ZUURGROEPENANALYSE EN KATIONENBINDING BIJ HUMINEZUREN

RIJKSUNIVERSITEIT TE GRONINGEN

ZUURGROEPENANALYSE EN KATIONENBINDING BIJ HUMINEZUREN

PROEFSCHRIFT

TER VERKRIJGING VAN DE GRAAD VAN DOCTOR
IN DE WISKUNDE EN NATUURWETENSCHAPPEN
AAN DE RIJKSUNIVERSITEIT TE GRONINGEN
OP GEZAG VAN DE RECTOR MAGNIFICUS DR. F. H. L. VAN OS,
HOOGLERAAR IN DE FACULTEIT DER WISKUNDE
EN NATUURWETENSCHAPPEN,
IN HET OPENBAAR TE VERDEDIGEN
OP DINSDAG 22 JUNI 1965 DES NAMIDDAGS TE 4 UUR

DOOR

HENDRIK VAN DIJK

GEBOREN TE EZINGE

ISN-468540-02

PROMOTOR: Prof. Dr. H. J. C. TENDELOO

AAN MIJN VROUW

Dit proefschrift zal, in het Engels vertaald, in druk verschijnen in de reeks Verslagen van Landbouwkundige Onderzoekingen

H. VAN DIJK
22 juni 1965

STELLINGEN

I

Tegen de conclusie van MEIJER betreffende de afwezigheid van carboxylgroepen in de door hem onderzochte huminezuren zijn verschillende bezwaren aan te voeren.

W. MEIJER, Diss. E. T. H., Zürich (1962)

II

De conclusies van LEWIS en BROADBENT over de identiteit en de pK van de zuurgroepen in de organische stof in de grond, zijn gebaseerd op een onjuiste hypothese.

T. E. LEWIS and F. E. BROADBENT, Soil Sci. **91** (1961) 393-399

III

De toepassing van acetaten bij het onderzoek van ionenwisselingsevenwichten bij humuspreparaten maakt de interpretatie van de resultaten onnodig moeilijk.

A. JUNGK, Z. Pflanzenernähr. Düng. Bodenk. **104** (1964) 206-216
Dit proefschrift blz. 123

IV

De uitspraak van IVES en JANZ dat „the glasselectrode loses its useful function altogether in completely anhydrous media" is in zijn algemeenheid onjuist.

D. J. G. IVES and G. J. JANZ, „Reference-electrodes",
A. P. New York and London (1961) blz. 434

V

De indeling van oplosmiddelen naar hun geschiktheid voor zuur-base-titraties kan het beste worden gekoppeld aan grenswaarden voor de neiging protonen te binden en protonen af te staan. (Dit proefschrift blz. 73—74). De thans bestaande willekeur bij deze indeling maakt in elk geval een afspraak in dezen gewenst.

VI

Tegen het mechanisme dat WASSERMANN en CLAGETT geven voor de omzetting van 1-ethoxycyclopropylacetaat met verdund zoutzuur, zijn bedenkingen te opperen.

H. WASSERMANN and D. C. CLAGETT, Tetrahedron Letters
No. 7 (1964) 341-344

VII

Aan metingen van de katalase-activiteit, verricht aan extracten van gist- of plantecellen waarbij geen rekening is gehouden met het „Euler-effect", kan hoogstens een beperkte waarde worden toegekend.

H. VON EULER und J. VON EULER, Arkiv Kemi, Mineral. Geol. 26A No. 22 (1948)
J. G. KAPLAN, Experimental Cell Res. 8 (1955) 305-328
H. KINZL und W. URL, Physiol. Plantarum 7 (1954) 835-850
E. F. HARTREE in Modern Methods of Plant Analysis IV by K. PAECH and M. V. TRACEY, Springer Verlag Berlin (1955) blz. 236

VIII

De classificatie van het water in de grond kan ook bij veengronden exacter en doelmatiger worden gebaseerd op de vrije energie van dit water dan op de wijze waarop het water wordt verondersteld te zijn „gebonden".

J. DALTON, Intern. Peat Symposium, Dublin (1954)

IX

Het is niet waarschijnlijk dat de „korrelgrootteverdeling" bij het veen, zoals door CHURAEV berekend uit metingen van de sedimentatiesnelheid in water, de werkelijkheid juist weergeeft.

M. P. VOLAROVICH en N. P. CHURAEV, „Nieuwe Fysische Methoden van Onderzoek van Veen", Moskou-Leningrad (1960) blz. 5-24

X

Het is niet bewezen dat de „kationenwisselingscapaciteit" van plantewortels onder geen enkele omstandigheid van invloed is op de kationenopneming door de plant.

XI

De „Aspergillus-methode" voor de koperbepaling in grond is niet geschikt voor het onderzoek van de stabiliteit van Cu-humuscomplexen. De door SCHLICHTING uit deze bepaling getrokken conclusies zijn dus ongefundeerd.

E. SCHLICHTING, Acta Agric. Scand. 4 (1955) 313-356

XII

KORTLEVEN geeft aan het begrip „humositeit" niet dezelfde inhoud als BENNEMA en VAN DER WOERDT. De door hem aangevoerde bezwaren

tegen de beschouwingen van deze onderzoekers zijn in dit opzicht dan ook irrelevant.

J. KORTLEVEN, Diss. Wageningen (1963)
S. B. HOOGHOUDT, D. VAN DER WOERDT, J. BENNEMA en H. VAN DIJK, Verslagen Landbouwk. Onderzoekingen No. 66.23 (1960) blz. 99-103

XIII

Bij de universitaire opleiding dient, meer dan incidenteel, aandacht te worden geschonken aan de eisen waaraan een publikatie behoort te voldoen.

XIV

Het ontstellend hoge percentage geestelijk gehandicapten maakt intensivering en coördinering van het onderzoek op het gebied van de „psychochemie" dringend geboden.

J. TH. HACKMANN, Inaugurele rede T. H. Enschede (1965)

XV

De doorwerking van nieuwe resultaten van het wetenschappelijk denken in hetgeen in vele kerken wordt verkondigd, is dermate traag dat een toenemende vervreemding tussen vele jongere intellectuelen en de kerk moet worden gevreesd, terwijl het bovendien de gemeente in benauwende mate weerloos maakt tegen aanvallen van niet-christelijke zijde.

WOORD VOORAF

Hooggeleerde TENDELOO, hooggeachte Promotor. Enkele jaren geleden bracht een publicatie over een heel ander onderwerp mij met U in contact. Aan het eind van het onderhoud roerde ik het thans in dit proefschrift beschreven onderzoek aan, waarbij ik de hoop uitsprak hierop te kunnen promoveren. Scherp staat in mijn herinnering gegrift hoe U mij onmiddellijk Uw steun toezegde en U bereid verklaarde als promotor op te treden. Dit vertrouwen in mij en Uw voortdurende belangstelling in de vordering van het onderzoek waren voor mij een sterke stimulans om door te zetten. Ik ben U voor dit alles bijzonder erkentelijk.

Hooggeachte BRUIN, aan U als directeur van het Instituut voor Bodemvruchtbaarheid ben ik grote dank verschuldigd voor de gelegenheid die U mij bood de resultaten van dit onderzoek, verricht aan Uw Instituut, neer te leggen in deze dissertatie.

Het stemt mij tot voldoening dit proefschrift te mogen aanbieden aan de Universiteit waar ik twaalf en een half jaar geleden tot doctorandus werd verklaard.

Hooggeleerde FABER, U ben ik zeer erkentelijk dat U bij deze aanbieding mijn voorspraak hebt willen zijn in de faculteit der wiskunde en natuurwetenschappen. U hebt het echter daarbij niet gelaten maar bovendien vele uren willen besteden aan het doornemen van het manuscript. Uw altijd opbouwende kritiek heb ik ten zeerste gewaardeerd.

U, hooggeleerde STRATING, ben ik zeer verplicht voor Uw kritisch doorlezen van hoofdstuk 3 en U, hooggeleerde BOLT, voor de discussie die ik met U mocht hebben over de uitwisselingsproeven, beschreven in § 6.3.2.

Herrn Professor Dr. W. FLAIG, Direktor des Institutes für Biochemie des Bodens der F.A.L., Braunschweig, und seinen Mitarbeitern danke ich sehr für Ihre Rat und Hilfe bei der Darstellung der synthetischen Huminsäuren während meines Aufenthaltes in Braunschweig.

Op deze plaats spreek ik ook gaarne mijn grote waardering uit voor de accurate en efficiënte medewerking die de heer H.P. DE ROOS verleende bij de uitvoering van het vele experimentele werk dat aan dit onderzoek was verbonden.

Van allen die mij door hun deskundige medewerking aan de totstandkoming van deze dissertatie zeer aan zich hebben verplicht wil ik tenslotte graag met name noemen de heer E.H. BRUINS die een deel van de apparatuur construeerde, de heer J.J. KLINKHAMER die het tekenwerk verzorgde en mej. G. SMIT die het stencil typte.

Mijn bijzondere dank voor de nooit aflatende steun die ik van mijn vrouw ontving, heb ik tot uitdrukking willen brengen door aan haar dit geschrift op te dragen.

INHOUD

Blz.

1. INLEIDING 1

1.1. Doel van het onderzoek 1

1.2. Korte samenvatting van de kennis omtrent huminezuren 1

2. ISOLERING EN ZUIVERING VAN HUMINEZUREN UIT GROND 8

2.1. Keuze van het oplosmiddel 8

2.1.1. Aanwijzingen uit de literatuur 8

2.1.2. Oriënterende proeven 9

2.2. De bodemtypen waaruit huminezuren werden geïsoleerd 13

2.3. Gevolgde werkwijze bij extractie en zuivering 15

2.4. Over de scheiding in z.g. "Braun"- en "Grau"- huminezuren 18

2.5. De procentuele samenstelling van de elementen in de verkregen huminezuren 20

3. SYNTHETISCHE HUMINEZUREN UIT POLYHYDROXIBENZENEN 22

3.1. Literatuuroverzicht 22

3.1.1. Oxidatie in afwezigheid van stikstofverbindingen 22

3.1.2. Oxidatie in aanwezigheid van ammoniak of aminoverbindingen 29

3.2. Experimenteel gedeelte 32

3.2.1. N-houdende hydrochinon-huminezuren 32

3.2.2. N-vrij hydrochinon-huminezuur 35

3.2.3. N-houdend pyrocatechol-huminezuur 35

3.2.4. N-vrij pyrocatechol-huminezuur 36

3.2.5. N-houdend pyrogallol-huminezuur 36

3.2.6. N-vrij pyrogallol-huminezuur 36

4. BESPREKING VAN DE LITERATUUR OVER DE ANALYSE VAN ZUURGROEPEN IN HUMINEZUREN 37

4.1. Inleiding 37

4.2. Organisch-chemische groepenanalyses 37

4.2.1. Bepaling van COOH- en OH-groepen gezamenlijk 37

4.2.2. Bepaling van COOH-groepen afzonderlijk 38

4.2.3. Bepaling van OH-groepen afzonderlijk 39

4.2.4. Bezwaren van deze methoden in het algemeen 40

4.3. Anorganisch-chemische bepalingen 41

4.3.1. Inleidende beschouwingen 41

4.3.2. Bepaling van COOH- en OH-groepen gezamenlijk 43

4.3.3. Bepaling van COOH- groepen afzonderlijk 45

4.3.4. Bepaling van OH-groepen afzonderlijk 46

Blz.

5. ELECTROMETRISCHE ANALYSE VAN DE ZUURGROEPEN BIJ HUMINEZUREN 48

5.1. Inleiding 48

5.2. Titraties van huminezuren opgelost in water 49

5.2.1. Potentiometrische titraties 49

5.2.1.1. Inleiding en bespreking van de literatuur 49

5.2.1.2. Experimenteel gedeelte 51

5.2.1.3. Resultaten en discussie 52

5.2.2. Conductometrische titraties 58

5.2.2.1. Inleiding. Mogelijkheden van deze titratiemethode 58

5.2.2.2. Experimenteel gedeelte 61

5.2.2.3. Resultaten en discussie 62

5.3. Titraties van huminezuren opgelost in organische oplosmiddelen 72

5.3.1. Perspectieven van het gebruik van organische oplosmiddelen 72

5.3.2. Potentiometrische titraties 77

5.3.2.1. Aanwijzingen uit de literatuur 77

5.3.2.2. Experimenteel gedeelte 80

5.3.2.3. Resultaten en discussie 82

5.3.3. Conductometrische titraties 84

5.3.3.1. Aanwijzingen uit de literatuur 84

5.3.3.2. Experimenteel gedeelte 87

5.3.3.3. Resultaten en discussie 88

5.3.4. Titraties met behulp van een hoge-frequentie-oscillator 93

5.3.4.1. Principe van de methode 93

5.3.4.2. Enkele literatuurgegevens over zuur-base-titraties 96

5.3.4.3. Experimenteel gedeelte 97

5.3.4.4. Resultaten en discussie 97

5.4. Slotbeschouwing van hoofdstuk 5 102

6. DE BINDING VAN KATIONEN DOOR HUMINEZUREN 109

6.1. Inleiding en nomenclatuur 109

6.2. Methoden van onderzoek (Literatuur) 111

6.2.1. Potentiometrische methoden 111

6.2.2. Ionenwisselingsmethoden 117

6.2.3. Overige methoden 124

Blz.

6.3. Eigen onderzoekingen 126

6.3.1. Potentiometrische titraties 126

6.3.1.1. Experimentele details en proeven vooraf 126

6.3.1.2. Interpretatie van het curveverloop in aanwezigheid van een zout 129

6.3.1.3. Vergelijking van verschillende kationen 136

6.3.1.4. Vergelijking van verschillende huminezuren 146

6.3.1.5. Recapitulatie en conclusies 150

6.3.2. Overige onderzoekingen van de ionenwisselingsevenwichten 152

SAMENVATTING 157

SUMMARY 163

LITERATUUR 168

1. INLEIDING

1.1. DOEL VAN HET ONDERZOEK

Met de verzamelnaam "huminezuren" duidt men in de bodemkunde aan een groep donkerbruin gekleurde organische zuren met een tamelijk hoog molecuulgewicht, die ontstaan bij de vertering van organisch materiaal in de grond. De huidige kennis van de structuur en de functie van deze zuren is nog zeer gebrekkig. Het staat wel vast, dat de huminezuren o.a. een belangrijk bestanddeel uitmaken van wat in de bodemkunde vaak het "adsorptiecomplex" van de grond wordt genoemd, waarmee gedoeld wordt op het vermogen van de grond ionen te binden en uit te wisselen.

Het onderhavige onderzoek was vooral gericht op de wijze van binding van kationen door huminezuren en op de wetmatigheden die de kationenwisseling bij deze zuren beheersen (Hoofdstuk 6). Als een belangrijke vraag werd daarbij gezien die naar de hoedanigheid en de "sterkte" van de zuurgroepen bij huminezuren (Hoofdstukken 4 en 5). De algemeen-geldigheid van het gevondene werd getoetst door het onderzoek zowel aan huminezuren, geïsoleerd uit diverse gronden (Hoofdstuk 2) als aan synthetisch bereide modelstoffen van huminezuren (Hoofdstuk 3) uit te voeren.

1.2. KORTE SAMENVATTING VAN DE KENNIS OMTRENT HUMINEZUREN

Een uitvoerig en goed gedocumenteerd overzicht van het tot 1960 verrichte onderzoek aan huminezuren wordt gegeven door SCHEFFER en ULRICH (1960). In deze inleiding wordt daarom volstaan met hiervan een korte samenvatting te geven. Een uitvoeriger overzicht van de literatuur die betrekking heeft op de in deze studie nader onderzochte eigenschappen der huminezuren wordt gegeven bij de betreffende hoofdstukken.

Onder huminezuren wordt meestal verstaan die fractie van de organische stof in de grond die met een verdunde oplossing van een eenwaardige base of een alkalisch reagerend zout hiervan kan worden geëxtraheerd en met mineraal zuur weer uit het extract wordt neergeslagen.

Huminezuren uit grond bestaan vrijwel geheel uit koolstof (50 à 60 %), waterstof (. 4 à 5,5 %), zuurstof (30 à 40 %) en stikstof

(2 à 5 %).(Deze cijfers zijn gecorrigeerd op as waarvan het gehalte, afhankelijk van het bodemtype, sterk kan variëren).

De door verschillende onderzoekers opgegeven waarden voor het gemiddelde molecuulgewicht lopen zeer sterk uiteen nl. van ongeveer 500 tot ca. 50.000. Deze divergentie kan hoogstens voor een deel worden verklaard uit het feit dat de onderzochte huminezuren, meestal tenminste, van verschillende herkomst waren. Het is vrijwel zeker dat men bij verschillende opgegeven waarden te doen heeft met artefacten veroorzaakt door een onvolledige dispergering of zuivering of anderzijds een gedeeltelijke afbraak vóór of tijdens de bepaling.

Eén der voornaamste oorzaken van deze divergentie is echter ongetwijfeld het verschil in bepalingsmethode, met name of methoden worden toegepast waarmee het aantalgemiddelde molecuulgewicht wordt gevonden (cryoscopie, osmometrie) of methoden die het gewichtsgemiddelde M.G. opleveren (viscosimetrie, ultracentrifugering). Het lijkt waarschijnlijk dat het gemiddelde molecuulgewicht ongeveer 25.000 bedraagt met een (grote) spreiding van ca. 5000 tot wellicht meer dan 100.000 (MEHTA, DUBACH en DEUEL, 1963).

FLAIG en BEUTELSPACHER (1951, 1954) en BEUTELSPACHER (1952) concluderen uit viscosimetrische bepalingen en uit electronenmicroscopische opnamen dat de huminezuren behoren tot de sferokollofden. Hiermee in strijd zijn de waarnemingen van PIRET c.s. (1960) die hun metingen echter verrichten aan weinig "gezuiverde" huminezuren.

Het mag thans wel als vaststaand worden aangenomen dat de huminezuren in droge toestand volledig amorf zijn. Hierdoor en door het feit dat het verbindingen zijn zonder smeltpunt vallen verschillende van de klassieke chemische karakteriseringsmethoden uit.

Volgens de huidige opvattingen ontstaan de huminezuren door een ingewikkeld geheel van oxidatie-, condensatie- en additiereacties uit allerlei fenolische en chinoïde verbindingen. Deze komen o.a. in de vorm van lignine en afbraakproducten hiervan en als stofwisselingsproducten van microorganismen in de grond voor. Hierbij worden ook stikstofverbindingen als ammoniak, aminozuren en peptiden gebonden waarbij o.a. heterocyclische ringen ontstaan. De iso- en heterocyclische ringen in huminezuren zijn waarschijnlijk gedeeltelijk direct door C-C-bindingen verbonden, gedeeltelijk treden ook -C-O-C- en -C-N-C-bruggen op. Er zijn aanwijzingen dat ook alifatische bruggen

voorkomen.

Het zuur-karakter van de huminezuren wordt veroorzaakt door tenminste twee soorten zure functies. De sterker zure zijn vermoedelijk carboxylgroepen, terwijl de zwakkere aan fenolische OH-groepen worden toegeschreven. Daarnaast bevatten ze methoxyl-groepen en carbonyl-groepen (in chinoïde ringen maar volgens sommige onderzoekers ook alifatische) en wellicht ook alcoholische OH-groepen. Dank zij de aanwezigheid van zure functies fungeren de huminezuren in de grond als kationenuitwisselaars. Hun uitwisselingscapaciteit ligt aanzienlijk hoger dan die van kleimineralen.

Als basische groepen worden naast heterocyclisch gebonden stikstof amidefuncties in geaddeerde eiwitbrokstukken genoemd en verder nog stikstof waarvan de bindingswijze nog niet bekend is. Hierbij kan worden opgemerkt, dat het zuurkarakter steeds dermate overweegt dat een iso-electrisch punt bij gezuiverde huminezuren nog nooit waargenomen is.

Vanuit de droge toestand zijn de huminezuren vrijwel onoplosbaar in water. Dit moet voornamelijk aan het optreden van waterstofbruggen in en tussen de deeltjes worden toegeschreven. De zuren lossen in het algemeen gemakkelijk op in verdunde alkalisch reagerende oplossingen, zoals die van de alkalihydroxiden, en vele zouten hiervan met zwakkere zuren, e.d. Van de organische oplosmiddelen zijn het voornamelijk de basische waarin de huminezuren een zekere oplosbaarheid vertonen. Hiervan moet vooral dimethylformamide worden genoemd. Naarmate de huminezuren meer water bevatten (en daardoor minder H-bruggen in en tussen delen van de huminezuren zelf zijn gevormd) zijn ze in het algemeen in diverse oplosmiddelen beter oplosbaar. Volgens sommige onderzoekers komen er bij oplossingen van huminezuren in water ook nog vaak associaties van moleculen (micellen) voor tengevolge van het optreden van waterstofbruggen.

De zouten der huminezuren zijn, uitgezonderd de alkali- en ammoniumhumaten, in het algemeen slecht tot zeer slecht oplosbaar in water. De huminezuren zouden in ongeveer neutraal milieu selectief meerwaardige kationen binden.

De huminezuren kunnen worden gereduceerd tot kleurloze verbindingen die in alkalische oplossing weer snel zuurstof uit de lucht opnemen waarbij de donkere kleur terugkeert. Ook de niet-gereduceerde verbindingen zijn in alkalische oplossingen onderhevig aan autoxida-

tie waarbij tenslotte molecuulafbraak optreedt. Verder kan nog worden vermeld dat de huminezuren een looistofkarakter hebben.

De absorptiespectra van huminezuren in het zichtbare en ultraviolette gebied zijn in hoge mate onkarakteristiek. Een kwalitatieve groepenanalyse door middel van infra-rood absorptiespectra biedt meer perspectieven.

Uit deze korte samenvatting van de beschikbare gegevens blijkt, dat de voorstelling die men heeft over het ontstaan, de molecuulopbouw en de eigenschappen van huminezuren betrekkelijk vaag is ondanks het vele onderzoek dat hierover is verricht. (Als eerste publikatie over huminezuren is te beschouwen die van ACHARD in 1786). Hiervoor kunnen verschillende oorzaken worden genoemd waarvan de volgende twee wel de voornaamste zijn:

1. De isolering en zuivering van de huminezuren uit grond, zonder dat ze daarbij zelf ook aangetast worden is moeilijk. Niet alleen heeft men te maken met een uiterst ingewikkeld mengsel van organische en anorganische stoffen, maar gedeeltelijk bestaat er ook een stevige binding tussen huminezuren en anorganische bestanddelen van de grond. De aanwezigheid van anorganische verontreinigingen brengt, speciaal bij het onderzoek van verschillende fysisch-chemische eigenschappen, altijd een onbekende factor in het spel. Hetzelfde geldt b.v. bij de bepaling van het molecuul- of deeltjesgewicht vooral als anorganische stoffen als bruggen fungeren tussen verschillende huminezuurdeeltjes zoals inderdaad het geval schijnt te kunnen zijn.
2. De huminezuren vertonen niet alleen een zekere variatie in molecuulgewicht zoals bij een "polymeerhomologe" reeks maar ze zijn zeer waarschijnlijk ook niet uniform en regelmatig uit dezelfde bouwstenen opgebouwd ("heteropolycondensaten"). De samenstelling is vermoedelijk afhankelijk van allerlei "toevallige" ontstaanscondities zoals aard en samenstelling van het organisch uitgangsmateriaal, klimatologische omstandigheden, bezetting van de grond met microörganismen, vochtigheidstoestand en pH van de grond, samenstelling van de anorganische bestanddelen van de grond e.d. Zelfs is er bij één bepaalde grond nog geen sprake van één huminezuur maar heeft men ook hier nog te maken met een mengsel van nauw verwante verbindingen.

Als gevolg van hetgeen onder 1 en 2 is vermeld is de samenstelling van het uit een bepaalde grond geïsoleerd huminezuurmengsel afhankelijk van het gebruikte extractiemiddel en van de gevolgde werkwijze bij de isolering en zuivering. Het is te betreuren dat ook nu nog in veel publikaties hiermee te weinig rekening wordt gehouden.

Niet alleen heeft nl. vrijwel iedere onderzoeker zijn eigen methode van isoleren en zuiveren van huminezuren, maar bovendien wordt dikwijls een behoorlijke beschrijving hiervan achterwege gelaten.

Reeds in oudere publikaties worden methoden beschreven om het huminezuurmengsel verder te scheiden in fracties. De bekendste hiervan zijn die van HOPPE-SEYLER (1889) en van SPRINGER (1938). HOPPE-SEYLER verdeelt de huminezuren in een in alcohol oplosbare fractie en een in alcohol onoplosbaar deel. De stoffen uit de eerste fractie worden hymatomelaanzuren genoemd, terwijl de naam huminezuren wordt beperkt tot de verbindingen van de tweede fractie. Tegenwoordig wordt deze splitsing niet veel meer toegepast.

SPRINGER introduceerde een indeling in "Braun"- en "Grauhuminsäuren" op grond van een grotere gevoeligheid van de laatste voor uitvlokking bij electrolyttoevoeging (partiële uitzouting). Aanvankelijk dacht men de huminezuren hiermee in twee wezenlijk verschillende stofgroepen te hebben verdeeld. Er zijn echter aanwijzingen dat men hier slechts te doen heeft met een zuiver conventionele scheiding van overigens in wezen verwante stoffen (zie b.v. de recente publikaties van SCHEFFER en SCHLÜTER (1959) en SCHARPENSEEL (1960)). De fractie "Grauhuminsäuren" heeft een hoger as-gehalte en in het algemeen ook een hoger N-gehalte. Door middel van gefractioneerde uitzouting met diverse zouten is nog wel een verdergaande indeling te bewerkstelligen zonder dat men daarbij echter een scheiding in essentieel verschillende typen van verbindingen verkrijgt.

In de laatste jaren heeft men door middel van papierchromatografie en papierelectroforese eveneens een splitsing in een aantal fracties kunnen verkrijgen. In sommige gevallen betrof dit slechts een vage scheiding maar in andere nam men een scherpere verdeling in verschillende zônes waar. Een dergelijke scheiding verkreeg men ook bij sedimentatieanalyse met behulp van de ultracentrifuge. Of men echter met deze methoden een scheiding in wezenlijk verschillende stoffen of stofgroepen heeft verkregen is nog niet een geheel uitgemaakte

zaak. Het is niet uitgesloten dat men hier voor een deel te maken heeft met een scheiding in "micellen" van verschillende grootte.

Gezien de hierboven onder 1 en 2 genoemde moeilijkheden van het onderzoek aan huminezuren uit de grond, lag het voor de hand te proberen de vragen van opbouw en eigenschappen van huminezuren te benaderen door onderzoek aan modelstoffen. Deze weg werd dan ook reeds in een zeer vroeg stadium van het onderzoek bewandeld. Aanvankelijk meende men dat als zodanig in aanmerking kwamen de donkerbruine producten die men verkrijgt door zeer langdurige verhitting van suikers en polysacchariden in een zwak zure waterige oplossing. Deze mening is echter thans vrijwel geheel verlaten.

Als betere modelstoffen van huminezuren worden beschouwd de donkerbruine stoffen die ontstaan bij oxidatie van diverse polyhydroxibenzenen b.v. wanneer men een alkalische oplossing hiervan in contact brengt met zuurstof. Het voordeel van dergelijke modelstoffen is dat men ze asvrij kan bereiden uit één bepaalde goed gedefinieerde verbinding. Men kan dus de invloed hiervan en van de reactieomstandigheden op de vorming en eigenschappen van "huminezuren" systematisch nagaan. Hetzelfde geldt voor de "inbouw" van stikstofverbindingen.

Zoals opgemerkt hebben we bij huminezuren in de grond zeer waarschijnlijk te doen met onregelmatige "heteropolycondensaten". Het is dus zeer de vraag of het veel zin heeft te trachten gedetailleerde structuurformules op te stellen. De betekenis van het organisch-chemische (en ook biochemische) onderzoek aan modelstoffen ligt allereerst in een studie van de reactiviteit van verbindingen die als mogelijke "precursors" van huminezuren in de grond voorkomen. Daarbij moeten de condities zoals die in de grond voorkomen zoveel mogelijk worden benaderd.

Langs deze weg kan inzicht worden verkregen in het koppelingsmechanisme van dergelijke verbindingen. Hierdoor immers worden in belangrijke mate eigenschappen als deeltjesvorm en -grootte, mate van "crosslinking" e.d. bepaald. Daarmee hangen weer nauw samen de voor de praktijk belangrijke eigenschappen als wijze en selectiviteit van de ionenbinding, krimp en zwelling en invloed op de consistentie van de grond.

Kennis van de wijze van ontstaan van huminezuren opent misschien ook de mogelijkheid in dit proces in te grijpen en het in een bepaalde richting te laten verlopen. Men kan hierbij b.v. denken aan de

omzetting van industriële afvalproducten, van huisvuil en veen in voor de land- en tuinbouw waardevolle producten.

Voordat men echter toe is aan een verklaring van de eigenschappen moet men deze eigenschappen leren kennen. De kennis hierover vertoont nog zeer veel leemten. Het doel van het in de volgende hoofdstukken te bespreken onderzoek is geweest een bijdrage te leveren aan deze kennis waarbij tevens meer inzicht zou worden verkregen in de functie en de betekenis van de huminezuren voor de bodemvruchtbaarheid.

In dit onderzoek is bewust afgezien van een poging eerst een zo goed mogelijke fractionering van de huminezuren te bewerkstelligen en deze fracties dan afzonderlijk te onderzoeken. In de eerste plaats zou dit op zichzelf reeds een heel onderzoek hebben gevergd omdat er geen doeltreffende methoden bekend waren om een dergelijke fractionering op voldoend grote schaal uit te voeren. Een dergelijk onderzoek lokte echter niet erg aan omdat het a priori niet bijzonder waarschijnlijk leek dat de huminezuren zouden bestaan uit een aantal componenten met een wezenlijk verschillende molecuulopbouw.

Ook al zouden er echter zodanig verschillende componenten inderdaad bestaan, dan was het nog zeer de vraag of deze ten aanzien van de te onderzoeken eigenschappen meer dan graduele verschillen zouden vertonen. Het voorgenomen onderzoek had namelijk, zoals gesteld in 1.1., allereerst ten doel nadere informaties te verkrijgen over de binding en uitwisseling van kationen door huminezuren. Een contrôle hierop leverde bovendien het onderzoek aan modelstoffen van huminezuren.

Als laatste argument voor een onderzoek aan de ongesplitste huminezuren kan worden aangevoerd dat dit het voordeel heeft dat men dan, op betrekkelijk korte termijn, tenminste over de gemiddelde eigenschappen van een aanzienlijke fractie van de organische stof bij verschillende bodemtypen geïnformeerd is.

2. ISOLERING EN ZUIVERING VAN HUMINEZUREN UIT GROND

2.1. KEUZE VAN HET OPLOSMIDDEL

2.1.1. Aanwijzingen uit de literatuur

Voor de extractie van huminezuren uit grond kon bij het begin van het hier te bespreken onderzoek in 1955 reeds een keuze worden gemaakt uit een hele reeks in de literatuur aanbevolen oplosmiddelen. Dit aantal heeft zich sedertdien nog sterk uitgebreid. Ook hiervan wordt een bespreking gegeven in SCHEFFER-ULRICH (pg. 56-63; zie daar ook voor opgave van de oorspronkelijke literatuur).

De grootste opbrengst aan huminezuren blijkt te worden verkregen bij extractie van de grond met verdunde loog na een voorbehandeling van de grond met verdund zoutzuur. Het laatste dient om zoveel mogelijk alle meerwaardige kationen, voornamelijk Ca-ionen, uit de grond te verwijderen. Ca-humaten zijn nl. slecht in loog oplosbaar.

Tegen het gebruik van natronloog wordt echter door veel onderzoekers het bezwaar aangevoerd dat, afhankelijk van de grond, de loogconcentratie en de temperatuur tijdens de extractie zuurstof kan worden opgenomen. Dit kan zowel leiden tot een verhoging van de opbrengst, door omzetting van lagermoleculaire "precursors" in huminezuren, als tot een verlaging door afbraak van huminezuren. Ook zou door een verdere "condensatie" van de huminezuren, gepaard gaand met een verhoging van het gemiddelde molecuulgewicht, een deel van de huminezuren zelfs onoplosbaar kan worden. Als gevolg van de oxidatie zou het zure karakter van de huminezuren worden versterkt en de uitwisselingscapaciteit verhoogd. De gronden zouden gevoeliger zijn voor zuurstofopname na een voorbehandeling met verdund zoutzuur.

Verder is wel beweerd dat de huminezuren verkregen door extractie met loog sterker zouden zijn verontreinigd met andere organische stoffen (zoals looistoffen en pektine) dan die verkregen door extractie met neutraal reagerende oplosmiddelen. Duidelijke bewijzen hiervoor hebben wij echter nergens gevonden.

Vooral op grond van het eerstgenoemde bezwaar zien veel onderzoekers af van het gebruik van loog als oplosmiddel. Hierbij moet echter worden opgemerkt dat bij de meeste onderzoekingen over de invloed van loog gewerkt werd met een loogconcentratie van 2 %

(0,5 N.) of hoger. Verder werd, om een duidelijker effect te vinden, het alkalische milieu dikwijls veel langer dan strikt nodig gehandhaafd. In sommige gevallen zijn omzettingen ten gevolge van het gebruik van loog alleen geconstateerd bij extracties bij verhoogde temperatuur.

In plaats van loog worden dan meestal de neutraal of zwak alkalisch reagerende oplossingen genomen van natriumfluoride, natriumpyrofosfaat, natrium- of ammoniumoxalaat of dgl. Van deze zouten bleken diegene het meest effectief, die in staat zijn meerwaardige kationen complex te binden.

Anderzijds wordt ook wel getracht de bezwaren van het gebruik van loog te ondervangen door de extractie uit te voeren in een stikstof- of waterstofatmosfeer of door een reductiemiddel als $SnCl_2$ toe te voegen. In het algemeen wordt dan echter de opbrengst ook lager (hetgeen een aanwijzing is dat de bezwaren in deze gevallen wel gegrond zijn), zodat het gebruik van loog geen bijzondere voordelen meer biedt.

2.1.2. Oriënterende proeven

Bij een ander onderzoek was reeds enige ervaring opgedaan met een aantal extractiemiddelen. Dit betrof een onderzoek naar de invloed van bekalking en van bemesting met stalmest op het gehalte aan huminezuren bij twee proefvelden resp. op een oude en een jonge veenkoloniale grond.

Daarbij werden eerst de volgende extractiemiddelen beproefd bij één der monsters van de jonge veenkoloniale grond: 0,1 N. natriumhydroxide-oplossing; 0,1 M. natrium-pyrofosfaat-oplossing; 0,1 M. oplossing van het tetra-natriumzout van ethyleendiamine-tetraazijnzuur (E.D.T.A.); 0,25 M. ammonium-oxalaatoplossing; 0,2 M. natriumfluoride-oplossing (alle in water). De concentraties zijn genomen zoals deze door verschillende onderzoekers werden aanbevolen, uitgezonderd die van NaOH waarvan een meer verdunde oplossing werd genomen dan meestal wordt toegepast. Een voorbehandeling van de grond met zoutzuur werd niet gegeven. De grond had een pH van 6,1 en een gehalte aan organische stof van 7,1 %.

De extracties werden als volgt uitgevoerd:
Aan 10 g. luchtdroge grond in een 100 ml. centrifugebuis werden 50 ml. oplosmiddel toegevoegd. Dit mengsel werd gedurende 10 min. bij

kamertemperatuur intensief geroerd met behulp van een "Vibromischer" (A.G. Apparatebau, Zürich). Het bruine extract werd dan afgescheiden door te centrifugeren. Het residu werd opnieuw behandeld met 50 ml. oplosmiddel enz. Deze bewerking werd herhaald tot het extract kleurloos was. Het totale met een bepaald oplosmiddel verkregen extract werd daarna onder goed roeren aangezuurd met geconcentreerd zoutzuur tot pH 1. De uitgevlokte huminezuren werden afgecentrifugeerd, uitgewassen met 0,1 N. zoutzuur en met gedestilleerd water en daarna gedroogd bij 105°C. Aan de droge huminezuren werd onder meer een C-bepaling uitgevoerd volgens een variant van de methode ter Meulen en Heslinga. Betrokken op het C-gehalte van de oorspronkelijke grond levert dit ten naaste bij het percentage huminezuren in de organische stof.

Dit percentage van de organische stof dat door de diverse oplosmiddelen in de genoemde volgorde werd geëxtraheerd bedroeg: 28, 21, 20, 13 en 9 %. Ook bij deze verdunning geeft loog dus nog de hoogste opbrengst.

Deze extracties werden eveneens uitgevoerd met de NaOH-, $Na_4P_2O_7$- en NaF-oplossingen aan een groter aantal veldjes van beide proefpercelen. Met oplossingen van zouten met een organisch anion werden geen verdere proeven genomen omdat deze gezien de bovenstaande cijfers geen hogere opbrengst gaven, terwijl de contrôle op volledige verwijdering bij de zuivering moeilijk is. Het gemiddelde gehalte aan organische stof bij de veldjes van het proefperceel op oude veenkoloniale grond was 18,7 % en de pH-KCl 4,3. Bij de jonge veenkoloniale grond waren deze cijfers resp. 9,3 en 4,5. Bij de oude veenkoloniale grond werd gemiddeld met loog 36 %, met de $Na_4P_2O_7$-oplossing 26 % en met de NaF-oplossing 18 % van de organische stof geëxtraheerd. Bij de jonge veenkoloniale grond waren deze cijfers resp. 32 %, 22 % en 11 %.

Opmerkelijk was dat het asgehalte in het algemeen het hoogste was bij de huminezuren geëxtraheerd met loog en het laagste bij die geëxtraheerd met de NaF-oplossing.

Op deze ervaringen voortbouwend werd nog een vergelijkend onderzoek ingesteld aan vier zeer verschillende bodemtypen, waarvan in tabel 2 (volgende paragraaf) nadere gegevens worden vermeld. Als oplosmiddelen werden weer genomen een NaOH-, een NaF- en een $Na_4P_2O_7$-oplossing van dezelfde concentratie als boven. Daarnaast

werd nog een oplossing geprobeerd die 0,1 Mol NaOH en 0,2 Mol NaF per liter bevatte. Gehoopt werd namelijk dat deze combinatie de voordelen van beide zou hebben nl. een hoge opbrengst met een laag asgehalte en een achterwege kunnen blijven van de voorbehandeling met zoutzuur, althans bij gronden die geen vrije kalk bevatten.

De extracties werden zowel uitgevoerd aan de grond zonder meer als aan grond die met 0,1 N. zoutzuur was voorbehandeld ter verwijdering van kalk e.d. en was nagewassen met water. De extractiemethode was als boven beschreven. Alleen werd de veengrond niet vooraf gedroogd en werd hiervan een hoeveelheid genomen overeenkomend met 5 g. droog veen.

De resultaten worden in tabel 1 weergegeven.

Tabel 1. Vergelijking van 4 extractiemiddelen voor huminezuren bij 4 verschillende grondtypen, zowel zonder als na voorbehandeling van de grond met 0,1 N zoutzuur

grond	extractiemiddel:	zonder voorbehandeling met zuur					na voorbehandeling met zuur				
		aantal keren geëxtr.	% [1]) $C_{h.z.}$ in de grond	% [1]) $N_{h.z.}$ in de grond	[2]) C/N h.z.	% [3]) gloei-verl. h.z.	aantal keren geëxtr.	% [1]) $C_{h.z.}$ in de grond	% [1]) $N_{h.z.}$ in de grond	[2]) C/N h.z.	% [3]) gloei-verl. h.z.
zand-grond 55 D 114	0,2 M NaF	6	0,20	0,070	3	96	5	0,24	-	-	91
	0,1 M $Na_4P_2O_7$	6	0,76	0,058	13	88	5	0,69	0,052	13	82
	0,1 M NaOH	6	0,84	0,053	16	72	5	0,90	0,061	15	75
	0,3 M NaOH-NaF(1:2)	6	0,65	0,048	14	77	5	0,68	0,068	10	74
bos-veen 55 D 123	0,2 M NaF	7	10,5	0,55	19	86	6	11,2	0,62	18	80
	0,1 M $Na_4P_2O_7$	7	16,2	1,00	16	72	6	13,4	0,70	19	69
	0,1 M NaOH	7	20,4	1,28	16	69	6	21,4	1,34	16	69
	0,3 M NaOH-NaF(1:2)	7	17,6	1,26	14	79	6	20,3	1,26	16	80
zwarte aarde 55 D 121	0,2 M NaF	5	0,20	0,016	12	44	5	0,41	0,029	14	29
	0,1 M $Na_4P_2O_7$	5	0,70	0,045	16	13	4	1,10	0,082	13	21
	0,1 M NaOH	1	0,00	-	-	-	3	1,19	0,091	13	25
	0,3 M NaOH-NaF(1:2)	5	0,16	0,017	9	41	5	0,47	0,032	15	80
zee-klei 55 D 089B	0,2 M NaF	2	0,08	-	-	37	2	0,07	-	-	14
	0,1 M $Na_4P_2O_7$	3	0,29	0,027	11	24	3	0,42	0,059	7	24
	0,1 M NaOH	2	0,05	-	-	36	3	0,41	0,027	15	38
	0,3 M NaOH-NaF(1:2)	3	0,16	-	-	68	4	0,16	-	-	60

1) % C resp. $N_{h.z.}$ in de grond = gevonden percentage koolstof resp. stikstof in de grond aanwezig in de vorm van huminezuren
2) C/N h.z. = verhouding koolstof/stikstof in de geëxtraheerde huminezuren.
3) % gloeiverl. h.z. = percentage gloeiverlies van de geëxtraheerde huminezuren.

Hieruit kunnen de volgende conclusies worden getrokken:

1. Zoals reeds uit andere onderzoekingen bekend was, blijkt ook hier dat de oplosmiddelen niet alleen verschillen in efficientie maar dat ze ook specifieke verschillen vertonen. Dit komt nl. duidelijk tot uiting in de verschillende C/N-verhouding van de huminezuren. Gezien deze verschillen in specifiek oplossend vermogen leek het ons voor een vergelijkend onderzoek van huminezuren uit verschillende gronden het meest gewenst om voor alle gronden hetzelfde

oplosmiddel te gebruiken.

2. De volgorde van efficientie is bij de vier gronden niet geheel dezelfde. Dit geldt zowel zonder als na voorbehandeling van de grond met zoutzuur.
3. Behalve bij de kleigronden voorzover ze niet met zuur zijn voorbehandeld werd de hoogste opbrengst aan huminezuren weer verkregen met 0,1 N. loog en de laagste weer met de NaF-oplossing. Opvallend is dat de toevoeging van 0,2 Mol NaF per liter aan de loog de opbrengst aan huminezuren vrij sterk doet dalen. Dit lijkt duidelijk een kwestie van electrolytconcentratie te zijn. Niet alleen wordt dus peptisatie van kleideeltjes tegengegaan maar ook het oplossen van een deel van de huminezuren. (Er zijn aanwijzingen dat deze gebonden zijn aan kleideeltjes.)
4. De opbrengst aan huminezuren verkregen met de pyrofosfaatoplossing verschilt bij de zand- en veengrond gemiddeld weinig van die verkregen met de loog-fluoride-oplossing. Hetzelfde geldt voor de asgehalten van de verkregen huminezuren. Bij de beide kleigronden is echter zowel de opbrengst als het asgehalte van de huminezuren verkregen met de pyrofosfaatoplossing aanzienlijk hoger dan met de loog-fluoride-oplossing. De door pyrofosfaat méér geëxtraheerde huminezuren zijn vermoedelijk weer, althans voor een deel, gebonden aan kleideeltjes.
5. Ten aanzien van de voorbehandeling van de grond met zoutzuur valt op dat deze bij de NaF-oplossing en bij de mengoplossing van loog en fluoride alleen een duidelijk gunstige invloed heeft op de opbrengst bij de kalkhoudende zwarte aarde. Bij pyrofosfaat en loog is er ook een zeer duidelijk effect bij de kleigrond 089 B die wel vrij veel Ca-ionen bevat (de pH = 6,83) maar toch geen vrije kalk. Dit wijst er op dat de calciumionen bij gronden die geen vrije kalk bevatten in voldoende mate door het natriumfluoride worden weggenomen om de ongunstige invloed van de aanwezige Ca-ionen op het in oplossing gaan van de huminezuren te neutraliseren.
6. Het aantal keren dat moet worden geëxtraheerd (de kolommen 3 en 8 van tabel 1) voordat het extract kleurloos is loopt voor de verschillende gronden uiteen. Dit is bij de kleigronden ook het geval voor de verschillende oplosmiddelen. Dit onderlinge verschil tussen de oplosmiddelen hebben we bij de uiteindelijke keuze niet zwaar laten wegen.

Gezien deze resultaten leek de mengoplossing van loog en fluoride nog het meest geschikt voor het beoogde doel. Aan een laag asgehalte werd namelijk een overwegend belang gehecht. (Uit oriënterende proeven was gebleken dat huminezuren die gebonden zijn aan kleideeltjes hiervan zeer moeilijk los te maken zijn).

In verband met het in de literatuur genoemde bezwaar van zuurstofopname bij extractie met loog werd het optreden hiervan nagegaan bij alle gronden waaruit huminezuren werden geëxtraheerd. Daartoe werd weer 10 g. grond (bij de veengronden 5 g.) langdurig geschud met 50 ml. van de loog-fluorideoplossing in een zuurstofatmosfeer, waarbij een eventuele zuurstofopname op een gasburet kon worden afgelezen. Geen der gronden bleek zuurstof op te nemen. Onder deze omstandigheden lijkt een eventuele disproportionering die, zoals door SCHULZE en FLAIG (1952) werd aangetoond, bij chinoïde verbindingen kan optreden ook niet méér waarschijnlijk dan bijv. bij extractie met een pyrofosfaatoplossing die immers eveneens alkalisch reageert.

Om over het effect van de aanwezigheid van loog op de samenstelling en de eigenschappen van de geëxtraheerde huminezuren nog nader geïnformeerd te raken werden uit één der gronden tevens huminezuren geëxtraheerd met een 0,2 M. natriumfluorideoplossing zonder meer.

Gezien conclusie 5 leek het ons wel verantwoord bij de gronden die geen vrije kalk bevatten de voorbehandeling met zoutzuur weg te laten.

2.2. DE BODEMTYPEN WAARUIT HUMINEZUREN WERDEN GEÏSOLEERD

Van de gronden waaruit huminezuren werden geïsoleerd zijn in tabel 2 enige gegevens vermeld.

Hieraan kan nog het volgende worden toegevoegd:

no. 082 is een gemiddeld monster van de bouwvoor van het proefveld Pr 120 in Borgercompagnie. Dit is een oude veenkoloniale grond. De organische stof is dus voor een groot deel afkomstig van het veen dat destijds bij de vervening werd achtergelaten.

no. 116 is "zwartveen", genomen van een profiel te Erica (Dr.). Het is een mengmonster van het gehele profiel. Dit is een oligotroof veen (hoogveen) ontstaan in een voedselarm milieu. Botanisch bestaat het veen voornamelijk uit matig tot sterk verteerd oud mosveen vermengd

met wollegras, resten van heidetakjes e.d.

Tabel 2. Enkele gegevens over de gronden waaruit huminezuren werden geëxtraheerd

No. 55D	Omschrijving	pH H_2O	% $CaCO_3$	% < 16 μ	1) % C_t	% N_t	C_t/N_t	2) $\frac{\% C_{hz}}{\% C_t}$ x 100	3) idem na 5% HCl
082	veenkoloniale grond (Borgercompagnie)	5,52	0,0	4,1	9,07	0,43	21	-	-
116	zwartveen (Erica)	3,95	0,0	-	52,68	0,94	56	46	-
118	X_2	7,00	0,0	-	42,94	12,34	3,5	55	-
123	bosveen (Zuidholland)	4,20	0,0	19,2	34,18	2,44	14	52	59
114	zandgrond (Groningen)	5,10	0,0	6,9	3,08	0,15	21	21	22
113	zandgrond (Hooghalen)	5,00	0,0	4,1	1,70	0,08	22	24	-
117	"bruine bank" (Zuidlaren)	5,12	0,0	6,2	3,62	0,13	28	28	-
115	zavel (Groningen)	7,79	3,0	20,9	1,04	0,06	19	10	26
089B	zeeklei (Nieuw Beerta)	6,83	0,0	68,2	2,44	0,23	11	7	7
094B	rodoorn (ten Boer)	7,14	0,2	67,7	4,62	0,39	12	20	-
122	rivierklei (Elst,Gld.)	8,01	0,2	63,6	1,30	0,14	9	8	16
121	zwarte aarde (Hildesheim)	8,20	0,7	36,9	1,24	0,13	10	13	38

1) % C_t = percentage koolstof-totaal (exclusief C aanwezig in de vorm van $CaCO_3$)
2) % $C_{h.z.}$/% C_t x 100 = het percentage van C_t dat in de vorm van huminezuren kan worden geëxtraheerd
3) idem, na voorbehandeling van de grond met 5%-ig zoutzuur

no. 118 is geen "grond" maar een kunstmatig product dat elders werd bereid uit zwartveenturf door dit in een autoclaaf te verhitten in aanwezigheid van ammoniak en zuurstof. Bij de oxidatie van het veen wordt vrij veel ammoniak gefixeerd. De uit dit produkt geïsoleerde huminezuren hebben dan ook een relatief zeer hoog stikstof-gehalte. Ze vormen daarom een interessant vergelijkingsobject vooral met de huminezuren uit zwartveen.

no. 123 is een veenmonster genomen van de laag 30-50 cm van een laagveenprofiel in het Zuidhollandse weidegebied. Dit is een onder eutrofe omstandigheden gevormd matig verteerd, slibrijk bosveen.

no. 114 is afkomstig van de bouwvoor van het bemestingsproefveld Pr 837 op diluviale zandgrond te Groningen.

no. 113 is een monster genomen van de bovenlaag van 15 cm van een lage diluviale zandgrond onder heide bij Hooghalen.

no. 117 is een monster genomen van de "bruine bank" (B2h-laag) van een hoge heidegrond bij Zuidlaren. Deze bruine inspoelingslaag was hier zeer sterk ontwikkeld.

no. 115 is afkomstig van de bouwvoor van het bemestingsproefveld Pr 1557 op zavel (lichte, vrij zandige, jonge zeeklei) te Groningen.

no. 089B is een mengmonster genomen van de bouwvoor van enkele veldjes van het bekalkingsproefveld Pr 79 op zware ontkalkte zeeklei te Nieuw-Beerta.
no. 094B is een dergelijk mengmonster van het bekalkingsproefveld Pr 842 op rodoorngrond te Ten Boer. Het relatief hoge gehalte aan organische stof bij deze grond wordt toegeschreven aan het feit dat het vroeger ten zuiden hiervan liggende hoogveengebied afwaterde over deze mariene kleigrond. Daarbij kwamen organische stoffen mee uit het veen die in deze kleigrond achterbleven.
no. 122 is een monster zware rivierklei uit Elst (Gld.). De in vergelijking met de grijze zeeklei meer bruine kleur van rivierklei wordt voor een deel wel toegeschreven aan een verschil in aard van de organische stof bij rivier- en zeeklei.
no. 121 tenslotte is afkomstig van een profiel bij Hildesheim (Duitsland). Dit is een, op enige diepte onder het oppervlak gelegen, zwarte aarde ("chernozem") die daar is ontstaan in een tijdperk dat er een meer continentaal klimaat heerste. Huminezuren uit deze grond werden in het onderzoek betrokken om een aanknopingspunt te krijgen met de vele, vooral Duitse en Russische publikaties over huminezuren uit zwarte aarde.

Het staat dus wel vast dat de huminezuren uit de meeste van de bovenstaande gronden zijn ontstaan bij de vertering van organisch materiaal van verschillende origine onder meestal sterk verschillende omstandigheden.

Als verdere toelichting op tabel 2 nog het volgende:
C_t en $C_{huminezuren}$ werden bepaald volgens de elementanalyse van ter Meulen en Heslinga, modificatie Spithost.

N_t werd bepaald volgens Kjeldahl.
De huminezuren werden geëxtraheerd met de loog-fluoride-oplossing als beschreven in 2.1.2.
Alle in procenten opgegeven waarden zijn berekend op de oorspronkelijke, stoofdroge grond.

2.3. GEVOLGDE WERKWIJZE BIJ EXTRACTIE EN ZUIVERING

Ca. 5 kg luchtdroge zand- of kleigrond of ca. 5 kg veldvochtige veengrond werd gebracht in een 15 l. porceleinen kogelmolen (zonder kogels). Hieraan werden indien de grond geen vrije kalk bevatte

7,5 l. van de mengoplossing loog-fluoride toegevoegd. Daarna werd de kogelmolen gesloten en enige uren in rotatie gezet. De suspensie bleef dan een nacht over staan om het zand en de klei zo goed mogelijk te laten bezinken. De bovenstaande bruine oplossing werd dan afgeheveld.

Bij kleigronden bezonk de suspensie in sommige gevallen ook na lang staan nog vrijwel niet. In dat geval werd het extract verkregen door de massa te centrifugeren met behulp van een grote bekercentrifuge.

Aan het residu werden dan opnieuw ca. 5 l. van het oplosmiddel toegevoegd en de extractie herhaald. Bij de meeste gronden nam de concentratie aan opgeloste huminezuren na 2 x extraheren al duidelijk af en werd de extractie daarom niet verder voortgezet. Bij de veengronden loonde het de moeite om tenminste 3 x te extraheren.

Bij de zavel en de zwarte aarde werd de grond in de kogelmolen voorbehandeld met 5 %-ig zoutzuur tot alle kalk was omgezet. Door te centrifugeren en met water uit te wassen werd het ontstane $CaCl_2$ en het zoutzuur grotendeels verwijderd. De grond werd weer teruggebracht in de kogelmolen. Daarna werden eerst ca. 7,5 l. extractievloeistof toegevoegd en vervolgens een meer geconcentreerde loogoplossing tot de suspensie neutraal reageerde. Het eerste extract leverde dan meestal nog weinig of niets op maar bij de volgende extractie was de oplossing donkerbruin gekleurd door de huminezuren.

Het ruwe extract waaruit na enige tijd staan dikwijls nog meegepeptiseerde kleideeltjes uitvlokten werd daarna, zonodig meermalen, geleid door een Sharpless supercentrifuge. Hierdoor werden de kleideeltjes reeds grotendeels verwijderd. Het zo gezuiverde extract werd dan onder goed roeren aangezuurd tot pH 1 met behulp van geconcentreerd zoutzuur. De ruwe huminezuren vlokten daarbij uit en werden afgecentrifugeerd. Na uitwassen van het neerslag met 0,1 N. zoutzuur in de centrifugebuis werd een klein deel gedroogd en werd daarin het gloeiverlies bepaald. Dit kan zeer sterk variëren, afhankelijk van het type grond waarvan werd uitgegaan. Bij kleigronden b.v. kan het asgehalte nog wel 50 % bedragen.

Na vele oriënterende proeven waarbij werd nagegaan hoe het asgehalte het meest effectief kon worden verlaagd werd tenslotte in het algemeen de volgende procedure toegepast:
De afgecentrifugeerde huminezuren werden weer opgelost, ditmaal in

een 0,1 M. natriumpyrofosfaatoplossing, waarbij nog zoveel natronloog werd toegevoegd dat de pH van de oplossing ongeveer 7 werd. Deze oplossing werd dan nogmaals door de Sharpless centrifuge geleid. Daarna werd weer aangezuurd met zoutzuur tot pH 1 en werd het neerslag in de centrifugebuizen enige malen gewassen met 0,1 N. zoutzuur en 1 à 2 maal met aqua dest. (vaker gaat niet omdat de huminezuren dan weer in oplossing gaan).

Aanvankelijk werden de huminezuren daarna gedialyseerd door ze over te brengen in dialyseslang die in gedestilleerd water werd gehangen totdat hierin na zeer vele malen verversen vrijwel geen chloorionen meer waren aan te tonen. Dit is een zeer langdurig proces en dit bleek ook nagenoeg geen effect meer te hebben op het asgehalte.

Veel sneller en efficiënter bleek de volgende werkwijze:
De afgecentrifugeerde huminezuren werden gesuspendeerd in zoveel gedestilleerd water dat de concentratie niet hoger was dan 25 gram per liter. Deze suspensie werd eerst geperkoleerd over een kolom anionenuitwisselaar Amberlite IRA 400 of ook wel 401, in OH^--vorm. Hierdoor werden de chloor-ionen en andere kleine anionen verwijderd waarbij de oplossing alkalisch werd en de huminezuren als humaten in oplossing gingen. (De suspensie was namelijk nog niet geheel vrij van zouten). De humaten werden, dank zij hun molecuulgrootte, slechts in geringe mate vastgehouden.

Daarna werd de verkregen humaatoplossing geperkoleerd over een kolom kationenuitwisselaar Amberlite IR 120 in H^+-vorm. Deze verwijderde op zijn beurt de metaalionen. De daarbij ontstane vrije huminezuren die de oplossing een pH van omstreeks 3 geven, vlokken ook na lang staan niet uit. (De vermelding in vele publikaties dat huminezuren onoplosbaar zijn in water is dus zo zonder meer, niet juist). De huminezuren worden dan weer uitgevlokt door aanzuren met zoutzuur tot pH 1 en afgecentrifugeerd.

Deze verschillende bewerkingen werden, al naar gelang het effect op het asgehalte, nog weer herhaald.

De zo gezuiverde huminezuren werden (na aanzuren en afcentrifugeren) uitgevroren bij een temperatuur van -5 à -10°C. Hierbij ontmengt de eerst homogene pasta. Een groot deel van het water bevindt zich in de vorm van ijskristallen tussen een zwarte korrelige substantie. Door de bevroren massa op een Buchnertrechter te laten ontdooien kan meteen het vrije water worden afgezogen en het korrelige residu worden uitgewassen met ijswater tot chloridevrij. (Bij

gebruik van water met een temperatuur hoger dan $0^{o}C$ lossen de huminezuren weer op en gaan door het filter).

De huminezuren die ook dan nog zeer veel water bevatten, werden daarna drooggevroren of bij kamertemperatuur gedroogd in vacuo boven P_2O_5.

Gewoonlijk werden de eerste, tweede en eventueel derde extracten bij elkaar gevoegd en als één huminezuuroplossing opgewerkt. Bij het bosveen en bij de zwarte aarde echter werden de extracten afzonderlijk opgewerkt om na te gaan of de samenstelling zich bij de achtereenvolgende extracties ook nog wijzigde.

Bij de veenkoloniale grond werd naast de extractie met de loog-fluoride-oplossing ook nog een extractie uitgevoerd met een 0,2 M. NaF-oplossing zonder loog. De huminezuren werden hier gezuiverd door het extract aan te zuren met zoutzuur tot pH 1, de huminezuren af te centrifugeren en enige malen in de centrifugebuizen uit te wassen met 0,1 N. zoutzuur, weer op te lossen in 0,2 N. NaF-oplossing enz. totdat het asgehalte niet meer afnam. Tenslotte werden ze nog in de centrifugebuizen gewassen met gedestilleerd water tot beginnende peptisatie, gedialyseerd, uitgevlokt door aanzuren, afgecentrifugeerd, uitgevroren enz.

2.4. OVER DE SCHEIDING IN Z.G. "BRAUN"- EN "GRAU"-HUMINEZUREN

In de inleiding werd reeds genoemd dat Springer (en in navolging van hem verschillende andere onderzoekers) twee typen van huminezuren onderscheiden nl. "Braun"- en "Grau"-huminezuren. De scheiding van huminezuren verkregen door extractie van grond met 0,5 %-ige natronloog (na voorbehandeling met zoutzuur) in deze twee typen werd door Springer bewerkstelligd door "uitzouten" van de "Grau"-huminezuren.

Wij hebben eveneens getracht deze scheiding uit te voeren bij alle huminezuren die wij hebben geëxtraheerd en gezuiverd. Daarbij werd het voorschrift gevolgd van FLAIG, SCHEFFER en KLAMROTH (1955): Een kleine hoeveelheid van de huminezuren werd opgelost in 0,1 N. natronloog. Aan deze oplossing werd daarna zoveel natriumchloride toegevoegd dat de oplossing hiervan 2 Mol, per liter bevatte. Bij deze electrolytconcentratie zouden de "Grau"-huminezuren moeten uitvlokken.

Slechts bij twee van de huminezuren ontstond een neerslag dat kon worden afgecentrifugeerd, namelijk bij die geïsoleerd uit rodoorn en die uit zwarte aarde. Bij alle andere huminezuren trad onder deze omstandigheden geen scheiding op.

Zoals in paragraaf 2.1.2. in de 3e conclusie is opgemerkt is de opbrengst aan huminezuren aanzienlijk lager bij extractie met de loog-fluoride-oplossing dan met loog alleen. Dit werd aan het verschil in electrolytconcentratie toegeschreven. Die huminezuren die het meest gevoelig zijn voor uitvlokking door zouten, gaan bij extractie met het loog-fluoridemengsel niet in oplossing. De totale electrolytconcentratie is dan echter nog maar 0,3 Mol. per liter terwijl deze voor de scheiding in "Braun"- en "Grau"-huminezuren 2 Mol. per liter moet zijn. Het lijkt dan ook weinig aannemelijk dat indien er "Grau"-huminezuren aanwezig waren geweest deze kwantitatief onopgelost zouden zijn gebleven bij extractie met de loog-fluoride-oplossing.

Waar er in de literatuur asgehalten worden vermeld van "Braun"- en "Grau"-huminezuren is het steeds zo dat de electrolytgevoeliger "Grau"-huminezuren van deze beide het hoogste asgehalte hebben. Nu hebben de door ons uit zand- en veengronden geïsoleerde huminezuren vergeleken met de in de literatuur opgegeven waarden bijna alle een laag of zelfs zeer laag asgehalte. Dit suggereert dat de scheiding in "Grau" en "Braun"-huminezuren wellicht slechts een scheiding is in huminezuren die toevallig nog aan méér en aan minder anorganische stoffen zijn gebonden.

Een duidelijke aanwijzing dat verontreinigingen hier inderdaad een belangrijke rol spelen is het feit dat in sommige gevallen bij de ruwe extracten wel een neerslag werd verkregen in een 2 N NaCl-oplossing. Bij het apart verder opwerken door herhaald uitwassen met zuur, weer oplossen in loog en weer neerslaan met NaCl precipiteerden steeds minder huminezuren, totdat tenslotte een neerslag overbleef dat in het geheel niet meer in loog oploste en bij analyse grotendeels uit anorganische stoffen bleek te bestaan.

Hiermee is echter toch niet alles verklaard. Bij de huminezuren uit rodoorn en uit het eerste extract van de zwarte aarde waar ondanks de zuivering het asgehalte toch nog zéér hoog was (nl. 42 resp. 51 %), werd wel een scheiding verkregen in 2 N NaCl. Daarbij bleek de "as" grotendeels in de "Grau"-fractie te zijn geconcentreerd. (Zie tabel 3. Dergelijke extreem hoge asgehalten zijn wij in de literatuur niet tegengekomen). Anderzijds gelukte deze scheiding niet bij de huminezuren

uit zware zeeklei, alhoewel ook daar het asgehalte zeer hoog was (41 %), terwijl er wel een scheiding werd verkregen bij het tweede extract van de zwarte aarde, ofschoon het asgehalte daar in het geheel niet hoog was (2,7 %). Misschien bepaalt de aard van de anorganische bestanddelen mede of huminezuren in 2 N NaCl uitvlokken (zie FLAIG, SCHEFFER en KLAMROTH, l.c.).

Tenslotte kan hier nog worden vermeld dat de gewichtsverhouding tussen de hoeveelheden "Braun"- en "Grau"-huminezuren in de beide opeenvolgende extracten bij de zwarte aarde niet gelijk was. Deze verhouding bleek namelijk in het gezuiverde eerste extract ongeveer 1 op 7 te zijn en in het tweede extract ongeveer 5 op 3. Sommige onderzoekers (zie SCHEFFER-ULRICH l.c.) menen dat de verhouding tussen de hoeveelheid "Braun"- en "Grau"-huminezuren karakteristiek is voor het "humustype" van een bepaalde grond. Daarbij wordt dikwijls slechts éénmaal geëxtraheerd. Uit het bovenstaande blijkt echter dat, behalve het extractiemiddel, ook het aantal keren extraheren en de zuivering van de verkregen huminezuren van invloed zijn op deze verhouding. Tevens zal de verhouding grond-extractiemiddel hierbij wel een rol spelen.

2.5. DE PROCENTUELE SAMENSTELLING VAN DE ELEMENTEN IN DE VERKREGEN HUMINEZUREN

De procentuele samenstelling van de elementen in de zo goed mogelijk gezuiverde huminezuren wordt gegeven in tabel 3.

Tabel 3. Procentuele samenstelling van de elementen in de gezuiverde huminezuren

No. h.z.	geïsoleerd uit	berekend op as-vrij % C	% H	% N	% "rest"	% as	C/N h.z.	C/N grond
082 I	veenkol.grond (NaOH-NaF)	57,2	5,1	2,9	34,8	1,9	19	21
082 II	" " (NaF)	56,3	4,1	2,4	37,2	0,6	23	
116	zwartveen	59,4	5,5	1,8	33,3	0,6	33	56
118	X_2	54,4	3,9	11,3	30,4	0,6	4,8	3,5
123a	bosveen	52,9	4,4	2,8	39,9	4,3	19	14
b		53,0	4,4	2,6	40,0	1,2	20	
c		53,1	4,6	2,9	39,4	1,5	18	
114	zandgrond (bouwland)	58,7	5,0	3,5	32,8	1,1	17	21
113	zandgrond (heide)	56,8	4,6	2,8	35,8	1,2	20	22
117	"bruine bank"	59,1	5,0	2,7	33,2	4,9	22	28
115	zavel	54,8	5,3	4,3	35,6	7,8	13	19
089B	zeeklei	57,1	6,1	4,1	32,7	41,0	14	11
094B (Br)	rodoorn	57,8	5,1	3,9	33,2	3,8	15	12
094B (Gr)		61,8	6,2	4,4	27,6	33,8	14	
122	rivierklei	57,2	5,8	4,7	32,3	4,1	12	9
121 (Br1)	zwarte aarde	56,5	5,6	3,6	34,3	2,6	16	10
121 (Gr1)		48,1	6,8	3,4	41,7	64,9	14	
121 (Br2)		57,2	5,0	3,9	33,9	1,7	15	
121 (Gr2)		62,4	2,8	4,0	30,8	4,5	16	

De opgegeven percentages C, H en as werden bepaald door de analytische afdeling van het Scheikundig Laboratorium der Rijks-Universiteit te Groningen. De N-bepalingen werden uitgevoerd in het eigen laboratorium volgens Kjeldahl. Een aantal N-bepalingen werden ter contrôle van de methode Kjeldahl eveneens uitgevoerd op het genoemde universiteitslaboratorium volgens Dumas. De overeenstemming tussen de waarden verkregen volgens Kjeldahl en die volgens Dumas was op één uitzondering na uitstekend. Het percentage "rest" werd berekend als 100 min de som van de procenten C, H, N en as. Naast geringe hoeveelheden van enkele andere elementen is dit zuurstof.

Het is de vraag of de gevonden verschillen in C, H, N en "rest" tussen de huminezuren overeenkomen met karakteristieke verschillen tussen de diverse bodemtypen waaruit deze huminezuren werden geïsoleerd. Sommige onderzoekers menen dat er inderdaad een dergelijke samenhang bestaat tussen bodemtype en samenstelling van de huminezuren (zie KONONOVA, 1958, blz. 36) maar het aantal bepalingen is gewoonlijk veel te klein om verschillen betrouwbaar te kunnen vaststellen. Wel bleek hier bij bewerking van de gevonden waarden voor het C/N-quotient dat er een weinig gespreid verband bestaat tussen C/N van de grond en C/N van de huminezuren uit die grond nl. $C/N_{h.z.} = 4,2 \sqrt{C/N_{grond}}$.

Afgezien van het asgehalte dat bij de "Grau"-fracties steeds hoger is, valt er niet een bepaalde lijn te ontdekken in de verschillen in samenstelling tussen de "Braun"- en de "Grau"-huminezuren. De huminezuren verkregen met de drie achtereenvolgende extracties van dezelfde hoeveelheid bosveen hebben nagenoeg dezelfde samenstelling.

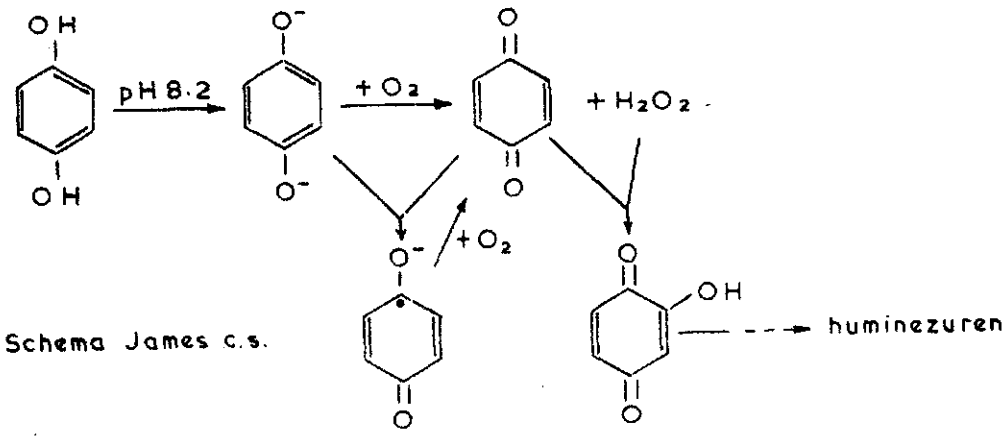
3. SYNTHETISCHE HUMINEZUREN UIT POLY-HYDROXIBENZENEN

3.1. LITERATUUROVERZICHT

De producten verkregen door oxidatie van alkalische oplossingen van hydrochinon, pyrocatechol en pyrogallol b.v. met zuurstof worden beschouwd als goede modelstoffen van huminezuren uit de grond en daarom vaak aangeduid als synthetische huminezuren. Over het reactiemechanisme en de hierbij ontstane producten is nog slechts weinig bekend. Gezien het doel van dit onderzoek kan hier volstaan worden met een samenvatting van de voornaamste resultaten van het tot dusver verrichte onderzoek (zie ook SCHEFFER-ULRICH (1960), pg. 101-120).

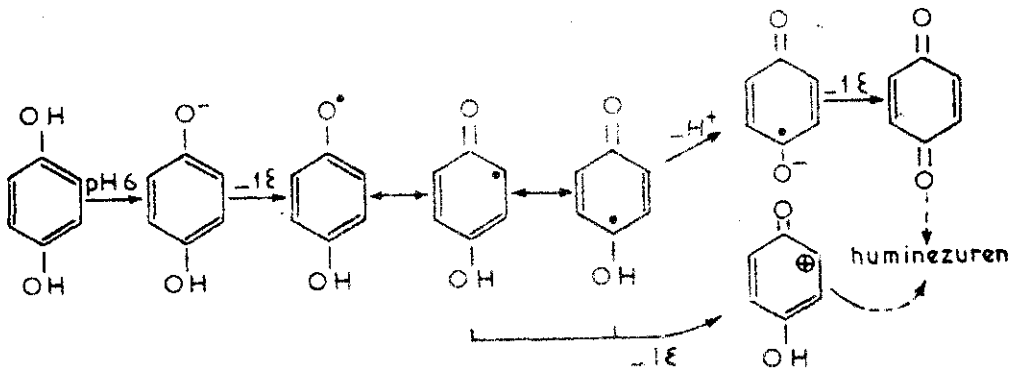
3.1.1. Oxidatie in afwezigheid van stikstofverbindingen

De kinetiek van de oxidatie van hydrochinon in waterige oplossing met zuurstof bij verschillende pH werd o.a. bestudeerd door LA MER en RIDEAL (1924), DINGEMANS (1928), JAMES, SNELL en WEISSBERGER (1938), SCHEFFER et al (1958 a en b), ZIECHMANN (1960, 1963), FLAIG c.s. (o.a. 1960, 1963), DIEBLER c.s. (1961) en EIGEN en MATTHIES (1961). Hierbij bleek (Dingemans) dat de reactiesnelheid in de beginfase van de oxidatie in neutraal en zwak alkalisch milieu evenredig is met de concentratie van het hydrochinon, met het kwadraat van de OH^--ionenconcentratie en met de partiële zuurstofdruk in het gas (dus met de concentratie van de zuurstof in de oplossing) mits er voldoende contact is tussen oplossing en zuurstof. Het reactieschema voor de eerste stadia van de oxidatie bij pH 7-9 dat reeds in 1938 werd geponeerd door James, Snell en Weissberger kon door Flaig en medewerkers vrijwel geheel worden bevestigd.



Schema James c.s.

Scheffer en Ziechmann menen dat de hoofdreactie niet via chinon verloopt en poneren een ander (radikaal-) mechanisme voor het beginstadium. Hierbijmoet erechter met nadruk op worden



Schema Scheffer c.s. (1958 a)

gewezen dat zij de eerste fase van de oxidatie hebben uitgevoerd bij pH 6 (volgende fasen bij pH 7,2 en hoger). Uit verschillende onderzoekingen o.a. van Dingermans (l.c.) blijkt nl. dat de pH in de eerste fase van doorslaggevende invloed is niet alleen op de reactiesnelheid maar ook op het mechanisme van de oxidatie.

De vorming van het p. benzo-semichinon-radikaal bij de oxidatie van hydrochinon aan de lucht in alkalische oplossingen werd intussen door verschillende onderzoekers (o.a. BLOIS, 1955) door meting van de electronen-spin-resonantie bevestigd. (Een radikaalmechanisme bij de oxidatie van polyhydroxibenzenen is door STEIN (1957) aangetoond voor floroglucinol).

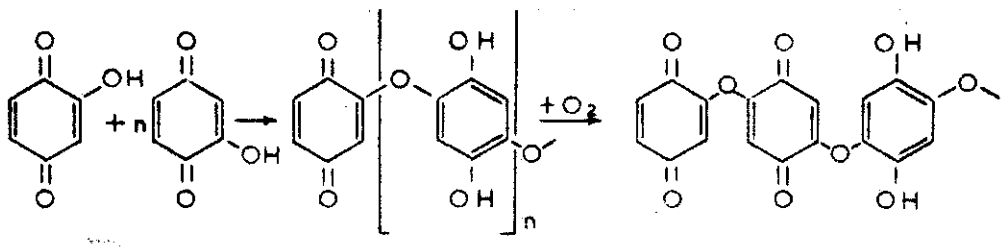
Verder moet nog worden vermeld dat verschillende stoffen o.a. kopersulfaat (DINGEMANS, l.c.), ijzerverbindingen en kiezelzuur (ZIECHMANN, 1959; SCHEFFER c.s., 1959, 1960) en enzymen (WIELAND en FISCHER, 1926; FLAIG et al o.a. 1963) de oxidatie kunnen beïnvloeden. In aanwezigheid van deze stoffen kan de oxidatie ook bij een pH lager dan 7 plaatsvinden. Hierbij treedt niet alleen katalyse op maar in sommige gevallen wordt ook het reactiemechanisme beïnvloed. Dit bleek o.a. uit een polarografische analyse van de oxidatie van pyrocatechol en pyrogallol in aanwezigheid van tyrosinase en van de kleimineralen bentoniet en kaolien (VAN DIJK en TER HAAR, 1961).

De meeste onderzoekers zijn het er over eens dat hydoxi-p-

chinon eén schakel is in de keten van reacties die leidt van hydrochinon tot huminezuren. Hydroxichinon is in alkalisch milieu bijzonder gevoelig voor oxidatie.

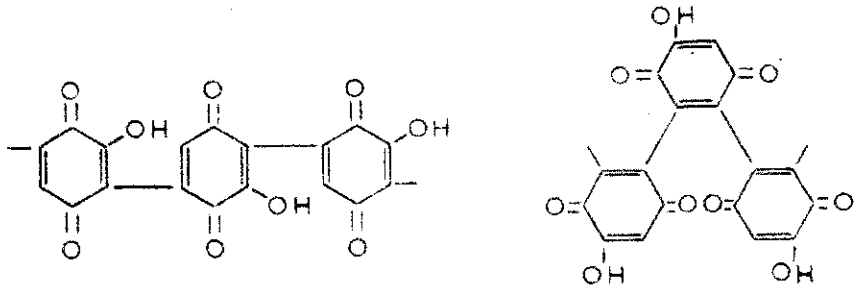
Over het verloop van deze oxidatie tast men nog goeddeels in het duister. ELLER (1921, 1923) verkreeg uit hydrochinon, pyrocatechol en chinon door oxidatie met kaliumperoxodisulfaat huminezuren met de bruto formule $(C_6H_4O_3)_n$. Op grond hiervan veronderstelt hij dat het eerst ontstane hydroxichinon is gepolymeriseerd en wel zonder dat daarbij de chinonring open gaat. Bij aanzuren van het reactiemengsel na oxidatie trad nl. niet een in dat geval te verwachten CO_2-ontwikkeling op. Deze vindt gewoonlijk wel plaats na oxidatie van polyhydroxibenzenen met zuurstof in alkalische oplossing en aanzuren van de oplossing.

FLAIG (1950) veronderstelde aanvankelijk dat het koppelingsmechanisme van hydroxichinon is een steeds verder gaande 1-4-additie, waarna het ontstane polymeer nog verder wordt geoxideerd tot een verbinding met een partieel chinoide structuur. Alhoewel het



Schema Flaig (1950)

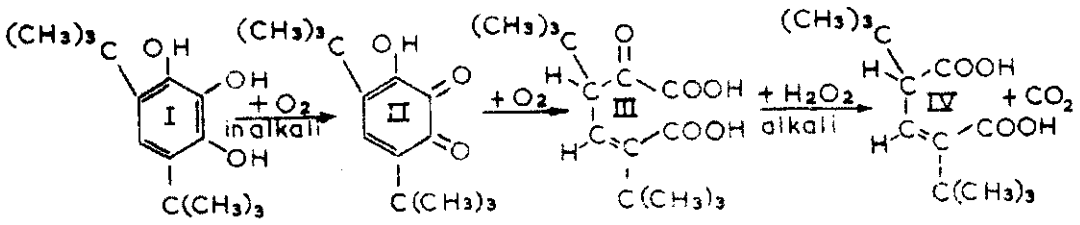
voorkomen van C-O-C-bindingen in deze "huminezuren" zeker niet uitgesloten is (zie SCHEFFER c.s. (1958b)), is dit reactieschema door FLAIG echter voornamelijk op grond van onderzoek van ERDTMANN (1934, 1954) verlaten. Erdtmann onderzocht de oxidatieve koppeling van fenolen en chinonen tot difenylderivaten en acht op grond daarvan een C-C-koppeling het meest waarschijnlijk. Hierbij zou dan een stof ontstaan met de structuur A of B of een combinatie, waarmee dan tevens de meestal aangenomen crosslinking zou zijn verklaard.

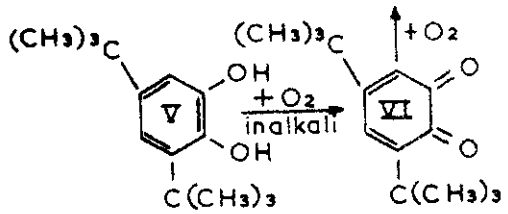


A Hypothese Erdtmann B

(Het oorspronkelijke schema van Flaig laat trouwens eveneens de mogelijkheid van crosslinking toe doordat ook reactie zou kunnen optreden tussen een van de twee para-standige OH-groepen ontstaan na een 1,4-additie en een molecule hydroxichinon). Het optreden van dimeren als tussenproducten bij de huminezuurvorming uit hydrochinon, waarbij een directe C-C-ringkoppeling heeft plaatsgevonden, is ook door FLAIG c.s. (1963) waarschijnlijk gemaakt.

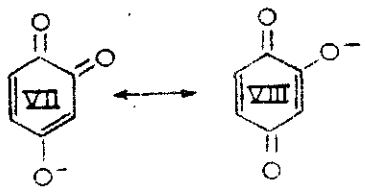
Echter, ook de hypothetische formules A of B van Erdtmann kunnen niet geheel juist zijn, aangezien er blijkens de CO_2-ontwikkeling bij aanzuren ook, eventueel plaatselijk in het ontstane "huminezuur", afbraak van de chinonring is opgetreden. Nader onderzoek hierover is o.a. verricht door FLAIG en SCHULTZE (1952): 4,6-di-tert. butyl-pyrogallol (I) nam in alkalische oplossing 2 O-atomen op waarbij via het overeenkomstige chinon (II) in een opbrengst van 70 % 2,4-di-tert. butyl -4-oxalocrotonzuur (III) werd verkregen dat met H_2O_2 verder kan worden geoxideerd tot het overeenkomstige glutaconzuur (IV) waarbij CO_2 wordt afgesplitst. (Uit dit pyrogallolderivaat I worden als gevolg van de aanwezigheid van de alkylsubstituenten geen huminezuren gevormd). Na een dergelijke ringopening, die volgens SCHEFFER c.s. (1958b) reeds tijdens de eerste fasen van de huminezuurvorming optreedt, kan ook koppeling ("crosslinking") optreden doordat de ontstane reactieve onverzadigde verbindingen inter- of intramoleculair verder reageren.





Flaig c.s. (1952, 1955)

Ook over het reactiemechanisme bij de oxidatie van pyrocatechol en pyrogallol in alkalische oplossingen met zuurstof is nog maar weinig bekend. De oxidatie verloopt hier kennelijk niet via 4-hydroxi-o-chinon. Immers het in alkalisch milieu dan aanwezige anion (VII) is mesomeer met dat van 2-hydroxi-p-chinon (VIII) dat ontstaat bij oxidatie van hydrochinon. Uit pyrocatechol en hydrochinon zou dan het-

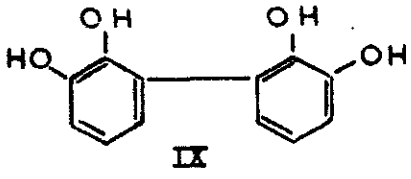


zelfde huminezuur moeten worden gevormd. In werkelijkheid zijn er echter volgens FLAIG (1950) kleine, maar aantoonbare verschillen tussen beide huminezuren. Bij het genoemde polarografische onderzoek (VAN DIJK en TER HAAR, 1961) bleek ook duidelijk dat de oxidatie van beide dihydroxibenzenen bij dezelfde pH volgens verschillende tussentrappen verloopt. Bovendien is, zoals uit het verslag van het experimenteel gedeelte nog zal blijken, de opbrengst aan huminezuren uit hydrochinon en pyrocatechol bij dezelfde reactieomstandigheden ook zeer verschillend.

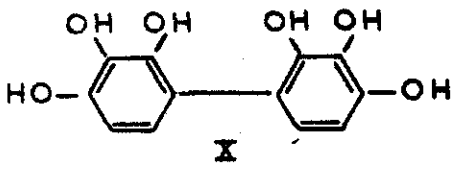
Bij enzymatische oxidatie van pyrocatechol ontstaan volgens FORSYTH en QUESNEL (1957) via o-benzochinon enkele isomere tetra-hydroxi-difenylverbindingen waarvan IX er één is.

Volgens FLAIG, PLOETZ en BIERGANS (1955) wordt bij de oxidatie van 3,5-di-tert. butyl-pyrocatechol (V) via het o-chinon (VI) intermediair hetzelfde 3-hydroxi-o-chinon (II) gevormd, dat ook een tussentrap is bij de oxidatie van het pyrogallolderivaat.I. Bij afwezigheid van deze alkylgroepen blijkt echter althans de hoofdreactie niet via een identieke tussentrap te verlopen. Zoals nog zal blijken zijn nl. ook de eindproducten bij de oxidatie van pyrocatechol en pyrogallol zeer verschillend.

Over de oxidatie van pyrogallol in alkalische oplossing met zuurstof het volgende: ERDTMANN (1934) kon bij oxidatie van pyrogallol in barietwater vicinaal dipyrogallol (X) uit het reactiemengsel isoleren. Wij verkregen uit pyrogallol in alkalische oplossing door



IX



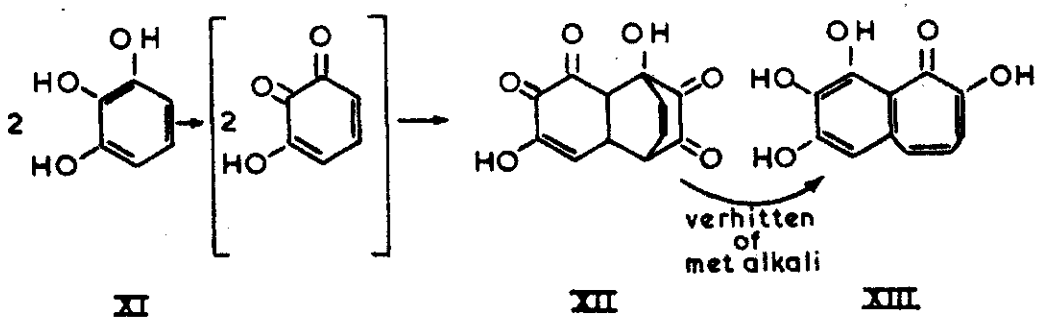
X

oxidatie met zuurstof een product dat zich door zijn lichtbruine kleur en door de consistentie van het afgecentrifugeerde neerslag reeds dadelijk sterk onderscheidde van huminezuren uit dihydroxibenzenen. Alle huminezuren ontleden (verkolen) bij droge verhitting. Bij het hier uit pyrogallol verkregen product vindt echter tussen 185 en 200°C (afhankelijk van de snelheid waarmee de temperatuur wordt opgevoerd) een reactie plaats waarbij water wordt afgesplitst en door sublimatie gele tot oranjerode naaldvormige kristallen worden verkregen. Een min of meer verkoold residu blijft achter. Deze ontleding kan fraai worden waargenomen in het smeltpuntsmicroscoop tussen gekruiste nicols. De stof vertoont nl. zelf geen dubbele breking terwijl de naaldjes sterk dubbelbrekend zijn.

Bij tamelijk snelle verdere verhitting beginnen bij ongeveer 275° de naaldjes te smelten. Gedeeltelijk treedt hierbij ook ontleding op. Met alkali treedt zowel bij het product zelf als bij de hieruit door verhitting verkregen stof eerst een blauwe kleur op die via groen over-

gaat in donkergeel. Dit wijst op purpurogalline. Volgens HEILBRONN en BUNBURRY Vol IV (1953) 269-270 is deze kleurreactie nl. karakteristiek voor purpurogalline dat (eveneens bij snelle verhitting) een smeltpunt heeft van 274°C en ontleedt bij langzame verhitting.

SALFELD (1960) vermeldt dat door oxidatie van pyrogallol (XI) met isoamylnitriet in alcohol-ijsazijn volgens Perkins en Steven, het dimeer van 3-hydroxi-o-benzochinon (XII) ontstaat. Salfeld vermeldt verder dat dit dimeer tussen 185 en 198°C ontleedt onder donkerkleuring en gasontwikkeling. Daarbij sublimeert bij ongeveer 190° purpurogalline (XIII) dat ook uit het dimeer ontstaat bij behandeling hiervan met alkali. Bij gesubstitueerde dimere 3-hydroxi-o-chinonen,



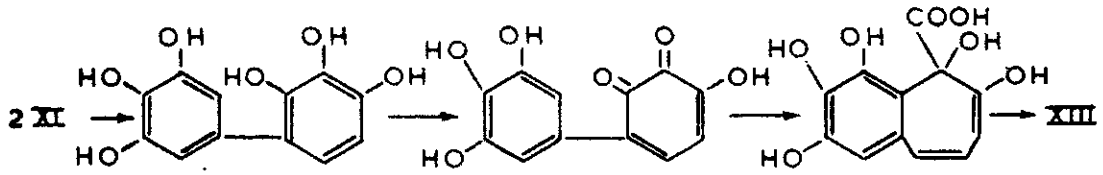
Salfeld

zoals in de grond o.a. in de vorm van afbraakproducten van lignine mogelijk voorkomen, kan een andere ringsplitsing optreden (SALFELD en BAUME, 1960).

Het door ons uit pyrogallol verkregen oxidatieproduct liet zich niet, zoals Salfeld vermeldt voor het dimeer XII, uit dioxaan omkristalliseren. De procentuele samenstelling komt er echter vrij goed mee overeen nl. 59,3 % C, 3,7 % H en 37,0 % O tegenover 58,1 % C, 3,2 % H en 38,7 % O voor het dimeer XII. De identiteit van dit product werd (nog) niet nader onderzocht. Aangezien het de karakteristieke eigenschappen van een huminezuur mist is het verder niet in dit onderzoek betrokken.

Tenslotte kan nog worden vermeld dat ZIECHMANN (1960b) uit een waterige oplossing van pyrogallol die tevens vast kiezelzuur bevatte, na enige tijd staan eerst een verbinding isoleerde met hetzelfde smeltpunt als dipyrogallol en na langer staan een verbinding die hij identificeerde als purpurogalline. Ziechmann neemt op grond daarvan

het volgende reactieschema aan:



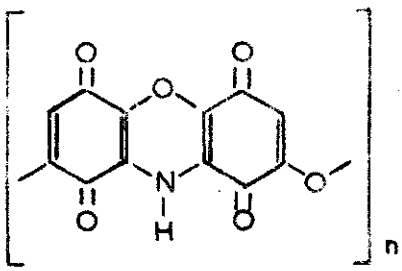
Ziechmann (1960 b)

3.1.2. Oxidatie in aanwezigheid van ammoniak of aminoverbindingen

Zoals opgemerkt bevatten natuurlijke huminezuren stikstofatomen die niet met zuur of loog als NH_3 zijn af te splitsen en zeer waarschijnlijk in heterocyclische kernen zijn gebonden. Ook bij synthetische huminezuren kan men stikstof in het molecuul ingebouwd krijgen.

De eerste die hierover onderzoek heeft verricht was ELLER (1925). Deze bereidde N-houdende huminezuren door oxidatie van hydrochinon in ammoniakale oplossing maar ook door oxidatie van aminofenolen in alkalisch milieu. Hierbij kwam een deel van de stikstof uit de aminofenolen vrij als NH_3, maar een deel werd stevig gebonden in het ontstane huminezuur. Bepaalde conclusies over de structuur van de ontstane verbindingen konden niet worden getrokkken.

Door FLAIG (1950) werd het onderzoek van Eller voortgezet. Flaig verkreeg uit hydrochinon bij pH 7-8 in zwak ammoniakaal milieu producten met een totaal N-gehalte van 3,5-3,8 %. Bij nader onderzoek van een huminezuur met 3,6 % N bleek hieruit door verhitten met loog 1 % in de vorm van NH_3 te worden afgesplitst. Flaig neemt aan dat de overige 2,6 % N heterocyclisch is gebonden. Bij deze oxidatie werden iets meer dan 3 at. zuurstof per mol. hydrochinon verbruikt. Bij een pH van ongeveer 10 werden 4 at. zuurstof per mol. hydrochinon verbruikt en was het totaal N-gehalte in het ontstane product 12,29 % waarvan 5,65 % "heterocyclisch"gebonden. Voor dit huminezuur stelde Flaig de formule XIV voor met een berekend N-gehalte van 5,45 % en waarin het verbruik van 4 at. zuurstof per mol. hydrochinon is verantwoord. Dit is te beschouwen als een fenoxazinederivaat. Door

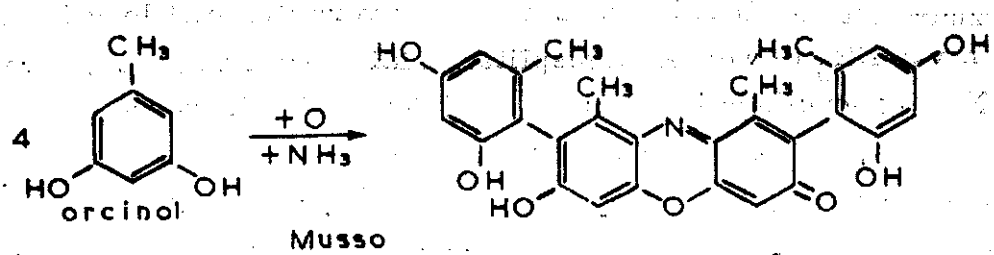


Hypothese
Flaig (1950)

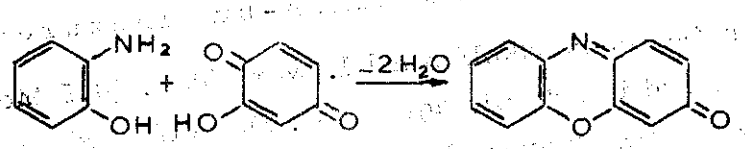
XIV

Flaig werden verschillende fenoxazinederivaten zowel met zuur als met alkali behandeld. Hierbij bleek geen NH_3 te worden afgesplitst. Flaig vermeldt niet welke fenoxazinederivaten hij heeft onderzocht. Het lijkt nl. enigszins twijfelachtig, dat de stikstof in een verbinding met een formule als door Flaig voorgesteld zo stevig gebonden is, dat het door zuur of loog niet kan worden afgesplitst. De C-N-binding wordt immers aanzienlijk verzwakt door de aanwezigheid van de carbonylfuncties (de configuratie is die van vinyloge zuuramiden). Van N-methyl-aminochinonen is bekend, dat de $NHCH_3$-groep vrij gemakkelijk bij behandeling met alkali wordt vervangen door een OH-groep. Dat verbindingen met fenoxazineringsystemen op deze wijze kunnen ontstaan is overigens niet uitgesloten.

Volgens MUSSO c.s. (1957) ontstaat dit ringsysteem ook bij oxidatie van orcinol in ammoniakale oplossing.

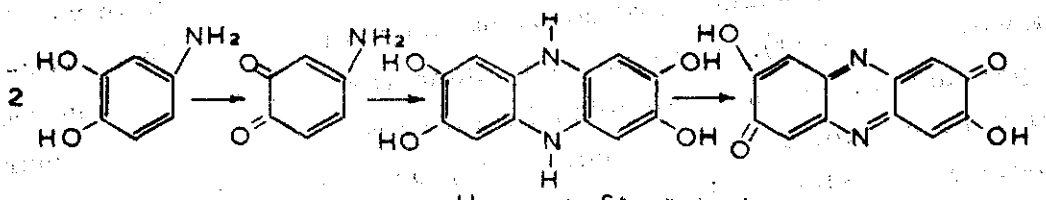


ZIECHMANN (1960b) vermeldt dat hydroxy-p-chinon en o. aminofenol in azijnzure oplossing vrij gemakkelijk een fenoxazon vormen. Op grond van U.V.- en I.R.-spectra vermoedt hij dat een



Ziechmann (1960 b)

dergelijke reactie ook optreedt in waterige oplossing.
HORNER en STURM (1957) verkregen door oxidatie van 4-amino-pyrocatechol een verbinding waaraan zij een fenazineringsysteem toekennen:



Horner en Sturm

Volgens Flaig is het gehalte aan "heterocyclisch" gebonden stikstof echter nooit hoger dan 6 % (ook bij natuurlijke huminezuren wordt deze waarde vrijwel nooit overschreden). Dit betekent dat niet meer dan één N-atoom per twee benzeenkernen optreedt. Een regelmatig fenazineringsysteem lijkt hier dus minder waarschijnlijk.

Flaig nam waar dat na oxidatie van hydrochinon tot huminezuur in natronalkalisch milieu achteraf geen stikstof meer kan worden ingebouwd. (Een overeenkomstige waarneming werd gedaan door MATTSON (1942) bij lignine). De reactie met NH_3 vindt dus tijdens een der eerste fasen van de huminezuurvorming plaats.

Bij verbruik van 4 at. zuurstof per mol. hydrochinon in natronalkalische oplossing verkreeg Flaig een opbrengst aan huminezuren van slechts 3-5 %, terwijl bij aanzuren van het alkalisch reactiemengsel een sterke CO_2-ontwikkeling optrad. In ammoniakaal milieu was de opbrengst bij hetzelfde zuurstofverbruik 90 % en bij aanzuren ontweek er vrijwel geen CO_2. De meest waarschijnlijke verklaring hier-

voor is dat de reactie met NH_3 een additie is aan een chinoide verbinding. Het is bekend dat verbindingen met een vrije NH_2-groep zoals primaire aminen en aminozuren gemakkelijk aan chinonen kunnen worden geaddeerd. De chinoïde functies gaan daardoor weer over in fenolische, zodat opnieuw zuurstof kan worden opgenomen.

Tenslotte kan nog worden vermeld dat Flaig bij oxidatie van hydrochinon in een waterige monomethylamine-oplossing eveneens stikstofhoudende producten met een hoog molecuulgewicht verkreeg, echter niet met di- of trimethylamine. Hieruit volgt dus, dat bij de reactie met NH_3 twee H-atomen hiervan betrokken zijn.

Hiermee zijn in het kort de voornaamste experimentele gegevens opgesomd die momenteel beschikbaar zijn. Het is duidelijk dat er nog heel wat onderzoek zal moeten worden verricht voordat met enige zekerheid een reactieschema kan worden opgesteld voor de vorming van deze synthetische "huminezuren".

3.2. EXPERIMENTEEL GEDEELTE

3.2.1. N-houdende hydrochinon-huminezuren

In een 3-hals-rondkolf van 1 l. werd 55 g. (0,5 Mol) hydrochinon gesuspendeerd in 500 ml. aqua dest. De kolf werd voorzien van een mechanisch aangedreven glazen (K.P.G.-) roerder en van een druppeltrechter. Verder werd de kolf in gesloten verbinding gebracht met een vat waarin zich zuivere zuurstof bevond, nadat ook de lucht boven de suspensie en in de verbindingsstukken was vervangen door zuurstof.

Zodra onder constant goed roeren van de suspensie via de druppeltrechter 12,5 N ammonia werd toegevoegd, kleurde de oplossing zich via wijnrood zeer snel donkerbruin waarbij zuurstof werd opgenomen. De O_2-druk werd constant gehouden (een geringe overdruk werd toegepast). Een opnamesnelheid van zuurstof van ongeveer 1 l. per uur kon in het begin gehandhaafd worden door langzamerhand meer ammonia toe te voegen maar de O_2-opname begon later steeds langzamer te verlopen. 's Nachts wanneer niet werd geroerd was ook de O_2-opname vrijwel nihil. De reactie werd na 32 uur roeren afgebroken, aangezien er toen nogslechts zeer langzaam O_2 werd opgenomen. In totaal was toen 325 ml. 12,5 N ammonia toegevoegd en 21,5 l. zuurstof (1,8 At; de temperatuur was ongeveer 17°C) verbruikt.

Het reactiemengsel werd daarna onder koeling met ijs aangezuurd met geconcentreerd zoutzuur tot pH 1 waarbij een vrij sterke CO_2-ontwikkeling optrad en het huminezuur zich in vlokken afscheidde. Na een dag staan werd het neerslag afgecentrifugeerd en door herhaald oproeren met aqua dest. en weer centrifugeren gewassen tot beginnende peptisatie. Daarna werd het huminezuur overgebracht in dialyseslangen en werd ongeveer een maand lang gedialyseerd tegen aqua dest. tot dit in 24 u. nauwelijks nog bruin gekleurd werd. Bij electrodialyse van een gedeelte kon in de anoderuimte geen spoor chloride meer worden aangetoond. Daarom is met eenvoudige dialyses volstaan. Het verdere opwerken vond plaats als beschreven bij de isolering en zuivering van huminezuren uit de grond. De opbrengst bedroeg 31 g. (62 g. per Mol hydrochinon) en het gehalte aan stikstof 11,4 %. Dit huminezuur is in tabel 4 waar meer analysecijfers worden vermeld, aangeduid als Ib.

Tabel 4. Procentuele samenstelling van de elementen in de synthetische huminezuren

No.	Uitgangsstof en exp. omstandigheden	berekend op as-vrij % C	% H	% N	% O	% as
Ia	hydrochinon + NH_4OH i.a.v. $CuSO_4$ (roeren)	55,0	3,6	11,0	30,4	0,8
Ib	hydrochinon + NH_4OH zonder $CuSO_4$ (roeren)	55,2	3,7	11,4	29,7	0
IIa	hydrochinon + NH_4OH i.a.v. $CuSO_4$ (schudden)	56,2	3,4	8,4	32,0	0
IIb	hydrochinon + NH_4OH zonder $CuSO_4$ (schudden)	55,7	3,6	7,9	32,8	0
V	hydrochinon + NaOH	60,9	3,0	-	36,1	0,6
IV	pyrocatechol + NH_4OH	57,9	3,3	7,0	31,8	0
VI	pyrocatechol + NaOH	63,0	3,0	-	34,0	0,5
III	pyrogallol + NH_4OH	55,3	3,7	5,8	35,2	0,3
VII	pyrogallol + NaOH	59,3	3,7	-	37,0	0,3

Gelijktijdig met de zojuist beschreven synthese werd op dezelfde wijze nogmaals 55 g. hydrochinon omgezet in huminezuur, alleen werd hierbij aan de suspensie vooraf een mespuntje $CuSO_4$ als katalysator toegevoegd. De O_2-opname vond hier in het begin inderdaad iets sneller plaats dan zonder $CuSO_4$ en in ongeveer dezelfde tijd werd 23 l. zuurstof (1,94 At) d.i. dus 1,5 l. méér opgenomen terwijl de opbrengst 36 g. (72 g. per Mol hydrochinon) bedroeg en het N-gehalte 10,9 %. De beide parallelsyntheses waren echter geen zuivere duplo's. Vooral de roersnelheid die volgens DINGEMANS (1928) een grote invloed heeft, kon moeilijk exact worden gedupliceerd. Daarom kan uit het gevonden relatief geringe verschil in opnamesnelheid van zuurstof niet worden geconcludeerd dat het $CuSO_4$ inderdaad de reactie heeft versneld. In tabel 4 is dit product aangeduid als Ia.

Hetzelfde procedé werd nogmaals uitgevoerd met dit verschil echter dat naast elkaar 2 rondkolven van elk 2 l. met de reactiemengsels (één zonder en één met toevoeging van iets $CuSO_4$) intensief werden geschud. Hierdoor werd een veel beter contact tussen de vloeistof en de O_2 bewerkstelligd. Nu werd in slechts 3½ u. 25,5 l. (2,15 At) zuurstof per kolf opgenomen. De vooral in het begin optredende sterke warmteontwikkeling kon slechts in de hand worden gehouden door de ammonia zeer langzaam toe te voegen. In het geheel kon daardoor slechts 150 ml. 12,5 N. ammonia per kolf worden toegevoegd. De verkregen huminezuren bevatten dan ook aanzienlijk minder stikstof dan de eerste preparaten nl. 7,9 % zonder $CuSO_4$-toevoeging en 8,4 % in het geval dat $CuSO_4$ was toegevoegd.

De O_2-opname was na verbruik van 25,5 l. nog lang niet afgelopen maar de reactie werd hier afgebroken omdat een verdere oxidatie de opbrengst nadelig zou beïnvloeden. Een verhoging van de reactiesnelheid door $CuSO_4$ kon niet betrouwbaar worden vastgesteld. In verband met een mogelijk anders verlopen van de reactie onder invloed van $CuSO_4$ werden de verkregen huminezuren ook hier afzonderlijk opgewerkt. De opbrengst was in beide gevallen 30 g. (60 g. per Mol hydrochinon). De producten zijn in tabel 4 aangeduid als IIa (met $CuSO_4$) en IIb (zonder $CuSO_4$).

De verdere syntheses van huminezuren werden alle met behulp van hetzelfde schudapparaat uitgevoerd en er werd geen $CuSO_4$ meer toegevoegd.

3.2.2. N-vrij hydrochinon-huminezuur

In elk van de 2 rondkolven werd 44g. (0,4 Mol) hydrochinon gesuspendeerd in 800 ml. aqua dest. De volgens voorschrift op te nemen hoeveelheid zuurstof nl. 3 At. per Mol hydrochinon was bij beide kolven in 2½ u. verbruikt waarvoor een langzame toevoeging van 65 ml. 6 N. natronloog per kolf voldoende was. De CO_2-ontwikkeling bij aanzuren was sterker dan bij de bereiding van de N-houdende hydrochinon-huminezuren. De totale opbrengst was slechts ongeveer 1 g. d.i. 1¼ g. per Mol hydrochinon.

Getracht werd een hogere opbrengst te verkrijgen door de O_2-opname te beperken tot 2½ At. per Mol hydrochinon en de concentratie aan hydrochinon te verdubbelen (per kolf 88 g. hydrochinon gesuspendeerd in 800 ml. water). De opbrengst was nu inderdaad iets hoger nl. in totaal 5 g. d.i. 3,1 g. per Mol hydrochinon, maar vergeleken met de opbrengst aan N-houdende huminezuren uit hydrochinon en ook met die aan N-vrije pyrocatecholhuminezuren (zie verderop) is deze toch nog bijzonder laag. Een bevredigende verklaring hiervoor kan niet gegeven worden.

De CO_2-ontwikkeling bij de laatste synthese was gemiddeld 6,9 l. (ca. 0,31 Mol) per Mol hydrochinon. Het product is in tabel 4 aangeduid als V.

3.2.3. N-houdend pyrocatechol-huminezuur

Op precies dezelfde wijze als bij het hydrochinonhuminezuur IIb werd huminezuur bereid uit pyrocatechol. De voorgeschreven hoeveelheid zuurstof (4,3 At per Mol pyrocatechol) werd in 4 u. opgenomen, waarbij per kolf 315 ml. 12½ N. ammonia langzaam werd toegevoegd. Het reactiemengsel kreeg hier eerst een donkergroene kleur die daarna overging in donkerbruin. De totale opbrengst was 52 g. (d.i. dus uit 1 Mol pyrocatechol) en het N-gehalte 7,0 %. Het huminezuur is in tabel 4 aangeduid met het cijfer IV.

3.2.4. N-vrij pyrocatechol-huminezuur

De bereiding is precies zo uitgevoerd als bij het hydrochinon-huminezuur V. Per kolf werd uitgegaan van 88 g. (0,8 Mol) pyrocatechol gesuspendeerd in 800 ml. water. De O_2-opname verliep echter veel langzamer dan bij hydrochinon. Hier werd nl. 2½ At zuurstof per Mol pyrocatechol opgenomen in 7 u. waarvoor de toevoeging van 250 ml. 6 N. natronloog per kolf nodig was. De CO_2-ontwikkeling bij aanzuren was hier gemiddeld 9,5 l. (ca. 0,41 Mol) per Mol pyrocatechol, dus hoger dan bij uitgaan van hydrochinon. De opbrengst was niettemin in totaal 18 g. d.i. 11¼ g. per Mol dus ruim 3½ x zo veel als bij het hydrochinonhuminezuur V. Dit huminezuur is in tabel 4 aangeduid met het cijfer VI.

3.2.5. N-houdend pyrogallol-huminezuur

Hierbij werd uitgegaan van 126 g. (1 Mol) pyrogallol per kolf, gesuspendeerd in 500 ml. water. Onder langzaam toevoegen van 400 ml. 6 N. ammonia per kolf werd in 4¼ u. de voorgeschreven hoeveelheid van 2,5 At zuurstof per Mol pyrogallol opgenomen. De kleur van het reactiemengsel gaat direct via wijnrood over in donkerbruin. De opbrengst was gemiddeld 33 g. per Mol pyrogallol en het gehalte aan stikstof 5,8 %. Het huminezuur is in tabel 4 aangeduid met het cijfer III.

3.2.6. N-vrij pyrogallol-"huminezuur"

Evenals bij hydrochinon en pyrocatechol werd per kolf 0,8 Mol (101 g.) pyrogallol gesuspendeerd in 800 ml. water. Onder langzaam toevoegen van 120 ml. 6 N. natronloog per kolf werd in 3¾ u. de voorgeschreven hoeveelheid van 1,7 At zuurstof per Mol pyrogallol opgenomen. (Het O_2-verbruik werd beperkt tot $^2/_3$ van die bij hydrochinon en pyrocatechol omdat het pyrogallolmolecuul reeds 3 O-atomen bevat).

De CO_2-ontwikkeling bij aanzuren tot pH 1 was gemiddeld 8,5 l. (ca. 0,38 Mol) per Mol pyrogallol. De gemiddelde opbrengst was 36 g. per Mol pyrogallol. Het product is in tabel 4 aangeduid met het cijfer VII.

4. BESPREKING VAN DE LITERATUUR OVER DE ANALYSE VAN ZUURGROEPEN IN HUMINEZUREN

4.1. INLEIDING

In hoofdstuk 1 is opgemerkt dat de huminezuren tenminste twee soorten zuurgroepen hebben nl. carboxyl- en fenolische hydroxyl-groepen. In de literatuur worden vele methoden beschreven om de som van de zuurgroepen zowel als de beide groepen afzonderlijk te bepalen. Vooral van de zijde van de steenkoolchemie is hieraan veel aandacht besteed. Ook uit steenkool en bruinkool kunnen namelijk, vooral na een zekere mate van oxidatie "huminezuren" worden geïsoleerd. (Men vermoedt dan ook dat huminezuren een tussenstadium zijn in het proces dat van planten tot steenkool heeft gevoerd.)

Deze methoden voor groepenanalyse kunnen worden verdeeld in twee soorten nl. organisch- en anorganisch-chemische methoden. Deze zullen afzonderlijk worden besproken.

4.2. ORGANISCH-CHEMISCHE GROEPENANALYSES

4.2.1. Bepaling van COOH- en OH-groepen gezamenlijk

FUCHS c.s. (1929, 1940, 1954), HALLE (1935), BROADBENT en BRADFORD (1952), BLOM (1957, 1960) e.a. bepalen het totaal van alle zure groepen uit de toename van het methoxylgehalte na methylering met diazomethaan. Eén bezwaar van deze methode is dat, om tot een min of meer constant methoxylgehalte te komen, de behandeling met diazomethaan zeer vaak herhaald moet worden (bijv. volgens Fuchs c.s. 12 maal) of zeer lang moet worden voortgezet (volgens Blom bij steenkool 7-10 dagen bij -15°C). Een ander bezwaar is dat nevenreacties van diazomethaan met andere groepen kunnen optreden (Blom; Broadbent en Bradford) waarvan niet is bewezen dat deze de bepaling van het methoxylgehalte niet beïnvloeden. Daarnaast is het ook mogelijk dat de reactie met diazomethaan onvolledig is. DIMROTH en FAUST (1921) constateerden dat de methylering van OH-groepen naast > C = O groepen vaak moeilijk is. Misschien spelen ook sterische effecten een rol (SCHEFFER-ULRICH, 1960) of is de methylering onvolledig doordat een deel van de zure groepen in droge toestand in anhydride- of lactonvorm is (Blom).

DUBACH (zie MEYER, 1962) voerde de methylering uit met methyljodide-zilveroxide in dimethylformamide (3 dagen bij kamertem-

peratuur). Of dit een verbetering is, kan uit de vermelde gegevens niet worden opgemaakt. Wel wordt vermeld dat de opbrengst slechts 40 % is van de inweeg.

Door FRANCIS en WHEELER (1925), HEATHCOAT en WHEELER (1932) en FUCHS (1954) werd een bepaling van het totale aantal zure groepen uitgevoerd volgens Zerewitinoff-Tschugaeff met methylmagnesiumbromide. Deze methode bleek echter slecht reproduceerbaar te zijn.

Een betere reagens voor "actieve H" is volgens MARTIN, DUBACH, MEHTA en DEUEL (1963) diboraan. Deze onderzoekers berekenden bovendien het carboxylgehalte uit de toename van het totaal H-gehalte resp. van de acetyleerbare OH-groepen en uit de afname van het O-gehalte, die het gevolg zijn van reductie van alle CO-groepen door diboraan. Deze reductie bleek echter een maand tijd te vergen. Bovendien moet gecorrigeerd worden voor carbonyl-groepen (die afzonderlijk bepaald werden met natrium-boor-tetrahydride).

4.2.2. Bepaling van COOH-groepen afzonderlijk

Blom (l. c.) bepaalt de COOH-groepen o.a. door bij een deel van het met diazomethaan gemethyleerde product de CH_3OOC-functies te verzepen met een bariumhydroxide-oplossing, waarna de ontstane methylalcohol en/of de vermindering in methoxylgroepen bij het product wordt bepaald.

DUBACH (zie MEYER, l. c.) verzeepte het met methyljodide-zilveroxide gemethyleerde product gedurende 60 uur bij kamertemperatuur onder stikstof met 0,1 N natronloog. Meyer wijst er echter op dat de verzepingssnelheden van de carboxylestergroepen en van de fenol-ethergroepen niet zodanig verschillen dat deze bepaling betrouwbaar is.

Een andere bepaling van de COOH-groepen wordt wel uitgevoerd door deze te veresteren met methylalcohol (door koken met een methylalcoholische HCl-oplossing) en dan de toename van het aantal methoxylgroepen vast te stellen (FUCHS c.s., 1929, 1940; HALLE, 1935; FORSYTH, 1947; BROADBENT en BRADFORD, 1952; e.a.). Het is echter niet uitgesloten dat hierbij een gedeeltelijke decarboxylering van de huminezuren optreedt(DUBACH, 1958. FUCHS c.s. kookten het reactiemengsel nl. 4 dagen aan de terugvloeikoeler).

BLOM (1957, 1960) en ook WRIGHT en SCHNITZER (1960)

trachtten in navolging van HUBACHER (1949) op deze betrekkelijk gemakkelijke decarboxylering een bepaling van het aantal COOH-groepen te baseren. Daarbij wordt de te onderzoeken stof opgelost of gesuspendeerd in chinoline en verhit in aanwezigheid van koper (II) hydroxidecarbonaat dat de decarboxylering katalyseert. Bij de door Hubacher onderzochte aromatische carbonzuren werd slechts ca. 80 % van de carboxylgroepen ontleed. Uit het feit dat bij steenkoolproducten na deze behandeling nog zuurgroepen aanwezig waren die azijnzuur konden vrijmaken uit Ca-acetaat concludeert BLOM (1960) dat ook bij deze steenkoolproducten de decarboxylering niet kwantitatief verloopt. Dit argument is echter o.i. op zich zelf niet steekhoudend (zie 4.3.1.). MEYER (1962) meent dat bij deze decarboxylering een niet controleerbare afbraak van huminezuren optreedt. Verder nam DUBACH (1958) waar dat de aciditeit van bepaalde humusstoffen bij verhitten in water niet overeenkomstig de hoeveelheid afgesplitste CO_2 afnam. Blijkbaar was daar dus de afgesplitste CO_2 niet alleen afkomstig van carboxylgroepen of werden er tijdens de verhitting nieuwe carboxylgroepen gevormd. Overigens levert deze methode bij steenkoolproducten volgens Blom ook geen goed reproduceerbare resultaten op. Wij hebben deze methode toegepast bij enkele huminezuren. De resultaten worden besproken in 5.4.

4.2.3. Bepaling van OH-groepen afzonderlijk

Voor de directe bepaling van fenolische OH-groepen worden eveneens verschillende methoden toegepast. BROADBENT en BRADFORD (1952), YOHE en BLODGETT (1947) en FORSYTH (1947) bepaalden de toename van het methoxylgehalte na "uitputtende" methylering met dimethylsulfaat in alkalische oplossing (Forsyth meent dat hierbij ook alcoholische OH-groepen worden gemethyleerd).

Een andere bepalingsmethode is die met behulp van 2,4-dinitrofluorbenzeen. Dit vormt nl. met fenol een difenyletherderivaat onder afsplitsing van HF. FLAIG, SCHEFFER en KLAMROTH (1955) trachtten deze methode toe te passen op huminezuren, maar verkregen geen plausibele resultaten. Zij toonden aan dat sterk zure hydroxylgroepen niet met dinitrofluorbenzeen reageren. BLOM (1960) paste deze methode toe op steenkool en vermeldt dat de resultaten bevredigend waren maar de bepaling nogal bewerkelijk. Overigens is deze methode niet specifiek. Er kan eveneens reactie optreden met amino-

groepen (FIESER en FIESER, 1956).

Daarnaast zijn er nog methoden waarbij niet alleen de fenolische OH-groepen bepaald worden maar (voorzover aanwezig) ook de alcoholische. Hiervan wordt er één nl. acetylering en bepaling van het acetylgehalte van het behandelde preparaat vrij veel toegepast.

Voor de acetylering worden verschillende reagentia gebruikt, nl. azijnzuuranhydride + geconcentreerd zwavelzuur (GILLAM, 1940; MARTIN c.s., 1963), azijnzuuranhydride + natriumacetaat (HEATHCOAT en WHEELER, 1932; FORSYTH, 1947; MAZUMBAR c.s., 1957), azijnzuuranhydride in pyridine (o.a. BLOM, 1960), keteen (HORTON, 1958) en azijnzuuranhydride in ethylacetaat + watervrij perchloorzuur (MEYER, 1962). Een interessante variant is die van DIMROTH en FAUST (1921) met azijnzuuranhydride in aanwezigheid van boriumacetaat. Hierbij is namelijk onderscheid mogelijk tussen OH-groepen die via H-bruggen zijn gebonden aan carbonylgroepen en vrije OH-groepen, daar alleen de laatste worden geacetyleerd (zie ook BLOM, 1960).

Ook bij acetylering is het, zoals meestal in de organische chemie moeilijk de reacties kwantitatief te laten verlopen en nevenreacties te vermijden. Dit blijkt duidelijk uit het onderzoek dat HALLEUX c.s. (1959) instelden naar de resultaten van de acetylering volgens Blom bij twintig modelstoffen. Ook is het gevaar niet denkbeeldig dat tevens acetylering van stikstoffuncties kan optreden, waardoor de gevonden waarden te hoog kunnen uitvallen. Gillam vond merkwaardigerwijze een toename van de totale zuursterkte bij acetylering.

Een nieuwe methode voor bepaling van alle OH-groepen, die afkomstig is van FRIEDMAN c.s. (1958), wordt aangeduid als "trimethylsilylering". Daarbij wordt de te onderzoeken stof behandeld met trimethylchloorsilaan, $(CH_3)_3 - Si - Cl$, of hexamethyldisilazaan, $(CH_3)_3 - Si - NH - Si - (CH_3)_3$, waarbij trimethylsilylethers worden gevormd. Het gehalte aan OH-groepen wordt dan berekend uit het Si-gehalte van het preparaat.

4.2.4. Bezwaren van deze methoden in het algemeen

In het algemeen zijn deze organisch-chemische methoden nogal bewerkelijk, terwijl de reproduceerbaarheid dikwijls te wensen overlaat. Dit is niet verwonderlijk. Om de zuurgroepen, tenminste bij

benadering, kwantitatief te laten reageren moeten de behandelingen soms meermalen herhaald worden of zeer lang worden voortgezet. Dikwijls moet echter ten aanzien hiervan en ook van de reactietemperatuur een compromis worden aanvaard, omdat anders nevenreacties (o.a. afbraak) van de te onderzoeken stof een te grote rol gaan spelen.

Een andere moeilijkheid is, dat bij de meeste van de hier genoemde methoden uiteindelijk analyses moeten worden verricht aan de behandelde producten, hetgeen impliceert dat deze na de behandeling (methylering e.d.) kwantitatief moeten worden opgewerkt. Aan deze voorwaarde kan bij huminezuren, die dikwijls gedeeltelijk in oplossing gaan tijdens de behandeling, lang niet altijd worden voldaan.

Tenslotte moet nog een derde foutenbron worden genoemd, nl. de vaak moeilijke toegankelijkheid van de zuurgroepen door onvolledige dispergering of zwelling, waardoor de omzettingen onvolledig kunnen zijn (ook bij de hierna te bespreken anorganisch-chemische bepalingen speelt dit vaak een belangrijke rol).

4.3. ANORGANISCH-CHEMISCHE BEPALINGEN

4.3.1. Inleidende beschouwingen

Om de in de literatuur genoemde anorganische methoden op hun juiste waarde te schatten is het dienstig vooraf enkele opmerkingen te maken in verband met de dissociatie van huminezuren in waterige oplossingen of suspensies.

In het algemeen treedt bij oplossingen van éénbasische organische zuren in water geen volledige dissociatie op. De ligging van het dissociatie-evenwicht wordt gekenschetst door de dissociatie-constante K. Bij twee-basische zwakke zuren krijgt men twee verschillende K's doordat het na afsplitsing van het eerste proton ontstane anion in het algemeen moeilijker dissocieert dan het ongeladen molecuul. Om dezelfde reden heeft men bij een n-basisch zuur ook een reeks van n verschillende K's, die kleiner worden naarmate reeds meer protonen zijn afgesplitst.

Bij huminezuren met een onbekend aantal (x) carboxyl- en een eveneens onbekend aantal (y) zure hydroxyl-groepen per deeltje hebben we dus bij oplossingen in water x + y dissociatie-constanten. Dit is dus een heel andere situatie dan wanneer we, zoals in de literatuur soms wordt gesuggereerd, eenvoudig te doen zouden hebben met een

mengsel van een heel zwak éénbasisch zuur zoals fenol en een minder zwak éénbasisch zuur zoals benzoëzuur.

In het laatste geval zouden we slechts te maken hebben met twee dissociatieconstanten nl. die voor fenol van $1,3 \times 10^{-10}$ en die voor benzoëzuur van $6,3 \times 10^{-5}$ (beide bij $25^{o}C$). Voegen we nu aan een oplossing van equivalente hoeveelheden van deze verbindingen in water een eveneens equivalente hoeveelheid natriumacetaat toe, dan zal er zich een evenwicht instellen waarbij het benzoëzuur ongeveer de helft van het azijnzuur "uit zijn zout verdrongen heeft". De dissociatieconstante van azijnzuur is nl. (bij $25^{o}C$) $1,75 \times 10^{-5}$, dus van dezelfde orde van grootte als die voor benzoëzuur. Het fenol dat immers een veel lagere dissociatieconstante bezit, kan hierbij practisch geen rol spelen.

Om te bereiken dat een met het benzoëzuur nagenoeg equivalente hoeveelheid azijnzuur "uit zijn zout zou worden verdrongen" zou een grote overmaat natriumacetaat moeten worden toegevoegd. De dissociatie van het bij deze verdringing vrijkomende azijnzuur zou dan immers zeer sterk worden teruggedrongen door de overmaat acetaationen. In dat geval zou echter, afhankelijk van de grootte van de overmaat natriumacetaat, ook het fenol een deel van het azijnzuur "uit zijn zout kunnen verdringen". De totale hoeveelheid vrijgekomen azijnzuur is slechts te berekenen indien de onderlinge concentratieverhoudingen van het benzoëzuur, het fenol en het natriumacetaat bekend zijn.

In principe zouden we een overeenkomstige situatie krijgen indien we aan een huminezuuroplossing een grote overmaat natriumacetaat zouden toevoegen. Indien we alle dissociatieconstanten van het huminezuur zouden kennen en tevens de onderlinge verhouding van het aantal COOH-groepen en OH-groepen dan is, bij bekende Na-acetaatconcentratie, de ligging van het evenwicht (en dus de hoeveelheid vrij azijnzuur) in principe te berekenen. Omgekeerd kan, indien deze gegevens niet of niet alle bekend zijn, uit de hoeveelheid vrij azijnzuur niet zonder meer een conclusie getrokken worden ten aanzien van de concentratie aan COOH-groepen van het huminezuur in de oplossing.

In het bovenstaande is aangenomen dat de affiniteit van alle betrokken anionen tot het Na^{+}-ion gelijk is, wat bij benadering ook wel het geval zal zijn. Geheel anders wordt de situatie wanneer dit niet meer opgaat. LIFSON (1957) onderscheidt vier soorten van "ionenbinding" bij polyelectrolyten nl.

a. Associatie tussen een klein ion en een enkele reactieve groep van het polyelectrolyt bijv. de associatie van COO^--groepen met H^+-ionen.
b. Polyfunctionele associatie wanneer een klein ion gelijktijdig met meer dan een reactieve groep van het polyelectrolyt reageert zoals bij een chelate binding van een kation door een polyanion optreedt of bij binding van een polyvalent kation door een polyanion kan optreden.
c. Electrostatische wisselwerkingen die met de Debye-Hückel-theorie kunnen worden beschreven.
d. Interactie tussen kleine ionen en het electrostatische veld van het macro-ion als geheel. Hieraan bijv. schrijven GREGOR c.s. (1955) de veel sterkere binding van het Cu(II)-ion door polyacrylzuur in vergelijking met de analoge monomeren azijnzuur en glutaarzuur toe.

Het is dus zonder meer duidelijk dat de verdeling van bijv. Ca-ionen na toevoeging van een Ca-acetaatoplossing aan een oplossing van huminezuren (en daarmee dus de hoeveelheid azijnzuur die wordt vrijgemaakt uit Ca-acetaat) zeker niet alleen wordt bepaald door de "sterkte" van de zuurgroepen. Een hierop gebaseerde bepaling van COOH-groepen in huminezuren, zonder dat de dissociatie-constanten der zuurgroepen en de sterkte van de kationbinding aan deze groepen bekend is, levert dus arbitraire uitkomsten.

Na deze beschouwingen zullen de verschillende in de literatuur genoemde bepalingsmethoden voor de som der zuurgroepen en voor de onderscheiden groepen afzonderlijk, worden besproken.

4.3.2. Bepaling van COOH- en OH- groepen gezamenlijk

Door FUCHS (1927, 1928) en UBALDINI (1937) werden de huminezuren verhit met een alcoholische oplossing van KOH (waarin de huminezuren slecht oplosbaar zijn), waarna de overmaat KOH werd teruggetitreerd. Een groot bezwaar van deze methode is, dat er onder deze omstandigheden gemakkelijk oncontroleerbare omzettingen (oxidaties, hydrolyse e.d.) kunnen optreden waarbij tevens nieuwe zure groepen worden gevormd.

Voor huminezuren zijn dergelijke, betrekkelijk drastische omstandigheden trouwens ook geheel overbodig, daar deze verbindingen ook in verdunde alkali bij kamertemperatuur volledig oplossen, waar-

bij alle zure groepen worden geneutraliseerd. De directe potentiometrische titratie van de huminezuren met alkali zoals o.a. door BROWN en COLLET (1938), ZADMARD (1939), GILLAM (1940), MARSHALL en PATNAIK (1953) en PUUSTJÄRVI (1955) is uitgevoerd is in dit opzicht dan ook zeker een verbetering. Hierbij doet zich echter de moeilijkheid voor dat het eindpunt lastig is vast te stellen (zie 5.2.1.).

STADNIKOFF c.s. (1929, 1935) e.a. bepaalden de som der zure groepen door de huminezuren te behandelen met overmaat bariumhydroxide (Ba-humaten zijn onoplosbaar) en de niet-verbruikte base terug te titreren. SCHEELE c.s. (1935) titreerden de met zoutzuur uitgevlokte huminezuren conductometrisch met loog. Hierbij kon het eindpunt goed worden vastgesteld, vooral indien de titratie werd uitgevoerd in aanwezigheid van overmaat bariumchloride (1936). Deze methode en nog een verbeterde variant hiervan werd eveneens toegepast door TOKUOKA en MATSUO (1941). SANDHOFF (1954) voerde een directe conductometrische titratie uit met bariumhydroxide.

BROOKS en MAHER (1954) titreerden steenkoolpoeder, SCHOBINGER (1958), WRIGHT en SCHNITZER (1960) huminezuren potentiometrisch in ethyleendiamine met natriumcolaminaat. MEYER (1962) gebruikte voor deze titratie als oplosmiddel pyridine en als base tetrabutyl-ammonium-hydroxide. Op deze verschillende titratiemethoden komen we in het volgende hoofdstuk nog terug.

Bij een andere methode voor het bepalen van de som der zure groepen worden de te onderzoeken stoffen behandeld met een zoutoplossing waarvan het kation met de huminezuren een onoplosbaar zout vormt. Dit principe werd o.a. toegepast door FRANCIS en WHEELER (1925). Zij gebruikten Ba-, Ca-, Ag- en Cu-zouten en analyseerden het verkregen neerslag op deze metalen. Dit veronderstelt dus dat ook de H^+-ionen van de zwakst zure groepen kwantitatief zijn vervangen door een equivalente hoeveelheid metaalionen, wat zeker niet steeds opgaat zoals in hoofdstuk 6 nader zal worden besproken.

Een zeer recente en interessante variant van de laatste methode, waarbij de genoemde moeilijkheid vermoedelijk geen rol speelt, werd geïntroduceerd door BLOM (1960). Deze schudde steenkoolpoeders enige tijd in D_2O waarbij de H^+-ionen dus werden uitgewisseld tegen D^+ en bepaalde daarna het deuteriumgehalte van het poeder.

4.3.3. Bepaling van COOH-groepen afzonderlijk

FUCHS (1927, 1928), STADNIKOFF (1937), BLOM (1957, 1960) e.a. baseren een bepaling van de COOH-groepen op het feit dat huminezuren en verwante stoffen in staat zijn azijnzuur vrij te maken uit een oplossing van calciumacetaat (waarvan een grote overmaat wordt gebruikt). Tegen deze methode zijn in 4.3.1. principiële bezwaren aangevoerd. FUCHS en SANDHOFF (1940) namen trouwens zelf reeds waar dat ook sommige fenolische verbindingen, ondanks hun zwak zuur karakter azijnzuur kunnen vrijmaken uit Ca-acetaat. Overigens hebben ook niet alle OH-groepen een zeer zwak zuur karakter. Het is bekend dat sommige hydroxychinonen, bijv. 2,5-dihydroxy-p-chinon, zelfs sterkere zuren zijn dan azijnzuur. (De berekening van "COOH" uit de hoeveelheid calcium die uit de oplossing is verdwenen heeft het door BLOM (1960) genoemde bezwaar dat er zich zure groepen in zodanig geïsoleerde posities kunnen bevinden, dat op die plaatsen uit één molecule Ca-acetaat slechts één molecule azijnzuur wordt vrijgemaakt. Eén verdwenen Ca-ion komt dan dus overeen met slechts één "COOH"-groep).

Deze z.g. "calciumacetaatmethode" hebben wij ook toegepast bij enkele huminezuren. De resultaten worden besproken in 5.4.

Een foutieve redenering is die van FUCHS (1927), STACH (1933) e.a.. Deze gaan namelijk nog calciumcarbonaat aan het mengsel toevoegen om de evenwichtsreactie tussen de huminezuren en calciumacetaat verder naar de kant van het vrije azijnzuur te verschuiven. Het $CaCO_3$ zou het azijnzuur dan aan het evenwicht onttrekken doordat Ca-acetaat wordt gevormd en het ontstane CO_2 ontwijkt. Met het calciumcarbonaat wordt echter een zout geïntroduceerd van een zuur (nl. koolzuur) dat aanzienlijk zwakker is dan azijnzuur. De (schijnbare) K_1 van koolzuur is nl. (bij 25°C) $4,3 \times 10^{-7}$. Het $CaCO_3$ zal dus niet alleen het azijnzuur wegnemen, maar ook met de huminezuren een reactie aangaan waarbij zwakker zure groepen zijn betrokken dan in de reactie met calciumacetaat. Het is dan ook niet verwonderlijk dat Fuchs en Stach nu waarden krijgen voor "COOH" die 1½ x zo groot zijn als bij gebruik van alléén Ca-acetaat.

Andere onderzoekers laten het calciumacetaat geheel weg en voegen alleen $CaCO_3$ toe, waarbij "COOH" weer wordt berekend uit de hoeveelheid vrijkomende CO_2.

Door UBALDINI (l. c.) werd ook nog een andere variant van deze methode beproefd. Daarbij werd naast de vermelde bepaling van alle zure groepen met behulp van alcoholische KOH-oplossing, ook nog eenzelfde behandeling met KOH in water uitgevoerd, waarna CO_2 werd doorgeleid om de "fenolaten" weer te ontleden. De niet in het filtraat teruggevonden K^+-ionen zouden dan gebonden zijn aan de $-COO^-$groepen. Volgens BEYER (1944) is deze bepaling overigens slecht reproduceerbaar.

Door BLOM (1960) werd de reeds van vóór 1900 daterende jodometrische titratie van zuren (zie bijv. KOLTHOFF, 1920) toegepast op steenkoolpoeder. Daarbij wordt een oplossing van NaCl, KJ, KJO_3 en $Na_2S_2O_3$ aan de suspensie toegevoegd. Van de te onderzoeken stof afkomstige H^+-ionen verdringen een weinig HJ uit zijn zout (HJ is wel een sterker zuur dan het organische maar er is een grote overmaat zout toegevoegd). Dit HJ wordt dan geoxydeerd door het KJO_3 tot J_2, wat op zijn beurt weer wordt weggenomen door het thiosulfaat. Ook bij zwakkere zuren dan HJ krijgt men hierdoor toch een verschuiving van het dissociatie-evenwicht van het zuur naar rechts. Dat bij deze methode die door WRIGHT en SCHNITZER (1960) ook werd toegepast bij huminezuren, alléén de COOH-groepen zouden worden bepaald, is een veronderstelling die onvoldoende gefundeerd is.

Na het bovenstaande behoeft het geen nadere toelichting meer dat hetzelfde geldt voor de gedachte, dat alléén de COOH-groepen worden geneutraliseerd door een zwakke base als ammonia (STADNIKOFF, l. c.; DRAGUNOV, 1950) of dat deze groepen juist zijn geneutraliseerd bij pH 7 (SCHEFFER en SCHACHTSCHABEL, 1940) of pH 8,2 (SAUERLANDT, 1948).

4.3.4. Bepaling van OH-groepen afzonderlijk

Voor de directe bepaling van fenolische OH-groepen naast carboxylgroepen zijn geen anorganisch-chemische methoden uit de literatuur bekend.

Resumerend kan gezegd worden dat er goede anorganisch-chemische methoden bestaan om de som der zuurgroepen bij huminezuren te bepalen, maar dat, althans voor wat betreft huminezuren, van geen der anorganische methoden die in de literatuur worden voorgesteld

voor de afzonderlijke bepaling van COOH-groepen de juistheid is aangetoond (voor eigen experimentele resultaten met sommige van deze methoden zie 5.4.).

5. ELECTROMETRISCHE ANALYSE VAN DE ZUURGROEPEN BIJ HUMINEZUREN.

5.1. INLEIDING

Gezien de bovengeschetste stand van zaken ten aanzien van de analyse van de zuurgroepen of -functies bij huminezuren leek het ons alleszins de moeite waard een diepergaande studie te maken van de mogelijkheden die de electrometrische titratie in dit opzicht biedt. In het bijzonder leken ons enkele, pas in de laatste jaren sterk ontwikkelde titratietechnieken, met name die waarbij de titraties worden uitgevoerd in niet-waterige oplossingen, veelbelovend. Een geslaagde toepassing van electrometrische titratie ter onderscheiding en bepaling van de verschillende soorten zuurgroepen zou bovendien het voordeel hebben dat men dan niet alleen beschikt over de gezochte waarden. Ook het verloop van de titratiecurve tussen de buigpunten, maxima of minima kan in sommige gevallen belangrijke additionele inlichtingen geven.

Bij de gevolgde titratiemethoden is getracht zuurfuncties te onderscheiden op grond van hun verschillende "zuursterkte". Daarbij is het gelukt twee groepen te onderscheiden. Een doorslaggevend bewijs dat de groep sterker zure functies, althans voornamelijk, wordt gevormd door carboxylgroepen en de groep zwakker zure functies door fenolische OH-groepen is niet geleverd (een manco dat inhaerent is aan de methode). Het is mogelijk dat de groep sterker zure functies, althans voor een deel, wordt gevormd door geactiveerde fenolische OH-groepen bijv. in hydroxichinon-configuraties (te beschouwen als vinyloge carboxylgroepen - CO - CH = COH -). Anderzijds is het niet uitgesloten dat, zoals GARTEN c.s. (1957) veronderstellen bij kool, ook bij huminezuren de zeer zwak zure functies voor een deel bestaan uit lactongroepen. MEYER (1962) komt op grond van onderzoek aan twee gereduceerde humuszuren zelfs tot de "aanvechtbare" conclusie dat de sterker zure groepen daar overwegend fenolische OH-groepen zijn en dat de zwakker zure groepen enolisch zijn! De aanwezigheid van zowel carboxyl- als fenolische hydroxyl-groepen bij huminezuren is echter bij verschillende onderzoekingen komen vast te staan. Verder is ons geen enkel organisch zuur dat deze groepen bevat bekend waarbij de OH-groepen sterker zuur zijn dan de COOH-groepen. Om echter misverstand te vermijden zij hier nadrukkelijk opgemerkt dat, waar in het volgende de sterker zure groepen zijn aangeduid als COOH- en de zwakker zure als fenolische OH-groepen, dit in globale

zin moet worden opgevat.

In de volgende paragrafen zullen nu de resultaten verkregen bij toepassing van verschillende titratiemethoden worden besproken.

5.2. TITRATIES VAN HUMINEZUREN OPGELOST IN WATER.

5.2.1. Potentiometrische titraties

5.2.1.1. Inleiding en bespreking van de literatuur

Aangezien het hier allereerst gaat om de potentiometrische titratie als detectiemogelijkheid voor de equivalentiepunten van de verschillende soorten zuurgroepen, kan een behandeling van de theorie van deze titratie bij polybasische zuren hier achterwege blijven (op deze theorie wordt in hoofdstuk 6 nog nader ingegaan). De volgende overwegingen zijn hier echter wel van belang.

AUERBACH en SMOLCZYK (1924) berekenden dat er in de titratiecurve (pH vs m.e. toegevoegde base) van twee-basische zuren geen buigpunt optreedt bij het eerste equivalentiepunt, tenzij de verhouding der beide dissociatieconstanten groter is dan 16. SIMS en PETERS (1957) leidden af, dat theoretisch pas bij een verhouding van $K_1 : K_2$ groter dan 59,7 ook het tweede equivalentiepunt is af te lezen. Volgens KOLTHOFF-ELVING (1959, p.465-473) wordt echter een bevredigende titratiecurve bij twee-basische zuren slechts dan experimenteel verkregen als K_1 tenminste 10.000 maal zo groot is als K_2. Of dus bij potentiometrische titratie van een polybasisch zuur in de curve (pH vs m.e. toegevoegde base) buigpunten optreden bij de equivalentiepunten van de achtereenvolgens geneutraliseerde zure groepen van het molecuul hangt af van de onderlinge verhouding der dissociatieconstanten. Dit stelt tevens een grens aan het aantal zure groepen per molecuul en, in het geval van een polydibasisch zuur, aan de verhouding van de aantallen der beide soorten zure groepen per molecuul (zie Sims en Peters).

Een andere eis is dat de zwakst zure groep nog voldoende sterk zuur moet zijn om een duidelijk buigpunt in de titratiecurve te kunnen geven. Bij zeer zwakke zuren krijgt men namelijk in de buurt van het equivalentiepunt geen grote pH-verandering meer bij toevoegen van base doordat het ontstane zout in sterke mate wordt gehydrolyseerd. Om het buigpunt nog met een acceptabele nauwkeurigheid te kunnen

vaststellen moet volgens KOLTHOFF-ELVING (l.c.) het product van concentratie en dissociatieconstante tenminste 10^{-10} bedragen.

Bij de titratie van huminezuren doen zich verder nog de volgende experimentele moeilijkheden voor. Huminezuren gaan, indien ze als droog poeder in water worden gesuspendeerd, pas langzamerhand in oplossing naarmate meer loog wordt toegevoegd. Een titratie van een dergelijke suspensie geeft daarom gemakkelijk onjuiste en slecht reproduceerbare curven met toevallige "buigpunten". Het onregelmatige verloop van de curven zoals gevonden door BROWN en COLLET (1938) en GILLAM (1940), evenals het zeer traag constant worden van de pH na iedere loog-toevoeging is hoogstwaarschijnlijk dan ook deels of zelfs geheel het gevolg van een langzame en onvolledige dispergering van de huminezuren.

Ook MARSHALL en PATNAIK (1953) constateerden een langzame evenwichtsinstelling van de pH, alhoewel zij toch niet uitgingen van droge huminezuren maar van een suspensie verkregen door electrodialyse van natriumhumaten. PUUSTJÄRVI (1955) vermeldt dit verschijnsel eveneens maar uit zijn betoog is niet op te maken of hij dit alléén waarnam bij uitgaan van een suspensie van droge huminezuren of ook bij terugtitreren van een natriumhumaatoplossing met zoutzuur. Verder vond Puustjärvi een zekere hysterese bij vergelijking van de curven verkregen door titratie van een suspensie van droge huminezuren met loog en die verkregen door terugtitreren van de natriumhumaatoplossing met zoutzuur. Een mogelijke verklaring voor deze verschijnselen levert het onderzoek van MARTIN en REEVE (1958). Deze toonden zeer duidelijk de noodzaak aan te werken met preparaten die vrij zijn van metaalionen, in het bijzonder van die van Al, aangezien deze, zoals bekend (o.a. VAN DIJK, 1959), niet alleen het verloop van de titratiecurve sterk kunnen beïnvloeden, maar ook de vermelde hysterese kunnen veroorzaken.

Een mogelijke foutenbron die bij sommige van de bovengenoemde onderzoekers de resultaten van de titraties vrij sterk kan hebben beïnvloed, is de storende invloed van zuurstof en kooldioxide uit de atmosfeer. Vooral bij pH's groter dan 7 kunnen door oxidatie met luchtzuurstof nieuwe zuurgroepen worden gevormd waardoor merkbare pH-dalingen optreden resp. het base-verbruik wordt vergroot.

5.2.1.2. Experimenteel gedeelte

Voor de titratie werd gebruik gemaakt van de pH-meter No. 22 van Radiometer, aanvankelijk uitgerust met de glaselectrode G 202 BT en de verzadigde calomelelectrode K 401, later met de glaselectrode G 202C en de calomelelectrode K 100. De temperatuur werd steeds op 25°C ± 0,1 gehouden met behulp van een rondpomp-thermostaat aangesloten op een dubbelwandig titratievat. Aanvankelijk werd een 5 ml. microburet gebruikt, verdeeld in 0,01 ml., later de Metrohm handburet E 274 van 5 ml, verdeeld in 0,005 ml. Alle titraties werden uitgevoerd in een N_2-atmosfeer. Roeren geschiedde met behulp van een magneetroerder.

Getitreerd werd o.a. met natriumhydroxide, bariumhydroxide en enkele quaternaire ammoniumbasen nl. N-methylchininiumhydroxide, N-methyl bruciniumhydroxide en tetrabutylammoniumhydroxide.

De beide eerstgenoemde organische basen werden bereid door methyljodide toe te voegen aan een aetherische oplossing van chinine resp. brucine en de gevormde jodiden, opgelost in water, te percoleren over een kolom Amberlite IRA 400 in OH-vorm. Tetrabutylammoniumjodide werd als zodanig betrokken van de firma Schuchardt en op dezelfde wijze als de hiervoor genoemde jodiden in de vrije base omgezet.

De gebruikte base-oplossingen waren alle 0,2 à 0,3 N. De volumetoename als gevolg van base-toevoeging tijdens de titratie was betrekkelijk klein (maximaal 5 %). Hiervoor werd geen correctie aangebracht.

De huminezuuroplossingen werden als volgt gemaakt: 2,5 g huminezuren, in vacuo boven P_2O_5 gedroogd, werden opgelost in ca. 35 ml van een 0,25 N. natriumhydroxideoplossing. Deze oplossing werd met water aangevuld tot 100 ml en dan gepercoleerd over een kolom goed met water gewassen kationenuitwisselaar Amberlite I.R. 120 in H^+-vorm, zodat de Na^+-ionen kwantitatief werden verwijderd. De verkregen huminezuuroplossing werd opgevangen in een maatkolf van 250 ml. De kolom werd nagewassen met water waarbij de huminezuren practisch kwantitatief uit de kolom worden verwijderd en in de maatkolf worden opgevangen. Tenslotte wordt aangevuld tot 250 ml. Hierdoor is dan een 1 %-ige stabiele, volledige homogene huminezuuroplossing verkregen die ook na lang staan niet uitvlokt. Voor de titraties werd hiervan 10 ml in het titratievat gepipetteerd en verdund met

precies 50 ml water.

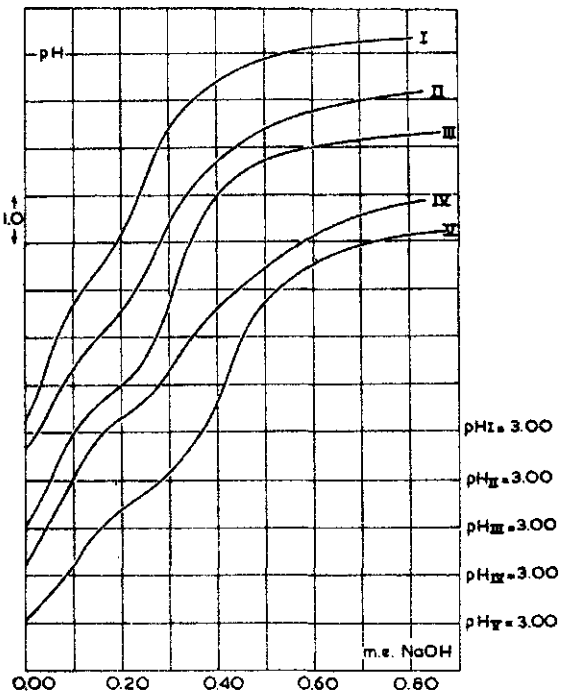
Bij deze werkwijze bleek de pH na elke base-toevoeging constant te zijn, zodra de oplossing weer homogeen was hetgeen in het algemeen binnen 30 sec. het geval was.

5.2.1.3. Resultaten en discussie

In figuur 1 zijn de titratiecurven van enkele huminezuren verkregen bij titratie met NaOH weergegeven (met KOH worden nagenoeg identieke curven verkregen). Alle huminezuren, inclusief de synthetische, geven bij titratie met alkalihydroxide soortgelijke curven. Wat betreft hun vorm komen de curven vrij goed overeen met die verkregen door PUUSTJÄRVI (1955) bij terugtitreren van een natriumhumaatoplossing met zoutzuur. Enkele huminezuren werden na titratie met base tot pH 12 met zoutzuur teruggetriteerd. Het hierbij gevonden geringe verschil tussen beide curven kan geheel worden verklaard als een zouteffect, een werkelijke hysterese werd niet waargenomen. De door Puustjärvi geconstateerde hysterese heeft hoogstwaarschijnlijk dan ook niets te maken met een of andere specifieke eigenschap of chemische reactie van de huminezuren, zoals door hem werd verondersteld.

De min of meer schuin verlopende curven vertonen twee steilere gedeelten waarop zich een buigpunt bevindt. (Het feit dat het eerste buigpunt niet wordt geëlimineerd door methylering of acetylering wijst er volgens GILLAM (1940) op dat we hier inderdaad te doen hebben met COOH-groepen). De interpretatie van Puustjärvi, nl. dat dit curven zijn van éénbasische zuren, is onjuist. De pK zou volgens hem gelijk zijn aan de pH waarbij maximale bufferende werking optreedt, d.i. midden tussen beide buigpunten. Integendeel, de gevonden curven zijn typisch voor een polydibasisch zuur als $R(COOH)_x(OH)_y$. De pK's van de COOH-groepen lopen naar het schijnt uiteen van ongeveer 3,5 tot ca. 4,5 à 5, die van de OH-groepen van ca. 6 à 6,5 tot ongeveer 9. Het onderling verschil tussen de K's van de COOH-groepen en dat tussen de K's van de OH-groepen is kennelijk te klein om voor elk van de zuurgroepen afzonderlijk een buigpunt te geven in de curve. Het verschil tussen de K van de zwakst zure COOH-groep en die van de sterkst zure OH-groep is echter blijkbaar meestal voldoende groot om, zij het niet scherp, in de curve aparte buigpunten te geven voor COOH- en voor OH-groepen. Dat de humine-

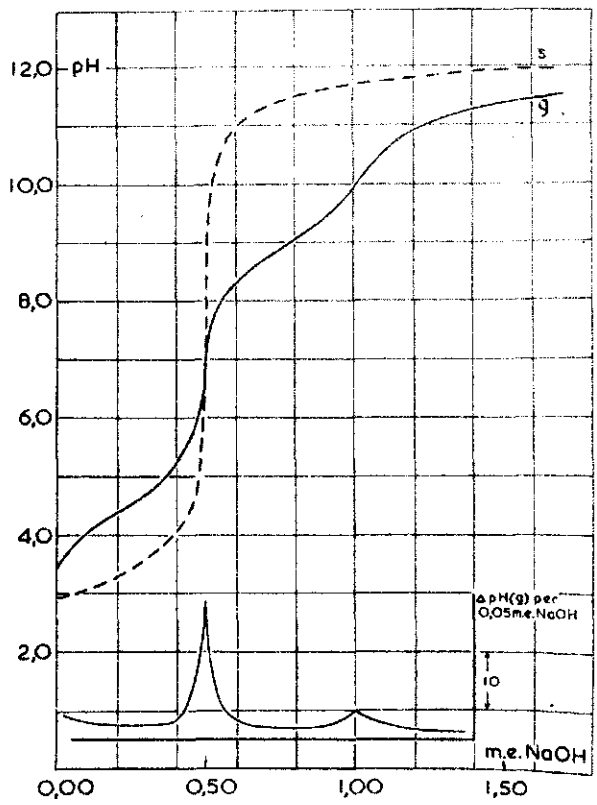
zuren per deeltje méér dan één COOH-groep bezitten blijkt uit het feit dat het eerste steilere stuk in de curve verre van vertikaal is. Het is in principe wél mogelijk (alhoewel niet waarschijnlijk) dat y gelijk 1 is. Het niet vertikaal zijn van het tweede steilere stuk in de curve kan namelijk, zoals opgemerkt in de inleiding, ook een gevolg zijn van hydrolyse.



Figuur 1. Potentiometrische titratie van 100 mg huminezuren, opgelost in 60 ml water, met NaOH.

Huminezuren: I - uit zwartveen (No. 116)
II - uit hydrochinon + NH_4OH (No. IIb)
III - uit rodoorn (No. 094B -"braun")
IV - uit pyrogallol + NH_4OH (No. III)
V - uit zandgrond (No. 113)

Ter vergelijking zijn in figuur 2 de curven weergegeven, verkregen bij titratie van salicylzuur en galluszuur. De titratiecurve van protocatechuzuur (niet ingetekend in figuur 2) is vrijwel identiek met die van galluszuur. Bij alle drie zuren treedt bij het equivalentiepunt van de carboxylgroep een grote pH-sprong op waardoor de curve daar een nagenoeg verticaal gedeelte heeft. De OH-groep van salicylzuur is te zwak zuur om op deze wijze te kunnen worden getitreerd. Bij

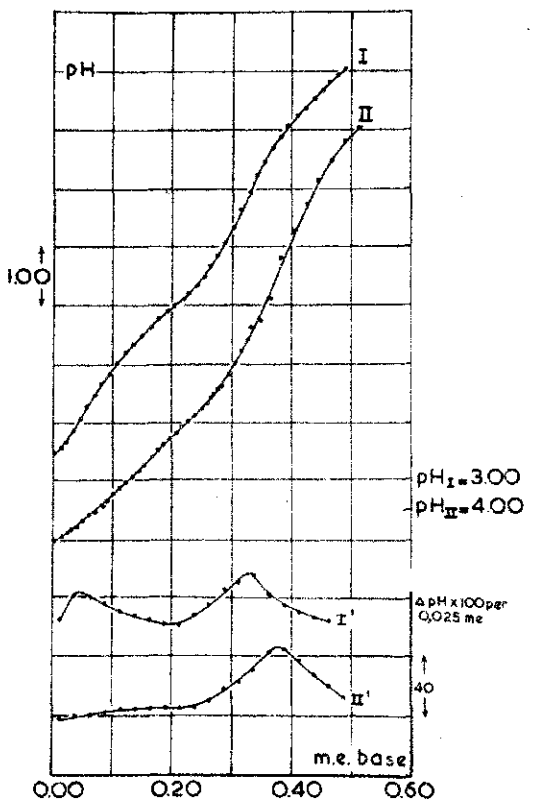


Figuur 2. Potentiometrische titratie van 0,5 mmol salicylzuur (s) en galluszuur (g), opgelost in 60 ml water, met NaOH.

protocatechuzuur en galluszuur treedt een tweede buigpunt op in de curve wanneer één OH-groep is geneutraliseerd. Het verloop van de curve wijkt hier echter sterk af van verticaal. De tweede en derde OH-groep zijn blijkbaar te zwak zuur om een buigpunt op te leveren. (misschien is het juister om te zeggen dat 2 naburige OH-groepen samen "sterk genoeg zuur zijn" om één proton af te splitsen waarna ze het overblijvende samen "delen").

Uit het bovenstaande volgt dus dat het eerste buigpunt bij huminezuren niet zondermeer mag worden geïnterpreteerd als het punt waarbij alle COOH-groepen zijn geneutraliseerd. Dit zou het immers alleen dan zijn, als per deeltje slechts één COOH-groep aanwezig was (wat ook op grond van andere gegevens onwaarschijnlijk is). Het equivalentiepunt voor de gezamenlijke COOH-groepen zal dus iets verder op de curve liggen dan het eerste buigpunt. Uit de ligging van het buigpunt kan men echter althans de maximumwaarde voor het equiva-

lentgewicht betrokken op COOH-groepen berekenen. Evenzo levert het tweede buigpunt een maximumwaarde voor het equivalentgewicht betrokken op OH-groepen. Om de plaats van de (tamelijk onscherpe) buigpunten zo goed mogelijk vast te stellen werd door de gevonden meetpunten een vloeiende curve getrokken. Van deze curven werd een differentiële titratiecurve afgeleid door de pH-stijging per constant aantal m.e. toegevoegde base af te lezen en uit te zetten tegen m.e. toegevoegde base. In figuur 2 is voor galluszuur en in figuur 3 is voor een der huminezuren deze differentiële titratiecurve ingetekend. In tabel 6 (§5.4) zijn voor de verschillende huminezuren de uit de ligging van het eerste buigpunt berekende "maximum-equivalentgewichten" betrokken op COOH-groepen weergegeven. (Dat deze misschien ook nog om een andere dan de genoemde reden te hoog kunnen zijn wordt aan het eind van 5.2.2.3. besproken).



Figuur 3. Potentiometrische titratie van 100 mg huminezuren uit zandgrond (No. 114), opgelost in 60 ml water, met NaOH (I) en met $Ba(OH)_2$ (II).

De curven verkregen bij titratie met de basen van de aardalkalimetalen wijken vrij sterk af van die verkregen bij titratie met alkalihydroxide. Ter illustratie hiervan is in figuur 3 tevens de titratiecurve bij gebruik van $Ba(OH)_2$ en de hieruit grafisch verkregen differentiële titratiecurve weergegeven. Bij vergelijking van de beide pH-curven valt sterk op dat bij titratie met $Ba(OH)_2$ het eerste buigpunt verdwenen is. Vergelijkt men de beide differentiële curven (I' en II'), dan blijkt dat bij het met $Ba(OH)_2$ gevonden buigpunt meer base is verbruikt dan bij het met NaOH gevonden tweede buigpunt.

Ook door ZADMARD (1939), GILLAM (1940) en MARSHALL en PATNAIK (1953) wordt gewezen op de invloed van de gebruikte base op de titratiecurve. Zadmard schrijft dit onder meer toe aan het verschil in hydrolyse bij alkali- en aardalkalihumaten. TENDELOO en NIERSTRASS (1935) menen dat "de humus veel meer waterstofionen kan opleveren, dan door titratie met sterke basen is te bepalen". Het verschil tussen titratie met NaOH en met $Ca(OH)_2$ zou daardoor worden veroorzaakt, dat de Ca-ionen meer H-ionen verdringen van het "adsorptiecomplex" (die dan door OH-ionen worden weggenomen) dan de Na-ionen. Hier, bij huminezuren, zou men dit zo kunnen vertalen dat geen of minder hydrolyse optreedt bij Ca-humaten dan bij Na-humaten doordat het ionenproduct van Ca-humaten klein zou zijn. Inderdaad is dit een reële mogelijkheid. Overigens hebben Tendeloo en Nierstrass de titratie niet tot het eind doorgevoerd en in feite alleen aangetoond dat de humus meer H-ionen kan opleveren dan er bij titratie met sterke basen tot pH ca. 7 worden geneutraliseerd.

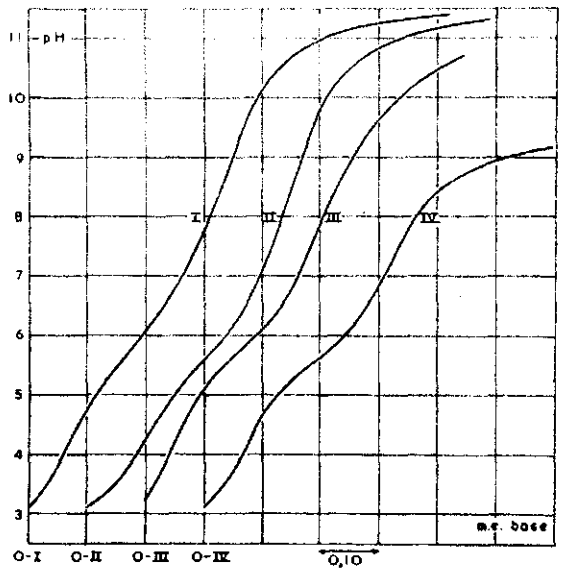
Dat er inderdaad een belangrijk verschil in ionisatie en hydrolyse bij alkali- en aardalkalihumaten optreedt zal straks nog duidelijk blijken o.a. bij conductometrische titratie. Dit kan ongetwijfeld van invloed zijn op de curven verkregen bij potentiometrische titratie, met name op de ligging van het tweede buigpunt.

BROADBENT en BRADFORD (1952) schrijven het verschil in uitwisselingscapaciteit bij gebruik van basen van verschillende waardigheid gedeeltelijk toe aan de vorming van inwendige complexen, maar menen dat ook sterische effecten hierbij een rol spelen. Wat het laatste betreft noemen BLOM c.s. (1957) de mogelijkheid dat zuurgroepen zodanig geïsoleerd kunnen zitten, dat ze niet samen met een naburige zuurrestgroep van het huminezuur een tweewaardig kation kunnen binden.

HEIMANN (1929) vermeldt dat de uitwisselingscapaciteit van huminezuren, indien bepaald met chinine of chinidine resp. 30 en 70 % lager was dan indien bepaald met NaOH. Dit wordt door hem ook aan sterische hindering toegeschreven. Als dit inderdaad het geval zou zijn, dan zou het een zeer waardevolle informatie geven over de structuur van huminezuren. Heimann werkte echter met een suspensie van droge huminezuren en verder realiseerde hij zich blijkbaar niet dat tertiaire aminen als chinine en chinidine te zwak basisch zijn om de huminezuren volledig te kunnen "neutraliseren".

Om de theorie van Heimann nader te toetsen titreerden wij enkele huminezuren met de quaternaire ammoniumbasen methylchininiumhydroxide, methylbruciniumhydroxide en tetrabutylammoniumhydroxide.

De verkregen titratiecurven bleken echter vrijwel identiek te zijn met die verkregen met NaOH (figuur 4, curve I, II, III). Met een zwakke base als ammonia (curve IV) blijken inderdaad de zeer zwak zure functies niet te kunnen worden getitreerd. Bij goed gedispergeerde huminezuren bevinden dus alle zuurgroepen zich in zodanige



Figuur 4. Potentiometrische titratie van 100 mg huminezuren uit veenkoloniale grond (No. 082I), opgelost in 60 ml water, met N-methylchininiumhydroxide (I), N-methylbruciniumhydroxide (II), natriumhydroxide (III) en ammonia (IV).

posities dat ze ook zeer grote organische kationen kunnen binden. In dit opzicht is van hindering dus geen sprake. Op de invloed van de gebruikte base op het eindpunt van de titratie komen we aan het slot van § 5.2.2.3. nog terug.

Op het wegvallen van het eerste buigpunt bij titratie met bariumhydroxide is niet eerder de aandacht gevestigd. Ter verklaring zou men kunnen denken aan een verschillende wijze van kationenbinding. Indien namelijk tweewaardige kationen met één valentie gebonden worden aan de anionen van de sterker zure groepen ($-COO^-$?) en met één valentie aan de anionen van de zwakker zure groepen ($-O^-$ afkomstig van fenolische OH-groepen?) dan zou daardoor het verschil in zuursterkte van deze groepen gemaskeerd worden. Inderdaad wijzen sommige waarnemingen die in hoofdstuk 6 nog worden besproken duidelijk in deze richting.

Resumerend kan dus gezegd worden dat de curven verkregen door potentiometrische titratie van huminezuren, opgelost in water, met alkalihydroxiden er duidelijk op wijzen dat we te doen hebben met polydibasische zuren.

Aan de (onscherpe)buigpunten in de curven mogen hoogstens maximumwaarden voor de equivalentgewichten betrokken op de "COOH"- en op de "OH"-groepen worden ontleend.

Titratie met bariumhydroxide geeft een curve met slechts één buigpunt. Bij dit buigpunt is iets meer base verbruikt dan bij titratie met alkalihydroxide. Ter verklaring hiervan werden verschillende hypothesen gegeven.

Titratie met organische basen met zeer grote kationen levert dezelfde curven als titratie met alkalihydroxide. Alle zuurgroepen zijn dus bij opgeloste huminezuren zeer goed bereikbaar voor kationen.

5.2.2. Conductometrische titraties

5.2.2.1. Inleiding. Mogelijkheden van deze titratiemethode

Zoals vermeld in 4.1.2. werden door enkele onderzoekers conductometrische titraties van huminezuren in waterige oplossing uitgevoerd ter bepaling van alle zuurgroepen gezamenlijk. Daarbij bleek het eindpunt vrij nauwkeurig te kunnen worden vastgesteld. In de literatuur vonden wij echter geen enkele poging vermeld de verschillende typen zuurgroepen te onderscheiden en te bepalen door

middel van conductometrische titratie. Dit is merkwaardig aangezien de mogelijkheden die deze titratie hiervoor biedt groter zijn dan die van de potentiometrische titratie (voor een algemeen overzicht zie bijv. BERL, 1951a). De perspectieven van deze titratie voor de analyse van huminezuren zijn de volgende:

De potentiometrische titratie leverde het beeld van een polybasisch zuur R. $(COOH)_x.(OH)_y$ met pK's voor de COOH-groepen oplopend van ongeveer 3,5 tot 4,5 à 5 (dus K-waarden van ca. 3,2 x 10^{-4} tot ca. 3,2 x 10^{-5}) en pK's voor de OH-groepen oplopend van ongeveer 6 à 6,5 tot ca. 9 (K van ca. 10^{-6} tot 10^{-9}). Nu leveren zuren met een pK tussen 1 en 4 bij conductometrische titratie met alkalihydroxide meestal een curve op die in het begin sterk gebogen is. Dikwijls is het rechte gedeelte dat men krijgt vóór het equivalentiepunt te kort om door grafische extrapolatie het snijpunt (= equivalentiepunt) met het rechte stuk na het passeren van dit punt voldoende nauwkeurig vast te stellen. Mede hierdoor is het dan ook niet erg waarschijnlijk dat het punt waar de laatste COOH-groep bij huminezuren is geneutraliseerd op deze wijze kan worden gevonden.

In dit opzicht lijkt er meer kans te bestaan dat de neutralisatiecurve van de OH-groepen over voldoende afstand recht zal zijn om grafisch het eindpunt hiervan vast te stellen. Deze groepen zijn namelijk zeer zwak zuur. Zodra dus een deel ervan geneutraliseerd is zal het ontstane anion de dissociatie van de overige zuurgroepen geheel terugdringen. Dan wordt het specifiek geleidingsvermogen dus niet meer door afgesplitste H^+-ionen beïnvloed, maar wordt deze geheel bepaald door de bij voortgaande titratie geleidelijk toenemende zoutconcentratie. Voordat het eindpunt van de titratie is bereikt treedt er echter een nieuwe complicatie op door hydrolyse van het ontstane zout. Hierdoor neemt het geleidingsvermogen sneller toe. De overgang bij het eindpunt wordt daardoor niet gekenmerkt door een scherpe knik maar door een meer of minder flauwe bocht in de curve. Indien de titratie wordt uitgevoerd met alkalihydroxide dan komt daar nog bij dat de hoek tussen het rechte stuk van de neutralisatiecurve en de curve na het eindpunt altijd zeer groot is. Door dit complex van verschijnselen wordt de nauwkeurige vaststelling van het eindpunt sterk bemoeilijkt en kan deze zelfs onmogelijk worden.

Voor de beide laatstgenoemde moeilijkheden is er echter in principe een uitstekende oplossing. Men moet dan titreren met een

base die bij neutralisatie van het huminezuur een onoplosbaar (niet of slecht geïoniseerd) zout geeft. De base moet echter sterk genoeg zijn om alle zuurgroepen te kunnen neutraliseren. Uit het onderzoek van SCHEELE en ROWE (1936) en van SANDHOFF (1954) blijkt dat bariumhydroxide aan deze voorwaarden voldoet. Het deel van de curve overeenkomend met de neutralisatie van de OH-groepen verloopt dan veel vlakker, doordat het zeer weinig geïoniseerde bariumhumaat practisch geen bijdrage levert aan het geleidingsvermogen. De knik in de curve bij het eindpunt is veel scherper doordat hydrolyse niet of hoogstens in geringe mate optreedt (feitelijk kan men dit dus evengoed een neerslagtitratie noemen).

Voor de afzonderlijke bepaling van de COOH-groepen levert dit echter nog geen oplossing. Hiervoor bestaan de volgende mogelijkheden:

a. Zoals opgemerkt zijn de equivalentiepunten van een polybasisch zuur bij titratie met alkalihydroxide als gevolg van het optreden van hydrolyse dikwijls moeilijk scherp vast te stellen. In sommige gevallen verkrijgt men dan betere resultaten door uit te gaan van het alkalizout van dit zuur en dit terug te titreren met een sterk zuur.

b. Men kan proberen een base te vinden die sterk genoeg is om alle COOH-groepen te neutraliseren maar te zwak om hetzelfde te doen met de OH-groepen. Daartoe moeten echter de pK van de zwakst zure COOH-groepen en die van de sterkst zure OH-groep ongeveer bekend zijn en tamelijk ver uiteenliggen. Fraaie resultaten zijn van deze methode niet te verwachten. Des te zwakker de base des te meer last krijgt men immers van hydrolyse.

c. De storende invloed van hydrolyse van het gevormde zout treedt sterker op naarmate het zuur dat getitreerd wordt zwakker is. In vele gevallen zou een titratiecurve van een meerbasisch zuur wel scherpere knikpunten vertonen als de dissociatieconstanten maar minder klein waren m.a.w. als de dissociatie-evenwichten:

$$H_nZ + H_2O \rightleftharpoons H_3O^+ + H_{n-1}Z^-$$

$$H_{n-1}Z^- + H_2O \rightleftharpoons H_3O^+ + H_{n-2}Z^{--}$$ etc. maar naar rechts verschoven werden. Om dit te bereiken voegen GASLINI en NAHUM (1959) aan de oplossing van het te titreren zuur in water een overmaat ammonia toe. NH_3 heeft immers een veel grotere affiniteit voor protonen dan H_2O. Gaslini en Nahum berekenen dat een zuur dat in water

opgelost een K heeft van 10^{-10}, in verdunde ammoniakale oplossing bij benadering een K heeft van 10^{-1}. De gevormde NH_4^+-ionen titreren zij met lithiumhydroxide. Een aantal twee-basische zuren met een kleine K_1 en een zeer kleine K_2, die in water opgelost niet getitreerd konden worden, bleken in ammoniakale oplossing een titratiecurve met twee duidelijke knikpunten te geven.

Deze titratiemethoden heeft bij huminezuren nog een ander belangrijk perspectief: Bij voldoende overmaat ammonia zullen misschien de protonen van alle COOH-groepen zijn afgesplitst (in NH_4^+ omgezet). Hierdoor zou dus het onderlinge verschil in dissociatieconstanten opgeheven zijn; alle COOH-groepen gedragen zich dan sterk zuur. Titratie hiervan zal dus een rechte lijn opleveren. Uiteraard mogen hierbij niet tevens van de sterkst zure OH-groepen de protonen geheel zijn afgesplitst in de ammoniakale oplossing, anders zou immers het verschil tussen de COOH- en deze OH-groepen ook genivelleerd zijn. Ook hier komt dus weer de voorwaarde om de hoek dat het verschil tussen de K van de zwakst zure COOH-groep en de K van de sterkst zure OH-groep niet te klein mag zijn. Indien ammonia een te sterke verschuiving van de dissociatie-evenwichten mocht geven en daardoor een gedeeltelijke nivellering van COOH en OH, dan kan een zwakkere base geprobeerd worden.

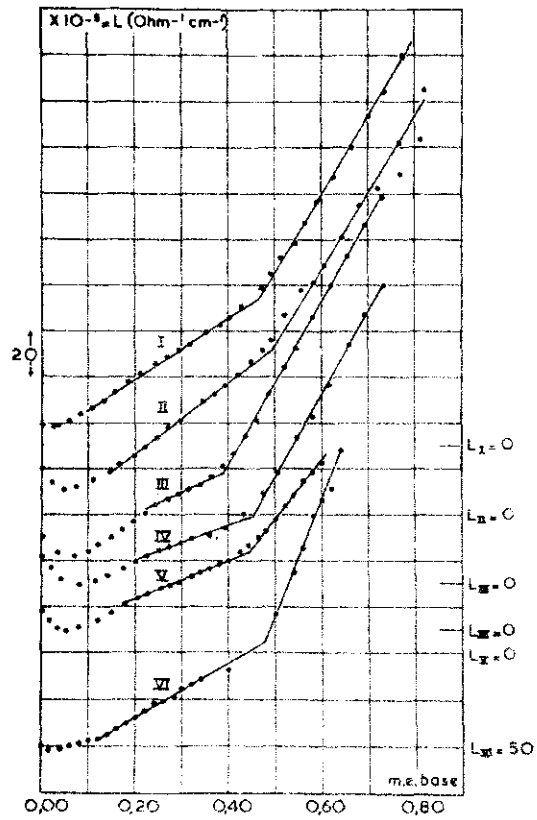
5.2.2.2. Experimenteel gedeelte

Alle titraties werden uitgevoerd met behulp van de Philips meetbrug GM 4249 (1000 $^c/$ sec) en de Philips dompelcel PR 9512/900, voorzien van geplatineerde Pt-electroden. De omstandigheden waren verder dezelfde als bij de potentiometrische titratie beschreven in 5.2.1.2. Als vergelijkingsobjecten dienden weer zuren als salicylzuur, galluszuur e.d. Voorzover er eindpunten konden worden vastgesteld werd dit gedaan door grafische extrapolatie van de rechte curvegedeelten vóór en na het eindpunt. Voor de betrekkelijk geringe verdunning als gevolg van base-toevoeging werd niet gecorrigeerd. (Deze correctie heeft immers alleen betrekking op het geleidingsvermogen wat ons minder interesseert en niet op het aantal m.e. base dat wordt verbruikt).

De titrantoplossingen waren weer 0,2 à 0,3 N en bereid uit zuivere, eventueel gezuiverde handelschemicaliën (voorzover verkrijgbaar "pro analysi").

5.2.2.3. Resultaten en discussie

In figuur 5 zijn de curven (I - V) van enkele huminezuren verkregen bij titratie met alkalihydroxide weergegeven. In het begin daalt het specifiek geleidingsvermogen vrij sterk doordat de H_3O^+-ionen worden vervangen door alkali-ionen. Daarna vertoont de curve een stijging. De overgang van dalend naar stijgend was in verschillende gevallen dermate scherp dat aanvankelijk werd vermoed dat deze huminezuuroplossingen nog verontreinigd waren met zoutzuur. Bij controle bleek dit echter niet het geval te zijn, zodat de vraag opkwam of deze overgang wellicht te maken had met een overgang van COOH- op OH-groepen bij de titratie, vooral ook omdat dit punt in hetzelfde gebied ligt als het eerste buigpunt in de potentiometrisch verkregen

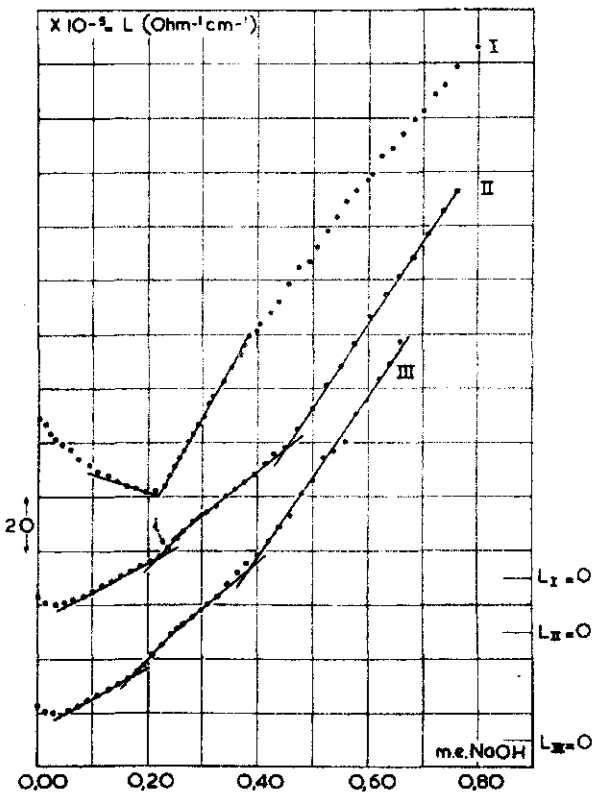


Figuur 5. Conductometrische titratie van 100 mg huminezuren, resp. Na-humaten, opgelost in 60 ml water, met alkalihydroxide resp. zoutzuur.

Huminezuren:	I	- uit pyrocatechol + NH_4OH (No. IV);	titr.	met	KOH
	II	- uit pyrocatechol + NaOH (No. VI);	"	"	"
	III	- uit rodoorn (No. 094 B-"braun");	"	"	"
	IV	- uit bosveen (No. 123b);	"	"	"
	V	- uit veenkoloniale grond (No. 082 I);	"	"	NaOH
	VI	- 100 mg 082 I + 0,48 m.e. NaOH;	"	"	HCl

titratiecurve. Op deze vraag is niet zonder meer uitsluitsel te geven omdat een dergelijk verloop heel vaak optreedt bij organische zuren. Zo blijkt bijv. uit figuur 6 dat protocatechuzuur en galluszuur eveneens een dergelijke curve geven (zij het dat de overgang hier minder scherp is) met een minimum ver voordat de COOH-groep is geneutraliseerd.

Na de zojuist besproken overgang neemt het specifiek geleidingsvermogen toe. Bij vele titratiecurven van huminezuren (o.a. III, IV en V in figuur 5) viel het op dat de aanvankelijke toename per m.e. toegevoegde base na toevoeging van méér base weer iets kleiner wordt. Dit verschijnsel werd ook gesignaleerd door SCHEELE en ROWE (1936). Een eenvoudige verklaring zou zijn dat naarmate de concentratie aan Na^+-ionen toeneemt, de dissociatie van de zuurrest-Natrium-binding wordt teruggedrongen. Daardoor zou immers de concentratie aan gedissocieerd zout (en dus het geleidingsvermogen) niet lineair toenemen met het aantal m.e. toegevoegde NaOH.

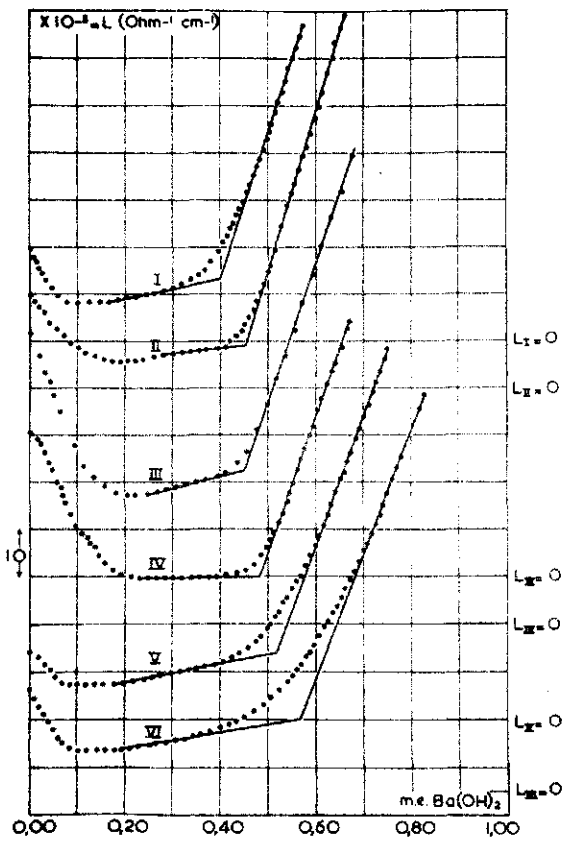


Figuur 6. Conductometrische titratie van 0,25 mmol salicylzuur (I), 0,25 mmol protocatechuzuur (II) en 0,17 mmol galluszuur (III), opgelost in 60 ml water met NaOH.
(i = omslagpunt broomthymolblauw).

Tenslotte gaat de curve na het passeren van het punt waar alle zure groepen zijn getitreerd, tamelijk steil naar boven als gevolg van de toenemende concentratie aan vrije OH-ionen. Door het enigszins onregelmatige verloop vóór het eindpunt, de optredende hydrolyse tegen het eind van de titratie en de grote hoek tussen beide curvegedeelten vóór en na het eindpunt is dit punt moeilijk scherp vast te stellen.

Titratie van een natriumhumaatoplossing met zoutzuur (figuur 5, curve VI) geeft een soortgelijke curve als titratie van het vrije huminezuur met NaOH. Hetzelfde kan worden vermeld van titraties van huminezuuroplossingen van lagere en hogere concentratie.

Het verloop van de titratiecurve verkregen met $Ba(OH)_2$ wijkt sterk af van dat verkregen met alkalihydroxide (figuur 7. N. B. L is in



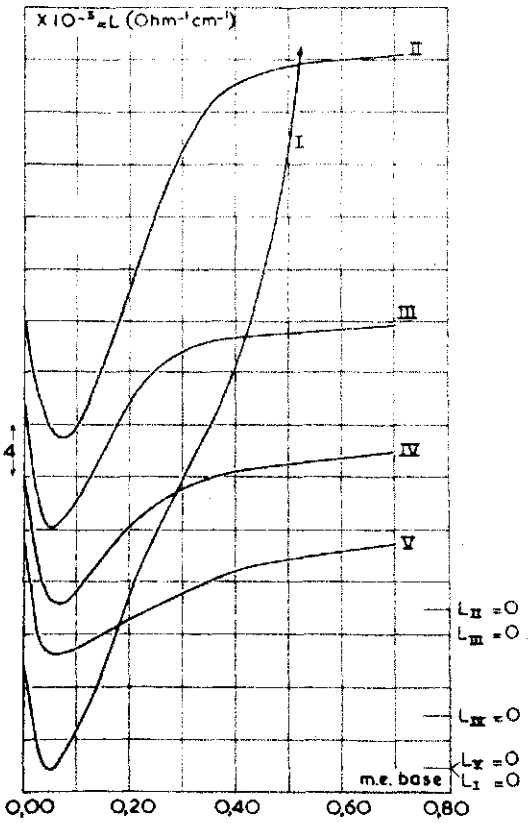
Figuur 7. Conductometrische titratie van 100 mg huminezuren opgelost in 60 ml water met $Ba(OH)_2$.

Huminezuren: I - uit zwartveen (No. 116)
II - uit zandgrond (No. 114)
III - uit zavel (No. 115)
IV - uit bosveen (No. 123b)
V - uit pyrocatechol + NH_4OH (No. IV)
VI - uit pyrocatechol + NaOH (No. VI)

figuur 7 op een 2 x zo grote schaal uitgezet als in figuur 5). De aanvankelijke daling van het geleidingsvermogen zet zich verder voort dan bij NaOH, waarna de curve vrijwel horizontaal gaat lopen. Gezien dit verloop rees de vraag of de grootte van de door SCHEELE (1936) en SANDHOFF (1954) toegepaste correctie voor vrij zoutzuur wel juist is. Deze onderzoekers verkregen namelijk soortgelijke curven en namen daarbij aan dat het ombuigen van de curve van dalend naar horizontaal het punt aangeeft waar het in hun geval inderdaad aanwezige vrije zoutzuur was geneutraliseerd. Hier blijkt echter dat ook in afwezigheid van minerale zuren een dergelijk curveverloop wordt verkregen. Ter controle werd eveneens een titratie uitgevoerd van huminezuren in aanwezigheid van een kleine hoeveelheid zoutzuur. Inderdaad bleek dat het eerste knikpunt optreedt als reeds meer base is verbruikt dan overeenkomt met de toegevoegde hoeveelheid zoutzuur. De door genoemde auteurs toegepaste correctie voor vrij zoutzuur is dus waarschijnlijk te groot geweest.

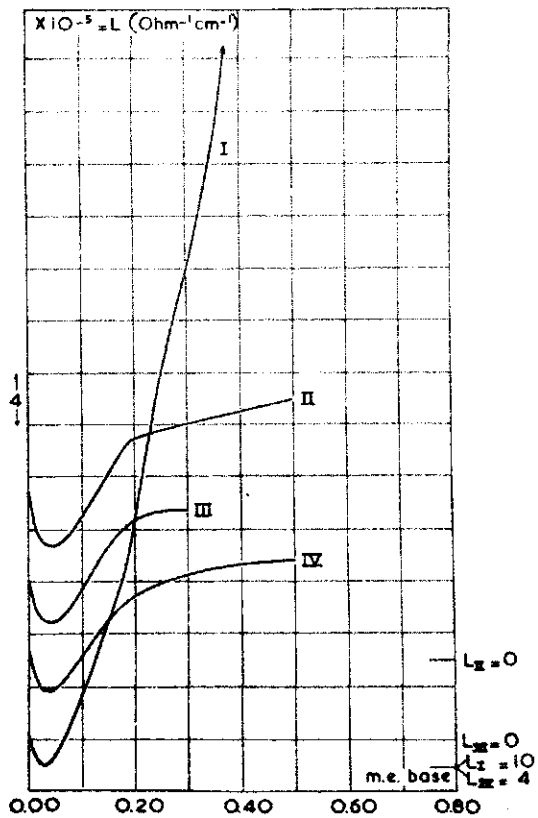
Na het horizontale gedeelte volgt weer een overgang naar een vrij sterk stijgend curvedeel, veroorzaakt door vrije base. De overgang is, zoals voorspeld, in het algemeen scherper dan bij titratie met alkalihydroxide en het eindpunt is dan ook meestal beter vast te stellen. Verder is er (zie slot van deze paragraaf) aanleiding om aan te nemen dat het met $Ba(OH)_2$ verkregen knikpunt een juistere benadering is van het equivalentiepunt dan het met NaOH of KOH gevonden knikpunt. In tabel 6 zijn de door titratie met $Ba(OH)_2$ gevonden equivalentgewichten en "uitwisselingscapaciteiten" van alle onderzochte huminezuren weergegeven (§ 5.4.).

Pogingen de COOH-groepen afzonderlijk te bepalen door titratie met een base die te zwak is om de OH-groepen te neutraliseren hadden het volgende resultaat: In figuur 8 zijn de curven weergegeven verkregen bij titratie van één der huminezuren met ammonia ($K_b = 1,8 \times 10^{-5}$), triethanolamine ($K_b = 5,9 \times 10^{-7}$), α-picoline ($K_b = 3 \times 10^{-8}$) en pyridine ($K_b = 2,3 \times 10^{-9}$). Ter vergelijking is tevens de curve bij titratie met NaOH in deze figuur opgenomen. In alle curven verkregen met zwakke basen treedt evenals bij titratie met NaOH een minimum op. Hetzelfde vonden we ook bij titratie van galluszuur met deze zwakke basen waarbij het minimum weer optreedt ver voordat de COOH-groepen zijn geneutraliseerd (figuur 9)!



Figuur 8. Conductometrische titratie van 100 mg huminezuren uit veenkoloniale grond (No. 082 I), opgelost in 60 ml water, met NaOH (I), ammonia (II), triethanolamine (III), α-picoline (IV), pyridine (V).

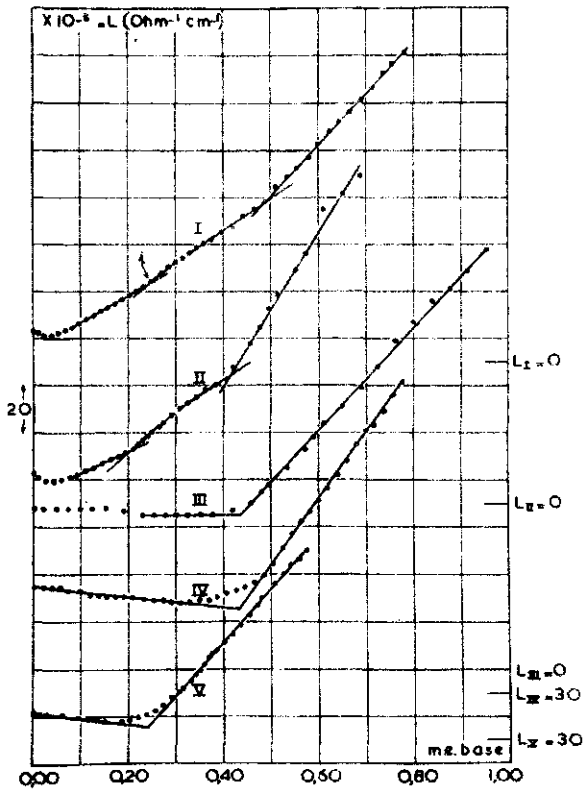
Na de minima in de curven van figuur 8 volgt eerst een stijging van het geleidingsvermogen en daarna buigen de curven af naar horizontaal. Zoals te verwachten is de helling van het stijgend curvestuk flauwer en treedt de afbuiging naar horizontaal eerder op naarmate de gebruikte base zwakker is. Er is echter geen aanwijzing dat bij een bepaalde sterkte van base alleen COOH-groepen zouden worden getitreerd. Het ombuigen naar horizontaal gaat bij α-picoline dermate geleidelijk dat er ook bij galluszuur (figuur 9) ten aanzien van deze vraag geen conclusie geoorloofd is. Bij galluszuur + triethanolamine is er een vrij scherp knikpunt. De bij dit punt verbruikte hoeveelheid base is groter dan overeenkomt met COOH. Deze titraties boden dus geen oplossing voor het gestelde probleem.



Figuur 9. Conductometrische titratie van 0,17 mmol galluszuur, opgelost in 60 ml water, met NaOH (I), triethanolamine (II), α -picoline (III), pyridine (IV).

Over de titraties met lithiumhydroxide in aanwezigheid van overmaat zwakke base het volgende: Figuur 10 geeft de titratiecurve van salicylzuur, protocatechuzuur en galluszuur in aanwezigheid van ammonia. Bij salicylzuur kan ook in aanwezigheid van ammonia alleen een duidelijk equivalentiepunt worden vastgesteld voor de carboxylgroep. Als gevolg van de vervanging van H_3O^+ door NH_4^+ heeft, zoals te verwachten, het eerste deel van de curve een meer horizontaal verloop. Bij protocatechuzuur en galluszuur in zuiver water kregen we bij titratie met NaOH (figuur 6) en LiOH (curve II in figuur 10), zij het onscherp, twee equivalentiepunten nl. voor de COOH-groep en voor één OH-groep. In aanwezigheid van ammonia (curve III, IV en V van figuur 10) krijgen we echter een meer horizontaal verlopend eerste deel van de curve waarbij alleen een equivalentiepunt (beter dan zonder ammonia) is vast te stellen voor de COOH + één OH-groep. De

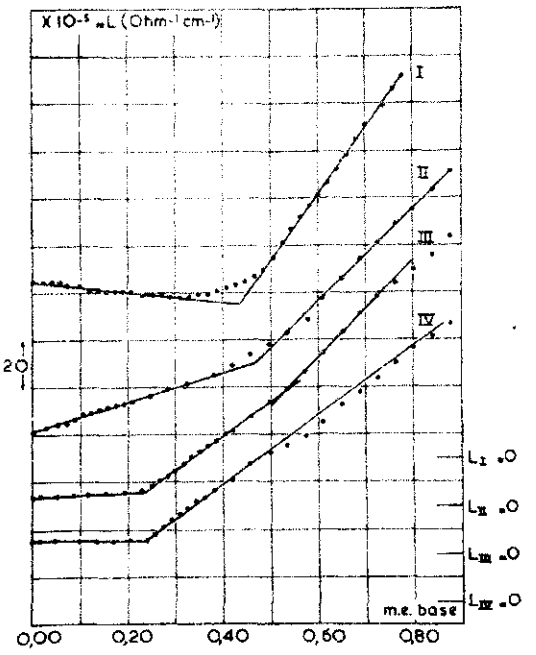
ammonia heeft dus het verschil in zuursterkte van deze COOH en OH genivelleerd.



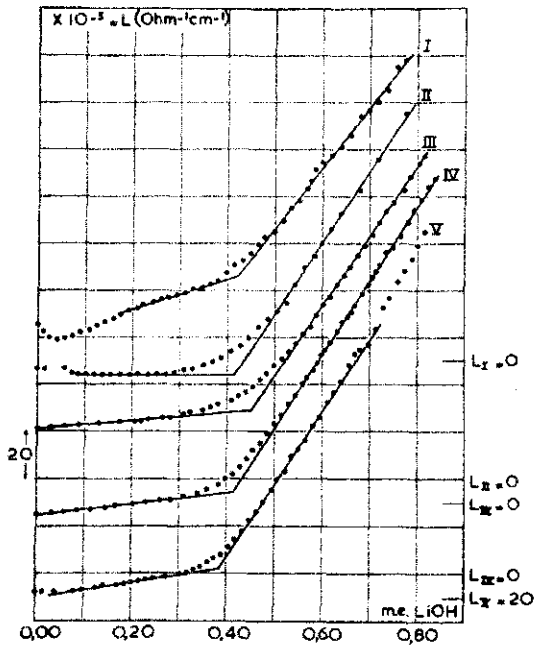
Figuur 10. Conductometrische titratie van enkele hydroxizuren in water (0,25 mmol per 60 ml).

I - protocatechuzuur met $Ba(OH)_2$ (i = omslagpunt broomthymolblauw).
II - idem met LiOH
III - idem i.a.v. 1 m.e. NH_4OH, met LiOH
IV - galluszuur i.a.v. 1 m.e. NH_4OH, met LiOH
V - salicylzuur i.a.v. 1 m.e. NH_4OH, met LiOH

In figuur 11 zijn de titratiecurven van galluszuur met lithiumhydroxide in aanwezigheid van ammonia, triethanolamine, α-picoline en pyridine weergegeven (in deze volgorde neemt de sterkte van deze "basen" af). Het blijkt dat ook triethanolamine hier nog een "levelling" effect heeft gehad. Bij α-picoline en pyridine treedt echter een knikpunt op daar waar de COOH-groep is geneutraliseerd (voor de OH-groep is niet meer nauwkeurig een knikpunt vast te stellen).



Figuur 11. Conductometrische titratie van 0,25 mmol galluszuur, opgelost in 60 ml water, waaraan 1 m.e. ammonia (I), resp. 1 m.e. triethanolamine (II), 1 m.e. α -picoline (III), 1 m.e. pyridine (IV) is toegevoegd. Titratie met LiOH.



Figuur 12. Conductometrische titratie van 100 mg (= 0,48 m.e.) huminezuren uit veenkoloniale grond (No. 082 I) opgelost in water (I), in water waaraan resp. is toegevoegd 1 m.e. ammonia (II), 1 m.e. triethanolamine (III), 1 m.e. α - picoline (IV), 1 m.e. pyridine (V). Titratie met LiOH.

De resultaten van de overeenkomstige titraties van huminezuren uit één der gronden zien we in figuur 12. Bij oplossingen van huminezuren in water (I), in water + ammonia (II) en in water + triethanolamine (III), in water + α-picoline en in water + pyridine (V), krijgen we een knikpunt bij verbruik van resp. ca. 0,42, 0,42, 0,45, 0,42 en 0,38 m.e. LiOH. Van een duidelijke en abrupte teruggang zoals bij galluszuur is dus geen sprake.

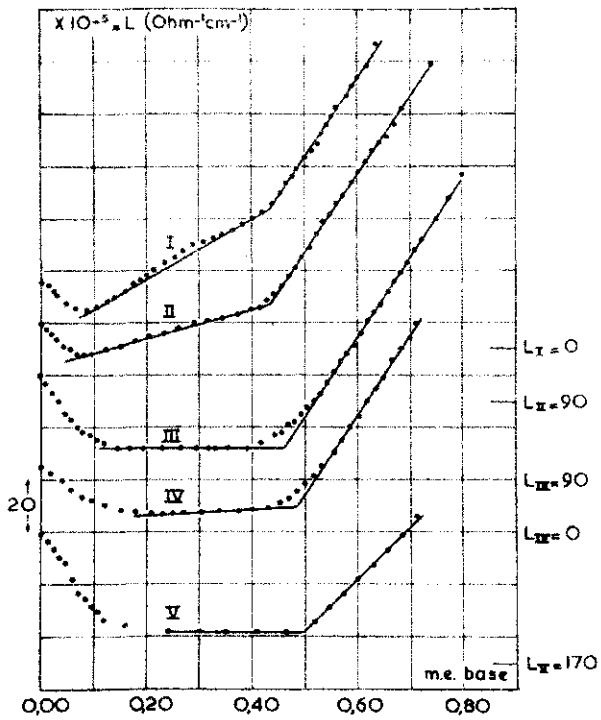
Tenslotte kan nog het volgende vermeld worden:

Evenals bij potentiometrische titratie (zie § 5.2.1.3.) treedt het eindpunt bij titratie met $Ba(OH)_2$ op na toevoeging van meer base dan bij titratie met alkalihydroxide. Voor een nader onderzoek van dit verschijnsel werden nog conductometrische titraties uitgevoerd (met NaOH) van een huminezuuroplossing waaraan een equivalente hoeveelheid NaCl, resp. KCl, $CaCl_2$, $BaCl_2$, $MgCl_2$ was toegevoegd. Dat wil zeggen: het aantal m.e. toegevoegd zout was gelijk aan het aantal m.e. $Ba(OH)_2$ dat bij het knikpunt is toegevoegd bij titratie in afwezigheid van zout. Uit figuur 13 blijkt nu dat de aanwezigheid van NaCl de ligging van het knikpunt bij titratie met NaOH niet duidelijk beïnvloedt. Voor KCl geldt hetzelfde. Daarentegen werd in aanwezigheid van aardalkalichloride bij titratie met NaOH gemiddeld hetzelfde knikpunt gevonden als bij titratie met bariumhydroxide.

Dit wijst er dus op dat er protonen zijn die niet door alkali-ionen worden vervangen, maar wel door tweewaardige kationen kunnen worden verdrongen. Dit is dus een bevestiging van de veronderstelling van TENDELOO en NIERSTRASS (zie § 5.2.1.3.). De meest aannemelijke verklaring is dat dit berust op een verschil in hydrolyse bij alkali- en aardalkalihumaat. Steun hiervoor levert het feit dat bij salicylzuur en protocatechuzuur hetzelfde verschijnsel werd waargenomen. Bij titratie met NaOH (fig. 6, zie ook curve II in fig. 10) treedt het knikpunt voor COOH en OH op kort voordat het equivalentiepunt is bereikt. Bij titratie met $Ba(OH)_2$ (curve I in fig. 10) vielen de knikpunten beter samen met de equivalentiepunten. Ook om deze reden hechten wij aan de titraties met bariumhydroxide meer waarde voor de bepaling van de som van alle zuurgroepen dan aan de titraties met NaOH of KOH.

De door BLOM c.s. (1957) geopperde verklaringsmogelijkheid dat sommige zuurgroepen zodanig geïsoleerd zouden zitten, dat ze niet samen met een naburige zuurrestgroep een tweewaardig kation

kunnen binden (ze zouden in ons geval $BaOH^-$ binden en zo een extra baseverbruik veroorzaken) lijkt hiermee, althans bij huminezuren, niet relevant.



Figuur 13. De invloed van de aanwezigheid van zouten op de conductometrische titraties van 100 mg (= 0,48 m.e.) huminezuren uit veenkoloniale grond (No. 082 I), opgelost in 60 ml water.

I - in zuiver water; titratie met NaOH
II - in water + 0,48 m.e. NaCl; titratie met NaOH
III - in water + 0,48 m.e. $BaCl_2$; titratie met NaOH
IV - in zuiver water; titratie met $Ba(OH)_2$
V - in water + 0,48 m.e. $CaCl_2$; titratie met NaOH

Resumerend kan gezegd worden dat het ondanks velerlei pogingen niet gelukt is door conductometrische titratie in waterige oplossingen verschillende soorten zuurgroepen bij huminezuren met zekerheid te onderscheiden en afzonderlijk te bepalen.

De conductometrische titratie met bariumhydroxide bleek een vrij goed vast te stellen eindpunt te hebben. Tot op heden lijkt deze titratie de beste waarde te geven voor de som der zure groepen.

De resultaten verkregen bij titratie in aanwezigheid van zouten

en bij titraties van salicylzuur en protocatechuzuur leverden steun voor de veronderstelling dat het verschil in "uitwisselingscapaciteit" bij titratie met één- en met tweewaardige basen veroorzaakt wordt door hydrolyse van het alkalihumaat.

5.3. TITRATIES VAN HUMINEZUREN OPGELOST IN ORGANISCHE OPLOSMIDDELEN

5.3.1. Perspectieven van het gebruik van organische oplosmiddelen

Nadat aldus de pogingen om de verschillende zuurgroepen te onderscheiden door potentiometrische of conductometrische titratie in waterige oplossingen onvoldoende succes hadden opgeleverd, zijn we overgegaan op titratie in organische oplosmiddelen. Over zuur-base-titraties in niet-waterig milieu is in de laatste tien jaren een snel wassende stroom van publikaties verschenen. Voor een overzicht kan o.m. worden verwezen naar BECKETT en TINLEY (1955), JONES (1959), FRANSWA (1963), HUBER (1964).

Voordat de hier toegepaste titratietechnieken afzonderlijk worden besproken zal eerst op de vraag waarom de toepassing van andere oplosmiddelen dan water hier meer succes belooft, worden ingegaan. (Min of meer is deze vraag reeds aan de orde geweest in 5.2.2.1. bij de vervanging van water als oplosmiddel door zeer verdunde ammonia. De vervanging van water door een ander oplosmiddel heeft echter nog weer heel andere consequenties dan de toevoeging van een weinig ammonia aan de huminezuuroplossing).

In 5.2.1.1. werd als voorwaarde voor het slagen van de potentiometrische titratie gesteld, dat het te titreren zuur niet zeer zwak mag zijn (onscherp buigpunt). Het bleek dat deze situatie echter wel optrad voor wat betreft de zwakst zure groepen bij huminezuren opgelost in water. We moeten dus een oplosmiddel zoeken dat zwakker "zuur" en sterker "basisch" is dan water. Voor een goed begrip van deze uitspraak het volgende:

In het voorafgaande is gewerkt met een definitie van het begrip zuur, die te beperkt is, nl. met de definitie dat een zuur een verbinding is die, in water opgelost, geheel of gedeeltelijk dissocieert in anionen en waterstofionen, terwijl een base gedefiniëerd was als een stof die in water dissocieerde in kationen en hydroxylionen. Het zuur of base zijn van een stof is hier dus afhankelijk gesteld van het gedrag

in oplossing en wel in waterige oplossing. BRONSTED en LOWRY definiëerden in 1923 een zuur als een stof die in staat is een proton af te staan en een base als een stof die een proton kan opnemen. Volgens deze definitie gedraagt huminezuur zich dus als een zuur indien het H^+-ionen afstaat en het huminezuuranion zich als een base indien het H^+-ionen opneemt. Een ion als $R\text{-}COO^-$. OH is dus zowel een zuur voorzover de OH-groep een proton afstaat als een base voorzover de carboxylgroep een proton opneemt. Nu is inmiddels gebleken dat ook deze definitie nog te beperkt is, maar voor het hier te houden betoog in verband met de titratie van huminezuren in organische oplosmiddelen is hij wel bruikbaar.

Een essentiëel verschil met de oude definitie is, dat het feit of een stof een zuur of een base is, hier afhankelijk is gesteld van de stoffen zelf en niet van hun oplossingen. Daarmee wil echter niet gezegd zijn, dat het oplosmiddel er niet toe doet. Integendeel, of een stof een zuur of basisch karakter zal tonen en in welke "sterkte" hangt in belangrijke mate af van het oplosmiddel.

De ligging van het evenwicht van de autoprotolysereactie van een oplosmiddel SH volgens de vergelijking

$$2\ SH \rightleftharpoons SH_2^+ + S^-$$

wordt gekenmerkt door de evenwichtsconstante

$$K_s = [SH_2^+] \times [S^-]$$

bijv. $2\ H_2O \rightleftharpoons H_3O^+ + OH^-$ $\quad pK_s = 14$ bij 25^oC

$2\ NH_3(liq) \rightleftharpoons NH_4^+ + NH_2^-$ $\quad pK_s = 22$ bij $-33,5^oC$

$2\ CH_3OH \rightleftharpoons CH_3OH_2 + CH_3O^-$ $\quad pK_s = 16,7$ bij 25^oC

$2\ CH_3COOH \rightleftharpoons CH_3COOH_2^+ + CH_3COO^-$ $\quad pK_s = 12,6$ bij 25^oC

Het zuur karakter van het oplosmiddel hangt af van de neiging protonen af te staan volgens de reactie:

$$SH \rightleftharpoons H^+ + S^-,$$

waarvoor $K_a = [H^+] \times [S^-]$.

Het basisch karakter wordt bepaald door de affiniteit van SH voor protonen:

$$SH + H^+ \rightleftharpoons SH_2^+,$$

waarvoor $K_b = \dfrac{[SH_2^+]}{[H^+]}$. K_s is dus gelijk aan $K_a \times K_b$.

Men kan het ook zo uitdrukken: Het karakter van het oplosmiddel wordt bepaald door de sterkte van het "zuur" SH_2^+ en die van de "base" S^-, waarbij $K_{SH_2^+} = 1/K_b$ en $K_{S^-} = 1/K_a$.

Bij zure of protogene oplosmiddelen is K_a groot en K_b klein, bijv. zwavelzuur en azijnzuur.

Bij basische of protofiele oplosmiddelen is K_b groot en K_a klein, bijv. vloeibare ammoniak, ethyleendiamine, pyridine, butylamine.

Indien noch K_a noch K_b klein zijn spreekt men wel van amfiprotische oplosmiddelen, bijv. water, methanol, propanol-2, aceton.

Oplosmiddelen waarbij zowel K_a als K_b zeer klein zijn worden aprotische of ook wel inerte oplosmiddelen genoemd, bijv. benzeen, chloorbenzeen, alfatische koolwaterstoffen.

Of een zuur HA te titreren is met een base BX hangt daarvan af of de reactie $HA + BX \rightleftharpoons AB + XH$ aflopend is. Ionisatie van het zuur en van de base is daarvoor niet strikt noodzakelijk. Wil men echter potentiometrisch of conductometrisch titreren dan is ionisatie wel vereist. Aprotische oplosmiddelen zijn in het algemeen voor dergelijke titraties niet geschikt omdat daarin geen ionisatie te verwachten is. (Soms heeft toevoeging van aprotische aan andere oplosmiddelen het gunstige effect dat het eindpunt scherper kan worden vastgesteld).

Of een bepaald zuur HA, opgelost in een amfiprotisch oplosmiddel SH, te titreren is met een base BX hangt af van de affiniteiten der aan de reacties deelnemende "basen" A^-, SH en X^- voor protonen en van het ionenproduct van AB. Deze reacties zijn:

$$\begin{array}{rcl} HA + SH & \rightleftharpoons & A^- + SH_2^+ \\ BX & \rightleftharpoons & B^+ + X^- \\ X^- + SH_2^+ & \rightleftharpoons & SH + XH \\ A^- + B^+ & \rightleftharpoons & AB \\ \hline HA + BX & \rightleftharpoons & AB + XH \end{array} \quad +$$

Voorlopig nemen we aan dat het ionenproduct van AB niet klein is en dat BX een sterke base is.

Indien A^- een veel grotere affiniteit heeft voor protonen als SH, m.a.w. als HA zich in dit oplosmiddel gedraagt als een zeer zwak

zuur waarbij de dissociatieconstante van HA nadert tot de waarde van K_a van het oplosmiddel, dan is de reactie dus niet aflopend en een goede titratie is niet mogelijk. (De verbinding AB zou, in dit oplosmiddel gebracht, in sterke mate gesolvolyseerd worden, waarbij relatief veel HA zou ontstaan). Het evenwicht van de reactie weergegeven in de bovenste vergelijking kan naar rechts worden verschoven door een oplosmiddel te nemen met een grotere K_b en een kleinere K_a, dus een protofiel oplosmiddel.

Hiermee is dus de aan het begin van deze paragraaf gedane uitspraak dat we voor de titratie van huminezuren een oplosmiddel moeten zoeken dat zwakker zuur en sterker basisch is dan water, toegelicht.

Indien in dit oplosmiddel het evenwicht $HA + SH \rightleftharpoons A^- + SH_2^+$ voldoende ver naar rechts schuift is een titratie in principe mogelijk, mits althans de affiniteit van X^- voor protonen nog in voldoende mate groter is dan die van SH. Deze laatste voorwaarde is uiteraard van veel belang en het is dan ook te beschouwen als een gelukkige omstandigheid dat er inderdaad verbindingen zijn die in organische oplosmiddelen zeer sterke basen zijn, zoals alkali-alkanolaten.

Bij het bovenstaande hadden we voorlopig buiten beschouwing gelaten de mogelijkheid dat het ionenproduct van AB zo klein is dat daardoor de reactie $A^- + B^+ \rightleftharpoons AB$ ver naar rechts verschoven zou worden. Uiteraard zou dit ook in de eerste en in de gesommeerde reactievergelijking het evenwicht naar rechts doen verschuiven, waardoor HA beter titreerbaar kan worden. Dit geval deed zich voor bij de reeds besproken titratie van huminezuren in water met bariumhydroxide, waardoor het eindpunt conductometrisch inderdaad goed vastgesteld kon worden. Een voorwaarde waaraan hierbij vaak niet wordt voldaan is echter dat het geen sterk absorptief neerslag mag zijn, aangezien dan het eindpunt te vroeg optreedt (en dikwijls gaat verlopen).

Het doel is de COOH- en OH- groepen van huminezuren te onderscheiden op grond van het verschil in dissociatieconstante van de zwakst zure COOH-groep met die van de sterkst zure OH-groep. Het zou ideaal zijn als we over een oplosmiddel beschikten waarvan de affiniteit voor protonen zo groot is dat deze COOH-groep zijn protonen nog juist volledig moet afstaan aan de basische oplosmiddelmoleculen. Het verschil in pK tussen de COOH-groepen onderling zou dan immers

genivelleerd zijn, d.w.z. ze zouden zich alle gedragen als sterk zuur, waardoor het eindpunt beter vastgesteld zou kunnen worden. Deze affiniteit mag uiteraard niet zo groot zijn dat behalve de COOH-groepen ook de sterkst zure of zelfs alle OH-groepen hun protonen kwantitatief moeten afstaan aan de oplosmiddelmoleculen. Dan zou immers ook het verschil tussen COOH- en OH-groepen genivelleerd zijn.

Gezien de resultaten van de huminezuurtitraties in waterig milieu is het dus een belangrijke vraag of het onderlinge verschil tussen de pK's, zoals dit zich voordoet in water, verandert als men organische oplosmiddelen gebruikt. Dezelfde vraag wordt in verband met de titratie van kleimineralen ook besproken door VAN COMPERNOLLE c.s. (1957). Hieraan (zie ook het genoemde artikel van FRANSWA) kan worden ontleend: Als het een mengsel betreft van bijv. twee zuren met gelijke lading dan is het verschil tussen beide dissociatieconstanten in water bij benadering gelijk aan dat in organische oplosmiddelen. Op zichzelf brengt een verlaging van de diëlectriciteitsconstante (D) een verlaging van de dissociatieconstante (dus een verhoging van pK) teweeg. De pK-verhogende invloed van D is bij zuren met reeds een negatieve lading echter groter dan bij electrisch neutrale zuren. In het algemeen liggen de dissociatieconstanten in organische oplosmiddelen in dat geval dus verder uiteen dan in water. Dit kan dus ook bij "polydibasische" zuren als huminezuren worden verwacht, hetgeen dus een bijkomend voordeel kan zijn van de vervanging van water door een organisch oplosmiddel.

Een lage D kan echter ook bezwaren hebben. In dit verband merkt GRÜNWALD (1954) op, dat in media met een lage of zelfs middelmatige D de activiteit der ionen aanzienlijk lager is dan in waterige oplossing. Deze afwijkingen kunnen bijv. onjuiste buigpunten veroorzaken bij potentiometrische titraties. Ze zijn volgens Grünwald het gevolg van ionen-interacties op korte afstand, die belangrijker worden naarmate D lager is. Evenals FUOSS en KRAUS en MC INNES (zie MC INNES (1939) pg. 367-374) acht Grünwald het meest aannemelijk dat deze (electrostatische) interactie leidt tot de vorming van ionenparen: $A^- + B^+ \rightleftharpoons A^-B^+$ en bij $D < 10$ zelfs tot ionenaggregaten van hogere orde: $mA^- + nB^+ \rightleftharpoons A_m^-B_n^+$, waartoe ook de door Fuoss en Kraus aangenomen "tripelionen": ABA^- en ABB^+ gerekend kunnen worden. Het is duidelijk dat dergelijke reacties ook belangrijke consequenties kunnen hebben voor het geschetste verloop van de reactie

$HA + BX \rightleftharpoons AB + XH$ en voor de hierbij potentiometrisch of conductometrisch verkregen titratiecurve.

Tenslotte kan nog worden opgemerkt dat aan het te gebruiken oplosmiddel uiteraard de eis gesteld moet worden dat het geen storende nevenreacties geeft met de huminezuren of met de base waarmee getitreerd wordt.

5.3.2. Potentiometrische titraties

5.3.2.1. Aanwijzingen uit de literatuur

Voor de differentiërende titraties als hier beoogd, worden in de literatuur verschillende combinaties van oplosmiddel, titrant en electrodensysteem aanbevolen. Voor de keuze van oplosmiddel-titrant combinaties bij gebruik van bepaalde Beckmann glas- en calomelelectrodes en pH-meter heeft VAN DER HEIDE (1957) een schema opgesteld. Afgaande op dit schema zouden als oplosmiddelen voor huminezuren in aanmerking komen acetonitril, aceton of andere alifatische ketonen, chloorbenzeen, pyridine en dimethylformamide (D.M.F.).

Hiervan is alleen D.M.F. een goed oplosmiddel voor huminezuren. Een gelukkige omstandigheid is wellicht dat de dielectriciteitsconstante (36,7 bij 25°C) aanzienlijk lager is dan die van water (78,6), zonder evenwel extreem laag te zijn. TEZE en SCHAAL (1962) en PAUL c.s. (1963) hebben een studie gemaakt van de eigenschappen van D.M.F. Zij toonden aan dat D.M.F. kan ionizeren volgens de vergelijking:

$$2\ H\ CO\ N(CH_3)_2 \rightleftharpoons \left[H_2CO\ N(CH_3)_2\right]^+ + \left[CO\ N(CH_3)_2\right]^-$$

Volgens eerstgenoemde auteurs in de autoprotolyseconstante K_s van deze reactie 18. Het oplosmiddel is zwak basisch.

In pyridine lossen de droge huminezuren veel minder goed op en in de overige niet of althans onvoldoende. (Pyridine heeft een relatief lage D nl. 12. Het vormt volgens SWAIN en BROWN (1952) gemakkelijk complexen met fenolen en andere zuren).

BROOKS en MAHER (1954), WALKER, HENRY en DAVIES (1958) en SCHOBINGER (1958) gebruikten ethyleendiamine als oplosmiddel. Brooks en Maher verkregen bij steenkoolpoeders in de meeste gevallen curven met twee, soms met meer dan twee buigpunten, die zij toeschrijven aan carboxyl-, fenolische en/of enolische OH-groepen. In deze richting wees nl. het feit dat toevoeging van

benzoëzuur beide, maar toevoeging van fenol slechts het tweede buigpunt deed verschuiven. Erg duidelijk zijn de buigpunten echter niet en Walker c.s. gebruikten deze titratie dan ook alleen maar om de totale zuursterkte van de koolpoeders te bepalen. Een ernstige moeilijkheid bij titratie van dergelijke koolpoeders is dat deze hoogstens gedeeltelijk oplossen (en zwellen). Walker c.s. vermelden dan ook dat de deeltjesgrootte van invloed is op de resultaten van de titratie vooral bij kool met een hoog C-gehalte. Verder concluderen deze onderzoekers uit de vorm van de titratiecurve dat er chemische reacties tijdens de titratie optreden. Dit bemoeilijkt de interpretatie van de curven uiteraard sterk. Bij gebruik van een calomelelectrode heeft ethyleendiamine volgens HARLOW c.s. (1956) het bezwaar dat dit de electrode aantast. Dit gevoegd bij het feit dat de droge huminezuren er moeilijk in oplossen maakt ethyleendiamine voor het door ons geoogde doel minder aantrekkelijk.

Als titrant gebruikten Brooks en Maher, Walker c.s. en Schobinger natriumcolaminaat, eveneens opgelost in ethyleendiamine. Alkalialkanolaten werden tot voor enkele jaren meestal als titrant gebruikt. Deze hebben echter verschillende bezwaren. Glaselectroden kunnen dan nl. veelal niet gebruikt worden terwijl de stabiliteit van de oplossingen dikwijls te wensen over laat. Verder zijn de alkalizouten van de meeste organische zuren niet of slecht oplosbaar in organische oplosmiddelen. Sinds kort worden als base zeer veel gebruikt diverse tetraalkylammoniumhydroxiden, in het bijzonder tetrabutylammoniumhydroxide (T.B.A.H.). Hierbij functioneert de glaselectrode bevredigend, de alkoholische oplossingen zijn dikwijls (niet steeds, zie HARLOW, 1962b) enige tijd houdbaar, de zouten zijn in het algemeen beter oplosbaar in watervrij milieu en deze hydroxiden gedragen zich ook in organische oplosmiddelen als zeer sterke basen.

Wat betreft het electrodesysteem het volgende: Het inzicht in de wijze, waarop verschillende electroden in organische oplosmiddelen functioneren is nog zeer gebrekkig. M.a.w. er is nog maar weinig over bekend hoe een gemeten potentiaalverschil eigenlijk tot stand komt. Kleine verschillen tussen de gebruikte electroden bijv. in glassoort bij glaselectroden kunnen belangrijke verschillen in de potentiaal veroorzaken. Daarom beperkt VAN DER HEYDE (1957) zijn schema ook uitdrukkelijk tot zeer bepaalde electroden en pH-meter. Hierin moet waarschijnlijk ook de verklaring worden gezocht dat sommige onderzoekers goede resultaten vermelden bij gebruik van antimoonelectroden (bijv. Brooks en Maher), terwijl deze bij BROCKMANN en

MEYER (1953) "versagten in Benzol-Methanol und basischen Lösungsmitteln wie Äthylendiamin, auch bei verschiedener Art der Vorbehandlung".

HARLOW c.s. (1956) gebruikten evenals Brockmann en Meyer platinaelectroden o.a. voor de titratie van catechol. Zij vermoeden dat de Pt-anode functioneert als zuurstofelectrode. Brockmann en Meyer delen deze mening en gronden dit juist op de waarneming dat stoffen die in alkalische oplossing gemakkelijk door luchtzuurstof worden geoxydeerd, depolariserend werken en daardoor de potentiometrische meting onmogelijk maken. Hieruit volgt dus dat stoffen als catechol en ook huminezuren juist niet getitreerd kunnen worden bij toepassing van platinaelectroden. In dit verband zij herinnerd aan de reeds aangehaalde opmerking van Walker c.s. dat er bij koolpoeders chemische reacties optraden tijdens de titratie met behulp van Pt-electroden.

Sinds de toepassing van T.B.A.H. als titrant in zwang gekomen is, wordt meestal gebruik gemaakt van glas- en calomelelectroden. Om moeilijkheden bij het contact verzadigde KCl-oplossing in water - organisch oplosmiddel te voorkomen hebben sommigen het water bij de calomelelectrode vervangen door methanol (CUNDIFF en MARKUNAS, 1956) of een verzadigde oplossing van Hg_2Cl_2 en LiCl in ethyleendiamine gebruikt (o.a. ALLEN en GEDDES, 1957). Blijkens de resultaten van verschillende andere onderzoekers schijnt dit echter bij de "sleeve type" en "fiber-tip" calomel electroden niet nodig te zijn.

Als potentiometer kunnen meestal gewone pH-meters worden gebruikt. Bij inerte en zwak basische oplosmiddelen is de weerstand echter dikwijls veel groter dan 10^{10} Ohm (HARLOW en BRUSS, 1958). Bij een stroomsterkte van 10^{-10} tot 10^{-12} Ampère wordt de potentiometerinstelling onnauwkeurig en slecht reproduceerbaar mede door electrostatische beïnvloeding van de potentiaal van buitenaf. (Bij toepassing van een "magnetische" roerder dient deze goed geaard te worden). Men kan de weerstand verlagen door toevoeging van polaire verbindingen, maar daarmee wordt het doel vaak voorbijgeschoten. Volgens VAN DER HEYDE (1957) kan de stabiliteit van de potentiometer heel goed worden verbeterd door toevoeging van 1 mmol tetrabutylammoniumjodide per liter oplossing.

Op grond van het bovenstaande leek het voor de titratie van huminezuren het meest belovend deze uit te voeren in D.M.F. met

T.B.A.H. als base en met behulp van een glas- en een calomelectrode. Daarnaast werden oplosmiddelen als acetonitril, pyridine en ethyleendiamine geprobeerd in dier voege dat de huminezuren werden opgelost in zo weinig mogelijk D.M.F. waarna de oplossing dan verder werd verdund met een ander oplosmiddel. Aan het verkrijgen van een homogene uitgangsoplossing hebben wij nl. een overwegend belang gehecht. Bij geen of weinig succes konden dan nog titraties worden geprobeerd met gebruikmaking van Pt-electroden.

5.3.2.2. Experimenteel gedeelte

De titraties werden weer uitgevoerd met behulp van de pH-meter en met de glaselectrode G 202 C en de Calomelelectrode K 401. De electroden werden voor gebruik goed afgespoeld met D.M.F. De glaselectrode werd tussen de titraties in ook bewaard in D.M.F. De temperatuur van het titratievat werd weer op 25°C ± 0,1 gehandhaafd. Feitelijk zou men hier alle titraties het beste kunnen uitvoeren in een ruimte van constante temperatuur, vanwege de hoge thermische uitzettingscoëfficiënten van organische oplosmiddelen, dus ook van de titrantoplossing in de buret. Wij beschikten niet over een dergelijke werkruimte, maar hebben temperatuurschommelingen zoveel mogelijk vermeden. Daarnaast werden enkele titraties uitgevoerd met gebruikmaking van Pt-electroden volgens de opstelling van HARLOW c.s. (1956).

Als titrant werd een ca. 0,3 N oplossing van T.B.A.H. in isopropanol (I.P.) gebruikt die werd bereid volgens het voorschrift van HARLOW c.s. (1956): 30,75 g tetrabutylammoniumjodide (Schuchardt) werd opgelost in I.P., omgezet in de overeenkomstige base met behulp van Amberliet IRA 400 in OH-vorm (waaruit van te voren met zuivere I.P. het water was verwijderd) en verdund met I.P. tot 250 ml. De oplossing werd potentiometrisch (of volumetrisch met thymolblauw als indicator) gesteld op benzoëzuur p.a., opgelost in D.M.F. Volgens HARLOW en BRUSS (1958) hebben we hier in werkelijkheid te maken met een evenwichtsmengsel van T.B.A.H. en T.B.A.-isopropanolaat. Een oplossing van T.B.A.H. in D.M.F. is instabiel, het D.M.F. gaat nl. ontleden. Isopropanol is het minst "zure" van de alcoholen en daarom hier nog het meest geschikt. Om echter mogelijke afwijkingen hierdoor na te gaan werd tevens nog getitreerd met een oplossing van T.B.A.H. in pyridine. Daartoe werd de I.P. uit de verkregen oplossing eerst grotendeels onder verminderde druk afgedestilleerd. Na toevoeging van pyridine werd de rest van de alcohol in vacuo afgedes-

tilleerd, waarna met pyridine werd aangevuld tot 250 ml. Deze oplossing is bij kamertemperatuur slecht houdbaar.

Voor de huminezuurtitraties werd telkens 100 mg van de in vacuo boven P_2O_5 gedroogde huminezuren nauwkeurig afgewogen en in het titreervat gebracht. De lucht hierin werd vervangen door zuivere stikstof waarna 5 ml D.M.F. werd bijgepipetteerd. Hierin losten de meeste (niet alle) huminezuren volledig op. Indien alleen D.M.F. werd gebruikt, werd de oplossing nog verdund met precies 55 ml D.M.F., zodat dezelfde concentratie werd verkregen als bij de titraties in water. Daarnaast werden enkele titraties uitgevoerd waarbij in plaats van de laatste 55 ml D.M.F. 55 ml van een ander oplosmiddel werd toegevoegd i.c. acetonitril, pyridine of ethyleendiamine.

Ter vergelijking werden eveneens weer een aantal titraties uitgevoerd van salicylzuur en galluszuur.

De dimethylformamide (Merck) werd aanvankelijk gebruikt zonder verdere zuivering waarbij ter contrôle een blanco titratie werd uitgevoerd. Later werden de titraties uitgevoerd met D.M.F. dat was gezuiverd volgens het voorschrift van ALLEN en GEDDES (1957): 24 uur schudden met BaO en daarna destilleren, hetgeen wij onder verminderde druk uitvoerden.

Volgens BECKETT en TINLEY(1955) krijgt men bij titratie in D.M.F. bij aanwezigheid van water te hoge resultaten, vermoedelijk veroorzaakt door hydrolyse van D.M.F. waarbij mierenzuur en dimethylamine zouden ontstaan. Nog afgezien hiervan is het uiteraard van belang dat geen water aanwezig is, aangezien dit zich hier gedraagt als een zeer zwak zuur met een dissociatieconstante die misschien weinig verschilt van die van de zwakst zure groepen van huminezuren. Dit is immers juist de reden waarom we water willen vervangen door een ander oplosmiddel! Wij hebben daarom steeds gewerkt in zo goed mogelijk watervrij milieu.

De pyridine werd gedroogd op vast NaOH en daarna gedestilleerd.

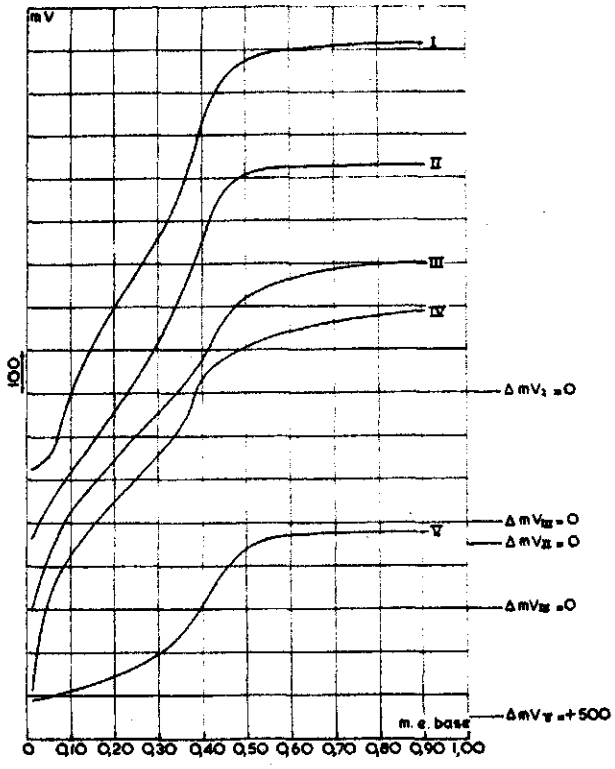
De isopropanol en ethyleendiamine werden gedroogd op metallisch natrium en daarna eveneens gedestilleerd.

De acetonitril werd gezuiverd door schudden met Amberliet IRA 400 (OH) en destillatie.

Alle handelingen met de basische oplosmiddelen en met de titrant werden zo veel mogelijk "onder een stikstofdeken" uitgevoerd om storingen door CO_2-opname uit de lucht te vermijden.

5.3.2.3. Resultaten en discussie

In figuur 14 zijn verschillende curven, verkregen bij titratie met resp. T.B.A.H. in I.P. en T.B.A.H. in pyridine, van de huminezuren geïsoleerd uit één der bodemtypen weergegeven. Sommige curven geven principiëel hetzelfde beeld als bij titratie van de huminezuren opgelost in water. Bij pure D.M.F. en bij D.M.F. + acetonitril treden twee buigpunten op, zij het dat het eerste weinig scherper is dan dat verkregen bij oplossingen in water. Er is echter in dit opzicht een duidelijk verschil met de titratiecurven die BUTLER en CZEPIEL (1956) verkregen bij titratie van lignine in D.M.F. waarmee overigens een grote overeenkomst is. Bij D.M.F. + pyridine treedt het eerste buigpunt nauwelijks of niet op. Bij D.M.F. + ethyleendiamine valt vooral op dat de potentiaalsprong die het grootst is bij pure D.M.F., hier relatief klein is. De vervanging van isopropanol door pyridine als oplosmiddel voor de titrant gaf geen verbetering.

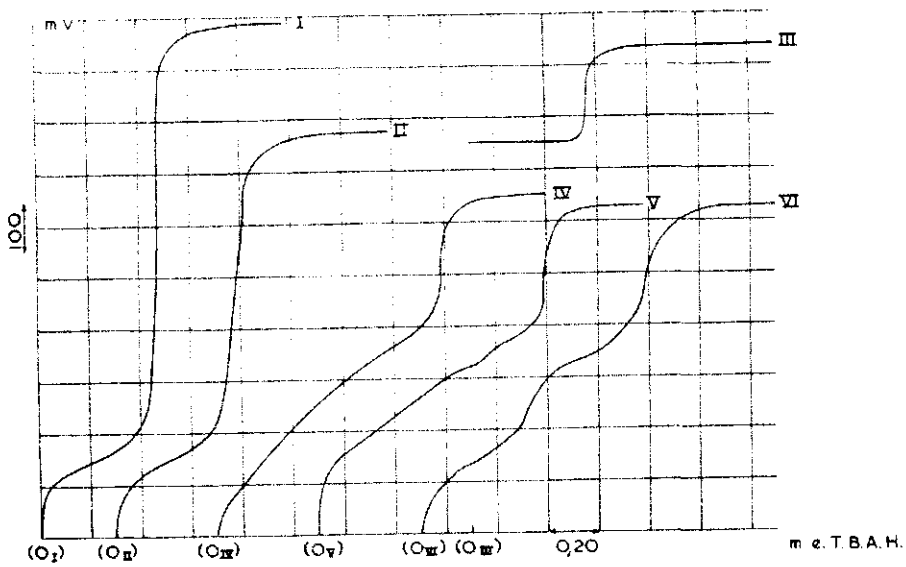


Figuur 14. Potentiometrische titratie van 100 mg huminezuren uit veenkoloniale grond (No. 082 I), opgelost in 60 ml oplosmiddel.

I - in pure D.M.F., getitreerd met T.B.A.H. in I.P.
II - in D.M.F.-pyridine (1 : 11) " " " "
III - in D.M.F.-acetonitril (1:11) " " " "
IV - idem " " " pyridine
V - in D.M.F.-ethyleendiamine, " " " "

Er is een sterke overeenkomst tussen de curven bij water en bij D.M.F. als oplosmiddel, zowel wat betreft de vorm der curven als de ligging der buigpunten. Van een verbetering ten opzichte van water kan niet gesproken worden. Het tweede buigpunt is in D.M.F. duidelijker vast te stellen dan in water maar bij verschillende huminezuren geldt voor het eerste buigpunt het omgekeerde.

Salicylzuur waarvan een met de huminezuren equivalente hoeveelheid werd afgewogen en getitreerd blijkt zich evenals in waterige oplossingen duidelijk te gedragen als een éénbasisch zuur (figuur 15).



Figuur 15. Potentiometrische titratie van 0,48 mmol salicylzuur opgelost in 60 ml D.M.F. (I), 5 ml D.M.F. + 55 ml acetonitril (II), 5 ml D.M.F. + 55 ml ethyleendiamine (III), resp. van 0,48 mmol galluszuur opgelost in 60 ml D.M.F. (IV), 5 ml D.M.F. + 55 ml pyridine (V), 5 ml D.M.F. + 55 ml acetonitril (VI), alle met T.B.A.H. in I.P.

Een buigpunt voor de OH-groep werd niet gevonden. Galluszuur gedraagt zich weer uitgesproken als een tweebasisch zuur, waarbij alleen in D.M.F. + acetonitril een zeer duidelijk buigpunt voor de eerst-geneutraliseerde zure groep te zien is. Het verloop van de curve van galluszuur bij gebruik van pure D.M.F. doet sterk denken aan dat bij de huminezuren. De potentiaalsprong is weer het kleinst bij het mengsel van ethyleendiamine en D.M.F.

Dat ondanks gebruik van het protofiele D.M.F. bij salicylzuur en galluszuur slechts één resp. twee zuurgroepen werden aangetoond

zou misschien daaraan kunnen liggen dat de gebruikte glaselectrode op een verandering in de potentiaal bij een eventuele reactie van T.B.A.H. met verdere OH-groepen niet meer reageert. Om dit na te gaan werden enkele titraties uitgevoerd met Pt-electroden volgens HARLOW c.s. (1956). Hierover kunnen we echter kort zijn: Het is niet gelukt op deze wijze reproduceerbare en plausibele resultaten te verkrijgen.

N.B. Nadat het onderzoek reeds was afgesloten ontvingen wij de dissertatie van MEYER (1962) waarin deze de titratie van huminezuren, opgelost in pyridine, met T.B.A.H. in methanol, met behulp van een glas-calomelelectrodenpaar aanbeveelt. Op zichzelf bleek dit bepaald geen curven te geven die meer zeggen dan de onze. Meyer voegt echter vóór de titratie een bekende en ongeveer equivalente hoeveelheid benzoëzuur en fenol toe aan de huminezuuroplossing. Het blijkt dat dan een curve wordt verkregen met twee vrij duidelijke buigpunten. Uit de verschuiving der buigpunten vergeleken met de titratiecurve van een oplossing van benzoëzuur en fenol van dezelfde concentratie, maar nu in afwezigheid van huminezuren, berekent Meyer het aantal m.e. sterk zure en zwak zure groepen bij huminezuren. Wij hebben met deze interessante variant (nog) geen ervaring. Het zou o.i. goed zijn ook nog andere "ijkstoffen" te proberen.

5.3.3. Conductometrische titraties

5.3.3.1. Aanwijzingen uit de literatuur

In een in 1955 gegeven beschouwing over de voordelen van de conductometrische titratie in vergelijking met andere bepalingsmethoden voor fenolische OH-groepen noemen SARKANEN en SCHUERCH als enig voordeel van andere titratiemethoden de mogelijkheid daar sterker basische oplosmiddelen te kunnen gebruiken, waarbij zij opmerken: "This seems not to be possible with conductometry". Inmiddels zijn echter reeds diverse conductometrische titraties uitgevoerd in organische w.o. basische oplosmiddelen.

BRUSS en HARLOW (1958) verkregen bij titratie van niet-gehinderde fenolen in pyridine met alkali-alkanolaten curven met een maximum vóór (dikwijls ongeveer halverwege) het equivalentiepunt. Ter verklaring nemen zij aan dat het fenol een complex vormt met het ontstane fenolaation en dat dit complex een ionenpaar vormt met het base-

kation bij deze vrij lage D. Dit geheel zou meer gedissociëerd (en dus beter stroomgeleidend) zijn dan fenol zelf of het ionenpaar gevormd door basekation en fenolaation. De lading in het fenolaation zou nl. meer gelocaliseerd zijn (en het base-kation dus sterker aantrekken) dan in het fenol-fenolaatcomplex. Het pyridinemolecuul wordt niet door Bruss en Harlow in hun beschouwingen betrokken. Het is de vraag of dit juist is gezien de reeds vermelde eigenschap van pyridine dat het gemakkelijk complexen vormt met fenolen. Bij titratie met T.B.A.H. werd hier geen maximum en geen eindpunt gevonden. (De beide ionenparen zouden hier ongeveer even sterk gedissocieerd zijn. Overigens treedt bij een groot kation als $T.B.A.^+$ ionenpaarvorming ook in veel geringere mate op dan bij kleine kationen als Na^+ of K^+).

Wel traden scherpe maxima op bij gebruik van T.B.A.H. als base indien het fenol werd opgelost in inerte oplosmiddelen als benzeen, tolueen e.d. met een zeer lage D. (K- en Na-alkanolaten gaven hier een neerslag). Bij toevoeging van sterk solvaterende oplosmiddelen zoals lagere alcoholen verdwenen deze maxima, doordat dan geen fenol-fenolaatcomplexen zouden worden gevormd. Bij titratie in zuivere alcohol kon dan ook geen eindpunt worden vastgesteld.

Een zeer belangrijke bijdrage werd geleverd door VAN MEURS en DAHMEN (1958 a en b, 1959 a en b en 1959/60), die ook een theoretische verklaring geven voor het verloop van de titratiecurven. Voor wat betreft fenolen levert hun onderzoek overeenkomstige resultaten op als dat van Bruss en Harlow, waarvoor zij ook dezelfde verklaring geven. Soortgelijke curven verkregen van Meurs en Dahmen echter eveneens bij titratie van alifatische monocarbonzuren, opgelost in pyridine of D.M.F. met kaliummethanolaat. In dit geval was het maximum het gevolg van een op dit punt beginnende neerslagvorming.

De vorm van de titratiecurven van twee-basische zuren in organische oplosmiddelen bleek afhankelijk te zijn van opgeloste stof, oplosmiddel, titrant en temperatuur. Meestal gelukte het bij goede keuze van oplosmiddel en titrant twee knikpunten vast te stellen, overeenkomend met de beide equivalentiepunten. Bij organische tweebasische zuren opgelost in D.M.F. of pyridine trad bij titratie eerst een stijging op van het geleidingsvermogen. Na het eerste equivalentiepunt volgde een zwakkere stijging (stoelvormige curve) of zelfs een daling (N-vormige curve), terwijl na het tweede equivalentiepunt het geleidingsvermogen, althans bij gebruik van sterke basen, steeds steeg. Volgens van Meurs en Dahmen zijn de zure zouten onder alle omstan-

digheden in de gebruikte oplosmiddelen grotendeels geïoniseerd. Uit de soms nahet eerste equivalentiepunt optredende daling concluderen zij dat in dat geval de neutrale zouten in geringere mate geïoniseerd zijn (of in sterkere mate onderhevig aan ionenpaarvorming) dan de zure zouten.

De knikpunten (equivalentiepunten) zijn uiteraard in het algemeen nauwkeuriger vast te stellen bij N-vormige dan bij stoelvormige curven. Het is dus van belang na te gaan welke regels de vorm van de curve bepalen.

Van Meurs en Dahmen vonden nu dat N-vormige curven kunnen worden verkregen bij die tweebasische zuren, waarbij de verhouding K_1/K_2 in water groter is dan of gelijk is aan 100, zoals oxaalzuur, malonzuur, ftaalzuur, salicylzuur. Dit zijn zuren waarbij de zuurfuncties zich dicht bij elkaar bevinden (hetgeen ook de relatief grote K_1/K_2-verhouding verklaart) en dus intramoleculaire "complexvorming" $-COO^-....HOOC-$ mogelijk is. (De vorming van intermoleculaire waterstofbruggen kan hier buiten beschouwing worden gelaten gezien de resultaten van titraties bij zeer grote verdunning). Daarnaast bleken ook enkele zuren met in water een kleinere K_1/K_2-verhouding een dergelijke curve te kunnen geven, zoals barnsteenzuur, maleïnezuur, wijnsteenzuur. Van Meurs en Dahmen veronderstellen, mede op grond van andere overwegingen, dat deze zuren onder deze omstandigheden een ringstructuur kunnen aannemen waarbij de zuurfuncties elkaar eveneens dicht naderen. In die gevallen waar alleen een stoelvormige curve kon worden verkregen, was de K_1/K_2-verhouding steeds kleiner dan 100 en was een ringstructuur onwaarschijnlijk.

Verder constateerden (en verklaarden) deze onderzoekers dat de N-vorm van de curven bij de eerstgenoemde groep tweebasische zuren optrad c.q. werd versterkt door oplosmiddelen te gebruiken met een laag solvaterend vermogen en betrekkelijk lage D, door met basen te titreren waarvan het kation klein is (zie ook HARLOW, 1962a) en in sommige gevallen door de titraties uit te voeren bij hogere temperatuur. Deze omstandigheden belemmeren nl. de dissociatie c.q. bevorderen de ionenpaar-vorming bij de neutrale zouten meer dan bij de zure zouten.

Belangrijk is dat neerslagvorming die dikwijls optreedt kort na het passeren van het eerste equivalentiepunt, bij deze tweebasische zuren het verloop van de curve en de nauwkeurigheid van de titratie

niet ernstig bleken te beïnvloeden. Daarentegen vermelden van Meurs en Dahmen dat bij dihydroxiverbindingen als resorcinol en difenylolpropaan slechts het tweede equivalentiepunt door een scherpe knik gekenmerkt wordt, terwijl het eerste als gevolg van de onoplosbaarheid van de neutrale kaliumzouten onscherp is (getitreerd werd met kaliummethanolaat).

Vermelding verdiënt tenslotte de eerst onlangs onder onze aandacht gekomen publikatie van MITRA en CHATTERJEE (1963) over de titratie van 0,0'-dihydroxi-difenylmethaan en van homologeen hiervan met 3, 4, 5 of 10 fenolkernen, in verschillende organische oplosmiddelen, met natrium-methanolaat en met tetramethylammoniumhydroxide (TMAH). Interessant is dat een der OH-groepen (waarschijnlijk van een eindstandige fenolkern) steeds sterk zuur blijkt te zijn en de overige zwak (vermoedelijk als gevolg van intramoleculaire H-bruggen nl. tussen de OH-groepen). De overige OH blijken in het algemeen moeilijker te onderscheiden naarmate er meer voorkomen. Het resultaat blijkt verder sterk afhankelijk te zijn van oplosmiddel, titrant en aantal fenolkernen.

Voor wat betreft huminezuren leek ons, gezien bovenvermelde literatuurgegevens, de toepassing van D.M.F. en/of pyridine als oplosmiddel en van alkali-alkanolaat als base de meeste kans op succes te bieden. Ter vergelijking werden weer titraties uitgevoerd van "modelstoffen" als salicylzuur, galluszuur e.d.

5.3.3.2. Experimenteel gedeelte.

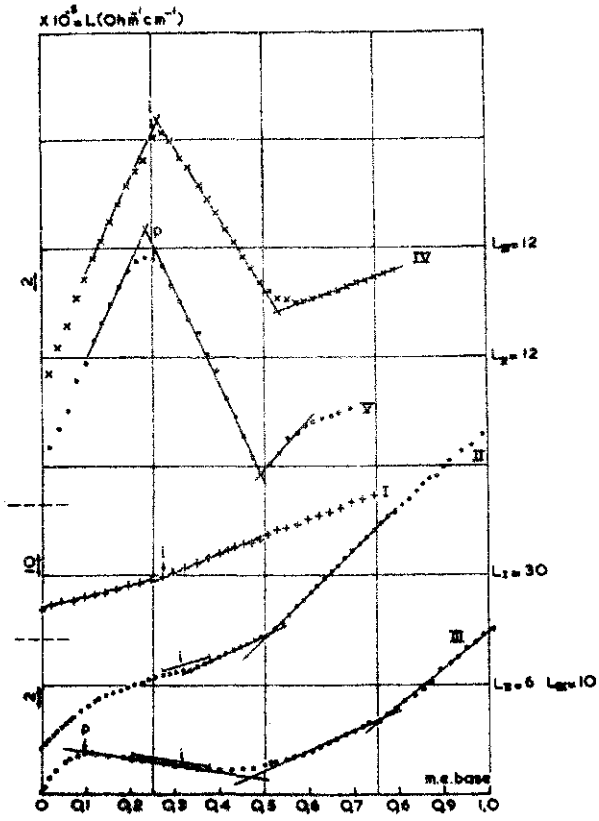
De titraties werden, evenals in waterige oplossing (zie 5.2.2.2.), uitgevoerd met behulp van de Philips Meetbrug GM 4249 en de dompelcel PR 9512/900. Voor de verdere omstandigheden, de bereiding van de huminezuuroplossingen en de zuivering van de oplosmiddelen kan worden verwezen naar 5.3.2.2. (experimenteel gedeelte bij potentiometrische titraties in organische oplosmiddelen).

Getitreerd werd met een ongeveer 0,2 N natriumisopropanolaat-oplossing die werd bereid door ca. 2,30 g blank natrium op te lossen in 250 ml zuivere isopropanol en in een N_2-atmosfeer met pyridine aan te vullen tot 500 ml. Daarnaast werden enkele titraties uitgevoerd met een T.B.A.H.- en een T.M.A.H.-oplossing, bereid als beschreven in 5.3.2.2. De oplossingen werden volumetrisch gesteld op benzoëzuur p.a. (indicator thymolblauw). Het bleek dat, om reproduceerbare resultaten te krijgen, hoge eisen moesten worden gesteld aan de zuiverheid van oplosmiddelen en titranten. Verder kan

nog worden vermeld dat het vooral tegen het eindpunt soms tamelijk lang duurde voor de meter constant was.

5.3.3.3. Resultaten en discussie

Titraties van salicylzuur en protocatechuzuur met T.B.A.H. of T.M.A.H. als base gaven noch in D.M.F. noch in D.M.F.-pyridine (1 : 11) bruikbare curven (zie figuur 16). Bij salicylzuur (fig. 16, curve I) is met T.M.A.H. slechts vaag een knikpunt in een opgaande curve waar te nemen ongeveer na bereiken van het equivalentiepunt voor de COOH-groep. Bij protocatechuzuur + T.B.A.H. (curve II) treedt een dergelijk knikpunt op equivalent met COOH- + 1 OH-groep. Slechts in één geval, nl. bij protocatechuzuur + T.M.A.H. (curve III) vertoonde de curve een zeer onscherp maximum en dito minimum. Het maximum komt echter niet overeen met het equivalentiepunt voor de COOH-groep. Het "minimum" is ongeveer equivalent met COOH-



Figuur 16. Conductometrische titratie van 0,25 mmol
I - salicylzuur in 60 ml D.M.F. met T.M.A.H. in I.P.
II - protocatechuzuur in 5 ml D.M.F. + 55 ml pyridine met T.B.A.H. in I.P.
III - idem met T.M.A.H. in I.P.
IV - salicylzuur in 60 ml D.M.F. met $NaOC_3H_7$-iso
V - 2,5-dihydroxichinon-1,4 in 60 ml D.M.F. met $NaOC_3H_7$-iso.
i = kleuromslag indicator (thymolblauw)
p = begin van neerslagvorming (bij I, II en IV niet genoteerd)

+ 1 OH-groep. Daarna volgt nog een onscherp knikpunt voor COOH- + 2 OH-groepen. Gezien deze resultaten werden met quaternaire ammoniumbasen dan ook verder geen titraerpogingen ondernomen.

Bij alle andere titraties werd als base natriumisopropanolaat gebruikt aangezien hiermee nog de beste resultaten werden verkregen.

Als oplosmiddel werden geprobeerd zuivere D.M.F., D.M.F.-pyridine (1 : 11), zuivere pyridine, D.M.F.-acetonitril (1 :11). De beide laatsten bleken ongeschikt te zijn. Bij het D.M.F.-pyridinemengsel is het geleidingsvermogen van de oplossing veel kleiner dan in D.M.F. alléén, de meterinstelling bleek veelal trager te zijn en er begon eerder een neerslag op te treden.

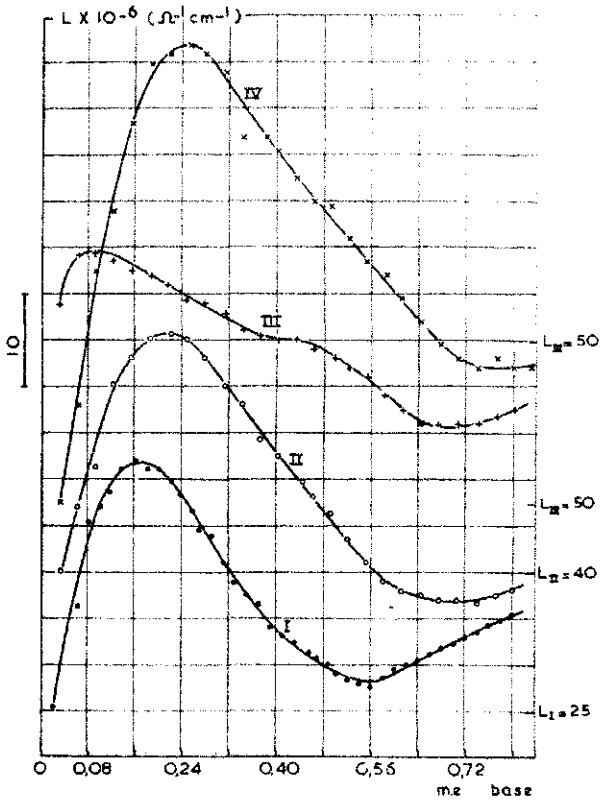
Bij de meeste "modelstoffen" werden nog de beste resultaten verkregen bij gebruik van D.M.F. als oplosmiddel. Zo trad bij salicylzuur (figuur 16, curve IV) een vrij scherp maximum op bij het bereiken van het equivalentiepunt voor de COOH-groep. Een minder scherp minimum vertoonde de curve bij het bereiken van het equivalentiepunt voor de OH-groep.

Titratie van 2,5-dihydroxi-p-chinon (curve V) leverde eveneens een N-vormige curve. Hier was echter het minimum scherper dan het maximum. Bij pyrocatechol was noch het minimum noch het maximum scherp. Titratie van hydrochinon gaf een stoelvormige curve met eveneens onscherpe "knikpunten". (In figuur 16 zijn lang niet alle curven die werden bepaald opgenomen maar slechts enkele "illustratieve").

Opgemerkt kan nog worden dat tijdens de titraties een neerslag optrad. Soms bleek duidelijk dat dit optreden van een neerslag, vooral daar waar het niet geleidelijk maar abrupt ontstond, het verloop van de curve beïnvloedde. In andere gevallen was echter geen invloed duidelijk vast te stellen.

Vermeldenswaard is tenslotte dat de kleuromslag van thymolblauw, dat bij de meeste van deze titraties werd toegevoegd, gewoonlijk in de buurt van het equivalentiepunt der COOH-groep begon op te treden, maar dikwijls hiermee niet precies samenviel en vaak zich over een groot traject voltrok. Het is dus zeer bepaald niet zo dat thymolblauw voor deze titraties universeel toepasbaar is. Integendeel, zowel het te titreren zuur als de gebruikte base en het oplosmiddel bleken van invloed te zijn.

Figuur 17 geeft enkele curven verkregen door een vloeiende lijn zo goed mogelijk door de meetpunten, gevonden bij titratie van



Figuur 17. Conductometrische titratie van 100 mg huminezuren, opgelost in 60 ml D. M. F. met $NaOC_3H_7$-iso.

Huminezuren: I - uit veenkoloniale grond (No. 082 I)
II - uit bosveen (No. 123b)
III - uit pyrocatechol + NH_4OH (No. IV)
IV - uit pyrocatechol + NaOH (No. VI)

huminezuren in D. M. F. met Na-isopropanolaat, te trekken. De gevonden meetpunten vormen nl. niet zoals tot dusver zelf een vloeiende lijn. De reproduceerbaarheid laat dan ook wel te wensen over. Niettemin is het duidelijk dat het geleidingsvermogen achtereenvolgens een maximum en daarna een minimum vertoont. De "knikpunten" zijn (door grafische extrapolatie van de curvegedeelten vóór en na de extrema), vooral bij het minimum niet scherp vast te stellen.

Uit metingen door verschillende onderzoekers (geref. door VAN MEURS en DAHMEN, l. c.) is gebleken dat alle ionen (inclusief H^+) in D. M. F. en pyridine ongeveer dezelfde beweeglijkheid hebben. De aanvankelijke stijging van het geleidingsvermogen betekent dus dat er méér geladen deeltjes in oplossing komen of dat de deeltjes meer

lading krijgen, m.a.w. dat de ontstaande Na-H-humaten beter gedissociëerd zijn dan de vrije huminezuren.

De belangrijke vraag waar het daarna om gaat is hoe het maximum moet worden geïnterpreteerd. In ieder geval lijkt het nog veel onwaarschijnlijker dan bij tweebasische zuren dat het maximum een gevolg zou zijn van de vorming van een intermoleculair zuur-anion-complex dat een sterk gedissociëerd ionenpaar vormt met Na^+, zoals volgens Bruss en Harlow bij eenwaardige fenolen het geval zou zijn. Het betreft hier immers nog veel grotere moleculen met verschillende zuurgroepen, waarvan bij associatie ook eerder een geringere beweeglijkheid en dus een daling van het geleidingsvermogen te verwachten zou zijn. Bovendien is de diëlectriciteitsconstante van D.M.F. veel groter dan die van pyridine waarin Bruss en Harlow en van Meurs en Dahmen de fenolen titreerden. Ten derde wordt met elke druppel baseoplossing ten opzichte van de toegevoegde hoeveelheid natrium-isopropanolaat een overmaat isopropanol toegevoegd, dat door zijn solvaterende ("hydrogen-bonding") eigenschappen de vorming van een dergelijk complex ook zou voorkomen. Een argument tegen deze complexvorming is tenslotte nog dat het maximum veel eerder optreedt dan halverwege het minimum.

De beide laatste argumenten weerspreken ook de vorming van een intramoleculair zuur-anion-complex die overigens bij huminezuren lang niet onwaarschijnlijk zou zijn. Indien een dergelijk complex aangenomen moet worden dan zou het maximum nog wel een reëel equivalentiepunt kunnen zijn maar behoefde het nog niet het punt te zijn waarbij alle COOH-groepen juist zijn getitreerd en dat punt proberen we juist te bepalen. Het zou bijv. dan ook het punt kunnen zijn waar de helft van het aantal COOH-groepen (indien dit aantal per molecuul even is) is getitreerd. Om op dit punt echter alle twijfel uit te sluiten werden nog enkele titraties uitgevoerd met als oplosmiddel 55 ml D.M.F. en 5 ml isopropanol. Deze hoeveelheid alcohol moet nl., gezien de resultaten van genoemde onderzoekers, ruimschoots voldoende worden geacht voor het voorkomen van dergelijke intramoleculaire complexen. Inderdaad trad ook in dit milieu nog een maximum op.

Een andere verklaring voor het optreden van een maximum zou kunnen zijn het ontstaan van een neerslag, zonder dat dit iets te maken heeft met het bereiken van een equivalentiepunt. Dit wordt echter tegengesproken door de waarneming dat het punt waarbij neerslag begint op te treden meestal vóór het maximum ligt, maar soms

ook daarop volgt en in elk geval zelden daarmee samenvalt. Overigens zij eraan herinnerd, dat neerslagvorming bij van Meurs en Dahmen wel een maximum veroorzaakte voordat het equivalentiepunt bij alifatische monocarbonzuren was bereikt, maar het verloop van de titratiecurve niet ingrijpend bleek te beïnvloeden bij dicarbonzuren (zoals ook bij salicylzuur e.d. niet het geval was).

Bij dibasische zuren die in water een kleine K_1/K_2-verhouding hebben en waarbij de mogelijkheid via een ringstructuur intramoleculaire zuur-anion-complexen te vormen. ontbreekt of afgesneden is werd, zoals vermeld, hoogstens een stoelvormige curve met minder scherp vast te stellen knikpunten of zelfs een curve zonder knikpunten verkregen. Hierop voortbordurend zou het niet-rechtlijnige verloop van de titratiecurve bij huminezuren vóór het maximum en de geringe scherpte van het maximum veroorzaakt kunnen zijn door een gering onderling verschil tussen de respectievelijke dissociatieconstanten van COOH-groepen die geen -COOH. . . OOC- associatie kunnen aangaan. Bij zeer kleine K_1/K_2-, K_2/K_3-etc. verhoudingen zou zelfs een dergelijk verloop ook bij het optreden van intramoleculaire complexen denkbaar zijn. (Een aanvankelijk wel rechtlijnig verloop kan berusten op de nivellerende werking van het basische D.M.F. op een deel der dissociatieconstanten). In dat geval is het echter bedenkelijk als equivalentiepunt het snijpunt van de verlengden der rechte curvegedeelten vóór en na het maximum te nemen. Hiervoor het maximum zelf te nemen zou dan wel eens een betere benadering van de waarheid kunnen zijn.

Naast de bovengenoemde mogelijke verklaring voor het verloop van de curve kort voor en bij het maximum kan ook solvolyse in meerdere of mindere mate een rol spelen.

De na het maximum optredende daling van het geleidingsvermogen kan het gevolg zijn van een geringere dissociatie of sterkere ionenpaar-vorming van de hier getitreerde zuurgroepen hetgeen daardoor tevens het neerslaan van de humaten tot gevolg heeft. Voor het flauwe verloop van de curve bij het minimum kan weer een soortgelijke verklaringsmogelijkheid als voor het onscherp zijn van het maximum worden genoemd. Daarnaast is het heel goed denkbaar dat een neergeslagen en niet meer "ladingtransporterend" aggregaat van humaatdeeltjes nog vrije OH-groepen heeft die wel met natrium-isopropanolaat reageren tot -ONa + isopropanol, maar waarbij het geleidings-

vermogen min of meer constant blijft.

Tenslotte: Het belangrijkste argument voor de aanname dat we bij het maximum te doen hebben met het equivalentiepunt voor de COOH-groepen is dat dit maximum ongeveer samenvalt met het eerste buigpunt in de curve verkregen door potentiometrische titratie van huminezuren opgelost in water met alkalihydroxide. In § 5.4 wordt dit gedemonstreerd.

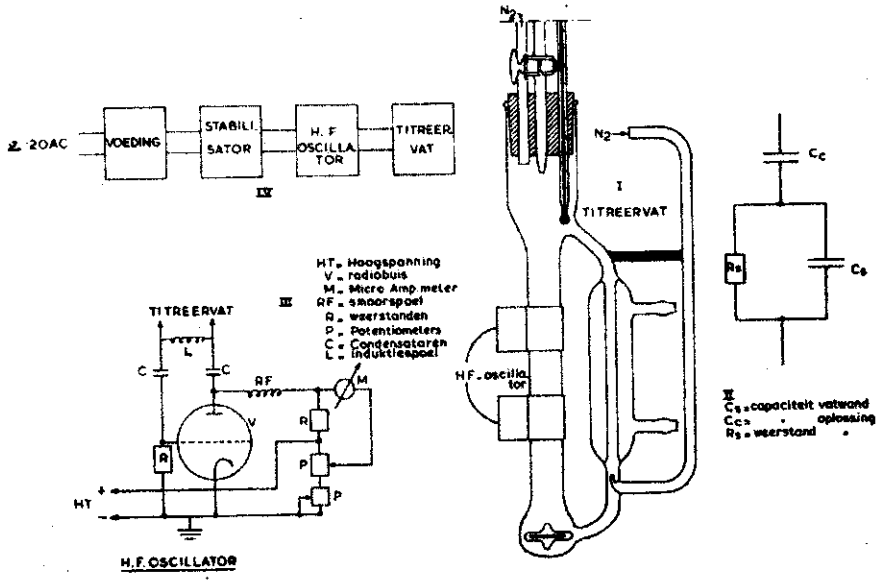
5.3.4. Titraties met behulp van een hoge-frequentie-oscillator

5.3.4.1. Principe van de methode

Aangezien deze methode veel minder bekend is dan die in het voorgaande werden toegepast moge hier een korte toelichting volgen. Het principe van deze methode wordt door BLAEDEL en PETITJEAN (zie BERL, 1951b) als volgt samengevat: "The high-frequency method of chemical analysis is used to measure or to follow changes in the composition of chemical systems. In principle, a vessel containing the chemical system is made part of, or coupled to, an oscillator circuit resonating at a frequency in the range 1-30 Mc. As the nature or composition of the chemical system changes, the resistance and/or capacitance of the circuit are altered, and changes are produced in oscillator characteristics, such as plate current and voltage, grid current and voltage, and frequency. Any of these characteristics may be easily measured and taken as an indication of the change in composition of the chemical system. The fundamental properties of the chemical system which affect the oscillar characteristics are the dielectric constant and the specific conductance".

Blaedel en Petitjean beschrijven vervolgens enkele typen van instrumenten en hun gedrag in het algemeen. Hiervan is, wat betreft het door ons gebruikte (in eigen beheer geconstrueerde) apparaat en titreervat, het volgende van toepassing:

Het in figuur 18^{I} geschetste titreervat is wat zijn electrische eigenschappen betreft bij benadering equivalent met een schakeling als weergegeven in figuur 18^{II}. Hierin vertegenwoordigt C_c de capaciteit van de vatwand, C_s die van de oplossing en R_s de weerstand van de oplossing. Daarbij is $C_s = D \gamma X$ (D = diëlectriciteitsconstante, γ = een dimensiefactor en X = de celconstante). $R_s . X$ is de reciproke



Figuur 18. H. F. -titrator

waarde van het specifiek geleidingsvermogen.

Zoals weergegeven in figuur 18[III] is dit titreervat, parallel geschakeld met een inductie L, opgenomen in een resonantiecircuit waarvan de frequentie (in cycles/sec) dan gelijk is aan $\frac{1}{2\sqrt{L.C_p}}$

(C_p is een vrij ingewikkelde functie van R_s, C_s en C_c). Door de spoel L verwisselbaar te maken konden wij naar keuze een frequentie van ongeveer 3,5; 8 en 30 Mc instellen.

Waar het op aan komt is dat de frequentie afhankelijk is van de diëlectriciteitsconstante en van het geleidingsvermogen van de oplossing in het titreervat. Bij toevoeging van een base aan een oplossing van een zuur veranderen deze grootheden (vooral het geleidingsvermogen) en daarmee dus de frequentie. Zoals in het bovengegeven citaat van Blaedel en Petitjean is vermeld kan men deze verandering op verschillende wijze meten. In ons apparaat wordt dit gedaan door een microampèremeter M die geshunt is met de anodekring (een verandering van de frequentie verwekt nl. tevens een verandering van de anodestroom).

Zoals in het blokdiagram van figuur 18[IV] is aangegeven bestaat het apparaat verder uit een voedingsgedeelte, dat de vereiste spanning

moet leveren en een stabilisator, waarmee de spanning op enkele millivolts nauwkeurig wordt gestabiliseerd.

De frequentie van de oscillator hebben wij niet nauwkeurig bepaald, evenmin hebben wij het apparaat gecalibreerd met behulp van standaardsystemen. De uitslag van de microampèremeter als responsie op het toevoegen van titrant konden wij dan ook niet splitsen in een (kleiner) deel veroorzaakt door de verandering van het diëlectricum en een (groter) deel berustend op de verandering van het geleidingsvermogen.

Door het complexe karakter van de responsie behoeft het verband tussen responsie en titranttoevoeging dan ook niet lineair te zijn. Dit verband is in het algemeen afhankelijk van de concentratie van de oplossing, frequentie van de oscillator, keuze van oplosmiddel en titrant e.d. "In fact, the response is quite insensitive to changes in composition except over certain regions of composition..." (Blaedel en Petitjean). Men moet er op bedacht zijn, dat de responsiecurve van de oscillator ook een opgaand deel, een extremum en een dalend deel kan vertonen zonder dat een chemische reactie is opgetreden, maar alleen als gevolg van de veranderende samenstelling bijv. bij toevoeging van de titrant aan het zuivere oplosmiddel. Om artefacten te vermijden moeten dus geschikte titratieomstandigheden worden gekozen. Daarvoor is het noodzakelijk "blanco-titraties" uit te voeren. Heeft men eenmaal een goede (sterk empirisch bepaalde) keuze van deze omstandigheden gedaan, dan kunnen dikwijls titratiecurven verkregen worden met een scherp knikpunt bij het equivalentiepunt. De literatuur geeft hiervan vele voorbeelden.

Een groot voordeel van deze methode is dat we hier geen electroden hebben die in direct contact zijn met de oplossing. De in het laatste geval vaak optredende storingen als gevolg van vergiftiging of polarisatie van de electroden of het afzetten van neerslag hierop zijn dus uitgesloten. Een voordeel is in bepaalde gevallen tevens dat deze "electroden" onmiddellijk responderen en de snelheid van de titratie dus alleen afhankelijk is van de snelheid van homogenisatie van de oplossing en niet van de snelheid waarmee het nieuwe evenwicht tussen electrode en oplossing zich instelt.

Voor een uitvoeriger behandeling van de theorie moge worden verwezen naar het genoemde boek van BERL of naar REILLEY (zie DELAHAY, 1954). Zeer vele, vooral technische details kan men o.a.

vinden bij CRUSE en HUBER (1957).

5.3.4.2. Enkele literatuurgegevens over zuur-base-titraties

Deze zogenaamde "hoge-frequentie" of nog korter "H.F."-titratie, ook wel aangeduid als "oscillometrische" titratie (een passende naam is kennelijk nog niet gevonden) wordt de laatste jaren steeds meer toegepast, vooral bij niet-waterige oplossingen. Een (lang niet volledig) overzicht van de literatuur wordt gegeven door TIMNICK, FLECK en HOOSER (1960).

Hieronder worden slechts enkele algemene literatuurgegevens vermeld die een aanwijzing geven voor de aanpak bij huminezuren. Literatuur zoals die over titraties in oplosmiddelen waarvan we weten dat huminezuren er toch niet in oplossen kan hier gevoegelijk buiten beschouwing blijven. De waarde van aanwijzingen uit de overige literatuur is echter ook betrekkelijk gering, tenminste voor wat betreft kleinere details. Of een "H.F."-titratie van een bepaalde stof bij een bepaalde oplosmiddel-titrant-combinatie succes zal hebben is nl. (nog) niet met zekerheid te voorspellen, laat staan dat men van te voren kan zeggen hoe het curveverloop zal zijn. Zo vermelden Timnick, Fleck en Hooser bijv. dat 2, 4, 6-trichloorfenol wel en fenol niet was te titreren met kalium-methanolaat in benzeen+methanol,indien de stof was opgelost in dimethylformamide. Daarentegen kon fenol in D.M.F. wel getitreerd worden met de zwakker basische titrant KOH in isopropanol. De optimale experimentele omstandigheden moeten voor elke verbinding en voor elk apparaat langs empirische weg bepaald worden.

Als algemene aanwijzing uit de literatuur kan worden vermeld dat voor de titratie van vele zwakke en zeer zwakke organische zuren D.M.F. een zeer geschikt oplosmiddel bleek te zijn (o.a. TIMNICK c.s., 1960; DEAN en CAIN, 1955; KARRMAN en JOHANSSON, 1956; TING, JEFFERY en GROVE, 1960). Bij meerbasische zuren w.o. pyrocatechol en pyrogallol konden in vele gevallen de afzonderlijke equivalentiepunten voor elk der zuurgroepen worden bepaald. Als titranten werden meestal alkali-alkanolaten gebruikt, opgelost in een mengsel van benzeen en methanol, maar bij dibasische zuren zou volgens FLECK (geciteerd door Timnick c.s.) tetrabutylammoniumhydroxide in isopropanol beter voldoen. Hij verrichtte echter de titraties bij een frequentie van 148,5 Mc. Het is best mogelijk (en typerend voor deze titratiemethode) dat de verhoudingen bij een frequentie van bijv. 30 Mc heel anders liggen. In het algemeen geldt: hoe hoger de concen-

tratie aan opgeloste stoffen, hoe hoger de frequentie die men moet toepassen om een goede analyse te krijgen.

De voor ons belangrijkste aanwijzingen leverden echter de resultaten verkregen bij de conductometrische titratie in organische oplosmiddelen (§ 5.3.3.3.). Voorzover ons bekend is deze titratiemethode niet eerder bij huminezuren toegepast.

Om tenslotte nog een indruk te geven van de nauwkeurigheid die men kan bereiken met deze titratietechniek: Karrman en Johansson titreerden diverse fenolen in concentraties van enkele milligrammen per 100 ml oplosmiddel met een ca. 0,03 N base-oplossing waarbij de nauwkeurigheid in het algemeen beter was dan ± 1 %.

5.3.4.3. Experimenteel gedeelte

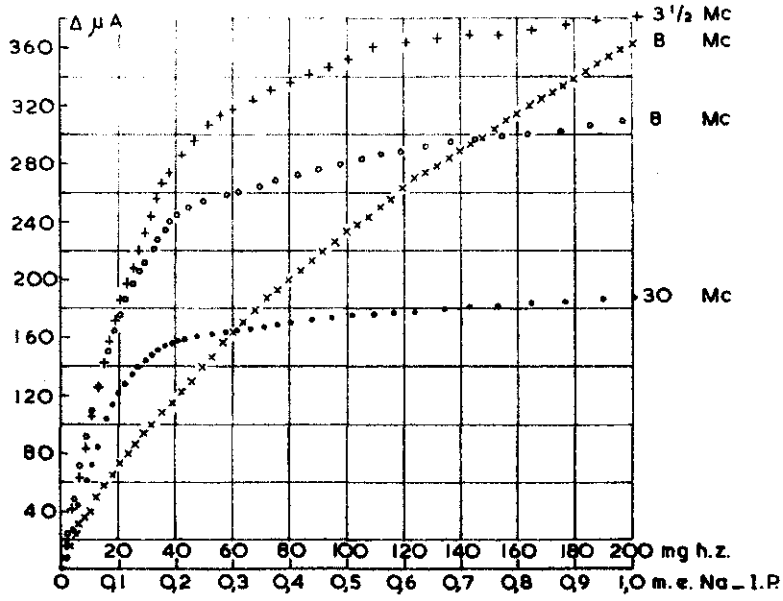
Het principe van het gebruikte apparaat is reeds behandeld in § 5.3.4.1. Wat betreft het titreervat kan nog worden vermeld dat als "electroden" twee platte koperen ringen dienden die onwrikbaar om de ene arm van het titreervat zijn vastgeklemd. De titraties werden weer uitgevoerd in een N_2-atmosfeer, waarbij de stikstofstroom die via de zijarm werd ingeleid tevens de oplossing deed circuleren door beide armen. De homogenisatie werd nog bevorderd met behulp van een "magnetische" roerder. Om de zijarm was een mantel aangebracht die was aangesloten op een rondpompthermostaat. Hierdoor kon de temperatuur ook bij deze titratie op 25°C ± 0,1 worden gehouden. Het titreervat was door middel van een duaxkabel met de oscillator verbonden.

De meeste titraties werden uitgevoerd bij een frequentie van 8 Mc, aangezien dit meestal nog de beste resultaten gaf.

Voor verdere details zoals het bereiden van de huminezuur- en titrantoplossingen wordt verwezen naar 5.3.3.2. en 5.3.2.2.

5.3.4.4. Resultaten en discussie

Figuur 19 geeft de responsie van de H.F.-titrator op de toevoeging van titrant resp. een geconcentreerde huminezuuroplossing aan zuivere D.M.F. In het begin respondeert het apparaat scherp op toevoeging van titrant. Nadat ca. 0,2 m.e. natrium-isopropanolaat is toegevoegd reageert de micro-ampèremeter steeds zwakker op volgende hoeveelheden (een verloop als dat van het geleidingsvermogen van water bij toevoeging van een zwakke base). Een maximum treedt

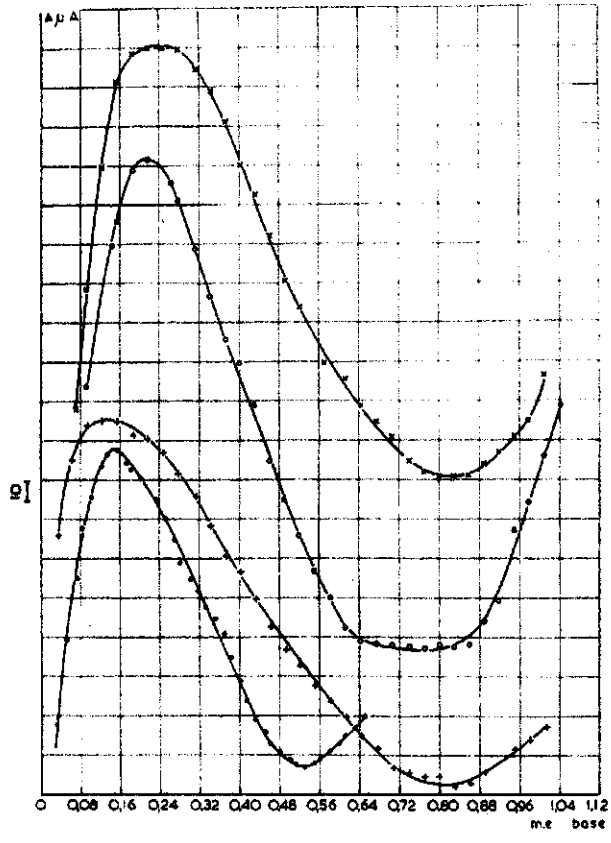


Figuur 19. Responsiecurven van de H.F.-titrator bij toevoeging van natriumisopropylaat aan 60 ml D.M.F. bij een frequentie van 3½, 8 en 30 Mc resp. bij toevoeging van 200 mg huminezuur (082 I) opgelost in 10 ml D.M.F. aan 50 ml D.M.F. bij 8 Mc (x x x x).

niet op. Bij toevoeging van huminezuur aan D.M.F. treedt een regelmatige, langzamerhand iets afnemende meteruitslag op. De kromming van de curve kan niet geheel worden verklaard uit de volumetoename. Het huminezuur gedraagt zich dus in D.M.F. nog niet geheel als een sterk zuur.

In figuur 20 zijn van enkele huminezuren in D.M.F. de verkregen curven bij titratie met natrium-isopropanolaat gegeven. De curven vertonen een zeer sterke overeenkomst met die verkregen bij "gewone" conductometrische titratie bij lage frequentie (figuur 17). De punten liggen echter veel minder gespreid om de curve die als vloeiende lijn hierdoor is getrokken en de plaats van het maximum en het minimum is beter vast te stellen. De titrator blijkt op de veranderingen in samenstelling van de oplossing als gevolg van titranttoevoeging zeer gevoelig te responderen en er schijnen minder storingen op te treden nu de electroden zich buiten de oplossing bevinden.

Zoals gezegd, het is niet aan te geven welk deel van de meteruitslag wordt veroorzaakt door verandering van het geleidingsvermogen. Wel kan echter, gezien ook de "blancotitraties", worden aan-



Figuur 20. H.F.-titratie van 100 mg huminezuren (berekend op asvrije stof) opgelost in 60 ml D.M.F. met natriumisopropanolaat (in I.P. + pyridine) bij 8 Mc.

Huminezuren: . . . . uit zwartveen (No. 116)
+ + + + uit pyrocatechol + NH_4OH (No. IV)
o o o o uit bosveen (No. 123b)
x x x x uit pyrocatechol + NaOH (No. VI)

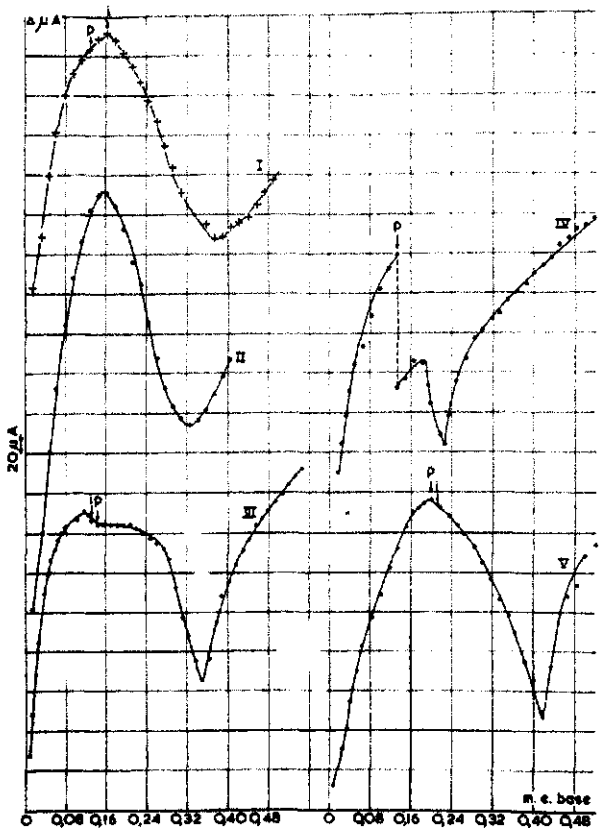
genomen dat de maxima en de minima in de curven geleidbaarheidsmaxima en -minima zijn. De overeenkomst met de conductometrisch verkregen curven is dan ook niet verwonderlijk.

Het maximum was vrijwel steeds veel scherper dan het minimum en ook beter reproduceerbaar. Hier moet echter opgemerkt worden dat het aanvankelijk optimisme wat betreft de reproduceerbaarheid van deze titratiemethode bij huminezuren geluwd is. Het bleek namelijk dat de resultaten sterk afhankelijk zijn van de kwaliteit van het oplosmiddel en de titrantoplossing. (Hetzelfde geldt overigens voor de conductometrische titratie. Het ligt dus niet aan de

titrator). De uitspraak in een vorige publikatie (VAN DIJK, 1960) dat "in high frequency titration we have found an accurate and rather convenient method to determine the amount of less weak acid groups .....in purified humic acids" kan dan ook niet meer geheel gehandhaafd worden. Zowel de nauwkeurigheid als de geschiktheid laten te wensen over.

De indruk werd verkregen dat de voornaamste oorzaak van de minder goede reproduceerbaarheid ligt in het ontstaan van een neerslag. Niet in deze zin dat de neerslagvorming op zichzelf het maximum en minimum veroorzaakt, maar wel het punt waar ze optreden kan beïnvloeden.

Een duidelijke illustratie van de moeilijkheden en onzekerheid veroorzaakt door de neerslagvorming leverden de titraties van "modelstoffen". Figuur 21 geeft de titratiecurven van salicylzuur, galluszuur, syringazuur, protocatechuzuur en vanillinezuur opgelost in D.M.F. en getitreerd met natrium-isopropanolaat. Bij de eerste drie



Figuur 21. H.F.-titratie van 0,13 mmol galluszuur (I), salicylzuur (II), protocatechuzuur (III), resp. 0,25 mmol vanillinezuur (IV) en syringazuur (V) opgelost in 60 ml D.M.F. met natriumisopropanolaat (in I.P. + pyridine) bij 8 Mc.

komt het snijpunt van de verlengden der rechte curvegedeelten vóór en na het maximum (beter dan het maximum zelf!, zie de in 5.3.3.3. opgeworpen vraag) vrij goed of zelfs precies overeen met het equivalentiepunt voor de COOH-groep. Bij protocatechuzuur is dit snijpunt moeilijk te construeren doordat de neerslagvorming, optredend kort na het maximum, de curve onregelmatig maakt. Bij vanillinezuur trad na toevoeging van 0,14 m.e. titrant aan 0,25 mmol van het zuur plotseling veel neerslag op waarbij de micro-ampèremeter 270 eenheden terugviel. Ook verder vertoont de curve hier een zeer onregelmatig verloop. (Een duplo gaf nagenoeg hetzelfde verloop).

Dergelijke complicaties treden misschien ook bij sommige huminezuren op. Verder is niet bij alle huminezuren het maximum even scherp. Behalve bij enkele geïsoleerd uit grond was vooral bij verschillende synthetische huminezuren het maximum niet met redelijke nauwkeurigheid vast te stellen en kan daar hoogstens van een schatting worden gesproken.

In tabel 6 (§ 5.4.) is de ligging van het snijpunt van de verlengden der rechte curvestukken vóór en na het maximum bij de diverse huminezuren vermeld.

Wat betreft het minimum in de titratiecurve kan het volgende worden opgemerkt:

Bij salicylzuur en syringazuur (figuur 21) komt het minimum ruwweg overeen met het equivalentiepunt voor COOH + OH-groep. Bij galluszuur en protocatechuzuur correspondeert het minimum ongeveer met het equivalentiepunt voor de COOH- en twéé OH-groepen. Hier is dus meer bereikt dan bij de potentiometrische titratie in water of D.M.F. met resp. NaOH en T.B.A.H. Daar kon immers bij salicylzuur slechts één buigpunt (voor de COOH-groep) worden verkregen en bij galluszuur twee buigpunten, nl. een voor de COOH- en een ongeveer voor één OH-groep.

Hieruit blijkt dat het niet zonder meer toegestaan is uit het minimum het totaal aan fenolische OH-groepen bij huminezuren af te leiden. Evenals bij galluszuur kunnen er nog fenolische OH-groepen overblijven die niet reageren met het alkanolaat (of, zo men wil: niet alle aan een benzeenring gebonden OH-groepen hebben een fenolisch karakter).

Het minimum in de curven van de huminezuren (figuur 20) komt meestal ruwweg overeen met het eindpunt verkregen bij conductometrische titratie in waterige oplossing met bariumhydroxide,

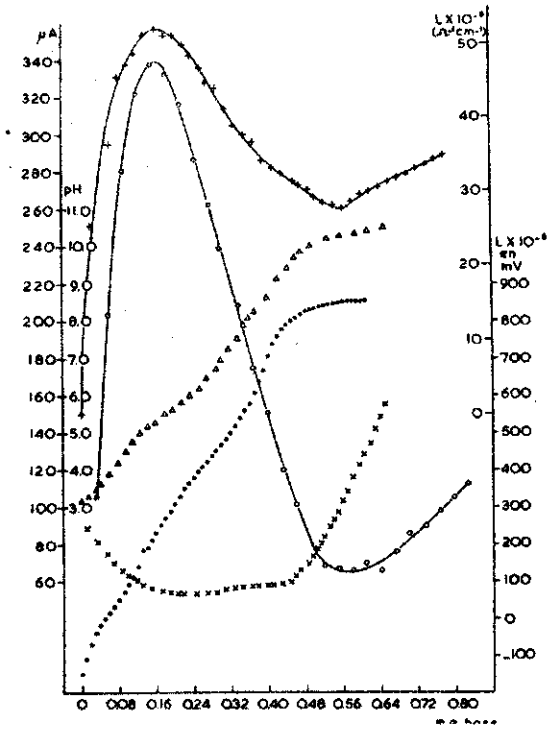
dikwijls ligt het iets verder (In D.M.F. kunnen meer groepen zich "zuur" gedragen dan in water!). Zoals reeds opgemerkt is het minimum echter in het algemeen onscherper en (nog) moeilijker reproduceerbaar dan het maximum. Bovendien zijn wij er meer in geïnteresseerd te weten hoe "zuur" de huminezuren zijn in water dan in D.M.F. De minima zijn daarom verder buiten beschouwing gelaten.

Tenslotte kan nog worden vermeld dat titratie van "modelstoffen" in D.M.F.-acetonitril (1 : 5) of met T.M.A.H. of natriumcolaminaat als titrant in het algemeen slechtere resultaten gaf; soms onjuiste, meestal onscherpe extrema of (bij T.M.A.H.) helemaal geen extrema. Soortgelijke ervaringen werden opgedaan bij huminezuren.

5.4. SLOTBESCHOUWING VAN HOOFDSTUK 5

Het onderzoek beschreven in de voorgaande paragrafen heeft onomstotelijk de aanwezigheid van tenminste twee soorten zuurgroepen aangetoond. De beide onderscheiden soorten (het kunnen er in werkelijkheid meer zijn) konden met de toegepaste methoden niet worden geïdentificeerd. (Hiervoor zullen vermoedelijk zeer selectieve organisch-chemische methoden, getoetst aan bekende modelstoffen die, qua structuur en "zuursterkte", zoveel mogelijk de huminezuren benaderen, nodig zijn. Afgaande op de literatuur levert het infra-rood spectofotometrisch onderzoek momenteel nog geen betrouwbare kwantitatieve gegevens. De interpretatie van I.R.-spectra is bij huminezuren nl. nogal speculatief (SCHWARTZ en ASFELD, 1963) doordat de spectra, zoals te verwachten van dergelijke ingewikkelde verbindingen, vele absorptiebanden vertonen).

Ter onderlinge vergelijking van de titratiemethoden zijn in figuur 22 de op verschillende wijze verkregen titratiecurven van huminezuren uit een der gronden weergegeven. Als alleen afgegaan mocht worden op deze figuur dan zou voor de bepaling der sterker zure groepen de keuze zeker vallen op de H.F.-titratie. Zoals in de vorige paragraaf echter reeds is vermeld, is de reproduceerbaarheid van deze titratie nog weinig bevredigend en, zoals reeds bleek uit figuur 20, is het maximum zeker niet altijd zo scherp als bij de huminezuren in figuur 22. Het laatste woord is hier dus nog niet gesproken. Zoals aan het slot van 5.3.2.3. opgemerkt verdient ook de methode, die MEYER (1962) toepaste, waarbij de huminezuren potentiometrisch in een organisch oplosmiddel werden getitreerd in aanwezigheid van twee "ijkstoffen", nadere toetsing.



Figuur 22. Vijf typen titratiecurven van 100 mg huminezuren 082 I uit veenkoloniale grond in 60 ml oplosmiddel.

Δ Δ Δ Potentiometrische titratie in water met 0,3 N NaOH (pH-schaal).

x x x Conductometrische titratie in water met 0,2 N $Ba(OH)_2$ (rechtse L-schaal op rechtse ordinaat).

. . . Potentiometrische titratie in D.M.F. met 0,3 N T.B.A.H. (mV-schaal).

+ + + Conductometrische titratie in D.M.F. met 0,3 N $NaOC_3H_7$iso (linkse L-schaal op rechtse ordinaat).

o o o H.F.-titratie in D.M.F. met 0,3 N $NaOC_3H_7$iso (microamp. schaal).

Voor de bepaling van de som der zure groepen geven wij bij de huidige stand van zaken de voorkeur aan de conductometrische titratie in water met bariumhydroxide. De bepaling is snel en goed reproduceerbaar, terwijl het eindpunt tamelijk nauwkeurig is vast te stellen.

Bij 4 huminezuren werden de "COOH"-groepen tevens bepaald volgens de Ca-acetaat-methode (§ 4.3.3.) en volgens de decarboxyleringsmethode (§ 4.2.2.) op de door BLOM (1960) beschreven werkwijzen. De resultaten zijn weergegeven in tabel 5, samen met die door

ons verkregen bij conductometrische titratie in water en bij H.F.-titratie in D.M.F. Hieruit is zonder meer duidelijk dat de Ca-acetaat-

Tabel 5. Vergelijking van "COOH"-waarden verkregen volgens verschillende methoden.

No.	Herkomst	"COOH" + "OH" 1)	"COOH" volgens Ca-acetaat methode	"COOH" volgens decarbox.	"COOH" uit max. H.F.
082 I-	Veenkol. gr. (NaOH-NaF)	4,9	4,5	2,2	1,0
123b	Bosveen (2e extract)	4,9	5,1	1,3	1,8
IV	Pyrocatech. + NH_4OH	5,2	2,5	1,7	1,1
VI	Pyrocatech. + NaOH	5,7	2,8	1,1	1,8

1) Volgens conductometrische titratie in water met $Ba(OH)_2$. Alle waarden in m.e. per g asvrije huminezuren.

methode bij de huminezuren uit grond veel te hoge waarden geeft. Bij die uit bosveen zouden zelfs alle zuurgroepen COOH-groepen moeten zijn. Bij de synthetische huminezuren liggen de waarden veel lager (maar toch nog altijd ongeveer 2 x zo hoog als die ontleend aan de H.F.-titratiecurven). Het verschil tussen de natuurlijke en de synthetische huminezuren is, althans gedeeltelijk, verklaarbaar uit het verloop van de curven bij potentiometrische titratie in water. Dit is bij deze synthetische huminezuren in het begin nl. steiler (zie ook § 6.3.1.4.) en de sterk zure groepen zijn dus iets minder sterk zuur dan bij de natuurlijke huminezuren.

De decarboxylering levert waarden die veel beter overeenkomen met die voor "COOH" volgens de H.F.-titratie. Opgemerkt kan worden dat de bepaling wordt uitgevoerd onder stikstof, d.w.z. dat oxidatieve afbraak door luchtzuurstof was uitgesloten. Het lijkt daarom niet direct waarschijnlijk, gezien ook hetgeen over deze methode in de literatuur wordt vermeld, dat de gevonden waarden erg veel van de werkelijke verschillen. Voorshands menen wij uit deze resultaten dan ook steun te mogen putten voor de opvatting dat de sterker zure groepen, althans overwegend, carboxylgroepen zijn. Voor het verschijnsel, dat de decarboxylering hoge waarden levert als de H.F.-waarden laag zijn en omgekeerd kunnen wij geen plausibele verklaring geven. Het kan trouwens

toeval zijn.

In tabel 6 zijn gegevens bijeengebracht, verkregen met verschillende titratiemethoden. De ligging van het eerste buigpunt bij poten-

Tabel 6. Enkele gegevens verkregen bij verschillende titraties

(1) No. huminezuur	(2) herkomst	(3) 1e buigpunt pot. titratie (in water)	(4) "max. equiv. gew."	(5) max.H.F. titratie	(6) eindpunt conduct. titr.met $Ba(OH)_2$	(7) uit (6) ber. equiv. gew.	(8) verh. "COOH" : "fenol.OH"
082 I	veenkol.grond (NaOH-NaF)	0,07	1430	0,10	0,49	204	1 : 4
082 II	" (NaF)	0,06	1670	0,09	0,55	181	1 : 5
116	zwartveen	0,04	2500	0,12	0,41	245	1 : 2
118	X 2	0,10	1000	0,12	0,49	205	1 : 3
123a	bosveen	0,06*	1670*	0,08*	0,58	172	1 : 6
123b	"	0,09	1120	0,18	0,49	202	1 : 2
123c	"	0,05*	2000*	0,14*	0,56	179	1 : 3
114	zandgrond (bouwland)	0,04	2500	0,15	0,46	215	1 : 2
113	" (heide)	0,11	910	0,12*	0,52	194	1 : 3
117	"bruine bank"	0,08	1250	0,07*	0,50	200	1 : 6
115	zavel	0,07	1430	-	0,51	196	-
089B	zeeklei	0,08	1250	-	0,68	147	-
094B(Br)	rodoorn	0,05	2000	0,15	0,46	219	1 : 2
122	rivierklei	0,20*	500*	-	0,42	238	-
121(Gr 1)	zwarte aarde	0,06*	1670*	-	0,94	106	-
121(Br 2)	"	0,09	1120	-	0,75	133	-
121(Gr 2)	"	0,15*	670	0,08	1,00	100	1 : 11
	gemiddeld	0,08	1250	0,117	0,58	172	1 : 4
Ia	h.ch. + NH_4OH (+ $CuSO_4$ roeren)	0,08	1250	0,08*	0,47	213	1 : 5
Ib	" " (- " ")	0,09	1120	0,08*	0,48	208	1 : 5
IIa	" " (+ " schudden)	0,12	830	0,08*	0,53	189	1 : 6
IIb	" " (- " ")	0,05	2000	0,12	0,54	185	1 : 4
V	" + NaOH	0,16*	620*	0,18*	0,62	160	1 : 3
IV	pyrocatechol + NH_4OH	0,04	2500	0,11*	0,52	192	1 : 4
VI	" + NaOH	0,05	2000	0,18*	0,57	175	1 : 2
III	pyrogallol + NH_4OH	0,06	1670	0,10*	0,68	147	1 : 6
	gemiddeld	0,08	1250	0,116	0,55	184	1 : 4

Waarden in kolom 3, 5 en 6 in m.e.per 100 mg asvrije huminezuren; de wijze waarop deze waarden zijn verkregen is beschreven in resp. 5.2.1.3, 5.3.4.4 en 5.2.2.3.

Kolom 4 is berekend uit kolom 3 en dus alleen betrokken op "COOH".
Kolom 7 is betrokken op "COOH" + "OH".

* onbetrouwbaar.

tiometrische titratie in water (kolom 3) vertoont een aanzienlijke spreiding, zowel bij natuurlijke als bij synthetische huminezuren. Gezien de tamelijk grote onnauwkeurigheid waarmee de vaststelling van dit buigpunt behept is, mogen uit deze cijfers geen vergaande conclusies ten aanzien van individuele verschillen tussen de huminezuren

worden getrokken. Het blijkt dat de gemiddelden bij beide groepen huminezuren gelijk zijn.

Uit de uit kolom 3 berekende "maximale equivalentgewichten" (zie § 5.2.1.3.) blijkt dat een gemiddeld molecuulgewicht voor huminezuren van 500, zoals wel opgegeven in oudere literatuur, zeker veel te laag is.

Hetgeen over de ligging der eerste buigpunten werd opgemerkt geldt eveneens voor de ligging der maxima in de H.F.-titratiecurven (kolom 5). De gemiddelden hiervan liggen evenwel duidelijk hoger dan die van kolom 3. Zoals beredeneerd in § 5.2.1.3. zijn de cijfers in kolom 3 te beschouwen als minimumwaarden en is het zeer aannemelijk dat de werkelijke waarde voor de sterk zure groepen hoger is. Dit in aanmerking nemend kan van een redelijke overeenstemming worden gesproken.

Kolom 6 geeft de ligging der knikpunten verkregen bij conductometrische titratie in water met bariumhydroxide. Ook hier blijkt dat de huminezuren wel onderlinge verschillen vertonen (en déze verschillen zijn betrouwbaar), maar dat natuurlijke en synthetische huminezuren gemiddeld genomen wel vergelijkbaar zijn. De sterk afwijkende waarden, gevonden voor de huminezuren uit zwarte aarde kunnen wij slechts signaleren maar niet verklaren. In verband met de zeer goede naam die de zwarte aarde heeft zou verificatie en verklarend onderzoek wellicht nuttig zijn.

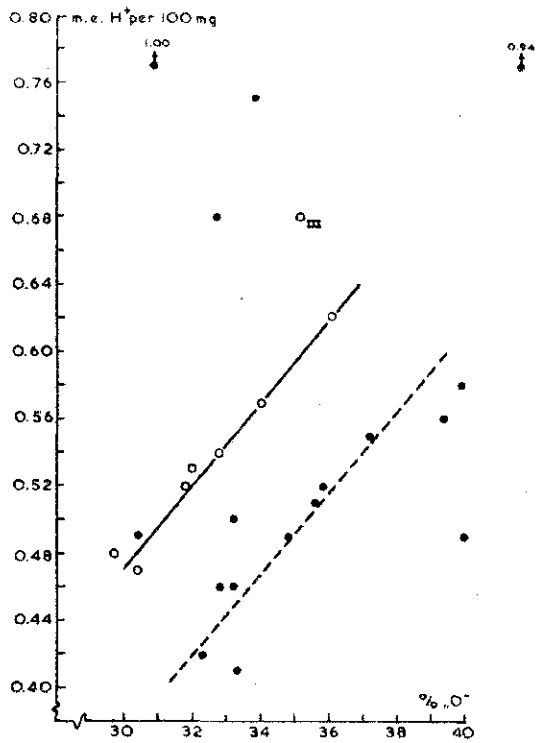
Kolom 7 geeft het equivalentgewicht berekend op de som der zuurgroepen.

In kolom 8 is de verhouding van het aantal "COOH"- tot het aantal "fenolische OH"-groepen, berekend uit de kolommen 5 en 6, (afgerond op eenheden) aangegeven. Ook hier geldt weer: een aanzienlijke variatie onderling maar gemiddeld geen verschil tussen natuurlijke en synthetische huminezuren. In het volgende hoofdstuk zal blijken of de individuele verschillen, zo ze al reëel zouden zijn, ook consequenties hebben voor de kationenbinding.

Tenslotte is nagegaan of er enig verband bestaat tussen het percentage zuurstof in huminezuren (in benadering gelijk gesteld aan 100 minus % C, N en H) en de som der zuurgroepen in m.e. per 100 mg, beide berekend op basis van asvrij.

Figuur 23 geeft het resultaat dat bepaald opmerkelijk is te noemen. Alle punten samen genomen valt er geen enkel verband te ontdekken. Let men echter alleen op de synthetische huminezuren, dan blijken 7

hiervan met zeer weinig spreiding te liggen op de lijn waarvoor geldt: $y = 0,0234\ (x - 10)$. M.a.w. een vast percentage zuurstof in deze huminezuren, nl. 10 % heeft geen invloed op het aantal m.e. H^+ dat per gewichtseenheid aanwezig is. Het resterende percentage zuurstof,



Figuur 23. Het verband tussen het aantal m.e. H^+ per 100 mg huminezuren en het zuurstofgehalte.

vermenigvuldigd met een constante factor, is gelijk aan het aantal m.e. H^+ per gewichtseenheid huminezuren. Eén van de synthetische huminezuren vormt een "uitbijter". Dit is juist het huminezuur III, dat bereid is uit een trihydroxibenzeen nl. pyrogallol, terwijl de ander zeven zijn bereid uit dihydroxibenzenen. Het ligt voor de hand te veronderstellen dat er een causaal verband bestaat tussen deze feiten.

In figuur 23 hebben wij verder de rechte $y = 0,0234\ (x - 14)$ getrokken (gebroken lijn), omdat ongeveer de helft van de natuurlijke huminezuren op of om deze lijn bleken te liggen. Het percentage "inerte" zuurstof zou bij deze huminezuren dus ca. 14 bedragen, terwijl de rest, vermenigvuldigd met dezelfde factor als bij de synthetische, ongeveer overeenkomt met het aantal m.e. H^+ per gewichtseenheid huminezuren. Om hieruit conclusies te trekken ten aanzien van het "mo-

nomeer" waaruit deze huminezuren zijn gevormd lijkt ons te speculatief. Dit geldt in nog sterkere mate voor de natuurlijke huminezuren die sterk van deze lijn afwijken. De hier verkregen aanwijzingen lijken ons echter perspectief te bieden voor nader onderzoek.

Wij hebben voor de 7 synthetische huminezuren, bereid uit dihydroxibenzenen de "zuurstofbalans" opgemaakt: gemiddeld bevatten 100 mg van deze huminezuren 32,4 mg O, (waarvan dus 10 mg niet in verband staan met het zuurkarakter) en 0,53 m.e. H^+. Van deze H^+ nemen we aan, dat die gebonden is aan zuurstofatomen. Bij een verhouding van 1 COOH op 4 OH is 0,53 m.e. H^+ dus aanwezig in combinatie met 6/5 x 0,53 = 0,64 milliatoom O. Het aantal milliatomen O dat in vaste verhouding tot het aantal m.e. H^+ aanwezig is, is echter $\frac{32,4 - 10}{16} = 1,4$. Dus op elke 5 H^+ zijn geen 6 O (in 1 COOH + 4 OH) maar ongeveer 13 O aanwezig, terwijl de huminezuren daarnaast nog 10 % andere O bevatten. Voor een serieuze hypothese beschikken wij over te weinig gegevens.

6. DE BINDING VAN KATIONEN DOOR HUMINEZUREN

6.1. INLEIDING EN NOMENCLATUUR

In § 1.1. werd reeds genoemd dat het doel van het onderzoek primair was nader geïnformeerd te worden over de binding en uitwisseling van kationen door huminezuren. Het praktische belang van dit onderzoek blijkt duidelijk uit het volgende:

Door zijn, in vergelijking met de minerale bestanddelen van de grond, hoge uitwisselingscapaciteit nl. 150-250 m.e./100 g droge stof is het aandeel van de humus (waarvan de huminezuren een hoofdbestanddeel vormen) in de totale uitwisselingscapaciteit van de grond relatief hoog. Dit aandeel varieert volgens SCHACHTSCHABEL (1940) van ongeveer 25-35 % bij zware kleigronden tot ca. 90 % bij lichte zandgronden. Eigen, niet gepubliceerde onderzoekingen gaven bijvoorbeeld een percentage van 84 bij ontginningszandgronden in Drente (gemiddeld gehalte aan organische stof 6,4 %). Bovendien zouden ook de wetmatigheden van de ionenwisseling zoals de selectiviteit en stabiliteit van de ionenbinding bij kleimineralen en humus sterk verschillend zijn (o.a. Schachtschabel, l.c.). Met het gedrag van de humus als ionenwisselaar hangen belangrijke kwesties als de plantevoeding (in het bijzonder de voorziening van de plant met "sporenelementen") samen. Verder kan de deelname van de humus aan bodemvormende processen zoals "podzolering" (WRIGHT en SCHNITZER, 1963) worden genoemd.

In vele publikaties worden voor de bindingswijze van twee- of meerwaardige kationen aan huminezuuranionen de termen complex of chelaat gebruikt, vooral als het gaat over elementen van de eerste overgangsreeks zoals Mn, Fe, Cu, Zn. "Chelates in soils" was ook de titel van een symposium, georganiseerd door de Soil Science Society of America in november 1961. Hieruit en uit het feit dat MORTENSEN (1963) in zijn daar gegeven overzicht over "complexing of metals by soil organic matter" 126 literatuurplaatsen aanhaalt, blijkt duidelijk dat er voor dit onderwerp een grote belangstelling bestond en nog steeds bestaat. Ook in het meergenoemde boek van SCHEFFER-ULRICH (1960) worden hieraan aandacht besteed (pg. 70-81). Het lijkt ons daarom overbodig hier nogmaals een zo volledig mogelijk literatuuroverzicht te geven. Bij de bespreking van de huidige (divergerende) theorieën over de metaal-"humus"-binding hebben wij de methoden van onderzoek centraal gesteld, mede om daarmee onze eigen keuze van methode te

verantwoorden.

Alvorens tot deze bespreking over te gaan moet echter een nomenclatuurkwestie worden besproken. Het is nl. zo dat ook al gebruiken vele onderzoekers de termen complex en chelaat, zij hiermee toch nog niet steeds hetzelfde bedoelen en omgekeerd, dat soms verschillende namen worden gebezigd terwijl toch hetzelfde blijkt te worden bedoeld. Nu door de International Union of Pure and Applied Chemistry regels zijn opgesteld voor de nomenclatuur van coördinatieverbindingen (van deze regels is in 1963 een Nederlandse bewerking van HAAK, HOSTE, JELLINEK en VAERNEWIJCK verschenen) verdient het dringend aanbeveling zich, waar mogelijk aan deze regels te houden (en waar men meent ervan te moeten afwijken, dat te vermelden). Zo kan het dispuut over de structuur van de verbindingen tenminste worden gezuiverd van misverstanden tengevolge van verschillen in nomenclatuur.

Uit de genoemde regels is het volgende op te maken:

1. Coördinatieverbindingen kunnen worden gevormd bij toevoeging van ionen en/of moleculen aan andere ionen en/of moleculen. Het zijn verbindingen waarin een centraal atoom A voorkomt, omringd door (coördinerende) atomen B of groepen C die liganden heten.
2. Een groep* die meer dan één potentieel coördinerend atoom bevat heet een meertandig ligand.
3. Is dit meertandig ligand door middel van twee of meer "tanden" aan éénzelfde centraal atoom gebonden, dan heet het een chelaat ligand en het geheel een chelaat.
4. Is een meertandig ligand aan meer dan één centraal atoom gebonden, dan heet het een bruggroep.
5. Het samenstel van een, twee . . . meer centrale atomen en hun liganden heet resp. een éénkernig, tweekernig . . . veelkernig complex.

Bij consequente toepassing van deze regels bij humaten moeten dus alle weinig gedissocieerde zouten van huminezuren en meerwaardige basen (althans voorzover aan punt 1 wordt voldaan), veelkernige complexen worden genoemd, bestaande uit een meertandig ligand en een aantal centrale atomen (nog juister zou misschien zijn te spreken van een veelkernig chelaat. Deze term komt echter niet in de regels

* Het begrip "groep" wordt niet nader gepreciseerd. Complete organische anionen kunnen dus als groep in de hierbedoelde zin worden opgevat.

voor).

Met nadruk zij opgemerkt dat met deze naamgeving geen uitspraak wordt gedaan over de aard van de bindingen tussen het humaation als meertandig ligand en de metaal-atomen, met name over de vraag of er naast electrostatische bindingen ook nog niet-electrostatische bindingen in het spel zijn.

Ook de grootte van de ring gevormd door chelaat ligand en metaalatoom is niet in de naamgeving betrokken. Bij macromoleculen kan de chelaatring theoretisch zeer groot zijn, namelijk als een metaalatoom als een soort "cross-link" aan twee "toevallig" naburige liganden in het kluwen is gebonden. In feite zijn volgens de huidige nomenclatuur alle Me^{++}-zouten van polymere zuren evenals alle ionenwisselaars waarin het Me^{++}-ion met twee of meer bindingen aan de wisselaarmatrix is gebonden onder de veelkernige complexen c.q. chelaten te rangschikken.

Tenslotte wat de naamgeving in detail betreft: Zolang althans de nauwkeurige samenstelling, de bindingswijze der kationen, het gemiddeld molecuulgewicht en het gemiddeld aantal liganden per molecuul nog onzeker zijn, heeft het weinig zin om een humaat dat bijv. zowel Na- als Cu(II)-ionen bevat anders aan te duiden dan een natrium-koper (II)-humaat.

6.2. METHODEN VAN ONDERZOEK (LITERATUUR)

6.2.1. Potentiometrische methoden

Voegt men aan een polybasisch zuur, opgelost in water, een metaalzout van een sterk zuur toe dan treedt in het algemeen een pH-daling op als gevolg van een competitie tussen de protonen en de metaalionen om een binding aan te gaan met het polyanion. (Zie § 4.3.1. Dit verschijnsel veroorzaakt ook het bekende suspensieeffect). De grootte van de pH-daling hangt af van de onderlinge verhouding der affiniteiten.

Als vormingsconstante van dgl. metaalcomplexen wordt gewoonlijk genomen de evenwichtsconstante K_{MA} van de reactie tussen het (gehydrateerde) metaalion en de verst gedissocieerde vorm van het zuur:

$$M^{+n} + A^{-m} \rightleftharpoons MA^{n-m}$$

$$K_{MA} = \frac{(MA^{n-m})}{(M^{+n})(A^{-m})}$$

De pH-daling wordt veroorzaakt door de reactie:

$$M^{+n} + H_mA \rightleftharpoons MA^{n-m} + mH^+$$

De evenwichtsconstante hiervoor is $K' = \frac{(MA^{n-m})(H^+)^m}{(M^{+n})(H_mA)}$

Bij vermenigvuldiging van deze uitdrukking voor K' met $\frac{(A^{-m})}{(A^{-m})}$ zien we dat $K' = K_{MA} . K_a$; waarin K_a de dissociatieconstante $\frac{(H^+)^m \ (A^{-m})}{(H_mA)}$ van het zuur voorstelt.

Voor de berekening van vormingsconstanten bij metaalcomplexen uit pH-metingen heeft BJERRUM een methode uitgewerkt (zie bijv. MARTELL en CALVIN, 1953 of CHABAREK en MARTELL, 1959). Deze methode is door GREGOR, LUTTINGER en LOEBL (1955) aangepast voor koper-polyacrylzuur complexen en door LEYTE (1961) voor koper-polymethacrylzuurcomplexen. Voorwaarde is dat de dissociatieconstanten van deze zuren bekend zijn. Een uiteenzetting van deze methode hier is dus alleen relevant als dit bij huminezuren het geval is. Dit zal thans eerst nader beschouwd worden.

De potentiometrische titratie van polymere organische zuren heeft de laatste jaren nogal in de belangstelling gestaan (men zie bijv. de overzichten gegeven door VAN DUYN (1957) en LEYTE (1961)). Door verschillende onderzoekers werden op grond van theoretische beschouwingen vergelijkingen opgesteld en experimenteel getoetst. Uiteraard zijn daarvoor geen stoffen van geheel onbekende en ingewikkelde aard genomen. Het onderzoek heeft zich voornamelijk toegespitst op polyacrylzuur en polymethacrylzuur. Dit zijn polymeren met een groot aantal (stel P) carboxylgroepen die zich op gelijke afstand van elkaar aan het ketenmolecuul bevinden. Stel dat er in een oplossing in water van bepaalde concentratie p carboxyl-groepen zijn geïoniseerd. Het molecuul en zijn onmiddellijke omgeving worden beschouwd als twee fasen. De ene fase bestaat uit het molecuul met als twee componenten de p gedissocieerde groepen met chemische potentiaal μ_- en de P-p ongedissocieerde groepen met chemische potentiaal μ_0. De andere fase heeft als component o.a. waterstofionen met chemische potentiaal μ_{H+}. Bij evenwicht geldt: $\mu_{H^+} = \mu_0 - \mu_-$ (I). Nu wordt verondersteld dat er tussen de onmiddellijke omgeving van het polymeermolecuul en de

rest van de oplossing een electrostatisch potentiaalverschil ψ bestaat. Tussen chemische potentiaal μ'_{H^+} van het H^+-ion in de rest van de oplossing en μ_{H^+} van het H^+-ion vlak bij het polymeermolecuul bestaat dus de betrekking: $\mu_{H^+} = \mu'_{H^+} - e\psi$ (II)

waarin e de lading is van het H^+-ion.

Indien nu met μ_0^0 en μ_-^0 de standaard chemische potentialen en met a_0 en a_- de activiteiten van de ongeladen resp. geladen groepen in het polymeermolecuul worden aangeduid, dan kunnen we de vergelijkingen I en II uitschrijven en samenvatten tot:

$$pH = pK_a + \log^{a_-}/a_0 - 0,4343\ e\ \psi\ /kT \qquad \text{(III)}$$

waarin $pK_a = 0,4343\ (\mu'^0_{H^+} + \mu_-^0 - \mu_0^0)\ /kT$

Afhankelijk van de geoorloofd geachte benaderingen zijn door verschillende onderzoekers ook verschillende oplossingen gegeven voor deze vergelijking. In verband met het feit dat één dezer oplossingen experimenteel werd getoetst bij de organische stof van de grond en bestanddelen hiervan dient deze hier te worden genoemd.

Aangenomen dat er geen wisselwerking bestaat tussen zuurgroepen die elkaars nabuur zijn of, anders gezegd, als de gedissocieerde en ongedissocieerde groepen ideaal zijn verdeeld over het polymeermolecuul, dan is $^{a_-}/a_0 = \alpha/1 - \alpha$, waarin α= dissociatiegraad.

Verder wordt met pK_a in vergelijking III de dissociatieconstante van één carboxylgroep aangeduid. Zoals reeds eerder opgemerkt is deze dissociatieconstante afhankelijk van het aantal zuurgroepen in het polymeer dat voordien reeds is gedissocieerd. Nu zijn de successieve dissociatieconstanten van de afzonderlijke zuurgroepen te beschouwen als bepaalde fracties van één enkele constante K_i die wel de intrinsieke of ook wel schijnbare dissociatieconstante wordt genoemd. KATCHALSKY en SPITNIK (1947) kwamen door een bepaalde redenering tot het volgende verband:

$$K_p = \left(\frac{P - p + 1}{p}\right)^{n-1} . K_i \quad \text{voor } p = 1, 2 \ldots . P \qquad \text{(IV)}$$

waarin K_p is de p- de "klassieke" dissociatieconstante van het polymeermolecuul en n is een constante. Deze verdeling van de "klassieke" constanten leidde tot de vergelijking:

$$pH = pK_i + n \log \frac{\alpha}{1 - \alpha} \qquad (V)$$

(inplaats van de dissociatiegraad wordt ook wel de neutralisatiegraad ingevuld. pK_i en n zijn afhankelijk van polymeerconcentratie en ionensterkte van de oplossing).

Vergelijking V wordt wel de gegeneraliseerde Henderson - Hasselbalch vergelijking genoemd.

Deze vergelijking bleek nu het potentiometrische gedrag van vele polymere zuren over een groot gebied van α -waarden te beschrijven. Dat wil zeggen, bij grafisch uitzetten van pH tegen $\log \alpha/1 - \alpha$ verkreeg men voor een groot α-gebied een rechte lijn, waaruit door interpolatie pK_i kan worden verkregen (pK_i = pH bij $\alpha = 1/2$).

Door DAWSON, DANIELSON and CAMERON werd reeds in 1950 vergelijking V (waaraan nog een term voor de ionensterkte werd toegevoegd) getoetst in een onderzoek naar de uitwisseling van calcium tegen waterstofionen bij een suspensie van bosveen. (Een nadere omschrijving, zelfs de opgave van het gehalte aan organische stof ontbreekt). Zij concluderen dat het gedrag van deze veensuspensie afwijkt van dat van een ideaal polybasisch zuur. Een overeenstemming zou ook wel zeer opmerkelijk zijn bij een dergelijk ongedefinieerd mengsel van zeer uiteenlopende organische (en andere?) materialen in een tamelijk geconcentreerde suspensie waarbij bovendien "getitreerd" wordt met $Ca(OH)_2$ (zie verderop). Het leek ons echter de moeite waard een soortgelijke poging te doen met alkalihydroxide bij goed gezuiverde huminezuren (VAN DIJK, 1959), al leek de kans op succes ook hier nog niet groot. Inderdaad werden bij uitzetten van pH tegen $\log {}^{s}/1-s$ (waarin s = neutralisatiegraad) geen curven verkregen met een lineair verloop. In tegenstelling tot de curve verkregen door Dawson, c.s. trad bij ongeveer $s = {}^{1}/2$ (waar pK_i = pH volgens vergelijking V) juist de sterkste kromming in de curve op.

Onafhankelijk hiervan werden ook door MARTIN en REEVE (1958) titraties uitgevoerd van suspensies van organisch materiaal verkregen uit grond door extractie met een waterige oplossing van acetylaceton (niet zonder meer te vergelijken met onze huminezuren). Uitzetten van pH tegen $\log {}^{s}/1 - s$ leverde sigmoide curven met een buigpunt ongeveer bij $s = {}^{1}/2$ (zij namen vrij willekeurig aan dat de neutralisatie compleet was bij pH = 8!). Deze resultaten bevestigen dat het gedrag van huminezuren afwijkt van dat van een lineair polymeer als po-

lyacrylzuur. (KHANNA en STEVENSON, 1962, vermelden wel dat hun pH vs log $^{s}/l$ - s curven bij de titratie van huminezuren in aanwezigheid van Cu (II)-zout een lichte kromming vertonen maar geven niet het verloop in afwezigheid van Cu (II)-ionen).

Als mogelijke oorzaken voor dit afwijken kunnen de volgende worden genoemd:

1. Het mag wel als vaststaand worden beschouwd dat huminezuren tenminste twee soorten zuurgroepen bezitten nl. carboxyl- en fenolische hydroxylgroepen.
2. Het lijkt vrij onwaarschijnlijk dat deze zuurgroepen equidistant zijn gedistribueerd in de huminezuurdeeltjes die, zoals eerder opgemerkt, vermoedelijk niet-lineaire heteropolycondensaten zijn.
3. Een wisselwerking van zuurgroepen die alkaars nabuur zijn, bijv. bij COOH- en OH-groepen in ortho-positie aan een zes-ring mag zeker niet uitgesloten worden geacht.
4. Bij de afleiding van de gegeneraliseerde Henderson-Hasselbalch vergelijking (V) is in feite aangenomen, dat er geen ongedissocieerde metaalion-polyanion bindingen optreden. Deze aanname mag misschien bij alkali-ionen min of meer opgaan, hij gaat zeker niet op bij meerwaardige kationen. Integendeel, een dergelijke kation kan gelijktijdig met meer dan één anion-groep van het polyanion een weinig gedissocieerde binding aangaan.

Wij zien geen kans om voor dit ingewikkelde geval tot een theoretisch acceptabele vergelijking te komen die toegankelijk is voor experimentele toetsing. Voorlopig kan dus o.i. de metaal-huminezurenbinding ook slechts in empirisch kwalitatieve zin worden besproken en een poging als die van COLEMAN c.s. (1955) om de vormingsconstante voor koper (II)-veencomplexen te berekenen lijkt ons in dit stadium dan ook niet geheel zinvol.

Thans zal een overzicht worden gegeven over wat in kwalitatief opzicht naar voren is gekomen bij potentiometrisch onderzoek:

BECKWITH (1955, 1959) concludeert uit het optreden van een pH-daling bij toevoeging van metaalzouten aan een suspensie van zure organische stof uit grond en uit het feit dat de grootte van deze pH-daling (nagegaan bij Mn, Co en Ni*) dezelfde volgorde heeft als in de reeks van Mellor en Maley (beter bekend als de reeks van Irving en Williams), dat we inderdaad met chelaten te doen hebben.

---

*) Waar niet anders is aangegeven wordt ook verderop met Co, Ni, Cu etc. steeds bedoeld Co (II), Ni (II), Cu (II) etc.

MARTIN en REEVE (1958) wijzen terecht op de mogelijkheid dat de in aanwezigheid van metaalzouten titreerbare H^+-ionen niet alleen van de organische stof maar (ook) van de gehydrateerde metaalionen afkomstig kunnen zijn. Zij vonden niet de bovenvermelde volgorde voor de grootte van de pH-daling. Tevens vonden zij een horizontale verplaatsing van de titratiecurve in aanwezigheid van Cu-zout die eenvoudig verklaard kon worden uit vorming van een basisch Cu-zout. Martin en Reeve menen daarom dat er tussen de Cu-(en andere metaal-)ionen en het "humus polyanion" als geheel misschien een electrostatische interactie kan bestaan die de gewone ion-ionbinding stabiliseert, maar dat er geen verdere specifieke effecten optreden bij deze binding.

KAWAGUCHI en KYUMA (1959) beperkten hun onderzoek tot de binding van Ca-, Al- en Fe (III)-ionen. Zij vonden dat in oplossingen die 0,1 N zijn aan KCl de titratiecurve van huminezuren niet wordt beïnvloed door de aanwezigheid van Ca-ionen. Wel vonden zij invloed van de toevoeging van K Al $(SO_4)_2$ of van NH_4 Fe $(SO_4)_2$ hetgeen zij toeschrijven aan Al^{+3}- en Fe^{+3}-ionen, (overigens zonder te bewijzen dat deze ionen in de waterige oplossing waarin zij worden toegevoegd alleen gehydrateerd en niet alleszins complex aanwezig zijn).

KHANNA en STEVENSON (1962) titreerden o.a. oplossingen van 50 mg huminezuren (afgaande op hun curven is dit ongeveer 0,25 m.e.) in aanwezigheid van 0,2 m.e. Mn-, resp. Co-, Ni-, Cu-en Zn-sulfaat. De "pH-val" (hiermee wordt bedoeld de vertikale afstand tussen de curve verkregen in afwezigheid van bovenstaande zouten en de curven verkregen in aanwezigheid daarvan bijv. na toevoeging van 0,2 m.e. base) had de volgorde: Mn $<$ Co $<$ Ni $<$ Cu $>$ Zn. D.i. dezelfde volgorde als deze elementen hebben in de reeks van Irving en Williams. Buigpunten overeenkomend met de vorming van $MeOH^+$ traden niet op. Zij veronderstellen daarom dat deze metaalionen complex worden gebonden. Uit het feit dat de genoemde pH-daling slechts klein is en slechts H^+-ionen lijken te zijn verdrongen van groepen die ook titreerbaar zijn in afwezigheid van deze zouten concluderen zij dat de neiging om complexen te vormen niet sterk is en dat het hier voornamelijk electrostatische bindingen betreft.

Tenslotte noemen we hier het potentiometrisch onderzoek van WRIGHT en SCHNITZER (1963) en van SCHNITZER en SKINNER (1963) aan een mengsel van fulvo- en huminezuren. Deze onderzoekers vonden in overeenstemming met KAWAGUCHI en KYUMA dat de aanwezigheid van Ca- of Mg-zouten niet en die van Ni- en Cu-zouten nauwelijks

de titratiecurve beïnvloedde. Slechts Fe (III)- en Al-zouten hadden een duidelijk effect in die zin dat ze, toegevoegd in bepaalde hoeveelheden, reeds een duidelijke pH-verlaging veroorzaken aan het begin en een vlakker verloop van de curve bij de titratie waarbij de buigpunten die typisch zijn voor de vorming van Fe (III)- en Al-hydroxide hier niet optreden.

Het "moleculaire" beeld van de complexvorming met Fe(III)- en Al-ionen dat SCHNITZER en SKINNER geven, achten wij een te ver gaande simplificatie. In de eerste plaats redeneren zij vanuit een veronderstelde situatie dat de organische component een zuivere verbinding is met een molecuulgewicht van 670 en 6 COOH-groepen per molecuul. Het getal 670 werd echter verkregen als aantalgemiddelde molecuulgewicht uit metingen van de vriespuntsdaling in sulfolaan, terwijl de COOH-groepen werden bepaald volgens in hoofdstuk 4 besproken (en verworpen) conventionele methoden.

Verder wordt verondersteld dat de extra base nodig om een bepaalde pH te bereiken bij pH kleiner dan 9 in aanwezigheid van bijv. het Fe(III)-zout uitsluitend dient om H^+-ionen te titreren die vrijgekomen zijn bij een (hydroxo-)complexvorming, die onmiddellijk en kwantitatief zou zijn opgetreden zodra het zout is toegevoegd en dat de samenstelling van dit complex pas veranderd bij een pH van ongeveer 9 waar het uiteenvalt in $Fe(OH)_3$ en het natriumzout van de organische stof. (Wij komen hierop terug bij de discussie van de eigen resultaten).

6.2.2. Ionenwisselingsmethoden

Ook uit de bestudering van de onderlinge verwisselbaarheid van metaalionen kan men een indruk krijgen van de stabiliteit van de metaal-organische stof binding. Een zodanig onderzoek werd o.a. verricht door HIMES en BARBER (1957) bij een zwarte humeuze zandgrond en bij hieruit geïsoleerde humine- en fulvozuren.

Aan de grond waaraan met behulp van KCl een K-bezetting was gegeven, werd een oplossing toegevoegd van radioactief zinkchloride. Na evenwichtsinstelling werd bepaald hoeveel Zn was geadsorbeerd. Daarna werd de grond uitgewassen met een KCl-oplossing. De hoeveelheid hierbij uit de grond verwijderde zink wordt uitwisselbaar genoemd. Van het geadsorbeerde Zn blijkt daarbij een deel in de grond achter te blijven. Hiervan wordt verondersteld dat het "chelaat" gebonden is. Deze hoeveelheid, die werd bepaald nadat het uitgewisseld was tegen

Cu (II) met behulp van een koper (II)-acetaatoplossing bleek toe te nemen met de pH tot een waarde die bij pH ongeveer 7 ca. 80 % bedraagt van de totale uitwisselingscapaciteit van de grond.

Dezelfde bepalingen werden gedaan bij grond die met H_2O_2 is behandeld ter verwijdering van de organische stof en eveneens bij grond die "gemethyleerd" was door herhaalde behandeling met dimethylsulfaat of met diazomethaan. Na de eerstgenoemde behandeling bleek het vermogen om Zn-ionen "chelaat" te binden tot nihil te zijn gereduceerd, terwijl dit bij beide methyleringen in gelijke mate zeer sterk bleek te zijn verlaagd. Uit het laatste werd geconcludeerd dat de carboxylgroepen (die niet door methylsulfaat maar wel door diazomethaan worden gemethyleerd) niet onafhankelijk van andere zuurgroepen met name fenolische OH-groepen als chelaat liganden functioneren.

Overeenkomstige resultaten verkregen Himes en Barber bij huminezuren en fulvozuren.

Een indruk van de stabiliteit van de Zn-organische stof binding verkregen zij o.a. door aan de grondsuspensie behalve radioactief zinkchloride tevens chelaat-vormende verbindingen toe te voegen waarvan de stabiliteitsconstante met Zn-ionen bekend is en dan de hoeveelheid niet-geadsorbeerd Zn te bepalen. Een bezwaar van deze methode is dat de mogelijkheid bestaat dat gemengde complexen worden gevormd.

Tenslotte moet uit dit interessante onderzoek van Himes en Barber nog worden vermeld dat de afgifte van Ag-ionen door een hiermee bezette grond bij titratie met een chloride-oplossing in sterke mate tijdafhankelijk bleek te zijn. Nu leent het Ag^+-ion zich heel goed voor een binding aan chelaatliganden door middel van covalente bindingen en is volgens MARTELL en CALVIN (1953) bij aanwezigheid van covalente bindingen de snelheid van ionenwisseling klein. Dit is dus een aanwijzing over de aard van de metaal-organische stof binding.

Vervolgens moeten de onderzoekingen van BROADBENT en OTT (1957) worden genoemd. Deze bepalen bij enkele "organische stof preparaten" verkregen door grond met een mengsel van HCl en HF te behandelen de "relatieve affiniteit" voor verschillende kationen door na te gaan hoeveel van een geadsorbeerd ion (resp. Ba, Mg, Cu) wordt uitgewisseld als een gelijk aantal milli-equivalenten zoutzuur wordt toegevoegd. Deze volgorde bleek te zijn: Mg $>$ Ca = Ba $>$ Cu.

BROADBENT (1957) gaat dit onderzoek verfijnen door de preparaten met resp. een Ca- en Cu-bezetting in een buis achtereenvolgens te per-

coleren met 0,01, 0,05, 0,1 en 1 N zoutzuur. Hetzelfde wordt gedaan met de zwak zure kationenwisselaar Amberliet IRC 50 waar carboxylgroepen de zure groepen vormen. Het blijkt dan dat zowel Cu als Ca uit de IRC 50 zijn te verwijderen met 0,01 N zoutzuur. Bij de grondpreparaten wordt de hoofdzaak van het Ca verwijderd door 0,01 N zoutzuur, een klein deel pas met 0,05 N zoutzuur, terwijl bij een Cubezetting nog Cu-ionen worden geëlueerd met 0,1 en met 1 N zoutzuur. Broadbent concludeert hieruit dat de zuurgroepen die bij percolatie met 0,01 N zoutzuur hun metaalionen uitwisselen tegen H^+ carboxylgroepen zijn. Voor deze conclusie achten wij echter het feit van een analogie met het gedrag van IRC 50 een veel te zwakke bewijsgrond. De regel dat de zwakst zure groepen (dit zullen hier fenolische OH-groepen zijn) in het algemeen het eerst hun kationen zullen uitwisselen tegen H^+, wordt geheel buiten beschouwing gelaten.

Door LEWIS en BROADBENT (1961) wordt in een volgende publikatie de methode van de analogie nog veel uitgebreider toegepast. Feitelijk berust hun hele betoog daar nl. op de veronderstelling dat het gedrag van anionfuncties in de organische stof van de grond geheel analoog is aan dat van eenvoudige, zuivere verbindingen. Bijvoorbeeld: Een 0,01 N azijnzuuroplossing bleek bij "modelstoffen" Ba en Cu te verwijderen van elke COOH- of fenolische OH-groep met een pK $<$ 2,85. Daar een azijnzuuroplossing van deze sterkte ook belangrijke hoeveelheden Ba en Cu kan verwijderen uit veenpreparaten die een bezetting hadden met deze ionen wordt geconcludeerd dat de verwijderde Ba- en Cu-ionen waren gebonden aan dergelijke COOH- en OH-groepen:

Een ander voorbeeld is het volgende: Cu-carboxylaatgroepen bleken bij modelstoffen niet te worden ontleed met een acetaatbuffer van pH 5,5. Uit het Cu-organische stof complex konden echter vrij veel koperionen met deze bufferoplossing worden verwijderd. Hieruit werd zonder meer geconcludeerd dat deze koperionen dus aan fenolische O^--groepen waren gebonden!

Hier wordt dus helemaal geen rekening gehouden met het feit dat we bij organische stof een hele reeks van pK-waarden hebben, noch met een electrostatisch veldeffect van het polyanion als geheel, noch met de mogelijkheid dat naburige OH- en COOH-groepen als chelate liganden fungeren (of in bepaalde configuraties ook juist niet als gevolg van sterische belemmering).

SCHEFFER en ULRICH (l.c., pg. 72) geven enkele ionenverdelingscurven voor alkali- en aardalkaliïonen, berekend uit experimentele ge-

gevens van ZADMARD (1939) door deze verkregen bij veen. Hierbij werd de equivalent-fractie van het bij het veen "ingewisselde" ion uitgezet tegen de equivalent-fractie van dit ion in de evenwichtsoplossing. Bijvoorbeeld: Bij het "inwisselen" van Ca^{++} tegen K^{+} bij suspendering van K^{+}-veen in water en toevoeging van een oplossing van $CaCl_2$ worden de equivalent-fracties van aan het veen geadsorbeerd Ca^{++}, resp. in oplossing gebleven Ca^{++} gegeven door

$$X_{Ca_S} = \left[\frac{me\ Ca^{++}}{me\ Ca^{++} + me\ K^{+}}\right] \text{ geadsorbeerd}$$

$$\text{resp. } X_{Ca_L} = \left[\frac{me\ Ca^{++}}{me\ Ca^{++} + me\ K^{+}}\right] \text{ in oplossing}$$

Zet men nu X_{Ca_S} af op de ordinaat en X_{Ca_L} op de abscis dan valt de curve die het verband tussen deze twee aangeeft samen met de diagonaal als er geen selectieve adsorptie is. Wordt Ca^{++} selectief geadsorbeerd (zoals te verwachten is op grond van het verschil in waardigheid) dan liggen de punten van de curve tussen 0 en 1 bóven de diagonaal en zou K^{+} selectief geadsorbeerd worden dan moesten deze punten onder de diagonaal liggen. (Voor algemene beschouwingen over de selectiviteit van ionenwisselaars zij bijv. verwezen naar het uitstekende overzicht van DEUEL en HUTSCHNEKER (1954)).

De genoemde, door Scheffer en Ulrich gegeven ionenverdelingscurven bij veen tonen in verschillende opzichten het verwachte beeld. Er zijn echter ook enkele anomalieën. Zo schijnen er verschillende curven op te treden als men uitgaat van het systeem Ca^{++}-veen + KCl dan wel van K^{+}-veen + $CaCl_2$ (hysterese). Tevens zou een selectieve adsorptie van Ca^{++} bij een lage X_{Ca} zelfs overgaan in een selectieve adsorptie van K^{+} bij een hoge X_{Ca} (een sigmoide curve, voor het verband X_{Ca_S} en X_{Ca_L}, die de diagonaal snijdt). Scheffer en Ulrich schrijven deze anomalieën toe aan de eigenschappen van het veen nl. aan het feit dat het meer dan één soort aniongroepen bevat terwijl tevens een verschillende aard van de kationbinding een rol zou kunnen spelen.

Zonder de mogelijke invloed van deze factoren te willen ontkennen moet hier echter op het volgende worden gewezen: Zadmard bereidde K^{+}-veen door aan een suspensie van H^{+}-veen zoveel KOH toe te voegen tot de pH blijvend 8,2 was. Op dezelfde wijze werd Ca^{++}-veen bereid

uit H^+-veen + $Ca(OH)_2$. Nu zijn er echter minder m.e. KOH nodig om pH 8,2 te bereiken dan m.e. $Ca(OH)_2$ als gevolg van een sterkere hydrolyse bij het K^+-veen. Deze (verschillende mate van) hydrolyse vormt een complicatie bij de berekening van de uitwisselingsevenwichten. Wat echter wellicht een grotere rol heeft gespeeld is dat Zadmard de bij "titratie" tot pH 8,2 in oplossing gegane kaliumhumaten heeft verwijderd ($Ca(OH)_2$ werkt nagenoeg niet "peptiserend") m.a.w. het veen in K^+-veen en het veen in Ca^{++}-veen was niet gelijk van samenstelling!

Verder ging Zadmard uit van suspensies van gedroogd veen. Dit kan aanleiding geven tot ernstige fouten daar de uitwisselingscapaciteit sterk afhankelijk is van de mate van zwelling en oplossen (zie HOOGHOUDT c.s., 1960). Het is te verwachten dat ook de selectiviteit hierdoor wordt beïnvloedt.

Zeer vele en velerlei pogingen zijn reeds gedaan de ionenwisseling in een formule vast te leggen. Eerst werden (empirische) formules opgesteld in analogie aan de vergelijkingen van Freundlich en van Langmuir voor de fysische adsorptie van gassen aan vaste stoffen. Toen vastgesteld werd dat het stoechiometrische omzettingen betrof tussen ionen in oplossing en ionen "gebonden" aan de "wisselaar" trachtte men de beschouwingen van het Donnan-evenwicht of wel die waarop de massawerkingswet berust (zie 6.2.1.) toe te passen.

Het bleek echter niet mogelijk om op basis van een van deze twee theoriën in hun elementaire vorm, te komen tot een algemeen geldige uitwisselingsvergelijking. Vooral rezen er moeilijkheden als er ionen van verschillende waardigheid bij de omwisseling waren betrokken. Men moest empirische constanten invoeren die verschilden voor de ionenwisselaars en de betrokken ionen (wat echter niet wegneemt dat het inzicht in de wetmatigheden van de omwisseling aanzienlijk werd verdiept). Gedeeltelijk konden de discrepanties tussen theorie en werkelijkheid worden toegeschreven aan onvolkomenheden van de wisselaars, zoals onregelmatigheden in de structuur, zwelling e.d. Een der grootste theoretische struikelblokken vormde de vraag welke activiteitscoëfficiënten men moet aannemen voor de ionen (van beiderlei ladingsteken) in de wisselaar. De concentratie van deze ionen in de wisselaardeeltjes is immers meestal hoog, dus hun gedrag verre van ideaal.

Voor een theoretische behandeling van dergelijke, niet-ideale

Donnan-evenwichten kan worden verwezen naar OVERBEEK (1956), die de grote variatie in electrische potentiaal nabij de deeltjes in een polyelectrolytoplossing in rekening brengt.

Bij een andere theoretische benadering van de ionenwisseling die vanuit het fysisch-chemisch grondonderzoek werd gelanceerd, werd de theorie van Gouy en Chapman over de diffuse dubbellaag bij geladen colloïde deeltjes als uitgangspunt genomen (zie bijv. ERIKSSON, 1952 en BOLT, 1955). LAGERWERFF en BOLT (1959) toonden aan dat de gevonden vergelijking voor de verdeling van één- en tweewaardige kationen tussen kleien en hun evenwichtsoplossing kon worden vereenvoudigd tot

$$\frac{Me^{+}_{s}}{Me^{++}_{s}} = k_G \cdot \frac{[Me^{+}]}{\sqrt{[Me^{++}]}}$$

De term links van het gelijkteken geeft de verhouding van de "gebonden" kationen uitgedrukt in milliequivalenten. In het quotient rechts van het gelijkteken stellen $[Me^{+}]$ en $[Me^{++}]$ de concentraties van deze ionen voor in de evenwichtsoplossing uitgedrukt in millimolen per liter. k_G is, althans voor een vrij groot gebied, een constante als er in dat gebied één type negatief geladen groepen bij de ionenwisseling betrokken is en als er geen specifieke (anders dan electrostatische) wisselwerking van betekenis optreedt met één der kationen, m.a.w. als alleen de concentratie en de waardigheid van de ionen in de evenwichtsoplossing de verhouding van de "gebonden" ionen bepalen. Deze vergelijking is identiek met die van GAPON (1944), verkregen op grond van kinetische overwegingen.

JUNGK (1964) heeft zeer recent deze vergelijking van Gapon toegepast bij een onderzoek naar de selectieve kationensorptie bij turfstrooisel, waarbij hij uitging van de H^{+}-vorm hiervan en de uitwisseling van H^{+} tegen alkali- en aardalkali-ionen naging bij toevoeging van deze kationen in de vorm van chloriden en van acetaten. Hierbij bleek de uitwisselingsconstante k_G zeer sterk afhankelijk te zijn van X_{Me_S}, (de relatieve bezetting met het "inwisselende" kation) en het turfstrooisel sterk selectief voor H^{+}-ionen. Jungk redeneert dan als volgt: De dissociatie van H^{+}-ionen der zwak zure carboxyl- en fenolische hydroxylgroepen en daarmee hun deelname aan het uitwisselingsproces, is sterk pH-afhankelijk. Naarmate meer H^{+}-ionen worden uitgewisseld stijgt de lading en daarmee de "uitwisselingscapaciteit" van en de ionenconcentratie in een turfstrooiseldeeltje. De vergelijking van Gapon veronder-

stelt echter een constante uitwisselingscapaciteit. Dit verklaart vermoedelijk waarom de gevonden k_G-waarden niet constant zijn.

In deze redenering worden dus alleen de reeds gedissocieerde H^+-ionen uitwisselbaar genoemd. In verband met de voorwaarden die werden genoemd voor het constant zijn van k_G zou men ook kunnen zeggen dat de moeilijkheid daarin schuilt dat er een, voor het H^+-ion specifiek bindingsmechanisme schijnt te zijn. Daardoor is niet zonder meer te concluderen of ook het "inwisselende" kation een specifieke wisselwerking met het turfstrooisel vertoont. Ook hier komt dus hetzelfde naar voren als in 6.2.1., nl. dat, men voor een juiste interpretatie van de experimentele gegevens, de dissociatieconstanten van de betrokken zuurgroepen van de wisselaar moet kennen, hetgeen zoals daar is uiteengezet, niet het geval is. Deze moeilijkheid ontmoet men dus (uiteraard) bij het toepassen van elke theorie op experimenten met humus of bestanddelen hiervan, waarbij H^+-ionen betrokken zijn.

Bij toevoeging van de kationen in de vorm van acetaten komen de evenwichtscurven X_{Me_S} vs X_{Me_L} heel anders te liggen dan bij chloriden. Bij aardalkali-acetaten is de curve zelfs S-vormig waarbij het turfstrooisel bij een lage X_{Me_L} schijnbaar selectief is voor de aardalkali-ionen en pas bij een hogere graad van bezetting met deze ionen de voorkeur geeft aan H^+-ionen. Jungk interpreteert dit als een bewijs dat in turfstrooisel zuurgroepen met een zeer verschillende selectiviteit, in casu zuursterkte, aan de uitwisseling deelnemen. Op zichzelf is dit wel juist maar, zoals Jungk ook zelf opmerkt, het uitwisselingsbeeld is hier in zekere zin vervalst doordat ook het acetaation een zodanige affiniteit heeft voor het H^+-ion dat het H^+-ionen aan het evenwicht (en dus aan het turfstrooisel) onttrekt zodat er voor dit veen bij wijze van spreken weinig anders overblijft dan de onttrokken H^+-ionen te vervangen door metaalionen. Daar komt nog bij dat de ionenconcentratie van de evenwichtsoplossing door de vorming van ongedissocieerd azijnzuur niet meer constant is.

De vraag kan worden gesteld of bij een kennelijk niet opgaan van een uitwisselingsvergelijking, zoals die van Gapon, in het geval dat er H^+-ionen in het spel zijn, het niet te prefereren is het evenwicht slechts te kenschetsen door een meer pretentieloze, een van elke theoretische interpretatie onafhankelijke selectiviteitscoëfficiënt, zoals dit is gedaan door DEUEL c.s. (1954):

$$k_s^{Me_1}_{Me_2} = \frac{Me_{1_S} / Me_{2_S}}{Me_{1_L} / Me_{2_L}}$$

waarbij de Me-waarden alle worden uitgedrukt in milliequivalenten per eenheid wisselaar resp. evenwichtsoplossing (k_s is dus dimensieloos) en waarbij onder Me_1 en Me_2 elk kation, inclusief H^+ wordt verstaan. k_s zal ook voor een gekozen ionenpaar en wisselaar in het algemeen niet constant zijn, maar afhankelijk van X_{Me_S}. Een k_s-waarde groter dan 1 betekent dat de ionenwisselaar ten opzichte van Me_2 selectief is voor Me_1, $k_s = 1$ betekent: géén selectiviteit en k_s kleiner dan 1 betekent dat de ionenwisselaar selectief is voor Me_2.

6.2.3. Overige methoden

Het optreden van een metaalchelaat gaat vaak samen met een verandering van de lichtadsorptie van de betreffende oplossing in het zichtbare of ultraviolette gebied. In vele gevallen is het zelfs mogelijk om de samenstelling van het chelaat langs deze weg na te gaan. Uiteraard is het een noodzakelijke vereiste dat de gevormde chelaten oplosbaar zijn. Aan deze eis voldoen huminezuren niet en fulvozuren slechts gedeeltelijk en deze methode is dan ook weinig toegepast. (We noemen BROADBENT en OTT (1957) en SCHNITZER en SKINNER (1963).

Daarnaast zijn door enkele onderzoekers (o.a. DE MUMBRUM en JACKSON, 1956, en WRIGHT en SCHNITZER, 1963) absorptie spectra opgenomen in het infrarode gebied. Veel meer dan dat er carboxylaatgroepen betrokken schijnen te zijn bij de metaalionbinding heeft dit onderzoek echter (nog) niet opgeleverd.

Door behandeling van een slecht oplosbaar zout met een stof die een of meer chelaat liganden bevat kan onder bepaalde omstandigheden een aanzienlijke hoeveelheid van dit zout als chelaat in oplossing gaan. Dit hangt uiteraard af van de oplosbaarheid van het gevormde chelaat. Is dit goed oplosbaar dan kan door bijv. precies te bepalen hoeveel van het slecht oplosbare zout wordt opgelost, de samenstelling van het chelaat worden bepaald.

Deze methode is door SCHEFFER c.s. (1957) en door enkele

Canadese onderzoekers nl. WRIGHT en SCHNITZER (1963) en SCHNITZER en SKINNER (1963) toegepast bij huminezuren en fulvozuren. Naarmate meer metaal-ionen door de organische zuren worden gebonden neemt echter de oplosbaarheid in water af en uiteindelijk treedt uitvlokking op. Daarmee hoeft echter de binding van metaalionen niet tevens op te houden. Om de samenstelling op het moment dat nog juist geen uitvlokking optreedt als "metal-complexing-power" te nemen is dus enigszins arbitrair. Overigens is het feit dat deze organische zuren moeilijk oplosbare zouten kunnen ontleden en oplossen op zichzelf nog geen sluitend bewijs voor chelaatvorming evenmin als bijv. de verdringing van H^+-ionen uit deze zuren door metaalzouten.

Het electrisch geleidingsvermogen van een oplossing is een sommatie van de bijdragen van alle aanwezige ionen. Worden er metaalionen aan de oplossing onttrokken dan daalt het geleidingsvermogen. Dit onttrekken van ionen aan de oplossing kan bijv. geschieden door ze te binden aan een stof met chelaat liganden en ook hier hebben we dus een methode om over de samenstelling van een chelaat meer te weten te komen. Dat de curve verkregen door conductometrische titratie van huminezuren met bariumhydroxide sterk verschilt van die verkregen met natriumhydroxide (zie 5.2.2.) zegt echter in feite alleen dat Ba-humaten in tegenstelling tot Na-humaten slecht gedissocieerd zijn. Het zegt op zichzelf nog niets over de aard van de verbinding!

Hetzelfde geldt voor electroforetische studies van huminezuren waaraan metaalzouten zijn toegevoegd en waarbij een deel van de metaalionen samen met een organische component zich naar de anode blijkt te bewegen (DROZDOVA en JEMELJANOVA, 1960).

Tenslotte moet als in aanmerking komende onderzoekmethode de polarografische worden genoemd. Deze berust op het feit dat de reductiepotentiaal van een metaal-ion verandert, gewoonlijk meer negatief wordt, als dit ion complex wordt gebonden. Volgens enkele oriënterende bepalingen verricht door KHANNA en STEVENSON (1962) treedt dit meer negatief worden van de reductiepotentiaal ook op bij oplossingen waarin naast Cu-ionen huminezuren aanwezig zijn. Ook wij hebben deze methode toegepast. Daarbij bleek, in overeenstemming met wat KINNEY en LOVE (1957) vermelden en in tegenstelling tot een mededeling van LUCENA en GONZALEZ (1960), dat de huminezuren zelf reductiegolven geven. De interpretatie van de polarogrammen is daardoor allerminst eenvoudig en vormt een apart onderwerp waarvan het onderzoek nog niet is afgesloten en dat daarom hier niet verder zal

worden besproken. Vermoedelijk ligt in deze complicatie de reden dat over de polarografische methode van onderzoek van metaalzouten van huminezuren in de literatuur zo weinig te vinden is.

6.3. EIGEN ONDERZOEKINGEN

Bij de bespreking van de literatuur in 6.2. is geconcludeerd dat het nog niet mogelijk is om theoretisch goed gefundeerde berekeningen uit te kunnen voeren van vormings- of uitwisselingsconstanten voor humaten. Ook in empirische, kwalitatieve zin bleek de literatuur echter nog leemten te vertonen die nader onderzoek wenselijk maken.

Wij hebben ons bij ons onderzoek vooral geconcentreerd op potentiometrische titraties van diverse huminezuren in waterig milieu, in aanwezigheid van verschillende zouten. Zo kon nl. op snelle en betrekkelijk eenvoudige wijze een groot aantal vergelijkingen zowel wat betreft huminezuren als kationen worden verkregen. Bovendien is "the potentiometric method . . . by far the most accurate and widely applicable technique currently available for the study of ionic equilibria" (ROSSOTTI en ROSSOTTI, 1961). De keuze van methode werd trouwens ook sterk beperkt door de eigenschappen van de huminezuren.

Daarnaast werden enkele andere, meer oriënterende onderzoekingen verricht. (De polarografische werden reeds genoemd aan het eind van de vorige paragraaf).

6.3.1. Potentiometrische titraties

6.3.1.1. Experimentele details en proeven vooraf

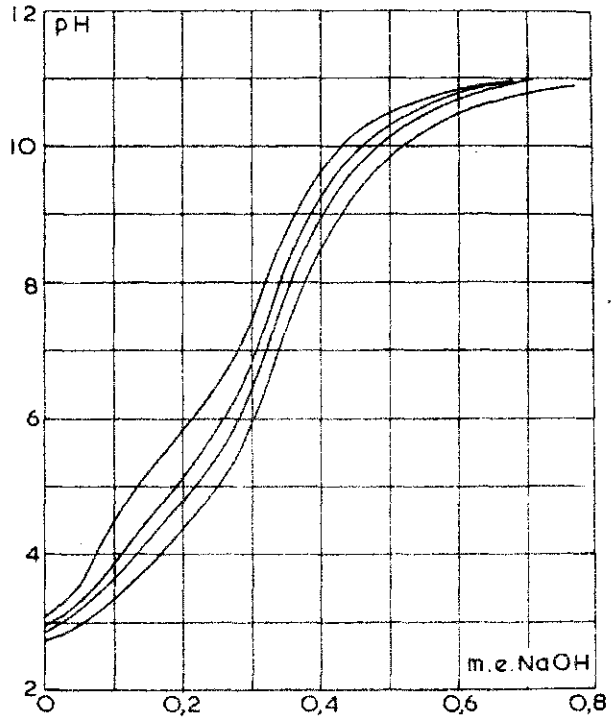
De titraties werden met dezelfde apparatuur uitgevoerd als beschreven in 5.2.1.2. Getitreerd werd met een 0,3 à 0,4 N kalium- of natriumhydroxide oplossing en de gebruikte zouten waren alle "pro analysi", behalve loodnitraat dat slechts in de kwaliteit "purissimum" verkrijgbaar was.

In het algemeen werd als volgt gehandeld: Eerst werd van een precies 0,050 N oplossing van het zout waarvan de interactie met de huminezuren zou worden nagegaan, 10 ml in het titratievat gepipetteerd. Vervolgens werd 40 ml dubbel gedemineraliseerd water toegevoegd en tenslotte onder goed roeren 10 ml van een huminezuuroplossing die eveneens precies 0,050 N was (berekend op het equivalentgewicht gevonden door conductometrische titratie in water met barium-

hydroxide). Hierna werd de titratie (steeds in een N_2- atmosfeer en bij 25°C ± 0,1) uitgevoerd.

Titraties van een polybasisch zuur waarbij het doel is de stabiliteitsconstanten te berekenen, worden meestal uitgevoerd in een oplossing die een constante en, met betrekking tot het zuur, hoge concentratie heeft van een eenvoudig 1-1-waardig zout, waarvan het kation geen specifieke interactie vertoont met het polyanion. De activiteitscoëfficiënten van de ionen zijn dan wel niet bekend maar variëren tenminste niet sterk tijdens de titratie. Bovendien heeft men dan bij gebruik van een calomelelectrode ook veel minder rekening te houden met een eventueel suspensieeffect.

Dat het verloop van de titratiecurve nogal afhankelijk is van de zoutconcentratie toont figuur 24. De pH-verlaging in het begin is een



Figuur 24. Titratiecurven van 0,48 m.e. huminezuren 082 I opgelost in 60 ml (van links naar rechts) water, 0,025 N NaCl, 0,1 N NaCl en 1 N NaCl.

gevolg van de gedeeltelijke "uitwisseling" van H^+-ionen van het huminezuur tegen Na^+-ionen. Dat ook bij het eindpunt (dit is hier na toevoeging van 0,48 m.e. natriumhydroxide) er een duidelijke invloed is van de aanwezigheid van NaCl op de pH, moet verklaard worden uit de

terugdringing van de hydrolyse van het ontstane Na-humaat door de in overmaat aanwezige Na^+-ionen.

Het is bekend dat de tendens tot chelate binding bij alkali-ionen zeer zwak is, in het bijzonder bij de grote ionen van K, Rb en Cs. De in volgende paragrafen beschreven titraties werden daarom meestal uitgevoerd met kaliumhydroxide.

Voorzover het echter gaat om een onderlinge vergelijking zowel wat betreft huminezuren als kationen is een hoge concentratie aan "basiselectrolyt" niet persé noodzakelijk. Integendeel, in sommige opzichten kan het zelfs nadelig zijn. Zo kan door de pH-verlaging die als gevolg van het aspecifieke zouteffect optreedt, de invloed van een (eventueel specifieke) interactie van een in kleine hoeveelheid toegevoegd kation op de titratiecurve deels of geheel worden gemaskeerd. Bovendien krijgt men spoediger uitvlokking (uitzouting) van het huminezuur, hetgeen de nauwkeurigheid van de titratie nadelig kan beïnvloeden (insluitingen; tragere evenwichtsinstelling). De meeste titraties zijn hier dan ook uitgevoerd zonder "basiselectrolyt". Ter vergelijking hebben wij een aantal titraties zowel in aanwezigheid als in afwezigheid van "basiselectrolyt" verricht.

Een tweede punt dat aandacht verdiende was de keuze van het anion van het toegevoegde metaalzout (en van het eventueel toegevoegde basiselectrolyt). Om de zaak zo eenvoudig mogelijk te houden moest een anion worden gekozen dat met het metaalion een in oplossing goed gedissocieerd zout vormt en dat zelf geen of zo gering mogelijke neiging tot complexvorming vertoont. Verder gaven wij uiteraard de voorkeur aan zouten die in "pro analyse" kwaliteit in de handel waren.

Wij hebben in dit verband titraties van huminezuren waarbij tevens een equivalente hoeveelheid Cu-nitraat aanwezig was, uitgevoerd in oplossingen die 1 N aan kaliumchloride óf 1 N aan kaliumnitraat waren. De verkregen titratiecurven waren identiek. We menen daarom te mogen aannemen dat noch het Cl^--ion noch het NO^-_3-ion het kwalitatieve beeld van de kationenbinding bij huminezuren hebben vertroebeld.

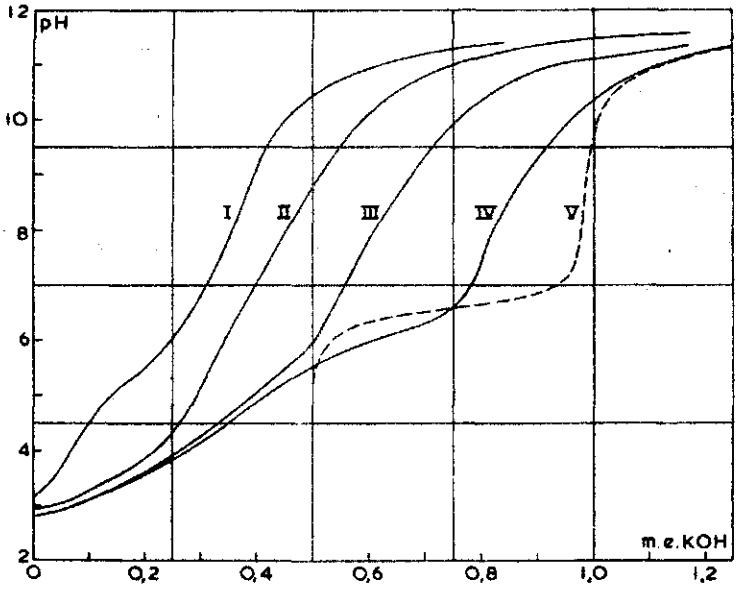
Wat betreft Fe(II)-, Zn- en Al-zouten beschikten wij slechts over de sulfaten in "pro analysi" kwaliteit. In verband hiermee hebben wij bij Cu nagegaan of het verschil maakte als hiervan een equivalente hoeveelheid werd toegevoegd als nitraat dan wel als sulfaat. Totdat 0,50 m.e. KOH is toegevoegd bleken de curven identiek. Daarna trad een verschil op dat misschien daarmee samenhangt dat er bij Cu een

een zeer stabiel "basisch zout" kan worden gevormd in aanwezigheid van sulfaat nl. van de samenstelling $CuSO_4 . 3 CuO(aq)$ (KOLTHOFF-ELVING, 1959, p. 803). Bij Fe(II), Zn en Al wordt daar van de vorming van een dergelijk basisch zout niets vermeld.

6.3.1.2. Interpretatie van het curveverloop in aanwezigheid van een zout

Thans zal het effect van de aanwezigheid van metaalzouten op het pH-verloop bij de potentiometrische titratie van huminezuren nader worden besproken. De huminezuren 082 I, geïsoleerd uit veenkoloniale grond, (0,50 m.e. in 60 ml oplossing) werden getitreerd met een 0,3346 N. KOH-oplossing in afwezigheid van zout resp. in aanwezigheid van 0,25; 0,50 en 0,75 m.e. kopernitraat. De resultaten zijn weergegeven in figuur 25, resp. de curven I t/m IV.

De aanwezigheid van Cu-nitraat blijkt het verloop van de titratiecurve in het begin sterk te beïnvloeden. De curven II, III en IV gaan pas min of meer parallel lopen met curve I nadat resp. ongeveer 0,25; 0,50 en 0,75 m.e. KOH was toegevoegd.



Figuur 25. Potentiometrische titraties van 0,50 m.e. huminezuren 082 I:

I - in 60 ml water
II - " " " " + 0,25 m.e. $Cu(NO_3)_2$
III - " " " " + 0,50 m.e. "
IV - " " " " + 0,75 m.e. "
V - Potent. titratie van 0,50 m.e. $Cu(NO_3)_2$ in 60 ml water (ordinaat 0,5 m.e. naar rechts verschoven).

Nu is in figuur 25 tevens de titratiecurve (V) getekend voor 0,50 m.e.*) $Cu(NO_3)_2$ in afwezigheid van huminezuren. (Voor deze curve is de Y-as 0,50 m.e. naar rechts verschoven). Vanaf de eerste base-toevoeging d.i. vanaf pH ca. 5,5 buigt V af naar horizontaal als gevolg van hydroxide - of beter gezegd van oxidehydraatvorming. Als bijna een equivalente hoeveelheid base is toegevoegd treedt een scherpe pH-stijging op. Na het equivalentiepunt krijgen we dan weer een ombuigen naar horizontaal.

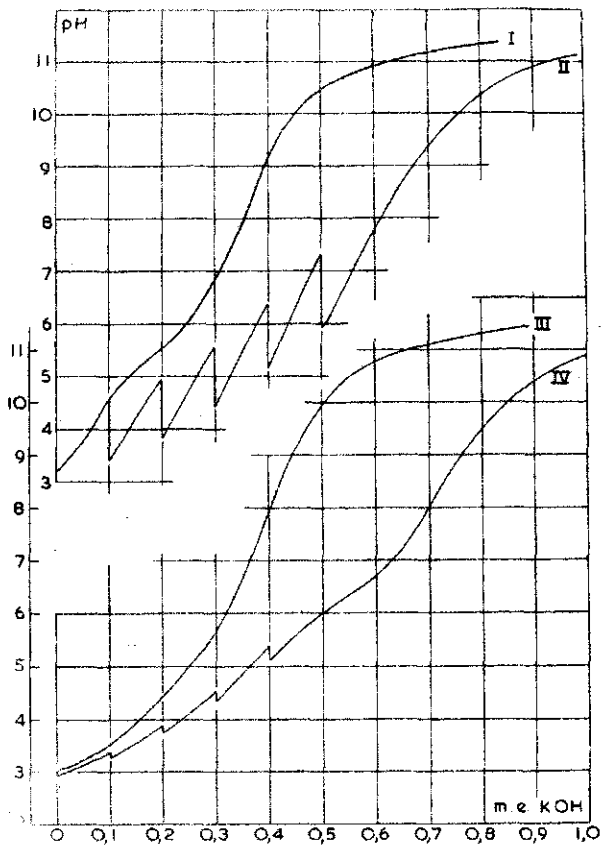
Opvallend is nu dat zowel curve II als III na het bereiken van pH 5,5 niet afbuigen naar horizontaal zoals curve V. Dit betekent dus dat daar géén vrije (gehydrateerde) Cu^{++}-ionen in de oplossing aanwezig zijn. Bij de oplossing die 0,50 m.e. huminezuren en 0,75 m.e. kopernitraat bevat (curve IV) is het pH-verloop eerst ongeveer gelijk aan dat bij III, maar we zien nu bij pH ca. 5,5 wel een ombuigen van de curve naar bijna horizontaal tot 0,75 m.e. base is toegevoegd. Daarna gaat curve IV parallel lopen met de curven II en III. Het heeft er dus veel van dat 0,25 m.e. Cu^{++}-ionen zich hier als vrije (gehydrateerde) ionen gedragen. De huminezuren blijken dus een hoeveelheid Cu^{++}-ionen te kunnen binden, die equivalent is met de hoeveelheid protonen, die we konden titreren in afwezigheid van zouten.

Om over deze binding van Cu nader geïnformeerd te worden hebben wij een oplossing van 0,50 m.e. van dezelfde huminezuren in zuiver water, afwisselend getitreerd met kaliumhydroxide en kopernitraat. Hierbij werd het pH-verloop nagegaan bij toevoeging van resp. 0,10 m.e. base, 0,10 m.e. Cu-nitraat, 0,10 m.e. base etc. Nadat in totaal 0,50 m.e. Cu-nitraat was toegevoegd werd alleen nog met base verder getitreerd.

Het resultaat is weergegeven in figuur 26. Als gevolg van de toevoeging van de eerste 0,10 m.e. base loopt de pH op van 3,20 tot 4,65. De sterkst zure groepen (hoogstwaarschijnlijk COOH-groepen) van de huminezuren zijn dan getitreerd. Aangenomen mag worden dat de K-ionen grotendeels "vrij" blijven (volledig gedissocieerd) en dat bij deze pH hydrolyse van het humaat nog geen rol speelt. Nu voegen we 0,10 m.e. Cu-nitraat toe. Zou dit aan zuiver water worden toegevoegd dan zou de pH niet beneden 5,2 zijn gedaald (een oplossing van 0,50 m.e. Cu-nitraat in 60 ml water had een pH van 5,2). Vanaf dat de eerste druppel Cu-nitraatoplossing wordt toegevoegd gaat de

*) onder m.e. wordt hier steeds verstaan milli-Atoom gedeeld door waardigheid!

pH echter dalen en de pH-daling gaat regelmatig door bij elke volgende druppel kopernitraatoplossing totdat 0,10 m.e. is toegevoegd (de pH is dan 3,40). Om deze pH-daling van 1,2 eenheden weer juist ongedaan te maken bleek 0,08 m.e. base te moeten worden toegevoegd. (N.B. de pH die dan dus weer 4,65 is, is lager dan die waarbij vorming van koperhydroxide is te verwachten.)



Figuur 26. Diverse potentiometrische titraties van 0,50 m.e. huminezuren 082 I in 60 ml water:

I - normale titratiecurve met KOH
II - afwisselend getitreerd met KOH (opgaande curvegedeelten) en $Cu(NO_3)_2$ (verticale curvegedeelten).
III en IV - als I en II, maar nu in 60 ml 1 N KNO_3 in plaats van in zuiver water.

De in de literatuur veelal hieraan gegeven uitleg is dat de Cu^{++}-ionen langs directe weg H^+-ionen hebben verdrongen van voorheen nog ongedissociëerde (geprotoneerde) liganden van de huminezuren (alhoewel "vrije" aniongroepen voor de binding van de Cu-ionen

beschikbaar waren).

Er is echter ook een indirecte weg waarlangs H^+-ionen kunnen zijn "verdrongen". Het Cu-ion zou nl. ook met beide valenties aan "vrije" aniongroepen (COO^-) kunnen zijn gebonden. Het polybasische organische molecuul zou daardoor (een groot deel van) zijn negatieve lading verliezen. Tengevolge daarvan zouden de nog aanwezige protonen niet meer zo sterk worden vastgehouden en een deel zou dus worden afgesplitst. Ook dit mechanisme zou dus hier de geconstateerde pH-verlaging kunnen verklaren (evenals het feit dat bij conductometrische titratie met $Ba(OH)_2$ het eerste buigpunt in de curve is verdwenen; zie pg. 58).

Er is echter één argument dat pleit voor een combinatie van beide verklaringen in die zin, dat de Cu^{++}-ionen hier met één valentie aan een "vrije" aniongroep (COO^-) worden gebonden en met de andere aan een voorheen nog geprotoneerde, zwak zure, fenolische OH-groep. Het "molecuulskelet" van de huminezuren brengt nl. mee, dat de liganden niet vrij beweeglijk zijn. Om samen één Cu^{++}-ion te kunnen binden moeten de beide betreffende liganden zich dus dicht bij elkaar in het skelet bevinden. Bij deze positie is in het vrije huminezuur echter een zodanige onderlinge beïnvloeding te verwachten dat één proton gemakkelijk wordt afgesplitst maar het tweede moeilijk, zoals b.v. bij salicylzuur waarvan de pK_1 lager is dan de pK van benzoëzuur, maar de pK_2 hoger dan de pK van fenol.

Na toevoeging van in totaal 0,20 m.e. base wordt opnieuw 0,10 m.e. kopernitraat bijgetitreerd. De pH daalt daarbij weer 1,2 eenheden nl. van 4,95 tot 3,75 en er is 0,07 m.e. base nodig om deze pH-daling weer op te heffen.

Bij de verdere stappen, d.w.z. bij verdere afwisselende toevoeging van KOH en $Cu(NO_3)_2$, treedt een soortgelijk pH-verloop op. Achtereenvolgens daalt bij de 3^e, 4^e en 5^e maal toevoeging van 0,10 m.e. $Cu(NO_3)_2$ de pH met 1,2; 1,3 en ca. 1,3 eenheid terwijl resp. 0,06; 0,06 en 0,07 m.e. KOH nodig zijn om deze pH-daling weer op te heffen.

Het is duidelijk dat de bij de eerste stap gevolgde redenering hier steeds minder opgaat. Dit blijkt vooral duidelijk bij de laatste stap. Immers, nadat reeds de equivalente hoeveelheid van 0,50 m.e. KOH is toegevoegd (analoog aan boven redenerend: nadat alle zure

groepen zijn getitreerd waarbij de pH 7,3 is geworden), treedt bij de 5e toevoeging van 0,10 m.e. $Cu(NO_3)_2$ toch nog een pH-daling op nl. tot ca. 6,0.

Het meest plausibel lijkt ons dit toe te schrijven aan de gedeeltelijke vorming van een hydroxo-complex.* Mede op grond van verderop te bespreken aanwijzingen menen wij nl. te mogen aannemen dat bij de binding van metaalionen aan huminezuren vrijwel alleen aniongroepen zijn betrokken en dat geen zuiver covalente binding van betekenis met andere groepen of atomen van de huminezuren optreedt. De Cu-ionen in het Cu-humaat zullen dus waarschijnlijk watermoleculen covalent binden. Deze vertonen in het algemeen méér neiging protonen af te staan (waarbij dus hydroxo-complexen worden gevormd) naarmate de pH stijgt. Dit kan ook bij voorgaande stappen een, overigens steeds kleinere, rol spelen. Bij een lage pH zoals tijdens de eerste stappen nog heerst zal hiervan vermoedelijk nauwelijks sprake zijn.

Een andere mogelijkheid zou zijn dat we met een eenvoudig geval van vorming van een "basisch zout" i.c. een hydroxide-humaat te doen hebben, waarbij een van de Cu-huminezuurbindingen wordt verbroken en OH^- in de plaats treedt van een van de twee organische liganden. In de beide volgende paragrafen worden hiertegen bezwaren aangevoerd.

Een derde mogelijkheid zou zijn dat bij de opeenvolgende toevoegingen van base er steeds minder protonen met OH^- tot water worden omgezet, doordat het K-humaat steeds meer aan hydrolyse onderhevig is (zie pg. 70), terwijl deze protonen wel door Cu^{++}-ionen worden verdrongen (en dan met de aanwezige OH-ionen reageren). Als dit het enige zou zijn wat er gebeurt dan veronderstelt dit wel een bijzondere binding van Cu door de huminezuren, anders was immers bij Cu-humaat totale hydrolyse te verwachten geweest.

Er zijn twee belangrijke argumenten tegen de laatst genoemde mogelijkheid. Het ene komt in het begin van de volgende paragraaf ter sprake. Het andere is dat de pH, nadat 0,50 m.e. base is toegevoegd, bij verdere titratie met KOH zeer snel zou moeten stijgen, hetgeen niet het geval blijkt te zijn. Pas na toevoeging van in totaal ca. 0,80 m.e. KOH wordt dezelfde pH bereikt als bij toevoeging van 0,50 m.e. KOH in afwezigheid van Cu-nitraat.

---

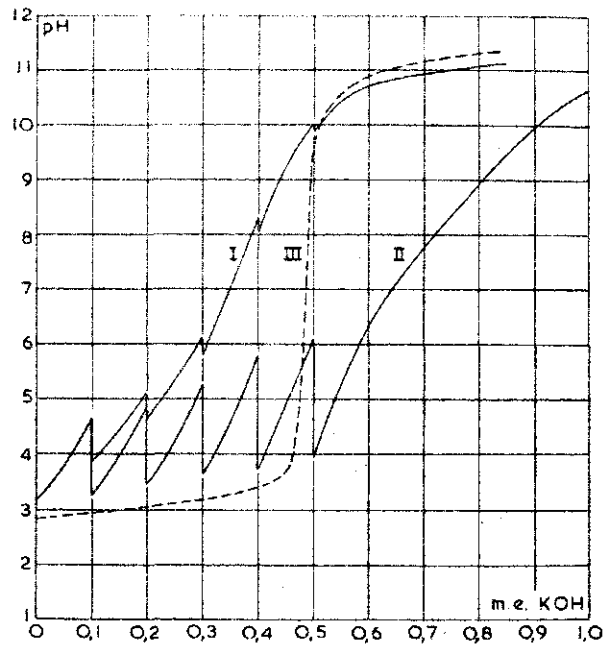
* Volgens de vigerende nomenclatuur zou dit moeten worden aangeduid als een hydroxo-humato-cupraat.

Hiertegen zou kunnen worden aangevoerd dat de Cu^{++}-ionen wellicht niet-zure protonen kunnen verdringen, d.w.z. protonen die niet met alkali- (of aardalkali-) hydroxide titreerbaar waren evenals die van de OH-groep in salicylzuur of in acetylaceton (enolische OH). Deze mogelijkheid hebben wij getoetst door een analoge titratie, afwisselend met KOH en $Cu(NO_3)_2$, tevens uit te voeren bij huminezuren opgelost in een 1 N. KNO_3-oplossing in plaats van zuiver water. Ook dit is weergegeven in figuur 26. De volgorde van toevoeging was hier iets anders. Hier is nl. begonnen met de toevoeging van 0,10 m.e. $Cu(NO_3)_2$. Duidelijk ziet men dat door de grote overmaat (60 m.e.) KNO_3 reeds zoveel H^+-ionen zijn verdrongen van het huminezuur dat de toevoeging van 0,10 m.e. $Cu(NO_3)_2$ slechts nog een gering pH-effect heeft. Het feit dat er hier echter nog een pH-effect optreedt bewijst wel dat de Cu^{++}-ionen zeer veel sterker door de huminezuren worden gebonden dan de K^+-ionen.

Wat in verband met het vorenstaande belangrijk is, is dat ook elke volgende toevoeging van $Cu(NO_3)_2$ slechts een klein pH-effect heeft. Als de Cu-ionen "niet-zure" protonen zouden kunnen verdringen, zouden ze dit ook kunnen doen in aanwezigheid van K-ionen die immers zelf geen "niet-zure" protonen kunnen verdringen.

Bij toevoeging van meer dan 0,50 m.e. base buigt de curve hier aanvankelijk af naar horizontaal om daarna parallel met die verkregen in afwezigheid van KNO_3 te gaan lopen. Het lijkt er dus op dat door de grote overmaat K^+-ionen een deel van de Cu^{++}-ionen zich min of meer als "vrij" gedragen en onderhevig zijn aan hydroxide- of beter gezegd oxidehydraat-vorming.

Steun voor de boven gegeven interpretatie van het curveverloop levert de geheel analoog uitgevoerde titratie van 0,50 m.e. van dezelfde huminezuren, opgelost in 60 ml water, afwisselend getitreerd met KOH en calciumnitraat (figuur 27). Bij titratie van een zuivere calciumnitraatoplossing van de concentratie 0,50 m.e. per 60 ml water is géén vorming van $Ca(OH)\ NO_3$ of $Ca(OH)_2$ waar te nemen. De vorming van een calcium-hydroxide-humaat mag dus, zeker bij een pH kleiner dan 5, uitgesloten worden geacht. De pH-daling die optreedt bij toevoeging van de eerste portie van 0,10 m.e. $Ca(NO_3)_2$, nadat van te voren 0,10 m.e. KOH was toegevoegd, wordt dus ver-



Figuur 27. Potentiometrische titratie van 0,50 m.e. huminezuren 082 I in 60 ml water:

I - afwisselend getitreerd met KOH (opgaande curvegedeelten) en met $Ca(NO_3)_2$ verticale curvegedeelten.

II - als I, maar nu met $Fe(NO_3)_3$ in plaats van met $Ca(NO_3)_2$.

III - potentiometrische titratie van 0,50 m.e. $Fe(NO_3)_3$ in 60 ml water.

oorzaakt doordat de Ca^{++}-ionen langs directe of indirecte weg H^+-ionen van de huminezuren "verdringen". Dat de in dit pH-traject van 3,20 tot 4,60 getitreerde zuurgroepen al zo sterk onderhevig zijn aan hydrolyse dat de door Ca^{++} verdrongen H^+-ionen van deze zuurgroepen afkomstig zijn blijven wij onaannemelijk vinden.

De pH-val bij volgende toevoegingen van 0,10 m.e. $Ca(NO_3)_2$ wordt steeds kleiner. Dit verschil met het effect van kopernitraat wordt veroorzaakt door het niet of althans veel minder optreden van een hydroxo-complex of hydroxide-humaat bij Ca.

Een ander extreem is de analoge titratie van dezelfde huminezuren, afwisselend met KOH en $Fe(NO_3)_3$. Zoals blijkt uit de titratiecurve van ijzer (III)-nitraat in zuiver water (zie figuur 27)

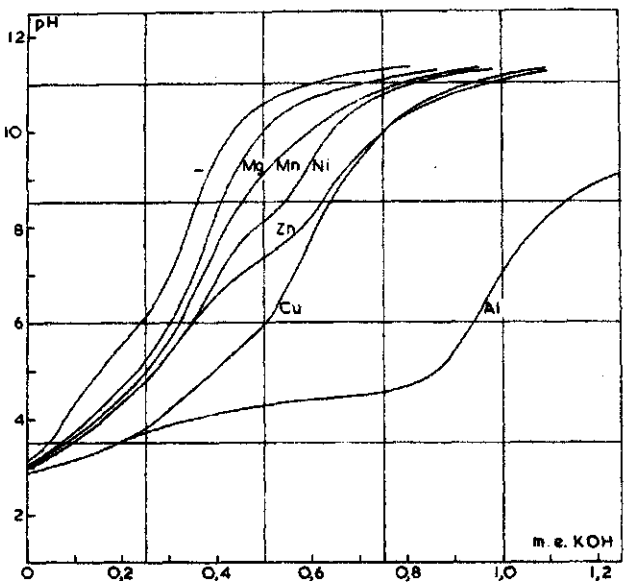
treedt daar reeds bij pH 2,9 de vorming van een ijzer (III)-hydroxide-nitraat of ijzer (III)-oxide-hydraat op (volgens Kolthoff-Elving reeds bij pH 2). De grote (en bij volgende stappen nog steeds groter wordende) pH-val bij toevoeging van telkens 0,10 m.e. $Fe(NO_3)_3$ kan dus vanaf de eerste toevoeging mede worden veroorzaakt door de vorming van een ijzer(III)-hydroxide-humaat, zeer schematisch (louter bij wijze van illustratie) weergegeven als volgt:

$$R.COO^-.(OH)_4 + \left[Fe^{+3}.\ (H_2O)_{x-1}.\ OH^-\right]^{+2} \longrightarrow$$

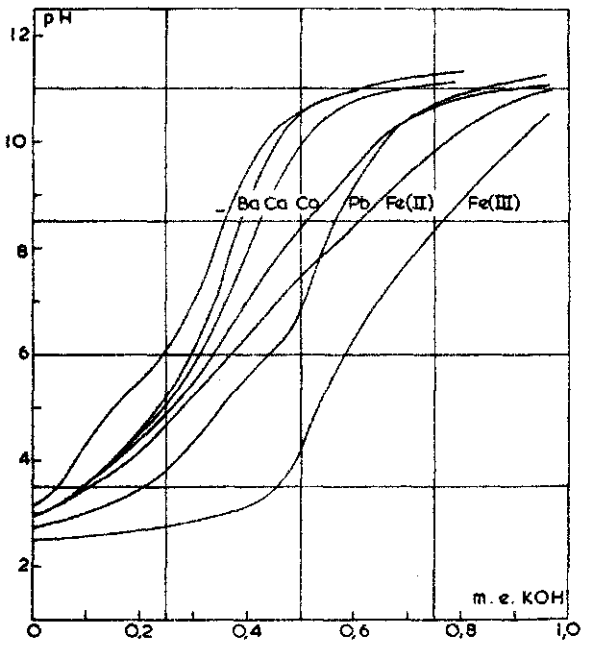
$$R.COO^-.O^-.\ (OH)_3.\ \left[Fe^{+3}\ (H_2O)_{x-1}.\ OH^-\right] + H^+$$

6.3.1.3. Vergelijking van verschillende kationen

De huminezuren 082 I, geïsoleerd uit veenkoloniale grond, werden achtereenvolgens getitreerd in aanwezigheid van een equivalente hoeveelheid Ba-, Mg-, Ca-, Mn-, Co-, Ni-, Fe(II)-, Zn-, Pb-, Cu-(alle tweewaardig), Al- en Fe(III)-ionen, waarbij Fe(II), Zn en Al werden toegevoegd als sulfaten en de overige als nitraten. De verkregen titratiecurven zijn, voor de overzichtelijkheid verdeeld over twee figuren, weergegeven in figuur 28 en 29.



Figuur 28. Potentiometrische titratie van 0,50 m.e. huminezuren 082 I in 60 ml water (meest linkse curve), resp. in aanwezigheid van 0,50 m.e. Mg-, Mn-, Ni-, Zn-, Cu- en Al-zout.



Figuur 29. Potentiometrische titratie van 0,50 m.e. huminezuren 082 I in 60 ml water (meest linkse curve), resp. in aanwezigheid van 0,50 m.e. Ba-, Ca-, Co-, Pb-, Fe(II)- en Fe(III)-zout.

Het blijkt dat alle genoemde kationen een duidelijk effect hebben op het verloop van de titratiecurve. Er is echter een sterk verschil in de grootte van het effect. De vraag rees in welke maat de grootte van dit effect het best kan worden uitgedrukt.

In de literatuur vindt men meestal de "val" van de pH ("pH-drop") opgegeven die, bij bepaalde pH, is opgetreden als gevolg van de aanwezigheid van het betreffende kation. Daarbij is het belangrijk te vermelden bij welke pH de "val" is begonnen op te treden. Een bekende illustratie hiervan vormen de titratiecurven op soortgelijke wijze als hier verkregen door SCHWARZENBACH bij ethyleendiaminetetraazijnzuur (Martell en Calvin, l.c., p. 89), waar natrium en lithium pas een pH-val veroorzaken nadat reeds 3 van de 4 protonen zijn getitreerd, terwijl dit bij calcium reeds het geval is nadat 2 protonen zijn getitreerd.

Opvallend is in dit verband dat alle curven van huminezuren, verkregen in aanwezigheid van bovengenoemde zouten, van het begin af lager liggen dan die voor de huminezuren onder zout. De ver-

schillen zijn slechts gradueel. (Een equivalente hoeveelheid KNO_3 gaf geen merkbare verplaatsing van de curve). Slechts die waar bariumnitraat aanwezig is bereikt na toevoeging van 0,50 m.e. base nagenoeg dezelfde pH als die verkregen in afwezigheid van een zout.

Het laatste pleit tegen de in de vorige paragraaf als derde genoemde mogelijkheid dat de lagere pH in aanwezigheid van Cu-ionen, nadat 0,50 m.e. KOH is toegevoegd, zou worden veroorzaakt doordat bij Cu-humaat geen en bij K-humaat wel hydrolyse zou optreden. Dit zou immers betekenen dat er ook bij Ba-humaat in sterke mate hydrolyse zou optreden (geen totale hydrolyse want $Ba(OH)_2$ is een sterke base). Uit het verloop van de curve verkregen bij conductometrische titratie van huminezuren met NaOH in aanwezigheid van $BaCl_2$ (fig. 13, blz. 71) blijkt echter dat dit niet het geval is. De hoge pH in aanwezigheid van Ba-ionen moet veeleer worden verklaard uit de geringe neiging bij Ba tot hydroxo-complexvorming c.q. tot de vorming van Ba-OH-humaat.

Daar, zoals opgemerkt, alle curven van het begin af lager liggen dan de curve voor huminezuren zonder zout is het dus enigszins willekeurig bij welke pH men hier de "val" afleest als maat voor het effect van de aanwezigheid van het metaalion. Wij hebben daarom in tabel 7 de pH-val opgegeven bij twee punten van de curve nl. daar waar 0,25 m.e. base is toegevoegd ($s = {}^1/2$) en daar waar 0,50 m.e. base is toegevoegd ($s = 1$). In plaats van deze pH-val zou men ook als maat kunnen nemen het aantal m.e. base dat bij aanwezigheid van een zout méér nodig is om dezelfde pH te bereiken als in afwezigheid van zout. (Dit wordt in de literatuur wel gelijk gesteld met de hoeveelheid H^+ uitgewisseld met of "verdrongen" van de huminezuren hetgeen overigens niet zonder meer geoorloofd is zoals in de vorige paragraaf werd uiteengezet). In tabel 7 hebben wij tevens deze horizontale curveverplaatsing door de metaalionen (Δ m.e. base) vermeld, gemeten vanuit het punt op de curve van huminezuren + zout waar $s = {}^1/2$ resp. $s = 1$; (Dit is dus 0,25 resp. 0,50 m.e. minus het aantal m.e. base toegevoegd aan de huminezuren zonder zout om dezelfde pH te bereiken als met zout bij $s = {}^1/2$ resp. $s = 1$). Kwalitatief blijkt deze grootheid dezelfde informatie te geven als de pH-val.

Tabel 7. Het effect van de toevoeging van een equivalente hoeveelheid metaalzout aan de huminezuren 082 I (0,50 m.e. per 60 ml water) gemeten bij twee punten van de titratiecurve.

zout	s = ½ 1)			s = 1 2)			pH 4) oxide-hydraat-vorming
	pH	pH-val	Δ me 3) base	pH	pH-val	Δ me 3) base	
geen	6,2	-	-	10,6	-	-	-
KNO_3	6,2	0	0	10,6	0	0	-
$Ba(NO_3)_2$	5,2	1,0	0,07	10,5	0,1	0,02	-
$Mg(NO_3)_2$	5,2	1,0	0,07	10,0	0,6	0,08	10,5
$Ca(NO_3)_2$	5,0	1,2	0,09	9,9	0,7	0,08	-
$Mn(NO_3)_2$	5,0	1,2	0,09	9,2	1,4	0,12	8,5-8,8
$Co(NO_3)_2$	4,9	1,3	0,10	8,4	2,2	0,15	6,8
$Ni(NO_3)_2$	4,8	1,4	0,11	8,1	2,5	0,16	6,7
$FeSO_4$	4,7	1,5	0,12	7,5	3,1	0,18	5,5
$ZnSO_4$	4,8	1,4	0,11	7,3	3,3	0,19	6,8-7,1
$Pb(NO_3)_2$	3,9	2,3	0,17	6,8	3,8	0,22	6,0
$Cu(NO_3)_2$	4,0	2,2	0,18	6,1	4,5	0,26	5,3
$Al_2(SO_4)_3$	3,7	2,5	0,19	4,2	6,4	0,40	4,1
$Fe(NO_3)_3$	2,8	3,4	>0,25	4,2	6,4	0,42	2

1) s = ½ na toevoeging van 0,25 m.e. KOH

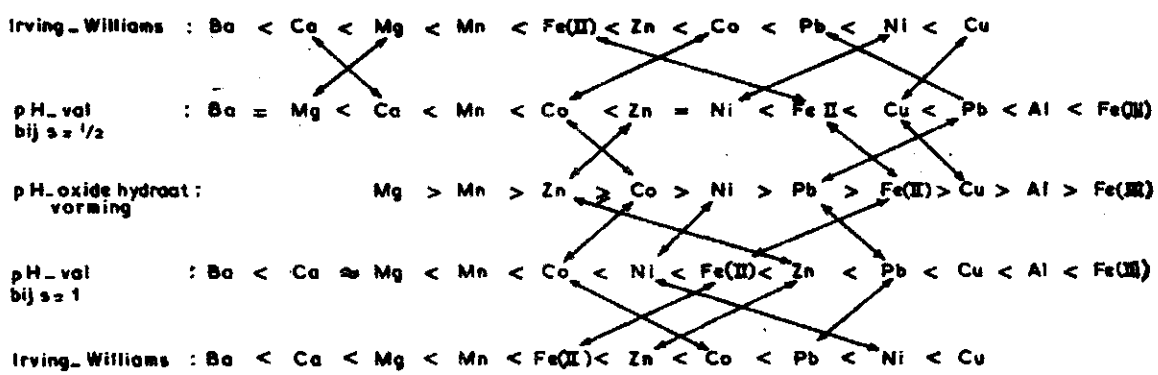
2) s = 1 na toevoeging van 0,50 m.e. KOH

3) Δ m.e. base = horizontale curveverplaatsing door de metaalionen, gemeten vanuit het punt op de curve van huminezuren + zout waar s = ½ resp. s = 1.

4) d.i. de pH waarbij volgens Kolthoff-Elving (l.c.) oxidehydraten van de betreffende metalen beginnen neer te slaan uit 0,02 M zoutoplossingen.

Thans wat betreft de volgorde van grootte van de pH-val: In de literatuurbespreking in 6.2.1. werd vermeld dat Beckwith en ook Khanna en Stevenson hiervoor een volgorde vonden die dezelfde was als in de reeks van Irving en Williams, (hetgeen Martin en Reeve trouwens niet geheel konden bevestigen). Nu beperkte Beckwith zijn onderzoek tot de elementen Mn, Co en Ni, terwijl Khanna en Stevenson ook Cu en Zn er nog in betrokken. Het viel ons echter op dat de volgorde van deze elementen in de reeks van Irving en Williams dezelfde is als de volgorde van de pH-waarden waarbij de oxidehydraten van deze metalen beginnen neer te slaan uit oplossingen die

ongeveer 0,02 M zijn aan zouten van deze elementen. (KOLTHOFF en ELVING, 1959, pg. 806; ook deze pH's zijn vermeld in tabel 7). Enkel afgaande op de pH-val zou het dus in principe mogelijk zijn dat deze alleen uit oxide-hydraatvorming zou moeten worden verklaard. Nu wijst, zoals we hebben gezien, het verloop van de titratiecurve erop dat er wel degelijk een interactie tussen de huminezuren en de metaalionen bestaat. Echter juist in verband met de veronderstelde hydroxocomplex-vorming leek het ons toch alleszins de moeite waard de metaalionen-serie zodanig te kiezen dat deze ook elementen bevat waarvan de plaats in de reeks verschillend is bij Irving-Williams en bij de oxidehydraatvorming. Dit is het geval bij de tweewaardige ionen van Fe en Pb. In het in figuur 30 weergegeven schema plaatsten wij de door ons in het onderzoek betrokken metaalionen in de volgorde van grootte van de pH-val die zij veroorzaakten bij s = ½ (pH = 6,2) en bij s = 1 (pH = 10,5) tussen de reeksen van Irving-Williams en die van de pH waarbij oxide-hydraatvorming optreedt. (In de laatste reeks ontbreken Ba en Ca omdat hiervan geen oxidehydraten worden gevormd).



Figuur 30. De volgorde van grootte van de "pH-val" bij huminezuuroplossingen door de aanwezigheid van de genoemde metaalionen, nadat 0,25 m.e. KOH (s = ½) resp. 0,50 m.e. KOH (s = 1) is toegevoegd, vergeleken met de volgorde in de reeks van Irving-Williams en met de volgorde van pH's waarbij oxidehydraatvorming optreedt in oplossingen van anorganische zouten van deze elementen.

Uit het schema in figuur 30 blijkt dat de volgorde van grootte van de pH-val noch met die in de reeks van Irving-Williams, noch met die in de reeks van oxide-hydraat-vorming geheel overeenkomt.

De plaatswisselingen die met pijltjes in het schema zijn aangegeven betreffen bij sommige elementen zelfs drie plaatsen in de reeks. (Hadden wij echter volstaan met bijv. de serie Mg, Mn, Co, Ni en Cu dan had de volgorde geklopt met die in beide reeksen).

Dat de volgorde van pH-"val" afwijkt van de volgorde van pH waarbij oxide-hydraat-vorming optreedt, achten wij geen doorslaggevend argument tegen onze opvatting dat bij het stijgen van de pH de vorming van hydroxo-complexen of metaal-hydroxide-humaten een steeds grotere rol gaat spelen. Zoals bekend zijn de hierbij betrokken evenwichten dikwijls zeer gecompliceerd.

In verband hiermee kan worden opgemerkt dat er, behalve in horizontale en verticale verschuiving ook nog andere verschillen blijken te zijn tussen de titratiecurven in figuur 28 en 29. Zo treedt er bij aanwezigheid van Ni en Zn daar waar ca. 0,50 m.e. KOH is toegevoegd een vrij duidelijke afbuiging naar een meer horizontaal verloop op. Nadat iets meer KOH is toegevoegd buigt de curve echter weer terug in de oude richting.

Opvallend is echter vooral dat in aanwezigheid van een equivalente hoeveelheid Mn-, Ni-, Co- en Pb- zout na toevoeging van bijna 0,75 m.e. KOH dezelfde pH (10,5) is bereikt als na toevoeging van 0,50 m.e. KOH in afwezigheid van een zout. Wij menen dit zo te moeten interpreteren dat bij deze pH de reactie niet verder is gegaan dan tot één OH^- per metaalion. Bij aanwezigheid van Zn-, Fe(II)- en Cu-zout wordt pas na toevoeging van ruim 0,8 m.e. KOH een pH van 10,5 bereikt, terwijl hiervoor bij aanwezigheid van Fe(III) bijna 1,0 m.e. KOH nodig is. Hier lijkt de reactie dus verder te gaan in de richting van een volledige oxide-hydraat-vorming c.q. in de richting van 2 OH^--ionen per metaalion in het complex.

Vermeldenswaard is nu dat bij geen der zojuist genoemde kationen, in equivalente hoeveelheid naast de huminezuren aanwezig, een neerslag werd waargenomen als tevens 1,0 m.e. KOH was toegevoegd, hetgeen toch te verwachten zou zijn bij een volledig uiteenvallen in het betreffende oxide-hydraat en kaliumhumaat. Wel was bij aanwezigheid van sommige metaalzouten, met name van Pb en Cu en ook Fe(III), duidelijk te zien dat de humaten in het begin van de titratie en ook nadat reeds 0,50 m.e. KOH was toegevoegd, uitgevlokt waren. Bij toevoeging van meer KOH loste het neerslag echter weer op en werd de oplossing weer volkomen homogeen! Dit is o.i. een duidelijke aanwijzing dat het hier niet eenvoudig de vorming van een hydroxide-

humaat betreft, maar dat er negatief geladen hydroxo-complexen worden gevormd bij hogere pH.

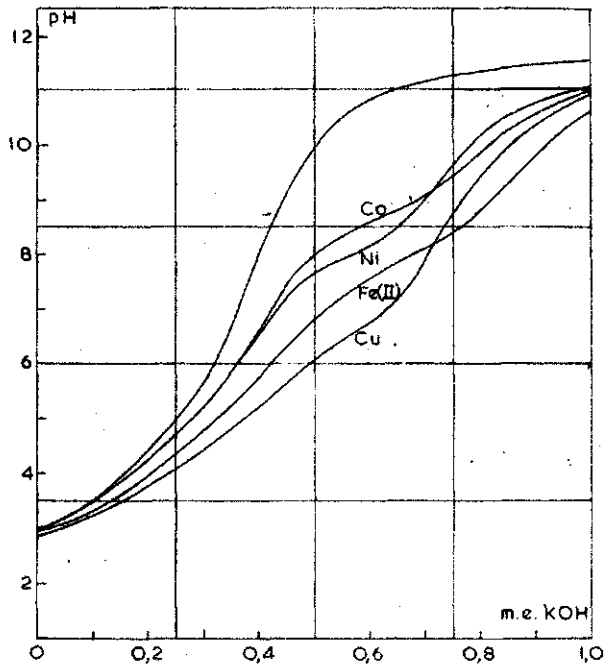
Het driewaardige Al neemt een aparte positie in. Het is niet uitgesloten dat hier reeds van het begin af hydroxide-humaat aanwezig is. De curve stijgt zeer zwak om na pH 4 bijna helemaal horizontaal te gaan lopen. Volgens Kolthoff-Elving treedt bij anorganische Al-zouten bij pH 4,1 oxide-hydraat-vorming op. Gezien het verloop van de curve lijkt het er veel op dat hier hetzelfde gebeurt. Tegen dat 1,0 m.e. KOH is toegevoegd gaat de curve sterk stijgen. Daar waar precies 1,0 m.e. KOH is toegevoegd treedt een buigpunt op. (Dit resultaat bij Al komt dus niet overeen met dat vermeld door WRIGHT c.s. 1963).

Het verloop bij aanwezigheid van Al wijkt dus sterk af van dat bij aanwezigheid van Fe(III). Zoals reeds in de vorige paragraaf is opgemerkt is wel bij Fe(III) van het begin af de aanwezigheid van een hydroxide-humaat heel goed mogelijk. De curve vertoont bij Fe(III) echter geen afbuiging tot bijna horizontaal zoals bij Al. De huminezuur-Fe(III) binding lijkt dus veel steviger dan die tussen huminezuren en het Al-ion. Dit is in overeenstemming met de mening van anderen (zie SCHEFFER-ULRICH l.c. pg. 78).

Op dezelfde plaats noemen Scheffer en Ulrich de opvatting dat de binding van Fe(III)-ionen zou plaats vinden onder gedeeltelijke reductie tot Fe(II). Wij hebben een titratie uitgevoerd van 0,50 m.e. huminezuren waaraan 0,25 m.e. Fe(III) en 0,25 m.e. Fe(II) waren toegevoegd. De verkregen curve had eerst een verloop als de curve verkregen in aanwezigheid van 0,50 m.e. Fe(III) en ging pas nadat 0,25 m.e. KOH was toegevoegd geheel evenwijdig lopen aan de curve verkregen in aanwezigheid van 0,50 m.e. Fe(II). Dit is dus bepaald geen bevestiging van de juistheid van genoemde opvatting, die overigens ook door Scheffer en Ulrich in twijfel wordt getrokken.

In figuur 31 zijn een aantal titratiecurven weergegeven van 0,50 m.e. van (nog steeds) dezelfde huminezuren in aanwezigheid van een equivalente hoeveelheid van enkele metaalzouten, echter met dit verschil dat de oplossing tevens 60 m.e. (1 Mol/l) KNO_3 bevatte. Het verschil tussen de curven onderling en met de curve verkregen bij huminezuren in aanwezigheid van alléén 60 m.e. KNO_3 is, vooral bij lage pH, sterk genivelleerd door de pH-val veroorzaakt door de grote overmaat KNO_3. De curven bij aanwezigheid van Ba en Ca (niet

in de figuur ingetekend) vallen zelfs nagenoeg samen met die verkregen bij alleen overmaat KNO_3. Bij aanwezigheid van zouten van Co, Ni, Zn, Fe(II), Cu en Fe(III) traden de verschillen echter steeds duidelijker naar voren naarmate de pH steeg. De pH-val als 0,50 m.e. KOH is toegevoegd bleek vrijwel dezelfde volgorde te hebben als in de oplossingen zonder KNO_3. Alleen Zn en Fe(II) waren van plaats verwisseld.



Figuur 31. Potentiometrische titratie van 0,50 m.e. huminezuren 082 I in 60 ml van een 1 N KNO_3-oplossing in water (meest linkse curve) resp. in deze oplossing waaraan echter bovendien 0,50 m.e. Co-, Ni-, Fe(II)- of Cu-zout is toegevoegd.

Een deel van de metaalionen lijkt door de aanwezigheid van overmaat K-ionen zich min of meer als vrije ionen te gedragen. Alle curven vertonen althans nadat 0,50 m.e. KOH is toegevoegd gedurende een klein pH-traject een afbuigen naar de X-as, hetgeen wijst op oxide-hydraat-vorming zoals ook werd verondersteld op te treden in aanwezigheid van meer dan 0,50 m.e. kopernitraat (zie figuur 25).

Hierop wees ook het resultaat van een titratie van 0,50 m.e. huminezuren in aanwezigheid van 0,50 m.e. kopernitraat + 0,50 m.e. calciumnitraat. De hierbij verkregen curve viel nl. binnen de bepa-

lingsfout samen met die verkregen in aanwezigheid van 0,50 m.e. kopernitraat + 60 m.e. kaliumnitraat. 0,50 m.e. Ca-ionen hadden dus zo te zien practisch evenveel (of beter gezegd: even weinig) Cu-ionen verdrongen als 60 m.e. K-ionen.

Een geschikter tweewaardig kation voor het nagaan van deze verdringing is dat van barium. We zagen immers dat Ba-humaten bij hoge pH geen neiging vertoonden in hydroxide-humaten of hydroxo-complexen over te gaan, terwijl Ca-humaten hiervan niet geheel vrij waren.

(Een electrostatisch veldeffect van het huminezuur-polyanion als geheel zal, naar is aan te nemen, bij alle tweewaardige kationen min of meer gelijk zijn.).

Eerst werden titraties uitgevoerd van oplossingen die 0,50 m.e. huminezuren + 0,50 m.e. kopernitraat + resp. 0,50, 1,00 en 10,0 m.e. bariumnitraat bevatten. Hierbij bleek ook het effect van 0,50 m.e. Ba-nitraat precies gelijk te zijn aan dat van 60 m.e. KNO_3. In feite is het zo, dat noch 60 m.e. KNO_3, noch 0,50, 1,00 of 10,0 m.e. Ba-nitraat enig effect hebben op de curve van huminezuren + Cu-nitraat, totdat 0,50 m.e. KOH is toegevoegd (de pH is dan 5,9 - 6,0). De afbuiging van de curve naar een meer horizontale richting na dit punt is gelijk bij aanwezigheid van 0,50 m.e. Ba- of Ca-nitraat of van 60 m.e. KNO_3. 1,00 m.e. Ba-nitraat veroorzaakt een iets sterkere en langere afbuiging naar horizontaal en bij 10,0 m.e. Ba-nitraat is dit effect nog weer iets sterker. Het méér-effect ten opzichte van 0,50 m.e. Ba-nitraat is echter relatief slechts gering. De verplaatsing van dit deel van de curve door Ba-nitraat naar rechts is nl. resp. ongeveer 0,10, 0,12 en 0,15 m.e.

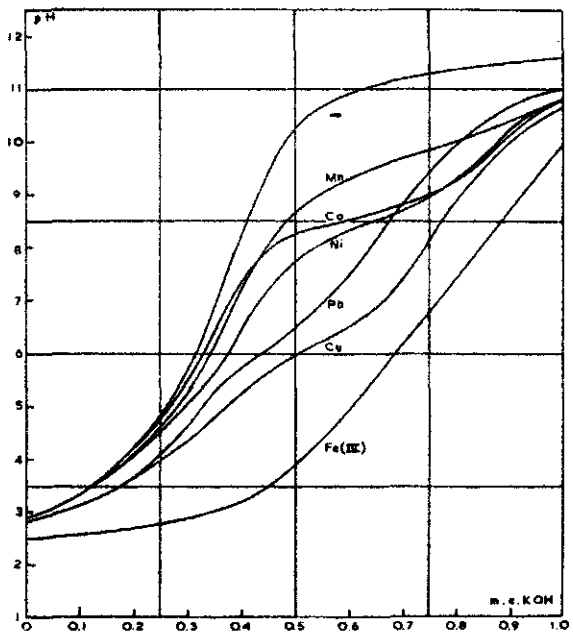
Dit betekent dus dat zelfs een twintigvoudige overmaat aan Ba-ionen nog niet $^1/_3$ van de Cu-ionen heeft kunnen "vrijmaken". Dit is te meer opvallend als we bedenken dat deze verdringing op zichzelf bevorderd wordt doordat de verdrongen Cu-ionen aan het evenwicht worden onttrokken door oxide-hydraatvorming. Hier hebben we dus een duidelijke aanwijzing dat de Cu-ionen voor het merendeel zeer sterk worden gebonden, sterker dan van een simpel "basisch zout" te verwachten zou zijn geweest. Ook dit wijst dus op een complexe binding.

In dit verband is het zeker interessant te vermelden dat bij aanwezigheid van 0,25 m.e. Cu-nitraat en 10,0 m.e. Ba-nitraat

(d.i. dus een 40-voudige overmaat) van een afbuiging van de titratiecurve naar horizontaal, zoals bij aanwezigheid van een equivalente hoeveelheid (0,50 m.e.) Cu-ionen, geen sprake bleek te zijn.

Of dat deel van de 0,50 m.e. Cu-ionen, dat zich wél liet verdringen juist diegene betreft die met één valentie aan de anionen van de sterk zure groepen gebonden waren, is niet met zekerheid te zeggen maar onwaarschijnlijk is het niet gezien het feit dat een complex dikwijls stabieler is naarmate het zuur zwakker is (MARTELL en CALVIN, § 4.4.).

Ook hier hebben we naast Cu andere metaalionen uit de eerste overgangsreeks en Pb in het onderzoek betrokken. In figuur 32 zijn de titratiecurven weergegeven van 0,50 m.e. huminezuren in aanwezigheid van 0,50 m.e. van deze ionen en van 10,0 m.e. Ba-nitraat. De overeenkomst met figuur 31 is evident. De pH waarbij afbuiging naar horizontaal optreedt bij de diverse tweewaardige ionen komt vrij goed overeen met die waarbij volgens Kolthoff-Elving de vorming van oxidehydraten te verwachten is (zie tabel 7). Dit steunt onze opvatting dat dit proces hier ook inderdaad optreedt.



Figuur 32. Potentiometrische titratie van 0,50 m.e. huminezuren 082 I in 60 ml van een 1/6 N $Ba(NO_3)_2$-oplossing in water (curve aangeduid met -) resp. in deze oplossing waarin echter bovendien 0,50 m.e. Mn-, Co-, Ni-, Pb-, Cu- of Fe(III)-zout aanwezig is.

Verder valt op dat het moment waarop de curven weer steiler gaan lopen (uitgezonderd bij Pb dat ook in figuur 29 door ons onbekende oorzaken afwijkt) eerder optreedt naarmate de pH waarbij oxidehydraat-vorming optreedt lager is. Dit wijst dus, evenals de "pH-val", op een volgorde van toenemende bindingssterkte in de reeks Mn Co Ni Cu. Zou er bij metaal-humaten bij hogere pH alleen maar sprake zijn van de vorming van een eenvoudig "basisch zout" zonder meer (hydroxide-humaat), dan was toch het omgekeerde te verwachten geweest nl. dat in aanwezigheid van overmaat Ba^{++} juist bij Cu-humaat in de sterkste mate metaal-ionen waren verdrongen en bij Mn-humaat het minst. Opnieuw een aanwijzing dus dat het hier een veelkernig complex betreft.

Zn en Fe(II) werden niet in dit onderzoek betrokken omdat we hiervan slechts sulfaten in zuivere vorm hadden. Deze zouden met Ba-ionen een $BaSO_4$-neerslag hebben gegeven.

Bij aanwezigheid van Fe(III)-ionen naast de overmaat Ba-ionen treedt niet een beperkt, meer horizontaal stuk in de curve op, maar heeft de gehele curve vanaf dat 0,45 m.e. KOH is toegevoegd, een kleinere helling dan zonder overmaat Ba-ionen.

Tenslotte kan nog worden vermeld dat door wassen met verdund mineraal zuur of schudden met een sterk zure kationenwisselaar in H^+-vorm het oorspronkelijke asgehalte van de huminezuren weer terug te krijgen is. De diverse metaalionen zijn dus kennelijk wel uit te wisselen tegen H^+-ionen!

6.3.1.4. Vergelijking van verschillende huminezuren

Om na te gaan in hoeverre de gevonden volgorde in pH-val regel is werd de volgorde van de elementen Ca, Ni, Zn, Fe(II), Pb en Cu tevens nagegaan bij de huminezuren 123b (bosveen) en Ib (bereid uit hydrochinon in ammoniakale oplossing). De resultaten zijn weergegeven in tabel 8. Hieruit blijkt dat niet alleen de volgorde in pH-val bij s = ½ en bij s = 1 voor de huminezuren uit veenkoloniale grond en uit bosveen gelijk is maar dat zelfs de grootte van de pH-val gelijk is. Dit kan niet gezegd worden van de synthetische huminezuren Ib. Wel is bij s = 1 de volgorde van grootte van de pH-val gelijk aan die bij de beide andere huminezuren maar bij s = ½ zijn Pb en Cu van plaats verwisseld. Verder is de grootte van de pH-val nogal wat verschillend, vooral bij s = ½. Daar is nl. de pH-val in aanwezigheid van een equi-

valente hoeveelheid calciumnitraat aanzienlijk lager, maar bij de overige zouten nogal wat hoger dan bij 082 I en 123b. Dit verschil is behalve bij Ca grotendeels verdwenen bij s = 1.

Tabel 8. Een vergelijking van 3 huminezuren wat betreft het effect van de aanwezigheid van 6 metaalzouten bij s = ½ en bij s = 1.

zout	humine-zuren	s = ½ [1]			s = 1 [2]		
(0,50 me in 60 ml)		pH	pH-val	Δ me base [3]	pH	pH-val	Δ me base [3]
	082 I	6,2	-	-	10,6	-	-
geen	123 b	5,6	-	-	10,4	-	-
	I b	7,7	-	-	10,7	-	-
	082 I	5,0	1,2	0,09	9,9	0,7	0,08
$Ca(NO_3)_2$	123 b	4,5	1,2	0,11	9,6	0,8	0,05
	I b	7,0	0,7	0,03	10,3	0,4	0,07
	082 I	4,8	1,4	0,11	8,1	2,5	0,16
$Ni(NO_3)_2$	123 b	4,2	1,4	0,13	7,8	2,6	0,11
	I b	5,8	1,9	0,09	8,6	2,1	0,21
	082 I	4,7	1,5	0,12	7,5	3,1	0,18
$FeSO_4$	123 b	4,2	1,5	0,13	7,0	3,3	0,15
	I b	5,5	2,2	0,11	7,7	3,0	0,25
	082 I	4,8	1,4	0,11	7,3	3,3	0,19
$ZnSO_4$	I b	5,7	2,0	0,10	7,5	3,2	0,26
	082 I	3,9	2,3	0,17	6,8	3,8	0,22
$Pb(NO_3)_2$	123 b	3,4	2,3	0,19	6,0	4,3	0,22
	I b	4,8	2,9	0,16	7,5	3,2	0,26
	082 I	4,0	2,2	0,18	6,1	4,5	0,26
$Cu(NO_3)_2$	123 b	3,5	2,1	0,18	5,7	4,7	0,25
	I b	4,2	3,6	0,19	6,2	4,5	0,31

1) 2) 3) zie onderaan tabel 6.

In elk geval mag gezien het bovenstaande worden geconcludeerd dat de in de vorige paragraaf geconstateerde afwijking tussen de volgorde van grootte van de pH-val en die in de reeks van Irving-Williams niet toevallig is.

Vervolgens werden nog 10 andere huminezuren getitreerd

in aanwezigheid van een equivalente hoeveelheid calcium- resp. koper (II)-nitraat. Bij alle titraties was de huminezuur-concentratie 0,50 m.e. per 60 ml. (gebaseerd op de equivalentsgewichtsbepaling door conductometrische titratie met bariumhydroxide). Tabel 9 geeft de resultaten.

In de eerste plaats zij gewezen op het verschil in gedrag van natuurlijke en synthetische huminezuren. Voor beide groepen zijn de gemiddelden met hun standaardafwijking berekend voor de pH-val en voor het verschil in Δ m.e. base bij s = ½ resp. s = 1. Bij toepassing van de t-toets blijkt bij s = ½ het verschil tussen de gemiddelde waarden van de pH-val bij aanwezigheid van calciumnitraat niet significant (overschrijdingskans meer dan 10 %), maar bij aanwezigheid van kopernitraat zeer significant (overschrijdingskans kleiner dan 1 %).

Tabel 9. Vergelijking van enkele gegevens ontleend aan titratiecurven van equinormale oplossingen van 13 huminezuren in zuiver water (0,50 m.e.in 60 ml) en in aanwezigheid van een equivalente hoeveelheid calcium- c.q. kopernitraat.

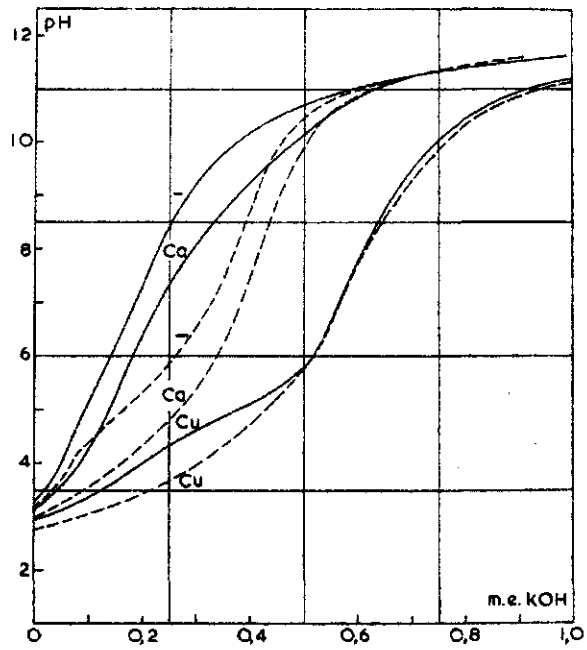
No. huminezuren	herkomst	na toevoeging van 0,25 m.e. KOH: pH zonder zout	pH-val bij Ca	Δ me base bij Ca [1]	pH-val bij Cu	Δ me base bij Cu [1]	na toevoeging van 0,50 m.e. KOH: pH zonder zout	pH-val bij Ca	Δ me base bij Ca [1]	pH-val bij Cu	Δ me base bij Cu [1]	mg N per 0,50 me huminezuren	mg O [2]	T [3]
082 I	veenkol.gr.(NaOH.NaF)	6,2	1,2	0,09	2,2	0,18	10,6	0,7	0,08	4,5	0,26	3,0	35,5	0,49
082 II	" (NaF)	6,0	1,1	0,12	2,3	0,20	10,5	0,7	0,06	4,7	0,27	2,2	34,0	0,55
114	zandgr.(bouwland)	5,8	1,0	0,11	2,1	0,20	10,5	0,5	0,04	4,8	0,26	3,8	36,0	0,46
0[illegible]4 B	radoorn "Braun"	6,0	1,0	0,12	2,1	0,20	10,6	0,3	0,04	4,7	0,25	4,4	37,5	0,46
123 b	boeveen 2e extrakt	5,6	1,2	0,11	2,1	0,18	10,4	0,8	0,05	4,7	0,25	2,6	40,8	0,49
123 c	" 3e "	6,0	1,2	0,10	2,2	0,16	10,7	0,3	0,05	4,7	0,25	2,6	35,7	0,56
116	zwartveen	6,4	0,5	0,05	2,3	0,19	10,2	0,2	0,02	4,4	0,30	2,2	40,9	0,4[illegible]
115	X_2	6,2	1,2	0,11	2,8	0,21	10,6	0,7	0,08	5,4	0,34	11,5	31,0	0,49
	gemiddeld	6,02	1,05	0,10	2,25	0,19	10,51	0,5	0,05	4,7	0,27			
	standaardafw. s	0,25	0,24	0,02	0,24	0,01	0,16	0,23	0,01	0,30	0,03			
I b	h.ch.e NH_4OH (roeren)	7,7	0,7	0,03	3,6	0,19	10,7	0,4	0,07	4,5	0,31	11,9	30,9	0,48
IIb	" " (schudden)	7,5	1,0	0,05	3,5	0,21	10,7	0,4	0,08	4,5	0,32	7,3	30,4	0,54
V	" + NaOH	7,8	0,8	0,03	3,0	0,16	10,6	0,3	0,06	4,3	0,32	0	29,3	0,62
III	pyrogallol + NH_4OH	7,2	0,4	0,02	3,3	0,20	10,3	0,3	0,04	5,2	0,35	4,3	26,0	0,68
VI	pyrocatechol + NaOH	8,4	1,1	0,05	4,1	0,19	10,7	0,6	0,11	5,0	0,37	0	30,0	0,57
	gemiddeld	7,72	0,8	0,04	3,5	0,19	10,60	0,4	0,07	4,7	0,33			
	standaardafw. s	0,45	0,27	0,01	0,41	0,01	0,17	0,12	0,03	0,41	0,02			

1) Δ me base = horizontale curveverplaatsing door de metaalionen, gemeten vanuit het punt op de curve van huminezuren + zout na toevoeging van 0,25 resp. 0,50 me KOH.
2) mg O = mg "rest" = mg (gloeiverlies - C - N - H).
3) T = me $Ba(OH)_2$ verbruikt bij eindpunt conduktometrische titratie, berekend per 100 mg asvrije huminezuren.

Ook bij s = 1 is het verschil tussen de gemiddelde waarden van de pH-val bij aanwezigheid van calciumnitraat niet significant, dat bij aanwezigheid van kopernitraat is nu echter nul.

Het verschil blijkt tussen de gemiddelde waarden van Δ m.e. KOH (= horizontale curveverplaatsing) bij s = ½ voor Ca zeer significant te zijn maar voor Cu nul en bij s = 1 voor Ca niet significant maar voor Cu zeer significant.

Figuur 33 illustreert het duidelijke verschil in curveverloop bij natuurlijke en synthetische huminezuren.



Figuur 33. Potentiometrische titratie van 0,50 m.e. synthetische huminezuren no. Ib (getrokken lijnen) en natuurlijke huminezuren no. 114 (onderbroken lijnen) resp. in 60 ml water (-) en in 60 ml water waaraan 0,50 m.e. Ca- of Cu-nitraat was toegevoegd.

Een zeer belangrijke conclusie die uit tabel 9 kan worden getrokken is, dat de betrekkelijk kleine verschillen die er zijn bij de natuurlijke en bij de synthetische huminezuren onderling, niet in verband blijken te staan met het totaal aantal mg N of "rest" (de "rest" is bij benadering het aantal mg O) per 0,50 m.e. huminezuur. Evenmin blijkt de verschillende verhouding tussen aantallen "COOH" en "fenolische OH", (tabel 6, § 5,4.), indien althans reëel, hier een rol te spelen. (Dit zou zelfs op te vatten zijn als een aanwijzing dat de gevonden verschillen in deze verhouding inderdaad niet reëel zijn). Sprekend is in dit opzicht dat de 3 curven van I b (nl. die in afwezigheid van zout, die in aanwezigheid van Ca^{++} en die in aanwezigheid van Cu^{++}) nagenoeg geheel samenvallen met de 3 overeenkomstige curven van II b en dat alleen de Cu-curve bij V beneden pH 6 afwijkt van de Cu-curven bij I b en II b. Het aantal mg N per 0,50 m.e. huminezuur bedraagt echter resp. 11,9; 7,3 en 0 (het aantal mg "rest" loopt hier weinig uiteen).en

de "COOH/OH-verhouding" zou resp. 1 : 5, 1 : 4 en 1 : 3 zijn.

Evenzo lijkt het verschil tussen natuurlijke en synthetische huminezuren bepaald niet samen te hangen met een verschil in N-gehalte. Dit verschil lijkt veeleer samen te hangen met het verschil in "sterkte" van de sterk zure groepen.

Alhoewel dat hiermee niet onomstotelijk bewezen is, wijst dit er toch wel zeer sterk op dat de N geen rol van betekenis speelt bij de kationenbinding bij huminezuren. Hier zij opgemerkt dat het tegendeel in de literatuur alleen maar verondersteld wordt maar nergens bewezen.

De kationenbinding zal vrijwel geheel zo niet uitsluitend er een zijn via O-aniongroepen die bij ongedissocieerde huminezuren geprotoneerd zijn. Hierop wijst nl. zeer duidelijk het genoemde samenvallen of althans grote overeenkomst vertonen der curven bij equinormale huminezuuroplossingen.

6.3.1.5. Recapitulatie en conclusies.

Uit potentiometrische titraties der huminezuren in aanwezigheid van zouten met KOH resulteerde dus onder meer het volgende:

Bij titraties van huminezuren in aanwezigheid van verschillende hoeveelheden Cu-nitraat bleek dat de huminezuren niet meer dan een equivalente hoeveelheid Cu-ionen binden.

Deze binding vindt niet uitsluitend allereerst plaats aan de sterkst zure groepen van de huminezuren. Bij lage pH is een binding van de Me^{++}-ionen met één valentie aan een sterker en met één valentie aan een zwakker zure groep wel plausibel. Bij de binding van metaalionen worden slechts waterstofionen verdrongen van zuurgroepen die ook zonder toevoeging van zout titreerbaar waren (dus "zure" H^{+}-ionen.)

Niettemin is bij aanwezigheid van een equivalente hoeveelheid van diverse Me^{++}-zouten, nadat een eveneens equivalente hoeveelheid base is toegevoegd, de pH toch aanzienlijk lager dan in afwezigheid van deze zouten, hetgeen niet aan een geringere mate van hydrolyse van het Me^{++}-humaat vergeleken met K-humaat bleek te kunnen worden toegeschreven.

Het verschil in effect van de aanwezigheid van de verschillende twee- en driewaardige kationen op de pH is slechts gradueel. Als de helft van de met de huminezuren equivalente hoeveelheid KOH is toegevoegd is het verschil tussen het effect van Ca, Ba, Mg, Mn, Co, Ni,

Zn en Fe(II) nog maar gering (de pH van de oplossing loopt dan nog niet verder uiteen dan van 5,2 tot 4,7). Dit wijst niet op een groot verschil in affiniteit van de huminezuren voor deze kationen bij deze pH. Bij Pb, Cu en vooral Fe(III) is de "pH-val" aanzienlijk groter.

Dit verschil in effect op de pH van de oplossing neemt toe bij hogere pH. De volgorde in grootte van dit effect wijkt af van de volgorde van de elementen in de reeks van Irving-Williams, maar komt ook niet geheel overeen met de volgorde van pH's waarbij oxidehydraatvorming te verwachten is.

Afhankelijk van het toegevoegde zout is (afgezien van de aardalkalizouten) 0,75 tot 1,00 m.e. KOH nodig om dezelfde pH te bereiken als in afwezigheid van zouten.

Diverse metaalzouten veroorzaken door hun aanwezigheid een neerslag bij het begin van de titratie. Dit neerslag is nog aanwezig als een met de huminezuren equivalente hoeveelheid KOH is toegevoegd. In alle gevallen (behalve bij Al), waar niet meer dan een equivalente hoeveelheid zout was toegevoegd, is dit neerslag na toevoeging van 1,00 m.e. KOH echter weer volledig opgelost. Dit pleit tegen een eenvoudige "basisch-zout"-vorming.

Een overmaat K^+- of zelfs Ba^{++}-ionen kunnen slechts een deel (1/5 tot 1/3) van de Cu^{++}-ionen in koperhumaat bij pH > 6 verdringen, hetgeen een aanwijzing is voor een zeer sterke binding van Cu^{++} door de zwak zure groepen van de huminezuren. Dit blijkt ook daaruit dat wanneer slechts de helft van de met de huminezuren equivalente hoeveelheid Cu^{++} aanwezig is, in het geheel geen verdringing optreedt.

In de volgorde Cu Ni Co Mn worden meer metaalionen verdrongen door een overmaat Ba-ionen. Deze verdrongen ionen zijn onderhevig aan oxide-hydraat-vorming. Bij eenvoudige anorganische zouten is de volgorde van pH waarbij (en dus bij bepaalde pH de mate waarin) oxide-hydraat-vorming optreedt juist omgekeerd.

Deze slechte uitwisselbaarheid tegen Ba-ionen en de volgorde hierin gevonden bij enkele metaal-ionen pleiten eveneens tegen de mogelijkheid dat we bij hoge pH eenvoudig te doen hebben met de vorming van "basische zouten".

Bij uitgaan van equinormale oplossingen van de huminezuren blijken er nauwelijks nog onderlinge verschillen tussen natuurlijke huminezuren ten aanzien van het effect van de toevoeging van metaalzouten te zijn, ondanks een uiteenlopend N-en O-gehalte (en "COOH/

OH-verhouding"). Hetzelfde geldt voor synthetische huminezuren. Tussen beide groepen van huminezuren blijken echter wel (deels significante) verschillen te bestaan. Deze hangen vermoedelijk samen met een verschil in pK van de sterk zure groepen.

Alhoewel het absolute bewijs ontbreekt leidt dit geheel van aanwijzingen ons tot de conclusies:

a. dat metaalhumaten veelkernige chelaten zijn, waarin de metaalhumaat-binding vrijwel alleen zo niet uitsluitend via negatief geladen liganden van de huminezuren plaatsvindt;
b. dat, afhankelijk van het aanwezige metaalion, bij hogere pH hydroxocomplexen kunnen ontstaan doordat H^+-ionen worden afgesplitst van covalent aan het metaalion gebonden watermoleculen.

6.3.2. Overige onderzoekingen van de ionenwisselingsevenwichten

De interactie tussen kationen en negatief geladen groepen van een ionenwisselaar wordt beheerst door verschillende factoren. In de eerste plaats kunnen worden genoemd de eigenschappen van de ionenwisselaar zoals aantal, stand en polariseerbaarheid van de liganden. Daarnaast zijn het de kationen die de interactie bepalen. De binding van kationen aan negatief geladen groepen van een ionenwisselaar wordt altijd tenminste voor een deel veroorzaakt door electrostatische krachten (Coulomb-krachten). Als gevolg van een eventuele "deformeerbaarheid" van het kation (en ligand) kan de binding echter ook een meer of minder sterk covalent karakter hebben.

KOLTHOFF en ELVING (1959, p. 546) geven, in navolging van Schwarzenbach de volgende indeling der kationen:

A. Kationen met een edelgasconfiguratie, zoals de alkali- en aardalkaliionen, waarbij de electrostatische krachten overheersen. De grootte en de lading der kationen zijn sterk bepalend voor de stabiliteit van de complexen (niet-specifieke interactie).
B. Kationen met een geheel gevulde d-baan, zoals Cu(I), Ag(I) en Au(I). De "deformeerbaarheid" van deze ionen is groot en de bindingen in de complexen zijn overwegend covalent (specifieke interactie).
C. Overgangsmetalen met incomplete electronenbanen, waarin beide tendenzen n.l. tot electrostatische en tot covalente binding een voorname rol spelen. Welke van beide overheerst hangt in wezen

van drie factoren af n.l. lading, grootte en ionisatiepotentiaal van het ion.

Slechts als de specifieke interactie tussen kationen en ionenwisselaar veel kleiner is dan de niet-specifieke, electrostatische interactie, is een diffuse, atmosferische distributie van de kationen aan het "oppervlak" van de wisselaar te verwachten en zal een ionenverdeling volgens een vergelijking van het type als die van Gapon, waarin k_G een constante is, kunnen optreden (zie pg. 122).

Uit de potentiometrische titraties in aanwezigheid van verschillende metaalzouten (6.3.1.) bleek dat er, althans bij de tweewaardige ionen der elementen uit de eerste overgangsreeks, een specifieke interactie optreedt. Bij de alkali-ionen was dit, zoals te verwachten, niet het geval of althans niet van betekenis. Bij de aardalkali-ionen was er wel een sterke interactie maar in hoeverre deze specifiek is kan niet zonder meer worden uitgemaakt.

Aangezien het voor het inzicht in de ionenwisseling in de grond van veel belang is te weten of er van een "abnormale" binding van Ca- en Mg-ionen vergeleken met K^+ en NH_4^+ sprake is, besloten wij een onderzoek hiernaar in te stellen bij huminezuren. (De in 6.3.1. besproken publikatie van Jungk was toen nog niet verschenen).

Als experimentele opzet kozen wij dezelfde als door HUTSCHNEKER (1955; zie pg. 39-42) toegepast bij polyacrylzuur, pectinezuur en polystyreensulfonzuur. De uitvoering was echter iets anders: Oplossingen van 1500 mg huminezuren (4 typen n.l. 2 uit grond en 2 synthetische) in 150 ml water werden in een dialyseslang gebracht, waarna deze, goed dichtgebonden, in 150 ml 0,010 KCl- (c.q. NH_4Cl-, $CaCl_2$-, $MgCl_2$-) oplossing werden gehangen. Nadat evenwicht was ontstaan werd de "buitenoplossing" gewogen en geanalyseerd op K^+ (c.q. NH_4^+, Ca^{++}, of Mg^{++}), op H^+ en op Cl^-. De dialyseslang met huminezuren werd in een verse 0,010 N zoutoplossing van hetzelfde gewicht als de verwijderde "buitenoplossing" gehangen. Dit proces werd 7-10 maal herhaald.

Uit de verrichte analyses van de "buitenoplossingen" kennen we dus de ionenverdeling tussen slang met inhoud en "buitenoplossing". Dit wordt door Hutschneker gelijk gesteld met de ionenverdeling tussen polyelectrolyt en "buitenoplossing". Het laatste moge bij benadering opgaan als het volume van de oplossing in de dialyseslang practisch te

verwaarlozen is ten opzichte van dat van de "buitenoplossing", zoals bij Hutschneker, in ons geval gaat het zeker niet op.

In feite hebben wij te doen met een groot aantal micro-Donnan-systeempjes (de huminezuurdeeltjes in de omgevende "binnenoplossing"), die samen met de door de dialyseslang hiervan gescheiden "buitenoplossing" een macro-Donnan-systeem vormen. (Het deeltjesgewicht van de huminezuren is dermate klein en de concentratie dermate hoog dat, bij uitwisseling tegen alkali- of NH_4^+ -ionen, een duidelijk waarneembare osmotische druk optreedt).

Om de ionenverdeling "op" de huminezuurdeeltjes te berekenen moeten we de concentraties aan "vrije" ionen in de "binnenoplossing" kennen. Nu hadden we de hoeveelheid Cl^- in de "buitenoplossing" bepaald en we kenden de in totaal toegevoegde hoeveelheid Cl^-. We wisten dus hoeveel Cl^--ionen naar binnen waren gediffundeerd. We hebben aangenomen dat deze Cl^- zich als "vrije" ionen in de "binnenoplossing" bevonden. Verder hebben we verondersteld dat de verdeling van inwisselende kationen en uitgewisselde H^+ over de vrije Cl^--ionen in "binnen"- en "buitenoplossing" gelijk was. Zo berekenden wij de hoeveelheid "vrije" ionen van beiderlei soort in de "binnenoplossing". Het deficit met wat vanuit de "buitenoplossing" in totaal naar binnen was gediffundeerd leverde de hoeveelheid "geadsorbeerd", ingewisseld ion. Dit werd in mindering gebracht op de in totaal oorspronkelijk aanwezige H^+, waardoor een waarde voor resterende "geadsorbeerde" H^+ werd verkregen. Hiermee waren dus de vier noodzakelijke gegevens (na ze, voorzover nodig, nog te hebben uitgedrukt in de juiste dimensies) beschikbaar voor het berekenen van de uitwisselingsconstante k_G volgens Gapon of een verwante vergelijking of van de selectiviteitsconstante k_s (zie pg. 122 e.v.).

Wij zullen de resultaten van deze berekeningen hier niet in extenso weergeven. In de eerste plaats bleek achteraf de nauwkeurigheid van enkele analyses te wensen over te laten. (Een nadeel van deze "progressivebatch"-methode is dat in het begin gemaakte fouten ook bij alle volgende berekeningen meespelen). Een complicatie vormde verder dat de "buitenoplossing" zich ook na zeer langdurige dialyse toch nog steeds weer bruin kleurt door organische zuren (wellicht treedt er enige afbraak op). De hoeveelheid huminezuren in de dialyseslang is dus niet geheel constant en bovendien zijn de kationen

in de buitenoplossing misschien voor een deel aan deze naar buiten gediffundeerde organische zuren gebonden. In de derde plaats veranderde tijdens deze omwisseling in veel gevallen de dispersietoestand van de huminezuren doordat ze gingen uitvlokken. Dit kan ook invloed hebben op de ionenverdeling.

Globaal genomen daalde k_G bij huminezuren uit grond van minder dan 0,01 tot nagenoeg nul tijdens een stijging van het bezettingspercentage met eenwaardige kationen tot ca. 10 % (veel meer werd bij 8 maal "verversen" van de "buitenoplossing" niet bereikt). Bij inwisseling van H^+- tegen Ca^{++}- of Mg^{++}-ionen was k_G ongeveer 10 maal zo groot, maar toonde een bijna even steil verloop met het bezettingspercentage dat hier opliep tot ca. 25 %. Deze waarden komen wat grootte-orde betreft goed overeen met die vermeld door JUNGK (1964) voor turfstrooisel.

Er kan dan ook geen enkele twijfel bestaan aan de conclusie dat k_G niet constant is. Deze conclusie is echter, nadat bij de potentiometrische titraties in 6.3.1. de aparte positie van het H^+-ion reeds duidelijk naar voren kwam, geen nieuws. De H^+-ionen zijn voor een groot deel zo sterk gebonden dat ze niet door alkali- of aardalkaliionen kunnen worden vervangen via "wassen" met oplossingen van chloriden hiervan. (Het beeld van een diffuse dubbellaag waarin de ionen atmosferisch zijn gedistribueerd, gaat dan ook voor een groot deel der H^+-ionen ten enenmale niet op).

Dit feit kwam zeer duidelijk naar voren toen aan het eind van de boven beschreven uitwisselingsproef de concentratie van de "buitenoplossing" werd verhoogd tot 1 N. In vele gevallen konden de huminezuren daarna uit de dialyseslang worden gehaald en door oproeren en weer centrifugeren verder "gewassen" met een 1 N zoutoplossing. (Bij deze hoge zoutconcentratie trad n.l. geen pepsitatie meer op). Zelfs na ca. 10 maal dialyse tegen een 1 N KCl- of NH_4Cl-zoutoplossing en 10 - 15 maal "nawassen" met deze zoutoplossingen was nog niet meer dan ongeveer 1/3 van de aanwezige H^+-ionen uitgewisseld. Ook bij een 1 N $CaCl_2$- of $MgCl_2$-oplossing werd op deze wijze nog niet de helft der H^+-ionen vervangen. De pH van de evenwichtsoplossing is dan ca. 4,2 (de pH van de betreffende zoutoplossingen was 5 à 6). M.a.w. alleen de H^+-ionen van de sterker zure groepen worden uitgewisseld tegen alkali- of aardalkali-ionen.

Om nu een vergelijking te krijgen tussen K^+, NH_4^+, Ca^{++}, Mg^{++} onderling, gingen wij de verkregen "zure" humaten (huminezuren waarin H^+ voor een deel is vervangen door één der genoemde kationen) zuiveren van vrij electrolyt. Daarna werden b.v. de NH_4-H-humaten of de K-H-humaten, in dialyseslang, gehangen in een 0,01 N $CaCl_2$- of $MgCl_2$-oplossing. De "buitenoplossing" werd na evenwichtsinstelling weer geanalyseerd en vervangen door een verse 0,01 N oplossing van hetzelfde zout etc.

Dezelfde foutenbronnen als genoemd bij de eerste reeks uitwisselingsproeven treden ook hier op. Er komt zelfs nog een foutenbron bij. De aardalkali-ionen kunnen nl. meer H^+ verdringen dan de alkali-ionen. Bij uitwisseling van K^+ in K-H-humaten tegen Ca^{++} wordt daardoor ook nog een geringe hoeveelheid H^+ uitgewisseld. Vanwege deze onzekerheid zullen wij ook hier geen gedetailleerde resultaten vermelden.

Gemiddeld bedroeg de uitwisselings-"constante" k_G bij uitwisseling van K^+ of NH_4^+ tegen Ca^{++} bij een bezettingspercentage van 40 % een waarde van 3. (Onder bezettingspercentage hier te verstaan $\left[\frac{\text{m.e. Ca} \times 100}{\text{m.e. Ca + m.e. K of } NH_4}\right]$ geadsorbeerd; de nog aanwezige H^+ is hier dus buiten beschouwing gelaten). Deze waarde voor k_G liep bij een stijging van het bezettingspercentage tot 90 % op tot het 5 à 10-voudige! Alhoewel ten aanzien van deze cijfers een duidelijk voorbehoud moet worden gemaakt is de gevonden variatie van k_G met de "ionenbezetting" toch wel zo groot dat wij geneigd zijn, ook waar het hier de sterker zure groepen van huminezuren betreft, een zekere specifieke interactie met de aardalkali-ionen aan te nemen, die niet te verwaarlozen is ten opzichte van de zuiver electrostatische interactie. In elk geval bleek (ten overvloede) dat de aardalkali-ionen selectief worden "geadsorbeerd" uit een oplossing waarin deze ionen naast die van de alkalimetalen of NH_4^+ aanwezig zijn. Het is gewenst dat deze proeven (in een wat gewijzigde opzet) nog eens zorgvuldig worden herhaald.

SAMENVATTING

1. INLEIDING EN DOEL VAN HET ONDERZOEK

Huminezuren vormen een hoofdbestanddeel van de organische stof in de grond. Het is bekend dat deze stoffen amorfe, hogermoleculaire, organische zuren zijn, ontstaan bij de vertering van allerlei plantaardig en dierlijk materiaal, vermoedelijk door heteropolycondensatie van fenolische en chinoide producten. Hun zuur-karakter ontlenen de huminezuren aan tenminste twee typen zuurgroepen n.l. carboxylgroepen en fenolische hydroxylgroepen.

Het doel van het onderzoek was na te gaan of de zuurgroepen konden worden onderscheiden en kwantitatief bepaald door electrometrische titratie. Gehoopt werd hierbij tevens bruikbare gegevens te verkrijgen over de dissociatieconstanten van de huminezuren, zodat een poging kon worden gedaan de stabiliteits- of vormingsconstanten van metaal-huminezuurverbindingen te berekenen. In elk geval zou worden getracht, althans kwalitatief, meer inzicht te krijgen in de wijze waarop de kationenbinding bij huminezuren tot stand komt en in de volgorde van bindingssterkte.

2. ISOLERING EN ZUIVERING VAN HUMINEZUREN UIT GROND

Bij oriënterende proeven met diverse extractiemiddelen bleek dat een verdunde (0,1 N) oplossing van NaOH in water in het algemeen de grootste opbrengst aan huminezuren gaf. De volgorde van efficiëntie van de extractiemiddelen was echter niet bij alle gronden gelijk. Tevens kwamen specifieke verschillen tot uiting in een verschillend C/N-quotient en asgehalte der geëxtraheerde huminezuren (tabel 1). Bij kalkrijke gronden bleek een voorbehandeling van de grond met verdund zoutzuur wenselijk.

Uiteindelijk werd gekozen voor een oplossing van 0,1 Mol NaOH + 0,2 Mol NaF per liter water, waarmee uit elf verschillende grondtypen en een veenproduct (tabel 2) huminezuren werden geëxtraheerd. (Hierbij bleek geen oxydatie door luchtzuurstof op te treden). Zuivering geschiedde door het extract herhaalde malen door een Sharpless supercentrifuge te leiden, de huminezuren neer te slaan met zoutzuur, weer op te lossen in een 0,1 M. natriumpyrofosfaatoplossing, opnieuw te centrifugeren, weer neer te slaan met zoutzuur en tenslotte, gesuspendeerd in water, te percoleren over een kolom Amberlite IRA

400 (OH^-) resp. IR 120 (H^+).

Slechts bij enkele huminezuren kon een scheiding in "Braun" en "Grau" worden verkregen. De waarde van deze scheiding wordt in twijfel getrokken.

Van de verkregen huminezuren werden de samenstellende elementen C, H en N bepaald (tabel 3). Tussen het C/N-quotient van de grond en dat van de hieruit geïsoleerde huminezuren bleek een vrij goed verband te bestaan.

3. SYNTHETISCHE HUMINEZUREN UIT POLYHYDROXIBENZENEN

Als goede modelstoffen van huminezuren uit grond worden beschouwd de producten die men verkrijgt bij oxidatie van hydrochinon, pyrocatechol en pyrogallol in alkalische oplossingen bijv. met zuurstof. Een samenvatting is gegeven van hetgeen bekend is over het mechanisme van deze oxidatie, zowel in afwezigheid van stikstofverbindingen als in ammoniakale oplossingen.

De bereiding van een negental van deze "synthetische huminezuren" wordt beschreven en hun samenstelling wordt vermeld (tabel 4).

4. BESPREKING VAN DE LITERATUUR OVER DE ANALYSE VAN ZUURGROEPEN IN HUMINEZUREN

Achtereenvolgens worden de organisch- en de anorganisch-chemische groepenanalyses, zoals deze zijn toegepast bij huminezuren, besproken. Tegen de organische methoden worden als hoofdbezwaren aangevoerd de bewerkelijkheid en de veelal slechte reproduceerbaarheid, die voor een deel inhaerent zijn aan de methoden zelf, maar voor een belangrijk deel ook worden veroorzaakt door de aard van het te onderzoeken materiaal i. c. de huminezuren (nevenreacties, onvolledige reactie door (te) beperkte zwelling, e. d.).

Voor het bepalen van het totaal der zuurgroepen bij huminezuren bestaan geschikte titratiemethoden. De bepaling van de sterker zure groepen geschiedt gewoonlijk door de H^+-ionen van deze groepen uit te wisselen tegen andere kationen en de vrijgekomen H^+ op een of andere wijze te bepalen. Uitvoerig wordt uiteengezet dat al déze methoden arbitraire uitkomsten leveren als over de dissociatieconstanten van de bij het uitwisselingsevenwicht betrokken zuren en de affiniteit van deze zuren voor de aanwezige kationen niets bekend is.

5. ELECTROMETRISCHE ANALYSE VAN DE ZUURGROEPEN BIJ HUMINEZUREN

a. Titraties van huminezuren opgelost in water

De curven verkregen bij potentiometrische titratie van 100 mg huminezuren in 60 ml water, met alkalihydroxide, bevestigen dat de huminezuren tenminste twee typen zuurgroepen met een verschillend pK-gebied hebben, het eerste (bij deze concentratie) uiteenlopend van ca. 3,5 - 5 , het tweede van ca. 6 tot 9. Bij titraties met bariumhydroxide konden de beide pK-gebieden niet meer worden onderscheiden.

Alle zuurgroepen zijn bij opgeloste huminezuren gemakkelijk toegankelijk zoals bleek uit titraties met organische basen met zeer grote kationen.

Onder dezelfde omstandigheden werden conductometrische titraties uitgevoerd van huminezuren met alkalihydroxide, met bariumhydroxide, met ammonia, met verschillende organische zwakke basen, met lithiumhydroxide in aanwezigheid van een overmaat van diverse zwakke basen en van natriumhumaten met zoutzuur. Het is niet gelukt langs deze weg verschillende typen zuurgroepen met zekerheid te onderscheiden en afzonderlijk te bepalen.

De som der zuurgroepen bleek het beste te kunnen worden bepaald met bariumhydroxide. Bij titratie met alkalihydroxide worden te lage waarden verkregen, hetgeen aan hydrolyse van het alkalihumaat wordt toegeschreven.

Ter vergelijking werden zowel potentiometrisch als conductometrisch tevens titraties uitgevoerd van salicylzuur, protocatechuzuur en galluszuur. Voor de OH-groep van salicylzuur, resp. de tweede en de tweede en derde OH-groep van de beide andere zuren werd geen equivalentiepunt in de curven gevonden.

b. Titraties in organische oplosmiddelen

Na een theoretische uiteenzetting van de perspectieven die het gebruik van organische oplosmiddelen voor de differentiërende titratie van huminezuren biedt, werden de resultaten besproken van potentiometrische titraties in dergelijke oplosmiddelen met tetrabutylammonium-hydroxide. Van een verbetering ten opzichte van de potentiometrische titraties in water bleek niet te kunnen worden gesproken.

Salicylzuur en galluszuur blijken zich ook onder deze omstandigheden als één- resp. tweebasische zuren te gedragen.

Soortgelijke titraties werden conductometrisch uitgevoerd. Bij toepassing van natrium-isopropanolaat als base konden in dimethylformamide curven worden verkregen die eerst een (onscherp) maximum en daarna een (nog onscherper) minimum vertoonden. Het maximum werd geïnterpreteerd als het equivalentiepunt voor de sterker zure (COOH-) groepen, het minimum als het "punt" waar de in dit milieu zwak "zuur" reagerende (fenolische OH-) groepen zijn getitreerd.

Een belangrijke verbetering ten opzichte van de bij conductometrische titraties gevonden curven werd verkregen door de titraties uit te voeren met behulp van een hoge-frequentie-oscillator. Salicylzuur gedroeg zich nu als een tweebasisch en galluszuur als een driebasisch zuur. Bij andere "modelstoffen" traden complicaties op door neerslagvorming. Alhoewel de huminezuren duidelijk een polydibasisch karakter vertoonden, bleek echter helaas ook hier nog niet van een absoluut betrouwbare en nauwkeurige, differentiërende titratiemethode voor huminezuren te kunnen worden gesproken.

In de "slotbeschouwing" van dit hoofdstuk werd gedemonstreerd dat de "calcium-acetaatmethode" (veel toegepast voor de bepaling van de COOH-groepen) veel te hoge resultaten geeft. Decarboxylering leverde waarden die veel beter overeenkomen met die, afgeleid van de curven verkregen bij potentiometrische titratie in water of H.F.-titratie in dimethyl-formamide (tabel 5).

Een overzicht van de bij verschillende titraties verkregen gegevens geeft tabel 6. Het equivalentgewicht van de huminezuren uit Nederlandse gronden bleek te variëren van ca. 150 - 250 met een gemiddelde van 172 (een maximale "uitwisselingscapaciteit" van ca. 400 - 700 m.e. per 100 gram met een gemiddelde van 580). Voor de gemiddelde verhouding tussen sterker zure (COOH-)groepen en zwakker zure (fenolische OH-)groepen werd 1 : 4 gevonden. De synthetische huminezuren wijken hierin niet van betekenis af van die uit grond. Meer dan de helft van de zuurstof in huminezuren is anders dan in deze zuurgroepen aanwezig.

6. DE BINDING VAN KATIONEN DOOR HUMINEZUREN

Geconstateerd werd dat de verrichte titraties niet voldoende

exacte gegevens over de dissociatieconstanten der huminezuren hadden geleverd om vormingsconstanten van metaalhumaten te kunnen berekenen. Kwalitatief kon echter het inzicht in de wijze waarop en de sterkte waarmee deze metaalionen worden gebonden, belangrijk worden verruimd. Dit geschiedde door potentiometrische titraties van huminezuren in water, met KOH, in aanwezigheid van diverse metaalzouten:

De huminezuren bleken niet meer metaalionen te kunnen binden dan overeenkomt met het aantal titreerbare H^+-ionen, gedeeld door de valentie van het betreffende metaalion. Op grond van verschillende aanwijzingen wordt geconcludeerd dat metaalhumaten moeten worden gerangschikt onder de veelkernige chelaten en dat de metaal-humaatbinding vrijwel alleen zo niet uitsluitend via negatief geladen liganden der huminezuren plaatsvindt.

Afgaande op de grootte van de pH-daling bij toevoeging van anorganische zouten (tabel 7; figuur 30) is bij een pH van ongeveer 5 het verschil in affiniteit van de huminezuren voor de divalente ionen van Ba, Ca, Mg, Mn, Co, Ni, Fe en Zn niet groot (in deze volgorde zwak toenemend), maar worden Pb(II)-, Cu(II)- en Fe(III)-ionen (in deze volgorde) in sterkere mate gebonden. (Het Al-ion schijnt bij deze pH reeds kwantitatief aan hydroxidevorming onderhevig te zijn).

Bij hogere pH ontstaan, naar is aan te nemen, bij humaten van metalen uit de eerste overgangsreeks, hydroxo-complexen doordat H^+-ionen worden afgesplitst van covalent aan het metaalion gebonden watermoleculen. Deze metaalionen zijn in de volgorde Mn, Co, Ni, Cu in toenemende mate moeilijker te verdringen door alkali- of aardalkaliionen (Een deel van de Cu(II)-ionen bijv. kunnen op deze wijze zelfs in het geheel niet worden verdrongen).

Wat betreft wijze en sterkte van kationenbinding bleken er tussen de huminezuren uit grond onderling, geen verschillen van enige betekenis te bestaan, ondanks uiteenlopend stikstofgehalte en "COOH/OH"-verhouding (tabel 9). Hetzelfde geldt voor de synthetische huminezuren. Tussen beide groepen van huminezuren bestaan echter wel verschillen, vermoedelijk samenhangend met een verschil in pK der sterk zure groepen.

De binding tussen huminezuren en ionen van de overgangsmetalen zal ongetwijfeld een deels covalent karakter hebben. Uit oriënterende onderzoekingen van de ionenuitwisselingsevenwichten, waarbij de huminezuren door een semipermeabel membraan van een

verdunde oplossing van alkali- of aardalkalichloriden waren gescheiden, werd de indruk verkregen dat ook de interactie tussen aardalkali-ionen en huminezuren niet zuiver electrostatisch is.

SUMMARY

1. INTRODUCTION AND AIM OF THE INVESTIGATION

Humic acids constitute one of the main fractions of soil organic matter. As known, they are amorphous, highermolecular, organic acids, formed during the decomposition of plant- and animal-fragments, presumably by heteropolycondensation of phenolic and quinonoid products. They owe their acid character to at least two types of acid groups, viz. carboxyl- and phenolic hydroxylgroups.

The investigation was focused partly on the differentiation and determination of acid groups by electrometric titration. It was hoped that in this way data of sufficient accuracy could be derived concerning the dissociation constants of the humic acids, in order that a calculation of stability- or formationconstants of metal humates could be attempted. Anyhow it was intended to gain more insight into the nature of the bond between cations and humic acids and in their order of stability.

2. ISOLATION AND PURIFICATION OF THE SOIL HUMIC ACIDS

From orientating experiments with different extractants it appeared, that a diluted (0,1 N) sodiumhydroxide solution in water generally gave the highest yield of humic acids. The order of efficiency of the different extractants, however, was not the same for all soils. Furthermore, they appeared to differ specifically as shown by varying C/N-ratio and ash-content of the humic acids extracted (table 1). In case of calcareous soils, a pretreatment with a diluted hydrochloric acid solution was profitable.

Ultimately, as an extractant a solution was chosen, containing 0,1 Mol NaOH and 0,2 Mol NaF per liter of water (which appeared not to induce oxydation by air oxygen). Humic acids were extracted from eleven soiltypes and one peatproduct (tabel 2). The acids were purified by repeated centrifuging in a Sharpless super-centrifuge, precipitating with hydrochloric acid, redissolving in a 0,1 M. solution of sodium-pyrophosphate, again centrifuging, reprecipitating with HCl and, at last, suspending in water and percolating over a column of Amberlite IRA 400 (OH^-) and one of IR 120 (H^+) respectively.

Only for some humic acids a fractionation in socalled "brown" and "grey" humic acids could be achieved. The merits of this fractionation

were questioned.

The elementary composition of the humic acids obtained, is given in table 3. There appeared to exist a rather good relation between the C/N-ratio of the soils and of the humic acids isolated from these soils.

3. SYNTHETIC HUMIC ACIDS FROM POLYHYDROXIBENZENES

The products obtained on oxidation of hydroquinone, pyrocatechol and pyrogallol in alkaline solutions with gaseous oxygen are considered to be good model substances of humic acids from soils. A summary is given of what is known about the mechanism of this oxidation, in absence of nitrogencompounds as well as in ammoniacal solutions.

The preparation of nine "synthetic humic acids" and their composition (table 4) is described.

4. DISCUSSION OF THE LITERATURE ON ACID GROUP ANALYSIS OF HUMIC ACIDS

Organic and inorganic chemical groupanalyses, as applied for humic acids, are successively discussed. The main objections against these methods are their tediousness and their rather bad reproducibility, partly inherent to these methods as such, but for an important part caused by the nature of the humic acids (sidereactions, incomplete reaction caused by restricted swelling, a.o.).

For the determination of the sum of the acid groups in humic acids there are suitable titration methods described in literature. The determination of the stronger acid groups is usually performed by exchanging the hydrogen ions of these groups against other cations and determining the exchanged H^+ in some way. It is amply discussed that all these methods give arbitrary results if nothing is known about the dissociation constants of the acids involved in the exchange equilibrium, and about the affinity of these acids for the cations present.

5. ELECTROMETRIC ANALYSIS OF THE ACID GROUPS IN HUMIC ACIDS

a. Titrations of humic acids in aqueous medium

The curves obtained with potentiometric titration of 100 mg

of humic acids in 60 ml of water, with alkalihydroxyde, prove that the humic acids contain at least two types of acid groups. These types show different ranges of pK-values here, the first from about 3,5 to 5 and the second from about 6 to 9. When titrated with bariumhydroxide, the separate ranges are not visible anymore.

All the acid groups are easily accessible as was shown by titrations with organic bases with very large cations.

Under the same conditions, conductometric titrations of humic acids were carried out with alkalihydroxide, with bariumhydroxide, with ammonia, with different organic weak bases, with lithiumhydroxide in presence of an excess of different weak bases and of sodiumhumates with hydrochloric acid. We did not succeed to differentiate types of acid groups in one of these ways with certainty.

The sum of acid groups could best be determined with bariumhydroxide. Titration with alkalihydroxide gives too low values, which is described to hydrolysis of the alkalihumates.

For a comparison both potentiometric and conductometric titrations were performed of salicylic acid, protocatechuic acid and gallic acid. For the hydroxylgroup of salicylic acid, for the second and for the second and third OH-group of both other acids respectively, no equivalence points in the curves were found.

b. Titrations in organic solvents

A theoretical discussion of the perspectives, which the use of organic solvents might offer for a differentiating titration of humic acids, is given. Then the results of potentiometric titrations in such solvents with tetrabutylammoniumhydroxide are discussed. It appeared, however, that no improvement as compared with the potentiometric titration in water had been achieved. Here again, salicylic acid and gallic acid behaved as mono- and dibasic acids respectively.

Similar titrations were carried out conductometrically. With application of sodium-isopropylate as a titrant and dimethylformamide as a solvent, titration curves were obtained showing first a maximum and then a (rather flat) minimum. The maximum was interpretated as the equivalence point for the stronger acid (carboxyl-) groups, the minimum as the "point" where the very weak acid groups (presumably phenolic hydroxylgroups) are titrated.

An important improvement, as compared with the

conductometrically derived curves, was obtained by performing the titrations with the aid of a high frequency oscillator. Here salicylic acid showed a dibasic and gallic acid a tribasic character. With other "modelsubstances", complications were caused by precipitate formation. Although the humic acids clearly showed a poly-dibasic character, it appeared that it is not yet allowed to call this H.F.-titration an absolutely reliable and accurate method for the differentiating titration of humic acids.

In the last paragraph of chapter 5 it was shown that the "calcium-acetate method", as often applied for the determination of carboxylgroups in humic acids, gives values which are much too high. The decarboxylation (on heating in quinoline with copper-hydroxi-carbonate as a catalyst) gave values which agreed much better with those, derived from the curves obtained with potentiometric titration in water or H.F.-titration in dimethylformamide (table 5).

Table 6 gives a survey of data, obtained with different titrations. The equivalent weight of humic acids from Dutch soils varies from about 150 to 250 with an average of 172 (the maximum "exchange capacity" varies from about 400 to 700 m.e. per 100 gram with a mean value of 580). As an average for the ratio of stronger acid (carboxyl-) groups and weak acid (phenolic OH-) groups a value of 1 : 4 was found. In this respect the synthetic humic acids showed no important deviations from those from the soil. More than half of the oxygen in humic acids could not be accounted for in these acid groups.

6. THE BINDING OF CATIONS BY HUMIC ACIDS

It was concluded that so far the titrations had failed to give sufficiently accurate data on the dissociation constants to allow the calculation of formation constants of the metalhumates. Qualitatively, however, considerable more insight could be gained into the nature and the strength of the bond between metal ions and humic acids by potentiometric titration in aqueous solution with KOH, in presence of various metal ions:

It appeared that no more metal ions can be bound than correspond with the number of titratable hydrogen ions, divided by the valency of the metal ion in question. On account of different indications, it is concluded that metalhumates are to be classified as polynuclear chelates and that the metal ions are exclusively, or at

least nearly so, bound to negatively charged ligands of the humic acids.

Relying on the magnitude of the pH-drop on addition of inorganic salts (table 7; figure 30), at a pH of about 5 there is not much difference in affinity between the divalent ions of Ba, Ca, Mg, Mn, Co, Ni, Fe and Zn and humic acids (the affinity in this order slightly increasing). The Pb(II)-, Cu(II)- and Fe(III)-ions, however, seem, in this order, to be bound increasingly stronger. (At this pH the Al-ion seems already quantitatively subjected to hydroxideforming).

It is assumed that at a higher pH, the humates of metals of the first transition series, change into hydroxo-complexes, protons being removed from watermolecules covalently bound to the metal ions. In the order of Mn, Co, Ni, Cu it is increasingly difficult to exchange these metal ions for those of the alkali or alkaline earth metals (part of the Cu(II)-ions, for example, cannot be exchanged at all in this way!)

Concerning nature and strength of the cationbinding there appeared to be no significant mutual differences between the soil humic acids, notwithstanding a varying nitrogencontent and "COOH/OH"-ratio (table 9). The same applies to the synthetic humic acids. Between both groups of humic acids, however, differences exist, presumably connected with a difference in pK of the stronger acid groups.

The bonds between humic acids and ions of the transition metals will undoubtedly be of partly covalent character. Orientating investigations of the ionexchange equilibria, in which the humic acids were separated from a diluted solution of alkali or alkaline earth chlorides by a semipermeable membrane, indicated that the interaction between alkaline earth ions and humic acids is also not purely electrostatic.

LITERATUUR

ACHARD, F.K.	1786	Crell's Chem.Ann. 2, 391.
ALLEN, J. and E.T. GEDDES	1957	J.Pharm. and Pharmacol. 9, 990.
AUERBACH, F. und E. SMOLCZYK	1924	Z.physik. Chem. 110, 65.
BECKETT, A.H. and E.H. TINLEY	1955	"Titration in non-aqueous solvents", 3. Ed., B.D.H.
BECKWITH, R.S.	1955	Austr.J.Agr.Res. 6, 685. Zie ook Nature 184 (1959) 745.
BERL, W.G.	1951a	Physical Methods in Chemical Analysis II, pg. 52-102 (A.P., New York).
BERL, W.G.	1951b	ibid. III, pg. 107 - 135.
BEUTELSPACHER, H.	1952	Z.Pflanzenernähr.Düng.Bodenk. 57, 57.
BEYER, M.	1944	Diss. E.T.H., Zürich.
BLOIS, S.	1955	J.Chem.Phys. 23, 1351.
BLOM, L.	1960	Diss. Delft.
BLOM, L., L. EDELHAUSEN and D.W. VAN KREVELEN	1957	Fuel 36, 135.
BOLT, G.H.	1955	Soil Sci. 79, 267.
BROADBENT, F.E.	1957	Soil Sci. 84, 127.
BROADBENT, F.E. and G.R. BRADFORD	1952	Soil Sci. 74, 447.
BROADBENT, F.E. and J.B. OTT	1957	Soil Sci. 83, 419.
BROCKMANN, H. und E. MEYER	1953	Chem.Ber. 86, 1514.
BROOKS, J.D. and T.P. MAHER	1954	Research, London 7, 530.
BROWN, L.F. and A.R. COLLET	1938	Fuel 17, 359.
BRUSS, D.B. and G.A. HARLOW	1958	Anal.Chem. 30, 1836.
BUTLER, J.P. and T.P. CZEPIEL	1956	Anal.Chem. 28, 1468.
CHABAREK, S. and A.E. MARTELL	1959	Sequestering agents. John Wiley, New York.
COLEMAN, N.T., A.C. McCLUNG and D.P. MOORE	1955	Science 123, 330.
COMPERNOLLE, G. VAN, J.J. FRIPIAT et J. COUVREUR	1957	Pédology 7, 28.

CRUSE, K. und R. HUBER	1957	"Die Hochfrequenztitration". Verlag Chemie, Weinheim.
CUNDIFF, R.H. and P.C. MARKUNAS	1956	Anal. Chem. 28, 792.
DAWSON, J.E., R.E. DANIELSON and D.M. CAMERON	1950	Soil Sci.Soc.Am.Proc. 14, 292.
DEAN, J.A. and C. CAIN	1955	Anal.Chem. 27, 212.
DELAHAY, P.	1954	"New Instrumental Methods in Electrochemistry", hoofdstuk 15. Intersci. Publ. New York.
DEMUMBRUM, L.F. and M.L. JACKSON	1956	Soil Sci.Soc.Am.Proc. 20, 334.
DEUEL, H. und K. HUTSCHNEKER	1954	"Kalium Symposium", 41.
DIEBLER, H., M. EIGEN und P.MATTHIES	1961	Z.Naturforsch. 16b, 629.
DIMROTH, O. und Th. FAUST	1921	Chem.Ber. 54, 3020.
DINGEMANS, P.	1928	Diss. Leiden.
DRAGUNOV, S.S.	1950	Pochvovedenye no. 3.
DROZDOVA, T.V. en M.P. JEMELJANOVA	1960	Dokl.Akad.Nauk SSSR 131, 651.
DUBACH, P.	1958	Diss. E.T.H., Zürich.
DUIN, P.J. VAN	1957	Diss. Leiden.
DIJK, H. VAN	1959	Z.Pflanzenernähr.Düng.Bodenk. 84, 150.
DIJK, H. VAN	1960	Sci.Proc.Roy. Dublin Soc.A 1, 163.
DIJK, H. VAN and H.E. TER HAAR	1961	Rec.Trav.Chim. 80, 1207.
EIGEN, M. und P. MATTHIES	1961	Chem.Ber. 94, 3309.
ELLER, W.	1921	Brennstoff-Chem. 2, 129.
ELLER, W.	1923	Ann.Chem. 431, 133.
ELLER, W.	1925	ibid. 442, 160.
ERDTMANN, H.G.	1934	Proc.Roy.Soc. London A 143, 177.
ERDTMANN, H.G. and M. GRANATH	1954	Acta Chem.Scand. 8, 811.
ERIKSSON, E.	1952	Soil Sci. 74, 103.
FIESER AND FIESER	1956	Organic Chemistry, 3e druk. Reinhold New York, p. 446.
FLAIG, W.	1950	Z.Pflanzenernähr.Düng.Bodenk. 51, 193.
FLAIG, W. und H. BEUTELSPACHER	1951	Z.Pflanzenernähr.Düng.Bodenk. 52, 1.

FLAIG, W. und H. BEUTELSPACHER	1954	Landbouwk. Tijdschr. 66, 306.
FLAIG, W., Th. PLOETZ und H. BIERGANS	1955	Ann. Chem. 597, 196.
FLAIG, W. and J. Chr. SALFELD	1960	Trans. Intern. Congr. Soil Sci. 7th, II, 648.
FLAIG, W., J. Chr. SALFELD und K. HAIDER	1963	Landwirtsch. Forsch. 16, 85.
FLAIG, W., F. SCHEFFER und B. KLAMROTH	1955	Z. Pflanzenernähr. Düng. Bodenk. 71, 33.
FLAIG, W. und H. SCHULTZE	1952	Z. Pflanzenernähr. Düng. Bodenk. 58, 59.
FORSYTH, W.G.C.	1947	J. Agr. Sci. 37, 132.
FORSYTH, W.G.C. and V.C. QUESNEL	1957	Biochim. Biophys. Acta 25, 155.
FRANCIS, W. and R.V. WHEELER	1925	J. Chem. Soc., 2236.
FRANSWA, C.E.M.	1963	Chem. Weekblad 59, 249.
FRIEDMAN, S., W.A. STEINER, R. RAYMOND and J. WENDER	1958	Paper presented for the Gas and Fuel Division, Am. Chem. Soc. May 1958 (ref. Blom).
FUCHS, W.	1927	Brennstof-Chem. 8, 337.
FUCHS, W.	1928	ibid. 9, 198.
FUCHS, W.	1954	Chem. Tech. 6, 378
FUCHS, W. und A.G. SANDHOFF	1940	Fuel 19, 45.
FUCHS, W. und W. STENGEL	1929	Brennstoff-Chem. 10, 303.
GAPON; ref: MAGISTAD, A.C., M. FIREMAN and B. MABY	1944	Soil Sci. 57, 371.
GARTEN, V.A., D.E. WEISS and J.B. WILLIS	1957	Austr. J. Chem. 10, 295.
GASLINI, F. and L.Z. NAHUM	1959	Anal. Chem. 31, 989.
GILLAM, W.S.	1940	Soil Sci. 49, 433.
GREGOR, H.P., L.B. LUTTINGER and E.M. LOEBL	1955	J. Phys. Chem. 59, 34, 366, 559.
GRUNWALD, E.	1954	Anal. Chem. 26, 1696.

HAAK, W.F., C.G. HOSTE, F.JELLINEK en J.A.C. VAERNE-WIJCK	1963	Chem.Weekblad 59, 149.
HALLE, R.	1935	Brennstoff-Chem. 16, 361.
HALLEUX, A., S. DELAVARENNE and H.TSCHAMLER	1959	Fuel 38, 283.
HARLOW, G.A.	1962a	Anal.Chem. 34, 1482.
HARLOW, G.A.	1962b	ibid. 1487.
HARLOW, G.A., C.M. NOBLE and G.E.A. WYLD	1956	Anal.Chem. 28, 784, 787.
HEATHCOAT, F. and R.V. WHEELER	1932	J.Chem.Soc. 2839.
HEIMANN, H.	1929	Brennstoff-Chem. 10, 301.
HEYDE, H.B. VAN DER	1957	Anal.Chim. Acta 17, 512.
HIMES, F.L. and S.A. BARBER	1957	Soil Sci.Soc.Am.Proc. 21, 368.
HOOGHOUDT, S.B., D.VAN DER WOERDT, J. BENNEMA en H. VAN DIJK	1960	Verslagen Landbouwk.Onderzoekingen. No. 66.23 p.66-68.
HOPPE-SEYLER, F.	1889	Z.physiol.Chem. 13, 66.
HORNER, L. und K. STURM	1957	Ann.Chem.608, 128.
HORTON, L.	1958	Paper presented at the 31th Intern.Congr. of Industr.Chem. Luik.(Ref.Blom (1960).
HUBACHER, M.H.	1949	Anal.Chem. 21, 945.
HUBER, W.	1964	"Titrationen in nichtwässrigen Lösungsmitteln". Akad.Verlag Ges., Frankfurt a.M.
HUTSCHNEKER, K.	1955	Diss. E.T.H., Zürich.
JAMES, T.H., J.M. SNELL and A. WEISSBERGER	1938	J.Am.Chem.Soc. 60, 98 en 2084.
JONES, A.G.	1959	"Analytical Chemistry. Some new Techniques". Butterworth, London.
JUNGK, A.	1964	Z.Pflanzenernähr.Düng.Bodenk. 104, 206.
KARRMANN, K.J. and G. JOHANSSON	1956	Mikrochim.Acta, 1573.
KATCHALSKY, A. and P. SPITNIK	1947	J.Polymer Sci. 2, 432.
KAWAGUCHI, K. and K. KYUMA	1959	Soil Plant Food (Tokyo) 5, 54.

KHANNA, S.S. and F.J. STEVENSON	1962	Soil Sci. 93, 298
KINNEY, C.R. and D.L. LOVE	1957	Anal. Chem. 29, 1641.
KOLTHOFF, I.M.	1920	Pharm. Weekblad 57, 53.
KOLTHOFF, I.M. and P.J. ELVING	1959	Treatise on analytical chemistry. Part I, Vol. I. Intersci. New York
KONONOVA, M.M.	1958	"Die Humusstoffe des Bodens". D.V.W. Berlin.
LAGERWERFF, J.V. and G.H. BOLT	1959	Soil Sci. 87, 217.
LA MER, V.K. and E. RIDEAL	1924	J. Am. Chem. Soc. 46, 223.
LEWIS, T.E. and F.E. BROADBENT	1961	Soil Sci. 91, 393.
LEYTE, J.C.	1961	Diss. Leiden
LIFSON, S.	1957	J. Chem. Phys. 26, 727.
LUCENA-CONDE, F. and A. GONZALEZ-CRESPO	1960	Trans. Intern. Congr. Soil Sci. 7th, II, 59.
MARSHALL, C.E. and N. PATNAIK	1953	Soil Sci. 75, 153.
MARTELL, A.E. and M. CALVIN	1953	"Chemistry of the chelate compounds". Prentice Hall, New York. 2e druk.
MARTIN, A.E. and R. REEVE	1958	J. Soil Sci. 9, 89.
MARTIN, F., P. DUBACH, N.C. MEHTA und H. DEUEL	1963	Z. Pflanzenernähr. Düng. Bodenk. 103, 27.
MATSUO, T. and H. MATSUO	1941	J. Sci. Soil Manure Japan 15, 595. (Ref. C.A. (1950) 1635d).
MATTSON, S. and E. KOUTLER-ANDERSSON	1942	Lantbruks Högskolans Ann. 10, 284.
MAZUMBAR, B.K., P.H. BHANGHALE and A. LAHIRI	1957	Fuel 36, 307.
McINNES, D.A.	1939	"The principles of electrochemistry". Reinhold, New York.
MEHTA, N.C., P. DUBACH und H. DEUEL	1963	Z. Pflanzenernähr. Düng. Bodenk. 102, 128.
MEURS, N. VAN	1958b	Chem. Weekblad 54, 298.
MEURS, N. VAN and E.A.M.F. DAHMEN	1958a	Anal. Chim. Acta 19, 64.
MEURS, N. VAN and E.A.M.F. DAHMEN	1959a	Anal. Chim. Acta 21, 10.

MEURS, N. VAN and E.A.M.F. DAHMEN	1959b	ibid. 443.
MEURS, N. VAN and E.A.M.F. DAHMEN	1959 /60	J. Electroanal. Chem., 1, 458.
MITRA, R.P. and S.K. CHATTERJEE	1963	Indian J. Chem. 1, 62.
MORTENSEN, J.L.	1963	Soil Sci. Soc. Am. Proc. 27, 179.
MUSSO, H., H.G. MATTHIES, H. BEECKEN und H. KRAMER	1957	Angew. Chem. 69, 178.
OVERBEEK, J.Th.G.	1956	Progress in Biophysics 6, 57.
PAUL, R.C., P.S. GURAYA and B.R. SREENATHAN	1963	Indian J. Chem. 1, 335.
PIRET, E.L., R.G. WHITE, H.C. WALTHER Jr. and A.J. MADDEN Jr.	1960	Sci. Proc. Roy. Dublin Soc. A 1, 69.
PUUSTJARVI, V.	1955	Acta Agr. Scand. 5, 257.
ROSSOTTI, F.J.C. and H. ROSSOTTI	1961	"The determination of stability constants". McGraw-Hill.
SALFELD, J.C.	1960	Chem. Ber. 93, 737.
SALFELD, J.C. und E. BAUME	1960	Chem. Ber. 93, 745.
SANDHOFF, H.	1954	Z. Pflanzenernähr. Düng. Bodenk. 67, 24.
SARKANEN, K. and C. SCHUERCH	1955	Anal. Chem. 27, 1245.
SAUERLANDT, W.	1948	Z. Pflanzenernähr. Düng. Bodenk. 41, 53.
SCHACHTSCHABEL, P.	1940	Kolloid-Beihefte 51, 199. Zie ook Landw. Jahrb. 91, (1941/42) 355.
SCHARPENSEEL, H.W.	1960	Z. Pflanzenernähr. Düng. Bodenk. 88, 97.
SCHEELE, W. und W. ROWE	1936	Kolloid-Z. 75, 73.
SCHEELE, W., W. SCHULZE und H. SPANDAU	1935	Kolloid-Z. 72, 305.
SCHEFFER, F. und W. KROLL	1960	Agrochimica 4, 97.
SCHEFFER, F., B. MEYER und E.A. NIEDERBUDDE	1959	Z. Pflanzenernähr. Düng. Bodenk. 87, 26.
SCHEFFER, F. und P. SCHACHTSCHABEL	1940	Bodenk. Pflanzenernähr. 21/22, 643.
SCHEFFER, F. und H. SCHLUTER	1959	Z. Pflanzenernähr. Düng. Bodenk. 84, 184.

SCHEFFER, F. und B. ULRICH	1960	"Lehrbuch der Agrikulturchemie und Bodenkunde III. Teil, Humus und Humusdüngung, Band I". F. Enke Verlag, Stuttgart.
SCHEFFER, F., B. ULRICH und P. HIESTERMANN	1957	Z. Pflanzenernähr. Düng. Bodenk. 78, 168.
SCHEFFER, F., W. ZIECHMANN und J. SCHMIDT	1958a	Z. Pflanzenernähr. Düng. Bodenk. 80, 126.
SCHEFFER, F., W. ZIECHMANN und H. SCHOLZ	1958b	Z. Pflanzenernähr. Düng. Bodenk. 80, 134.
SCHNITZER, M. and S. I. M. SKINNER	1963	Soil Sci. 96, 86.
SCHOBINGER, U.	1958	Diss. E.T.H., Zürich.
SCHULTZE, H. und W. FLAIG	1952	Ann. Chem. 575, 231.
SCHWARTZ, D. and L. ASFELD	1963	Nature 197, 569.
SIMS, D. and L. PETERS	1957	Nature 180, 805.
SPRINGER, U.	1938	Z. Pflanzenernähr. Düng. Bodenk. 6, 312.
STACH, H.	1933	Braunkohlenarchiv 40, 51.
STADNIKOFF, G.	1937	Kolloid-Z. 80, 60.
STADNIKOFF, G., K. SSYSKOW und A. USCHAKOWA	1935	Kolloid-Z. 71, 206.
STADNIKOFF, G. und KORSCHEW	1929	Kolloid-Z. 47, 136.
STEIN, H. N.	1957	Diss. Wageningen.
SWAIN, C.G. and J.F. BROWN	1952	J. Am. Chem. Soc. 74, 2691.
TÉZÉ, M. et R. SCHAAL	1962	Bull. Soc. Chim., 1372.
UBALDINI, I.	1937	Brennstoff-Chem. 18, 273.
TENDELOO, H. J. C. en G. A. NIERSTRASZ	1935	Landbouwk. Tijdschr. 47, 259.
TIMNICK, A., L. L. FLECK and E. R. HOOSER	1960	Chemistry in Canada 23.
TING, S. F., W. S. JEFFERY and E. L. GROVE	1960	Talanta 3, 240.
WALKER, W. E., J. P. HENRY and H. G. DAVIES	1958	Paper presented before the Division of Gas and Fuel Chem. of Am. Chem. Soc.

WIELAND, H. und F.G. FISCHER	1926	Chem. Ber. 59B, 1180.
WRIGHT, J.R. and M. SCHNITZER	1960	Trans. Intern. Congr. Soil Sci. 7th, II, 120.
WRIGHT, J.R. and M. SCHNITZER	1963	Soil Sci. Soc. Am. Proc. 27, 171.
YOHE, G.R. and E.O. BLODGETT	1947	J. Am. Chem. Soc. 69, 2644.
ZADMARD, H.	1939	Kolloid-Beihefte 49, 315, 337.
ZIECHMANN, W.	1959	Z. Pflanzenernähr. Düng. Bodenk. 84, 155.
ZIECHMANN, W.	1960a	Brennstoff-Chem. 41, 289.
ZIECHMANN, W.	1960b	ibid. 334.
ZIECHMANN, W.	1963	ibid. 44, 52.