонке до промывания	5110	102	1190
Подвижных форм в колонке до промывания	770	98	126
Металла, вымытое в процессе элюирования	1.5	0.15	0.2

Следовательно, промывание водорастворимыми гумусовыми кислотами не приводит к мобилизации и вымыванию сколько-нибудь значительного количества тяжелых металлов, содержащихся в почве, и не может вызвать вторичное загрязнение грунтовых вод.

Анализ материала промытых почвенных колонок

Анализ азотнокислых вытяжек отдельных сегментов промытых колонок показал, что содержание кислоторастворимых форм ТМ в почве практически не изменяется; не происходит и перераспределения ТМ по профилю колонок.

Анализ ацетатно-аммонийных вытяжек показал, что после промывания существенно снизилось содержание в материале колонок подвижных форм Cu, Cd и Cr в 10, 2 и 1.5 раза, соответственно (рис. 2.18). На распределение Pb по формам существования промывание не оказывает заметного влияния.

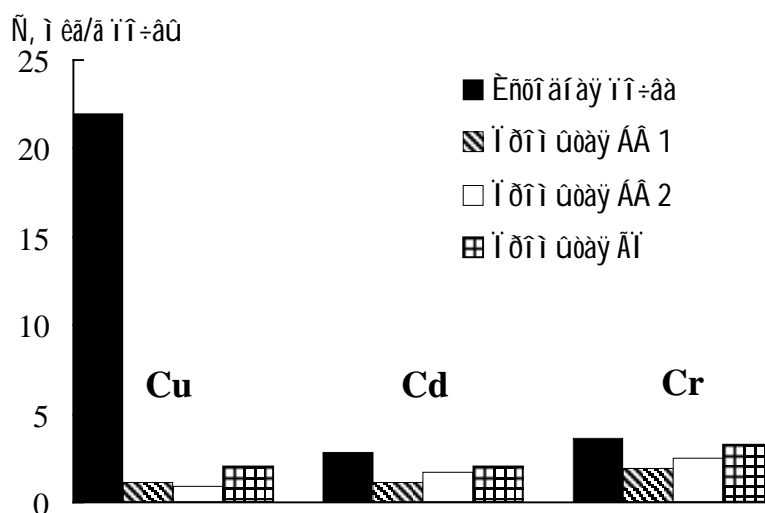


Рис. 2.18. Содержание подвижных форм ТМ в исходном и промытом разными элюентами образце почвы (по результатам анализа ацетатно-аммонийных вытяжек).

Проведенное исследование показало, что в условиях промывания загрязненных ТМ почв растворами гумусовых кислот природного и искусственного происхождения преобладает второй из предполагаемых механизмов влияния на подвижность ТМ в почве – иммобилизация подвижных форм. Наблюдаемое влияние можно объяснить связыванием подвижных форм металлов с более высокомолекулярной фракцией гумусовых кислот и сорбцией комплексов на почве, что подтверждается ослаблением окраски раствора гумусовых кислот после прохождения почвенного слоя.

Полученные результаты могут быть использованы для разработки метода рекультивации загрязненных тяжелыми металлами почв, основанного на уменьшении концентрации свободной, наиболее токсичной для растений, формы металла. Особенно эффективным данный метод может оказаться для почв, основным загрязнителем которых является медь. Внесение растворов гумусовых кислот может осуществляться при поливе.

3. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

3.1. Материалы и реактивы

Препараты гумусовых кислот. Общая схема выделения препаратов гумусовых кислот приведена на рис.3.1.

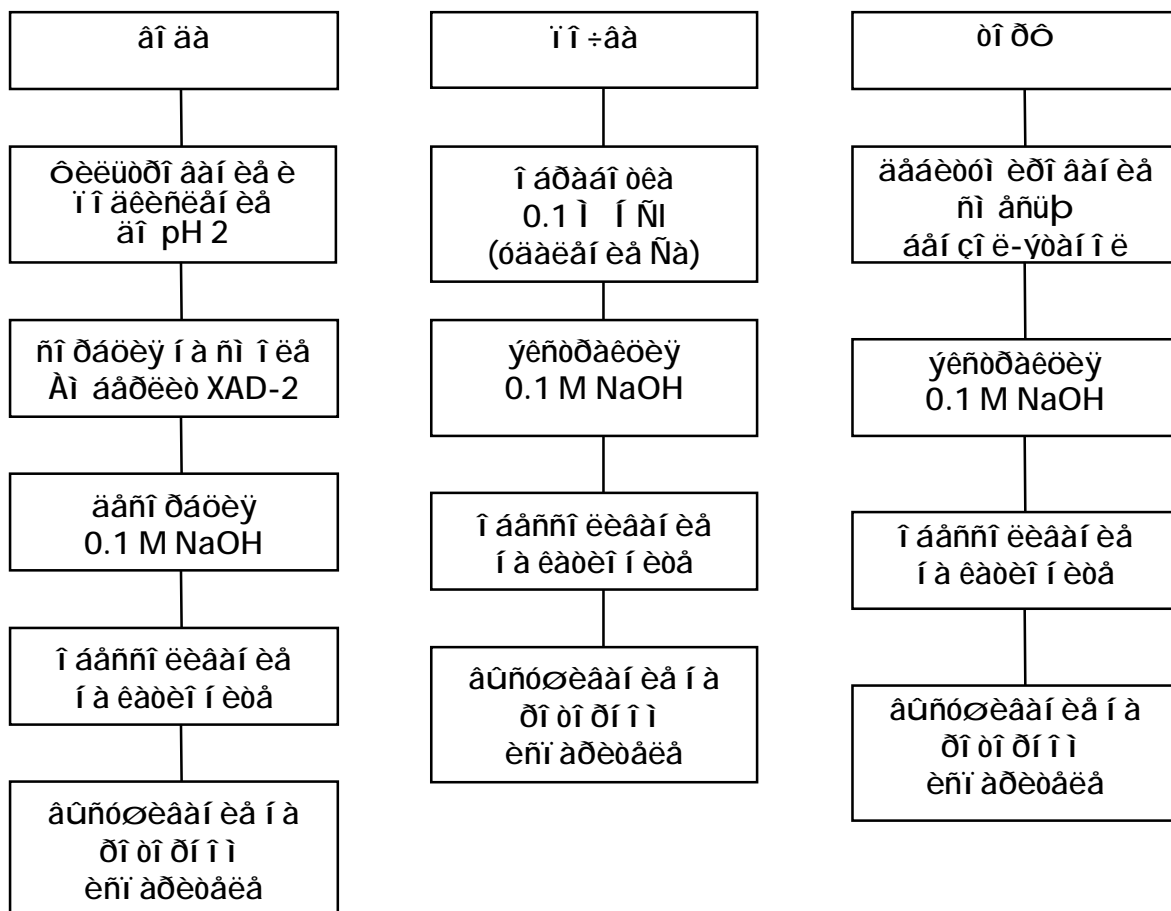


Рис.3.1 Схема выделения препаратов гумусовых кислот

Препараты торфяных ГФК выделены щелочной экстракцией из 8 торфов различного происхождения и геоботанического состава (табл. 3.1) по методике, изложенной в работе [192]. С целью сохранения водорастворимой фракции ГФК была опущена начальная стадия обработки торфа горячей водой. Согласно выбранной методике измельченный торф дважды обрабатывали смесью бензол-этанол (1:1) – соотношение торф/экстрагент – 1:2, и высушивали при температуре 40-60°C в течение ~8 часов до исчезновения запаха бензола. Затем торф заливали раствором 0,1 М NaOH в соотношении 1:3 и оставляли на ночь. Щелочной раствор сливали и

отфильтровывали, экстракцию повторяли несколько раз до тех пор пока экстракт не становился слабо окрашенным. Порции щелочного экстракта объединяли и обессоливали пропусканием через катионит КУ-2-8 в Н-форме (рН полученных таким образом растворов составил 2,95-3,4). Для большинства исследований использовали полученные водные концентраты ГФК, которые хранили в защищенном от света месте при температуре 10-18°C.

Содержание ГФК в растворах определяли гравиметрически, упаривая точную аликвоту. Кроме того концентрацию рассчитывали из данных по содержанию общего органического углерода, определенных с помощью автоматического анализатора.

Таблица 3.1. Характеристики торфов, использованных для выделения ГФК.

Препарат	Образец торфа	Геоботнический состав	Рабочий шифр	Концентрация, %
T1	тип - верховой группа-моховая вид - фускум-торф	сфагновые мхи -80% с преобладанием сфагнума-фускума, пушица-20%	T1	0.6
T2	тип - верховой группа - моховая вид - магелланикум	сфагновые мхи-80%, пушица-15%, шейхтцерия-5%; R*=20%	T4	2.2
T3	торф месторождения "Васильевский мох"	--**	T5	0.5
T4	тип - верховой группа - травяная вид - пушицевый	пушица-100%, R=20%	T6	0.6
T5	тип - верховой фрезерный торф	--**	T7	1.2
T6	тип - низинный группа - травяная вид - осоковый	осока-60%, тростник-10%, вахта-10%, гипновые мхи-20%	T10	0.8
T7	тип - низинный группа - двевесная вид - сосновый	R=50% **	TTL	1.0
T8	тип - верховой группа - двевесно-травяная вид - сосново-пушицевый	R=50-55% **	HTL	1.2

* – степень разложения торфа

** – геоботанический состав не охарактеризован.

Почвенные ГФК (препарат П) выделены из образца Ставропольского огородного чернозема, горизонт А₀. Как и в случае торфяных препаратов, фракционирование на ГК и ФК не проводилось. Измельченную и просеянную через сито (1 мм) почву экстрагировали 0.1 М NaOH при соотношении почва/экстрагент (1:3). Процедуру повторяли до желтой окраски экстракта. Для удаления коллоидных частиц глины порции экстрактов центрифугировали при 7000 об./мин. Обессоливание и выделение сухих препаратов проводили так же как и для торфяных препаратов. (Рабочий шифр препарата - SEL, концентрация исходного раствора 2.4 г/л).

Препараты водных ГФК выделяли сорбцией на смоле Амберлит ХАД-2 по методике [18] из природных вод, источники которых приведены в табл. 3.2.

Таблица 3.2

Препарат	Источник природной воды	Внутренний шифр
V1	р. Москва (район г.Звенигород)	FMX2
V2	болото (Шатурский район Московской области)	BB2
V3	эстуарий Белого моря (район о.Мудьюг)	WM3X2

Природную воду фильтровали через сложенную в несколько слоев марлю и подкисляли до pH 2 концентрированной соляной кислотой квалификации ч.д.а. После чего пропускали через колонку (длина 40 см, внутренний диаметр 20 мм) со смолой до насыщенно-желтого окрашивания смолы (речные и эстуарные воды – 150-200 л, болотные – 20 л). Затем колонку промывали дистиллированной водой до отрицательной реакции на Cl⁻-ион по 0.1 М AgNO₃, десорбировали ГФК с колонки 0.1 М NaOH до обесцвечивания элюата. Щелочной концентрат обессоливали аналогично торфяным образцам и определяли концентрацию. Смолу перед заполнением колонок гидрофилизировали, промывая несколькими порциями метанола, а затем дистиллированной воды.

Для исследований, проводимых с водной среде, все образцы ГФК использовали в виде полученных после обессоливания растворов.

Для элементного анализа и ИК-спектроскопии использовали твердые препараты, полученные упариванием обессоленных растворов ГФК на

ротормом испарителе (при температуре 50-60°C) с последующим высушиванием в эксикаторе над P₂O₅ до постоянного веса (около 7 суток).

Реактивы

Растворители для обработки торфа (бензол и этанол) и кондиционирования смолы XAD-2 (метанол) квалификации ч.д.а. использовали без дополнительной очистки.

Для выделения ГФК использовали раствор 0.1 М NaOH, приготовленный растворением навески сухой щелочи квалификации ч.д.а. в дистиллированной воде.

Приготовление растворов Ba(OH)₂. Насыщенный раствор Ba(OH)₂ (~0.2 М) готовили растворением навески BaO в дистиллированной воде, затем отстаивали в течение 2-3 дней для осаждения карбоната. Для приготовления рабочего раствора исходный сливали с осадка, фильтровали через бумажный фильтр (синяя лента) и разбавляли бескарбонатной дистиллированной водой до требуемой концентрации.

Для определения концентрации рабочих растворов Ba(OH)₂ и титрования избытка Ba(OH)₂ использовали 0.0999 М HCl квалификации "для волюмометрических определений" ("Baker Analysed" Reagent).

Бескарбонатную воду готовили кипячением дистиллированной воды в течение 1 часа. После кипячения воду помещали в сосуд, снабженный хлоркальциевой трубкой с аскаритом, для изолирования от атмосферного CO₂.

Реактивы и растворители для химической модификации.

Уксусный ангидрид квалификации "ч" кипятили с обратным холодильником над прокаленным ацетатом натрия и перегоняли [193].

Пиридин сушили над КОН и перегоняли над BaO [193].

н-Бутанол кипятили и перегоняли над CaO [194].

Гексан чистили встряхиванием с концентрированной серной кислотой, промывали водным раствором NaHCO₃ (10%), затем дистиллированной водой, сушили над безводным прокаленным Na₂SO₄ и перегоняли. О чистоте подготовленного растворителя судили по отсутствию пиков примесей на хроматограмме сконцентрированной в 10 раз пробы очищенного растворителя.

Толуол и бутилацетат квалификации х.ч. очищали перегонкой.

Эфир сутки сушили над щелочью, затем кипятили и перегоняли над свежей порцией щелочи.

ДМФА сначала перегоняли с бензолом и водой для освобождения от NH_3 , HCOH и аминов при атмосферном давлении, а по достижении 120°C процесс прекращали. Оставшийся растворитель трижды перегоняли под уменьшенным давлением в присутствии свежей порции цеолитов СаА, предварительно прокаленных в вакууме при 370°C [195].

Метанол кипятили над магниевой стружкой и перегоняли [196].

3.2. Техника эксперимента

Методика определения влажности твердых препаратов ГФК. Определение проводили по методу описанному в работе [31]. В оловянной лодочке взвешивали около 1,5-2 мг воздушно-сухого образца ГФК с точностью до 1×10^{-3} мг и помещали вместе с лодочкой в прибор для вакуумирования. Вакуумирование проводили при температуре 45°C и давлении 10^{-4} мм. рт. ст. в течение 24 ч. По истечении этого времени лодочку с навеской помещали на тарелку микровесов и регистрировали набор массы образца каждые 15 секунд (первое измерение через 1 мин после прекращения вакуумирования). Строили зависимость массы образца от времени и, экстраполируя ее начальный линейный участок на момент времени $t=0$, находили массу сухого вещества (рис. 3.2). По разности между массой воздушно-сухого образца и абсолютно сухого находили его влажность. Большая величина навески не использовалась в связи с тем, что для больших навесок набор массы за счет поглощения атмосферной влаги оказывается настолько велик, что весы не успевают уравновеситься.

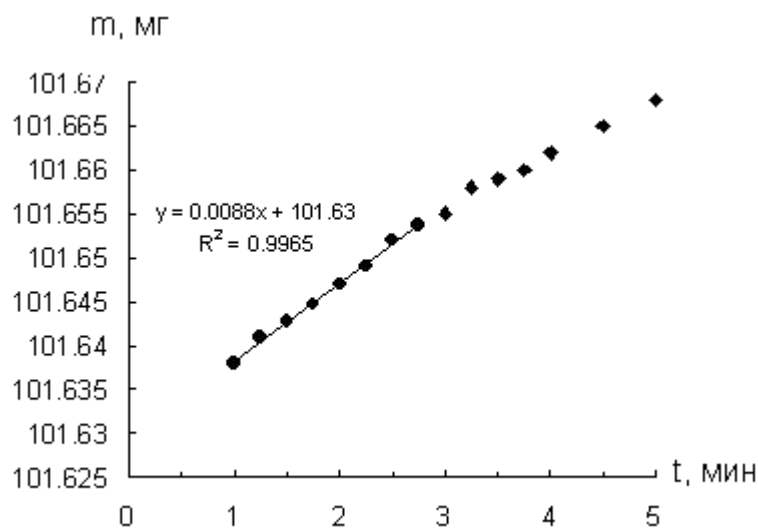


Рис. 3.2. Набор массы высушенной навески ГФК (образец П) при экспонировании атмосферной влаге.

Исходя из полученных величин влажности были рассчитаны поправки к содержанию элементов по следующим формулам:

$$\Delta a = \frac{x \cdot a}{100 - x} \quad (3.1),$$

$$\Delta h = \frac{(9h - 100)x}{9(100 - x)} \quad (3.2),$$

$$\Delta q = \frac{(9q - 800)x}{9(100 - x)} \quad (3.3),$$

где a – процентное содержание элемента (C, N, S);

x – влажность образца, %;

h – процентное содержание водорода;

q – процентное содержание кислорода;

Δ – соответствующие поправки на влажность.

Величины поправок составили для C – от +3 до +6%; для H от –0.4 до –0.7%; для O от –3 до –6%.

Зольность была определена в лаборатории микроанализа кафедры органической химии ручным сжиганием в кварцевых трубках в атмосфере кислорода при температуре 750°C в течение 40 мин, а также с дожиганием с дополнительной порцией кислорода при той же температуре в течение еще 40 мин.

Элементный анализ препаратов гумусовых кислот. C,H,N-анализ был выполнен на элементном анализаторе модели CHN–O–Rapid-Gerdt фирмы Heraeus (ФРГ), для сравнения использовали данные, полученные в лаборатории микроанализа на приборе модели-1106 фирмы Carlo Erba

Strumentazione (Италия). Краткая характеристика условий определения для обоих приборов приведена в следующей таблице:

Анализатор	Carlo Erba	Heraeus
Температура сожжения пробы	1010 ⁰ С	940 ⁰ С
Катализатор окисления	Cr ₂ O ₃	CuO
Температура восстановления окислов азота на Cu-контакте	650 ⁰ С	600 ⁰ С
Разделение продуктов пиролиза	ГХ* на колонке Porapak Q	Адсорбция-десорбция на силикагеле
Детектирование	Катарометр	Катарометр

*ГХ – газовая хроматография

Оба элементных анализатора были откалиброваны по ацетанилиду. Использовали навески 1.5-2.0 мг.

Содержание кислорода определяли двумя способами: по разности и непосредственно. Условия прямого определения кислорода на элементном анализаторе Heraeus: восстановительный пиролиз в среде формиергаза при 1120⁰С; конверсия продуктов пиролиза в СО на некаталитическом углеродном контакте (газовая сажа); селективное детектирование СО с помощью недисперсионного ИК-спектрометра.

ИК-спектры исходных препаратов ГФК и их ацетилированных производных регистрировались на ИК-Фурье спектрометре Perkin Elmer. Пробы готовили прессованием в таблетки с КВг.

Методика определения содержания гидроксильных групп ацетилированием

1. Ацилирование ГФК. Навеску ГФК 5-10 мг помещали в стеклянную ампулу с длинной трубкой, добавляли по 0,5 мл пиридина и уксусного ангидрида и запаивали под вакуумом. Ампулу несколько минут встряхивали в руках и помещали в сушильный шкаф с температурой 80⁰С на 12 часов, затем вскрывали и содержимое упаривали на песчаной бане при температуре 80⁰С в токе аргона. Следы пиридина, уксусного ангидрида и образовавшейся уксусной кислоты удаляли, подсоединив ампулу к вакуумной установке (10⁻² мм рт ст) и нагревая на водяной бане с температурой 60⁰С.

2. Бутанолиз. В ампулу с ацилированным и очищенным от следов реагентов образцом вносили 1 мл бутанола и 50 мкл концентрированной

серной кислоты. Ампулу запаивали, встряхивали и выдерживали в сушильном шкафу при температуре 100°C в течение 12 часов. Затем ампулу вскрывали и содержимое переносили в делительную воронку с 10 мл гексана, туда же добавляли 1 мл раствора толуола в гексане (в качестве внутреннего стандарта) и 10 мл 0,1 М NaOH. Воронку встряхивали, отделяли и отбрасывали водную фазу, а органическую промывали еще одной порцией щелочи. Экстракт сушили, пропуская через маленькую колонку с безводным Na₂SO₄, и анализировали газо-хроматографически. Раствор внутреннего стандарта (толуол в гексане) готовили, беря точную навеску толуола и растворяя в гексане в мерной колбе.

3. Газо-хроматографическое определение проводили при помощи хроматографа фирмы "Varian" серии 3000 с пламенно-ионизационным детектором и делителем потока. Использовали капиллярные кварцевые колонки размером 25 м x 0,30 мм с неподвижной фазой SE-30. Условия хроматографирования: расход газа-носителя (He) - 1,0 см³/мин, вспомогательного газа- 25 см³/мин, водорода- 40 см³/мин, воздуха- 350 см³/мин. Температура испарителя хроматографа - 200°C, детектора - 200°C, нагрев термостата колонок программировали от 35 до 150°C. Исходную температуру 35°C выдерживали в течение 2 мин, затем нагревали со скоростью 10 град/мин до 150°C и выдерживали 20 мин. Соотношение деления газового потока на входе 1:100. Объем вводимой пробы – 1 мкл.

Калибровку проводили по пяти стандартным растворам с различным соотношением толуол/бутилацетат, приготовленным по точным навескам компонентов. Значение калибровочного фактора рассчитывали по формуле :

$$F = \frac{V_{\text{BuOAc}}}{S_{\text{BuOAc}}} \times \frac{S_{\text{int.st.}}}{V_{\text{int.st.}}} \quad (3.4),$$

Где n_{BuAc} и $n_{\text{int.st.}}$ – количества бутилацетата и внутреннего стандарта в калибровочной смеси, моль;

S_{BuOAc} и $S_{\text{int.st.}}$ – соответствующие площади пиков на хроматограмме, усл. ед.

Для выбранных условий определения величина F составила 1,47±0,01.

Модификация различными реагентами. Диазометан для метилирования ГФК получали по методике [195] из N-нитрозо-N-

метилмочевины, предварительно перекристаллизованной из метанола. Метилирование проводили по методике [188], растворяя навеску препарата ГФК около 20 мг в водном метаноле (10:1) или абсолютированном ДМФА. Растворитель отгоняли на роторном испарителе и затем под вакуумом.

$\text{BF}_3 \cdot \text{CH}_3\text{OH}$ получали пропусканием газообразного BF_3 через абсолютированный метанол при охлаждении [197]. Метилирование и выделение продуктов проводили согласно [61].

Силилирование Me_3SiCl . К суспензии ГФК (10 мг) в пиридине (в ампуле для ЯМР) на вакуумной системе добавляли Me_3SiCl , затем ампулу запаивали и нагревали на водяной бане в течение 2 ч при $t \sim 50^\circ\text{C}$.

Силилирование $\text{Et}_2\text{NSiMe}_3$. Исходный реактив $\text{Et}_2\text{NSiMe}_3$ получали из Me_3SiCl и диэтиламина согласно [198]. Обработку ГФК проводили, перепаривая $\text{Et}_2\text{NSiMe}_3$ в раствор ГФК в ДМФА- d_7 на вакуумной системе. Затем герметично закрытый сосуд с реакционной смесью нагревали в течение 3 ч при температуре 75°C , отгоняли избыток реагента и образовавшийся диэтиламин, добавляли ДМФА- d_7 и переносили в ампулу для ЯМР. Ампулу запаивали и регистрировали ПМР спектр.

Ацилирование трифторацетилимидазолом проводили непосредственно в ампуле для ЯМР. Продажный реактив фирмы Aldrich квалификации Reagent Grade перегоняли на вакуумной системе при расфасовке порций в мелкие ампулы. Реагент перепаривали к раствору препарата ГФК в ДМСО- d_6 в ампуле для ЯМР, подпаянной к замкнутой вакуумированной системе. Затем ампулу запаивали и помещали на 2 ч в ультразвуковую баню с $t=40^\circ\text{C}$. После обработки регистрировали ^{19}F ЯМР-спектры.

Методика определения общего содержания кислотных групп баритовым методом. Аликвоту раствора ГФК (10 мл), содержащую 6-12 мг твердого вещества, помещали в полиэтиленовый сосуд емкостью ~ 22 мл, добавляли 10 мл рабочего раствора $\text{Ba}(\text{OH})_2$ с концентрацией около 0.03 М, герметично закрывали, встряхивали и оставляли для полноты осаждения гуматов и фульватов бария на 24 часа при комнатной температуре. Отбирали аликвоту прозрачного раствора над осадком и титровали 0,1 М стандартным раствором HCl по фенолфталеину. Параллельно проводили холостое определение для аликвоты бескарбонатной воды, в которую вносили такое же

количество $\text{Ba}(\text{OH})_2$. Общее содержание кислотных групп рассчитывали согласно [8,99] по формуле:

$$\text{Т.А.} = \frac{(V_0 - V_{\text{ГФК}}) \times N}{m}$$

где: Т.А. – общая кислотность, мэкв/г;

V_0 – объем HCl , израсходованный на титрование холостого раствора, мл;

$V_{\text{ГФК}}$ – объем HCl , израсходованный на титрование образца, мл;

N – концентрация HCl ; ммоль/мл;

m – масса твердого вещества ГФК в аликвоте, г.

При анализе модельных органических кислот использовали те же условия с потенциометрической индикацией. Для этого использовали рН-метр рН-340 со стандартными стеклянным и каломельным электродами.

Методика определения содержания карбоксильных групп Са-ацетатным методом. Аликвоту раствора ГФК (10 мл), помещали в сосуд емкостью ~22 мл, добавляли 10 мл рабочего раствора ацетата кальция (~0.6 М), герметично закрывали, встряхивали и оставляли для полноты осаждения гуматов кальция на 24 часа при комнатной температуре. Отбирали 10 мл прозрачного раствора над осадком и титровали потенциометрически 0,05 М NaOH . Параллельно проводили контрольное определение для аликвоты бескарбонатной воды, в которую было внесено такое же количество $\text{Ca}(\text{OAc})_2$.

Точку перегиба кривой титрования высвобождающейся уксусной кислоты находили с помощью расчетного метода. Выбранный метод основан на аппроксимации участка кривой титрования вблизи точки перегиба кубической параболой [199]:

$$\text{pH} = k_1 + k_2 V + k_3 V^2 + k_4 V^3, \quad (3.6)$$

где V – объем добавленного титранта,

и нахождении точки перегиба параболической функции по формуле:

$$V_{\text{тр}} = -k_3 / (3 \cdot k_4) \quad (3.7).$$

Метод был реализован с помощью имеющейся в лаборатории оригинальной компьютерной программы.

Методика получения рК-спектров. Для прямого потенциометрического титрования использовали растворы препаратов ГФК с концентрацией

0.8-2 г/л, что обеспечивало хорошую воспроизводимость кривых титрования и рассчитанных по ним рК-спектров.

Для получения рК-спектров использовали оригинальную компьютерную программу (Гармаш А.В., Кудрявцев А.В.), которая позволяет рассчитывать как суммарную концентрацию ионогенных групп, так и доли ионогенных групп с константами K_i (q_i). Расчет основан на использовании линейного МНК с ограничениями на неотрицательность решения. В качестве исходных данных использовали значения объема титранта и соответствующие значения рН во всех точках кривой титрования, а также начальный объем титруемого раствора V_0 и концентрацию титранта C_T . Набор значений рК от 1 до 12 с шагом 1 был задан априори. Ранее было показано [127], что использование для ПЭ более высокого разрешения (шаг рК 0.5 и меньше) приводит к неустойчивости решения.

Алгоритм расчета основан на численном решении относительно q_i следующего уравнения:

$$a = \frac{[H^+] - [OH^-]}{c_0 V_0} (V_0 + V_T) + \frac{c_T V_T}{c_0 V_0} = \sum_{i=1}^N q_i \frac{K_i}{K_i + [H^+]} \quad (3.8).$$

Содержание карбоксильных и фенольных гидроксильных групп из рК-спектра определяли, суммируя доли групп с $pK \leq 8$ и $pK \geq 8$, соответственно.

Методика определения констант устойчивости комплексов ГФК с медью с помощью ионного обмена (метод Шуберта)

1. Подготовка катионита. Около 200 г катионита Dowex-50 фирмы Reanal попеременно обрабатывали 0.1 М растворами NaCl и HCl, затем переводили в Na-форму, загрузив катионит в большую препаративную колонку и пропуская 5М NaCl до тех пор, пока рН вытекающей жидкости не станет близким к нейтральному. Обработанный таким способом катионит отмывали от избытка соли пропусканием дистиллированной воды до отрицательной реакции на хлорид-ион по раствору нитрата серебра и сушили на воздухе до постоянного веса.

2. Определение коэффициентов распределения Cu между катионитом и раствором. В стакан помещали аликвоту раствора ГФК, содержащую 0.5-5 мг вещества и раствор $CuCl_2$, так чтобы конечная концентрация составила ~ 25 мкг/л, добавляли 2.5 мл 0.1 М NaCl (для создания постоянной ионной силы

0.01 М) и дистиллированную воду так чтобы общий объем составлял ~ 20 мл. Доводили рН раствора до 5 с помощью NaOH или HCl. Приготовленную смесь количественно переносили в мерную колбу на 25 мл и доводили до метки. Для каждого препарата ГФК готовили 5 растворов с различным содержанием вещества (от 0.01 до 0.1 г/л). Для определения коэффициента распределения Cu(II) в отсутствие ГФК (λ_0) готовили пробу, содержащую все те же компоненты за исключением ГФК.

В сухой стеклянный сосуд помещали навеску подготовленного катионита (200 или 500 мг), аккуратно переносили приготовленный раствор, содержащий ГФК, медь и NaCl, плотно закрывали сосуд и помещали его на 1 час на встряхиватель. После этого раствор фильтровали через бумажный фильтр и анализировали на содержание Cu методом атомно-абсорбционной спектrophотометрии (методика - см. ниже).

3. Расчет констант устойчивости и состава комплексов. По данным эксперимента рассчитывали величины λ_0 и λ и строили зависимости в координатах $\lg(\lambda_0/\lambda-1)$ от $\lg[L]$, где [L] - концентрация ГФК в г/л, моль карбоксильных групп на литр или моль центров связывания на литр. Из полученной зависимости находили параметры, характеризующие комплексообразование. Отрезок, отсекаемый полученной зависимостью на оси ординат, равен $\lg\beta_n$.

Методика проведения экспериментов с почвенными колонками

Образцы дерново-подзолистой почвы с повышенным содержанием тяжелых металлов отбирали на Люблинских полях фильтрации и высушивали на воздухе в течение 7 суток. Затем из почвы тщательно выбирали корни и другие включения, почву перетирали и просеивали через сито (1 мм).

Подготовка почвенных колонок. Подготовленной таким образом почвой заполняли стеклянные колонки с внутренним диаметром 16 мм и длиной 20 см, так, чтобы высота столба почвы составляла около 12 см. Навеска почвы на колонку составляла 35 г. Для вытеснения воздуха из почвенного столба с помощью перистальтического насоса смачивали почву элюирующим раствором с подачей элюента снизу и оставляли на ночь. Поровый объем набитых почвенных колонок рассчитывали по разности между

геометрическим объемом почвенного столбика и объемом твердой фазы почвы, определенной с помощью пикнометра, согласно [201].

Условия элюирования. Через подготовленные и смоченные колонки с помощью перистальтического насоса прокачивали элюент с постоянной скоростью 0.1 мл/мин, собирая последовательные фракции элюата по 2 мл. Во фракциях элюата определяли содержание Cu, Pb, Cd и Cr атомно-абсорбционным методом.

Анализ материала промытых почвенных колонок на содержание ТМ. После промывания материал почвенной колонки аккуратно извлекали, деля на 4 сегмента по высоте колонки и высушивали на воздухе и растирали. Из каждого сегмента каждой колонки брали по четыре навески почвы и делали две вытяжки раствором 0.1 М ацетатного буфера с pH 4.8 (извлекает подвижные формы металлов) и две – 0.1 М HNO₃ (кислоторастворимые формы металлов). Массовое отношение почва:экстрагент в обоих случаях составляло 1:100, время контакта 24 ч. Полученные вытяжки отфильтровывали и также как элюат анализировали на содержание Cu, Pb, Cd и Cr.

Методика атомно-абсорбционного определения тяжелых металлов. Определение содержания Cu при исследовании констант устойчивости комплексов Cu(II) ГФК с а также содержания Cu, Pb, Cd и Cr при изучении иммобилизующей способности ГФК проводили с помощью спектрометра фирмы Varian модель AA 30/40 с электротермическим атомизатором. Рабочая длина волны для Cu– 324.8 нм, Pb – 217.0 нм, Cd – 326.1 нм; Cr – 357.9, ширина щели 0.5 нм. Объем вводимой пробы 20 мкл.

Калибровку проводили по трем стандартным растворам в рабочем диапазоне концентраций для Cu, Pb и Cr – 2-16, Cd – 0.5-2.5 мкг/л. При калибровке для определения меди при изучении комплексообразования в стандартные растворы добавляли такое же количество NaCl, как содержалось в исследуемых растворах.

Для устранения мешающего влияния неселективного поглощения при определении Pb во вводимую пробу добавляли 2 мкл 1% раствора цитрата аммония в качестве модификатора матрицы.

При программировании режима нагрева графитовой кюветы для устранения мешающего влияния ГФК на результаты определения использовали длительное (30 сек) озоление при рекомендуемой для каждого из металлов максимально допустимой температуре [202].

ВЫВОДЫ

1. Выделены и охарактеризованы 12 препаратов нефракционированных гумусовых кислот различного происхождения.
2. Исследован функциональный состав выделенных препаратов гумусовых кислот:
 - а) Показана неприменимость традиционных методов химической модификации для количественной характеристики функционального состава нефракционированных препаратов ГФК.
 - б) Найдены условия количественного определения кислотных групп в нефракционированных препаратах гумусовых кислот по реакциям солеобразования.
 - в) Определено содержание карбоксильных и гидроксильных групп в выделенных препаратах гумусовых кислот. Показано, что в состав данных групп входит 75-85% от общего содержания кислорода.
 - г) Осуществлена оценка количественности определения функциональных групп с помощью сопоставления результатов независимых методов анализа.
3. Охарактеризована реакционная способность выделенных препаратов гумусовых кислот:
 - а) Получены количественные характеристики протолитических свойств гумусовых кислот, в качестве которых впервые предложено использовать средневзвешенные рК кислотных групп, рассчитываемые из данных рК-спектроскопии.
 - б) Определены константы устойчивости комплексов гумусовых кислот с ионами меди(II) с использованием метода ионного обмена.
4. Установлены количественные соотношения между структурой и протолитическими и комплексообразующими свойствами выделенных препаратов гумусовых кислот. Для описания структуры гумусовых кислот впервые предложено использовать структурные дескрипторы состава и распределения элементов между функциональными группами.
5. Впервые показана принципиальная возможность использования водорастворимых препаратов гумусовых кислот природного и промышленного происхождения для иммобилизации подвижных форм тяжелых металлов в загрязненной почве.

СПИСОК ЦИТИРУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Кононова М. М. Органическое вещество почвы. М: Изд-во МГУ, 1963.
2. Орлов Д. С. Химия почв. М., Изд-во МГУ, 1992, с. 259
3. Орлов Д. С. Свойства и функции гуминовых веществ. В сб.: Гуминовые вещества в биосфере. М.: Наука, 1993, с.16-27.
4. Rashid M.A. Geochemistry of marine humic compounds. Springer-Verlag, Oxford, 1985, 243 p.
5. Линник П.Н., Набиванец Б.И. Формы миграции металлов в пресных поверхностных водах. Гидрометеоиздат. Л., 1986, 268 с.
6. Humic substances and their role in the environment. Rep. of Dahlem workshop, Berlin, 1987. John Wiley & Sons Limited. S. Bernhard. Dahlem Konferenzen. 1988. p. 133-148.
7. Bollag J.-M., Mayers K.//Sci. Total Environ., 1992, v. 117/118, p. 357-366.
8. Schnitzer M., Khan S.U. Humic substances in the environment. N.Y., Marcel Decker, 1972, p. 12-17.
9. Орлов Д. С. Гумусовые кислоты почв. М.: Изд-во МГУ, 1974, 287 с.
10. Ziechman W.//Huminstoffen. Problemen, Methoden, Ergebniss. Weicheim: Chemie, 1980, 480 p.
11. Stevenson F.J.//Geochemistry of Soil Humic Substances. In: Humic substances in soil, sediment and water. Aiken G.R., McKnight D.M., Wershaw R.L., MacCarthy P. (Eds.), N.Y., John Wiley & Sons, 1985, p.13-52.
12. Liao W., Christman R., Johnson J.D., Millington D.S.//Environ. Sci. Technol., 1982, v. 16, No.7, p. 403-410.
13. Stevenson F.J. Humus chemistry. Genesis, composition, reactions. N.Y., Wiley Interscience, 1982, p. 221-237.
14. Kleinhempel D.//Albrecht-Thaer-Archiv. 1970. Bd. 14. H. 1. S. 3-14.
15. Rice J.A., MacCarthy P.//Org. Geochem., 1991, v. 17, No.5, p. 635-648.
16. Perdue E.M.//Geochim. Cosmochim. Acta. 1984, v. 48, p. 1435-1442.
17. Орлов Д.С. Гумусовые кислоты почв и общая теория гумификации. Изд-во МГУ, М., 1990, 325 с.

18. Buffle J., Altmann R.S.//*Geochem. Cosmochim. Acta*, 1988, v. 52, p. 1505-1508.
19. Stuermer D. H., Payne J. R.//*Geochem. Cosmochim. Acta*, 1976, v. 40, p. 1109-1114.
20. Wilson M.A., Philip R.P., Gillam A.H., Tate R.R.//*Geochim. Cosmochim. Acta*, 1983, v. 47, p. 497-502.
21. Wilson M. A., Gillam A. H., Collin P. J.//*Chem. Geol.*, 1983, v. 60, No. 3-4, p. 181-201.
22. Stuermer D. H., Peters K.E., Kaplan I.R.//*Geochim. Cosmochim. Acta*. 1978, v. 42, p. 989-997.
23. Harvey G.R., Boran D. A., Tokar J.M.//*Mar. Chem.*, 1983, 12, p.119-132.
24. Piotrowicz S.R., Harvey G.R., Boran D.A. et al.//*Marine Chem.*, 1984, v. 14, p. 333-346.
25. Visser S.A.//*Environ. Sci. Technol.*, 1983, v. 17, No. 7, p. 412-417.
26. Steelink C. Implications of elemental characteristics of humic substances. In: *Humic substances in soil, sediment and water*. Aiken G.R., McKnight D.M., Wershaw R.L., MacCarthy P. (Eds.), John Wiley & Sons. N.Y., 1985, p. 457-475.
27. Huffman E.W.D., Stuber Jr. and H. A. Analytical Methodology for Elemental Analysis of Humic Substances. In: *Humic substances in soil, sediment and water* Aiken G.R., McKnight D.M., Wershaw R.L., MacCarthy P. (Eds.), John Wiley & Sons. N.Y., 1985, p. 433-455.
28. Kuwatsuka S., Tsutsuki K., Kumada K.//*Soil Sci. Plant Nutr.* 1978, v. 24, p. 337-347.
29. Rise G., Sulbu B.//*Sci. Total Environ.*, 1989, v. 81/82, p. 137-142
30. Орлов Д.С.//*Почвоведение*, 1972, N 7, с. 55-63.
31. Abbt-Braun G., Schmiedel U., Frimmel F.H.//*Vom Wasser*, 1990, B. 75, S. 59-73.
32. Методы количественного органического элементного микроанализа. Под ред. Гельман Н.Э., М., Химия, 1987.
33. Schütze M.//*Z. anal. Chem.* 1939, B. 118, H. 3, S. 241-245.
34. Коршун М. О., Гельман Н.Э. Новые методы элементного анализа. М.-Л., Госхимиздат, 1949, с. 19-25.

35. Huber W. *Microchim. Acta*, 1959, No. 5, p. 751-755.
36. Фритц Дж., Шенк Г. Количественный анализ. 1978, М., Мир, с. 227.
37. Schnitzer M., Preston C.M.//*Soil Sci. Soc. Amer. J.*, 1986, v. 50, p. 326-331.
38. Lobartini J. C., Tan K.N. *Soil Sci. Soc. Amer. J.*, 1988, v. 52, p. 125-130.
39. Драгунов, С.С. Методы исследования гумусовых веществ. Труды почв. инст. им. Докучаева, 1951, т. 38, с. 86-98.
40. Perdue E.M.//*Acidic Functional Groups of Humic Substances*. In: *Humic substances in soil, sediment and water*. Aiken G.R., McKnight D.M., Wershaw R.L., MacCarthy P. (Eds.) N.Y., 1985. p. 493-525.
41. Schulten H.-R., Schnitzer M.//*Naturwissenschaften*, 1993, B. 80, S. 29-30.
42. Right J.R., Schnitzer M.//*Trans. 7th Intern. Congr. Soil Sci.*, 1960, v. 2, p. 120-123.
43. Жмакова Н.А., Наумова Г.В., Косоногова Л.В. Влияние окисления на физико-химические свойства гуминовых кислот торфа. В сб.: *Гуминовые вещества в биосфере*. М.: Наука, 1993, с. 45-49.
44. Martin F., Dubach P., Menta N. C. //*Z. Pflanzeherner Dung Bodenk*, 1963, B. 103, S. 27-32.
45. Ephraim J.H., Boren H., Arsenie I., Pettersson C., Allard B.//*Sci. Total Environ.*, 1989, v. 81/82, p. 615-624.
46. Andres, J.M., C. Romero, J.M. Gavilan (1987) *Talanta*, v.34, No. 6, p.583-585.
47. Frimmel F. H., Hopp W., Quentin K.-E.//*Z. Wasser Abwasser-Forsch.* 1985, B. 18, S. 259-262.
48. Wershaw R.L.// In: *Humic substances in soil, sediment and water*. Aiken G.R., McKnight D.M., Wershaw R.L., MacCarthy P. (Eds.) 1985, John Wiley & Sons. N.Y., Chapter 22.
49. Steelink C., Wershaw R.L, Thorn K.A., Wilson M.A.//*Application of liquid-state NMR spectroscopy to humic substances*. In: *Humic Substances II: In Search of Structure*. Hayes M.H.B., MacCarthy P., Malcolm R.L., Swift R.S. (Eds.) 1989, p. 281-310.
50. Herzog, H.; Burba, P.; Buddrus, J.//*Fresenius J. Anal.Chem.*, 1996, v. 354, No. 3, p. 375-377.
51. Химия углеводов. Под ред. Кочеткова Н.К. М., Химия, 1967, с.437, 494.

52. Pigman W.W. The Carbohydrates: Chemistry, Biochemistry, Physiology. N.Y. Acad. Press, 1957, p. 369-370.
53. Metcalfe L.D., Schmitz A.A., Pelka J.R.//Anal. Chem., 1966, v. 38, No. 3, p. 514-515.
54. Gellerstedt G., Agnemo R.//Acta Chem. Scand., 1980, B34, p. 275-277.
55. Schnitzer M.//Soil Sci., 1974, v.117, No. 2, p. 94-101.
56. Reuter J.H., Ghosal M., Chian E.S.K., Giabai M. Oxidative degradation studies on aquatic humic substances. In: Aquatic and Terrestrial Humic Materials. Christman R.F. and Gjessing E.T. (Eds.) Ann Arbor Science, 1983, MI, p. 107-125.
57. Leenheer J.A., Noyes T.I. Derivatization of humic substances for structural studies. In: Humic Substances II: In Search of Structure. Hayes M.H., MacCarthy P., Malcolm R.L., and Swift R.S. (Eds.) John Wiley & Sons. N.Y., 1989, p. 257-280.
58. Wershaw R.L., Picney D. J.//Science, 1978, v. 199, p. 906-907.
59. Arsenie I., Boren H., Allard B.//Sci. Total Environ., 1992, v. 116, p. 213-220.
60. Mikita M.A., Steelink C., Wershaw R.L.//Anal. Chem., 1981, v. 53, No. 11. 1715-1717.
61. Barton D.H.R., Schnitzer M.//Nature, 1963, v. 198, No. 4876, p. 217-218.
62. Schnitzer M., Desjardins J.G.//Soil Sci. Soc. Amer. Proc., 1962, v. 26, p. 362-3368.
63. Noyes T.I., Leenheer J.A. Proton Nuclear Magnetic Resonance Studies of Fulvic Acid from the Suwannee River. In: Humic substances in the Suwannee river, Georgia: Interactions, properties, and proposed structures. Averett R.C., Leenheer J.A., McKnight D.M., and Thorn K.A. (Eds.) U.S. Geological survey water-supply paper 2373, 1994, p. 129-139.
64. Briggs G.C., Lawson G. J.//Fuel, 1970, v. 49, p. 39-48.
65. Органикум. М., Мир, 1979, т. 2, с. 248-250.
66. Кухаренко Т.А.// Хим. Тверд. Топл., 1937, т. 8, N 9, с. 803-813.
67. Hänninen K.I.//Sci. Total Environ. 1987, v. 62, p. 193-200.
68. Stevenson F.J., Goh K. M.//Soil Sci. 1972, v. 113, No. 5, p. 334-345.
69. Шрайнер Р., Фьюзон Р., Кертин Д., Моррил Т. Идентификация органических соединений, М., Мир, 1983, с.350-351.

70. Сиггиа С., Ханна Дж. Г. Количественный органический анализ по функциональным группам. М. Химия, 1983, с. 132-135.
71. Wright, J.R., Schnitzer M. //Nature, 1959, v. 184, No. 4697, p. 1462-1463.
72. Handbook of Derivatives for Chromatography, Blau K., King G.S. (Eds.), London, Heyden and Son, 1978, p. 104-151.
73. Органикум. М., Мир, 1979, т. 2, с. 81.
74. Snape C.E., Smith C.A., Bartle K.D., Matthews R.S.//Anal. Chem., 1982, v. 54, No. 1, p. 20-25.
75. Stevenson F. J., Butler I. H. A., in: Organic Geochemistry, New York: 1969, p. 534-535.
76. Schnitzer M., Desjardins J.G.//Soil Sci. Soc. Amer. Proc., 1970, v. 34, p.77-79.
77. Ruffaldi R., Schnitzer M.//Soil Sci. Soc. Amer. Proc., 1972, v. 36, No. 1, p. 301-305.
78. Bowles E.C., Antweiler R.C., MacCarthy P. Acid-base titration and hydrolysis of fulvic acid from the Suwannee river. In: Humic substances in the Suwannee river, Georgia: Interactions, properties, and proposed structures. Averett R.C., Leenheer J.A., McKnight D.M., and Thorn K.A. (Eds.) U.S. Geological survey water-supply paper 2373, 1994, p.115-127.
79. Скуг Д., Уэст Д. Основы аналитической химии. М., Мир, 1979, т.1, с. 425-432.
80. Buffle J., Deloey M. D., Haerdi L.//Anal. Chim. Acta. 1978, v. 101, p. 339-350.
81. Davis J.A.//Geochim. Cosmochim. Acta. 1982, v. 46, p. 2381-2393.
82. Herbert B.E., Bortsch M., Novak, J.M.//Environ. Sci. Technol., 1993., v. 27, p. 398-403.
83. Piccolo A., Camici L. //Int. J. Environ. Anal. Chem., 1990, v. 41, p. 65-69.
84. Pattersson C., Arsenie I., Ephraim J.P., Boren H., Allard B.//Sci. Total Environ., 1989, v. 81/82, p. 287-296.
85. Perdue E.M., Reuter J.H., Parrish R. S.//Geochim. Cosmochim. Acta, 1984, v. 48, p.1257-1263.
86. Скуг Д., Уэст Д. Основы аналитической химии. М., Мир, 1979, т.1, с. 284.

87. Perdue E.M.//*Geochim. Cosmochim. Acta.* 1978, v. 42. p. 1351-1358.
88. Perdue E.M., Reuter J.H., Ghosal M. //*Geochim. Cosmochim. Acta*, 1980, v. 44, p.1841-1851.
89. Van Den Hoop M. A. G. T., Van Leeuwen H.P., Cleven R. F. M. J.//*Anal. Chim. Acta.* 1990, v. 232, p.141-148.
90. De Nobili M., Contin M. Determination of carboxyl groups content in fulvic acids by СТА⁺ (cetyltrimethylammonium) method. In: *Humic Substances in the Global Environment and Implications on Human Health.* Senesi N., Miano T.M. (Eds.) 1994. Elsevier, p. 263-268.
91. Стадников Г.Л., Сысков К.И., Ушакова А.А.//*Хим. Тверд. Топл.*, 1934, т. 5, N 7, с. 581-589.
92. Сысков К.И.//*Хим. Тверд. Топл.*, 1936, т. 7, N 6, с. 566-574.
93. Сысков К.И., Кухаренко Т.А.//*Заводск. лаб.*, 1947, т. 13, N 1, с. 25-28.
94. Кухаренко Т.А.//*Хим. Тверд. Топл.*, 1937, т. 8, N 12, с. 1064-1072.
95. Кухаренко Т.А.//*ЖАХ*, 1948, т. 3., вып. 3, с. 181-185.
96. Кухаренко Т.А., Бороздина Л.А.//*Коллоидн. журн.*, 1949, т. 11, N 4, с. 244-250.
97. Brooks J.D., Sternhell S.//*Austr. J. Appl. Sci.*, 1957, v. 8, p. 206-221.
98. Schnitzer M., Gupta U.C.//*Soil Sci. Soc. Amer. Proc.*, 1964, v. 28, p. 374-377.
99. Schnitzer M. ,Gupta U.C.//*Soil Sci. Soc. Amer. Proc.*, 1965, v. 29, p. 274-278.
100. Gillam A.H., Riley J.P.//*Anal. Chim. Acta*, 1982, v. 141, p. 287-299.
101. Bonn B.A., Fish W. //*Environ. Sci. Technol.*, 1991, v. 25. p. 232-240.
102. Brunelot J., Adrian P., Rouiller J., Guillet B., Andreux F.//*Chemosphere*, 1989, v. 19, Nos. 8/9, p.1413-1419.
103. Gamble D. S., Underdown A. W.//*Anal.Chem.*, 1980, v. 52, p.1901-1908.
104. Gamble D. S.//*Can. J. Chem.*, 1972, v. 50, p. 2680-2686.
105. Тенфорд Ч. *Физическая химия полимеров.* М., Химия, 1965, с. 25.
106. Моравец Г. *Макромолекулы в растворе.* М., Мир, 1967, с. 36.
107. Flaig W., Beutelspacher H., Rietz E. Chemical composition and physical properties of humic substances. In: *Soil components.* Gieseking J.E. (Ed.), V.1, Springer-Verlag, Berlin, 1975, p. 145-164.

108. Paxeus N., Wedborg M.//*Analyt. Chim. Acta*, 1985, v.169, p. 87-98.
109. Katchalsky A., Gillis G.//*Rec. Trav. Chim.*, 1950, v. 69, p. 192-208.
110. Gregor H.P., Luttinger L.B.,Loebl E.M.//*J. Phys. Chem.*, 1955, v. 59, p.34-39.
111. Gregor H.P., Luttinger L.B.,Loebl E.M.//*J. Phys. Chem.*, 1955, v. 59, p. 366-379.
112. Katchalsky A., Shavit N., Eisenberg H.//*J. Polymer Sci.*, 1954, v. 13, p. 69-78.
113. Dubin P., Straus U.//*J. Phys. Chem.*, 1970, v. 74, p.2842-2851.
114. Fukushima M., Tanaka S., Hasebe K., Taga M., Nakamura H. //*Analyt. Chim. Acta*, 1995, v. 302, p. 365-373.
115. de Wit J.C.M. Proton and Metal Ion Binding to Humic Substances. Ph.D. thesis, Wageningen Agricultural University. The Netherlands. 255 p.
116. Бугаевский А.А., Холин Ю.В.//*Вестник Харьковского Университета, Харьков, ХГУ*, 1989, N 340, с.85.
117. Варшал Г.М., Бугаевский А.А., Холин Ю.В. и др.//*Химия и технология воды*, 1990, т. 12, N 11, с. 979-986.
118. Simms H.S.//*J. Amer. Chem. Soc.*, 1926, v. 48, p. 1231-1261.
119. Leuenberger B., Schindler P.//*Analyt.Chem.*, 1986, v. 58, p.1471-1474.
120. Eberle S.H., Feuerstein W.//*Naturwissenschaften*, 1979, v. 66, p. 572-573.
121. Paxeus N. Studies on aquatic humic substances, Ph.D. thesis, University of Gütteborg, Sweden, 1985, p. 51-57.
122. Sips R.//*J. Chem. Phys.*, 1948, v.16, p. 490-498.
123. Thakur A.K., Munson P.J., Hunston D.L., Rodbard D.//*Anal. Biochem.*, 1980, v.103, p. 240-254.
124. Turner D.R., Varney M.S., Whitfield M., Mantoura R.F.C., Riley J.P.//*Geochim. Cosmochim. Acta*, 1986, v. 50, No. 2, p. 289-297.
125. Triay I.R., Rundberg R.S.//*J. Phys. Chem.*,1987, v. 91, p. 5269-5275.
126. Гармаш А.В., Воробьева О.Н.//*ЖАХ*, 1997, (в печати).
127. Alegret S., Escalas M.-T., Marinsky J.A.//*Talanta*, 1984, v. 31, No. 9, p. 683-687.
128. Marinsky J.A.//*J. Phys. Chem.*, 1985, v. 89, p. 5294-5302.
129. Marinsky J.A., Ephraim J.//*Environ. Sci. Technol.*, 1986, v. 20, p. 349-354.

130. Ephraim J., Alegret S., Mathuthu A., Bicking M., Malcolm R.L., Marinsky J.A.// *Environ. Sci. Technol.*, 1986, v. 20, p. 354-366.
131. Manning P. G., Ramamoorthy S.//*J. Inorg. Nucl. Chem.*, 1973, v. 35, No. 5, p.1577-1585.
132. Saar R.A., Weber J. H.//*Environ. Sci. Technol.*, 1982, v. 16, No. 9, p. 510-516.
133. Tramont V, Zienius R.H.//*J. Environ. Anal. Chem.* 1986, v.24, p.203.
134. Dzombak D.A., Fish W., Morrel F.M.M.//*Environ. Sci. Technol.*, 1986, v. 20, No.7, p. 669-675.
135. Dzombak D.A., Fish W., Morrel F.M.M.//*Environ. Sci. Technol.*,1986, v. 20, No.7, p. 676-683.
136. Wilson S.A., Weber J.H.//*Chem. Geol.*, 1977, v. 17, p. 285-293.
137. Buffle J., Greter F.-L., Haerdi W.//*Anal. Chem.*, 1977, v. 49, p. 216-222.
138. Schnitzer M., Skinner S.I.M.//*Soil Sci.*, 1966, v. 102, No. 6, p. 361-365.
139. Schubert J., Richter J.W.//*J. Amer. Chem. Soc.*, 1948, v. 70, p. 4259-4268.
140. Schubert J., Russel E.R., Myers L.S.//*J. Biol. Chem.*, 1950, v. 185, p.387-398.
141. Schubert J.//*J. Phys. Chem.*, 1952, v. 56, p. 113-118.
142. MacCarthy P., Mark Jr., H.B. In: *The biological implication of metals in the environment. Proc. 15th Annual Life Sciences Symp., Hanford, Washington, Sept. Oct. 1975, (publ. 1976), p. 197-212.*
143. MacCarthy P.//*J. Environ. Sci. Health*, 1977, A12(1&2), p.43-59.
144. Adhikari M., Hazra C.G.//*J. Indian Chem. Soc.*, 1972, v. 49, p. 947-951.
145. Cheng M.H., Patterson J.W., Minear R.A.//*J. Water Pollut. Control. Fed.*, 1975, v. 47, p. 362-376.
146. Nash K.L., Chopping G.R.//*J. Inorg. Nucl. Chem.*, 1980, v. 42, p. 1045-1050.
147. Ephraim J.//*Sci. Total Environ.*, 1991, v. 108, p. 261-273.
148. Scatchard G., Coleman J.S., Shen A.L.//*J. Amer. Chem. Soc.*, 1957, v. 79, p. 12-23.
149. Hirata Sh.//*Talanta*, 1981, v. 28, p. 809-815.
150. Giesy J.P., Alberts J.J., Ewans D.W.//*Environ. Toxicol. Chem.*, 1986, v. 5, p. 139-154.

151. Weber J. Binding and transport of metals by humic materials. In: Humic substances and their role in the environment. Frimmel F.H., Christman R.F. (Eds.) John Wiley & Sons. N.Y., 1988, p. 165-178.
152. Mantoura R.F.C., Riley J.R.//Anal. Chim. Acta, 1975, v. 78, p. 193-200.
153. Sposito G.//Environ. Sci. Technol., 1981, v. 15, No.4, p. 396-403.
154. Колосов И.В.//Почвоведение, 1982, N 4, с. 42-47.
155. Giesy J.P., Newell A., Laversee G.J.//Sci. Total Environ., 1983, v. 28, p. 23-36.
156. Sahu S., Banerjee D.K.//Int. J. Environ. Anal. Chem., 1990, v. 42, p. 35-44.
157. Taga M., Tanaka Sh., Fukushima M.//Anal. Chim. Acta, 1991, v. 244, p. 281-287.
158. Fitch A., Stevenson F.J.//Soil Sci. Soc. Amer. J., 1984, v. 48, p. 1044-1050.
159. Klotz I.M.//Science, 1982, v. 217, p. 1247-1249.
160. Lamy I., Cromer M., Scharff J.P.//Anal. Chim. Acta, 1988, v. 212, p. 105-122.
161. Gamble D.S., Langford C.H.//Environ. Sci. Technol., 1988, v. 22, No. 11, p. 1325-1336.
162. Filella M., Buffle J., Van Leeuwen H.P.//Anal. Chim. Acta, 1990, v. 232, p. 209-223.
163. Buffle J., Altmann R.S., Filella M.//Anal. Chim. Acta, 1990, v. 232, p. 225-237.
164. Susetyo W., Carreira L.A., Azarraga L.V., Grimm D.M.//Fresenius J. Anal. Chem., 1991, v.339, No. 9, p. 624-635.
165. Manunza B., Deiana S., Maddau V., Gessa C., Seeber R.//Soil Sci. Soc. Amer. J., 1995, v. 59, No. 6, p. 1570-1574.
166. Van Den Berg C.M.G., Nimmo M., Daly P., Turner D.R.//Anal. Chim. Acta, 1990, v. 232, p. 149-159.
167. Ricart M., Villaescusa I., de la Torre F.//React. Funct. Polym., 1996, v. 28, p. 159-165.
168. Ryan D.K., Weber J.H.//Anal. Chem., 1982, v. 54, No. 6, p. 986-990.
169. Van Den Berg C.M.G., Kramer J.R.//Anal. Chim. Acta, 1979, v. 106, p. 113-120.

170. Жоробекова Ш.Ж. Макролигандные свойства гуминовых кислот. Фрунзе, Илим, 1987, с. 49-75.
171. Pauli F. W.//Soil Sci., 1975, v. 119, No. 1, p. 98-103.
172. Stevenson F.J.//Soil Sci. Soc. Amer. J., 1976, v. 40, No. 5, p. 665-672.
173. Schnitzer M., Skinner S.I.M.//Soil Sci., 1967, v. 103, No. 5, p. 247-258.
174. Варшал Г.М. и др. Биогеохимическая роль гумусовых кислот в процессах миграции элементов. В сб.: Гуминовые вещества в биосфере. М.: Наука, 1993, с. 23-30.
175. Шестаков Е.И., Карпухин А.И., Кауричев И.С., Рачинский В.В.//Почвовед., 1989, N 12, с. 35-47.
176. Blume H. P., Brummer G.//Ecotoxic. Environ. Saf., 1991, v. 22, p. 265-285.
177. Евдокимова Г.А., Морозова Н.М. Миграция тяжелых металлов из почвы в сельскохозяйственные культуры. В сб.: Тяжелые металлы в окружающей среде и охрана природы. Мат. II Всесоюзн. конф., 28-30 дек. 1987 г., ч. II, М., 1988, с. 204-209.
178. Кабата-Пендиас А., Пендиас Х. Микроэлементы в почвах и растениях. М., 1989, 439 с.
179. Белькевич П.И., Чистова Л.Р. Торф и проблема защиты окружающей среды. Минск, 1979, с. 38-56.
180. Смычник Т.Б. Получение и свойства водорастворимых гуминовых препаратов из торфа. Дисс. докт. техн. наук, Минск, 1992.
181. Gardea-Torresdey, J. L.; Tang, L.; Salvador, J. M.//J. Hazard. Mater., 1996, v. 48, No. 1-3, p. 191-206.
182. Гордон А., Форд Р., Спутник химика, М., Мир, 1976, с. 208.
183. Тищенко, В.В., Рыдалевская М.Д.//ДАН СССР, 1936, т. 4, N 3, с. 234.
184. Комиссаров И.Д., Логинов Л.Ф.//Труды Тюменского с.-х. ин-та. 1970, т. 14, с. 141-140.
185. Hänninen K.I. Phenolic acids in humus chemistry. Annal. Acad. Sci. Fennicae, Ser. A, II. Chem., 1987, v. 213, p. 15-33.
186. Martell A.E., Smith R.M. Critical stability constants, V. 3: Other organic ligands; Plenum Press, N.Y., 1977.

187. Гармаш А.В. Кривые титрования для любознательных. М., МГУ, 1992, с. 30.
188. Гармаш А.В., Устимова И.В., Кудрявцев А.В., Воробьева О.Н., Поленова Т.В.//ЖАХ, 1997, (в печати).
189. Leenheer J.A., Wershaw R.L., Reddy M.M.//Environ. Sci. Technol., 1995, v. 29, No. 2, p. 393-405.
190. Singh K.P.//Chem. Eng. J. (Lausanne), 1996, v. 63, No. 3, p. 189-194.
191. McCarthy J.F., Jimenez B.D., Barbee Th.//Aquat. Toxicol., 1985, v. 7, p. 15-24.
192. Lowe L.E.//Sci. Total Environ., 1992, v. 113, p. 133-145.
193. Органикум. М., Мир, 1979, т. 2, с. 372, 367.
194. Riddick J.A., Bunger W.B. Organic solvents. N.Y., 1970, p. 654.
195. Физер Л., Физер М. Реагенты для органического синтеза, М., Мир, 1975, т. 1, с. 244.
196. Гордон А., Форд Р., Спутник химика. М., Мир, 1976, с. 440.
197. Metcalfe L.D., Smitz A.A., Pelka J.R.//Anal. Chem., 1966, v. 38, No. 3, p. 514-515.
198. Андрианов К.А. Методы элементарорганической химии. Кремний. М., Наука, 1968, с. 238.
199. Торренс К., Мидгли Д. Потенциометрический анализ воды. М., Мир, 1980, с. 139-145.
200. Kuwatsuka Sh., Watanabe A., Itoh K., Arai Sh.//Soil Sci. Plant Nutr., 1992, v. 38, No. 1, p. 23.
201. Вадюнина А.Ф., Корчагина З.А. Методы исследования физических свойств почв. М., МГУ, 1983, с. 89-95.
202. Varian Spectrophotometer AA 30/40, Operation manual.

ПРИЛОЖЕНИЯ

Приложение 1.

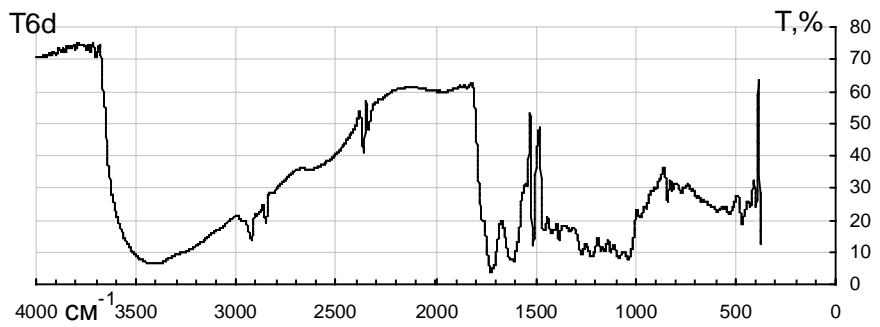
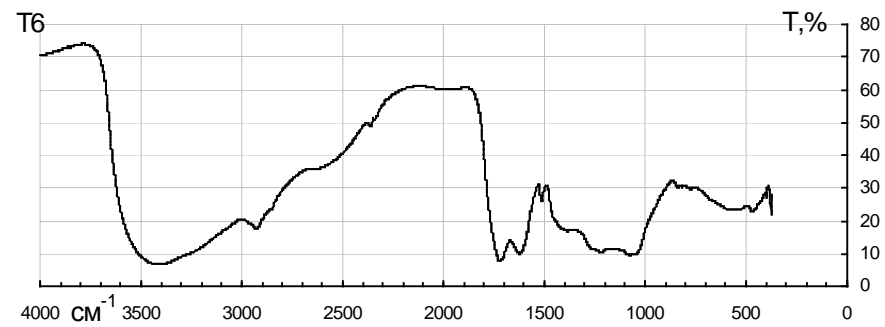
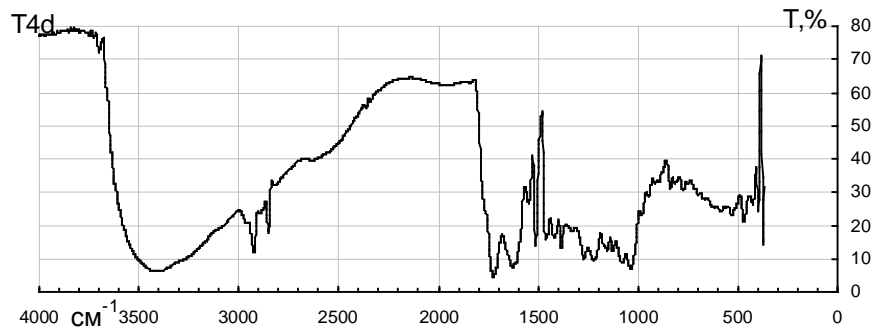
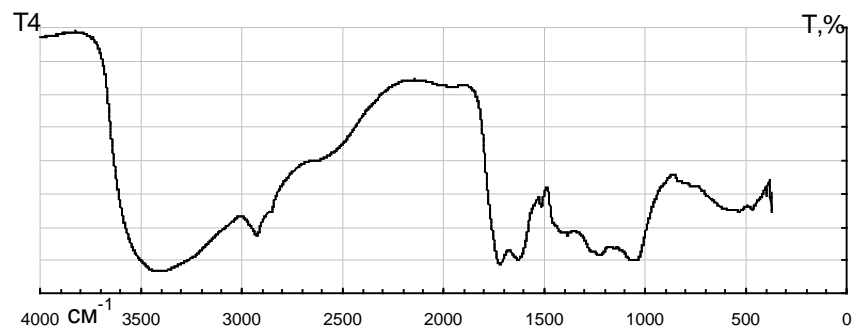
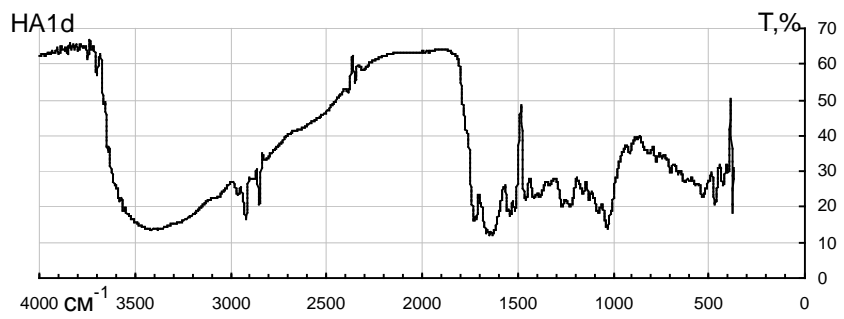
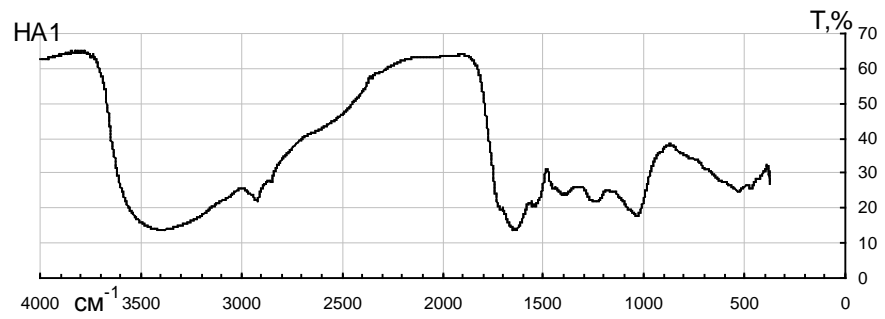
Экспериментальные методы исследования комплексообразования в системе
гумусовые кислоты – тяжелые металлы

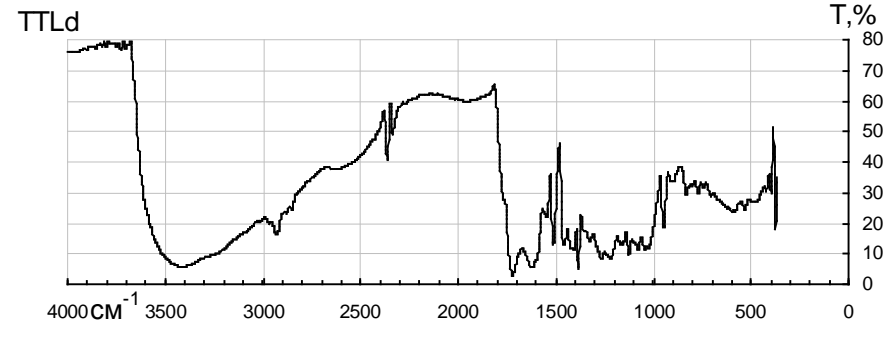
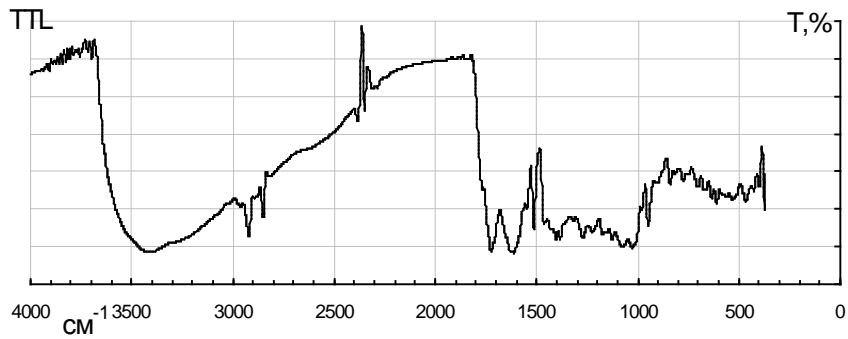
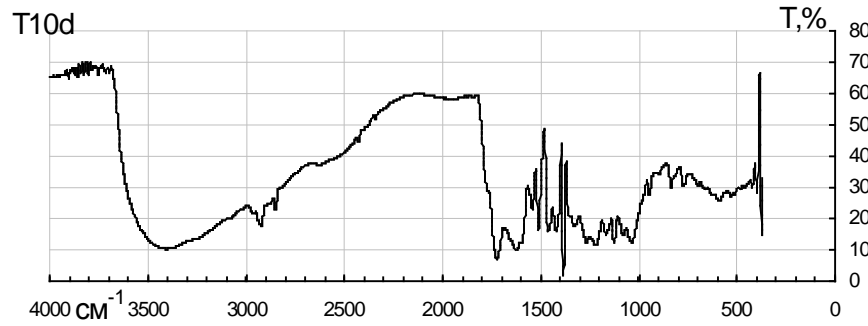
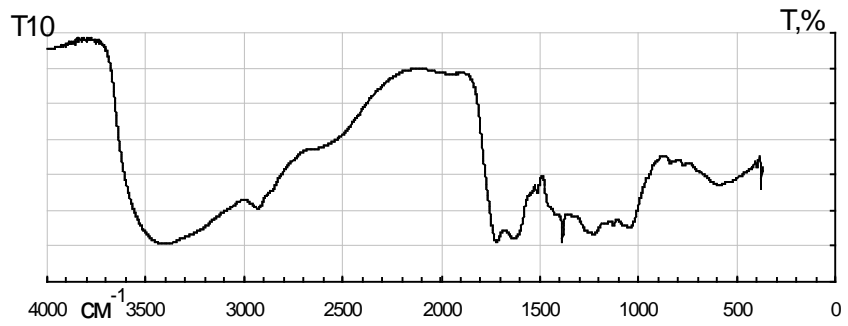
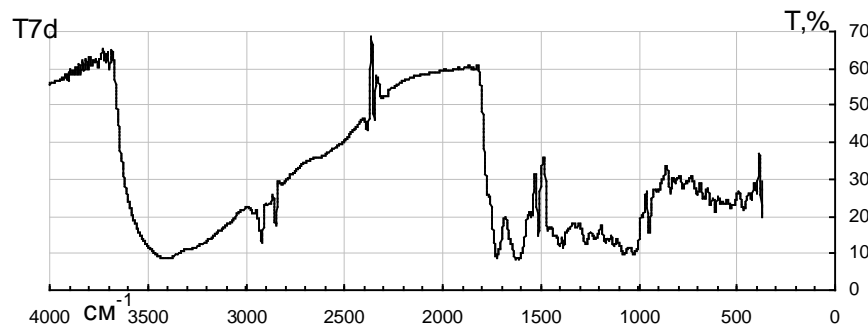
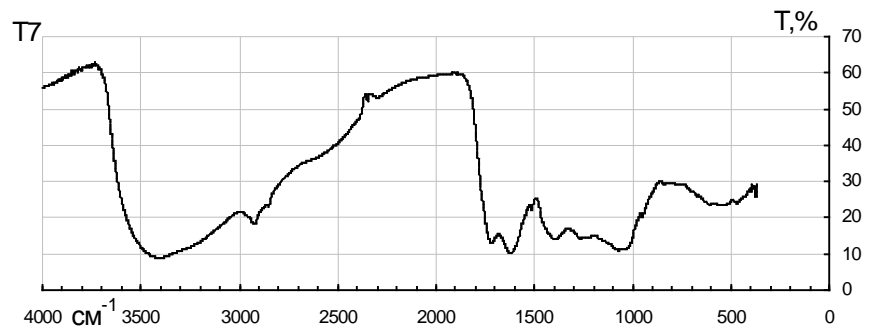
Метод	Металлы	Что измеряется*	Ионная сила раствора	Достоинства	Недостатки
<i>С предварительным разделением</i>					
Жидкостная хроматография** + ААС***	любые	[M ⁿ⁺] и [М-ГФК] в различных фракциях	нет ограничений	низкий предел обнаружения; не требует пробоподготовки	адсорбция на материале колонок и сдвиг равновесия
Ионный обмен + ААС	любые	[М-ГФК]	≥0.01 М	низкий предел обнаружения, экспрессность	адсорбция на катионите
Равновесный диализ+ ААС	любые	[M ⁿ⁺]	≥0.001 М	низкий предел обнаружения	адсорбция на мембране и сдвиг равновесия
Ультрафильтрация+ААС	любые	[M ⁿ⁺]	нет ограничений	низкий предел обнаружения	адсорбция на мембране и сдвиг равновесия
Ультрацентрифугирование + ААС	любые	[M ⁿ⁺]	нет ограничений	низкий предел обнаружения, экспрессность	неполное отделение связанной формы
<i>Без разделения</i>					
ЭПР	парамагнитные	c _м , [M ⁿ⁺], [М-ГФК]	нет ограничений	дает информацию о типе комплексов	высокие пределы обнаружения металлов
Потенциометрия с ионселективными электродами	Ca, Cu, Cd, Pb	[M ⁿ⁺]	≥0.01 М	экспрессность	высокие пределы обнаружения, адсорбция на электроде
Анодная пульсвольтамперометрия	Cu, Cd, Pb, Zn	[M ⁿ⁺]	≥0.01 М	высокая чувствительность	адсорбция на электроде, сдвиг равновесия
Конкурентное комплексообразование	любые	[M ⁿ⁺]	необходим буфер	широкая доступность	трудность подбора конкурирующего лиганда
Тушение флуоресценции	парамагнитные	[ГФК]	нет ограничений	высокая чувствительность	ограничен несколькими металлами

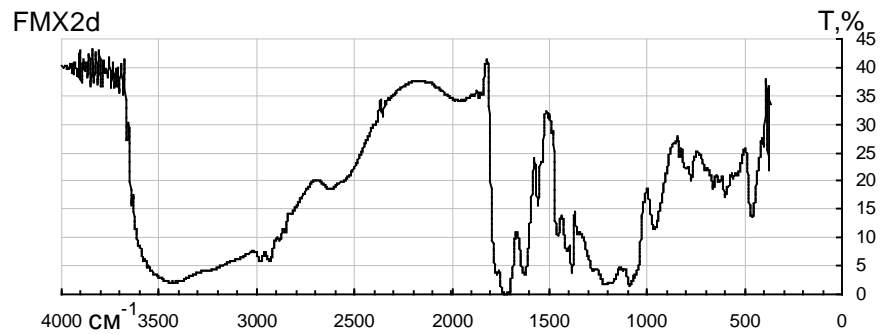
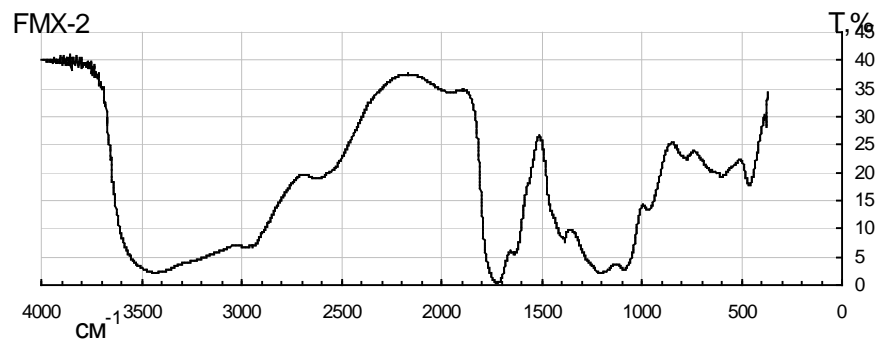
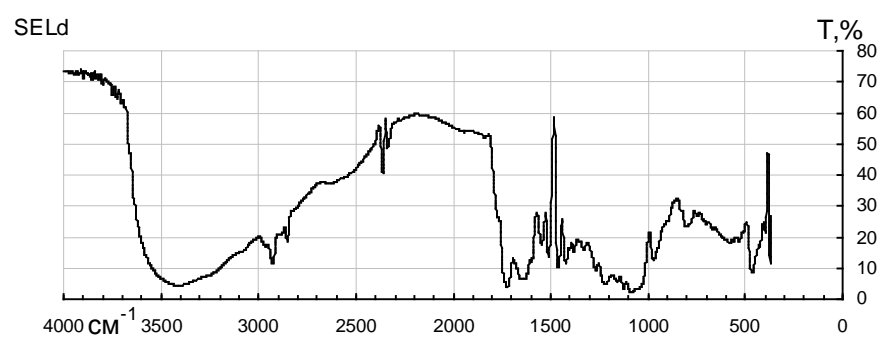
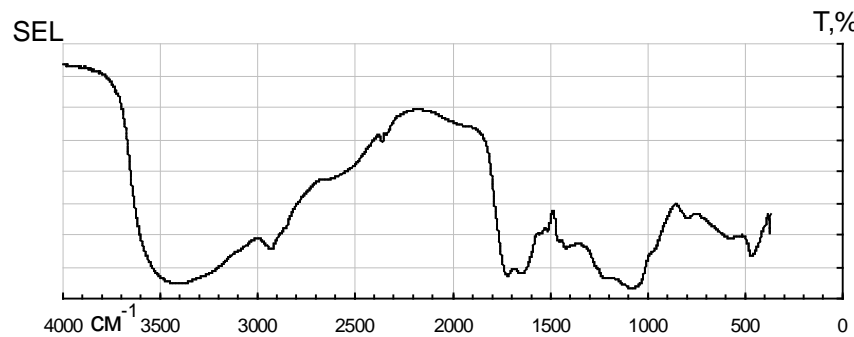
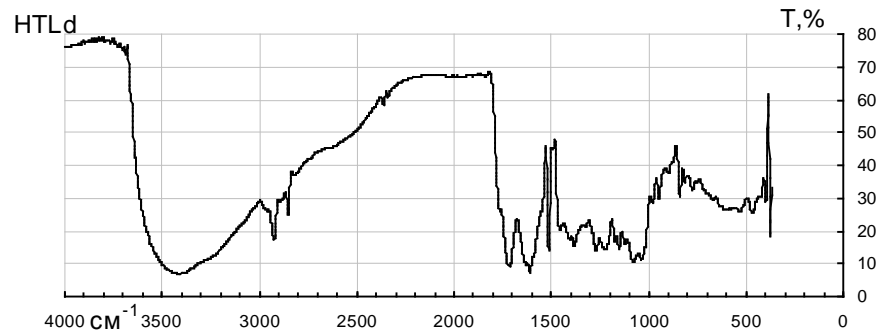
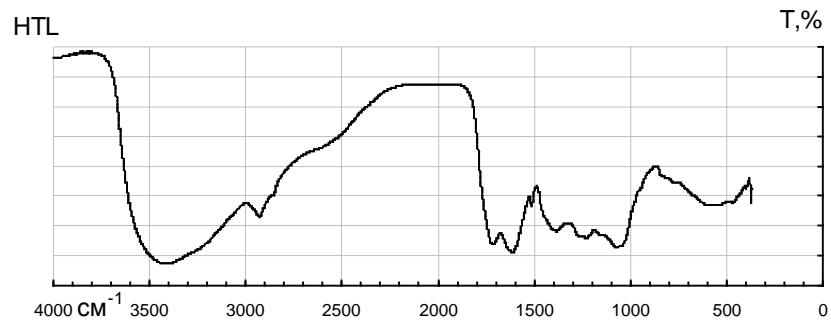
*[Mⁿ⁺], [М-ГФК] и [ГФК] – равновесные концентрации свободного металла, комплекса и свободного лиганда, соответственно

** Включая обращенно-фазовую и гель-фильтрацию

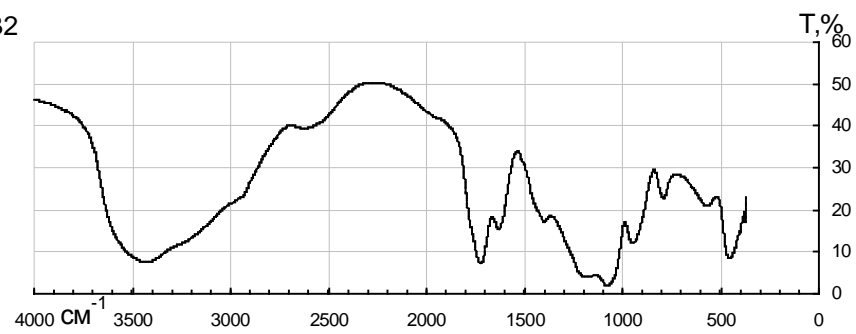
*** Атомно-абсорбционная спектроскопия



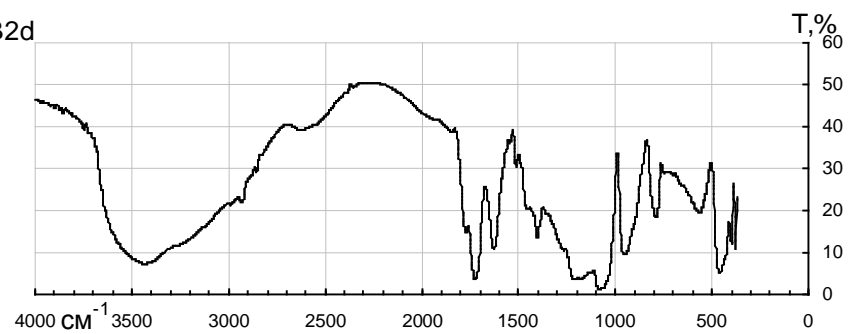




B2



B2d



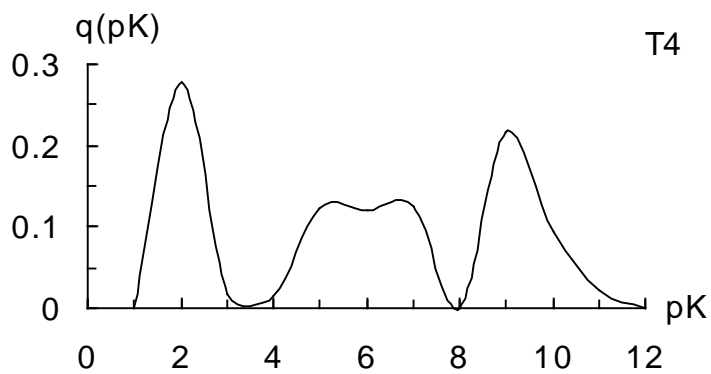
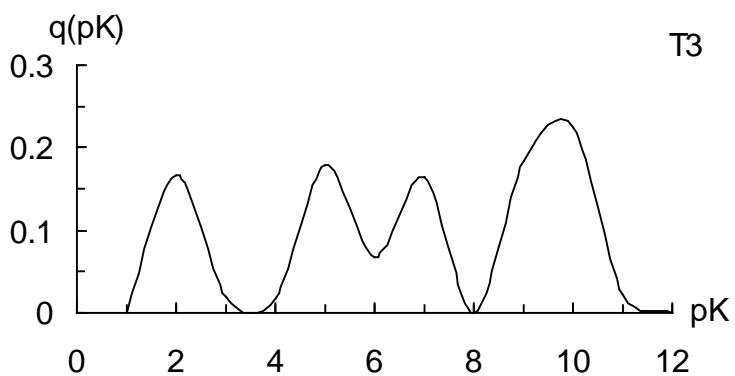
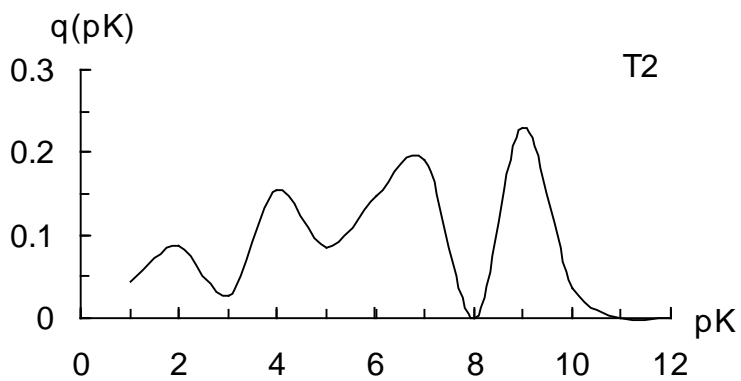
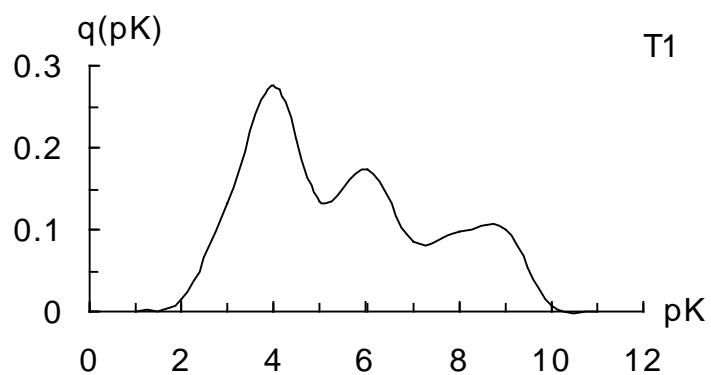
Приложение 3

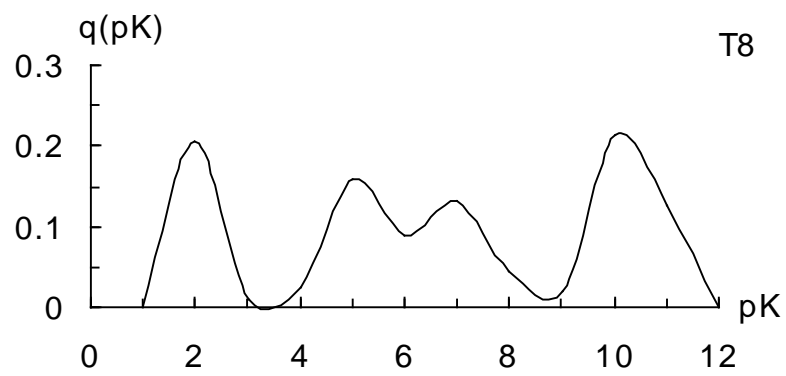
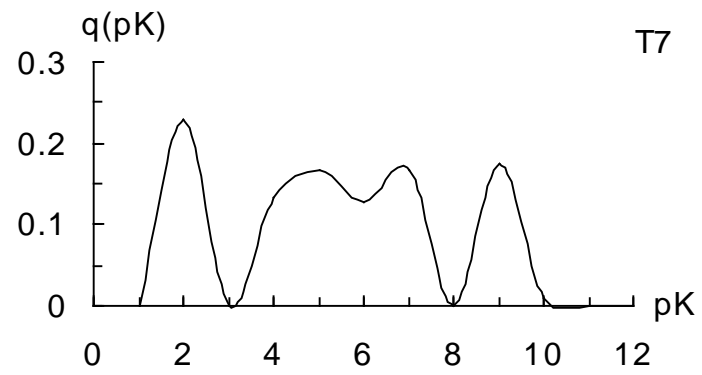
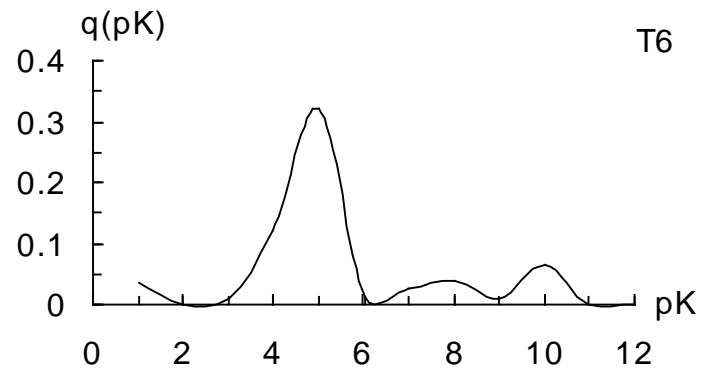
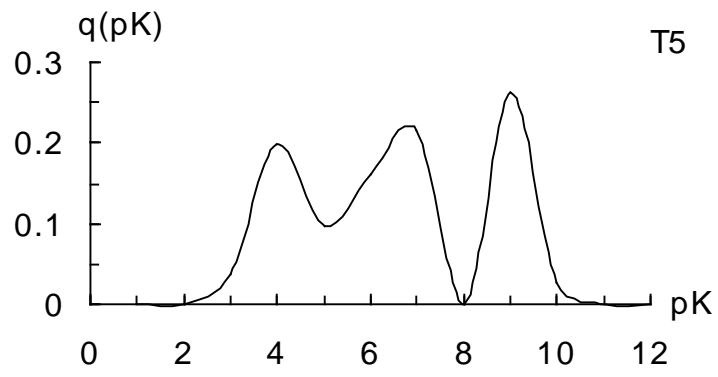
Элементный состав метилированных препаратов ГФК

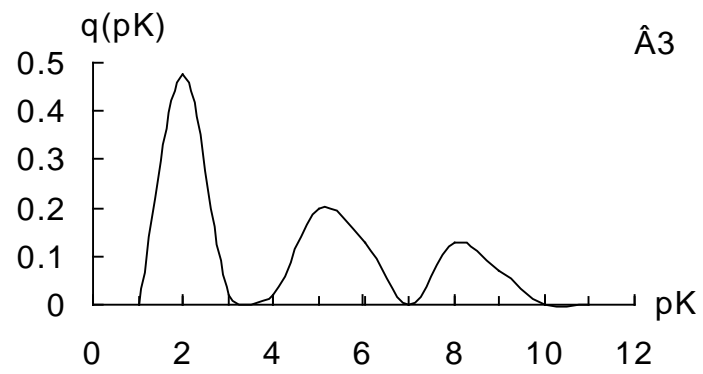
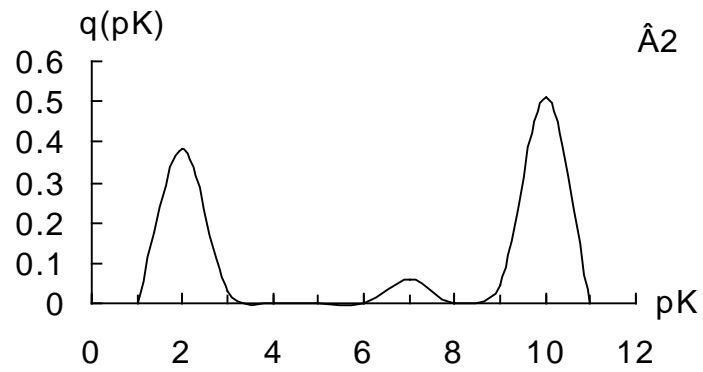
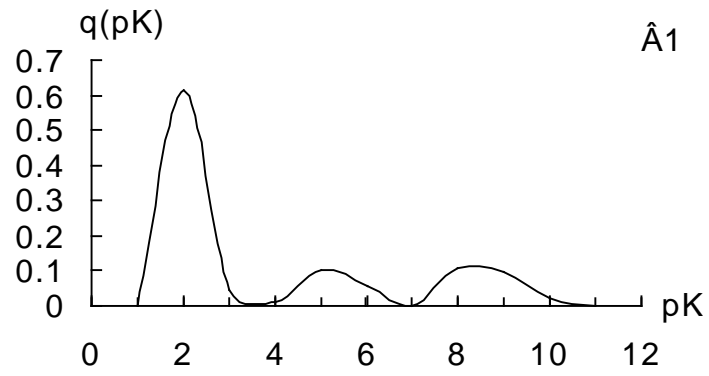
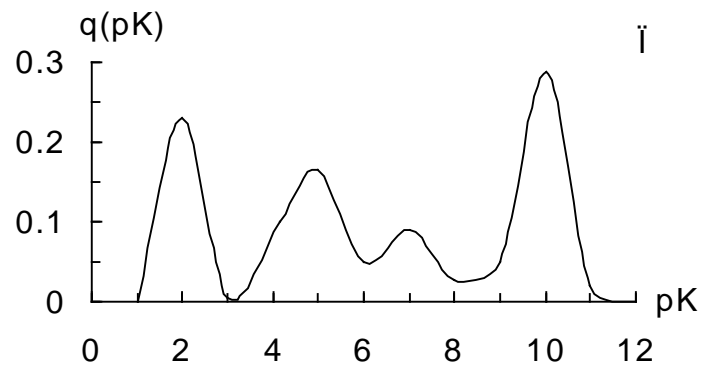
Препарат ГФК	Содержание элементов, %		
	С	Н	N
T2	56.5	5.8	2.8
T5	58.1	6.0	2.0
T7	60.3	5.5	2.6
T8	60.6	5.0	2.3

Приложение 4.

pK-спектры препаратов ГФК







Приложение 5.

Список модельных органических кислот, включенных в построение корреляционных зависимостей “структура-средняя константа диссоциации”

	Кислота	$pK_{\text{усред}}$	$pK_{\text{расч}}$
1	Щавелевая	2.76	3.48
2	D-Глюкуроновая	2.95	3.30
3	Феноксиуксусная	3.17	3.69
4	α -Гидроксифенилуксусная	3.18	3.69
5	Глиоксиловая	3.18	2.89
6	Хинная	3.30	3.52
7	Ацетилсалициловая	3.48	3.27
8	Дигидроксibenзойные	3.50	3.80
9	Тригидроксibenзойные	3.62	3.70
10	мезо-Винная	3.71	3.73
11	Муравьиная	3.75	3.48
12	Гидроксibenзойные	3.80	3.95
13	Гликолевая	3.83	3.73
14	d,l-Молочная	3.83	4.08
15	Глюконовая	3.86	3.58
16	Лимонная	3.90	4.16
17	Малеиновая+фумаровая	3.90	4.05
18	Бензойная	4.01	4.22
19	Бензолтрикарбоновые	4.02	4.05
20	Бензолдидкарбоновые	4.10	4.13
21	2,5-Дигидроксифенилуксусная	4.14	3.96
22	Коричные	4.16	4.31
23	Метоксibenзойные	4.22	3.69
24	Яблочная	4.26	4.03
25	Акриловая	4.26	4.24
26	Малоновая	4.27	4.14
27	Фенилуксусная	4.31	4.37
28	4-Метоксифенилуксусная	4.36	3.81
29	Гидрокоричная	4.37	4.49
30	Гидроксикоричные	4.50	4.04
31	Кротоновая	4.69	4.55
32	Метакриловая	4.70	4.55
33	Уксусная	4.76	4.47
34	Глутаровая	4.81	4.67
35	Масляная	4.82	4.97
36	Адипиновая	4.85	4.80
37	Валериановая	4.86	5.06
38	Пропионовая	4.87	4.80
39	Капроновая	4.88	5.13
40	Пимелиновая	4.91	4.89
41	Янтарная	4.92	4.47

Приложение 6.

Корреляционная матрица для низкомолекулярных кислот (список – Приложение 5)

	pKmean	O/C	U/C	Ar/C	COOH/O	ArOH/O	OH/O
pKmean	1						
O/C	-0.39	1					
U/C	-0.49	0.25	1				
Ar/C	-0.24	-0.60	0.42	1			
COOH/O	0.60	-0.08	0.09	-0.24	1		
PhOH/O	-0.14	-0.18	0.23	0.51	-0.44	1	
OH/O	-0.60	0.22	-0.04	0.09	-0.87	0.48	1

То же для препаратов ГФК

	pKmean	O/C	U/C	COOH/O	PhOH/O	OH/O
pKmean	1.00					
O/C	-0.90	1.00				
U/C	0.26	-0.05	1.00			
COOH/O	-0.25	0.29	0.13	1.00		
PhOH/O	0.28	-0.26	-0.13	0.01	1.00	
OH/O	0.10	-0.30	0.12	-0.26	0.04	1.00

Корреляционная матрица анализа данных по комплексообразованию ГФК с Cu^{2+}

	$\lg\beta_2$	OH/O	ArOH* COOH/O	U/C	U*O/C	pKmean	ArOH/O	O/C	COOH/O	Car
$\lg\beta_2$	1									
OH/O	-0.73	1								
PhOH*	0.48	-0.02	1							
COOH/O										
U/C	0.09	0.26	0.08	1						
U*O/C	0.25	-0.15	0.34	0.49	1					
pKmean	0.08	0.09	0.21	0.29	-0.16	1				
PhOH/O	0.33	0.11	0.67	-0.13	-0.43	0.38	1			
O/C	0.09	-0.28	-0.29	-0.09	0.24	-0.90	-0.48	1		
COOH/O	0.22	-0.23	0.36	0.25	0.96	-0.25	-0.43	0.27	1	
Car	-0.03	-0.04	-0.20	0.14	-0.38	0.66	0.21	-0.58	-0.43	1