



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE

INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

**SEKVENČNÍ FRAKCIONACE ORGANICKÉ HMOTY
HUMINOVÉ KYSELINY IZOLOVANÉ Z LEONARDITU**

SEQUENTIAL FRACTIONATION OF ORGANIC MATTER OF HUMIC ACID ISOLATED FROM LEONARDITE

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Tomáš Krist

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. Vojtěch Enev, Ph.D.

BRNO 2021

Zadání diplomové práce

Číslo práce: FCH-DIP1614/2020 Akademický rok: 2020/21
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie
Student: **Bc. Tomáš Krist**
Studijní program: Spotřební chemie
Studijní obor: Spotřební chemie
Vedoucí práce: **Ing. Vojtěch Enev, Ph.D.**

Název diplomové práce:

Sekvenční frakcionace organické hmoty huminové kyseliny izolované z Leonarditu

Zadání diplomové práce:

Vypracovat aktuální literární rešerši na téma nových možností frakcionace organické hmoty tvořící supramolekulární strukturu huminových látek.

Na základě vypracované rešerše navrhnout a realizovat metodu frakcionace organické hmoty s ohledem na její rychlost a nenáročnost na technické řešení.

Optimalizovat postup frakcionace organické hmoty a následně podrobit získané frakce fyzikálně–chemické charakterizaci.

Diskutovat získané experimentální výstupy, zhodnotit praktickou využitelnost navržené metody frakcionace.

Termín odevzdání diplomové práce: 28.5.2021:

Diplomová práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu. Toto zadání je součástí diplomové práce.

Bc. Tomáš Krist
student(ka)

Ing. Vojtěch Enev, Ph.D.
vedoucí práce

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 1.2.2021

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

ABSTRAKT

Cílem diplomové práce byla optimalizace sekvenční frakcionace organické hmoty, aby byla využitelná pro fyzikálně-chemickou charakterizaci extrahovaných frakcí. Jako zdrojová matrice organické hmoty byla využita huminová kyselina izolovaná z oxidovaného hnědého uhlí Leonarditu. Byla sestavena eluotropní řada a provedena sekvenční frakcionace pomocí extrakce na Soxhletově přístroji. Výchozí huminová kyselina a frakce byly charakterizovány pomocí elementární analýzy (EA) a termogravimetrické analýzy (TGA), dále pak za použití infračervené spektrometrie s Fourierovou transformací (FTIR), molekulové absorpční spektrometrie (UV/Vis), fluorescenční spektrometrie a v neposlední řadě i potenciometrickou titrací. Z výsledků elementární analýzy byly stanoveny atomové poměry. Z naměřených UV/VIS a fluorescenčních excitačních a emisních spekter byly vypočteny absorpční koeficienty, resp. fluorescenční koeficienty.

Využitá metoda frakcionace huminové kyseliny se prokázala být vhodnou metodou pro zkoumání struktury HK. Celkově se podařilo extrahovat 62 hm. % z navážky HK, výtěžky frakcí se pohybovaly v rozmezí 0,36–30,92 hm. %. Z výsledků strukturní analýzy je zřejmé, že se se zvyšující polaritou organického rozpouštědla nejprve izolovaly frakce s dlouhými alifatickými řetězci a postupně se zvyšovala jejich aromaticita. Nepochárny organická rozpouštědla byla vhodná pro extrakci sloučenin podobných struktuře lipidů, zatímco nejvíce polární organické frakce byly bohaté na polární skupiny a svými parametry byly blízké původní huminové kyselině. Frakce extrahovaná acetonitrilem byla nejodlišnější. Frakce obsahovala nejvíce dusíku a obsahovala větší množství amidových skupin, charakteristických pro strukturu podobnou proteinům. V posledních dvou frakcích, extrahovaných alkoholy, byl pozorován významný bathochromní posun typický pro fluofor typu V. Mimo jiné byly charakteristické také vyšším obsahem rostlinných sacharidových zbytků.

KLÍČOVÁ SLOVA

Sekvenční chemická frakcionace, huminová kyselina, Soxhletova extrakce, organická frakce, absorpční koeficienty, fluorescenční koeficienty, FTIR, aromaticita

ABSTRACT

The aim of the diploma thesis was to optimize the sequential fractionation method of organic matter to be used for physico-chemical characterization of extracted fractions. Humic acid isolated from oxidized brown coal of Leonardite was used as a source matrix of organic matter. An eluotropic series was assembled and sequential fractionation was performed by extraction on a Soxhlet apparatus. The original humic acid and fractions were characterized by elemental analysis (EA) and thermogravimetric analysis (TGA), followed by Fourier transform infrared spectrometry (FTIR), molecular absorption spectrometry (UV/VIS), fluorescence spectrometry and potentiometric titration. Atomic ratios were determined from the results of the elemental analysis. From the measured UV/Vis and fluorescence excitation and emission spectra, the absorption coefficients, resp. fluorescence coefficients.

Used fractionation method proved to be a suitable method for studying HA structure. A total of 62 wt. % of initial material was extracted, individual fraction amounted from 0.36–30.92 wt. %. From the results of the structural analysis, it is clear that with increasing polarity of the organic solvent, fractions with long aliphatic chains were first isolated and their aromaticity gradually increased. Non-polar organic solvents were suitable for the extraction of lipid-like compounds, while the most polar organic fractions were rich in polar groups and their structural parameters were close to the original humic acid. The fraction extracted with acetonitrile was the most unique fraction. This fraction was rich on nitrogen and amine groups and was similar to protein-like structures. In the last two fractions, extracted with alcohols, a significant bathochromic shift typical of fluorophore type V was observed. Among other things, they were also characterized by a higher content of plant carbohydrate residues.

KEYWORDS

Sequential chemical fractionation, humic acid, Soxhlet extraction, organic fraction, absorption coefficients, fluorescence coefficients, FTIR, aromaticity

KRIST, Tomáš. *Sekvenční frakcionace organické hmoty huminové kyseliny izolované z Leonarditu*. Brno, 2021. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav fyzikální a spotřební chemie. Vedoucí práce Vojtěch Enev.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že tato diplomová práce byla vypracována samostatně a že všechny použité literární zdroje jsou správně a úplně citovány. Tato práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické Vysokého učení technického v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího diplomové práce a děkana FCH VUT.

.....
Bc. Tomáš Krist

Tímto bych velmi rád poděkoval mému vedoucímu Ing. Vojtěchu Enevovi, Ph.D., za jeho velmi cenné rady, veškerou pomoc a především čas, který mi věnoval. Dále patří velké poděkování mé rodině za jejich nekonečnou podporu.

1	ÚVOD.....	7
2	TEORETICKÁ ČÁST.....	8
2.1	Vznik uhlí	8
2.1.1	Biochemická fáze.....	8
2.1.2	Geochemická fáze	11
2.2	Složení uhlí	15
2.3	Huminové látky.....	18
2.3.1	Rozdělení huminových látek	18
2.3.2	Vznik huminových látek	23
2.3.3	Molekulární struktura.....	26
2.3.4	Rozdělení organické hmoty dle polarity rozpouštědla.....	32
2.3.5	Využití huminových látek	33
2.4	Současný stav řešené problematiky.....	35
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	41
3.1	Použité chemikálie	41
3.2	Použité přístroje	41
3.3	Sekvenční frakcionace HK	41
3.4	FTIR spektrometrie	42
3.5	Elementární analýza	42
3.6	UV/Vis spektrometrie.....	42
3.7	Fluorescenční spektrometrie	44
3.8	Stanovení celkové, karboxylátové a fenolické kyselosti	45
4	VÝSLEDKY A DISKUZE.....	46
4.1	Sekvenční frakcionace, výtěžek.....	46
4.2	Elementární analýza a kyselost.....	46
4.3	Strukturní analýza	49
4.3.1	UV/Vis spektrometrie	49
4.3.2	Infračervená spektrometrie.....	51
4.3.3	Fluorescenční spektrometrie.....	54
5	ZÁVĚR.....	58
6	CITOVANÁ LITERATURA	60
7	SEZNAM SYMBOLŮ A ZKRATEK	70
7.1	Seznam symbolů	70
7.2	Seznam zkratk	70
8	PŘÍLOHY	72

1 ÚVOD

Huminové látky (HL) jsou předmětem studia už přes dvě století. První zaznamenaný pokus o izolování huminových látek byl v roce 1786 pruským chemikem Franzem Achardem, který extrahoval rašelinu alkalickým rozpouštědlem, a po následném okyselení byla koagulována tmavá amorfni sraženina, která až v roce 1839 získala od švédského chemika Berzelia své současné pojmenování huminová kyselina. Od konce 18. století se spustil maraton extrakcí a frakcionací organické hmoty a pokusů o charakterizaci a pojmenování jednotlivých frakcí. V současnosti je základním rozdělením HL dle jejich acidobazické rozpustnosti na huminové kyseliny, fulvinové kyseliny a humin. Huminové kyseliny jsou nezastupitelné v půdním ekosystému, přispívají k rozmělnění jílovité a zhutnělé půdy (provzdušnění), pomáhají při transportu mikroživin z půdy do rostlin, napomáhají zadržovat vodu v krajině, zrychlují klíčení semen či stimulují rozvoj půdní mikroflóry. Taktéž zpomalují vypařování vody z půdy, což je vlastnost významná převážně v půdách s omezenou nebo žádnou schopností zadržet vodu, jako jsou půdy s nízkým obsahem jílu či v písčitéch oblastech.

Huminové látky se v přírodních ekosystémech vyskytují v různých formách, jsou přítomné volně ve sladkovodních a mořských zdrojích či jsou vázány na jílovité částice v půdě formou organominerálních komplexů. Nejbohatším zdrojem HL jsou kaustobiolity, mezi které se řadí rašeliny a uhlí (lignit, oxyhumolit a leonardit).

Leonardit patří mezi oxyhumolity a jedná se o oxidovanou formu lignitu, která se vyskytuje převážně v mělkých hloubkách, kde překrývá kompaktnější uhlí. Jedná se o směs HL s minerály jako je jíl, křemen a sádrovec. Díky jeho dostupnosti, nízké ceně a vysokému obsahu HK je právě leonardit často využíván jako výchozí zdroj HL.

Největší průlom ve výzkumu HL započal až začátkem 20. století a s postupným rozvojem analytických metod se víceméně ustálila jako nejpravděpodobnější struktura huminových látek struktura supramolekulární. Supramolekulární struktura byla popsána jako asociace heterogenních relativně malých molekul navzájem vázaných slabými nekovalentními silami. Tento popis se významně liší od původního polymerního modelu, který popisoval huminové kyseliny jako shluk organických makromolekul s vysokou molekulovou hmotností, které lze popsat průměrným vzorcem.

Existuje nespočetné množství metod frakcionace s cílem snížit heterogenitu huminových látek. Heterogenitu lze snížit postupnou destrukcí intermolekulárních interakcí, které supramolekulární komplexy stabilizují, a které vedou ke vzniku frakcí. Sekvenční frakcionace má za úkol postupně separovat molekuly od supramolekulárního huminového celku řízeným štěpením vazeb. Struktura takto získaných frakcí organické hmoty s nižší heterogenitou lze snáze charakterizovat pomocí různých analytických metod.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Vznik uhlí

Organický původ kaustobiolitů uhelné řady je prokazatelný. Uhlí vzniká chemickou a fyzikální transformací rostlinných polymerů skrze mikrobiální enzymatické procesy (biodegradace) vyskytující se v rané fázi diagenese (biochemická fáze) a také za dlouhodobého působení tlaku a teploty. K utváření uhlí docházelo v oblastech mírného pásu, a to z rostlinných zbytků uložených ve vodních tocích, jezerech, mořských zálivech a lagunách [1]. Vznikaly zde postupným zaplňováním bažin, které dále zarůstaly rostlinstvem vlastním příslušnému geologickému období. Bažiny a jezera postupně zarůstaly až k úrovni vody a na povrchu pak rostla jejich mocnost. K nahromadění a uchování takového množství rostlinných zbytků potřebných k utvoření uhelných pánví bylo třeba, aby v daném období společně působily co nejpříznivější klimatické, biologické, zeměpisné i geologické podmínky [1]. Nejvíce hnědého uhlí se tvořilo v třetihorách, kdy atmosférické a geologické podmínky byly nejpříznivější. Aby se nekromasa bakterií, planktonu nebo vyšších rostlin změnila v uhlí, musí projít procesy uhelnění [1].

Podstatou procesu uhelnění je rozklad složitých velkých molekul biopolymerů nekromasy na látky s jednoduššími molekulami (monomery), a současná nebo následná syntéza monomerů na složité makromolekulární organické látky. Procesy uhelnění, postihující převážně nekromasu vyšších rostlin, představuje rašelinění, probíhající na povrchu, a prouhelňování v zemské kůře. Společně s rašeliněním se nekromasa na povrchu rozkládá i tlením a trouchnivěním. Pokud nejsou procesy přerušeny, dojde až k rozkladu nekromasy na CO_2 a H_2O . Pro vznik kaustobiolitů tyto dva procesy nepřispívají [2].

Dle řídicích faktorů a reakcí v průběhu uhelnění rozlišujeme fázi biochemickou s rašeliněním a fázi geochemickou s prouhelňováním [2].

2.1.1 Biochemická fáze

Nejprve dochází k hromadění rostlinného materiálu a později k jeho rozkladu. Odumřelé části rostlin podléhají rozkladným procesům, a to za přímé účasti mikroorganismů, aerobních a anaerobních bakterií, hub, mikro a makro edafonu a rovněž i za působení vody, nerostných příměsí a plynů. Rozkladné procesy, kterým podléhají odumřelé části organismů, je možné rozdělit na tlení, trouchnivění, hnití a rašelinění. [1]

Tlení a trouchnivění

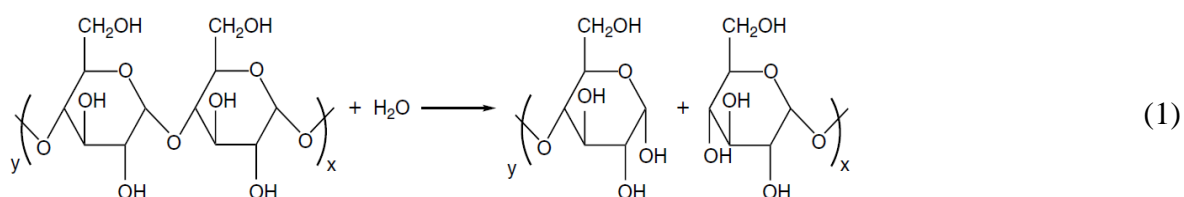
Tlení je rozkladný proces, ke kterému dochází působením enzymů nacházejících se v aerobních bakteriích a k efektivnímu rozkladu je potřeba koncentrace kyslíku ve vzduchu více jak $1 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$. Těchto bakterií je v půdě značné množství, přibližně 10^9 bakterií na gram půdy a tři tuny bakterií na hektar. Překrytím organické hmoty stojatou vodou nebo nánosy bahna se významně sníží přístup kyslíku k organické hmotě. Do jednoho metru hloubky však může docházet k difundování kyslíku skrze vodu a sediment a k pokračování tlení. Tento proces se nazývá trouchnivění [3].

Hnití

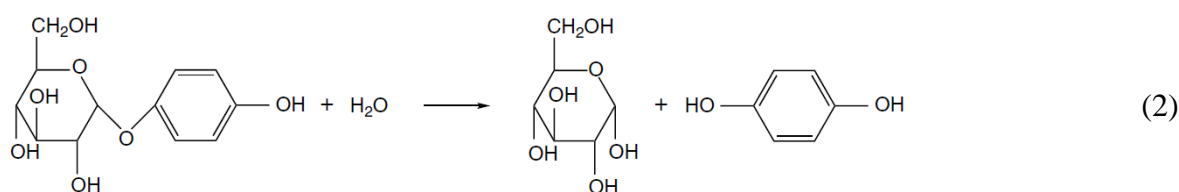
Pokud je mocnost sedimentu nad organickou hmotou větší jak jeden metr, tak se vzduch, resp. vzdušný kyslík nezúčastňuje rozkladných procesů. Nedojde k úplnému rozkladu a zůstává pevný zbytek, trouch. Takových podmínek je dosaženo, pokud koncentrace kyslíku je menší jak $0,1 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ [3]. Na následném rozkladu, hnití, se podílejí anaerobní bakterie. Plynnými produkty rozkladu jsou především methan, amoniak, sulfan a oxid uhličitý. Zbytek tvoří tekuté nebo tuhé látky, které jsou poměrně bohaté na vodík. Vzniklý organický hlen je označován jako hnilobal – sapropel [1].

Rašelinění

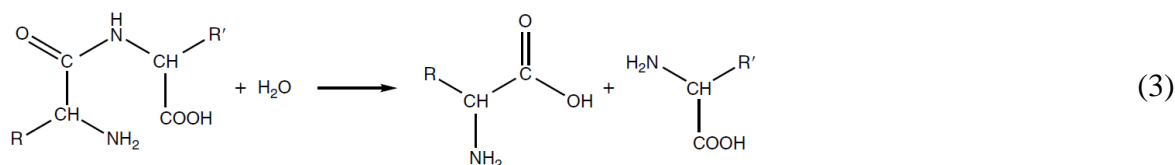
Aby vznikalo uhlí, musí proběhnout proces rašelinění. K rašelinění dochází z části nebo úplně v subakvatickém prostředí, tedy v místech pod vodou bez nebo s omezeným přístupem vzduchu. Kdyby rašelinění pokračovalo volně dál, podlehla by nekromasa úplnému rozkladu, proto musí dojít k ochraně nekromasy před úplným rozkladem kombinací faktorů biologických, chemických a geologických [1; 2]. Reaktanty v anaerobních reakcích v procesu rašelinění tvoří látky v organické hmotě jako je celulóza a hemicelulóza, škrob, glykosidy, lignin, bílkoviny, tuky a oleje, vosky, steroidy, pryskyřice a uhlovodíky. Primárním rozkladným procesem je hydrolýza. Vliv teploty a tlaku zatím není brán v potaz, protože teplota i tlak v hloubkách pár metrů pod povrchem země je blízká hodnotám na povrchu [3]. Za těchto podmínek se polysacharidy snadno hydrolyzují:



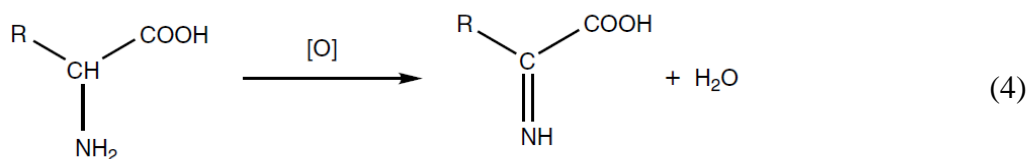
Stejně tak ochotně reagují glykosidy:



Peptidická vazba v lipidech také podléhá hydrolýze:



Enzymy anaerobních bakterií významně zrychlují tyto reakce, a to až řádově o 10^{10} faktorů v případě hydrolýzy polypeptidů. Přestože anaerobní bakterie nezískávají kyslík ze vzduchu pro reakce ve vnitřních biochemických procesech, musí tyto oxidační reakce nějakým způsobem probíhat. Dochází totiž k oxidativní deaminaci aminokyselin (Rovnice 4) za vzniku iminokyselin, které reagují s vodou za vzniku amoniaku a α -keto kyselin [3].



Dále dochází k dekarboxylaci vzniklých α -keto kyselin, při které se uvolní CO_2 . Anaerobní bakterie rozkládají i monosacharidy na CH_4 a CO_2 . Tuky a oleje za těchto podmínek nepodléhají hydrolýze, stejně tak i esterové skupiny ve voscích. Methoxy a jiné etherové vazby v ligninu nereagují vůbec. Ostatní látky v organické hmotě, například pryskyřice a alkany, neobsahují hydrolyzovatelné funkční skupiny [3]. Přehled všech předpokládaných hydrolytických reakcí organické hmoty jsou popsány v Tabulce 1. [3]

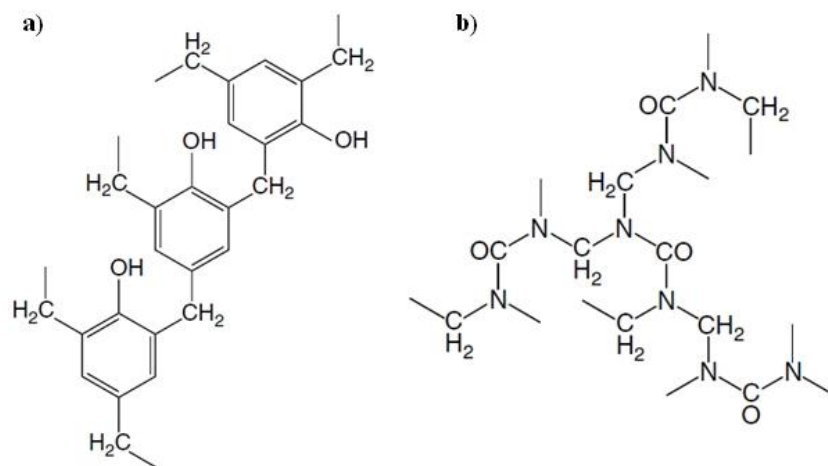
Tabulka 1: Předpokládané hydrolytické reakce [3].

Funkční skupina	Reaktivita	Hlavní produkty	Vedlejší produkty
Sacharidy	Vysoká	Cukry	
Glykosidy	Vysoká	Sacharidové fenoly	$\text{CO}_2 + \text{CH}_4$
Peptidy	Vysoká	Aminokyseliny	$\text{CO}_2 + \text{NH}_3 + \text{aldehydy}$
Estery	Střední	Mastné kyseliny	
Vosky	Nízká	Mastné kyseliny s dlouhým řetězcem	
Etery	Velmi nízká	Fenoly	
Uhlovodíky	Žádná	Žádné	

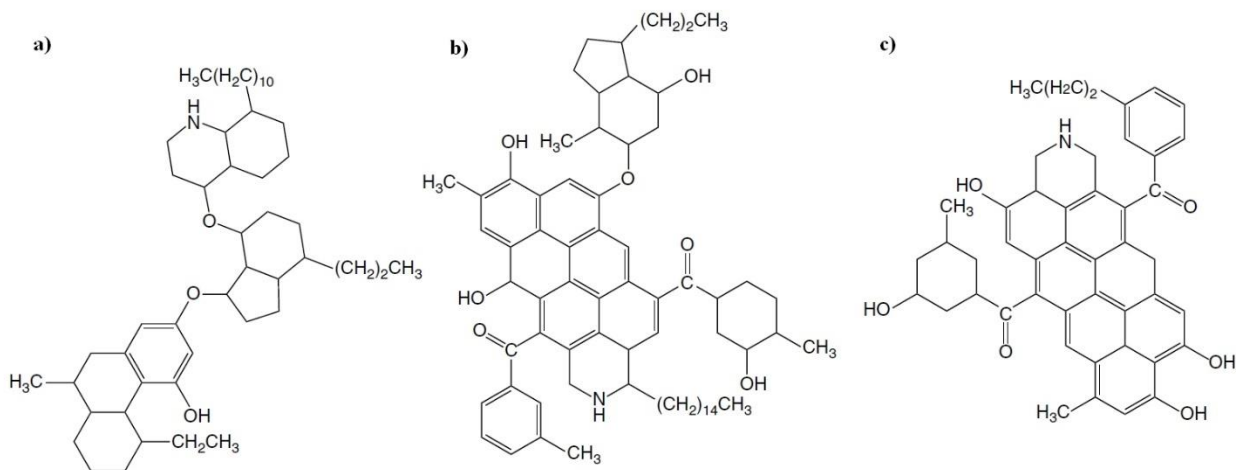
Postupně se přetváří monosacharidy, aminokyseliny, fenoly a aldehydy ve fulvinové kyseliny a následnými reakcemi v huminové kyseliny [3].

V hloubce okolo deseti metrů aktivita anaerobních bakterií klesá, v tento moment bakterie zpracovaly veškerou organickou hmotu, kterou jsou schopné metabolizovat. Druh bakterií tzn. aktinomycety produkují značné množství antibiotických sloučenin, jako jsou aktinomycin, streptomycin či tetracyklin. Fenolové sloučeniny vyprodukované při reakcích působí baktericidně. Výsledkem všech reakcí v této hloubce je směs látek obsahující huminové kyseliny; nezreagované nebo částečně zreagované tuky, oleje a vosky; mírně modifikovaný lignin; pryskyřice a ostatní uhlovodíky. Zmíněné látky poté vytváří kerogen. Samotný proces vzniku kerogenu není doposud znám. [3]

Kerogen je komplexní směs organických chemických sloučenin, nerozpustných v normálních organických rozpouštědlech částečně kvůli své vysoké molekulové hmotnosti. Jeho chemické složení se podstatně liší mezi sedimentárními formacemi, a dokonce i v nich. Kerogen nelze popsat jedním vzorcem. Mezi strukturální jednotky se řadí například fenol-formaldehydové a močovino-formaldehydové pryskyřice (Obrázek 1), které vznikly reakcí fenolu či močoviny s formaldehydem. Rozlišujeme tři typy kerogenu, kde převažující organickou hmotou jsou buď řasy, plankton nebo vyšší rostliny (převážně dřeviny). Kerogen III. typu (označovaný též jako huminový) již můžeme považovat za rašelinu. Možné struktury kerogenů jsou znázorněny na Obrázku 2. [3]



Obrázek 1: Příklady strukturálních jednotek kerogenu; a) fenol-formaldehydová pryskyřice, b) močovino-formaldehydová pryskyřice [3].



Obrázek 2: Struktura kerogenu, zdroj huminové hmoty; a) řasy, b) plankton, c) vyšší rostliny [3].

Rašelinění střídá prouhelňování a začíná geochemická fáze. Podmínkou je zastavení rozkladných reakcí, aby nedošlo k úplnému rozkladu. Biologická ochrana spočívá v tvorbě látek jedovatých pro mikroorganismy, chemická ochrana probíhá v podobě ztráty vody dehydratací koloidů, která způsobí smrt rozkladných mikroorganismů. Základem geochemické ochrany je omezení přístupu vzdušného kyslíku, např. zalitím vodou nebo překrytím nánosem sedimentů [1]. Pokud se zamezí existenci rozkladných mikroorganismů, zastaví se rozkladné procesy a tím i biochemická fáze. Dojde k tomu tehdy, když se rozložená a sedimenty překrytá ústrojná hmota dostane hlouběji pod zemský povrch. Dlouhodobým působením zejména tlaku a teploty dochází k dalším chemickým reakcím, jimiž se organická hmota dále nerozkládá, nýbrž proměňuje [1].

2.1.2 Geochemická fáze

Prouhelňování lze definovat jako složitý geochemický proces vytvářející z vrstev rašeliny a sapropelu hnědouhelnou, černouhelnou nebo antracitovou sloj [1]. Nejdůležitějšími faktory jsou teplota a tlak, význam časového faktoru je menší [1].

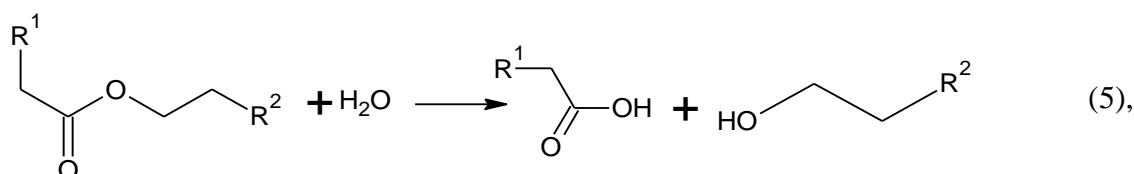
Vliv teploty je dán tím, že její vzrůst mění chemickou a strukturní stavbu organické hmoty. Tlak je významným faktorem, který výrazně ovlivňuje objem plynné fáze a tím i intenzitu reakcí probíhajících při prouhelňování. Vliv času vyplývá z empirického poznání, že více prouhelňené uhlí se vyskytuje až na výjimky jen ve starších geologických formacích [1].

Absence vnějších zdrojů vodíku vede ke dvěma produktům, a těmi jsou látky bohaté na vodík (vysoký atomový poměr H/C) v porovnání s původní látkou a látky bohaté na uhlík (nižší atomový poměr H/C). To platí pro jakoukoliv látku, od propylového radikálu až po komplexní látku s neznámou strukturou jako je kerogen. Látky mohou zvýšit svůj atomový poměr H/C pouze na úkor látek s nižším atomovým poměrem H/C, od kterých převzou vodík. To, jaké produkty ve výsledku převažují, rozhoduje atomový poměr H/C původního kerogenu. Více látek bohatých na vodík se bude vytvářet, pokud i původní kerogen byl bohatší na vodík a naopak. Kerogen, jehož převažujícím organickým zbytkem byly řasy a plankton, se vyznačuje vyšším poměrem H/C, jehož hodnoty jsou okolo 1,7; resp. 1,4, a je prekurzorem pro ropná ložiska a ložiska zemního plynu. Pro vznik uhlí je významný převážně huminový kerogen, jehož atomový poměr H/C je nižší jak 1. [3]

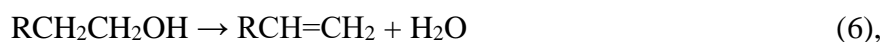
V této fázi se pohybuje teplota v rozmezí 100–300 °C v hloubce okolo 10 km, maximální teplota je nižší než teplota potřebná pro pyrolýzu, která probíhá až při teplotách nad 350 °C [3]. Při procesu prouhelňování dochází ke snižování atomového poměru H/C a O/C, k trvalému růstu planárního uspořádání a přibližování makromolekul s krystalitou grafitu. Z hlediska molekulární chemie dochází k trvalému růstu aromaticity uhlí a dále i k trvalému růstu kondenzačního indexu uhlí, který je dán počtem atomů uhlíku zapojených do cyklických vazeb. [2]

Popsané strukturní a molekulárně chemické proměny vyvolávají změny fyzikálních a chemických parametrů uhlí a jsou doprovázeny uvolňováním methanu. Z fyzikálních parametrů se zmenšuje objem i vnitřní povrch uhlí, klesá obsah kapilární vody; roste lesk, index lomu, tvrdost aj. Chemicky roste obsah uhlíku, ubývá konstituční vody a prchavé hořlaviny, ubývá počet funkčních skupin aj. [2]

V rané geochemické fázi se začínou látky postupně rozpadat. Vosky a nezreagované tuky mohou podléhat hydrolýze, pokud je přítomna podzemní voda:



produkty této reakce se dále mohou zúčastnit tepelně řízených reakcí dekarboxylace a dehydratace. Alkoholy se dehydratují při zvýšených teplotách v reakcích katalyzované minerály obsažené v jílu. Jíl je v zemské kůře hojně zastoupen a může hrát roli při usnadňování některých reakcí [3]. Dehydratace alkoholu může být popsána rovnicí:



v laboratoři by tato reakce probíhala při 160 °C, v hloubce jednoho kilometru je však teplota okolo 60 °C (závisí na geotermických podmínkách). Pokud se vezme v potaz pravidlo, že se

zdvojnásobí reakční rychlost při zvýšení teploty o 10 °C, pak by se rychlost dehydratace alkoholu zpomalila poměrem o $(\frac{1}{2})^{10}$. Reakce, která by v laboratoři trvala tři hodiny při 160 °C, tak přírodě trvá osmnáct týdnů při 60 °C [3].

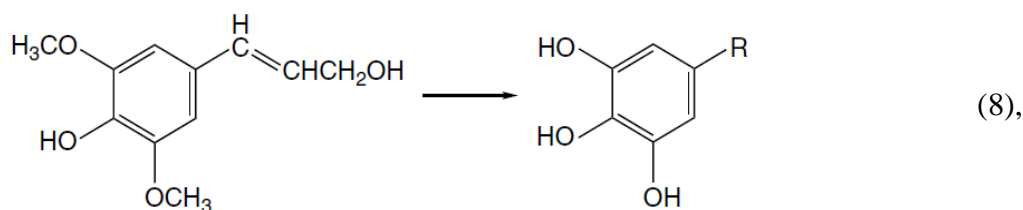
Stejné pravidlo lze použít i při dekarboxylaci kyselin:



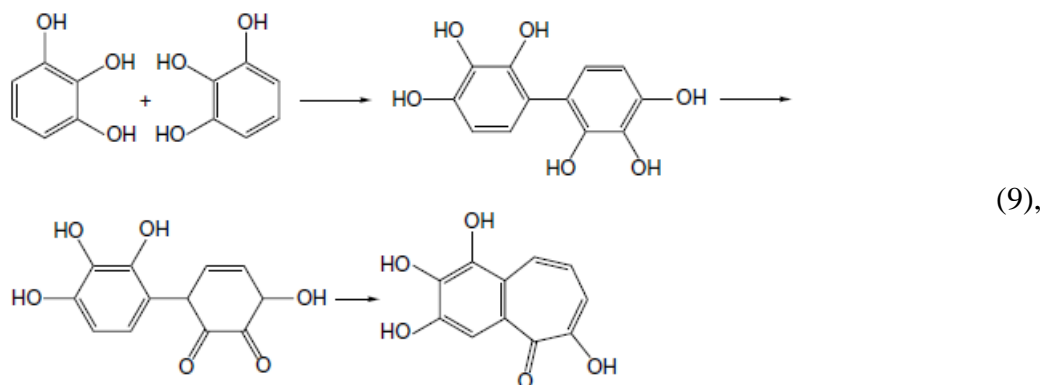
tato reakce v laboratoři probíhá při 300–400 °C. Reakce v procesu prouhelňování probíhá tudíž mnohem pomaleji a v časovém úseku tisíců až milionů let. [3]

Estery podléhají tepelné dekarboxylaci, jejímž výsledkem jsou alkeny a kyseliny. Kyseliny pravděpodobně taktéž podlehnou dekarboxylaci, tudíž konečným produktem bude alken, alkan a oxid uhličitý. [3]

Mezi změny ve struktuře ligninu, který v předchozí fázi víceméně neměnil svoji strukturu, patří demethylace methoxylových funkčních skupin, dehydroxylace alkylových bočních řetězců a štěpení β -O-4-arylesterů, které vedou k tvorbě látek strukturně podobných katecholu. [4] Reakce tedy vedou nejprve k uvolnění monomerních jednotek, po kterém následuje další degradační reakce. [3] Příkladem může být sinapylalcohol:



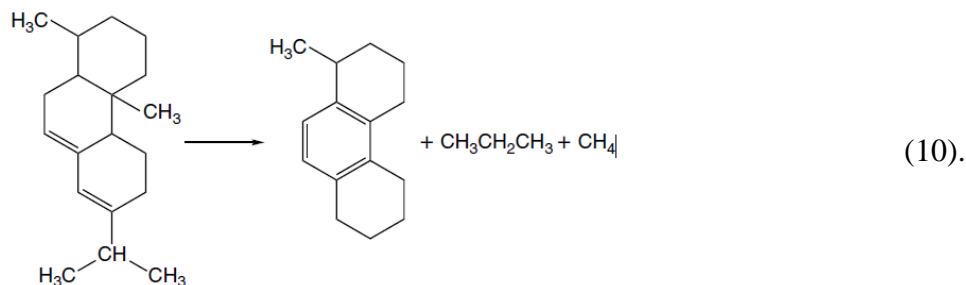
možný produkt 1,2,3-trihydroxybenzen může podléhat autokondenzaci:



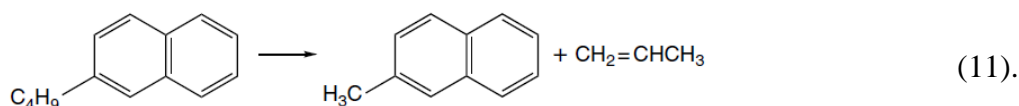
výsledkem celého procesu je kondenzace cyklických sloučenin do větší polycyklických systémů doprovázená uvolňováním CO_2 . [3]

Po přibližně 30 milionech let postupnou ztrátou kyslíku, zvyšováním obsahu uhlíku, kompresí rašeliny na přibližně polovinu původního objemu vzniká lignit. Další zhuštění na asi čtvrtinu původního objemu rašeliny a pokračující snižování obsahu kyslíku vede po cca 60 až 70 milionech let od počátku procesu ke vzniku hnědého uhlí. S postupující ztrátou karboxylových a methoxylových skupin postupně vzniká hnědo-černé uhlí [3].

Následné reakce vedou ke vzniku černého uhlí o mocnosti jeden metr z původní rašeliny o mocnosti 7–20 metrů. Dochází k tzv. prouhelňovacímu skoku, který je charakteristický výraznou změnou trendu ve van Krevelenově diagramu (Obrázek 4). K reakcím dochází při teplotách okolo 60 °C a při obsahu uhlíku okolo 80 %. [4] Pryskeřice podléhají částečné dealkylaci a aromatizaci:



Dále se odštěpují vedlejší alkylové řetězce z alkylaromátů:



Dlouhé alkylové řetězce lipidů anebo derivátů lipidů podléhají tepelnému rozkladu:



Všechny tyto reakce vedou k redistribuci vodíku, či dokonce k jeho ztrátě tvorbou lehkých produktů, které se mohou uvolnit ze systému. Výsledkem je mnohem významnější pokles atomového poměru H/C oproti O/C, což je znát i ve zmíněném van Krevelenově diagramu. Zatímco doposud byl převažujícím plynným produktem CO₂, po prvním prouhelňovacím skoku převládá CH₄ coby primární plynný produkt [3].

Druhý prouhelňovací skok nastává, pokud obsah uhlíku v uhlí dosáhne 87 % v takové hloubce, že teplota dosahuje 120 °C. Výrazně se zvyšuje produkce methanu, jehož atomový poměr H/C je 4 a výrazně snižuje atomový poměr H/C zbylých produktů. Hypotetickými sekvenčními reakcemi, které vedou k produkci methanu, jsou následující (začínající undekánem):



Produkty jdoucí sekvenčně od decenu, přes nonadien po oktadien, mají výrazně menší atomový poměr H/C, a to 2,00; 1,77 a 1,50. [3]

Dalšími pravděpodobnými reakcemi snižující obsah vodíku jsou cyklizace a aromatizace nenasycených látek z předchozích reakcí a vznik polycyklických aromatických systémů. Ztráta kyslíku při druhém prouhelňovacím skoku je pravděpodobně způsobená deoxygenací fenolů společně s kondenzačními reakcemi aromatických kruhů. [3]

Třetí prouhelňovací skok je již spojen s tvorbou antracitu a dochází k němu, pokud obsah uhlíku dosáhl 91 %. Antracit se vyskytuje v horských oblastech, kde je na tvořící se uhlí vyvíjen výrazně vyšší tlak a působí vysoká teplota. V této fázi se vytváří asi 200 litrů methanu na kilogram uhlí. Víceméně dochází k zintenzivnění reakcí z předchozího kroku a k tvorbě polycyklických aromatických systémů. V extrémním případě, při obsahu uhlíku okolo 96 hm. %, dochází k tvorbě metaantracitu, který je strukturou podobný grafitu a lze předpokládat, že s dostatečným časem a za správných podmínek dojde až k vytvoření čistého grafitu. [3]

2.2 Složení uhlí

Z obecného hlediska jsou základní složkou uhelné hmoty hořlaviny, popeloviny a voda [5].

Uhlí z hlediska struktury lze dělit i dle petrograficko-chemické klasifikace macerátových skupin. Macerátové skupiny jsou mikrokonstituenty uhlí, jejichž původ je odvozován z macerace původního rostlinného materiálu. Macerátové skupiny hnědého uhlí jsou huminit, liptinit a inertinit. Macerátové skupiny černého uhlí jsou vitrinit, liptinit, inertinit. Jednotlivé skupiny se dělí i na podskupiny. Odlišnost macerátů je dána odlišností původního rostlinného materiálu a podmínkami procesů prouhelňování [6].

Voda je v uhlí vázaná různě. Kromě volné vody rozlišujeme vodu fyzikálně (kapilární) a chemicky (konstituční) vázanou na hořlavinu a vodu vázanou na popeloviny (hydrátovou). Podle stupně prouhelňování kolísá obsah vody v uhlí od 1 do 60 % vody, rašelina obsahuje dokonce 90 % a více vody [5].

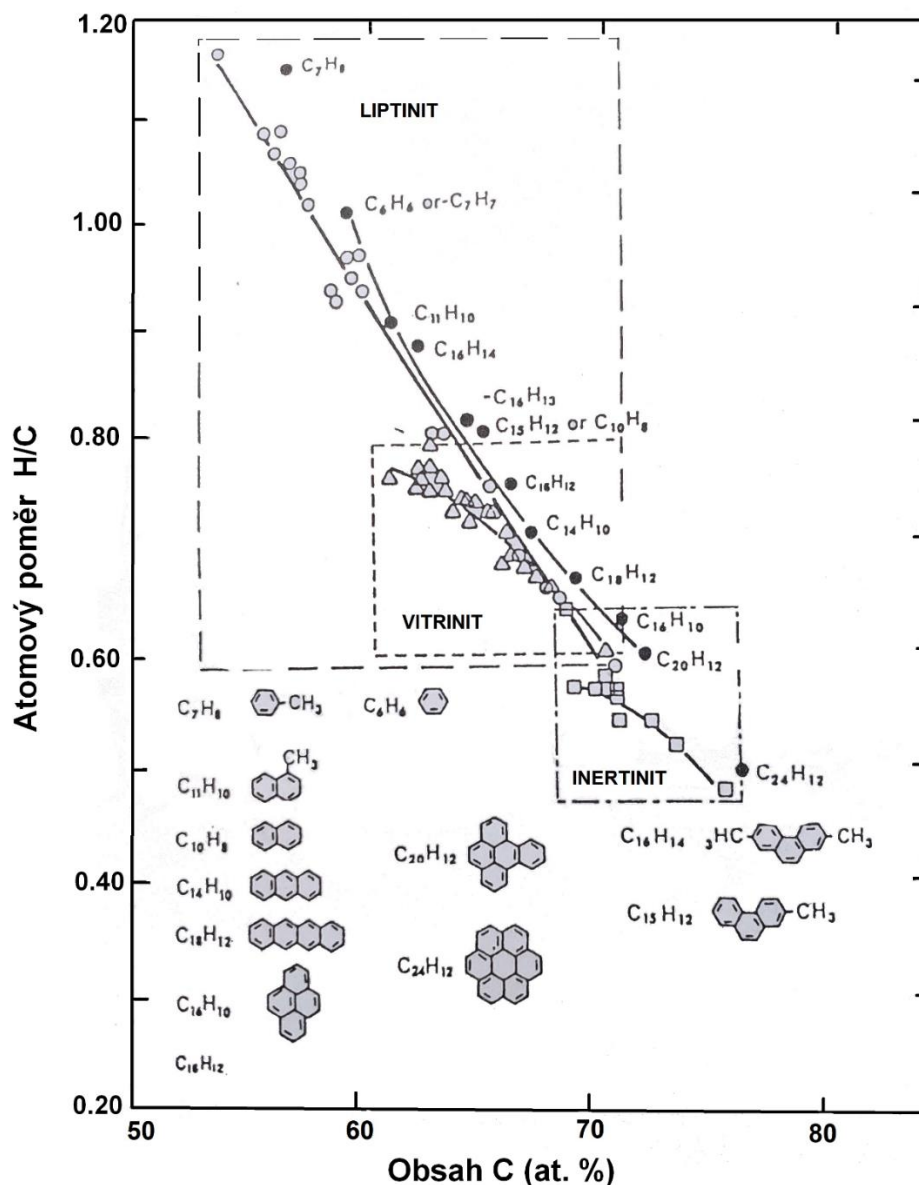
Popeloviny jsou látky původně vzniklé z anorganických složek výchozího odumřelého rostlinného materiálu, dále z minerálních látek mechanicky přimíšených, vnesených, naplavených ve stádiu hromadění rostlinných zbytků nebo infiltrovaných do uhelné hmoty z okolí během procesu uhelňování [5].

Ve vzorcích hnědého i černého uhlí byly nalezeny minerály: kaolinit, muskovit, křemen, pyrit, kalcit a sádrovec. Minerální látky hnědých uhlí jsou zčásti chemicky vázány na huminové kyseliny [5]. Obecně se uhelné popeloviny skládají z minerálů těchto skupin: skupina kaolinu (kaolin, livesit a halloysit), skupina illitu a montmorillonitu (muskovit, illit, montmorillonit atd.), skupina sulfidů pyrit nebo markasit a výjimečně pyrrhotin, skupina uhličitanů (kalcit, ankerit, dolomit, ocelek atd.) [5].

Hnědé uhlí obsahuje hlavně jílové minerály a pyrit. Popeloviny málopopelnatých hnědých uhlí obsahují 20 až 60 % CaO, jehož větší podíl je vázán v podobě humátu vápenatého. Dále jsou přítomny i humáty železa a hliníku [5].

Hořlaviny tvoří uhlík, vodík, kyslík, síra a dusík. Jejich zastoupení v uhlí se mění dle jejich prouhelňování. Obsah uhlíku stoupá z cca 55 hm. % v rašelině na více než 92 hm. % v antracitu, zatímco množství vodíku klesá z 10 hm. % na 3 hm. % a kyslíku z 35 hm. % na 2 hm. %. Změny v množství síry a dusíku vlivem prouhelňování nejsou významné vzhledem k jejich zastoupení [7]. Prvkové složení vyjádřené v hmotnostních procentech je z hlediska pochopení stavby organické hmoty nevýstižné a zavádějící [8]. Zastírá totiž klíčovou roli vodík, který je nejlehčí prvkem periodického systému, ale z hlediska různých procesů (např. zkapalňovacích či extrakčních), sehrává v řadě případů rozhodující úlohu [6].

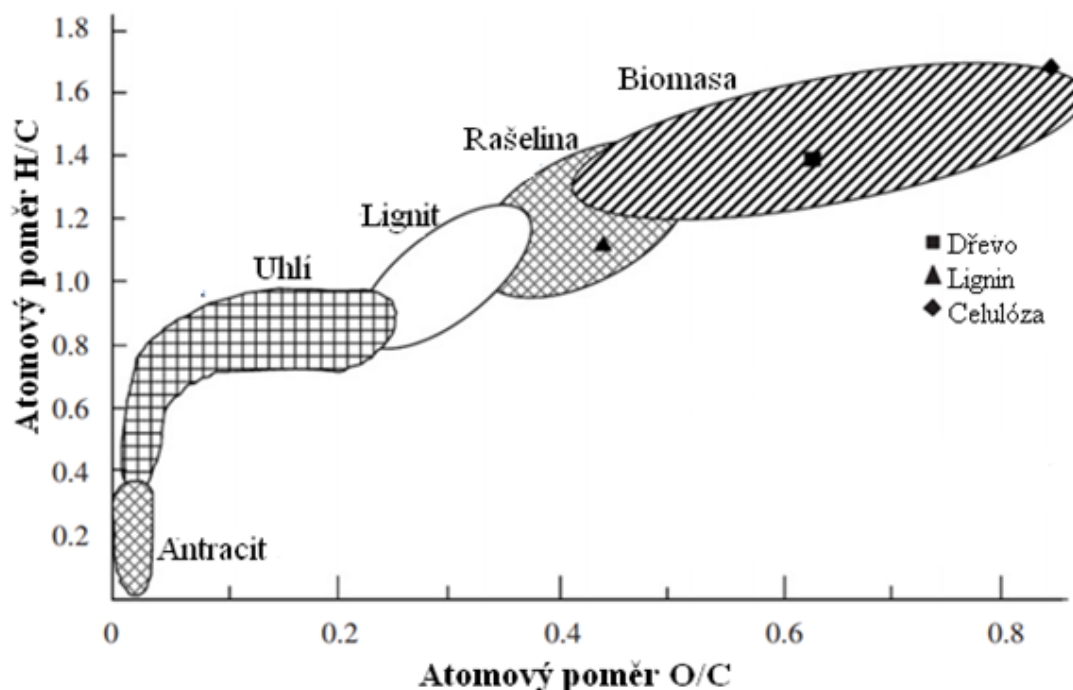
Rozdíly v chemické struktuře macerálových skupin jsou výrazně ovlivněny podílem kyslíku v hořlavině a zastoupením kyslíkatých funkčních skupin v uhlí. Z Obrázku 3 je zřejmé, že zvláště v macerálové skupině liptinitu je vzájemný poměr hlavních organogenních prvků C, H, O variabilnější než u vitrinitu a inertinitu [6].



Obrázek 3: Atomový poměr H/C v závislosti na obsahu C v macerálových skupinách černého uhlí, v obrázku jsou znázorněny i možné konstituční jednotky [8].

Atomový podíl aromatických atomů uhlíku k celkovému počtu organického uhlíku je 0,5 u lignitu a narůstá až přes 0,95 u antracitu [7].

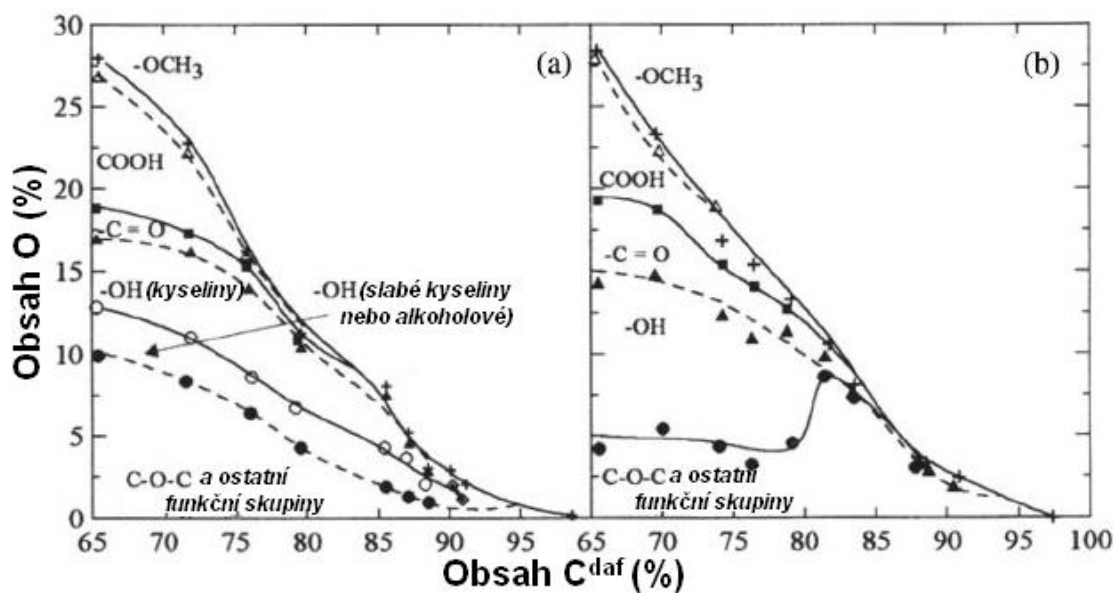
S postupným prouhelňováním se snižuje atomový poměr H/C. Trend lze pozorovat na Obrázku 4, kde je zobrazena závislost atomového poměru H/C na atomovém poměru O/C pro organickou hmotu odlišného původu.



Obrázek 4: Van Krevelenův diagram [9].

Síra, nacházející se v hořlavině, je vázána většinou v sírných heterocyklech, jakými jsou thiofeny, benzothiofeny apod. V hořlavině připadá jeden atom síry na 100 až 300 atomů uhlíku. Až 90 % organické síry je obsaženo ve strukturách $-SH$, $-SR$ a $-S-S-$ [6].

Kyslík se vyskytuje v periferních částech systému ve funkčních skupinách hydroxylových, karboxylových, karbonylových a methoxylových. Obsah kyslíku v jednotlivých funkčních skupinách vyjadřuje Obrázek 5. Je zřejmé, že spolu s rostoucím prouhelněním mizí nejdříve methoxylové, potom karboxylové a následně potom i karbonylové a hydroxylové skupiny [6].



Obrázek 5: Obsah kyslíku v jednotlivých funkčních skupinách v závislosti na míře prouhelnění, a) interpretace od Ihnatowicz, b) interpretace od Bloom et al.; index daf značí dry, ash-free, vzorek je přepočten na suchý a bez popelový [10].

2.3 Huminové látky

Huminové látky jsou heterogenní směsí přirozeně se vyskytujícími organickými molekulami, které jsou v přírodě všudypřítomné a vyskytují se v půdách, vodách a sedimentech. [11] Vznikly rozkladem organické hmoty rostlinného nebo živočišného původu a syntetickou činností mikroorganismů, čemuž se říká humifikace. Huminové látky hrají významnou roli v cyklu uhlíku v přírodě, kde představuje primární zdroj CO₂, protože uhlík v huminových látkách představuje 60 až 70 % celkového uhlíku obsaženého v půdě [12].

Zdrojem huminových kyselin pro průmyslové využití jsou kaustobiolity – rašeliny, lignit a zoxidované hnědé uhlí, tzv. oxyhumolity [13]. Množství huminových látek v přírodních matricích kolísá od stopových množství (písky a jíly), přes jednotky procent (3 % v běžných zeminách) až k desítkám procent (3–10 % v hnědém uhlí). Mimořádně vysoký obsah vykazuje lignit, rašelina a oxyhumolit, a to až 85 % [12].

Obsah huminových kyselin a fulvokyselin v přírodních matricích uvádí Tabulka 2.

Tabulka 2: Obsah HK a FK v přírodních matricích [12].

Přírodní zdroj	Obsah HK a FK (%)
Leonardit/humát	40–85
Černá rašelina	10–40
Sapropelová rašelina	10–20
Hnědé uhlí	10–30
Hněj	5–15
Kompost	2–5
Půda	1–5
Kal	1–5
Černé uhlí	0–1

2.3.1 Rozdělení huminových látek

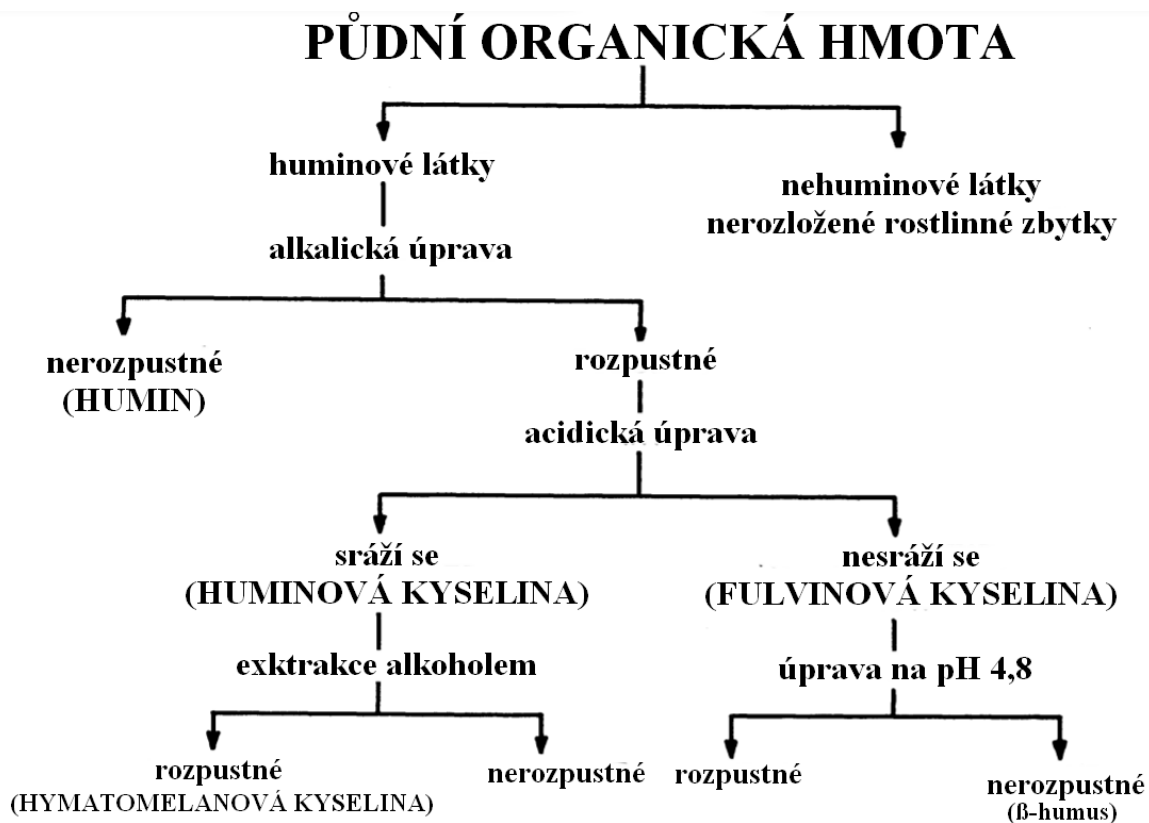
Prvním, kdo jasně definoval rozdělení huminových látek, byl Mulder [14] v roce 1862, který klasifikoval huminové látky dle rozpustnosti do tří skupin, a to na ulminy nebo huminy, nerozpustné za bazických podmínek; ulmické (hnědé) a huminové (černé) kyseliny, rozpustné za bazických podmínek; a crenové a apocrenové kyseliny, rozpustné ve vodě. Každý autor v té době přiřazoval různým skupinám různé názvy, místo crenových a apocrenových kyselin se vyskytovaly i glukové, apoglukové, chlorhuminové kyseliny a jiné. Od tohoto rozdělení se víceméně upustilo, protože se zakládalo na konkrétním pojmenování sloučeniny s konkrétní strukturou. Později bylo prokázáno, že humus, ze kterého izolovali huminové látky, je komplexní směs organických látek, které jsou většinou koloidní povahy a jsou slabě kyselé. Jediné pojmenování, které se dochovalo do současnosti je hymatomelanová kyselina nazvaná Hoppe-Seylerem [15] v roce 1889 jakožto frakce rozpustná v alkoholech [16].

Další historické rozdělení vytvořil Oden (1914, 1919) [17; 18], který rozděloval huminové látky na humusové uhlí, huminové kyseliny, hymatomelanové kyseliny a fulvinové kyseliny. Jako první popsal fulvinové kyseliny jakožto frakci humusu rozpustnou za bazických i kyselých podmínek. Huminové kyseliny popsal jako tmavě hnědý materiál rozpustný pouze

za bazických podmínek a s obsahem uhlíku okolo 58 %. Dle Odena vznikala hymatomelanová kyselina z huminové kyseliny při alkalické extrakci. Kyselinu charakterizoval jako čokoládově hnědou látku s vyšším obsahem uhlíku než je v HK (okolo 62 %). Žlutohnědé fulvokyseliny, které byly získány z bažinných vod ultrafiltrací, byly považovány za podobné crenovým a apocrenovým kyselinám. Oden konstatoval, že humusové uhlí a fulvinové kyseliny jsou skupinová označení, zatímco huminová kyselina a hymatomelanová kyselina jsou individuální sloučeniny. Později v roce 1930 Shmuk dokázal, že huminová kyselina není individuální sloučenina, ale směs látek sdílející podobnou strukturu [16].

Ke konci předmoderní éry výzkumu huminových látek byly do seznamu látek, které lze oddělit od humusu, přidány další látky. Na základě chování huminových látek v roztocích elektrolytů Springer (1938) [19] rozděloval huminové kyseliny na hnědé huminové kyseliny (Braunhuminsäure) a šedé huminové kyseliny (Grauhuminsäure). Pozoroval chování původní huminové kyseliny rozpuštěné v alkalickém roztoku při postupném přidávání silného elektrolytu (KCl) až do konečné koncentrace 0,1 M. Šedé HK snadno koagulovaly, měly relativně vysoký obsah uhlíku a vykazovaly nižší stupeň disperze [11; 16].

Waksman (1936) [20] ještě rozlišoval další dvě frakce z fulvinových kyselin, a to na rozpustnou frakci a nerozpustnou frakci nazvanou jako β -humus, získaný úpravou pH po izolaci na 4,8. β -humus je bohatý na hliník a byl považována za „Al-humát“. Huminové kyseliny jsou v některých zdrojích definované jakožto frakce nerozpustná v kyselině ani alkoholu s označením jako α -humus. Hymatomelanová kyselina a β -humus bývají často opomíjeny. [21] Rozdělení a vznik HL je popsán na Obrázku 6.



Obrázek 6: Rozdělení půdní organické hmoty [21].

V minulosti autoři zpochybňovali zavedenou klasifikaci složek půdní organické hmoty. Page (1930) [22] navrhl, aby pojem „humus“ nahradil termín „huminová hmota“ pro tmavě zbarvené, vysokomolekulární organické koloidy, a „nehuminová hmota“ pro bezbarvé organické látky pocházející z biologického rozkladu rostlinných a živočišných zbytků jako jsou vosky a celulóza. S tímto základním rozdělením se můžeme setkat i v současnosti. Existují i novější terminologie bez použití termínu „humin“, jako je rozdělení na diagenní (obsahující huminové a fulvinové kyseliny) a biogenní (obsahující nehuminové a biochemické materiály) [23]. Waksman navrhoval upustit od celé nomenklatury huminových kyselin, počínaje huminy a ulminy, přes různé humusové, hymatomelanové, crenové, apocrenové kyseliny až po fulvinové a humátové kyseliny a jiné, a omezil se na termíny jako „frakce rozpustná za bazických podmínek“ atd. Všechna historická dělení huminových látek jsou shrnutá v Tabulce 3.

Tabulka 3: Historická jména huminových frakcí [16].

současné označení	Sprengel (1826)	Berzelius (1839)	Mulder (1840)	Hoppe- Seyler (1889)	Oden (1919)	Springer (1938)
huminová kyselina (HK)	humusová kyselina	HK	HK	HK	humusová kyselina	HK (šedé a hnědé)
fulvinová kyselina (FK)	–	crenová, apocrenová kyselina	gluková, apocrenová kyselina	–	FK	–
hymatomelanová kyselina (HMK)	–	–	–	HMK	HMK	–
humin	humusové uhlí	humin	humin, ulmin	humin	humusové uhlí	–

Obecnější rozdělení huminových látek dle Tana (2011) [24] je na pět základních skupin, a to terestriální (pozemní) – huminové látky v půdě; akvatické (vodní) – huminové látky v řekách, jezerech, oceánech a jejich sedimentech; geologické – huminové látky v lignitu nebo leonarditu, uhlí a jiných geologických ložiskách; huminové látky v bažinách a antropogenní huminové látky pocházející ze zemědělských, průmyslových odpadů a odpadů domácností. Terestriální HL autor rozděluje na huminové látky pocházející z měkkých dřevin, tvrdých dřevin a z travin, které se liší ligninovými monomery. Akvatické dále rozděluje dle původu na alochtonní – huminové látky, které se vytvářely v půdě a až následně se např. erozí přesunuly do vod; a na autochtonní – huminové látky se vytvářely přímo ve vodním prostředí ze zbytků vodních organismů. [24]

V současnosti se setkáváme s rozdělením huminových látek, dle chemických a fyzikálně-chemických vlastností, na humusové kyseliny (huminové kyseliny, fulvokyseliny, hymatomelanové kyseliny), huminy a humusové uhlí [25]. Všechny jsou si strukturně podobné, liší se však molekulovou hmotností, obsahem funkčních skupin, kyselostí, komplexačními schopnostmi a rozpustností v některých rozpouštědlech. Huminy a humusové uhlí jsou, na rozdíl od huminových kyselin, nerozpustné ve vodě [25]. Všechny trendy jsou popsány na Obrázku 7.

Nejčastější rozdělení, vyskytující se v odborných člancích, je dle rozpustnosti huminových látek za acidobazických podmínek, a to na huminové kyseliny, fulvinové kyseliny a huminy [26].

Fulvinové kyseliny

Považují se za koloidní, polydispergované, amorfni huminové látky se žlutou až hnědo-černou barvou [24]. Jsou rozpustné za jakýchkoliv acidobazických podmínek, tedy v celé škále pH [26]. Někteří autoři popisují fulvinové kyseliny jako oxidované fragmenty větších huminových látek, jiní jako jejich prekurzor. Vzhledem k jejich rozpustnosti se fulvokyseliny vyskytují v nízkých koncentracích v přírodních vodách a jsou povrchově a redoxně aktivní. Tyto vlastnosti jim znesnadňují jejich izolaci a purifikaci [27]. Lyofilizované FK jsou občas obtížně rozpustné ve vodě, protože během procesu lyofilizace polymerizují a také přijímají elektrostatický náboj. FK se rozkládají při zahřívání, kdy nedochází k hoření, ale k postupnému zuhelnatění. Je však zaznamenáno, že v přítomnosti oxidačního činidla začínají hořet při 190–200 °C. Nevratné změny lze pozorovat již při zahřátí na 50 °C [24].

Fulvinové kyseliny mají nižší molekulovou hmotnost (175–3570 Da), obsahují více kyslíku, méně uhlíku a dusíku. V jejich struktuře je více kyslíkatých funkčních skupin (COOH, OH, C=O) na jednotku hmotnosti než v ostatních dvou frakcích. [11]

Fulvokyseliny a jejich soli (fulváty) se v půdě nejčastěji vyskytují v adsorbované formě. S oxidy železa a hliníku vytváří organominerální sloučeniny. Jsou charakteristické zejména pro kyselé půdy. Díky svým vlastnostem, zejména obsahu kyselých funkčních skupin, jsou známé jako nejreaktivnější frakce huminových látek ve vodném prostředí. [12]

Huminové kyseliny

HK jsou koloidní, polydispergované, amorfni tmavě hnědé až černé látky. Považují se za hydrofobní a kyselé v přírodních matricích [24]. Jsou rozpustné za alkalických podmínek, ale za kyselých podmínek se srážejí (pH < 2), přičemž v roztoku koagulují a jsou omezeně rozpustné ve vodě. Je možné je vyextrahovat alkalickým loužením z vhodné přírodní matrice a následným okyselením výluhu. [28] Po lyofilizaci získávají HK rombický nebo rhombohedrální tvar (jako krystalek cukru) a získávají elektrostatický náboj. Dochází u nich k rozkladu při zahřívání, a to ve vzduchu, kyslíku i vakuu. Při zahřívání ve vakuu vznikají látky podobné pryskyřicím, přičemž je proces vzniku doprovázen postupným uvolňováním vody. Stejně jako v případě FK rozklad probíhá bez procesu hoření, ale postupným zuhelnáváním. Avšak v přítomnosti oxidačního činidla může začít hořet při 150–240 °C. Nevratné změny lze pozorovat při zahřátí nad 105 °C, přičemž v teplotním intervalu 25–105 °C dochází ke ztrátě volné a semikrystalické vody [24].

Schopnost tvořit koloidy stoupá se zvyšující se koncentrací a v přítomnosti kovových iontů a klesá s narůstajícím pH. Dále bylo prokázáno, že díky svému amfifilnímu charakteru jsou molekuly HK schopny tvořit micely v bazických vodných roztocích, i když za relativně vysokých koncentrací. Kvůli těmto vlastnostem společně s širokou škálou molekulové hmotnosti HK není snadné přesně určit molární hmotnost koloidních sloučenin. I přes množství vědeckých článků zabývajících se tímto tématem zůstává molekulová hmotnost HK nejasná [29].

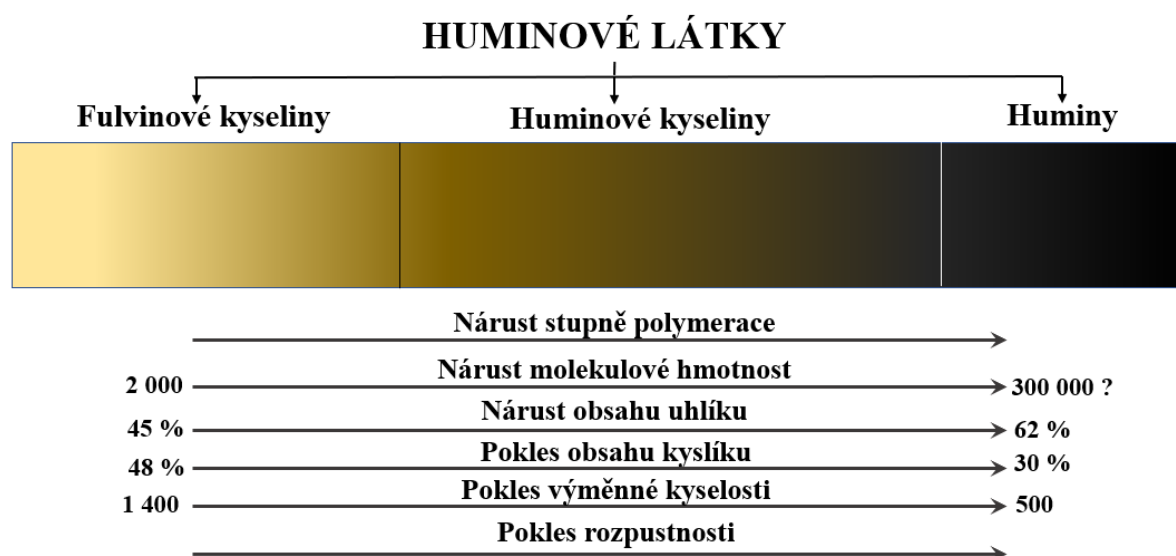
Huminové kyseliny jsou uváděny jako hlavní nosiče ovlivňující mobilitu znečišťujících látek, které mají negativní dopad na životní prostředí. Z toho důvodu byla rozsáhle zkoumána jejich chemická struktura a adsorpční vlastnosti [29].

Struktura HK se skládá z aromatických kruhů a alkylových řetězců nesoucích rozmanité funkční skupiny, zejména karboxylové, fenolové, hydroxylové a chinonové skupiny. HK může vázat kationty elektrostatickými interakcemi, neiontové organické sloučeniny vodíkovými vazbami, dipól-dipól interakcemi či hydrofobními reakcemi. Vazebné možnosti HK umožňují jejich využití jako adsorbent v zařízeních na čištění odpadních vod. Na druhou stranu nelze HK odstranit z vody pomocí standardních oxidačních procesů, existují však jiné metody jako je adsorpce či pokročilé oxidační procesy [29].

Huminy

Nejsou rozpustné ani v kyselých ani v bazických roztocích. Nelze je tedy připravit ani mnohonásobnou bazickou extrakcí. Jsou mnohem kondenzovanější a silněji dehydrované než huminové kyseliny [12]. Huminy se často považují za směs huminových látek pevně vázaných na půdní anorganické koloidy, což je důvod jejich nerozpustnosti [27]. Podle jiných zdrojů je humin silně karbonizovaná organická hmota považovaná za nerozpustnou HK. [12] Humin je méně aromatický jak HK, což je zdůvodněno vyšším obsahem alifatických polysacharidů, což také způsobuje jeho nerozpustnost v alkalických roztocích. Vyšší obsah polysacharidů v huminu je považován za hlavní rozdíl mezi strukturou HK a huminem, ačkoli v poslední době je brán zřetel spíše na sloučeniny vyšších mastných kyselin (vosky) a látek bílkovinné povahy obsažené v huminu jakožto rozdíl ve struktuře. Předpokládá se, že tyto sloučeniny pocházejí z degradace zbytků stélnatých rostlin při procesu tvorby rašeliny [24].

Vykazují vysoký stupeň kondenzace a polymerizace, nehydrolyzují a podle Najmra ztratily funkci pravého humusu. Dusík obsažený v huminu představuje 20–30 % z celkového dusíku v půdě. [12]



Obrázek 7: Dělení huminových látek dle Stevenson (1982) [30].

2.3.2 Vznik huminových látek

Huminové látky jsou výsledkem biochemických reakcí organické hmoty, rostlinných a živočišných zbytků. Proces humifikace probíhá současně s procesy spojenými se štěpením chemických vazeb a mineralizace. Prvním krokem humifikace je rozklad komplexních molekul organického substrátu na menší, v druhém kroku dochází k syntéze a případně i k resyntéze jednoduchých sloučenin, v jejichž důsledku se vytváří huminové látky. Navzdory různým metodám někteří autoři tvrdí, že průběh těchto procesů závisí na organickém substrátu, typu a prostředí. Hlavním zdrojem organické hmoty v půdě je rostlinný substrát, kterému dominuje lignin, polypeptidy a polysacharidy. [31]

V dalších oborech jako je geologie, geochemie, hydrologie aj. se můžeme setkat s označením humifikace jakožto diagenese. S termínem diagenese se pracovalo v podkapitole 2.1 pojednávající o vzniku uhlí, kde byla označována jako fáze, při které docházelo k chemickým, fyzikálním a biologickým změnám anorganických a organických sedimentů. Množství geologických termínů infiltrovaných do terminologie oboru chemie huminových látek přineslo množství pokroků ve výzkumu, ale zároveň i zmatek a kontroverzi. Geologové a geochemici označovali produkt diagenese jako geopolymer. McSween a kol. [32] zmínili, že v půdních systémech je produktem diagenese humin, kdežto v bažinách lignit a/nebo uhlí. V mořských oblastech a lagunách předpokládali vznik kerogenu. Je však všeobecně známo, že kerogen se tvoří z huminu a humin je produktem rozkladu rostlinných zbytků. To je v rozporu s tvrzením McSweena. Další autoři proto rozdělují kerogen na sapropelový; planktonický, pocházející ze zbytků vodních organismů; huminový a zbytkový kerogen pocházející z rostlinných zbytků v pobřežních oblastech. [24]

Bylo představeno několik způsobů vzniku huminových látek v průběhu procesu humifikace, avšak doposud není znám přesný mechanismus. Seřazeno chronologicky dle vzniku jimi jsou teorie mikrobiální syntézy, ligninová teorie, polyfenolová teorie, teorie autolýzy a teorie kondenzace sacharidů s aminy.

V případě konvenčního biopolymerního konceptu vzniku huminových látek existují dvě možné cesty, které se liší ve využití organického materiálu při syntéze huminových látek. První starší zavedená cesta předpokládá dekompozici rostlinných biopolymerů na monomery a menší organické složky. Huminové látky poté vznikají interakcemi mezi malými organickými fragmenty následovanou kondenzací a/nebo polymerací. Jako první vznikají fulvinové kyseliny, ze kterých poté vznikají huminové kyseliny. Do této kategorie patří polyfenolová teorie a teorie kondenzace sacharidů s aminy. V druhém případě Hedges [33] rozpoznával další dvě možné cesty vedoucí ke vzniku huminových látek. První nazval jako *degradaci biopolymerů*. Předpokládá, že mírně pozměněné biopolymery v rostlinách jsou transformovány hned na huminové kyseliny, které se postupně rozpadají na fulvinové kyseliny a poté ještě na menší sloučeniny. Část těchto malých sloučenin mineralizuje či se ztrácí loužením, další část je naopak využita pro zpětné vytvoření huminových kyselin. Rekonstrukce huminových kyselin je druhá možná cesta vzniku a nazval ji *abiotická kondenzace*. Jako příklad, který měl podpořit druhou variantu vzniku, byla ligninová teorie od Flaiga.

Teorie mikrobiální syntézy

Tato teorie vypracována Tpycovem [34] v roce 1914 předpokládala, že půdní mikroorganismy využívají rostlinou tkáň jako zdroj uhlíku a energie pro pohánění intracelulárních procesů vedoucích ke tvorbě vysokomolekulárních látek. Poté, co mikroorganismus zahyne, se tyto látky uvolňují do půdy. V druhém kroku se činností mikroorganismu, nyní extracelulárně, látky rozkládají na huminové kyseliny, fulvinové kyseliny a případně až na CO₂ a vodu. [11; 35] Na Obrázku 9 je tato teorie vyznačena jako cesta číslo 1.

Ligninová teorie

Teorie předpokládá, že jediným prekurzorem huminových látek je lignin, kutin nebo melanin pocházející z rostlinných zbytků [25]. Lignin podléhá rozkladu půdními mikroorganismy. Dochází k odštěpení methoxylové (–OCH₃) skupiny, čímž se zvýší množství fenolických skupin vznikem hydrochinonů. Oxidací alifatických částí molekuly dochází ke vzniku karboxylových skupin (COOH). Hydrochinon se dále může oxidovat na p-benzochinon, který podléhá kondenzačním reakcím s polypeptidy a NH₃, které vznikly rozkladem organických látek bohatých na dusík činností mikroorganismů [36]. Tímto procesem jako první vznikají vysokomolekulární huminy, které další oxidací tvoří huminové kyseliny a nakonec fulvinové kyseliny. Pokud degradační proces pokračuje, jsou huminové látky pomalu rozloženy až na oxid uhličitý a vodu [25]. Na Obrázku 9 je tato teorie vyznačena jako cesta číslo 2.

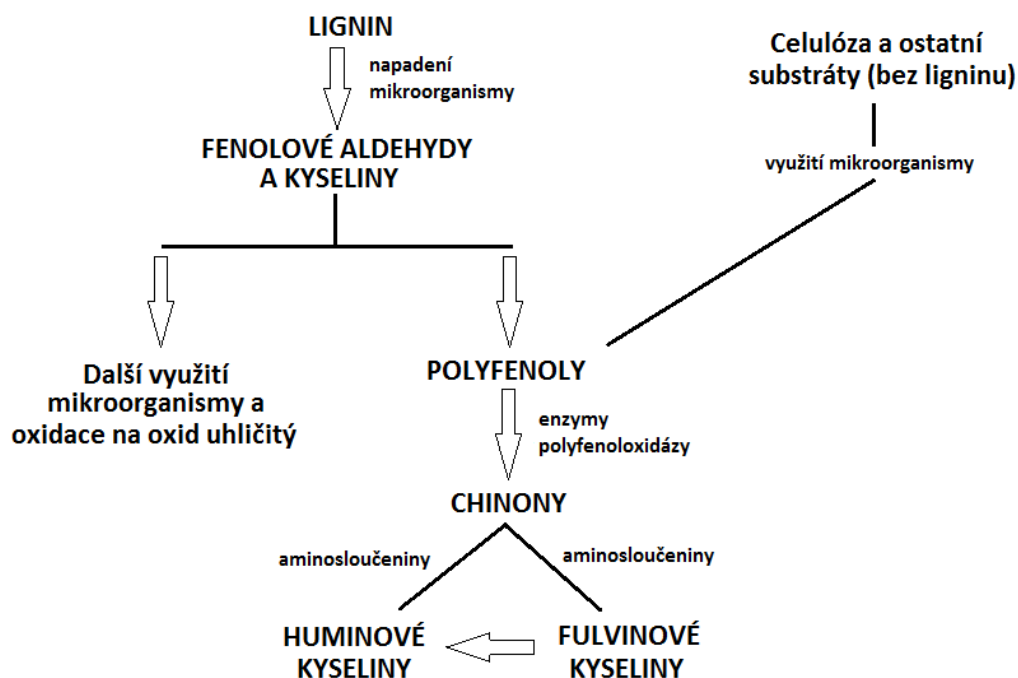
Druhou možnou cestou je, dle Waksmana [20], že lignin je činností mikroorganismů pouze modifikován. Modifikace spočívá v demethylaci a zkracování alifatických bočních řetězců a jejich nahrazení karboxylovými skupinami. Poté je lignin obohacen o dusík abiotickou kondenzací s polypeptidy vedoucí ke vzniku Schiffových bází. Následně vznikají huminové kyseliny, které se poté fragmentují na jednodušší fulvinové kyseliny. [31] Na Obrázku 9 je tato teorie vyznačena jako cesta číslo 3.

Stevenson pojmenoval tuto teorii jako „ligninová“, což je zavádějící. První zmíněnou cestu můžeme nazvat přesněji jako lignin-polyfenolovou teorii, v druhém případě se nepovažuje za klíčovou složku pouze lignin, ale i aminokyseliny (proteiny), proto by se měla nazývat spíše lignin-proteinová teorie. [24].

Polyfenolová teorie

Tato teorie se nazývá polyfenolová podle Stevensona [37] nebo teorie feonolové autooxidace podle Ziechmanna [38] (1994), podle Tana [24] by se měla nazývat fenol-proteinová teorie analogicky k lignino-proteinové teorii. Podle této teorie jsou základními stavebními jednotkami huminových látek polyfenoly, které pochází z ligninu nebo byly syntetizovány mikroorganismy ze sacharidů, čímž se liší od ligninové teorie. Nejdříve dochází k rozkladu rostlinných polymerů na monomerní strukturní jednotky. Poté, co se přeruší vazba mezi ligninem a celulózą během rozkladu rostlinných zbytků, jsou postranní řetězce oxidovány a demetylovány a tvoří se polyfenoly, které jsou enzymaticky transformovány na chinony. Chinony poté reagují s látkami obsahujícími dusík a polymerují za vzniku huminových látek se zvyšující se komplexností. Nejdříve by byly formovány fulvinové kyseliny, poté huminové

kyseliny, a nakonec huminy a kerogen [24; 36]. Na Obrázku 9 je tato teorie vyznačena jako cesta číslo 4.



Obrázek 8: Polyfenolová teorie [36].

Teorie autolýzy

Podle této teorie jsou huminové látky produktem enzymatické autolýzy mrtvých rostlinných a mikrobiálních buněk. Výsledné buněčné zbytky (cukry, aminokyseliny, fenoly a jiné aromatické sloučeniny) podléhají náhodné kondenzaci a volné radikálové polymeraci [11]. Na Obrázku 9 je tato teorie vyznačen jako cesta číslo 5.

Kondenzace sacharidů s aminy

Vznik huminových látek je založen na neenzymatické kondenzaci redukujícího sacharidu s aminosloučeninami, které jsou vedlejšími produkty mikrobiálního metabolismu a následnou polymerizací [36].

Dle Maillarda [39] je prvním krokem kondenzace aminoskupiny v aminokyselinách s aldehydickou skupinou sacharidů, při které vzniká Schiffova báze a N-substituovaný glykosylamin. Poté postupným přeskupováním a reakcemi dochází k fragmentaci, odštěpení vody a k tvorbě tříuhlíkatých aldehydů a ketonů (např. acetal, glyceraldehyd, dyhydroxyaceton, ...). Všechny tyto sloučeniny jsou vysoce reaktivní a ihned polymerují v přítomnosti aminosloučenin na hnědě zbarvený produkt podobný huminovým látkám [36].

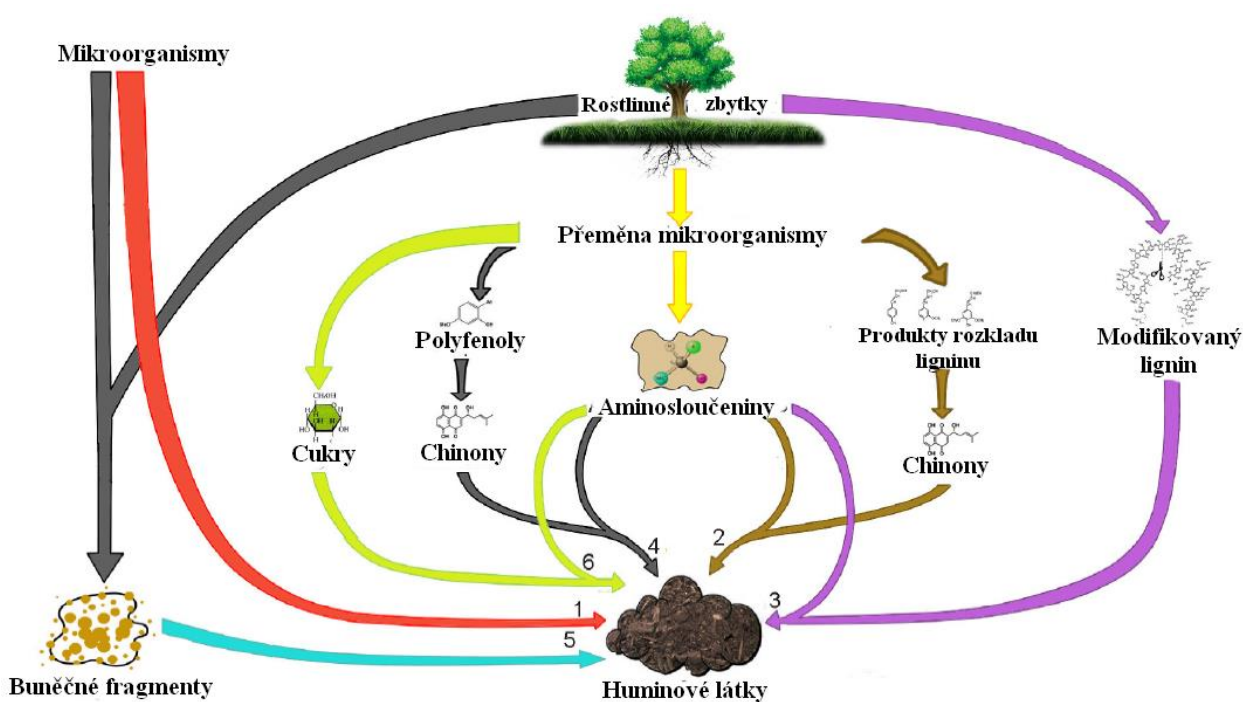
Dle Ziechmanna a Stevensona se na glycin substituují aminová skupina, která následně reaguje s glukózou na glukosylamin. Poté dochází k přeměně glykosylaminu na malanoidiny a následnou polymerací nebo kondenzací vznikají huminové látky. [24]

Podle této teorie do tvorby huminových látek nemusí být zakomponována činnost mikroorganismů a mohou vznikat čistě chemicky, s výjimkou tvorby cukrů z uhlíkatých látek a aminokyselin z proteinů. Ačkoliv jsou reaktanty produktem mikroorganismů, kondenzační reakce jsou pomalejší při běžných půdních teplotách. Tato teorie by se uplatnila spíše pro

půdy s nižším obsahem ligninu a v půdách s výraznými a častými změnami prostředí jako jsou například sucho, mokro, mráz atd. [36] Na Obrázku 9 je tato teorie vyznačena jako cesta číslo 6.

Soil continuum model

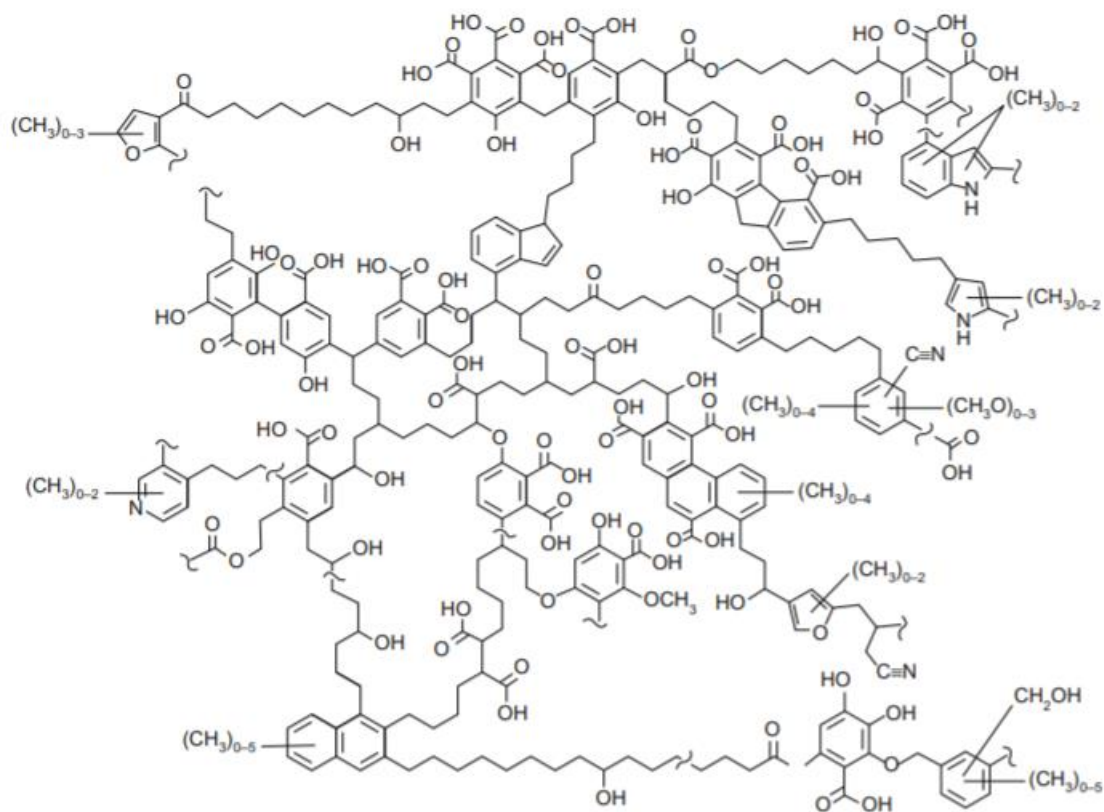
Tato teorie vylučuje jakýkoliv vznik a výskyt HL. Autoři (Lehmann a Kleber) zmínili, že z dlouhodobého hlediska jakákoliv frakce organické rostlinné či živočišné hmoty nakonec podlehnou rozkladu na CO_2 a vodu. Proto nelze pohlížet na půdní organickou hmotu nebo huminové látky jako na velké a odolné chemicky specifické makromolekuly, ale jako na kontinuum organických fragmentů všech velikostí pokrývající celou škálu látek, od neporušené rostlinné hmoty po vysoce oxidovaný uhlík v karboxylové kyselině. Tyto fragmenty jsou nepřetržitě zpracovávány mikroorganismy směrem k menší molekulové velikosti [35].



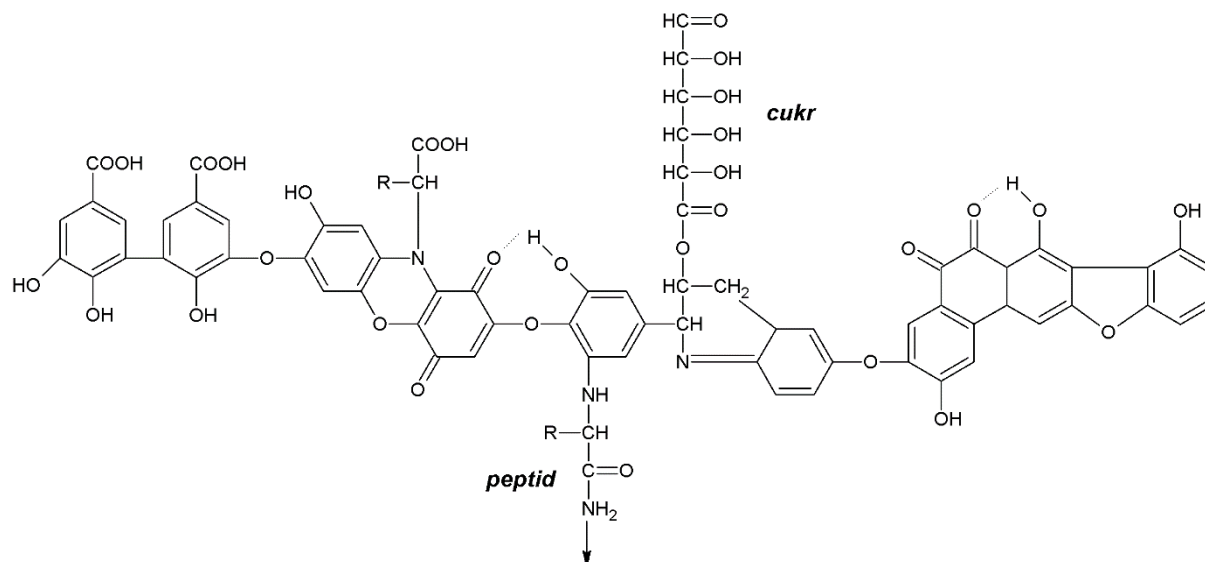
Obrázek 9: Přehled jednotlivých teorií vzniku huminových látek [35].

2.3.3 Molekulární struktura

Struktura huminových látek je velmi složitá. Znalost strukturního složení huminových kyselin je nezbytná pro pochopení jejich možných fyzikálně-chemických vlastností. Nejdůležitější vlastností huminových látek, která je klíčová pro jejich výzkum, je molekulová hmotnost. Molekulová hmotnost udává konformační strukturu (tvar a velikost) a dokonce i reaktivitu. S rozvojem moderních analytických metod se rozšířily i možnosti zkoumání a v současnosti existují dva pohledy na strukturu huminových látek: původní pohled jako na makromolekuly s lineární strukturou a v dnešní době více diskutovaný pohled jako na supramolekulární agregáty relativně malých heterogenních molekul stabilizovaných disperzními hydrofobními interakcemi [40].



Obrázek 11: 2D struktura dle Schnitzera a Schultena [44].



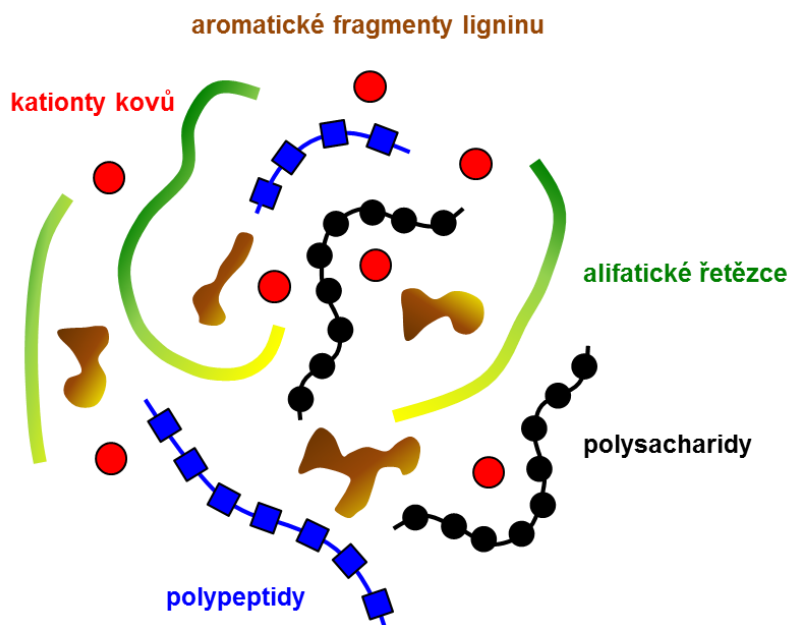
Obrázek 12: Struktura podle Stevensona [37].

První pochybnosti o polymerním modelu vznesl Wershaw ve své studii v roce 1986 [45]. Pro studium velikosti částic využil metody rentgenového rozptylu s malým úhlem v případě HK v roztoku a adsorpční chromatografie na dextranových gelech v případě jejich frakcí. Předpokládal vznik amfifilních částic vzniklých depolymerací a oxidací lipidových a aromatických sloučenin pocházejících z rostlinných zbytků. Dle Wershava se hydrofobní

část amfifilní částice skládala z nepozměněných fragmentů původního biopolymeru. Jako součást hydrofilní skupiny označil karboxylové kyseliny vytvořené oxidací fragmentů, které vznikly depolymerací biopolymerů. V jeho modelu jsou agregáty drženy pohromadě hydrofobními silami a vodíkovými můstky a v roztocích tvoří micely, zatímco v půdě tvoří dvojvrstvou membránu pokrývající minerální zrna. [46] Wershawův micelární model reprezentoval významný pokrok, avšak stále nevysvětloval značné rozdíly v molekulové hmotnosti, protože byl stále založen na polymerní povaze agregovaných huminových molekul [31].

Významný průlom nastal až s pokrokem v instrumentální analýze a s metodami jako jsou SEC, C-NMR, MS aj. Mezi nejvýznamnější práce patří studie Piccola a kol. (1996a, b). Metodou SEC pozorovali reverzibilní hypsochromní posun maxima absorpce při 280 nm z oblasti vysoké molekulové velikosti k nízké, při okyselení různými organickými kyselinami z pH 9,2 na 2 před elucí v pufru. Usuzovali, že důvodem tohoto chování je, že huminové látky jsou micelární asociáty, které jsou stabilizovány převážně hydrofobními silami při pH 7. Domnívali se, že organické kyseliny pronikaly do hydrofobního jádra micelární struktury během ztráty kyselého charakteru huminových látek při změně pH z 7 na 2. Došlo by k asociování organických kyselin a huminových látek, kvůli amfifilním vlastnostem kyseliny, schopné reagovat jak s hydrofilními, tak s hydrofobními částmi huminových agregátů. Tyto interakce byly schopné narušit slabé síly, které stabilizují huminovou strukturu. Následná chromatografická eluce oddělovala malé podjednotky tvořící agregát a bránila zpětné tvorbě agregátu, ke které by docházelo za statických podmínek. [47; 48]

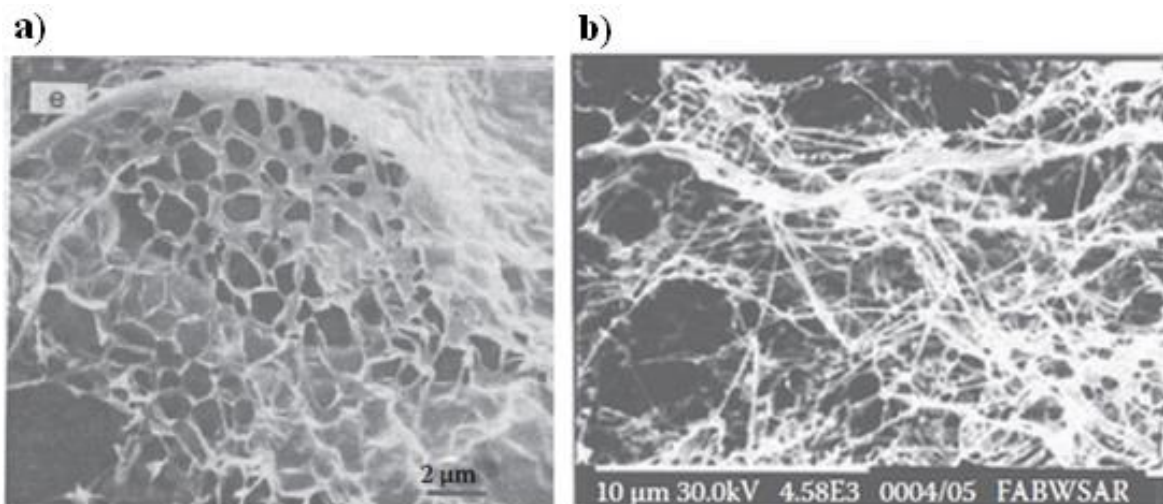
Výsledkem následujících studií je tvrzení, že huminové látky jsou relativně malé heterogenní molekuly, které se samovolně uspořádávají do supramolekulárních struktur. Oproti polymernímu modelu nejsou mezi sebou vázány kovalentními vazbami, ale jsou stabilizovány slabými ne vazebnými interakcemi, jako jsou hydrofobní interakce, π - π vazby, van der Waalsovy síly, CH- π vazby a při nízkých hodnotách pH i vodíkovými můstky. Právě kvůli těmto vazbám jsou agregáty mnohem méně stabilní jak sloučeniny diskutované v polymerním modelu a mají tendenci k snadné deagregaci, zejména při vysokých teplotách či v kyselém prostředí. Konstituční jednotky agregátu se tedy mohou kdykoliv jednoduše přeuspořádat do termodynamicky nejstabilnější konformace. Právě tato vlastnost je v supramolekulárním modelu klíčová v kontrastu s polymerním modelem. [47; 49] Dle studie předložené Simpsonem [50] jsou supramolekulární agregáty tvořeny nízkomolekulárními (<2000 Da) fragmenty, jako jsou alifatické kyseliny, ethery, estery a alkoholy, aromatické sloučeniny odštěpené z ligninu, polysacharidy a polypeptidy; poutané k sobě výše zmíněnými silami, a proces agregace je iniciován kovovým kationtem.



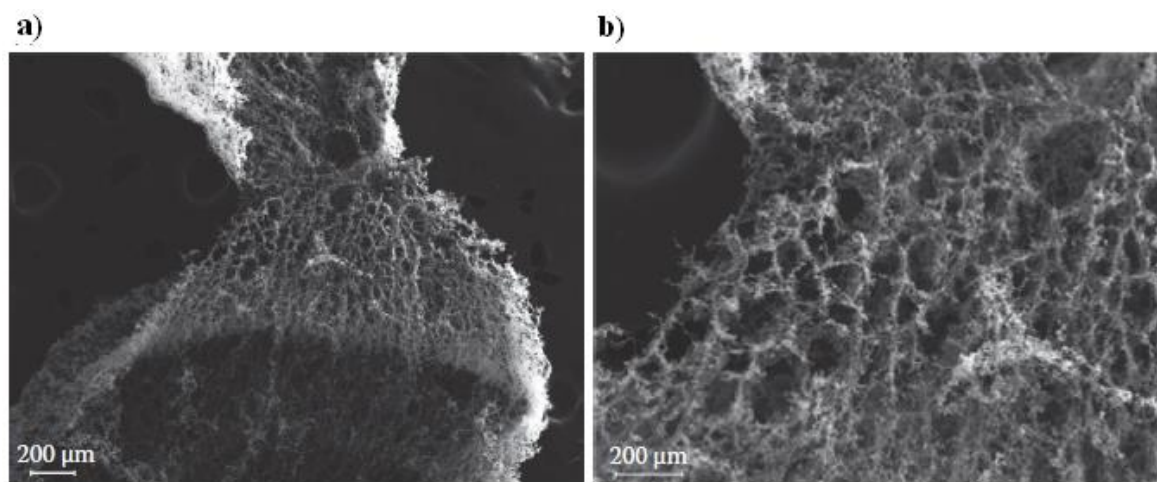
Obrázek 13: Supramolekulární struktura dle Simpsona [50].

I v současnosti jsou vydávány vědecké články vypovídající o polymerní struktuře huminových látek či o kombinaci obou modelů. Dle těchto publikací jsou huminové látky směs velkého množství chemicky individuálních sloučenin s polymerním charakterem. Některé z novějších studií popisují alkyl-aromatickou strukturu molekul huminových kyselin. Aromatické kruhy hydrofenuolu a alifatické zbytky uhlohydrátů, proteinů a aminokyselin jsou spojeny kyslíkovými můstky ($-O-$), dusíkem ($-N-$), sírou ($-S-$) a $-CH_2-$ a $-NH-$ a jinými funkčními skupinami: karboxylovými, fenolickými, alkoholovými, chinonovými, ketonovými, methoxy, amino a amidovými, které jsou velmi důležitými stavebními kameny určující řadu vlastností HL. Tvar molekuly HK v roztoku závisí na vlastnostech rozpouštědla (koncentrace, pH, iontová síla) avšak předpokládají, že to jsou sférokoloidy s porózní strukturou o molekulové hmotnosti v rozmezí $2000-300\,000\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$. Nízkomolekulární frakce jsou tvořeny fulvinovými kyselinami a vysokomolekulární frakce huminovými kyselinami [24].

Tan ve své studii [24] využil rastrovacího elektronového mikroskopu pro zkoumání struktury huminových látek. Struktura fulvinové kyseliny extrahované z půdy byla podobná rybářské síti, která je charakteristická pro nanotrubičky (Obrázek 14a). Pozoroval dlouhé vláknité molekuly fulvinových kyselin extrahované z přírodních vod spojené van der Waalsovými silami tvořícími shluk nanotrubiček (Obrázek 14b). V případě huminových kyselin, extrahovaných z lignitu, pozoroval nanotrubičkovou membránovou strukturu podobající se včelí plástvi (Obrázek 15). Tato struktura je termodynamicky nejstabilnější konformací, která může vzniknout samovolným uspořádáním. Nanotrubičky jsou dle autora stabilizované taky nanotečkami (nanobuds), což jsou fullereny kovalentně navázané na obvod nanotrubičky.



Obrázek 14: Mikrograf SEM, a) struktura půdní FK podobající se rybářské síti, b) struktura FK extrahované z přírodních vod [24].



Obrázek 15: Mikrogram SEM, a) porušená nanotrubičková membránová struktura HK, b) přiblížení na oblast s rozpoznatelnou strukturou podobající se včelí plástvi [24].

V roce 2015 byla publikována studie [51], která prezentovala huminové látky jako hierarchický samovolně uspořádávající se systém skládající se ze tří složek, a to z neamfifilní, amfifilní a lipidové frakce. V první hierarchické úrovni se samovolně uspořádávají amfifilní složky s lipidovými, druhá úroveň je výsledkem uspořádání první vrstvy s neamfifilními složkami. Zatímco v druhé úrovni je struktura huminu a huminové kyseliny podobná, v první úrovni je huminová kyselina tvořena převážně amfifilními složkami a humin převážně lipidovou složkou.

Na základě rozšířené teorie vodíkových vazeb od autorů Gilli a Ni [52; 53], dle kterých jsou molekuly organických látek spojeny také silnými, negativními, elektrostaticky podporovanými vodíkovými můstky (CAHB – charge-assisted H-bond), které jsou silnější než vodíkové můstky mezi molekulami vody a organické hmoty, byl vytvořen nový možný supramolekulární model [54]. Tento model pojednává o huminových látkách jako o supramolekulárních agregátech skládajících se z metachemických hydrogelů (o průměru

$\leq 1 \mu\text{m}$) spojených výše zmíněnými silnými (téměř kovalentní) vodíkovými můstky, které jsou zapouzdřeny v dispergovatelných fyzikálních hydrogelových scaffoldech (o průměru $>1 \mu\text{m}$) spojených nekovalentními slabými intermolekulárními silami. Dohromady tedy tvoří hierarchickou supramolekulární strukturu, která se samovolně uspořádává do vyšší supramolekulární struktury [55].

2.3.4 Rozdělení organické hmoty dle polaritý rozpouštědla

Frakcionace je proces rozdělování organické hmoty dle specifických vlastností souvisejících s jejich strukturou a je prováděna za účelem co největšího snížení heterogenity. Snížení heterogenity a rozdělení na frakce usnadňuje fyzikálně-chemickou charakterizaci. Organická rozpouštědla se využívají pro extrakci/frakcionaci a sekvenční extrakci po dlouho dobu. Příkladem může být separace hymatomelanové kyseliny získaná extrakcí ethanolem v roce 1919 Odenem. [16]

Dle [56] by rozpouštědlo mělo splňovat dvě podmínky:

1. Neovlivňuje chemické a fyzikální vlastnosti extrahované látky.
2. Je schopno kvantitativně odstranit nebo izolovat huminovou látku z půdy.

Většina rozpouštědel používaných pro extrakci či frakcionaci jsou polární. Polární látky mají permanentní elektrický dipól, vzniklý rozdílnou elektronegativitou atomů v molekule. Polárnost charakterizuje dipólový moment μ , který se pohybuje v rozmezí 1,15 Debye (D) (diethyether, chloroform) až po 5,54 D (hexamethylforsforamid). Látky, které nemají dipólový moment, se nazývají nepolární. Mezi nepolární se řadí většina uhlovodíků, ale ne všechny, například toluene vykazuje dipólový moment (0,34 D). Rozpouštědla používaná pro extrakci se rozdělují do několika tříd [57]. Některé fyzikálně-chemické vlastnosti rozpouštědel využitých v této diplomové práci jsou zmíněny v Tabulce 4.

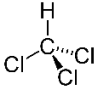
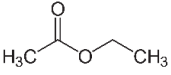



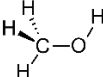
Látka se rozpustí v rozpouštědle, když jsou přitažlivé síly mezi molekulami rozpouštědla a rozpouštěné látky podobně silné. Nejdůležitějšími parametry organických rozpouštědel používaných pro rozdělení organické hmoty jsou bazicita systému, schopnost utvářet a rozrušovat vodíkové vazby, dielektrická konstanta a dipólový moment. Bod varu, viskozita a hustota neovlivňují proces izolace, ale je nutné s nimi počítat při znovuzískávání izolované látky z rozpouštědla [58]. Obecně platí, že méně polární látky se snáze rozpouštějí v rozpouštědlech s nižší dielektrickou konstantou a naopak. Je však nutné brát v potaz, že samotný rozsah rozpustnosti látky je závislý také na zapojení specifických interakcí a zejména vodíkových vazeb.

Nepolární rozpouštědla se využívají převážně před extrakcí pro odstranění nehuminových látek (jako jsou tuky či vosky). [16] Huminové kyseliny obsahují 95 % pevně vázaných mastných kyselin pravděpodobně esterovou vazbou na fenol a zbylých 5 % tvoří slabě vázané mastné kyseliny pravděpodobně adsorbované na povrchu HK [11].

V případě extrakce lipidů závisí na výběru rozpouštědla, protože ne všechny lipidy jsou rozpustné v běžných nepolárních rozpouštědlech. Například lipidy spojené s proteiny nebo cukry, či soli těžkých kovů vysokomolekulárních mastných kyselin jsou nerozpustné v nepolárních rozpouštědlech, jako jsou například ethery. Pokud je v extrakční směsi přítomen methanol či jiné polární organické rozpouštědlo, tak dochází k rozbití

lipoproteinových či glykoproteinových komplexů. Methanol je dokonce i účinný pro extrakci solí těžkých kovů mastných kyselin. Další výhodou polárních rozpouštědel, jako jsou methanol, ethanol či aceton, je jejich schopnost extrahovat anorganické a nelipidické organické sloučeniny [56]. Koncept pro odhad rozpustnosti na základě parametrů rozpustnosti byl představen Hildebrandem et al. [59] a Hansenem [60].

Tabulka 4: Vlastnosti organických rozpouštědel využitých v experimentální části.

název	vzorec	typ	bod varu (°C) [61]	dielektrická konstanta [61]	hustota (g/mL) [61]	dipólový moment (D) [61]	relativní polarita [62]
chloroform		nepolární ¹	61,20	4,80	1,498	1,00	0,259
ethylacetát		polární aprotické	77,00	6,00	0,894	1,78	0,228
aceton		polární aprotické	56,20	21,00	0,786	2,85	0,355
acetonitril		polární aprotické	81,60	37,50	0,786	3,50	0,460
n-propanol		polární protické	97,00	22,00	0,803	1,68	0,617
methanol		polární protické	64,60	33,00	0,791	1,60	0,762

¹ Z hlediska rozpustnosti ve vodě je považován za nepolární rozpouštědlo (rozpustnost 8 g/L při laboratorní teplotě), z hlediska relativní polarity a dielektrické konstanty je považován za polární aprotické rozpouštědlo.

2.3.5 Využití huminových látek

Huminové látky jsou jakožto unikátní materiál hojně využívány v různých oblastech lidské činnosti. Z počátku byly spalovány v elektrárnách jakožto součást uhelných paliv, avšak s pokrokem výzkumu a vzrůstající tendencí omezovat spalování uhlí se huminové látky začaly více uplatňovat v dalších oblastech jako je zemědělství, průmysl, ochrana životního prostředí či lékařství.

Využití v zemědělství

Huminové látky mají příznivý vliv na fyzikální, chemické a biologické vlastnosti půdy. HK napomáhají k vytváření pórů v půdě formou agregace částic půdy, asistují při transportu mikroživin z půdy a stimulují vývoj mikroflóry v půdě. Vzniklá drobkovitá struktura zvyšuje dobu po kterou půda zadržuje vodu a rychlost výměny plynů mezi půdou a okolím. HL jsou zdrojem minerálních a organických látek, které jsou následně využity jako zdroj energie při biologických procesech v půdě [63]. Huminové látky jsou schopné tvořit rozpustné i nerozpustné komplexy s kovy. Předpokládá se dvojí efekt huminových látek. Fulvokyseliny, tvořící převážně rozpustné cheláty kovů, napomáhají k transportu prospěšných biogenních

kovů ke kořenovému systému rostlin. Naopak huminové kyseliny tvoří převážně, ale ne vždy, nerozpustné cheláty kovů a mohou na sebe vázat toxické kovy [24]. HL jsou schopné vázat také oxidy a hydroxidy a pomalu je uvolňovat. Zabraňují vzniku půdních prasklin a půdní eroze slučováním koloidu. Dále mají schopnost regulovat hodnoty pH v půdě a zvyšují pufrční schopnosti půdy [64].

Huminové látky se přidávají do hnojiv jako aditivum ve formě solí, jako humát vápenatý aplikovaný přímo na listy nebo humát amonný [63]. Efekt huminových látek na vlastnosti půdy závisí na jejich koncentraci. Nízké koncentrace (do $1000 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$) zlepšují příjem živin a hormonální efektivitu. Při koncentracích nad $1000 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ dochází k výraznému nárůstu obsahu živin (N, P, K, Ca, Mg, Fe, Zn) v listech a ve stonku, avšak na úkor úbytku některých jiných živin [65].

Průmyslové využití

S huminovými látkami je možné se setkat ve stavebnictví, kde se používají například jako aditivum do cementu napomáhající usazování betonu, dále v kožedělnictví při prvotní úpravě kůže, barvení, procesu činění a jako součást roztoku při její finální úpravě. V keramickém průmyslu se využívají jako aditiva zvyšující mechanickou odolnost nevypálené keramiky a zlepšující její odlévání. V dřevozpracovatelském průmyslu se využívají na přípravu „přírodního indiga“ pro barvení dřevěných dýh a jako složka vodorozpustných barev na nábytek. Rovněž nalézají využití pro barvení PVC či Nylonu 6, jako tužidlo polyuretanových pěn nebo jako součást změkčovadla při výrobě PVC. Své uplatnění nalézají i při výrobě papíru. Jsou součástí nejrůznějších částí výrobního procesu, například při výrobě papíru s vysokou pevností v tahu, při výrobě elektrovedivého papíru nebo při recyklaci papíru. Huminové látky se používají jako iontoměniče, jako zdroj syntetického uhlíku a při extrakci uranu z rudy [63].

Ochrana životního prostředí

Huminové látky mohou interagovat se širokou škálou xenobiotik. Pro ochranu životního prostředí je významná jejich schopnost tvořit nerozpustné komplexy s kovy, včetně radionuklidů, s jejich oxidy a hydroxidy [63], a také sorpce či jiné interakce s organickými hydrofobními látkami, pesticidy, detergenty či barvivy [66]. Iontoměničové látky založené na humátu vápenatém jsou schopné vázat těžké kovy jako železo, nikl, rtuť, kadmium a měď a odstraňovat je z vod, či odstraňovat radioaktivní prvky z chladicí vody z jaderných elektráren. Materiály obsahující humus jsou schopné sorbovat plyny, což je využitelné například pro odstraňování odpadních plynů z kafilérií či k čištění zemního plynu od sirovodíku a thiolů, a spalin od oxidu siřičitého [63]. Huminové látky a převážně huminová kyselina, se jeví jako vhodná látka pro detoxikaci látek kontaminujících životní prostředí [64].

Aplikace v biomedicině a lékařství

Huminové látky se hojně využívají také v medicíně a veterinářství. Historicky nejrozšířenější a nejdůležitější aplikací huminových látek je balneoterapie a hydroterapie [67]. Jejich medicínské uplatnění umocňují antivirové, chelační a protizánětlivé schopnosti a podpora aktivity estrogenu. Některé studie dokonce popisují huminové látky a převážně fulvinové

kyseliny jako látky chránící před vznikem rakoviny či pozastavující její průběh. Jejich další rozvoj však ohrožuje fakt, že huminové kyseliny mohou být toxickým činitelem poškozujícím buňky savců, avšak samotný mechanismus cytotoxicity je neznámý. Zjistilo se, že HK podávaná potkanům profylakticky snižuje poškození žaludku ethanolem [63].

2.4 Současný stav řešené problematiky

Nejreaktivnější a nejvýznamnější složkou půdní hmoty jsou bezpochyby huminové látky, vzniklé chemickou a biologickou degradací rostlinných a živočišných zbytků. Nejen, že jsou klíčové v ekosystémech jako regulátor globálních cyklů uhlíku a dusíku, ale příznivě ovlivňují také růst rostlin a mikroorganismů, podílí se na transportu antropogenních sloučenin a těžkých kovů a stabilizují půdu. Doposud však nebyla rozvinuta žádná technologie řídicí aktivitu huminových látek, kvůli jejich strukturní komplexnosti. Pro charakterizaci HL lze použít mnoho analytických metod, jako jsou oxidační a redukční degradační reakce, UV/VIS a fluorescenční spektroskopie, ^{13}C -NMR spektroskopie, HPSEC (vysokoúčinná SEC), plynová chromatografie s hmotnostní spektrometrií (GC/MS), hmotnostní spektrometrie s elektrosprejovou ionizací (ESI/MS), sorpce na pevných maticích a další. Nicméně žádná z těchto technik sama o sobě nebyla shledána dostatečnou k objasnění struktury huminových molekul. Obecně se považují HL za supramolekulární agregáty heterogenních a relativně malých molekul, které jsou drženy pohromadě slabými nekovalentními interakcemi, jako jsou vodíkové můstky a hydrofobní síly. Zmíněná komplexnost HL může být snížena postupným rozrušováním intramolekulárních vazeb, které stabilizují huminový supramolekulární agregát, a následně mohou být izolovány jednotlivé frakce. Frakce lze poté strukturně identifikovat kombinací pokročilých analytických metod [68].

Cílem frakcionace je usnadnit stanovení fyzikálních a chemických vlastností, určit rozsah variací vlastností a charakterizovat či určit otisku prstu – „fingerprint“ [69]. V současnosti existuje mnoho chemických a fyzikálních metod pro frakcionaci HL. Chemické metody jsou založeny na rozdílných fyzikálně-chemických vlastnostech HL, jako jsou rozdíly v rozpustnosti, náboji, adsorpci, hustotě, velikosti částic a molekulové hmotnosti. Z fyzikálních metod jsou nejvýznamnějšími filtrace a centrifugace, dále se setkáváme i s proséváním, ultrazvukovou, mechanickou a chemickou dispergací, nebo separací usazováním částic různé hustoty [24].

Filtrace

Nejčastěji využívanou metodou filtrace je ultrafiltrace s použitím filtrů různých velikostí pórů. Filtry obecně separují na základě lineární velikosti nebo rozměrů, ne nutně dle molekulové velikosti, a často dochází k záměně jednoho s druhým. Pro tento účel se nejčastěji používají dva typy filtrů, a to membránové a hloubkové. Membránové filtry, např. acetát celulózy, dusičnan celulózy či stříbrné filtry, fungují na principu síta a nepropouští látky větší, než je velikost pórů. Hloubkové filtry, např. ze skleněných vláken, fungují taktéž na principu síta, avšak občas mohou propouštět i látky větší, než je velikost pórů [24]. Proces oddělení relativně velkých částic za použití filtru s většími póry se nazývá *mikrofiltrace* a proces využívající filtry s menšími póry se nazývá *ultrafiltrace*.

Lobartini a kol. použili průtočné cely Amicon (model 8050) se sérií celulózových membrán se zvětšující se velikostí pórů. Nejdříve separovali frakci s molekulovou hmotností <10 000, dále v rozmezí 10 000–30 000, 30 000–50 000, 50 000–100 000 a >100 000. Každou z frakcí následně čistili a koncentrovali pomocí kolony s XAD-8 pryskyřicí. Z výsledků strukturální analýzy frakcí usoudili, že jednotlivé frakce jsou složeny z podobných sloučenin a rozdíl v molekulové hmotnosti je dán rozdílným stupněm polymerizace [70].

Ve studii [71] rozdělili HK izolovanou z rašeliny pomocí crossflow ultrafiltrace s využitím hydrofilních celulózových membrán na frakce o molekulové hmotnosti 1, 1–3, 3–5, 5–10, 10–30, 30–100, 100–300 a >300 kDa. Distribuce molekulové hmotnosti byla dále kalibrována pomocí HPSEC. V chromatogramu jednotlivé frakce HK vykazovaly úzkou distribuci molekulových hmotností, z čehož usoudili, že ultrafiltrace je vhodnou metodou pro frakcionaci heterogenních huminových makromolekul. Ve frakcích s nižší molekulovou hmotností indikovali více heterogenních funkčních skupin, větší atomový poměr O/C, vyšší obsah kyslíku a aromatických strukturálních jednotek pocházejících z ligninu. Frakce s vyšší molekulovou hmotností obsahovaly méně kyslíku a méně aromatických strukturálních jednotek korespondujících s vyšším atomovým poměrem H/C a nižším poměrem O/C.

Huminové kyseliny izolované z rašeliny byly separovány pomocí tangenciální ultrafiltrace na frakce s různou nominální molekulovou hmotností (5–10, 10–20, 20–50, 50–100, 100–300, >300 kDa) a ty následně podrobeny strukturální analýze ve studii [72]. Frakce s vyšší nominální molekulovou hmotností (>50 kDa) byla charakteristická dlouhými řetězci methylových a methylenových skupin a málo substituovanými aromatickými kruhy. Frakci s nižší nominální molekulovou hmotností dominovaly fenolické a kyslík obsahující skupiny. Frakce byly následně ošetřeny 0,5 M HCl, takto ošetřené frakce následně vykazovaly zvýšení karboxylových a fenolických OH skupin.

Hustotní frakcionace

Nehuminifikovaná organická hmota má menší hustotu než organická hmota podléhající humifikaci, která se v procesu váže na minerální částice půdy. Separace je založena na dispergaci vzorku s roztokem o hustotě v rozmezí 1,6–2,2 g·cm⁻³, čímž dojde k rozdělení na lehkou a těžkou frakci. Lehká frakce, která má hustotu menší než roztok, se bude vznášet na hladině, zatímco těžká frakce bude klesat ke dnu. Následně je narušena stabilita půdních agregátů u dna pomocí disperzního kroku, který vede k uvolnění půdní organické hmoty, která vzlíná k hladině. Vznikají dvě lehké frakce, které jsou tvořeny úlomky rostlinného odpadu, živočišných zbytků, semeny, pylem a uhlím, a liší se pouze intenzitou interakce s půdní maticí. Stupeň separace a výtěžky závisí na intenzitě disperze a hustotě roztoku – čím vyšší hustota, tím vyšší výtěžnost [73; 74]. Nevýhodou metody je, že v lehké frakci jsou separovány i částičky uhlí, dále fakt, že hustota separačního roztoku je ovlivněna teplotou či pH, což může ovlivnit intenzitu extrakce HL. Také dochází k nedostatečné disperzi mikroagregátů, protože v nich přirozeně se vyskytující voda a vzduch snižují jejich hustotu [73; 74].

Prosívání

Na půdní agregáty se působí stejnými disperzními silami, jako na ně působí síly v přirozeném prostředí (např. větrná eroze či zaplavení půdní vodou). Při větrné erozi dochází k mechanickému rozrušování půdních agregátů po dopadu volných částic půdy přenášené větrem. To se v laboratoři simuluje prosíváním za sucha s použitím rotačních sítí, které rozdělují vzorek do velikostních tříd, dle kterých se hodnotí množství agregátů odolávající jejich rozrušení různými silami. Zaplavení půdní vodou, která způsobuje nabobtnání agregátů a rozpouštění látek držících agregát pohromadě, se laboratorně napodobují prosíváním pod vodou. Využívá se držáku, ve kterém je připevněno síto se vzorkem půdy umístěným na jeho povrchu. Síto je následně v pravidelných intervalech ponořováno a vynořováno. Míra rozrušení půdních agregátů je hodnocena jako množství hmoty složené z částic v určitém rozmezí velikostí. Nejčastěji mají póry v sítu velikost 2000, 250 a 53 μm [75; 76].

Gelová chromatografie (LPSEC), HPSEC

Gelová chromatografie je jednoduchá a relativně efektivní frakcionační metoda, v současnosti se setkáváme s pojmenováním SEC. Ne všechny gely a pryskyřice jsou vhodné pro frakcionaci (nevhodná je například XAD pryskyřice, přesto se v některých studiích objevuje), avšak lze použít Sephadex, Pephagel, Silikagel, aj. Metoda využívající kolonu naplněnou Sephadexem se nazývá *gelová filtrace*. Nabobtnalé kuličky Sephadexu jsou často velikosti mezi 20 až 300 μm . Specifikované množství HK poté prochází kolonou a kolona je současně promývána vodou o průtoku 40 $\text{mL}\cdot\text{h}^{-1}$. Sephadex má pórovitou strukturu a chová se jako chromatografické médium. Větší huminové molekuly mají tendenci protékat rychleji mezerami mezi kuličkami, zatímco malé huminové molekuly mohou vstupovat i do pórů kuliček, což je značně zpomaluje. HPSEC pracuje na stejném principu, akorát proces probíhá za zvýšeného tlaku, většinou od 50 do 350 barů, to umožňuje využití menších rozměrů kuliček náplně (2–5 μ) a tím i lepší rozlišení [24].

Peuravuori a Hautala využili HPSEC aparaturu s Biosep SEC-2000 kolonou na frakcionaci HK. Huminová kyselina před vstupem do kolony byla filtrovaná skrze filtr ze skleněných mikrovláken. Kolona byla kalibrována pomocí standardu polystyren-sulfonátu na molekulové hmotnosti o hodnotách: 678, 16 800, 32 000, 123 000 Da. Jako mobilní fázi použili roztok obsahující NaCl a NaN_3 . Takto vznikly tři frakce. Frakce byly charakterizovány pomocí 3D-EEM spektrofluorometrií. V původní HK pozorovali ve fluorescenčních spektrech píky charakteristické pro látky odvozené od proteinu, fenolu a naftolu. Při změně pH pozorovali, že látky odvozené od fenolu a naftolu se skládají z částí o různé kyselosti, a tudíž i struktury. Fluorescenční (3D-EEM) spektra frakcí vykazovala podobná maxima píků jako nefrakcionovaná HK a přidané píky látek charakteristické pro vysoce kondenzované aromatické systémy, které byly ve spektru nefrakcionované HK překryty. Intenzita píků frakcí byla také intenzivnější než píky původní HK, což si vysvětlovali potlačením samozhášení v méně komplexních frakcích [77; 78].

Adsorpční/iontovýměnná chromatografie

Ve studii předložené Yonebayashim a Hattorim využili pro frakcionaci HK makroporézní neiontovou XAD-8 pryskyřici (Amberlite). HK nasycená H^+ byla adsorbovaná na pryskyřici

při pH 3 a frakcionována na 4 části. Toho docílili elucí univerzálními pufrů upravených na pH 7 a 11, vodou a 50% ethanolem. Pro popis struktury frakcí využili elementární analýzy, ¹H-NMR a gelovou permeační chromatografií. První frakce se sestavovala z několika strukturních subjednotek. Předpokládali, že je jedná o kondenzované aromatické kruhy s krátkými alifatickými substituenty a větším množstvím karboxylových skupin. Druhá frakce byla charakteristická přítomností fenolických skupin a třetí frakce dlouhými alifatickými řetězci. Čtvrtá frakce byla tvořena větším množstvím strukturních podjednotek. Mezi něž řadili aromatické kruhy s dlouhými alifatickými řetězci [79].

Frakcionace na základě rozdílné rozpustnosti

Metoda je založená na schopnosti chemické látky rozložit huminovou molekulu na několik frakcí s různou rozpustností. V historii toho využil například Oden při rozdělení HK dle rozpustnosti v ethanolu na rozpustnou hmatomelanovou kyselinu a nerozpustnou část – α -huminovou kyselinu [24]. Jedna z běžných metod frakcionace je založena na rozpustnosti v rozpouštědle při různých hodnotách pH. Frakce HK, která obsahuje slabé disociovatelné kyseliny, se vysráží jako první při snížení pH a silné kyseliny naposled. Přidáním solí se sníží intra- a intermolekulární odpuzování nábojů, což vede ke zmenšení agregátů vyloučením vody z matrice. Také potlačení elektrické dvojvrstvy umožňuje molekulám se přiblížit a podporuje koagulaci. Tomuto se říká vysolování (salting out). Selektivního vysrážení lze dosáhnout využitím těžkých kovů [80].

HL jsou málo rozpustné v běžných organických rozpouštědlech. Rozpouštědla jako jsou ethanol, methanol či aceton mohou být použita pro frakcionaci z alkalických roztoků. Rozdělení mezi alkalický roztok a nemísitelné (či mírně mísitelné) organické rozpouštědlo může vést k zakoncentrování HL na rozhraní voda–organické rozpouštědlo. Hydrofobní součásti HL jsou přitahovány na rozhraní organického rozpouštědla, avšak polární části nejsou solvatovány, a proto nepřechází do rozpouštědla [80].

Kosaka frakcionoval HK, extrahovanou převážně z organické hmoty pocházející z vulkanického popela, na tři části – rozpustnou v acetonu (A-frakce), rozpustnou v benzenalkoholu (B-frakce) a nerozpustnou (C-frakce). K extrakci využil Soxhletův přístroj, 10 gramů vzorku HK navázil do extrakční patrony a ponechal extrahovat acetonem osm hodin. Následně nechal patronu uschnout na vzduchu. Obdobně postupoval i v případě benzenalkoholu. Výsledkem práce bylo zjištění, že výtěžek frakce se zvyšoval se snižujícím se obsahem metoxylových skupin v HK. Frakce rozpustné v organických rozpouštědlech mají menší molekulovou hmotnost než frakce nerozpustné. Nejvyšší obsah uhlíku měla C-frakce a nejnižší A-frakce. V případě množství karboxylových skupin a poměru C/N to bylo naopak, nejvyšší množství skupin a nejvyšší poměr C/N byly v A-frakci a nejnižší v C-frakci [81].

Autoři ve své práci [82] využili GC/MS a LC/MS v závislosti na rozpustnosti frakcí získaných sekvenční chemickou frakcionací ve vodě. K popisu struktury využili NMR spektrometrii. Výsledek výzkumu poukázal na přítomnost převážně nasycených a nenasycených n-alkanových kyselin ve všech oddělených frakcích. Jejich přítomnost ve všech frakcích nasvědčuje jejich roli při tvorbě a stabilizování huminových supramolekulárních struktur. Části nasycených kyselin jsou slabě vázané na huminovou matici, většina n-alkanových kyselin je zapojená do esterových vazeb a je odštěpena až po hydrolýze.

Nenasycené alkanové kyseliny byly pozorovány i u vodorozpustné frakce (AQU2) ve větším množství než dovoluje jejich rozpustnost, což může být vysvětleno agregací s hydrofilními látkami. Každopádně většina nenasycených alkanových kyselin byla pozorována v HK po frakcionaci. Hydroxylované kyseliny a n-alkoholy byly v různém množství detekovány napříč všemi frakcemi. Velkou roli při stabilizování huminových supramolekulárních struktur přikládali di- a trihydroxy- substituovaným kyselinám, které byly významně zastoupené ve frakci ORG1 a ORG2. Ve frakcích ORG2 a ORG3 byly detekovány převážně aromatické struktury a ve větší míře i lineární cukry a steroidy, které však pozorovali i v ostatních frakcích v menším množství [82].

Sekvenční chemická frakcionace

Piccolo navrhl chemickou frakcionaci založenou na postupném rozrušování vazeb. Začíná extrakcí volných a nevázaných huminových molekul navázaných na suprastrukturu HK pomocí disperzních sil organickým rozpouštědlem, aniž by došlo k destrukci kovalentních vazeb. Další dva následující kroky zahrnují štěpení kovalentních vazeb ve slabě vázaných esterech mírnou transesterifikací trifluoridem boritým-methanolem ($\text{BF}_3\text{-MeOH}$) a v silněji vázaných esterech alkalickou solvolýzou (KOH-MeOH). Nakonec jsou štěpeny silné etherové a glykosidické vazby působením kyseliny jodovodíkové a následně je organický ether protonován a jodid s alkoholem podléhá nukleofilní substituci, přičemž alkohol je dobře odstupující skupina. [82].

Ve studii [83] bylo pro izolování organických frakcí ze tří typů půdní organické hmoty využito sekvenční extrakční metody s využitím 10 organických rozpouštědel s rozdílnou polaritou. Získané frakce byly charakterizovány pomocí elementární analýzy, infračervené spektrometrie a ESR analýzy (electron spin resonance). Pozorovali zvyšující se obsah popela (s výjimkou prvních dvou frakcí), zvyšující se obsah uhlíku a vodíku, a naopak snižování obsahu kyslíku a dusíku se zvyšující se polaritou organického rozpouštědla. Frakce extrahované typicky nepolárními rozpouštědly se vyznačovaly vysokým obsahem C a H a nízkým obsahem O, z infračervených spekter vyhodnotili přítomnost komplexní heterogenní alifatické struktury sestávající se z různých lipidických materiálů (tuky, vosky, terpeny, steroly aj.). S narůstající polaritou pozorovali zvyšování aromaticity a vysoký stupeň substituce kyslíkem.

Frakcionace na základě rozdílného pH

Ve studii [84] představili nový způsob frakcionace huminových kyselin, a to pomocí tzv. sekvenční rozpouštěcí metody, která si kládla za cíl snížit kompoziční a strukturní heterogenitu HK a docílit lepšího využití zdrojů HK. K frakcionaci využili extrakční činidla o různých pH. Vzorek HK izolovaný ze zvětralého uhlí frakcionovali touto metodou do sedmi frakcí o hodnotách pH 3–10 použitím NaOH a HCl. Frakce o pH 3 měla nízký výtěžek a nebyla dále charakterizována. K fyzikálně-chemické charakterizaci využili metod elementární analýzy, UV/Vis spektrometrie, FTIR a ^{13}C NMR. Výsledkem studie bylo zjištění, že více jak 90 % HK bylo extrahováno v hodnotách pH extrakčního roztoku 3–7. Ve zmíněných frakcích byl obsah aromatického uhlíku větší jak 80 %, což poukazuje na to, že frakce mají strukturu charakteristickou vyšší mírou kondenzace a vyšší molekulovou

hmotností. Celková koncentrace kyselých a karboxylových skupin se snižovala s rostoucím pH. Nejvyšší aromaticita byla pozorována v případě frakcí získaných z extrakčních roztoků okolo neutrálního pH (6–7) a zároveň tyto frakce byly hojnější na funkční skupiny s vyšším poměrem nepolárního aromatického uhlíku a karboxylového uhlíku. Zato frakce z roztoků o pH 3–4 měly relativně nižší aromaticitu, ale vyšší obsah protonovaného uhlíku.

Klučáková charakterizovala huminové frakce HK izolované z lignitu, které byly získány extrakčními činidly o různém pH s využitím pufrů dvěma různými způsoby. První ze způsobů byla extrakce frakce rozpuštěním v pufrch upravených na různé pH (4–12) a druhý byla extrakce následným rozpuštěním v pufrch se zvyšujícími se hodnotami pH (sekvenční rozpouštěcí metoda). Frakce byly charakterizovány pomocí elementární analýzy a dále byl u nich zjištěn obsah karboxylových skupin pomocí standardní acetátové metody. Bylo zjištěno, že všechny frakce byly bohaté na karboxylové funkční skupiny. Zvyšování pH způsobilo snížení síly a disociační schopnosti funkčních skupin v extrahovaných frakcích [85].

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Použité chemikálie

- huminová kyselina izolovaná z přírodního vzorku Leonarditu (Afşin, Kahramanmaraş, Turecko);
- chloroform p.a. stabilizovaný amylenem, výrobce Lachner;
- ethylester kys. octové p.a., výrobce Penta;
- aceton p.a., výrobce Penta;
- acetonitril p.a., výrobce Penta;
- n-propanol p.a., výrobce Penta a Lachner;
- methanol p.a., výrobce Penta;
- ultra čistá voda (Milli-Q);
- dihydrát dihydrogenfosforečnanu sodného, výrobce Sigma Aldrich;
- hydrogen fosforečnan sodný, výrobce Sigma Aldrich
- hydroxid sodný (mikro-granule) p.a., výrobce Penta .

3.2 Použité přístroje

- Hitachi U3900H – UV/Vis spektrometrie;
- Nicolet iS50, Thermo Fisher Scientific, Inc. – FTIR spektrometrie;
- TGA Q5000 TA Instruments – termická analýza;
- Fluorescenční spektrometr (steady-state) Edinburgh Instruments FS5;
- CHNS/O EuroVector EA3000 – elementární analyzátor;
- Metrohm Titrando – automatický titrátor.

3.3 Sekvenční frakcionace HK

Bylo naváženo 3,5 gramů homogenizovaného vzorku HK do celulózové patrony. Patrona byla utěsněna vatou a vložena do Soxhletova přístroje (Obrázek 20) po dobu 48–120 hodin. Vzorek byl v přístroji promýván organickým rozpouštědlem po dobu, po kterou docházelo k zabarvení rozpouštědla extrahovanou frakcí. Rozpouštědlo bylo následně odpařeno na vakuové odparce. Před použitím dalšího rozpouštědla byla ponechána patrona k vyschnutí a Soxhletův přístroj byl vymyt. Byla využita organická rozpouštědla se zvyšující se polaritou. Eluotropní řada použitých organických rozpouštědel s některými fyzikálně-chemickými vlastnostmi je popsána v Tabulce 4.

Ze vzorku HK bylo tímto způsobem extrahováno šest organických frakcí a zbylé HK po extrakci, které byly dále podrobeny fyzikálně-chemické charakterizaci.

Tabulka 5: Přehledová tabulka názvu frakcí a použitého organického rozpouštědla.

název	organické rozpouštědlo
Frakce 1 (CHF1)	chloroform
Frakce 2 (EAC2)	ethylacetát
Frakce 3 (ACE3)	aceton
Frakce 4 (ACN4)	acetonitril
Frakce 5 (PRO5)	n-propanol
Frakce 6 (MET6)	methanol

3.4 FTIR spektrometrie

K identifikaci funkčních skupin a strukturních jednotek ve vzorcích byla použita infračervená spektrometrie s Fourierovou transformací (FTIR) a její metoda zeslabeného totálního odrazu (ATR – *Attenuated Total Reflection*)

Spektra frakcí byla měřena na ATR krystalu (diamant) na spektrometru Nicolet iS50. Kapka rozpuštěné frakce (kapalný výtěžek frakcionace) byla převedena na ATR krystal a po odpaření rozpouštědla se změřilo ATR spektrum v rozmezí 4000–400 cm^{-1} se spektrálním rozlišením 4 cm^{-1} a celkovým počtem akumulovaných scanů 128.

3.5 Elementární analýza

Elementární složení vzorku HK, organických frakcí a HK po extrakci bylo zjištěno pomocí CHNS/O EA3000 analyzátoru. Přibližně 0,5–1 mg vzorku bylo zabaleno do cínové kapsule (Obrázek 21) a spáleno v atmosféře kyslíku při pracovní teplotě reaktoru 980 °C. Kalibrace byla provedena standardní látkou *p-aminobenzensulfoamidem*. Vyhodnocení, sestávající se ze tří opakování, bylo realizováno pomocí programu *CallidusTM 5.1*. Získané elementární složení bylo přepočteno na atomová procenta (*at. %*).

Vzorky byly také termogravimetricky analyzovány pomocí přístroje TGA Q5000, z důvodu stanovení nespalitelného podílu tj. popela a vzdušné vlhkosti, následně byly použity pro dopočítání obsahu kyslíku ve vzorcích. Bylo naváženo ~ 5 mg vzorku na platinovou pánvičku a následně spáleno z laboratorní teploty na teplotu 800 °C v atmosféře vzduchu s průtokem 50 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$ s krokem zvyšování teploty 10 $^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$. Ze získaných dat byl určen obsah nespalitelného podílu (popel a celková vlhkost ve vzorcích).

3.6 UV/Vis spektrometrie

Molekulová absorpční spektrometrie v ultrafialové a viditelné oblasti (UV/Vis) byla použita k primární charakterizaci HK, organických frakcí a HK po extrakci. Byly vybrány absorpční koeficienty E_4/E_6 , E_2/E_4 , E_2/E_3 , $\Delta\log K$, E_{ET}/E_{Bz} , které jsou definovány jako poměry absorbancí při vhodně zvolených vlnových délkách. K tomuto účelu byl využit spektrometr Hitachi U-3900H.

Pro určení absorpčních koeficientů E_4/E_6 a $\Delta\log K$ byly použity roztoky vzorků o koncentraci 50 $\text{mg}\cdot\text{dm}^{-3}$. Roztoky byly připraveny ze zásobního roztoku o koncentraci 100 $\text{mg}\cdot\text{dm}^{-3}$ vzniklého rozpuštěním ~ 0,5 mg vzorku v 0,01M NaOH v 5 ml odměrné baňce.

Následně bylo kvantitativně přeneseno 2,5 ml rozpuštěného vzorku do 25 ml odměrné baňky a doplněno po rysku standardním fosfátovým pufrům o hodnotě pH 7, směsí Na₂HPO₄ a NaH₂PO₄·2H₂O v poměru 1:1,79.

V případě koeficientů E_2/E_4 , E_2/E_3 , E_{ET}/E_{Bz} byly použity roztoky vzorků o koncentraci 10 mg·dm⁻³. Roztoky vzorků byly připraveny ze stejného zásobního roztoku, použitého pro přípravu roztoků o koncentraci 50 mg·dm⁻³.

Připravené roztoky vzorků byly změřeny na UV/Vis spektrometru Hitachi U3900H v rozmezí vlnových délek 200–700 nm v křemenné kyvetě s optickou dráhou 1 cm.

Absorpční koeficient E_4/E_6 , který je též znám jako tzv. *humifikační index*, byl získán jako poměr absorbancí při vlnových délkách 465 a 665 nm. Hodnota humifikačního indexu klesá s molekulovou hmotností HL a je závislá na pH roztoku [86]. Vypovídá rovněž o stupni kondenzace aromatických jader ve struktuře HL. Vzhledem k často velmi nízké absorpanci při 665 nm je humifikační index zatížen značnou chybou a je nahrazován ekvivalentním absorpčním koeficientem E_2/E_4 definovaným jako poměr absorbancí při vlnových délkách 265 a 465 nm [87; 88].

Absorpční koeficient $\Delta \log K$ byl získán jako rozdíl dekadických logaritmů absorbancí při vlnových délkách 400 a 600 nm a rozděluje půdní HK na tři typy: *A*, *B* a *Rp*. Tento koeficient je také v dobré shodě s koeficientem E_4/E_6 [88; 89].

Půdní HK typu *A* je charakteristická vysokým stupněm humifikace ($\Delta \log K < 0,6$). Tato skupina HK je vysoce stabilní vůči mineralizaci, má vysokou molekulovou hmotnost a obsahuje více aromatických struktur, převážně polyfenolové a chinoidní struktury.

Typ *B* představuje HK s hodnotou $\Delta \log K$ v rozmezí 0,6–0,8. HK jsou charakteristické nižším stupněm humifikace a molekulovou hmotností.

Typ *Rp* je skupina HK s hodnotou $\Delta \log K > 0,8$. HK v této skupině jsou labilnější vůči mineralizaci, mají nejnižší molekulovou hmotnost ze dvou výše zmíněných typů a vysoký obsah alifatických funkčních skupin (–CH₃, –CH₂– a –CH=).

S molekulovou hmotností HL a se stupněm aromaticity je spojen absorpční koeficient E_2/E_3 získaný jako $A_{254\text{ nm}}/A_{410\text{ nm}}$. Obecně platí, že s klesající hodnotou koeficientu roste aromaticita a molekulová hmotnost HL [90; 91].

Posledním z absorpčních koeficientů využitých v této práci je E_{ET}/E_{Bz} . Vychází z poměrů absorbancí při 253 nm a 203 nm. Absorbance při 203 nm je však nepříznivě ovlivněna možnou přítomností dusičnanových aniontů ve vzorku HL, a proto je nahrazen poměrem absorbancí při 253 nm a 220 nm, který koreluje s původně vypočítaným koeficientem. Tento absorpční koeficient specifikuje přítomnost polárních substituentů na aromatickém jádře a poskytuje tedy informace o typu těchto substituentů. Pokud je ve struktuře zapojeno více alifatických substituentů, tak se hodnota absorpčního koeficientu snižuje. Vyšší obsah polárních skupin jako jsou –OH, –COOH, –C=O či –O– vede ke zvýšení absorbance při 253 nm a zvýšení hodnoty koeficientu [92].

3.7 Fluorescenční spektrometrie

Fluorescenční spektra byla získána pomocí ustálené (steady-state) fluorescenční spektrometrie. Organické frakce, HK a residuální HK po extrakci byly změřeny pomocí steady-state fluorescenčního spektrometru Edinburg Instruments FS5[®]. Byla nastavena šířka štěrbin excitačního a emisního monochromátoru na 4 nm a byla použita křemenná kvjeta pro fluorescenční spektrometrii s optickou dráhou 1 cm. Fluorescenční spektra byla změřena v rozsahu vlnových délek 300–600 nm při konstantní vlnové délce excitačního záření 360 nm. Vzorky byly připraveny stejně jako v podkapitole 3.6. Excitační spektra byla změřena na steady-state fluorescenčního spektrometru Edinburg Instruments FS5[®] v rozsahu vlnových délek 380–600 nm.

K charakterizaci HL lze využít tzv. *fluorescenčních koeficientů*, získané jako poměry intenzit fluorescence, případně jako plochy pod křivkou při vhodně zvolených vlnových délkách emise. Pro tuto práci byly vybrány fluorescenční koeficienty *FI*, *BIX*, *HIX* a *Milori index*.

Fluorescenční index (*FI*) byl získán z emisních spekter vzorků jako poměr intenzit fluorescence při vlnových délkách emise 450 a 500 nm. Tyto emisní fluorescenční spektra byla měřena v rozsahu vlnových délek 390–600 nm při konstantní vlnové délce excitačního záření 370 nm. Hodnota tohoto koeficientu vypovídá o původu HL. Huminové látky pocházející z terestriálních přírodních matric mají hodnoty koeficientu nízké (přibližně 0,2–1,4), zatímco pro FK a některé HK, vzniklé na základě mikrobiologické aktivity vodní flóry, jsou charakteristické hodnoty $FI > 1,9$ [93].

Fluorescenční koeficient *BIX* je definován jako poměr intenzit fluorescence při emisních vlnových délkách 380 a 430 nm. Hodnoty vlnových délek byly odečteny z fluorescenčního spektra roztoků vzorků změřených v rozmezí vlnových délek emise 330–600 nm při konstantní vlnové délce budícího záření 310 nm. Nižší hodnotou tohoto koeficientu ($< 0,8$) jsou charakteristické HL izolované z terestriálních, případně kaustobiolitických přírodních matric, a vypovídá o jejich alochtonním původu. Vyšší hodnota značí autochtonní původ HL, které vznikly biologickou aktivitou mikroorganismů [94].

Fluorescenční koeficient podle Zsolnaye (*HIX*) byl získán z poměru ploch emisního spektra vzorků, kde příslušné plochy A_1 a A_4 jsou vypočteny jako plošné integrály v rozmezí vlnových délek 435–480 nm (plocha A_4) a 300–345 nm (plocha A_1). Za tímto účelem byla změřena fluorescenční spektra vzorků v rozmezí vlnových délek emise 280–600 nm při konstantní vlnové délce budícího záření 254 nm. Tento fluorescenční koeficient je citlivý k přítomnosti aromatických jader a poskytuje tak informace o stupni humifikace HL. Zvýšení obsahu aromatických jader vede ke zvýšení intenzity fluorescence v ploše A_4 a tím i ke zvýšení indexu *HIX*. Huminové látky izolované z terestriálních či kaustobiolitických přírodních matric mají vysoké hodnoty *HIX* (> 5), HL z přírodních vod nižší (< 5) [95].

Podobným způsobem byl získán i *Milori Index*, definovaný jako plošný integrál pod celým emisním spektrem vzorku. Fluorescenční spektra vzorků byla změřena v rozsahu vlnových délek 460–650 nm při konstantním excitačním záření 400 nm. Obecně lze konstatovat, že s rostoucí hodnotou *Milori Indexu* roste stupeň humifikace HL [96].

3.8 Stanovení celkové, karboxylátové a fenolické kyselosti

Pro stanovení celkové kyselosti lze využít buď přímou či zpětnou titraci. V této práci byla využita zpětná titrace, pomocí které byla stanovena celková kyselost (Rovnice 16) a následně byla získaná karboxylátová kyselost (Rovnice 17) využitím karboxylátové titrace. Fenolická kyselost byla následně dopočítána jako rozdíl celkové a karboxylátové kyselosti (Rovnice 18).

$$n_{\text{H}^+_{\text{celková}}} = \frac{c_{\text{HCl}} [\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}] \cdot \Delta V_{\text{HCl}} [\text{dm}^3]}{m_{\text{vz}} [\text{g}]} \quad (16)$$

$$n_{\text{H}^+_{\text{karboxyl.}}} = \frac{c_{\text{NaOH}} [\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}] \cdot \Delta V_{\text{NaOH}} [\text{dm}^3]}{m_{\text{vz}} [\text{g}]} \quad (17)$$

$$n_{\text{H}^+_{\text{fenol.}}} = n_{\text{H}^+_{\text{celková}}} - n_{\text{H}^+_{\text{karboxyl.}}} \quad (18)$$

Zpětná titrace (celková kyselost)

Navážka 100 mg HK byla rozpuštěna v 100 cm³ 0,01M NaOH a míchána po dobu 24 hodin na magnetické míchačce. Posléze byl vzorek titrován 0,05M HCl s přídatkem 0,1 ml·min⁻¹. Titrace byla ukončena, když dosáhl finální objem kyseliny tzn. titračního činidla 60 cm³.

Karboxylátová titrace

Navážka 50 mg vzorku byla kvantitativně převedena do 40 cm³ roztoku octanu vápenatého o koncentraci 0,5 mol·dm⁻³ a 10 cm³ destilované vody. Smícháním 40 cm³ octanu vápenatého a 60 cm³ destilované vody vznikl slepý vzorek. Slepý i stanovovaný vzorek byly míchány 24 hodin na magnetické míchačce a následující den přefiltrovány přes papírový filtrační papír do 100 cm³ odměrné baňky a doplněny destilovanou vodou po rysku. Vzorky byly titrovány 0,1M NaOH s přídatkem 1 ml·min⁻¹, titrace byla ukončena po konečném přídatku 10 ml titračního činidla.

4 VÝSLEDKY A DISKUZE

4.1 Sekvenční frakcionace, výtěžek

Frakcionací vzorku huminové kyseliny bylo extrahováno šest frakcí. První frakce, extrahovaná methanolem, jako jediná z frakcí měla jen velmi slabě nažloutlou barvu a jako jediná nebyla sypká. Dle literatury [56] je zbarvení a konzistence způsobená složením frakce. Frakce, dle uvedeného zdroje, obsahuje zejména lipidické složky, které jsou bezbarvé až slabě nažloutlé, a je možné je extrahovat z HK pomocí nepolárního rozpouštědla. Změna zbarvení u jednotlivých frakcí je viditelná na Obrázku 22.

Výtěžek frakcí získané frakcionací HK jsou uvedené v Tabulce 7. Výtěžek vztažený k původní navážce HK se pohyboval v rozmezí 0,36–30,92 hm. %. Nejvíce bylo získáno frakce ACE3 a PRO5 (26,18 hm. % a 30,92 hm. %), naopak nejméně v případě frakcí izolovaných chloroformem a acetonitrilem (0,36 hm. % a 0,83 hm. %). Lze usoudit, že nejvíce se extrahovaly polární části organické matrice, což lze mimo jiné vyvodit i z jejího přirozeného obsahu kyslíkatých funkčních skupin jako jsou fenolické, karboxylové či karbonylové skupiny. Residuální HK po frakcionaci tvořila přibližně třetinu z celkové původní hmotnosti HK (32,03 hm. %). Tento poměrně velký podíl z celkového výtěžku má možné vysvětlení, že použitý extrakční postup extrahuje z organické matrice převážně volné organické sloučeniny a slabě vázané molekuly.

4.2 Elementární analýza a kyselost

Obsah biogenních prvků HK před extrakcí, organických frakcí a HK po extrakci popisuje Tabulka 6 a je uveden v atomových procentech, které nepodhodnocují podíl vodíku jako v případě hmotnostních procent. Všechny vzorky jsou tvořené převážně uhlíkem, vodíkem, kyslíkem, v menší míře dusíkem a v některých případech i sírou. GC kolona použitá v této diplomové práci umožňuje stanovení síry při koncentraci $> 0,5$ hm. % a proto nebyla v některých vzorcích detekována. Rozsah obsahu uhlíku v jednotlivých frakcích se pohyboval v rozmezí hodnot 20,56–38,97 at. %, obsah vodíku byl v rozsahu 47,50–78,57 at. %, obsah dusíku 0,45–2,34 at. % a obsah kyslíku 0,43–13,03 at. %. Síra byla detekována jen v ACN4, PRO5 a MET6 frakcích v rozsahu hodnot 0,30–0,39. V CHF1 byl naměřen nejnižší obsah C, N, O a nejvyšší obsah H ze všech frakcí. Obsah elementárního uhlíku a dusíku ve frakcích stoupá se zvyšující se polaritou organického rozpouštědla, zatímco obsah dusíku a síry klesá. Největší obsah uhlíku ze všech frakcí byl naměřen ve frakci PRO5, která byla extrahovaná n-propanolem. HK před extrakcí obsahovala méně atomárního uhlíku a dusíku a více atomárního vodíku než HK po extrakci.

Tabulka 6: Elementární složení HK před extrakcí, HK po extrakci a šesti organických frakcí, obsah popela a vlhkosti a atomové poměry.

	C	H	N	S	O	H/C	O/C	N/C
	(at. %)							
HK _{před}	34,83 ± 0,54	53,14 ± 0,55	1,10 ± 0,08	nd ¹	10,94	1,53	0,31	0,03
HK _{po}	36,96 ± 0,26	50,19 ± 1,10	1,27 ± 0,06	nd ¹	11,58	1,36	0,31	0,03
CHF1	20,56 ± 0,08	78,57 ± 0,87	0,45 ± 0,05	nd ¹	0,43	3,82	0,02	0,02
EAC2	31,07 ± 0,28	59,54 ± 0,44	0,71 ± 0,02	nd ¹	8,68	1,92	0,28	0,02
ACE3	32,99 ± 0,01	54,52 ± 0,62	0,94 ± 0,03	nd ¹	11,55	1,65	0,35	0,03
ACN4	33,74 ± 0,08	52,12 ± 0,50	2,34 ± 0,07	0,39 ± 0,01	11,41	1,54	0,34	0,07
PRO5	38,97 ± 0,30	47,50 ± 3,75	1,34 ± 0,05	0,34 ± 0,01	11,85	1,22	0,30	0,03
MET6	32,38 ± 0,07	52,60 ± 1,08	1,68 ± 0,13	0,30 ± 0,01	13,03	1,62	0,40	0,05

¹ nebylo detekováno, obsah elementární síry ve vzorku byl pod 0,5 hm. %.

Atomové poměry jsou často využívány pro základní rozlišení hlavní struktury analyzovaného vzorku. Míru alifaticity popisuje atomový podíl H/C. Atomový poměr H/C izolovaných frakcí se pohyboval v rozmezí 1,22–3,82. Frakce CHF1 měla tento poměr nejvyšší, což značí její vyšší míru alifaticity a obsah sloučenin s dlouhými uhlíkovými řetězci jako jsou mastné kyseliny a jejich estery. Nižší atomový poměr naopak značí, že frakce obsahuje sloučeniny vyznačující se vyšší mírou aromaticity. Lze pozorovat snížení atomového poměru H/C v případě HK po extrakci v porovnání s původní HK. Extrakcí došlo k odtržení dlouhých alifatických řetězců (zřejmě CHF1), což mělo za následek zvýšení aromaticity HK po extrakci.

Dalším ze základních strukturních ukazatelů je atomový poměr O/C, který reflektuje množství kyslíkatých funkčních skupin, mezi které řadíme např. karboxylové, –OH fenolické a karbonylové funkční skupiny. Atomový poměr O/C izolovaných frakcí se pohyboval v rozmezí 0,02–0,40. Vyšší hodnota atomového poměru O/C značí, že frakce obsahuje větší množství kyslík obsahujících funkčních skupin. Tento atomový poměr nabýval nejvyšší hodnoty v případě frakcí izolovaných pomocí acetonitrilu (ACE3) a methanolu (MET6), které mají zároveň i relativně vysoký atomový poměr H/C. Z toho lze usuzovat, že jsou v těchto frakcích přítomny kyslíkem vázané alkylové skupiny, jako jsou alkylové ethery a estery pocházející z ligninu a/nebo z polysacharidových zbytků, což je v dobré shodě s výsledky FTIR spektrometrie.

Posledním z atomových poměrů je poměr N/C. Hodnoty tohoto poměru se významně nelišily od původní HK. Nejnížší hodnoty nabývala v případě CHF1 a EAC2, tedy ve frakcích s použitím nejméně polárních organických rozpouštědel. Naopak nejvyšší hodnota byla vypočtena v případě frakcí ACN4 a MET6. Vzhledem k tomu, že tyto frakce jsou charakteristické i vysokým obsahem kyslíku, lze předpokládat, že dusík je v těchto frakcích obsažen ve formě amidových skupin ve sloučeninách podobných proteinům.

Termogravimetricky stanovená vlhkost (Tabulka 7) se pohybovala ve frakcích v rozmezí 0,32–9,06 hm. %. Rozdíl mezi HK před a po extrakci není významný. Vyšší vlhkost je pravděpodobně způsobena vyšším obsahem polárních funkčních skupin, které sorbují

vzdušnou vlhkost na povrchu vzorku. V případě obsahu vlhkosti ve frakcích lze pozorovat, že se zvyšující se polaritou rozpouštědla se zvyšuje i obsah polárních funkčních skupin, což koreluje i s vypočteným koeficientem O/C. V případě MET6 můžeme považovat obsah těchto skupin na úroveň obsahu v HK. Obsah nespalitelného podílu (Tabulka 7) odráží čistotu analyzovaného vzorku a je vázán na použité purifikační kroky. Výsledná hodnota popela HK využitá v této práci je na velmi nízké úrovni, což značí její vysokou čistotu. Frakce ACN4 a MET6 obsahují relativně velké množství anorganických nespalitelných zbytků.

Tabulka 7: Výtěžek frakcionace, množství popela a vlhkosti v hm. %.

	výtěžek	popel	vlhkost
HK _{před}	–	1,07	7,48
HK _{po}	32,07	1,42	7,34
CHF1	0,36	0,04	0,32
EAC2	7,43	0,27	2,81
ACE3	26,18	0,94	6,90
ACN4	0,83	6,84	4,06
PRO5	30,92	1,38	5,16
MET6	2,22	10,59	9,06

Huminové látky jsou charakteristické přítomností funkčních skupin, které obsahují kyselé protony, mezi které řadíme karboxylové kyseliny, fenoly a aminy. Výsledné hodnoty kyselosti jsou vyznačeny v Tabulce 8 a titrační křivky na Obrázku 21 a Obrázku 22. Z výsledků lze pozorovat, že významný podíl na kyselosti mají fenolické funkční skupiny a po extrakci se jejich vliv významně zvýšil, zatímco podíl karboxylových funkčních skupin se snížil.

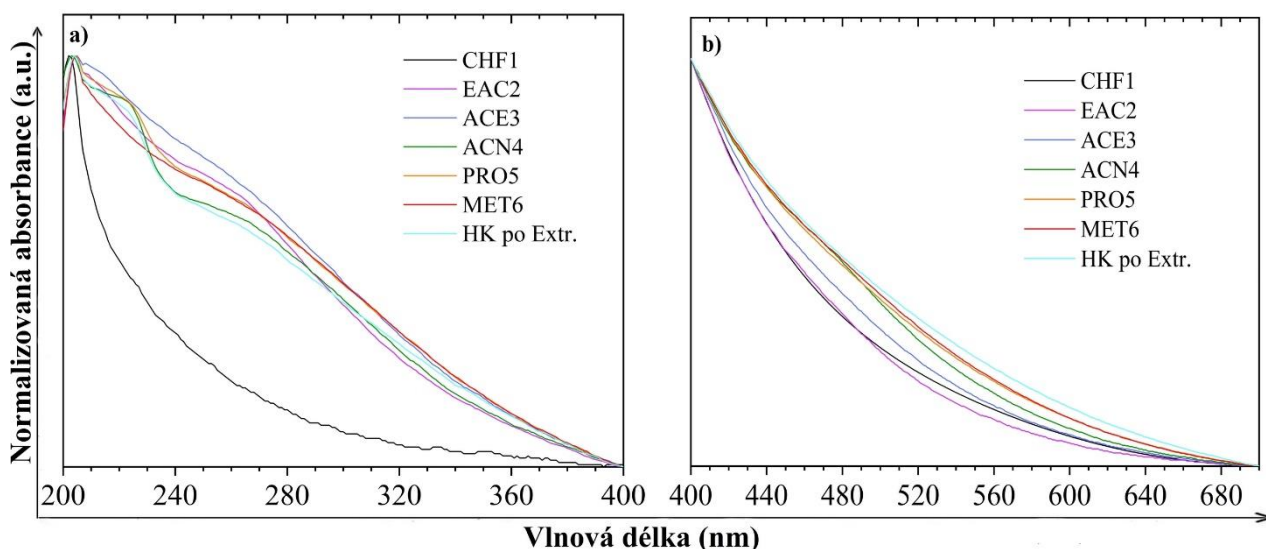
Tabulka 8: Kyselost HK před a po extrakci v mmol·g⁻¹.

Vzorek	Celková	Karboxylátová	Fenolická
HK před ext.	7,40	2,27	5,13
HK po ext.	10,40	1,56	8,84

4.3 Strukturní analýza

4.3.1 UV/Vis spektrometrie

Na Obrázku 16 (a,b) jsou znázorněná spektra izolovaných frakcí a HK po extrakci. Absorbance UV/Vis spekter se stoupající vlnovou délkou klesala. Všechny získané organické frakce výrazně absorbovaly v UV části spektra, což značí, že velká část chromoforů zahrnuje aromatické kruhy s různým stupněm a typem substituentů [92]. Mezi možné strukturní jednotky můžeme řadit látky, jako jsou monosubstituované a polysubstituované fenolické sloučeniny derivované ze zbytků ligninu, taninu a hydroxy- nebo polyhydroxy- kumarinů atd., a různé monoaromatické a/nebo polyaromatické kyseliny [97]. Ve změřených UV/Vis spektrech o vlnové délce 400–700 nm (Obrázek 16b) nejsou žádná pozorovatelná maxima či minima a jejich průběh je kvaziexponenciální. Absorpční křivka prvních tří frakcí (CHF1, EAC2, ACE3) má větší sklon než ostatní frakce. V případě spekter vzorků o vlnové délce 200–400 nm (Obrázek 16a) lze pozorovat výrazné rameno při vlnové délce ~210 nm. Frakce CHF1 vykazovala odlišný průběh než ostatní frakce, její průběh byl kvaziexponenciální oproti víceméně lineárnímu průběhu ostatních frakcí. Ve spektrech ACN4, HK po extrakci, ale také v PRO5 lze pozorovat odlišný průběh od ostatních. Jsou viditelná dvě ramena s maximem/minimem při 222/240 nm, což se projevilo na vypočtených absorpčních koeficientech. Mimo jiné výskyt ramene v oblasti 240–290 nm je spojován s výskytem aromatických a nenasycených vazeb (konjugace v chinonech a ketonech). Výrazné rameno v případě ACN4 značí výskyt chinonů a konjugovaných ketonů, což koreluje s daty v FTIR spektrech.



Obrázek 16: UV/VIS spektra frakcí a HK po extrakci; závislost normalizované absorbance na vlnové délce – a) o koncentraci 10 mg/L, b) o koncentraci 50 mg/L.

Absorpční koeficienty byly jejich autory utvořeny na základě různých metod a předpokladů. Koeficienty E_{ET}/E_{Bz} a E_2/E_3 mají oporu v kvantové mechanice. První z nich je definován jako podíl absorbancí, které korespondují s elektronovými přechody v benzenu, konkrétně při 253 nm substituenty na benzenovém jádře a při 203 nm benzenoidními strukturami [92]. Koeficient E_2/E_3 koresponduje s $\pi-\pi^*$ přechody v aromatických strukturách

(250 nm) a s vlnovou délkou při 465 nm, která je obecně spojována s barevností [91]. Ostatní koeficienty jsou založené pouze na korelaci s jinými analytickými metodami jako je ultrafiltrace či SEC a je značně ovlivněna experimentálními podmínkami.

Vypočtené absorpční koeficienty jsou uvedené v Tabulce 8. Absorpční koeficient E_{ET}/E_{Bz} vypovídá o míře substituce aromatických struktur kyslíkatými funkčními skupinami, jako jsou karboxylové a hlavně –OH fenolické, případně C=O či –OR [92]. Hodnoty koeficientu se pohybovaly v rozmezí 0,56–0,86. S výjimkou frakcí izolovaných v 1. a 4. kroku mají frakce hodnotu koeficientu blízkou hodnotě nefrakcionované HK (0,87). Frakce pravděpodobně sdílí podobné substituenty na aromatické jádře s HK. Naopak první a čtvrtá frakce má více alifatických skupin v porovnání s HK. Nejmenší koeficient byl vypočten pro frakci CHF1, značící vyšší obsah alifatických substituentů na aromatických konstitučních jednotkách, která tedy bude charakteristická vyšším obsahem aryl-esterových a etherových funkčních skupin. Tyto funkční skupiny jsou mimo jiné potvrzeny přítomností absorpčního pásu při 1730 cm^{-1} v IR spektru.

Absorpční koeficient E_4/E_6 reflektuje míru kondenzace aromatických jader a průměrnou molekulovou hmotnost HL různého původu [87]. Jeho hodnota byla vypočtena v rozmezí 4,83–14,46. Lze pozorovat trend, kdy s rostoucí polaritou klesá hodnota koeficientu. Nejnižší koeficient byl změřen v případě extrakce nepolárním rozpouštědlem (CHF1), což značí vysokou molekulovou hmotnost a vyšší míru kondenzace aromatických jader. Je však nutné brát na vědomí, že absorpce při vlnové délce 665 nm byla v případě prvních tří frakcí velmi nízká a samotný výpočet může být zatížen chybou.

Podobnou informaci jako koeficient E_4/E_6 , poskytuje i koeficient E_2/E_4 . Koeficient nabýval hodnot od 6,00–11,90 a vykazoval klesající trend se zvyšující se polaritou rozpouštědla, s výjimkou frakce extrahované nepolárním rozpouštědlem. Nejnižší hodnota koeficientu byla naměřena v případě HK po extrakci naznačující, že polární organická rozpouštědla preferují extrakci méně aromatických organických částí HK s nižší molekulovou hmotností. Je nutné vzít na pováženou, že frakce obsahují různé množství kyslíkatých funkčních skupin. Koeficient se zvyšuje společně se specifickou absorpcí –C=O skupin [87], a proto nelze s jistotou použít tento koeficient jako ukazatel aromaticity a střední molekulové hmotnosti.

Koeficient E_2/E_3 se snižuje s klesající aromaticitou a/nebo s rostoucí velikostí molekul (molekulovou hmotností). Jeho hodnoty se pohybovaly v užším rozmezí od 2,70–4,11, což značí i užší distribuci střední molekulové hmotnosti \overline{M}_w frakcí. Lze pozorovat trend, že se zvyšující se polaritou rozpouštědla se snižuje střední molekulová hmotnost frakcí a zvyšuje jejich aromaticita.

Použitá huminová kyselina se řadí do skupiny Rp ($> 0,80$) dle vypočteného $\Delta\log K$, to znamená, že obsahovala větší množství alifatických řetězců (v porovnání s ostatními typy) a tedy i nižší míru humifikace. Nejnižší hodnoty dosahovala HK po extrakci, což potvrzuje odtržení dlouhých alifatických řetězců. Nicméně musíme mít na paměti, že tento absorpční koeficient byl původně navržen ke kvalitativní analýze půdních HL [89].

Tabulka 9: Vypočtené absorpční koeficienty E_{ET}/EBZ , E_2/E_4 , E_2/E_3 , E_4/E_6 a parametr $\Delta \log K$ extrahovaných frakcí a HK před a po extrakci a poměr I_{Ar}/I_{COOH} a I_{CH_2}/I_{CH_3} extrahovaných frakcí.

Frakce	HK _{před}	HK _{po}	CHF1	EAC2	ACE3	ACN4	PRO5	MET6
E_{ET}/EBZ	0,87	0,77	0,56	0,83	0,84	0,75	0,81	0,86
E_4/E_6	7,75	5,29	4,83	14,46	12,33	11,74	7,53	8,21
E_2/E_4	6,82	5,41	6,00	15,18	10,20	8,09	6,58	6,37
E_2/E_3	2,76	2,44	3,81	4,11	3,31	3,13	2,70	2,69
$\Delta \log K$	0,85	0,67	0,81	1,12	1,00	0,92	0,79	0,80
I_{Ar}/I_{COOH}	–	–	0,22	0,59	0,61	1,24	0,82	1,53
I_{CH_2}/I_{CH_3}	–	–	3,12	1,11	0,98	1,10	0,97	0,93

4.3.2 Infračervená spektrometrie

K základnímu screeningu, tzn. identifikaci funkčních skupin a strukturních jednotek ve skeletu HL, byla použita infračervená spektrometrie s Fourierovou transformací (FTIR), respektive její metoda zeslabené úplné reflektance (ATR). Touto zvolenou metodou se předešlo deprotonaci ve vzorcích, resp. dekarboxylaci kyselých funkčních skupin (karboxylové a fenolické skupiny), ke kterým by pravděpodobně docházelo v případě standardně používané metody lisování KBr tablety (transmisní metoda). Podle autorů [98; 99] dochází při lisování KBr tablety se vzorkem HL vlivem vysokých tlaků ($p > 6 \text{ t}^{-2}$) k iontové výměně mezi vodíkovými kationty a kationty použité soli (KBr nebo NaCl) a následnému snížení intenzity absorpčního pásu v oblasti vlnočtu $1720\text{--}1700 \text{ cm}^{-1}$, který je charakteristický pro valenční symetrickou vibraci C=O vazeb v karboxylových funkčních skupinách. Naměřená ATR spektra izolovaných frakcí (Obrázek 17) byla normalizována na nejintenzivnější absorpční pás přítomný v extrahovaných frakcích, kterým byl pás charakteristický pro asymetrickou vibraci C–H vazeb v $-\text{CH}_2$ skupinách ve spektru CHF1.

Spektra všech frakcí sdílela podobné vlastnosti, avšak v některých absorpčních oblastech se nezanedbatelně lišila. Pro větší přehlednost charakterizace spekter jsou rozděleny na skupiny dle specifických absorpčních pásů. První skupina se věnuje absorpčním pásům náležícím kyslík a síru obsahujícím funkčním skupinám:

Široký absorpční pás $3600\text{--}3100 \text{ cm}^{-1}$ s středem okolo 3250 cm^{-1} je charakteristický pro O–H valenční vibraci v různých funkčních skupinách (včetně karboxylových), které jsou mezi sebou propojeny vodíkovou vazbou. Tento pás byl pozorován ve všech spektrech frakcí, kromě frakce izolované nepolárním organickým rozpouštědlem (CHF1), který vykazoval výrazně nižší intenzitu. Slabý pás při 1840 cm^{-1} společně s intenzivnějším ostrým pásem při 1770 cm^{-1} odpovídají vibracím karboxylových funkčních skupin v cyklických anhydridech, případně v acetanhydridech. Zdaleka nejintenzivnější byly tyto pásy v případě ACN4, nezanedbatelné v případě EAC2 a ACE3. Ostrý pás při 1710 cm^{-1} nabývající různé intenzity je přiřazován symetrické vibraci C=O vazeb v karboxylových skupinách. V případě CHF1 lze pozorovat také pík při 1730 cm^{-1} charakteristický pro vibraci karboxylové skupiny v esterech. Široké rameno s maximem okolo 2620 cm^{-1} je přisuzováno valenční vibraci O–H \cdots O

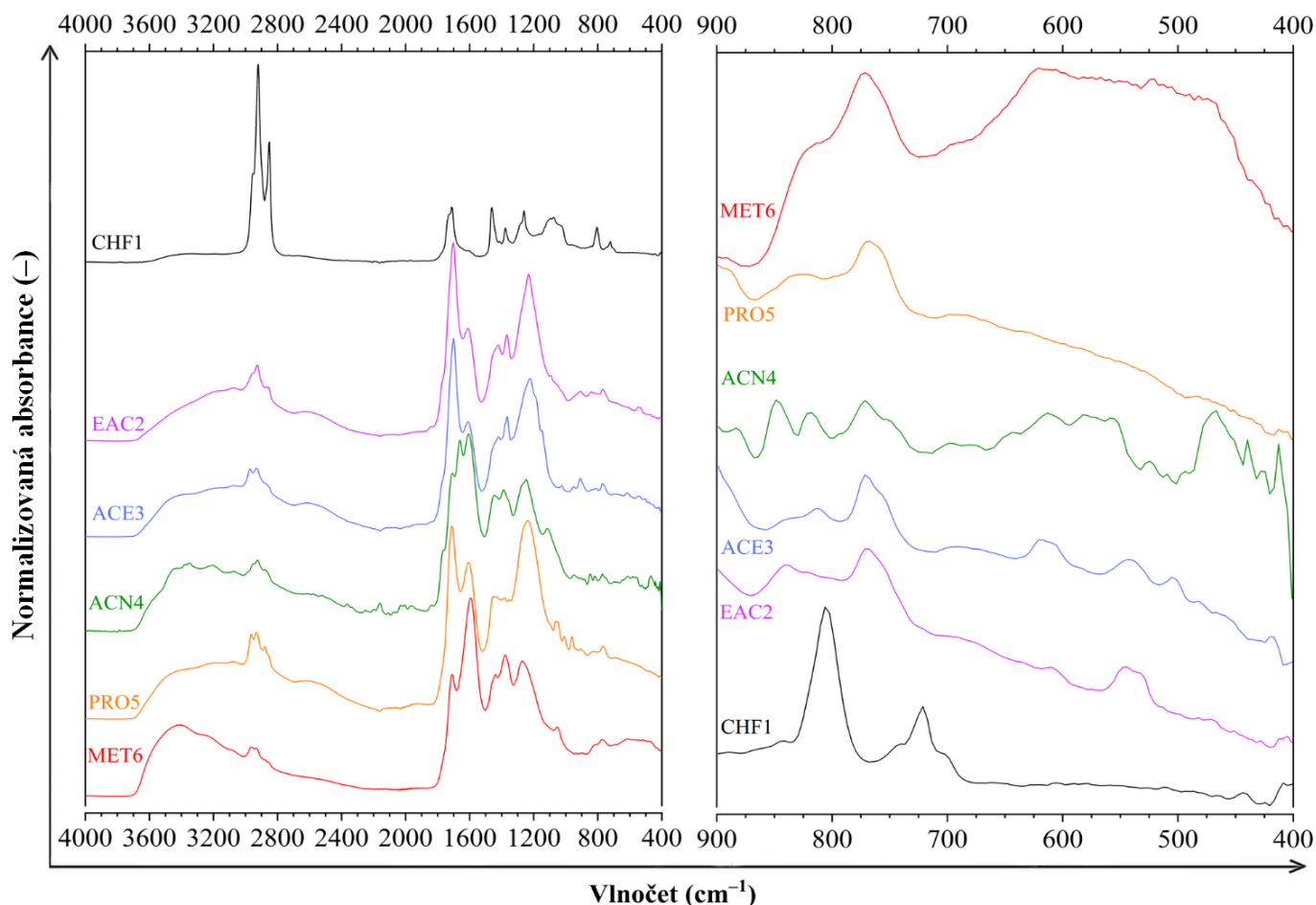
v dimerech karboxylových kyselin vázaných vodíkovými můstky [100]. Tento slabý pás, dokazující přítomnost protonovaných karboxylových skupin, je přítomen ve všech frakcích mimo CHF1, ale i ACE3 a MET6 (žádné maximum, klesající trend). Nepřítomnost tohoto pásu v případě tří zmíněných frakcí může být dán tím, že jsou tyto dimery redukovány jejich částečnou přeměnou na estery a karboxyláty. Maximum při 1660 cm^{-1} je charakteristické pro valenční vibraci C=O skupin v sekundárních amidech (amidy I) jako je peptidická vazba v proteinech, případně i v chinonech či konjugovaných ketonech vázaných vodíkovou vazbou ke skupině –OH. Absorpční skupina amidy I bývá spojena s přítomností absorpčního pásu skupiny amidy II ($1570\text{--}1540\text{ cm}^{-1}$). Tyto pásy byly pozorovatelné pouze ve frakci ACN4, avšak pás amidů II je překryt absorpčním pásem při 1600 cm^{-1} . Slabé rameno při $1385 \pm 5\text{ cm}^{-1}$ bylo pozorovatelné pouze ve spektru frakcí ACN4 a MET6 a je charakteristické pro deformační vibraci v karboxylátech anebo –CH₃ funkčních skupinách. Vzhledem k vysokému obsahu popela v ACN4 (6,84 hm. %) a v MET6 (10,59 hm. %) lze uvažovat také o přítomnosti chelátů kovů. Slabý absorpční pás pozorovatelný při vlnové délce 1420 cm^{-1} odpovídá rovinné deformační vibraci C–O–H v karboxylech. Pás je jasně viditelný v případě prvních tří frakcí, v ostatních třech frakcích je tento pás překryt absorpčními pásy dalších kyslíkatých funkčních skupin. Ostrý absorpční pás v oblasti $1230\text{--}1270\text{ cm}^{-1}$ je připisován valenční vibraci C–O (fenolické OH) např. v aryl-esterech a může se částečně překrývat s intenzivním pásem v oblasti $1234\text{--}1220\text{ cm}^{-1}$ odpovídající valenční asymetrické vibraci C–O a deformační vibraci O–H vazeb v karboxylových a fenolických –OH skupinách. Druhý zmíněný pás nebyl pozorovatelný v případě frakce CHF1 a MET6. V případě CHF1 a MET6 to je způsobené nižším obsahem protonovaných karboxylových skupin. Ve spektru ACN4 lze pozorovat pík při 1114 cm^{-1} , který je připisován buď vibraci C–O–C v alkyl esterech či –OCN v kyanátech. Vzhledem k přítomnosti slabého absorpčního pásu při 2250 cm^{-1} se spíše jedná o skupinu –OCN. Slabý absorpční pás při vlnové délce 1050 cm^{-1} je charakteristický pro C–O vibraci v primárních alkoholech a je pozorovatelný v případě frakcí PRO5 a MET6, tedy frakcí extrahovaných alkoholem. Přítomnost tohoto pásu značí i vyšší množství extrahovaných látek podobných polysacharidům. Ve spektru ACN4 je, jako v jediné z izolovaných frakcí, lokalizovatelný ostrý absorpční pás při 2160 cm^{-1} a doublet při $2032/2003\text{ cm}^{-1}$ připisovaný vibraci –SCN v thiokyanátech, respektive vibraci –NCS v isothiokyanátech. Oblast $700\text{--}400\text{ cm}^{-1}$ byla u většiny frakcí málo čitelná či byla málo intenzivní. Zmínit lze relativně intenzivní maximum při 470 cm^{-1} ve spektru ACN4, který je charakteristický pro valenční vibraci S–S v polysulfidech. Polysulfidy se snadno homolyticky štěpí a produkují volné radikály, které mohou reagovat s organickou hmotou za vzniku organických polysulfidů a/nebo thiolových skupin. Sulfidové anionty jsou silné nukleofily asnadno reagují s organickými funkčními skupinami obsahující atom uhlíku s elektronovým deficitem, obzvláště při vysokém pH [101]. Tímto mechanismem mohlo dojít k nahrazení atomu kyslíku atomem síry v kyanatanech či isokyanatanech, které mohou být obsaženy v kaustobiolitech uhelného řady ([72; 102]). Dle [103] může leonardit obsahovat také thiofeny, polysulfidy, sulfoxidy, ale i elementární síru. Identifikace skupin obsahující síru je vzhledem k jejímu nízkému obsahu ve vzorcích značně omezená a jejich specifický absorpční pás je často překryt intenzivnějším pásem jiných skupin.

Druhá skupina je věnovaná absorpčním pásům popisujícím přítomnost alifatických částí ve struktuře izolovaných frakcí. Absorpční pás v oblasti 3000–2800 cm^{-1} je charakteristický pro alifatické řetězce. Jejich přítomnost je potvrzena pozorovatelnými absorpčními pásy při 2970–2950 cm^{-1} a 2880 cm^{-1} připadající asymetrické a symetrické valenční vibraci C–H v methylových skupinách. Nejintenzivnější pásy byly pozorovány v případě PRO5, ACE3 a CHF1. Ve frakci CHF1 je absorpční pás při 2950 cm^{-1} částečně překryt výrazně intenzivnějším pásem při 2920 cm^{-1} . Absorpční pásy ostatních frakcí byly slabší intenzity. Pro methylenové skupiny jsou specifické absorpční pásy při 2930–2920 cm^{-1} a $2852 \pm 2 \text{ cm}^{-1}$ popisující symetrickou a asymetrickou valenční vibraci. Nejvyšší intenzity dosahují ve frakcích CHF1 a EAC2, avšak jsou nezanedbatelné i v případě ostatních frakcí. Ve spektru ACN4 lze pozorovat slabé absorpční pásy při 2110 a 2250 cm^{-1} náležící vibračním trojně vazby v mono- a disubstituovaných alkynech. Deformační vibrace skupin –CH₂ a –CH₃ je pozorovatelná při 1460 cm^{-1} v různé intenzitě, dominantní intenzity dosahuje v případě frakce CHF1. Při 1370 cm^{-1} lze pozorovat absorpční pás charakteristický pro deformační vibraci v methylových skupinách. Žádné výrazné maximum nebylo pozorovatelné v případě PRO5, což je způsobené překryvem tohoto pásu ostatními skupinami. Ve spektru CHF1 si lze povšimnout širokého absorpčního pásu s maximem kolem 1070 cm^{-1} , která je charakteristická pro valenční vibraci C–C v alifatických skupinách. Dlouhé alifatické řetězce ve frakci CHF1 lze potvrdit také přítomností absorpčního pásu při 720 cm^{-1} , který je popisován jako deformační kyvadlová vibrace –(CH₂)_{n>3}. Lze tedy uvažovat, že nepolární organické rozpouštědlo je nejúčinnější pro extrakci lipidických struktur s dlouhými řetězci z HK. Spektrum ACN4 se vyznačuje i množstvím píku v oblasti 3500–3100 cm^{-1} . Absorpční pásy při 3450 a 3205 cm^{-1} jsou specifické pro valenční vibrace N–H v primárních, respektive v sekundárních aminech.

Obsahem třetí skupiny jsou absorpční pásy popisující aromatické struktury. Absorpční pás při 1608 cm^{-1} je charakteristický pro symetrickou valenční vibraci aromatického kruhu. Frakce CHF1 v této oblasti se vyznačovala pouze velmi slabým ramenem a z toho vyplývající nízkou aromaticitou. Oblast 870–750 cm^{-1} je oblastí popisující mimorovinné deformační vibrace C–H vazeb. Pozice píku je specifická pro typ substituce na aromátech. Absorpční pás při 883 cm^{-1} , pozorovaný pouze ve spektru ACN4, je charakteristický pro *meta*-substituované aromatické jednotky. Naproti tomu absorpční pás lokalizovaný v oblasti okolo 818 (770) cm^{-1} je připisován *para*-disubstituovaným aromatickým sloučeninám a byl pozorovatelný ve všech spektr kromě CHF1. Obsah *ortho*-substituovaných aromátů je připisován vibraci C–H při ~840 cm^{-1} výrazně viditelný ve spektru ACN4 a EAC2. V oblasti 870–750 cm^{-1} lze pozorovat absorpční pásy i v případě CHF1, které vzhledem k nízkému obsahu aromatických struktur, popisují mimorovinnou valenční vibraci v laktonech či vibraci C–Cl v zbytcích rozpouštědla.

Byl vypočten poměr I_{Ar}/I_{COOH} (poměr intenzity při 1610 cm^{-1} a 1710 cm^{-1}), který udává semi-kvantitativní informaci o množství hlavní strukturních skupin [104]. Nejmenší poměr byl vypočítán v případě frakce CHF1 (Tabulka 9), avšak vzhledem k nízké aromaticitě je použitelnost tohoto poměru v případě této frakce diskutabilní. Podobně lze uvažovat i v případě frakcí ACN4 a MET6, ve kterých je obsah karboxylových skupin významně zastoupen ve formě karboxylátů. V případě ostatních frakcí lze pozorovat vzestupný trend,

tedy se zmenšuje množství karboxylových skupin $EAC2 > ACE3 > PRO5$. Podobným způsobem lze semikvantitativně hodnotit alifatické strukturní jednotky pomocí poměru I_{CH_2}/I_{CH_3} (poměr intenzit při 2920 cm^{-1} a 2965 cm^{-1}), který se využívá pro odhad délky a stupně větvení alifatických řetězců. Delší a méně větvené alifatické řetězce obsahuje frakce CHF1, jejíž vypočtený faktor výrazně převyšoval faktor ostatních frakcí (Tabulka 9).



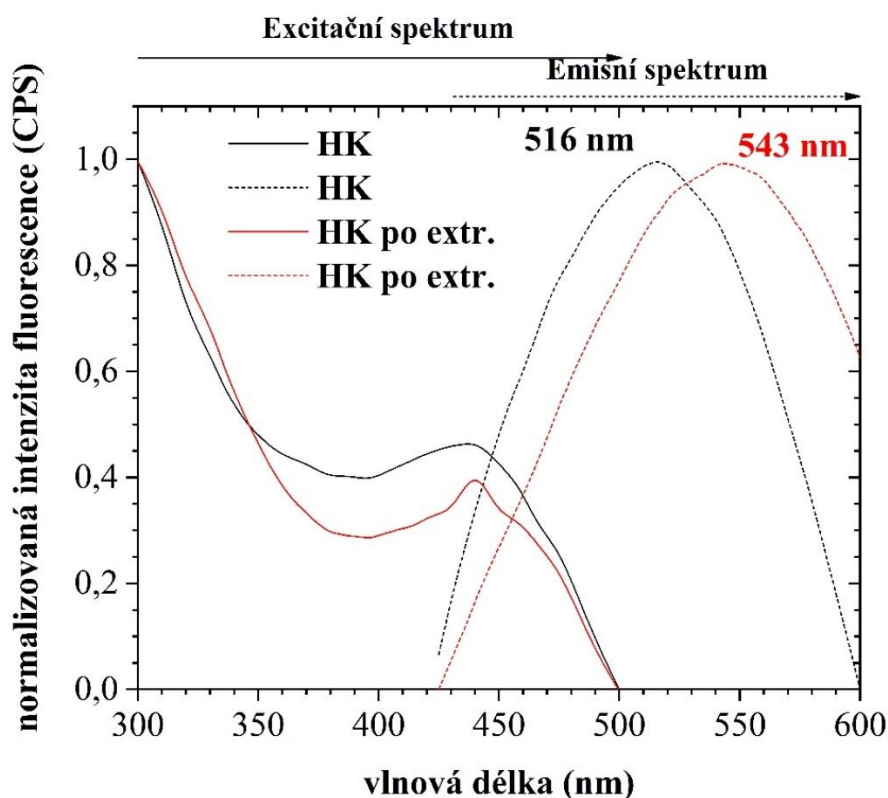
Obrázek 17: FTIR-ATR spektra organických frakcí HK; a) rozsah vlnočtu $4000\text{--}400\text{ cm}^{-1}$ a b) rozsah vlnočtu $900\text{--}400\text{ cm}^{-1}$.

4.3.3 Fluorescenční spektrometrie

Emisní a excitační spektra frakcí a HK před a po extrakci jsou zobrazeny na Obrázku 18 a Obrázku 19. Obecně platí, že emise v kratších vlnových délkách je specifická pro jednoduché aromatické struktury a nižší molekulové hmotnosti organických strukturních jednotek. Naopak posun maxima fluorescence k vyšším vlnovým délkám poukazuje na přítomnost kondenzovaných aromatických strukturních jednotek s vyšší mírou substituce elektron-donorními skupinami, jako jsou karbonyl obsahující konstituční jednotky, $-OH$, $-OR$, $-NH_2$ atd. [105]. Emisní maximum v rozmezí $340\text{--}430\text{ nm}$ je spojováno s přítomností tří a/nebo čtyř aromatických jader na strukturní jednotky, případně v oblasti $400\text{--}500\text{ nm}$ se čtyř a více aromatických jader na strukturní jednotku. V případě terestriálních HK mohou být specifická maxima posunuta ještě do vyšších vlnových délek a jsou

interpretovány jako fluorofory derivované z fytochlorinu (vedlejší produkt degradace chlorofylu) [106; 107].

Huminová kyselina obsahuje fluorofory typické pro kaustobiolity jako jsou lignit, leonardit či rašelina a půdní organická hmota [108; 109]. Jak lze pozorovat na Obrázku 19, spektra byla charakteristická fluorescenčními maximy při 440 nm a 516/543 nm, které mají zpravidla původ v tzv. α – *humic-like* fluoroforech. Dle [110] dochází k bathochromnímu (červenému) v důsledku přítomnosti vyššího obsahu funkčních skupin – NH₂, C=O, –OH a –OR. Hypsochromní posun je spojován s přítomností jednodušších struktur s nižším obsahem aromatických jader a alifatických řetězců s konjugovaným systémem dvojných vazeb. Z těchto poznatků lze vyvodit, že extrakcí frakcí došlo ke zvýšení obsahu funkčních skupin a snížená intenzita fluorescence je spojována s vyšším obsahem elektron-akceptorních funkčních skupin –COOH v HK po extrakci, což je ve shodě se zjištěnou kyselostí [105]. V této souvislosti přichází v úvahu i hypotéza, že residuální HK je rovněž charakterizována vyšším obsahem strukturních jednotek s konjugovaným systémem dvojných vazeb. Tento závěr je v dobré shodě s výsledky UV/Vis spektrometrie, resp. absorpčními koeficienty.

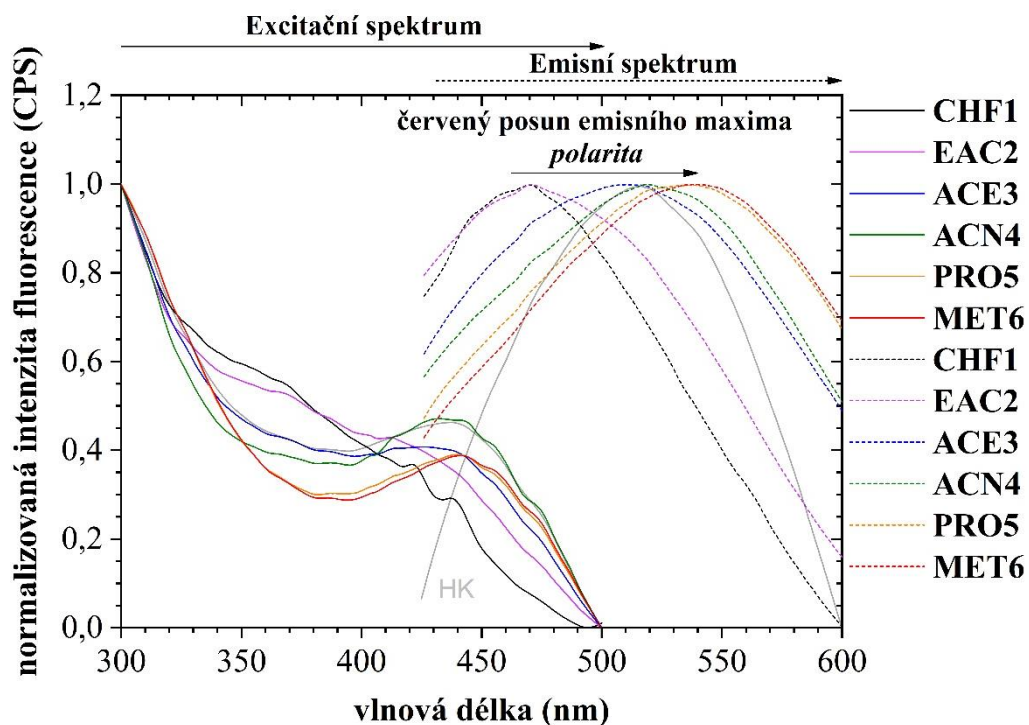


Obrázek 18: Excitační a emisní spektra HK před a po extrakci.

V excitačních a emisních spektrech frakcí (Obrázek 19) lze pozorovat výrazně posuny maxim, ale i intenzit fluorescence. Fluorescenční maximum excitačního spektra ACN4 bylo téměř totožné s původní HK a taktéž i maximum emisního spektra. Nejedlišnější průběh vykazovala spektra frakcí CHF1 a EAC2. Mimo jiné lze pozorovat, že se zvyšující se polaritou organického rozpouštědla se posouvá maximum emisního spektra směrem k delším vlnovým délkám. V porovnání se spektrem HK se frakce CHF1 a EAC2 vyznačují

hypsochromním posunem, a tedy nižším obsahem aromatických jader a alifatických řetězců s konjugovaným systémem dvojných vazeb a spíše jednodušší strukturou.

Frakce CHF1 a EAC2 (frakce ACE3 a ACN4 slabé ramena) obsahovaly fluofoř typu C, který je typický pro HL pocházející z rašeliny, půdy či přírodních vod [111]. Tento typ fluorescence byl pozorován ve frakcích huminové kyseliny izolované z Leonarditu s nízkou molekulovou hmotností [112]. Jiné studie fluofoř spojuje s přítomností derivátů fenolických kyselin a jiných substituovaných fenolických jednotek pocházejících z ligninu, hydroxykumarinu a/nebo chinonu vzniklých rozkladem terestriálních biomateriálu [110]. McKnight a kol. [93] ve své práci zabývající se spektrofluorometrickou charakterizací DOM vyhodnotili, že C fluofoř by mohl být mikrobiálního původu. Ostatní frakce byly charakteristické excitační vlnovou délkou větší jak 400 nm, která je označována jako oblast V nebo také α [113] a je charakteristická pro lignit, rašelinu a půdy bohaté na humus. Obecně platí, že fluorescenční maximum s emisní vlnovou délkou delší jak 470 nm je spojováno spíše s přenosem elektronového náboje z oblasti specifické pro jeden druh molekuly na jinou či přenosu z jednoho druhu molekuly na druhou než s individuálním fluofořem [114]. Fluorescenční maxima v oblasti fluoroforu V frakcí PRO5 a MET6 pravděpodobně značí přítomnost vysokomolekulárních fluofořů (např. lineární kondenzované sítě aromatických jader) substituovaných elektron-donorními funkčními skupinami. To je v dobré shodě s výsledky UV/Vis (vysoká hodnota E_{ET}/EBZ) a také s FTIR. Tento fluorofor byl pozorovatelný i ve spektru HK použité v této práci.



Obrázek 19: Excitační a emisní spektra izolovaných frakcí.

Byly vypočteny *fluorescenční koeficienty*, které jsou sumarizovány v Tabulce 10. Koeficienty *FI* a *BIX* naznačují, že HK využitá v této práci je terestriálního a alochtonního

původu [93; 111] Dle Senesiho [105] posunuté maximum ke kratším vlnovým délkám a vyšší hodnota *FI* značí jednodušší strukturu systému s méně kondenzovanými aromatickými jádry či slabší konjugací v alifatických řetězcích. Lze pozorovat trend, že se zvyšující se polaritou organického rozpouštědla se posunuje maximum fluorescence k delším vlnovým délkám a snižuje se koeficient *FI*. Dochází tedy ke zvyšování aromaticity, což je v dobré shodě s výsledky elementární analýzy.

Míru humifikace vyjadřuje index *Milori* a *HIX*. Z pozorování lze opět vyvodit, že s rostoucí polaritou rozpouštědla se obecně zvyšuje i aromaticita frakcí. Lze však pozorovat, že zdaleka nejvyšší hodnoty byly vypočteny v případě frakce ACE3, což může být zapříčiněno vysokým obsahem kyslíku (poměr O/C, ale i H/C, viz Obrázek 23), který mohl koeficienty ovlivnit [115]. Absolutně nejnižší obsah aromátů ve struktuře je v případě frakce CHF1, podtrhující její alifatický charakter. Koeficienty také vypovídají o množství strukturních jednotek odpovídající HK (*humic-like*) a mikrobiálně derivovaných strukturních jednotek (*protein-like*). Lze pozorovat, že se změnil poměr těchto strukturních jednotek v HK před a po extrakci. Pravděpodobně došlo k odtržení více strukturních jednotek typických pro HK, což koresponduje s výtěžky, které jsou ve prospěch těchto struktur. Nejvíce strukturních jednotek mikrobiálního původu obsahovala frakce CHF1. Naopak frakce ACN4 byla charakteristická strukturními jednotkami, které jsou více humifikované, jako jsou například chinony, které značně ovlivňují intenzitu fluorescence. Přítomnost chinonů ve struktuře ACN4 byla potvrzena i příslušným absorpčním pásem v FTIR spektru, ale i UV/Vis spektru. Na druhé straně nelze ani opomenout příspěvek takových strukturních jednotek, které lze definovat jako protein-like fluorescenční domény.

Tabulka 10: Vypočítané fluorescenční koeficienty.

Frakce	FI	BIX	HIX	Milori ($\cdot 10^7$)
HK _{před}	0,78	0,35	125	1,27
HK _{po}	0,68	0,34	31	0,13
CHF1	1,00	0,90	7	0,05
EAC2	0,93	0,63	70	1,10
ACE3	0,79	0,31	173	2,38
ACN4	0,75	0,31	115	2,08
PRO5	0,73	0,24	83	0,67
MET6	0,70	0,26	90	0,88

5 ZÁVĚR

Předložená diplomová práce se zabývala frakcionací huminové kyseliny izolované z tureckého Leonarditu (Afşin, Kahramanmaraş), jejíž cílem bylo rozdělení komplexní organické matrice na menší celky s jednodušší specifickou strukturou s podobnými vlastnostmi, které byly následně podrobeny chemicko-fyzikální charakterizaci. V rámci řešení diplomové práce byla provedena sekvenční frakcionace s využitím organických rozpouštědel se zvyšující se polaritou. Tímto způsobem došlo k izolaci frakcí vázaných k původní organické matici vazbami různé síly. Bylo extrahováno šest frakcí o různém výtěžku. Největší výtěžek byl v případě frakcí izolovaných pomocí acetonu (26,2 hm. %) a n-propanolu (30,92 hm.%), naproti tomu nejnižší v případě frakcí izolovaných chloroformem (0,36 hm. %) a aceto-nitrilem (0,83 hm. %).

Vzorky byly zkoumány i z hlediska jejich fyzikálně-chemických vlastností. Byl určen obsah uhlíku, vodíku, dusíku a síry ve frakcích a HK před a po extrakci, obsah kyslíku byl dopočítán po zjištění nespalitelných zbytků, tj. popela a vlhkosti, pomocí TGA analýzy. Byl pozorovatelný trend, kdy se nejprve extrahovaly strukturní jednotky obsahující dlouhé alifatické řetězce a se zvyšující se polaritou rozpouštědla se tyto řetězce zkracovaly a narůstala aromaticita. Nejvyšší atomový poměr O/C byl stanoven ve frakci izolovaných acetonem a methanolem, společně s vysokým poměrem H/C bylo usouzeno, že obsahují kyslíkem vázané alkylové skupiny, jako jsou alkylové ethery a estery pocházející z ligninu a/nebo z polysacharidových zbytků. Přítomnost polysacharidů byla podpořena i výsledky FTIR. V případě frakcí izolovaných acetonitrilem a methanolem bylo uvažováno i o přítomnosti amidových skupin ve sloučeninách podobných proteinům.

Byla stanovena celková a karboxylátová kyselost HK před a po extrakci a dopočítána jejich fenolická kyselost. Bylo zjištěno, že významný podíl na kyselosti mají fenolické funkční skupiny a po extrakci se jejich vliv významně zvýšil, zatímco podíl karboxylových funkčních skupin se snížil.

Pomocí UV/Vis spektrometrie byla získána spektra a na jejich základě byly vypočteny absorpční koeficienty (E_4/E_6 , E_2/E_4 , E_2/E_3 , $\Delta \log K$, E_{ET}/E_{BZ}). Všechny frakce s výjimkou CHF1 a ACN4 sdílejí podobné substituenty na aromatickém jádře s HK. Frakce CHF1 byla charakteristická vyšším obsahem aryl-esterových a etherových funkčních skupin. Se zvyšující se polaritou rozpouštědla se snižovala střední molekulová hmotnost frakcí a zvyšovala se jejich aromaticita.

Pomocí infračervené spektrometrie byly zjištěny funkční skupiny v molekulární struktuře frakcí. Frakce CHF1 se vyznačovala vibracemi charakteristickými pro dlouhé alifatické řetězce, což bylo podpořeno i výrazně vyšší hodnotou poměru I_{CH_2}/I_{CH_3} . V případě frakce ACN4 byly pozorovány absorpční pásy charakteristické pro amidové skupiny ve strukturách podobných proteinům či chinony a konjugované ketony. Byl vypočten poměr I_{Ar}/I_{COOH} , který udal trend, že se zvyšující polaritou se snižuje množství karboxylových skupin.

Byla získána emisní a excitační fluorescenční spektra a vypočteny fluorescenční koeficienty (FI , BIX , HIX a $Milori\ index$). Byl pozorován bathochromní posun emisního spektra se zvyšující se polaritou rozpouštědla, tedy i s posunem ve struktuře od jednodušší struktury s nižším obsahem aromatických jader k vyšší aromaticitě a obsahu polárních funkčních skupin jako jsou $-NH_2$, $C=O$, $-OH$ aj. Ve frakcích CHF1 a EAC2 (slabé ramena

v případě ACE3 a ACN4) byla pozorována přítomnost fluoforu typu C, který je mikrobiálního původu. Ostatní byla charakteristická převážně fluoforem typu V, který byl pozorovaný na základě značně posunutých excitačních spektrech. Fluorescenční maxima frakcí PRO5 a MET6 pravděpodobně značila přítomnost vysokomolekulární fluofořů jako jsou například lineární kondenzované sítě aromatických jader substituovaných elektron-donorními funkčními skupinami. Vypočtené fluorescenční koeficienty naznačovaly terestriální a alochtonní původ HK využité v této práci. Z hodnot koeficientů *FI* a *BIX* byl opět pozorován trend, že se zvyšuje aromaticita, respektive kondenzace aromatických jader, se zvyšující se polaritou rozpouštědla. Z vypočtených koeficientu *HIX* a *Milori* bylo usouzeno, že se došlo k extrakci látek se strukturními jednotkami odpovídající huminové kyselině (více humifikované). Frakce CHF1 obsahovala více strukturních jednotek mikrobiálního původu.

Souhrnem všech zjištěných informací lze konstatovat, že huminové kyseliny jsou komplexní směs oddělitelných frakcí se specifickou strukturou a fyzikálně-chemickými vlastnostmi. U analyzované HK se potvrdilo, že frakce, izolované navrhovanou technikou frakcionace, se navzájem liší z hlediska jejich původu, molekulové hmotnosti, aromaticity a obsahu a složení heteroatomových funkčních skupin. Konkrétně byly frakce, extrahované nejméně polárními/nepolárními rozpouštědly, charakteristické strukturou podobné lipidům (nízká aromaticita, nízký obsah kyslíku a dusíku, vysoký poměr I_{CH_2}/I_{CH_3}). Ostatní frakce byly obecně více aromatické a bohatější na polární (hlavně kyslík obsahující) funkční skupiny. Nejedlišnější frakcí byla ACN4, která byla specifická vyšším obsahem dusíku, amidových skupin a relativně malou aromaticitou naznačující její stukturu podobnou proteinům. Poslední dvě extrahované frakce, pomocí alkoholových rozpouštědel, jsou specifické vyšším obsahem stuktturních jednotek odvozených od sacharidů a obsahem fluofořů (typ V) spojovaných se zbytky rostlinných pigmentů v huminových kyselinách.

6 CITOVANÁ LITERATURA

- [1] ROUBÍČEK, Václav a Jaroslav BUCHTELE. *Uhlí: Zdroje. Procesy. Užití*. [1. vyd]. Ostrava: MONTANEX, 2002, 173 s. ISBN 80-7225-063-9.
- [2] DOPITA, Miloslav. *Ložiska fosilních paliv*. 1. Praha: Nakladatelství technické literatury, 1985.
- [3] SCHOBERT, Harold. *Chemistry of fossil fuels and biofuels*. New York: Cambridge University Press, 2013. Cambridge series in chemical engineering (Cambridge University Press). ISBN 978-052-1114-004.
- [4] OREM, W.H. a R.B. FINKELMAN. Coal Formation and Geochemistry. *Treatise on Geochemistry*. Elsevier, 2003, , 191-222. ISBN 9780080437514. Dostupné z: doi:10.1016/B0-08-043751-6/07097-3
- [5] HUBÁČEK, Josef. *Chemie uhlí*. 1. vyd. Praha: Státní nakladatelství technické literatury, 1962.
- [6] ROUBÍČEK, Václav a Jaroslav BUCHTELE. *Chemie uhlí a jeho využití*. 2. vyd. Ostrava: Vysoká škola báňská - Technická univerzita Ostrava, 2002. ISBN 80-248-0147-7.
- [7] HAENEL, Matthias. Recent progress in coal structure research. *Fuel* [online]. 1992, **71**(11), 1211-1223 [cit. 2018-11-13]. ISSN 00162361. Dostupné z: doi:10.1016/0016-2361(92)90046-Q
- [8] ROUBÍČEK, Václav a Jaroslav BUCHTELE. *Chemie uhlí a jeho využití*. 1. vyd. Ostrava: VŠB, 1996, 216 s. ISBN 80-7078-406-7.
- [9] PRINS, M, K PTASINSKI a F JANSSEN. From coal to biomass gasification: Comparison of thermodynamic efficiency. *Energy* [online]. 2007, **32**(7), 1248-1259 [cit. 2018-11-28]. ISSN 03605442. Dostupné z: doi:10.1016/j.energy.2006.07.017
- [10] HOLUSZKO, Maria a Maria MASTALERZ. Coal Macerals Chemistry and Its Implications for Selectivity in Coal Floatability. *International Journal of Coal Preparation and Utilization*. 2014, **35**(2), 99-110. ISSN 1939-2699. Dostupné z: doi:10.1080/19392699.2014.967850
- [11] KHAN, S., M. SCHNITZER, ed. *Developments in Soil Science 8: SOIL ORGANIC MATTER*. First edition. New York: Elsevier science publishing company inc., 1978.
- [12] SKOKANOVÁ, Marianna a Katarína DERCOVÁ. Humínové kyseliny. Pôvod a štruktúra. *Chemické listy* [online]. Praha, 2019, **2008**(4), 262-268 [cit. 2021-01-29]. ISSN 1213-7103. Dostupné z: http://chemicke-listy.cz/docs/full/2008_04_262-268.pdf
- [13] ANTOŠOVÁ, Barbora, Josef KOZLER, Jaromír NOVÁK, Jaroslav KUBÍČEK, Dorota HOROVÁ a Iva VONDROVÁ. Biologická aktivita huminových látek. *ChemZi*. Bratislava: Slovenská spoločnosť chemického inžinierstva, 2005, **1**(1), 256. ISSN 1336-7242.
- [14] MULDER, G., J. MÜLLER. *Die Chemie der Ackerkrume: Nach Der Holländ Originalausgabe Deutsch Bearbeitet Und Mit Erläuterungen Versehen*. Berlin: E. Gross, 1862.

- [15] HOPPE-SEYLER., F. Ueber Huminsubstanzen, ihre Entstehung und ihre Eigenschaften. *Bchm* [online]. 1889, **13**(1-2), 66-123 [cit. 2021-04-18]. ISSN 1437-4315. Dostupné z: doi:10.1515/bchm1.1889.13.1-2.66
- [16] TIPPING, E. Humic substances in soil, sediment and water: Geochemistry, isolation and characterization edited by G. R. Aiken, D. M. McKnight, R. L. Wershaw and P. MacCarthy, Wiley, 1985. No. of pages. *Geological Journal*. 1986, **21**(2), 213-214. ISSN 00721050. Dostupné z: doi:10.1002/gj.3350210213
- [17] ODEN, S. Zur Kolloidchemie der Humusstoff. *Kolloid-Zeitschrift und Zeitschrift für Polymere*. 1914, **14**, 123–130.
- [18] ODEN, S. Die Huminsäuren. *Kolloidchemische Beihefte*. 1919, **11**, 75–260.
- [19] SPRINGER, U. Der heutige Stand der Humusuntersuchungsmethodik mit besonderer Berücksichtigung der Trennung, Bestimmung und Charakterisierung der Huminsäuretypen und ihre Anwendung auf charakteristische Humusformen. *Bodenkunde und Pflanzenernährung* [online]. 1938, **6**(5-6), 312-373 [cit. 2021-01-01]. ISSN 03662136. Dostupné z: doi:10.1002/jpln.19380060504
- [20] WAKSMAN, Selman. *Humus: Origin, chemical composition, and importance in nature*. The Williams and Wilkins co., 1936.
- [21] STEVENSON, F. Gross Chemical Fractionation of Organic Matter. NORMAN, A. G., ed., A. NORMAN. *Methods of Soil Analysis* [online]. Madison, WI, USA: American Society of Agronomy, Soil Science Society of America, 1965, s. 1409-1421 [cit. 2020-12-09]. Agronomy Monographs. ISBN 9780891182047. Dostupné z: doi:10.2134/agronmonogr9.2.c43
- [22] ARNOLD, C. a H. PAGE. Studies on the Carbon and Nitrogen Cycles in the soil. II. The Extraction of the Organic Matter of the Soil With Alkali. *The Journal of Agricultural Science* [online]. 1930, **20**(3), 460-477 [cit. 2021-01-01]. ISSN 0021-8596. Dostupné z: doi:10.1017/S0021859600006973
- [23] SCHWARZENBACH, Rene, Philip GSCHWEND a Dieter IMBODEN. *Environmental organic chemistry*. 3rd ed. Hoboken: Wiley-Interscience, 2017. ISBN 978-1-118-76723-8.
- [24] TAN, Kim. *Humic matter in soil and the environment: principles and controversies*. 2nd ed. Boca Raton: CRC Press, 2014, xxxii, 463 s. : il. ISBN 9781482234459.
- [25] PIVOKONNSKÝ, Martin, Lenka PIVOKONNSKÁ, Petra BUBÁKOVÁ a Václav JANDA. Úprava vody s obsahem huminových látek. *Chemické listy* [online]. Praha: Česká společnost chemická, 2010, **104**(11), 1015–1022 [cit. 2021-01-30]. ISSN 1213-7103. Dostupné z: http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2010_11_1015-1022.pdf
- [26] SUTTON, Rebecca a Garrison SPOSITO. Molecular Structure in Soil Humic Substances: The New View. *Environmental Science & Technology* [online]. Berkeley: University of California, 2005, **39**(23), 9009-9015 [cit. 2021-02-05]. ISSN 1520-5851. Dostupné z: doi:10.1021/es050778q
- [27] LARIVE, Cynthia. Humic Substances: Structures, Properties and Uses Edited by G. Davies and E. A. Ghabbour (Northeastern University). Royal Society of Chemistry.

- Journal of the American Chemical Society*. 1999, **121**(51), 12215-12216. ISSN 0002-7863. Dostupné z: doi:10.1021/ja995692
- [28] VESELÁ, Lenka, Martin KUBAL, Josef KOZLER a Petra INNEMANOVÁ. Struktura a vlastnosti přírodních huminových látek typu oxihumolitu. *Chemické listy* [online]. Praha: Česká společnost chemická, 2005, **99**(10), 711–717 [cit. 2021-01-30]. ISSN 1213-7103. Dostupné z: http://chemicke-listy.cz/docs/full/2005_10_711-717.pdf
- [29] CAPASSO, Sante, Simeone CHIANESE, Dino MUSMARRA a Pasquale IOVINO. Macromolecular Structure of a Commercial Humic Acid Sample. *Environments*. 2020, **7**(4). ISSN 2076-3298. Dostupné z: doi:10.3390/environments7040032
- [30] WEBER, Adam a Jerzy WEBER. Properties of humic substances. *Jerzy Weber's Homepage* [online]. Wrocław, 1997 [cit. 2021-02-06]. Dostupné z: <http://karnet.up.wroc.pl/~weber/kwasy2.htm>
- [31] KOSOBUCKI, Przemysław a Bogusław BUSZEWSKI. Natural Organic Matter in Ecosystems - a Review. *Nova Biotechnologica et Chimica*. 2014, **13**(2), 109-129. ISSN 1338-6905. Dostupné z: doi:10.1515/nbec-2015-0002
- [32] FOWLER, Mike. MCSWEEN , H. Y., J R , RICHARDSON , S. M. & UHLE , M. E. 2003. Geochemistry. Pathways and Processes , 2nd ed. xvi+363 pp. New York: Columbia University Press. ISBN 0 231 12440 6. *Geological Magazine* [online]. Columbia University Press., 2005, **142**(1), 141-142 [cit. 2021-01-01]. ISSN 0016-7568. Dostupné z: doi:10.1017/S0016756805370439
- [33] HEDGES, J.I. Polymerization of humic substances in natural environments. CHRISTMAN, R. a F. FRIMMER, F. H. FRIMMER, ed. *Humic Substances and Their Role in the Environment*. Wiley Interscience, 1988, s. 44–57. ISBN 0471918172.
- [34] TPYCOV, A. *The humification of compounds which are constituents of plants*. Omsk: Trudy Sibirskogo Instituta Sel'skogo Khozyaistva i Lesovodstva, 1914.
- [35] DOU, Sen, Jun SHAN, Xiangyun SONG, Rui CAO, Meng WU, Chenglin LI a Song GUAN. Are humic substances soil microbial residues or unique synthesized compounds? A perspective on their distinctiveness. *Pedosphere*. 2020, **30**(2), 159-167. ISSN 10020160. Dostupné z: doi:10.1016/S1002-0160(20)60001-7
- [36] STEINBÜCHEL, A a M HOFRICHTER. *Biopolymers. Volume 1, Lignin, humic substances and coal*. Weinheim: Wiley-VCH, 2001, 513 s. ISBN 3-527-30220-4.
- [37] STEVENSON, F. *Humus chemistry: genesis, composition, reactions*. 2nd ed. New York: Wiley, 1994. ISBN 04-715-9474-1.
- [38] ZIECHMANN, W. *Humic substances*. Germany: Wissenschaftsverlag, 1994. ISBN 341116591X.
- [39] MAILLARD, L. Synthèse des matières humiques par action des acides aminés sur les sucres réducteurs. *Annales de chimie et de physique*. Paris, 1916, **5**(9), 258–317. ISSN 0365-1444.
- [40] SWIFT, Roger. MACROMOLECULAR PROPERTIES OF SOIL HUMIC SUBSTANCES: FACT, FICTION, AND OPINION. *Soil Science* [online]. 1999, **164**(11), 790-802 [cit. 2021-02-18]. ISSN 0038-075X. Dostupné z:

doi:10.1097/00010694-199911000-00003

- [41] PICCOLO, Alessandro. The supramolecular structure of humic substances: A novel understanding of humus chemistry and implications in soil science. *Elsevier* [online]. Elsevier, 2002, **75**, 57-134 [cit. 2021-02-16]. *Advances in Agronomy*. ISBN 9780120007936. Dostupné z: doi:10.1016/S0065-2113(02)75003-7
- [42] HAYES, M., P. MACCARTHY, R. MALCOLM a R. SWIFT. *Humic substances II: in search of structure*. New York: J. Wiley, 1989. ISBN 978-0471922797.
- [43] ENEV, Vojtěch. *Spektrometrické metody pro výzkum huminových látek* [online]. Brno, 2015 [cit. 2021-02-25]. Dostupné z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/93250>. Dizertace. Vysoké učení technické v Brně, fakulta chemická, ústav fyzikální a spotřební chemie. Vedoucí práce Martina Klučáková.
- [44] SCHNITZER, Morris a Carlos MONREAL. *Quo Vadis Soil Organic Matter Research? A Biological Link to the Chemistry of Humification* [online]. Elsevier, 2011, , 143-217 [cit. 2021-02-21]. *Advances in Agronomy*. ISBN 9780123864734. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-386473-4.00003-8
- [45] WERSHAW, Robert. A new model for humic materials and their interactions with hydrophobic organic chemicals in soil-water or sediment-water systems. *Journal of Contaminant Hydrology* [online]. 1986, **1**(1-2), 29-45 [cit. 2020-12-04]. ISSN 01697722. Dostupné z: doi:10.1016/0169-7722(86)90005-7
- [46] WERSHAW, Robert. Model for Humus in Soils and Sediments. *Environmental Science & Technology* [online]. 2002, **27**(5), 814-816 [cit. 2020-12-04]. ISSN 0013-936X. Dostupné z: doi:10.1021/es00042a603
- [47] PICCOLO, Alessandro. *The supramolecular structure of humic substances: A novel understanding of humus chemistry and implications in soil science*. Elsevier, 2002, , 57-134. *Advances in Agronomy*. ISBN 9780120007936. Dostupné z: doi:10.1016/S0065-2113(02)75003-7
- [48] PICCOLO, A., S. NARDI a G. CONCHERI. Micelle-like conformation of humic substances as revealed by size exclusion chromatography. *Chemosphere* [online]. 1996, **33**(4), 595-602 [cit. 2021-02-18]. ISSN 00456535. Dostupné z: doi:10.1016/0045-6535(96)00210-X
- [49] PICCOLO, Alessandro. *Humic substances in terrestrial ecosystems* [online]. 1st ed. New York: Elsevier, 1996 [cit. 2021-02-25]. ISBN 04-448-1516-3.
- [50] SIMPSON, André, William KINGERY, Michael HAYES et al. Molecular structures and associations of humic substances in the terrestrial environment. *Naturwissenschaften* [online]. 2002, **89**(2), 84-88 [cit. 2021-02-18]. ISSN 0028-1042. Dostupné z: doi:10.1007/s00114-001-0293-8
- [51] CHILOM, Gabriela, Andrea BAGLIERI, Cyndey JOHNSON-EDLER a James RICE. Hierarchical self-assembling properties of natural organic matter's components. *Organic Geochemistry* [online]. 2013, **57**, 119-126 [cit. 2020-12-05]. ISSN 01466380. Dostupné z: doi:10.1016/j.orggeochem.2013.02.008
- [52] GILLI, Gastone a Paola GILLI. *The Nature of the Hydrogen Bond* [online]. Oxford

- University Press, 2009 [cit. 2020-12-05]. ISBN 9780199558964. Dostupné z: doi:10.1093/acprof:oso/9780199558964.001.0001
- [53] NI, Jinzhi a Joseph PIGNATELLO. Charge-assisted hydrogen bonding as a cohesive force in soil organic matter: water solubility enhancement by addition of simple carboxylic acids. *Environmental Science: Processes & Impacts* [online]. 2018, **20**(9), 1225-1233 [cit. 2020-12-05]. ISSN 2050-7887. Dostupné z: doi:10.1039/C8EM00255J
- [54] WELLS, Martha a Holly STRETZ. Supramolecular architectures of natural organic matter. *Science of The Total Environment* [online]. 2019, **671**, 1125-1133 [cit. 2020-12-05]. ISSN 00489697. Dostupné z: doi:10.1016/j.scitotenv.2019.03.406
- [55] WELLS, Martha. Supramolecular Answers to the Organic Matter Controversy. *Journal of Environmental Quality* [online]. 2019, **48**(6), 1644-1651 [cit. 2020-12-05]. ISSN 00472425. Dostupné z: doi:10.2134/jeq2019.02.0089
- [56] GIESEKING, John, ed. *Soil Components: Vol. 1: Organic Components* [online]. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag, 1975 [cit. 2020-12-08]. ISBN 978-3-642-65915-7. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/978-3-642-65915-7>
- [57] FLETT, Douglas. *Principles and practices of solvent extraction. Second Edition, Revised and Expanded. Edited by J Rydberg, M Cox, C Musikas and GR Choppin. Marcel Dekker, New York, 2004. 760 pp, ISBN 0 8247 5053 2.* 2005, **80**(3), 359-360. ISSN 0268-2575. Dostupné z: doi:10.1002/jctb.1219
- [58] HAYES, Michael. Solvent Systems for the Isolation of Organic Components from Soils. *Soil Science Society of America Journal* [online]. 2006, **70**(3), 986-994 [cit. 2021-04-15]. ISSN 03615995. Dostupné z: doi:10.2136/sssaj2005.0107
- [59] HILDEBRAND, J.H. a R. SCOTT. *Regular Solutions*. 1st ed. USA: Prentice Hall, 1962, 180 s. B0000CLGWH.
- [60] HANSEN, Charles. *Hansen solubility parameters: a user's handbook*. 2nd ed. Boca Raton: CRC Press, 2007. ISBN 978-084-9372-483.
- [61] MUROV, Steve. Properties of Solvents Used in Organic Chemistry. *HOME PAGE of: Dr. Steven L. Murov* [online]. [cit. 2021-05-24]. Dostupné z: <http://murov.info/orgsolvents.htm>
- [62] REICHARDT, C. a T. WELTON. *Solvents and solvent effects in organic chemistry*. 4th, updated and enl. ed. Weinheim, Germany: Wiley-VCH, 2011. ISBN 9783527324736.
- [63] PEÑA-MÉNDEZ, Eladia, Josef HAVEL a Jiří PATOČKA. Humic substance compounds of still unknown structure: applications in agriculture, industry, environment and biomedicine. *Journal of applied biomedicine* [online]. 2005, , 13–24 [cit. 2021-02-26]. ISSN 1214-0287.
- [64] SKYBOVÁ, Mária. Humínové kyseliny - prínos pre environmentálny výskum. *Acta Montanistica Slovaca* [online]. Košice: Technical University of Kosice, 2006, **11**(2), 362-366 [cit. 2021-02-26]. ISSN 1335-1788. Dostupné z: <https://actamont.tuke.sk/pdf/2006/s2/25skybova.pdf>
- [65] VISTA, S., T. BINITA, S. SHOVA, K. DINESH a A. BH. *A Handbook of Soil Science*

- [online]. Lalitpur (Nepal): Khumaltar : Soil Science Division, 2015 [cit. 2021-02-26]. ISBN 2392-4942. Dostupné z: <http://nkcs.org.np/narc/dl/pages/view.php?ref=1621&k=>
- [66] KOPINKE, Frank-Dieter., Juergen. POERSCHMANN a Ulrich. STOTTMEISTER. *Sorption of Organic Pollutants on Anthropogenic Humic Matter* [online]. 2002, **29**(4), 941-950 [cit. 2021-02-26]. ISSN 0013-936X. Dostupné z: doi:10.1021/es00004a014
- [67] KLÖCKING, Renate, Björn HELBIG, Alexander STEINBÜCHEL a Martin HOFRICHTER. *Humic Substances, Medical Aspects and Applications of. Biopolymers Online* [online]. Weinheim, Germany, 2005 [cit. 2021-02-27]. ISBN 3527600035. Dostupné z: doi:10.1002/3527600035.bpol1013
- [68] NEBBIOSO, Antonio a Alessandro PICCOLO. *Basis of a Humeomics Science: Chemical Fractionation and Molecular Characterization of Humic Biosuprastructures. Biomacromolecules.* 2011, **12**(4), 1187-1199. ISSN 1525-7797. Dostupné z: doi:10.1021/bm101488e
- [69] HAYES, M. *Soil organic matter extraction, fractionation, structure and effects on soil structure.* CHEN, Y. a Y. AVNIMELECH, ed., Y. CHEN, Y. AVNIMELECH. *The Role of Organic Matter in Modern Agriculture* [online]. Dordrecht: Springer Netherlands, 1986, s. 183-208 [cit. 2020-12-22]. ISBN 978-94-010-8470-3. Dostupné z: doi:10.1007/978-94-009-4426-8_9
- [70] LOBARTINI, J., G. ORIOLI a K. TAN. *Characteristics of soil humic acid fractions separated by ultrafiltration. Communications in Soil Science and Plant Analysis* [online]. 2008, **28**(9-10), 787-796 [cit. 2020-12-22]. ISSN 0010-3624. Dostupné z: doi:10.1080/00103629709369830
- [71] LI, Li, Zhenye ZHAO, Weilin HUANG, Ping'an PENG, Guoying SHENG a Jiamo FU. *Characterization of humic acids fractionated by ultrafiltration. Organic Geochemistry* [online]. 2004, **35**(9), 1025-1037 [cit. 2020-12-22]. ISSN 01466380. Dostupné z: doi:10.1016/j.orggeochem.2004.05.002
- [72] FRANCIOSO, O., S. SÁNCHEZ-CORTÉS, D. CASARINI, J.V. GARCIA-RAMOS, C. CIAVATTA a C. GESSA. *Spectroscopic study of humic acids fractionated by means of tangential ultrafiltration. Journal of Molecular Structure* [online]. 2002, **609**(1-3), 137-147 [cit. 2020-12-22]. ISSN 00222860. Dostupné z: doi:10.1016/S0022-2860(01)00971-1
- [73] CHRISTENSEN, B. *Physical fractionation of soil and structural and functional complexity in organic matter turnover. European Journal of Soil Science* [online]. 2001, **52**(3), 345-353 [cit. 2020-12-22]. ISSN 13510754. Dostupné z: doi:10.1046/j.1365-2389.2001.00417.x
- [74] HAKEEM, Khalid, Javaid AKHTAR a Muhammad SABIR, ed. *Soil Science: Agricultural and Environmental Prospectives* [online]. Cham: Springer International Publishing, 2016 [cit. 2020-12-22]. ISBN 978-3-319-34449-2. Dostupné z: doi:10.1007/978-3-319-34451-5
- [75] POWLSON, David, Pete SMITH a Jo SMITH, ed. *Evaluation of Soil Organic Matter Models* [online]. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 1996 [cit. 2020-12-

- 22]. ISBN 978-3-642-64692-8.
- [76] CARTER, M. a E. GREGORICH, ed. *Soil Sampling and Methods of Analysis*. 2nd edition. CRC Press, 2007. ISBN 0849335868.
- [77] HALIM, M., R. SPACCINI, E. PARLANTI, A. AMEZGHAL a A. PICCOLO. Differences in fluorescence properties between humic acid and its size fractions separated by preparative HPSEC. *Journal of Geochemical Exploration* [online]. 2013, **129**, 23-27 [cit. 2020-12-22]. ISSN 03756742. Dostupné z: doi:10.1016/j.gexplo.2012.11.006
- [78] NEBBIOSO, Antonio a Alessandro PICCOLO. Advances in humeomics: Enhanced structural identification of humic molecules after size fractionation of a soil humic acid. *Analytica Chimica Acta* [online]. 2012, **720**, 77-90 [cit. 2021-03-16]. ISSN 00032670. Dostupné z: doi:10.1016/j.aca.2012.01.027
- [79] YONEBAYASHI, K. a T. HATTORI. A new fractionation of soil humic acids by adsorption chromatography. *Geoderma* [online]. 1990, **47**(3-4), 327-336 [cit. 2021-05-02]. ISSN 00167061. Dostupné z: doi:10.1016/0016-7061(90)90036-9
- [80] DAVIS, G. a E. GHABBOUR, ed. *Humic Substances: Structures, Properties and Uses* [online]. Elsevier, 1998 [cit. 2020-12-22]. ISBN 9781855738065. Dostupné z: doi:10.1016/C2013-0-17908-1
- [81] KOSAKA, Jiro, Chikabumi HONDA a Akira IZEKI. Fractionation of humic acid by organic solvents. *Soil Science and Plant Nutrition*. 1961, **7**(2), 48-53. ISSN 0038-0768. Dostupné z: doi:10.1080/00380768.1961.10430956
- [82] NEBBIOSO, Antonio a Alessandro PICCOLO. Basis of a Humeomics Science: Chemical Fractionation and Molecular Characterization of Humic Biosuprastructures. *Biomacromolecules* [online]. 2011, **12**(4), 1187-1199 [cit. 2020-12-23]. ISSN 1525-7797. Dostupné z: doi:10.1021/bm101488e
- [83] SENESI, N., C. TESTINI a M. POLEMIO. Chemical and spectroscopic characterization of soil organic matter fractions isolated by sequential extraction procedure. *Journal of Soil Science* [online]. 1983, **34**(4), 801-813 [cit. 2021-04-15]. ISSN 00224588. Dostupné z: doi:10.1111/j.1365-2389.1983.tb01073.x
- [84] ZHANG, Shuiqin, Liang YUAN, Wei LI, Zhian LIN, Yanting LI, Shuwen HU a Bingqiang ZHAO. Characterization of pH-fractionated humic acids derived from Chinese weathered coal. *Chemosphere* [online]. 2017, **166**, 334-342 [cit. 2021-03-16]. ISSN 00456535. Dostupné z: doi:10.1016/j.chemosphere.2016.09.095
- [85] KLUČÁKOVÁ, Martina. Characterization of pH-fractionated humic acids with respect to their dissociation behaviour. *Environmental Science and Pollution Research* [online]. 2016, **23**(8), 7722-7731 [cit. 2021-03-16]. ISSN 0944-1344. Dostupné z: doi:10.1007/s11356-015-5932-2
- [86] CHEN, Y., N. SENESI a M. SCHNITZER. Information Provided on Humic Substances by E4/E6 Ratios. *Soil Science Society of America Journal* [online]. 1977, **41**(2), 352-358 [cit. 2021-04-04]. ISSN 03615995. Dostupné z: doi:10.2136/sssaj1977.03615995004100020037x

- [87] CHEN, Jie, Baohua GU, Eugene LEBOEUF, Hongjun PAN a Sheng DAI. Spectroscopic characterization of the structural and functional properties of natural organic matter fractions. *Chemosphere* [online]. 2002, **48**(1), 59-68 [cit. 2021-04-04]. ISSN 00456535. Dostupné z: doi:10.1016/S0045-6535(02)00041-3
- [88] BARANČÍKOVÁ, G., N. SENESI a G. BRUNETTI. Chemical and spectroscopic characterization of humic acids isolated from different Slovak soil types. *Geoderma* [online]. 1997, **78**(3-4), 251-266 [cit. 2021-04-04]. ISSN 00167061. Dostupné z: doi:10.1016/S0016-7061(97)00033-5
- [89] KUMADA, K. *Chemistry of Soil Organic Matter: Volume 17* [online]. 1st Edition. © Elsevier Science 1987, 1988 [cit. 2021-04-04]. ISBN 978-0-444-98936-9. Dostupné z: <https://www.elsevier.com/books/chemistry-of-soil-organic-matter/kumada/978-0-444-98936-9>
- [90] PEURAVUORI, Juhani a Kalevi PIHLAJA. Molecular size distribution and spectroscopic properties of aquatic humic substances. *Analytica Chimica Acta* [online]. 1997, **337**(2), 133-149 [cit. 2021-04-04]. ISSN 00032670. Dostupné z: doi:10.1016/S0003-2670(96)00412-6
- [91] HAUTALA, Kimmo, Juhani PEURAVUORI a Kalevi PIHLAJA. Measurement of aquatic humus content by spectroscopic analyses. *Water Research* [online]. 2000, **34**(1), 246-258 [cit. 2021-04-04]. ISSN 00431354. Dostupné z: doi:10.1016/S0043-1354(99)00137-2
- [92] KORSHIN, Gregory, Chi-Wang LI a Mark BENJAMIN. Monitoring the properties of natural organic matter through UV spectroscopy: A consistent theory. *Water Research* [online]. 1997, **31**(7), 1787-1795 [cit. 2021-04-04]. ISSN 00431354. Dostupné z: doi:10.1016/S0043-1354(97)00006-7
- [93] MCKNIGHT, Diane, Elizabeth BOYER, Paul WESTERHOFF, Peter DORAN, Thomas KULBE a Dale ANDERSEN. Spectrofluorometric characterization of dissolved organic matter for indication of precursor organic material and aromaticity. *Limnology and Oceanography* [online]. 2001, **46**(1), 38-48 [cit. 2021-04-04]. ISSN 00243590. Dostupné z: doi:10.4319/lo.2001.46.1.0038
- [94] HUGUET, A., L. VACHER, S. RELEXANS, S. SAUBUSSE, J.M. FROIDEFOND a E. PARLANTI. Properties of fluorescent dissolved organic matter in the Gironde Estuary. *Organic Geochemistry* [online]. 2009, **40**(6), 706-719 [cit. 2021-04-18]. ISSN 01466380. Dostupné z: doi:10.1016/j.orggeochem.2009.03.002
- [95] ZSOLNAY, Adam, Erik BAIGAR, Miguel JIMENEZ, Bernd STEINWEG a Flavia SACCOMANDI. Differentiating with fluorescence spectroscopy the sources of dissolved organic matter in soils subjected to drying. *Chemosphere* [online]. 1999, **38**(1), 45-50 [cit. 2021-04-18]. ISSN 00456535. Dostupné z: doi:10.1016/S0045-6535(98)00166-0
- [96] MILORI, Débora, Ladislau MARTIN-NETO, Cimélio BAYER, João MIELNICZUK a Vanderlei BAGNATO. HUMIFICATION DEGREE OF SOIL HUMIC ACIDS DETERMINED BY FLUORESCENCE SPECTROSCOPY. *Soil Science* [online].

- 2002, **167**(11), 739-749 [cit. 2021-04-18]. ISSN 0038-075X. Dostupné z: doi:10.1097/00010694-200211000-00004
- [97] DEL VECCHIO, Rossana a Neil BLOUGH. On the Origin of the Optical Properties of Humic Substances. *Environmental Science & Technology* [online]. 2004, **38**(14), 3885-3891 [cit. 2021-04-04]. ISSN 0013-936X. Dostupné z: doi:10.1021/es049912h
- [98] DICK, D., J. SANTOS a E. FERRANTI. Chemical characterization and infrared spectroscopy of soil organic matter from two southern brazilian soils. *Revista Brasileira de Ciência do Solo* [online]. 2003, **27**(1), 29-39 [cit. 2021-04-08]. ISSN 0100-0683. Dostupné z: doi:10.1590/S0100-06832003000100004
- [99] TINTI, Anna, Vitaliano TUGNOLI, Sergio BONORA a Ornella FRANCIOSO. Recent applications of vibrational mid-Infrared (IR) spectroscopy for studying soil components: a review. *Journal of Central European Agriculture* [online]. 2015, **16**(1), 1-22 [cit. 2021-04-08]. ISSN 1332-9049. Dostupné z: doi:10.5513/JCEA01/16.1.1535
- [100] BAES, A. a P. BLOOM. Diffuse Reflectance and Transmission Fourier Transform Infrared (DRIFT) Spectroscopy of Humic and Fulvic Acids. *Soil Science Society of America Journal* [online]. 1989, **53**(3), 695-700 [cit. 2021-04-08]. ISSN 03615995. Dostupné z: doi:10.2136/sssaj1989.03615995005300030008x
- [101] FRANCOIS, R. A study of the extraction conditions of sedimentary humic acids to estimate their true in situ sulfur content. *Limnology and Oceanography* [online]. 1987, **32**(4), 964-972 [cit. 2021-05-13]. ISSN 00243590. Dostupné z: doi:10.4319/lo.1987.32.4.0964
- [102] FRANCIOSO, Ornella, Santiago SANCHEZ-CORTES, Sergio BONORA, Maria ROLDÁN a Giacomo CERTINI. Structural characterization of charcoal size-fractions from a burnt *Pinus pinea* forest by FT-IR, Raman and surface-enhanced Raman spectroscopies. *Journal of Molecular Structure* [online]. 2011, **994**(1-3), 155-162 [cit. 2021-05-13]. ISSN 00222860. Dostupné z: doi:10.1016/j.molstruc.2011.03.011
- [103] OLIVELLA, M.A., J.C. DEL RÍO, J. PALACIOS, Murthy VAIRAVAMURTHY a F.X.C. DE LAS HERAS. Characterization of humic acid from leonardite coal: an integrated study of PY-GC-MS, XPS and XANES techniques. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis* [online]. Elsevier B.V, 2002, **63**(1), 59-68 [cit. 2018-11-07]. ISSN 0165-2370. Dostupné z: doi:10.1016/S0165-2370(01)00141-3
- [104] HANC, Ales, Vojtech ENEV, Tereza HREBECKOVA, Martina KLUCAKOVA a Miloslav PEKAR. Characterization of humic acids in a continuous-feeding vermicomposting system with horse manure. *Waste Management* [online]. 2019, **99**, 1-11 [cit. 2021-04-14]. ISSN 0956053X. Dostupné z: doi:10.1016/j.wasman.2019.08.032
- [105] SENESI, N., T. MIANO, M. PROVENZANO a G. BRUNETTI. Characterization, differentiation, and classification of humic substances by fluorescence spectroscopy. *Soil Science*. Williams & Wilkins, 1991, **152**(4), 259–271. ISSN 0038-075X.
- [106] GAO, JinFeng, Sen DOU a ZhiGuo WANG. Structural Analysis of Humic Acid in Soil at Different Corn Straw Returning Modes through Fluorescence Spectroscopy and Infrared Spectroscopy. *International Journal of Analytical Chemistry* [online]. 2019,

- 2019, 1-9 [cit. 2021-04-20]. ISSN 1687-8760. Dostupné z: doi:10.1155/2019/1086324
- [107] ENEV, V., L. POSPÍŠILOVÁ, M. KLUČÁKOVÁ, T. LIPTAJ a L. DOSKOČIL. Spectral characterization of selected humic substances. *Soil and Water Research* [online]. 2014, **9**(1), 9-17 [cit. 2021-04-20]. ISSN 18015395. Dostupné z: doi:10.17221/39/2013-SWR
- [108] D’ORAZIO, Valeria, Andreina TRAVERSA a Nicola SENESI. Forest soil organic carbon dynamics as affected by plant species and their corresponding litters: a fluorescence spectroscopy approach. *Plant and Soil*. 2014, **374**(1-2), 473-484. ISSN 0032-079X. Dostupné z: doi:10.1007/s11104-013-1897-4
- [109] MURPHY, Kathleen, Colin STEDMON, T. WAITE a Gregory RUIZ. Distinguishing between terrestrial and autochthonous organic matter sources in marine environments using fluorescence spectroscopy. *Marine Chemistry* [online]. 2008, **108**(1-2), 40-58 [cit. 2021-04-23]. ISSN 03044203. Dostupné z: doi:10.1016/j.marchem.2007.10.003
- [110] RODRÍGUEZ, Francisco, Patrick SCHLENGER a María GARCÍA-VALVERDE. A comprehensive structural evaluation of humic substances using several fluorescence techniques before and after ozonation. Part I: Structural characterization of humic substances. *Science of The Total Environment* [online]. 2014, **476-477**, 718-730 [cit. 2021-04-23]. ISSN 00489697. Dostupné z: doi:10.1016/j.scitotenv.2013.11.150
- [111] BIRDWELL, Justin a Annette ENGEL. Characterization of dissolved organic matter in cave and spring waters using UV–Vis absorbance and fluorescence spectroscopy. *Organic Geochemistry* [online]. 2010, **41**(3), 270-280 [cit. 2021-04-27]. ISSN 01466380. Dostupné z: doi:10.1016/j.orggeochem.2009.11.002
- [112] CAO, Jun a Jie JIANG. Reducing capacities in continuously released low molecular weight fractions from bulk humic acids. *Journal of Environmental Management* [online]. 2019, **244**, 172-179 [cit. 2021-05-14]. ISSN 03014797. Dostupné z: doi:10.1016/j.jenvman.2019.05.014
- [113] DOSKOČIL, Leoš, Jana BURDÍKOVÁ-SZEWIECZKOVÁ, Vojtěch ENEV, Lukáš KALINA a Jaromír WASSERBAUER. Spectral characterization and comparison of humic acids isolated from some European lignites. *Fuel* [online]. 2018, **213**, 123-132 [cit. 2018-11-07]. ISSN 00162361. Dostupné z: doi:10.1016/j.fuel.2017.10.114
- [114] BOYLE, Erin, Nicolas GUERRIERO, Anthony THIALLET, Rossana VECCHIO a Neil BLOUGH. Optical Properties of Humic Substances and CDOM: Relation to Structure. *Environmental Science & Technology* [online]. 2009, **43**(7), 2262-2268 [cit. 2021-05-14]. ISSN 0013-936X. Dostupné z: doi:10.1021/es803264g
- [115] FULTON, Jennifer, Diane MCKNIGHT, Rose CORY, Colin STEDMON, Elisabeth BLUNT a Christine FOREMAN. Changes in fulvic acid redox state through the oxycline of a permanently ice-covered Antarctic lake. *Aquatic Sciences - Research Across Boundaries* [online]. 2004, **66**(1), 27-46 [cit. 2021-05-14]. ISSN 1015-1621. Dostupné z: doi:10.1007/s00027-003-0691-4

7 SEZNAM SYMBOLŮ A ZKRATEK

7.1 Seznam symbolů

\overline{M}_w	střední molekulová hmotnost	[kg·mol ⁻¹]
<i>A, B, Rp</i>	rozdělení půdních kyseliny dle Kumady [89]	[-]
A_1	integrál v rozmezí vlnových délek emise 300–345 nm	[-]
A_4	integrál v rozmezí vlnových délek emise 435–480 nm	[-]
A_{254}/A_{410}	poměr absorbancí při vlnových délkách 254 a 410 nm	[-]
<i>at. %</i>	elementární složení v atomových procentech	[%]
E_2/E_3	poměr absorbancí při vlnových délkách 250 a 365 nm	[-]
E_2/E_4	poměr absorbancí při vlnových délkách 265 a 465 nm	[-]
E_4/E_6	poměr absorbancí při vlnových délkách 465 a 665 nm	[-]
E_{ET}/E_{Bz}	poměr absorbancí při vlnových délkách 253 a 220 nm	[-]
<i>hm. %</i>	koncentrace v hmotnostních procentech	[-]
$\Delta \log K$	rozdíl logaritmičeských hodnot absorbancí při 400 a 600 nm	[-]
<i>Milori index</i>	plošný integrál přes celé emisní spektrum	[-]

7.2 Seznam zkratk

¹³ C-NMR	¹³ C nukleární magnetická rezonanční spektrometrie
¹ H-NMR	¹ H nukleární magnetická rezonanční spektrometrie
ATR	attenuated Total Reflection
BIX	autochtonní/biologický index
DOM	rozpuštěná organická hmota (Dissolved Organic Matter)
EA	elementární analýza
ESI/MS	hmotnostní spektrometrie s elektrosprejovou ionizací
ESR	elektronová spinová resonance
FI	fluorescenční index
FK	fulvinová kyselina
FTIR	infračervená spektrometrie s Fourierovou transformací
GC/MS	plynová chromatografie s hmotnostní spektrometrií
HIX	humifikační index
HK	huminová kyselina
HL	huminové látky
HPSEC	vysokoúčinná velikostně-vylučovací chromatografie

LC/MS	kapalinová chromatografie s hmotnostní spektrometrií
MS	hmotnostní spektrometrie
PVC	poly(vinyl)chlorid
SEC	velikostně-vylučovací chromatografie
TGA	termogravimetrická analýza
UV/Vis	ultrafialová a viditelná oblast elektromagnetického záření

8 PŘÍLOHY



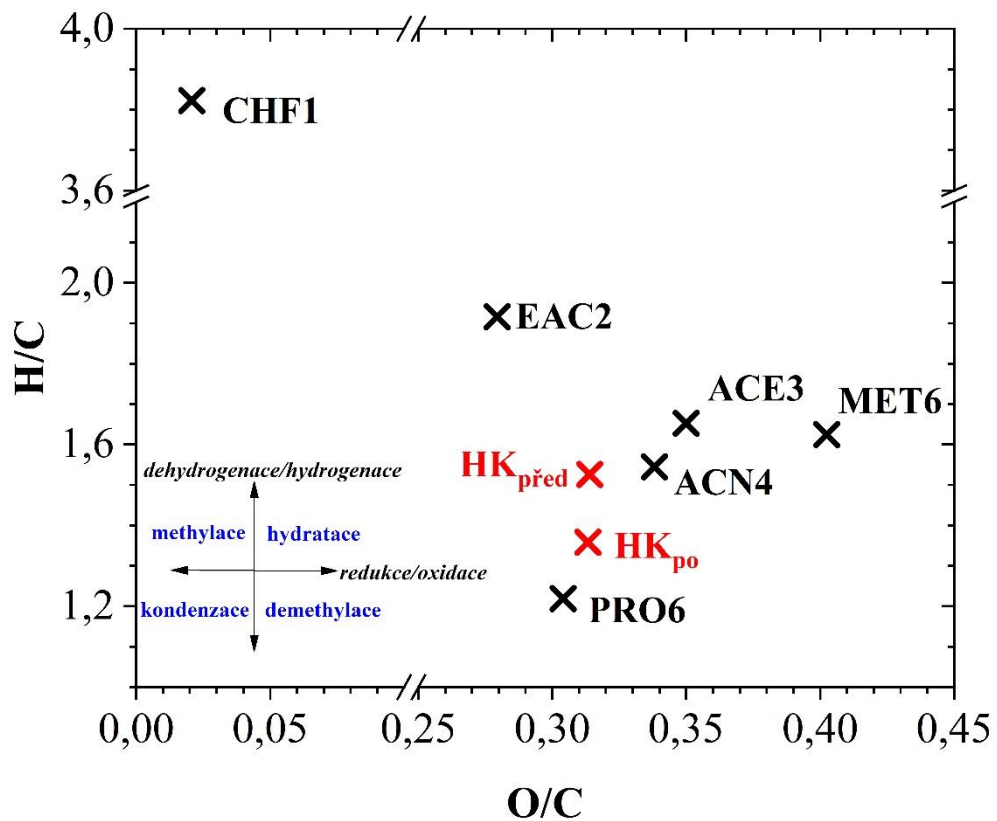
Obrázek 20: Aparatura využitá pro frakcionaci.



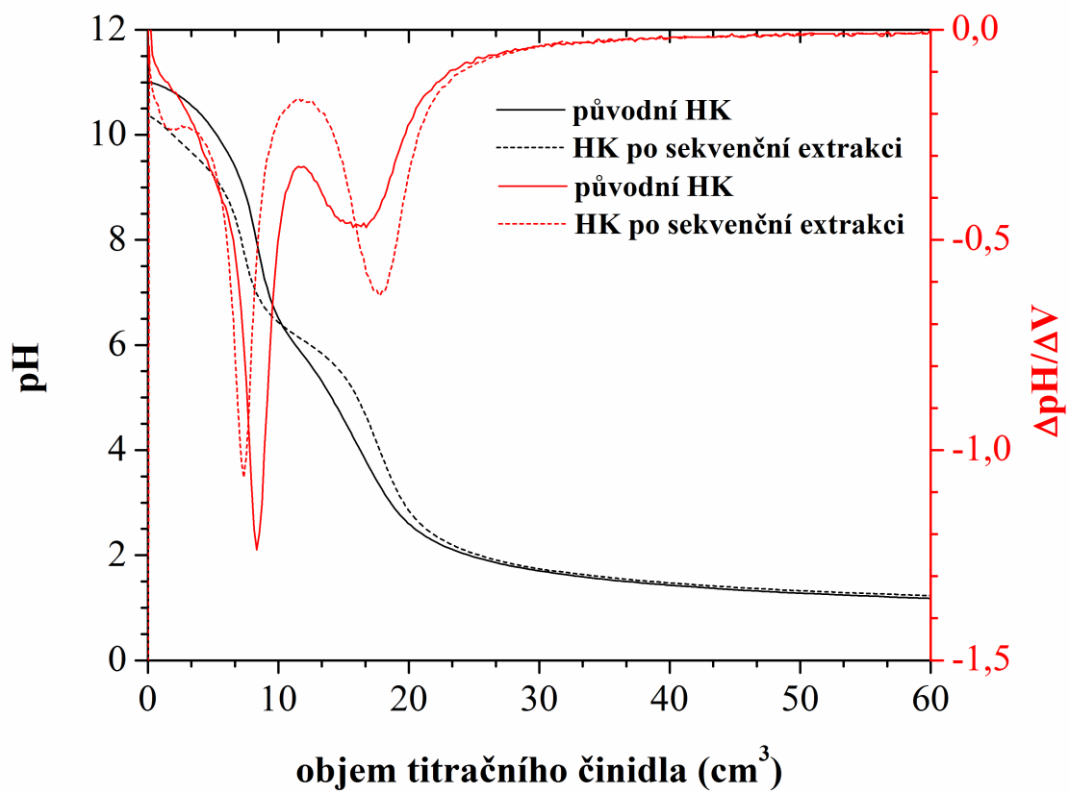
Obrázek 21: Revolverový podavač vzorků elementárního analyzátoru s cínovými kapslemi naplněnými přibližně 1 mg vzorku.



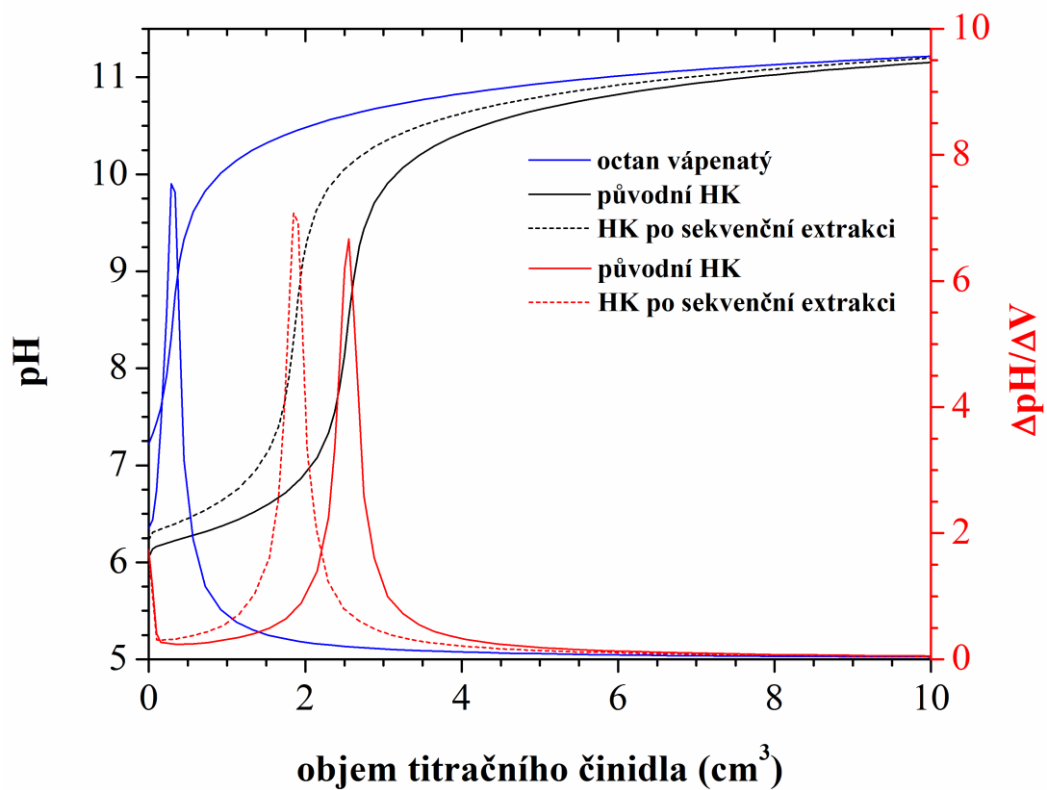
Obrázek 22: Roztoky frakcí před měřením na UV/VIS spektrometru, zleva HK před extrakcí, chloroformová frakce, ethylacetátová frakce, acetonová frakce, acetonitrilová frakce, n-propanolová frakce, methanolová frakce a residuální HK po extrakci.



Obrázek 23: Van Krevelenův diagram izolovaných frakcí.



Obrázek 24: Titrační křivky měření celkové kyselosti.



Obrázek 25: Titrační křivky měření karboxylátové kyselosti.