



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

**VYUŽITÍ METOD IZOLACE A FRAKCIONACE PRO
STANOVENÍ OBSAHU HUMINOVÝCH LÁTEK V
JIHOMORAVSKÉM LIGNITU**

ISOLATION AND FRACTIONATION METHODS FOR DETERMINATION OF HUMIC SUBSTANCES
CONTENT IN SOUTH MORAVIAN LIGNITE

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Pavol Černý

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. Vojtěch Enev, Ph.D.

BRNO 2020

Zadání bakalářské práce

Číslo práce: FCH-BAK1488/2019 Akademický rok: 2019/20
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie
Student: **Pavol Černý**
Studijní program: Chemie a chemické technologie
Studijní obor: Spotřební chemie
Vedoucí práce: **Ing. Vojtěch Enev, Ph.D.**

Název bakalářské práce:

Využití metod izolace a frakcionace pro stanovení obsahu huminových látek v jihomoravském lignitu

Zadání bakalářské práce:

Pomocí standardního postupu izolace a frakcionace huminových látek stanovit jejich obsah v jihomoravském lignitu.

Provést literární rešerši na zadané téma.

Stanovit obsah huminových látek ve vzorku.

Fyzikálně–chemická charakterizace izolovaných huminových látek.

Termín odevzdání bakalářské práce: 31.7.2020:

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

Pavol Černý
student(ka)

Ing. Vojtěch Enev, Ph.D.
vedoucí práce

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2020

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

ABSTRAKT

Táto bakalárska práca si kladie za cieľ izoláciu a frakcionáciu humínových látok (HL) z prírodnej matrice lignitu, ktorý pochádza z južnej Moravy z dolu Mír Mikulčice. V teoretických základoch oboznamuje čitateľa o danej problematike, počnúc základnými informáciami o lignite a HL. V práci bol použitý štandardný postup izolácie a frakcionácie HL podľa International Humic Substances Society (IHSS). Z prírodnej matrice lignitu bolo stanovené množstvo obsahovaných HL, ktoré boli podrobené fyzikálnej chemickej charakterizácii – elementárna analýza (EA), termogravimetrická analýza (TGA), UV/Vis spektrometria, infračervená spektrometria s Fourierovou transformáciou (FTIR) a pomocou potenciometrickej titrácie bola stanovená kyslosť humínových kyselín (HK). EA bola využitá na stanovenie obsahu biogénnych prvkov, pomocou TGA bola stanovená vlhkosť a obsah nespáliteľného podielu, využitím FTIR spektrometrie boli identifikované rozličné funkčné skupiny a stavebné jednotky, ktoré sú prítomné v supramolekulách HL a využitím UV/Vis spektrometrie boli stanovené absorpčné koeficienty E_{ET}/E_{BT} , E_2/E_4 , E_2/E_3 a E_4/E_6 . Výsledky predstavujú dobrú charakterizáciu HL izolovaných z lignitu a sú v dobrej zhode s odbornou literatúrou.

KLÚČOVÉ SLOVÁ

humínové látky, humínové kyseliny, fulvínové kyseliny, lignit, izolácia a frakcionácia z lignitu, EA, TGA, UV/Vis, FTIR, kyslosť

ABSTRACT

This bachelor thesis focuses on isolation and fractionation of humic substances (HS) from the natural matrix of lignite, which comes from southern Moravia from the mine Mír Mikulčice. In the theoretical part, it informs the reader about the issue, starting with information about lignite and HS. In this work, the standard procedure of isolation and fractionation of HS was used as according to the International Humic Substances Society (IHSS). The content of HS in the natural matrix of lignite was determined, and then isolated HS were subjected to physicochemical characterization – elemental analysis (EA), thermogravimetric analysis (TGA), UV/Vis spectrometry, infrared spectrometry with Fourier transformation (FTIR) and the acidity of humic acids (HA) was determined by potentiometric titration. EA was used to determine the content of biogenic elements, moisture and ash content were determined by TGA. By using FTIR, various functional groups and building blocks that are present in supramolecules of HS were identified and absorption coefficients E_{ET}/E_{BT} , E_2/E_4 , E_2/E_3 and E_4/E_6 were determined by UV/Vis spectrometry. Results represent good characterization of HS isolated from lignite and are in agreement with scientific literature.

KEYWORDS

humic substances, humic acids, fulvic acids, lignite, isolation and fractionation from lignite, EA, TGA, UV/Vis, FTIR, acidity

ČERNÝ, Pavol. *Využití metod izolace a frakcionace pro stanovení obsahu huminových látek v jihomoravském lignitu*. Brno, 2020. Dostupné také z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/123840>. Bakalářská práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav fyzikální a spotřební chemie. Vedoucí práce Vojtěch Enev.

PREHLÁSENIE:

Prehlasujem, že som bakalársku prácu vypracoval samostatne a že všetky použité literárne zdroje som správne a úplne citoval. Bakalárska práca je z hľadiska obsahu majetkom Fakulty chemickej VUT v Brne a môže byť využitá ku komerčným účelom len so súhlasom vedúceho bakalárskej práce a dekana FCH VUT.

.....
podpis študenta

POĎAKOVANIE:

Rád by som poďakoval vedúcemu mojej práce Ing. Vojtěchovi Enevovi, Ph.D za odborné vedenie, ústretovosť a rady pri spracovaní výsledkov.

OBSAH

ÚVOD.....	7
1 TEORETICKÉ ZÁKLADY.....	8
1.1 Lignit	8
1.1.1 Vznik lignitu.....	9
1.1.2 Štruktúra lignitu	10
1.2 Humínové látky	11
1.2.1 Rozdelenie humínových látok.....	12
1.2.2 Vznik humínových látok	15
1.2.3 Molekulárna štruktúra humínových látok	16
1.2.4 Využitie humínových látok	19
1.3 Izolácia humínových látok z pevných matric.....	20
1.3.1 Anorganické činidlá	20
1.3.2 Organické činidlá	21
2 SÚČASNÝ STAV RIEŠENEJ PROBLEMATIKY	23
3 EXPERIMENTÁLNA ČASŤ	25
3.1 Použité chemikálie a prístroje	25
3.2 Izolácia humínových látok z lignitu	25
3.3 Separácia humínových kyselín	26
3.4 Separácia fulvínových kyselín.....	26
3.4.1 Adsorpcia fulvínových kyselín na živicu.....	26
3.4.2 Protonácia fulvínových kyselín na živici	27
3.5 Základná fyzikálne chemická charakterizácia.....	27
3.5.1 Elementárna analýza	27
3.5.2 Termogravimetrická analýza.....	28
3.5.3 UV/Vis spektrometria	28
3.5.4 FTIR spektrometria	28
3.5.5 Stanovenie kyslosti.....	28
4 VÝSLEDKY A DISKUSIA.....	30
4.1 Stanovenie obsahu HK a FK	30
4.2 Elementárna analýza a TGA.....	30
4.3 UV/Vis spektrometria.....	31
4.4 FTIR spektrometria	32

4.5 Stanovenie kyslosti.....	34
5 ZÁVER	35
6 ZOZNAM POUŽITEJ LITERATÚRY A ZDROJOV	37
7 ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK A SYMBOLOV	42
PRÍLOHY.....	43

ÚVOD

Humínové látky sú pre laika neznámy pojem, no sú to látky, ktoré sa nachádzajú všade okolo nás – v pôde, v riekach, v jazerách a aj v moriach. Celkovo koncept humínových látok je mätúci, pretože veľa ľudí zameniteľne používa termíny humus a humínové látky. Humus je definovaný ako zmes humifikovaného a nehumifikovaného materiálu. Humifikovaná frakcia je označovaná ako humínové látky. Tak ako je pôdna organická hmota zmes nerozložených a rozložených organických zložiek, alebo tak ako je íl zmes ílovitých minerálov, pozostávajú aj humínové látky z rôznych druhov zložiek. Týmito zložkami sú humínové kyseliny vrátane hymatomelanových kyselín, fulvínové kyseliny a humíny. Jednotlivé zložky možno získať frakcionáciou na základe ich rozpustnosti v kyslých a zásaditých roztokoch. Prvýkrát boli extrahované švédskym chemikom Berzeliom v roku 1839, kedy ich nazval „cernic“ a „apocernic“ acids.

HL sú už dlho známe svojimi priaznivými účinkami v pôde. Zohrávajú dôležitú úlohu pri úrodnosti a výžive rastlín. Poskytujú pôde pórovitosť, zadržiavajú vodu a podieľajú sa na chelácii minerálnych prvkov. Taktiež majú schopnosť zachytávať rôznorodé nečistoty, preto majú veľký potenciál do budúcnosti. A práve aj pre ich veľký potenciál je o HL čím ďalej, tým väčší záujem. Aj napriek stúpajúcemu záujmu, nie sú tieto látky pre nás úplne objasnené a preto je možné, že nájdeme ešte ďalšie využitie.

Prvé časti práce predstavujú teoretický úvod k danej problematike. V našej práci sa zaoberáme humínovými látkami z juhomoravského lignitu, konkrétne z dolu Mír Mikulčice. Lignit je forma najmladšieho uhlia (hnedé uhlie), dá sa očakávať, že bude HL obsahovať. Zaoberáme sa teda ich kvantifikáciou a následnou charakterizáciou. V ďalšej časti sa venujeme práve experimentálnej zložke, kedy sú HL izolované z prírodnej matrice. Následne sú HL frakcionované na jednotlivé zložky, pričom je prevedená základná fyzikálne chemická charakterizácia získaných zložiek HL. Vzorky HK a FK sú analyzované elementárnou analýzou, termogravimetrickou analýzou, UV/Vis spektrometriou, infračervenou spektrometriou s Fourierovou transformáciou, a potenciometrickou titráciou (stanovením kyslosti). Tieto metódy sú schopné poskytnúť dôležité informácie o funkčných skupinách, štruktúre ale aj o reaktivite a poskytujú dobrý prehľad o humínových látkach izolovaných z juhomoravského lignitu.

1 TEORETICKÉ ZÁKLADY

1.1 Lignit

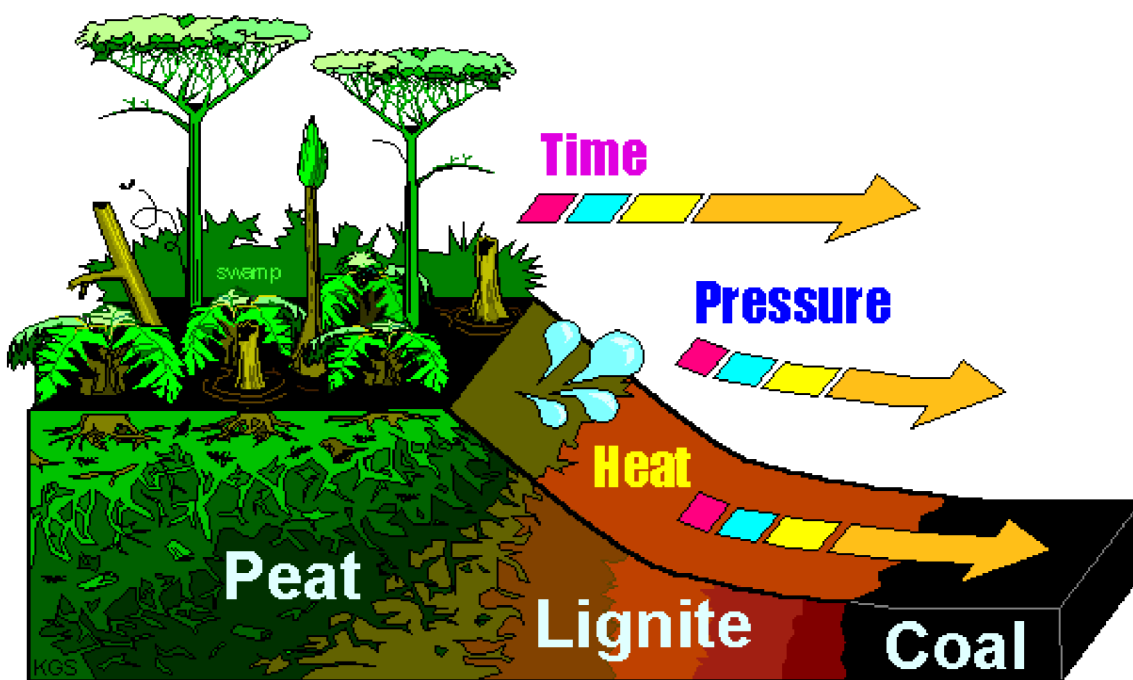
Lignit, často označovaný aj ako hnedé uhlie, je organická sedimentárna hornina, ktorá vzniká procesom koalifikácie – proces, ktorým sa v časovom horizonte desiatok až stoviek miliónov rokov tvorí akumuláciou a konzerváciou vegetácie, zvyčajne v bažinovom prostredí, uhlie. Rozdielne typy uhlia sa podľa zloženia a vlastností zaraďujú do stupnice, ktorá zodpovedá úrovni organického metamorfizmu. Prvý stupeň je rašelina (< 60 % obsah uhlíka), nasleduje nami skúmaný lignit (60–70 % obsah uhlíka), sub-bitúmenové uhlie (71–77 % obsah uhlíka), bitúmenové uhlie (77–87 % obsah uhlíka) a posledným stupňom je antracit (> 87 % obsah uhlíka) [1].

Tabuľka 1: Priemerná elementárna štruktúra jednotlivých stupňov uhlia vyjadrená v hm. % [2]

	C	H	N	O
rašelina	56	5,8	1,4	36
lignit	69	4,6	1,2	25
bitúmenové uhlie	86	5,4	1,6	7,5
antracit	94	2,5	1,0	2,3

Lignit je iba druhým stupňom metamorfizmu, preto je najnižšou úrovňou uhlia a niekedy obsahuje rozpoznateľné zvyšky rastlín. Spolu s ropou a zemným plynom patrí celkovo uhlie medzi tri najdôležitejšie fosílné palivá, pričom samotný lignit obsahuje viac vody ako klasické tvrdé uhlie, tým pádom má menšiu energetickú hodnotu na jednotku hmotnosti a považuje sa za menej kvalitné uhlie. Zatiaľ čo typické tvrdé uhlie obsahujú 16,5–32,5 MJ na kilogram, lignit obsahuje menej ako 16,5 MJ na kilogram [3]. Na druhej strane ťažba lignitu je lacnejšia z dôvodu, že je ťažený na povrchu zeme, pričom ťažba tvrdých uhlí vyžaduje podzemné hlboké bane. [4, 5]

Lignit sa stále globálne využíva na produkciu elektriny, kedy sa drví na malé častice a následne sa spaľuje. Vzniknuté teplo sa používa na tvorbu pary, ktorá poháňa generátor a generuje sa elektrina. Lignit nachádza aj odlišné využitie, napríklad výrobu koksu – koks vzniká zahrievaním uhlia za kontrolovaných podmienok bez prístupu vzduchu. Každopádne spaľovanie uhlia spôsobuje znečistenie vzduchu a vznikajú pri ňom skleníkové plyny. Pri spaľovaní uhlia sa do vzduchu uvoľňujú pevné častice, oxid siričitý, oxidy dusíka a ďalšie znečisťujúce látky. Lignit obsahuje viac síry a má väčší obsah popola pri menšej výhrevnosti ako tvrdé uhlie, preto sa radí medzi najškodlivejšie spaľované uhlie. [1, 4]



Obrázok 1: Príklad vzniku uhlia [6]

1.1.1 Vznik lignitu

Ako už bolo vyššie spomínané, uhlie vzniká procesom koalifikácie. Východisková látka pre vznik uhlia boli zvyšky rastlín, ktoré boli v období karbónu¹ naplavené, postupne sa pod vodou začali rozkladať, kedy strácali kyslík a vodík a vznikali zvyšky s vyšším percentom uhlíka [7]. Aby sa vytvorila hrubá vrstva zvyškov rastlín, ktorá je potrebná na vznik uholného ložiska, je potrebné aby bola miera akumulácie rastlinných zvyškov väčšia ako rýchlosť rozkladu. Ak boli splnené tieto podmienky, bola vytvorená hrubá vrstva rastlinných zvyškov s vysokým obsahom uhlíka, na ktorú sa postupom času usadzovali vrstvy anorganického materiálu ako napríklad piesok a blato, ktoré boli zvyčajne do močiarov vyplavené povodňami z riek. Tlak týchto vrstiev, ako aj pohyby zemskej kôry, spôsobili stlačenie a stvrdnutie rastlinných zvyškov a tak teda spôsobili produkciu uhlia. Asi z desiatich stôp rastlinných zvyškov sa vytvorí jedna stopa uhlia. Rastlinné zvyšky sa usadzovali veľmi pomaly a akumulovanie 50 stôp hrubej vrstvy rastlinných zvyškov si vyžadovalo tisíce rokov. Počas tejto dlhej doby musela hladina vody, v ktorej sa zvyšky akumulovali ostať stabilná. Voda nemohla byť ani príliš hlboká ani príliš plytká, pretože by sa zvyšky rozložili. Aby vzniklo uhlie museli byť veľmi dlhú dobu udržiavané ideálne podmienky hĺbky vody. Uhlie teda mohlo vznikáť iba v dvoch prípadoch. Prvá možnosť bola keď stúpajúca hladina vody perfektne držala krok s rýchlosťou akumulácie rastlinných zvyškov. Druhá možnosť bola keď postupne klesajúca pôda perfektne držala krok s rýchlosťou akumulácie rastlinných zvyškov. O väčšine uholných ložísk sa predpokladá, že vznikli práve druhou možnosťou v deltách riek, kde sa ukladalo veľa riečnych sedimentov, ktorých hmotnosť spôsobovala pokles pôdy. Nato aby sa vytvorilo uhlie musí byť táto rovnováha udržiavaná veľmi dlhý čas a práve z toho dôvodu je

¹ karbón – geologický útvar prvohôr (pred 354 – 298 miliónmi rokov)

zrejmé, prečo sa podmienky na tvorbu uhlia vyskytli iba niekoľkokrát v priebehu histórie Zeme. [1, 2, 6, 8]

1.1.2 Štruktúra lignitu

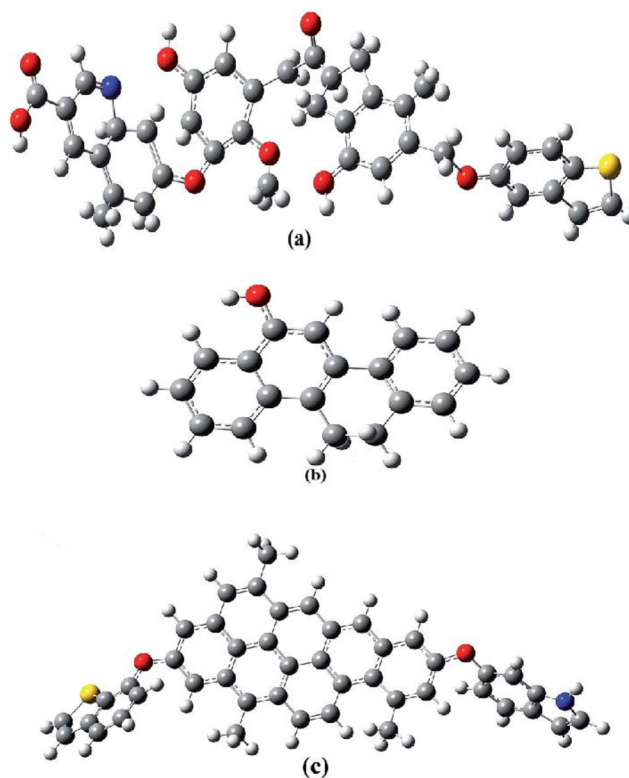
Uhlie samo o sebe nemá jedinečnú molekulárnu štruktúru, tým sa líši od polymérov, ktoré majú pravidelne opakujúce sa štruktúry založené na jednom alebo viac monoméroch. Uhlie sa takisto líši aj od biologických makromolekúl, ktoré síce majú veľmi zložitú komplexnú štruktúru, no ich štruktúra je jednoznačne objasnená. Pri uhlí môžeme hovoriť iba o takzvaných priemerných alebo empirických štruktúrach, ktoré boli vytvorené tak aby súhlasili s konečnou analýzou, rozložením funkčných skupín a taktiež s inými meranými vlastnosťami ako napríklad rozloženie molekulárnej hmotnosti. Tieto štruktúry sa nepovažujú za štruktúru uhlia, ale slúžia ako ilustrácia, ktorá môže pomôcť vysvetliť vlastnosti a reaktivitu uhlia [9]. Uhlie je zložené z mikrosubstituentov, ktoré sú označované ako macerálové skupiny. Ich pôvod je odvodzovaný z macerácie pôvodného rastlinného materiálu. Macerály sú pre uhlie ako minerály pre anorganické horniny, s tým rozdielom, že presná štruktúra macerálu nie je známa. Slovo „macerovať“ znamená niečo zmäkčiť pomocou namočenia do vody, čo sa presne deje so zvyškami vegetácie na začiatku procesu koalifikácie (viď kapitola 1.1.1 *Vznik lignitu*). Macerály sa identifikujú na základe ich optických vlastností pod mikroskopom. Všeobecne sa akceptuje klasifikácia ICCP², kedy sa macerály delia do troch skupín: liptinit, inertinit a huminit/vitrinit. Tieto skupiny sa líšia ako chemickou kompozíciou tak aj optickými vlastnosťami. [10, 11, 12]

Macerály liptinidovej skupiny zahŕňajú mnoho chemicky odlišných častí rastlín ako napríklad spóry, kutikuly, suberíny, živice, polymerizované vosky, tuky a oleje rastlinného pôvodu. Táto skupina macerálov má najvyšší obsah vodíka a obsahuje prevažne iba zlúčeniny alifatickej povahy. Väčšina macerálov tejto skupiny počas koalifikácie zmizne v dôsledku tepelnej transformácie alebo si vyvinú podobné optické vlastnosti ako macerály vitrinidovej skupiny vo fáze bitúmenového uhlia. Citlivosť na oxidáciu liptinidových macerálov je nízka a ich hydrogenačná kapacita je vynikajúca. [10, 13]

Inertinidová macerálna skupina je odvodená od rastlinného materiálu, ktorý bol pred depozíciou silne zmenený a degradovaný za oxidačných podmienok, alebo bol zmenený redoxnými, biochemickými a chemickými procesmi v štádiu rašeliny. Macerály tejto skupiny vykazujú vysoký stupeň aromatizácie a kondenzácie a sú tvorené štruktúrami, ktoré sú prevažne aromatického charakteru s vysokou úrovňou zosieťovania. Táto macerálová skupina má najvyšší obsah uhlíka a najnižší obsah kyslíka a vodíka. Macerály tejto skupiny sú inertnejšie, menej reaktívne, ako ostatné skupiny. [10, 13]

Huminidová/vitrinidová macerálová skupina pochádza hlavne z lignínu, celulózy a čiastočne z trieslovín a koloidných humínových gélov. Pri tvorbe macerálov tejto skupiny sa mohli podieľať aj proteíny a lipidy. Chemickú štruktúru uhlí nižšej úrovne predstavujú aromatické a hydroaromatické zlúčeniny, pri uhliach vyššej úrovne sa zvyšuje aromaticita, kondenzácia a zvyšuje sa aj počet polyaromatických jednotiek. Huminidové skupiny sa nachádzajú v uhliach nižšej úrovne a sú prekursorom pre vitrinidové skupiny v uhliach vyššej

² ICCP – The International Committee for Coal and Organic Petrology



Obrázok 2: Hypotetická štruktúra a) lignitu, b) bitúmenového uhlia, c) antracitu [14]

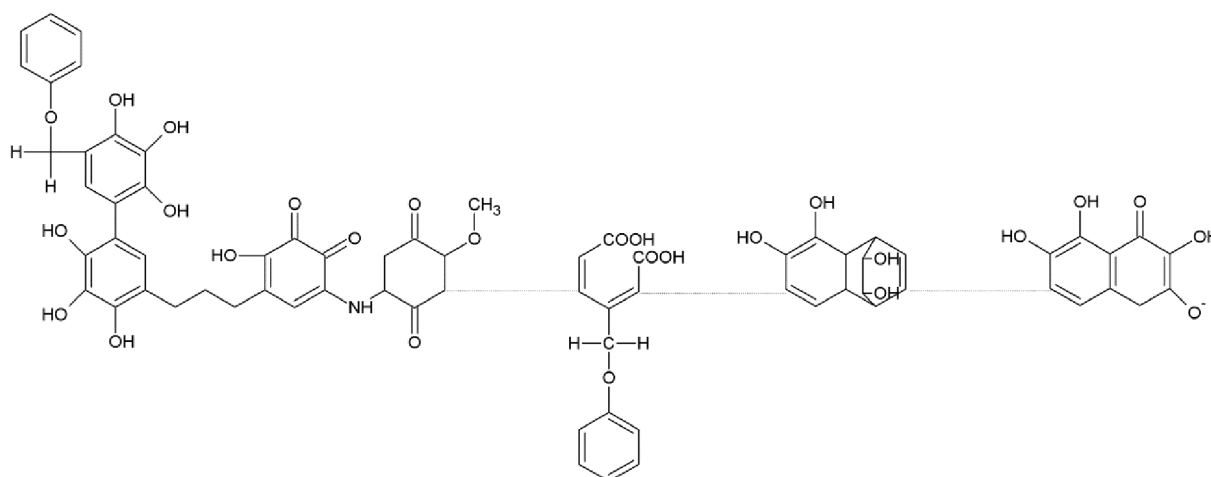
úrovne. Rastlinné tkanivá sa transformujú najskôr na huminit a potom na vitrinit procesmi, ktoré sa nazývajú humifikácia, gelifikácia a vitrinizácia. [10, 13, 15]

Obecne sa liptinit a vitrinit značne podobajú v mnoho hlavných chemických charakteristikách. Ich správanie pri substitučných aromatických reakciách je podobné a obidva zrejme pozostávajú z hydroaromatických štruktúr, ktoré sú ľahko dehydrogenovateľné, no majú niekoľko podstatných rozdielov. Vitrinit je nerozpustný v nitrobenzéne a trichlórbenzéne, zatiaľ čo liptinit je rozpustný v týchto nepolárnych rozpúšťadlách pre komplex aromatických zlúčenín. Vitrinit je ľahko oxidovateľný na humínové kyseliny, zatiaľ čo liptinit je odolnejší k oxidácii a nemá tendenciu tvoriť humínové kyseliny. Vitrinit je značne redukovaný lítiom v etylamíne a produkty sú dobre rozpustné v pyridíne, zatiaľ čo liptinit je redukovaný menej a produkty sú málo rozpustné. [10]

V tejto práci nás zaujímajú HL, ktoré sa nachádzajú v lignite. Lignite je uhlie nižšej úrovne, preto obsahuje macerálové skupiny liptinit, vitrinit a huminit. Dôležitá je macerálová skupina huminit. Huminit je rozdelený na tri macerálne podskupiny a na šesť macerálov. Mnoho týchto macerálov je priamo zložených z HL, ako napríklad textinit, ulminite alebo attrinit.

1.2 Humínové látky

Ako bolo v úvode spomínané, humus je definovaný ako zmes humifikovaného a nehumifikovaného organického materiálu. Humifikovaná frakcia predstavuje práve humínové látky. HL sú zmes amorfnych, polydisperzných zlúčenín so žltou až hnedo čiernou farbou. Sú hydrofilné, kyslé a majú veľké molekulové hmotnosti od pár sto až po tisíce Daltonov.



Obrázok 3: Hypotetický štruktúrny vzorec HK podľa Flaiga [16]

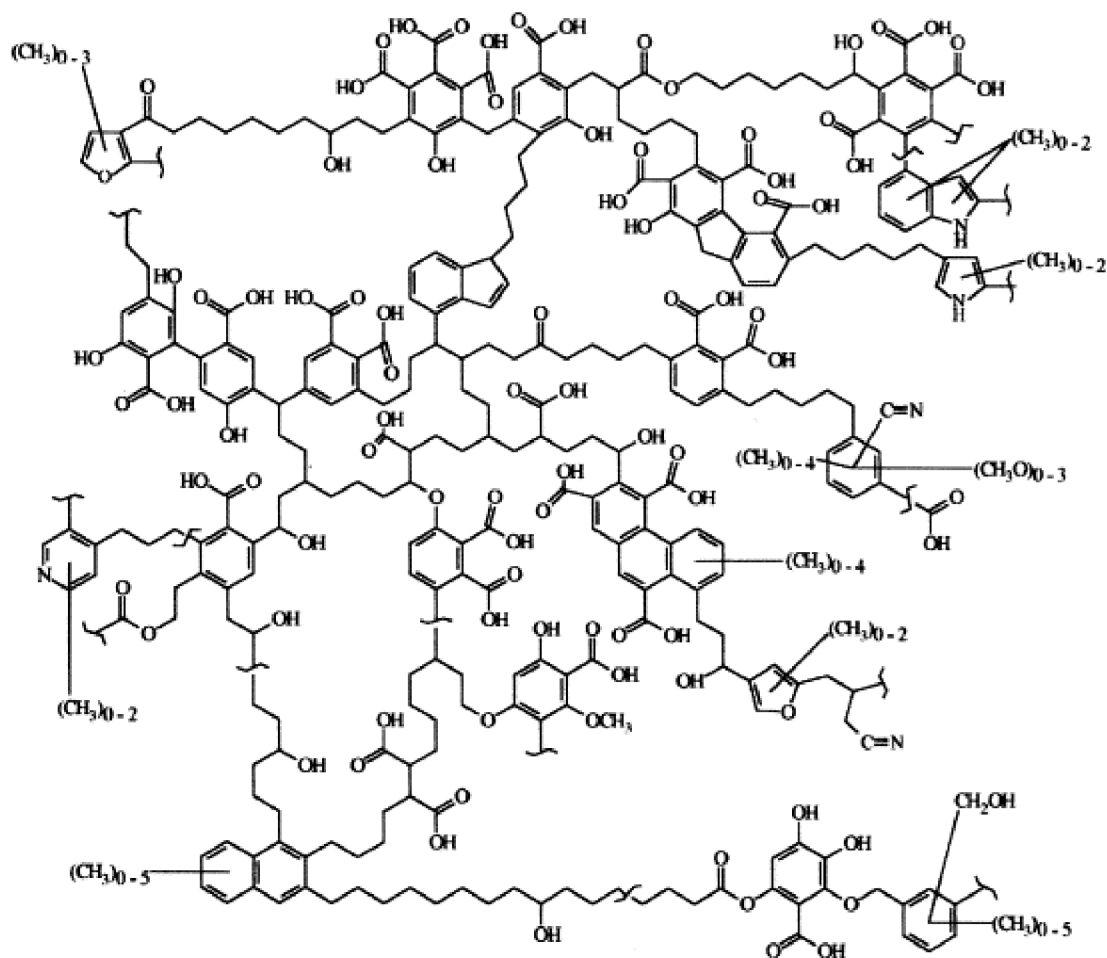
Pochádzajú z rozloženej organickej frakcie procesom, ktorý sa nazýva humifikácia a sú získavané väčšinou z pôdy extrakčnými, frakcionačnými a izolačnými procesmi so zásaditými a kyslými roztokmi. [17]

HL sa v minulosti nepovažovali za samostatné chemické zlúčeniny, ale prevládal názor, že sú to iba produkty extrakcie. Tento koncept hovoril o tom, že sú to nepravé zlúčeniny, ktoré sa nevyskytujú v prírode. Predpokladalo sa, že majú heterogénnu štruktúru a preto ich nemožno zaradiť do definovanej triedy zlúčenín, ako napríklad polysacharidy, proteíny alebo aminokyseliny, kde sú zlúčeniny klasifikované na základe presne daného chemického zloženia. [17]

Oproti tomu stál koncept založený na tom, že HL sú reálne zlúčeniny. Snahou zástancov tohto konceptu bolo hlavne prezentovať molekulárnu štruktúru HL, čo by pridalo váhu teórii, že sú reálne zlúčeniny. Problémom bola ale veľká rozmanitosť chemickej štruktúry v závislosti na fázy, z ktorej boli extrahované a na mieste výskytu. Nemecký vedec Flaig [18] v roku 1975 ale povedal, že meniaci sa charakter ich chemického zloženia je spôsobený dynamickou alebo prechodnou povahou HL kvôli ich nekončiacemu rozkladu a stále vznikajúcim novým formáciám. Domnieva sa, že prijatím rozdelenia HL na humínové a fulvínové kyseliny je naznačená prítomnosť určitého špecifického chemického zloženia. Schnitzer a Schulten [19] predstavili v rokoch 1993–1995 niekoľko konceptov na molekulárnu štruktúru humínových kyselín zostavených z produktov nájdených v ich degradačných analýzach. Práve títo dvaja vedci sa vo veľkej miere zaslúžili o úplné vyvrátenie konceptu HL ako nepravých zlúčeninách, ktoré vznikajú len ako produkt extrakcie. [20]

1.2.1 Rozdelenie humínových látok

Na začiatku rozvoja chémie humínových látok panoval názor, že HL sú prítomné iba v pôdach v obmedzených klimatických podmienkach, momentálne sa však považujú za najrozšírenejší materiál na zemskom povrchu, ktorý obsahuje organický uhlík. Nachádzajú sa v pôdach, v riekach a oceánoch a aj v ich sedimentoch, od tropických až po arktické regióny. Taktiež sú obsiahnuté v rašeline, lignite, leonardite, uhlí ale aj v ropných bridliciach. Väčšina týchto HL má pôvod v prírode, no existuje aj časť, ktorá vznikla antropogénnou činnosťou, väčšinou sa jedná o organický odpad vyprodukovaný človekom. [21]



Obrázok 4: Hypotetická schematická biomakromolekulárna štruktúra HK podľa Schnitzera a Schultena [22]

Rozdelenie podľa pôvodu

- pôdne humínové látky – skupina humínových látok v pôde, zložená z významných množstiev humínových a fulvínových kyselín. Podľa ligno-proteínovej teórie, ktorá je bližšie rozobratá v kapitole 1.2.2 *Vznik humínových látok*, sú humínové látky hlavne zložené z ligno-proteínového komplexu, kde je lignín hlavnou zložkou a lignín na základe charakteristického monoméru delíme na tri hlavné typy: lignín z mäkkého dreva, ktorého monomér je koniferyl alkohol, lignín z tvrdého dreva s monomérom sinapyl alkohol a lignín z trávy a bambusu, charakterizovaný monomérom kumaryl alkohol. Z toho vyplýva, že budú existovať humínové látky z mäkkého dreva, z tvrdého dreva a z trávy a bambusu, každé charakterizované príslušným monomérom. Reálne systémy sú ale zložené z tvrdého dreva, mäkkého dreva a aj trávy, preto humínové látky budú väčšinou zmesou týchto troch skupín.
- vodné humínové látky – skupina látok obsiahnutá v riekach, jazerách, moriach a v ich sedimentoch. V tejto skupine majú dominantné zastúpenie fulvínové kyseliny, humínové kyseliny sú len v minoritnom zastúpení, každopádne humínové kyseliny sú v značných mierach obsiahnuté na dnách jazier a morí. Táto skupina sa delí na pôvodné vodné humínové látky, ktoré vznikli vo vodnom prostredí z bunkových zložiek

pôvodných vodných organizmov a nepôvodné vodné humínové látky, ktoré boli sformované v pôde a následne boli premiestnené do vodného prostredia. Pri týchto humínových látkach môžu nastať chemické alebo fyzikálne zmeny vplyvom vodného prostredia, no sú stále podobné humínovým látkam z pôdy.

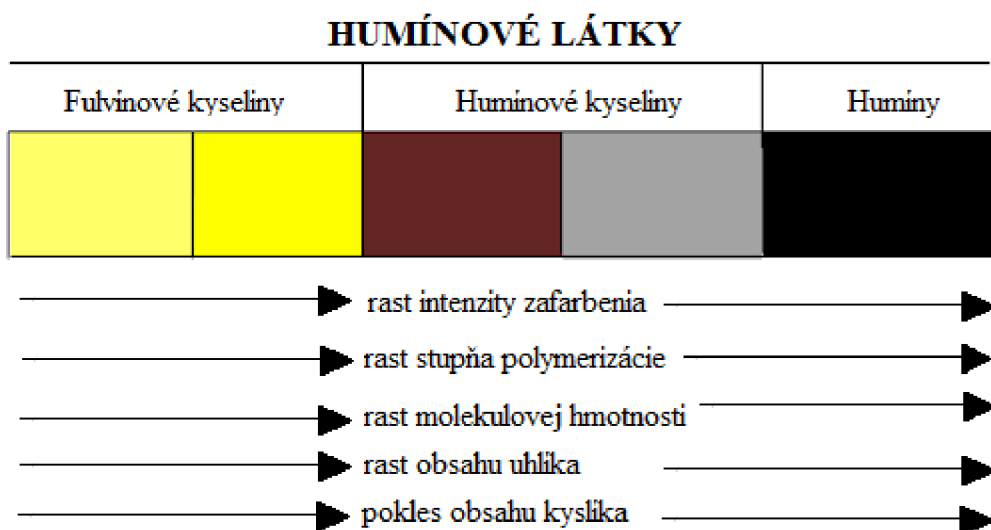
- humínové látky z rašeliny – typ pochádzajúci z močiarov, rašeliny a bažín. Pozostáva z HK a FK, pričom obsah HK stúpa od močiaru po bažinu.
- geologické humínové látky – skupina HL v lignite, leonardite a v ďalších typoch uhlia. Sú zložené najmä z HK a to preto, že FK sa procesom starnutia chemicky zmenili na HK.
- antropogénne humínové látky – tento typ HL vznikol z poľnohospodárskeho a priemyselného odpadu, a zo znečistených vodných tokov. Z nameraných dát vyplýva, že je zložený ako z HK, tak aj FK. [17]

Rozdelenie podľa chemických a fyzikálnych vlastností

Humínové látky sa na základe svojich vlastností, hlavne solubilizačných, delia na tri hlavné typy. Koncept týchto troch hlavných typov je platný pre pôdne, vodné, geologické, antropogénne a aj humínové látky z rašeliny. [21]

Prvý typ humínových látok sú humínové kyseliny. Tento typ humínových látok je rozpustný v bázičných rozpúšťadlách, no nerozpustný pri kyslých podmienkach a obmedzene rozpustné vo vode. HK sú charakterizované ako tmavohnedé až čierne, koloidné polydisperzné látky bez zápachu, predpokladá sa, že v prírode sú hydrofilné a kyslé. Ich molekulová hmotnosť je vysoká – od niekoľko stoviek až po tisíce Daltonov. HK majú väčšinou malý podiel popola, no záleží to na spôsobe extrakcie. HK získané extrakčnými metódami s NaOH majú menší podiel popola než HK získané metódami s pyrofosfátmi. [23]

Druhým typom sú fulvínové kyseliny. FK sú látky rozpustné v alkalických a kyslých roztokoch a aj vo vode. Sú to koloidné polydisperzné amorfné látky so svetložltou až hnedou farbou. FK vykazujú hydrofilné a silne kyslé vlastnosti, z troch typov HL majú najmenšie molekulové hmotnosti – 175 až 3 750 Daltonov. [24]



Obrázok 5: Rozdelenie HL podľa chemických a fyzikálnych vlastností [25]

Posledným typom sú humíny (HU). Táto skupina humínových látok nie je rozpustná v zásaditých ani v kyslých rozpúšťadlách. Kvôli ich nerozpustnosti a z toho vyplývajúcim ťažkostiam pri extrakcii a izolácii, HU nepriťahli na seba veľa pozornosti aj keď sa o ich prítomnosti vedelo už od začiatkov študovania humínových látok. Prevláda názor, že HU sú zmesi vysoko kondenzovaných HK silne naviazaných na ílový materiál a parafínové zlúčeniny. Ich nerozpustnosť v alkalických rozpúšťadlách je spojená s ich alifatickými polysacharidovými komponentmi v ich molekulách, a práve vysoký obsah polysacharidov je často používaný na ich odlišenie od HK. Hlavnou odlišujúcou látkou od HK sú ale parafínové zložky. [17]

1.2.2 Vznik humínových látok

Proces, ktorým vznikajú HL sa nazýva humifikácia. Tento proces je zložený z mnoho biochemických reakcií a je blízko prepojený k organickým a dusíkovým cyklom v prírode. Mechanizmus humifikácie nie je úplne objasnený, no existuje niekoľko teórií, ktoré budú rozobrané v ďalšom texte. Primárnymi prekurzormi HL sú lignín, a teda monoméry lignínu koniferyl alkohol, sinapyl alkohol a kumaryl alkohol, fenoly a polyfenoly, chinóny, bielkoviny, aminokyseliny, sacharidy a lipidy. Jednotlivé teórie sa líšia prekurzormi, no súhlasia s tým, že stavebnými blokmi HL sú fenolové skupiny a zlúčeniny, ktoré obsahujú dusík. [26]

Ligno-proteínová teória

Táto teória bola dominantnou spomedzi teórií vzniku HL a bola podporovaná významnými vedcami v obore HL ako napríklad Waksman, Konovova alebo Flaig. Teória predpokladá, že jadro humínových látok je tvorené lignínom a aminokyselinami (proteínmi). Pomocou pokročilých analytických techník boli v roku 2002 zistené veľké množstvá lignínu a proteínov v štruktúre HL, čo ešte viac podporilo túto teóriu. [27]

Predpokladá sa, že lignín je rozštiepený degradáciou alebo rozkladnými reakciami na jeho základné monoméry. Následne tieto lignínové monoméry podliehajú oxidácii alifatických postranných reťazcov na $-COOH$ skupiny a demetylácii $-OCH_3$ skupín, pričom vznikajú *o*-hydroxyfenoly. Následnou kondenzáciou s aminokyselinami a polysacharidmi vzniká molekula HK a fragmentáciou na menšie molekuly vzniká FK. [26]

Polyfenolová teória

V tejto teórii stále môže, ale nemusí hrať rolu lignín. Z mikrobiologického rozkladu lignínu vznikajú fenolické aldehydy a kyseliny, ktoré podliehajú enzymatickej konverzii na chinóny a polymerizáciou s amino zlúčeninami vznikajú makromolekuly HL.

Polyfenoly môžu byť syntetizované aj inak ako z lignínu a to pomocou mikroorganizmov z organických látok, ako napríklad celulóza. Vzniknuté polyfenoly sú potom enzýmovo oxidované na chinóny, ktoré sú prevedené obdobne polymerizáciou s amino zlúčeninami na HL. Po publikovaní tejto teórie bola mnohými vedcami považovaná ligno-proteínová teória za zastaralú. Podľa súčasných konceptov sú chinóny lignínového pôvodu spolu s tými, ktoré sú syntetizované mikroorganizmami, hlavnými stavebnými kameňmi HL. [27]

Teória kondenzácie sacharid-amín

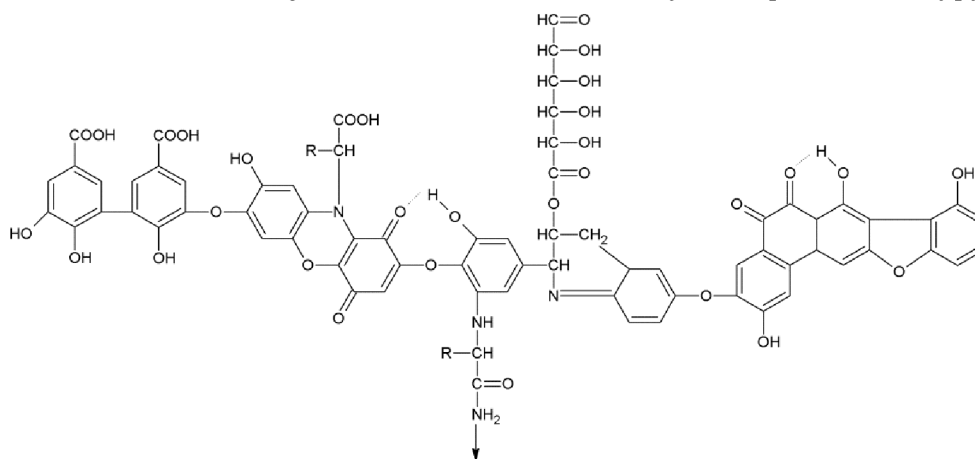
Podľa tohto konceptu sa redukujúce cukry a aminokyseliny, vytvorené ako vedľajšie produkty mikrobiálneho metabolizmu, podrobujú neenzymatickej polymerizácii za vzniku hnedých dusíkatých polymérov. Hlavnou námietkou proti tejto teórii je, že táto reakcia prebieha pomerne pomaly pri teplotách v pôde za normálnych podmienok. Kondenzáciu však môžu uľahčiť časté zmeny v pôdnom prostredí spolu so zmiešaním reaktantov s minerálnym materiálom, ktorý má katalytické vlastnosti.

Počiatočná reakcia pri kondenzácii sacharid-amín zahrňuje adíciu amínu k aldehydovej skupine sacharidu za vzniku n-substituovaného glykozylamínu. Glykozylamín následne prechádza do formy N-substituovaného-1-amino-deoxy-2-ketózy, ktorá podlieha fragmentácii a tvorbe aldehydov a ketónov s trojuhlíkatým reťazcom (acetol, diacetyl, atď.), dehydratácii a formácii redukónov a hydroxyfurfuralov. Všetky tieto zlúčeniny sú vysoko reaktívne a ľahko podliehajú polymerizácii s amino zlúčeninami za vzniku hnedo zafarbených produktov. [26, 27]

1.2.3 Molekulárna štruktúra humínových látok

Štúdium chemickej povahy HL brzdí nie len ich nerozpustnosť a makromolekulárna štruktúra, ale aj skutočnosť, že ide o komplexný konglomerát rôznych podjednotiek, ktoré netvoria jednotnú molekulu. Vzhľadom na uvedenú zložitosť sa používali degradačné metódy s cieľom získať zlúčeniny, ktoré je možno identifikovať, a ktoré by mohli súvisieť so štruktúrami HL. Hovoríme hlavne o degradačných metódach ako sú oxidácie, redukcie a hydrolýzy. Týmito degradačnými metódami boli získané dáta iba o stavebných jednotkách, ale nie o ich interakciách. Väčšina zlúčenín identifikovaných v HL je podobná zlúčeninám získaných degradáciou lignínu a mikrobiálnych fenolových polymérov. [28]

HL sú všeobecne považované za komplexné aromatické makromolekuly, v ktorých spojenie medzi aromatickými skupinami zaisťujú aminokyseliny, aminocukry, peptidy a alifatické zlúčeniny. Hypotetická štruktúra HK podľa Stevensona obsahuje voľné a viazané fenolické –OH skupiny, chinónové štruktúry, dusík a kyslík vo forme mostíkov a karboxylové –COOH skupiny rôzne umiestnené na aromatických kruhoch. HL pozostávajú z heterogénnej zmesi zlúčenín, preto nemožno jednoznačne popísať ich štruktúrny vzorec. Každá frakcia je zložená z molekúl o rozličnej veľkosti a množstva funkčných skupín. Hlavné typy funkčných



Obrázok 6: Hypotetický štruktúrny vzorec HK podľa Stevensona [31]

skupín HL sú karboxylové skupiny, fenolické –OH skupiny, alkoholové –OH skupiny a karbonylové skupiny. [28,29,30]

Molekuly HL majú hlavne vďaka karboxylovým a hydroxylovým skupinám záporný náboj. V závislosti od pH a iónovej sily roztoku, v ktorom sa nachádzajú, dochádza tiež k zmene ich tvaru. V roztoku s vysokým pH alebo nízkou iónovou silou sú totiž rozťahnuté v dôsledku intramolekulárnej repulzie medzi zápornými skupinami v rámci jednotlivých molekúl. Súčasne pôsobí aj intermolekulárna repulzia medzi zápornými skupinami susediacich molekúl, ktoré tak v silne alkalických roztokoch vytvárajú pravé roztoky. Pri pH menšom ako 7 alebo vysokej iónovej sile sú HL stočené do klobiek a vytvárajú agregáty. Na tomto princípe funguje vyzrážanie HK v kyslom prostredí, na rozdiel FK, ktoré sú kyslejšie a teda aj zápornejšie a teda agregácii podliehať nebudú. [30]

Polymérová teória

Jeden z hlavných predpokladov tejto teórie môže byť nájdený v historických hypotézach, ktoré považovali HL za produkty biologických syntéz z látok odvodených od lignínu, polyfenolov, celulózy a aminokyselín. Dôkazom tejto polymérnej štruktúry boli laboratórne experimenty, ktoré naznačovali možnosť abiotickej aj biotickej kondenzácie jednoduchých molekúl za vzniku materiálov podobných HL. Avšak, žiadny priamy dôkaz podobného procesu budovania polymérov v prírode nebol poskytnutý. Napriek neprítomnosti dôkazov viedli rozličné dôvody vedeckú obec k akceptovaniu tejto teórie. [32]

S postupnými teóriami vzniku HL, prichádzali aj teórie o ich molekulárnej štruktúre. Prvé koncepcie, ktoré vychádzali z vývoja polymérnej vedeckej disciplíny, naznačovali, že HL obsahovali náhodne stočené makromolekuly, ktoré mali v bázických roztokoch alebo v roztokoch s nízkou iónovou silou podlhovasté tvary, ale v kyslých roztokoch alebo v roztokoch s vysokou iónovou silou sa stali špirálami. Prvé koncepty štruktúry HL boli založené na ligno-proteínovej teórii, štruktúra HL pozostávala z monomérov lignínu. Ďalšie teórie prišli s polyfenolovou teóriou vzniku HL. V oboch spomínaných teóriách museli byť ale samotné monoméry jednotky pospájané uhlíkovými jednotkami. [32, 33]

Polymérny pohľad na HL zahrňoval všeobecný koncept polydisperzity, podľa ktorého sú HL zložené z polymérov s rozdielnymi molekulovými hmotnosťami, rovnako ako je to u iných prírodných makromolekulách ako napríklad u proteínov, polysacharidov a lignínu. Ťažkosti pri izolácii homogénnych frakcií HL boli prirovnávané k ťažkostiam pri polydisperzných biopolyméroch syntetizovaných v živých bunkách. Táto nepodstatná podobnosť podporovala polydisperzný polymérny koncept HL a vyvracala podozrenie, že ide len o zmes zlúčenín. [31]

Ako bolo vyššie spomínané, neexistovali žiadne priame dôkazy polymérnej teórie, no v tom čase neexistovala ani iná teória. Tým pádom širšia vedecká obec, aj napriek prítomnosti iba nepriamych dôkazov, akceptovala polymérnu teóriu, keďže nebola priamo ani vyvrátená ani potvrdená a lepšia alternatíva neexistovala.

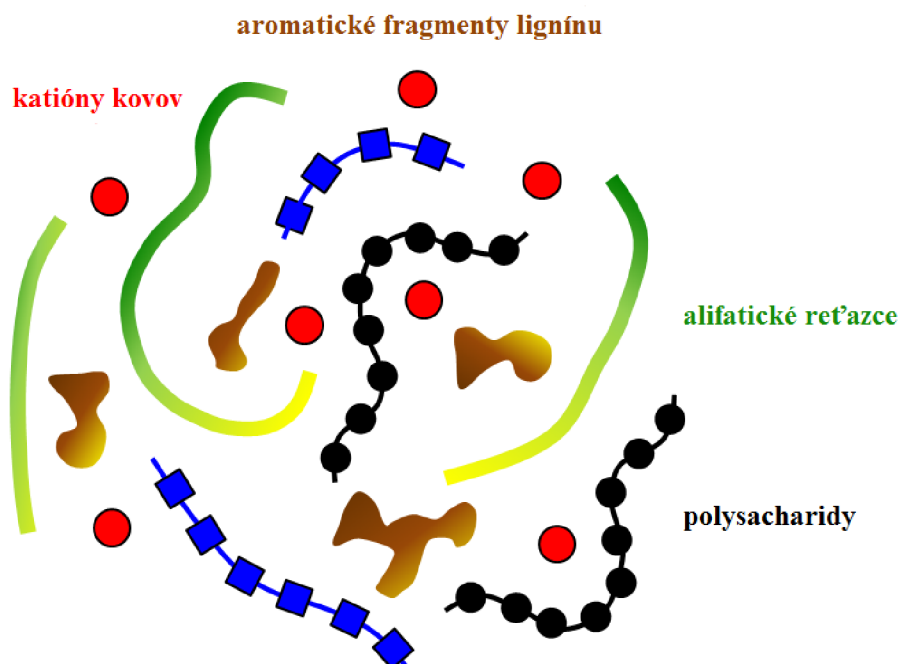
Supramolekulárna teória

Najnovšie informácie získané pomocou spektroskopických, mikroskopických, pyrolytických a mäkkých ionizačných techník nie sú v súlade s polymérnym modelom HL.

Taktiež nové preskúmanie pôdnych procesov pri tvorbe HL spochybňuje tento model. Namiesto toho sa objavil nový koncept HL, a to supramolekulárna asociácia, v ktorej mnoho relatívne malých a chemicky rozmanitých organických molekúl vytvára zhľuky spojené slabými neväzbovými interakciami, ako sú vodíkové väzby a hydrofóbne interakcie. Dôsledkom toho je vznik micelárnej štruktúry – usporiadanie organických molekúl vo vodných roztokoch tak, že vniká hydrofilná vonkajšia časť, ktorá cháni hydrofóbnu vnútornú časť od kontaktu s molekulami vody. [33]

Piccolo a kol. [32] poskytli pomocou gélovej permeačnej chromatografie a pomocou vysokotlakačnej vylučovacej chromatografie dôkaz, že zdanlivá veľkosť humínových frakcií sa drasticky mení s pridaním jednoduchých organických kyselín v porovnaní s pridaním HCl. UV/Vis spektrum HL ošetrených organickými kyselinami vykazuje hypochromizmus – znížená absorbanca kvôli zvýšenej vzdialenosti medzi absorbujúcimi chromoformi. Je zrejmé, že zdanlivá veľkosť HL sa nemení v dôsledku navíjania a odvíjania ako je spomínané v polymérovej teórii, ale v dôsledku agregácie a dezagregácie zhľukov menších molekúl. Účinky prísad karboxylových a minerálnych kyselín na humínové frakcie s rôznymi hydrofóbnymi vlastnosťami naznačujú, že narušenie agregátov je najväčšie, keď sa viac hydrofóbných HL kombinuje s organickými molekulami obsahujúcimi hydrofóbne aj hydrofilné segmenty. Tento výsledok naznačuje, že HL sú držané pomocou hydrofóbných interakcií, ktoré sa ľahko narušia, keď jednoduché organické molekuly preniknú do veľkých hydrofóbne viazaných asociácií a rozdelia ich na menšie, energeticky lepšie asociácie s vodíkovými väzbami. [33]

Model samozostavujúcej sa supramolekulárnej asociácie HL súvisí so vzájomnými afinitami určitých molekúl vo vodných roztokoch. Molekuly majú tendenciu združovať sa prostredníctvom intermolekulárnych síl a sila asociácie závisí od ich molekulárnych štruktúr. Mimoriadne silné asociácie sa vytvárajú pomocou nepolárnych zlúčenín prostredníctvom hydrofóbného efektu. Humínové supramolekulárne asociácie v roztoku sa teda vytvárajú



Obrázok 7: Supramolekulárna štruktúra podľa Simpsona [34]

samoorganizáciou hydrofóbných a amfifilných zlúčenín. Združenia sú postupne izolované od siete vodných štruktúr. Takéto oddelenie vedie k zvýšeniu entropie systému a k celkovej stabilizácii energie, akonáhle rôzne humínové molekuly tvoria superštruktúry. [32]

K vyššie spomínaným experimentom a teóriám sa pridávajú desiatky až stovky ďalších a výsledky týchto experimentov sa nedajú vysvetliť tradičným polymérnym modelom HL. Humínové látky možno skôr teda interpretovať ako koncept voľne viazaných humínových supramolekulárnych asociácií. V tomto koncepte si možno predstaviť HL ako relatívne malé, heterogénne molekuly rôzneho pôvodu, ktoré sa sami organizujú v supramolekulárnych konformáciách. Humínové supraštruktúry relatívne malých molekúl nie sú spojené kovalentnými väzbami, ale sú spojené iba slabými silami, ako disperzné hydrofóbne interakcie, van der Waalsove interakcie a vodíkové väzby. Hydrofilné a hydrofóbne domény humínových molekúl môžu byť susediace alebo obsiahnuté jedna v druhej a vo vode môžu vytvárať asociácie so zjavne veľkými molekulovými rozmermi. V humínových supramolekulárnych organizáciách intermolekulárne sily určujú konformačnú štruktúru HL a komplexnosť týchto nekovalentných interakcií riadi ich reaktivitu v prostredí. [32]

1.2.4 Využitie humínových látok

HL nachádzajú využitie v mnoho oblastiach ako napríklad poľnohospodárstvo, priemysel, oblasť životného prostredia ale aj medicína. V poľnohospodárskej a živočíšnej výrobe sa používajú ako prírodné rastové stimulanty. Významne ovplyvňujú kvalitu pôdy, zlepšujú jej fyzikálne vlastnosti, obsah vlhkosti a úrodnosť. Majú schopnosť vytvárať chelátové komplexy s mikroprvkami, čo uľahčuje príjem živín rastlinným bunkám. Súčasné štúdie ukazujú, že úrodnosť pôdy je do značnej miery ovplyvnená obsahom HL. Ich vysoká kationová výmenná kapacita, obsah kyslíka, ako aj nadpriemerná kapacita zadržiavania vody sú dôvodmi vysokej miery používania HL na zlepšenie úrodnosti pôdy a rastlín. [35]

V otázke životného prostredia sú HL užitočné vďaka už spomínanej schopnosti vytvárať chelátové komplexy. Viazu na seba ťažké kovy, mykotoxíny, polychlórované bifenyly, dioxíny, pesticídy a zabráňujú týmto látkam prechodu ďalej do potravinového reťazca. Taktiež zvyšujú biologickú odbúrateľnosť toxických organických látok ako sú fenoly, formaldehyd atď. Dobro rozvinutý koreňový systém, ktorý sa, ako bolo spomínané v predošlom odseku, dosahuje vysokým obsahom HL, bráni tomu aby sa dusičnany a pesticídy dostali do podzemnej vody. HL taktiež odstraňujú problém nadmerného zasolenia pri aplikácii vo vode rozpustných minerálnych hnojív. Sú schopné znižovať tento vysoký obsah solí v pôde a tým aj výslednú toxicitu, špeciálne NH_4 toxicitu. [35, 36]

Aplikácie HL v biochémií a farmácii majú značné obmedzenie kvôli svojmu zafarbeniu, ktoré nie je možné ľahko odstrániť. Avšak niekoľko pozitívnych vlastností bolo dosiahnutých a bolo aj publikovaných viacero štúdií liečivých vlastností HL. Zistilo sa, že HK podávané potkanom profylakticky, významne znížili rozšírenie žalúdočného poškodenia vyvolaného etanolom [37]. Ďalej sa tieto látky svojím pôsobením podobajú účinkom heparínu, estrogénu a rada derivátov HK bola označená ako terapeutiká. Ďalšieho využitia dosiahli HL v oblasti kozmetiky, kde sú používané k bahenným kúpeľom a liečebným zábalom. [25, 38]

1.3 Izolácia humínových látok z pevných matric

Základom úspechu extrakčných procedúr HL je použitie vhodného extrakčného činidla. Najstaršie metódy, ktoré boli praktikované už pred 200 rokmi, používali ako činidlo NaOH, čo je dodnes považované za akceptované extrakčné činidlo pre humínové látky. S pokrokom chémie humínových látok bolo toto činidlo konfrontované s teóriami, že chemicky ovplyvňuje produkty extrakcie a hľadalo sa lepšie, vhodnejšie činidlo a preto boli vytvorené kritériá, ktoré by dané činidlo malo spĺňať:

1. metóda by mala viesť k izolácii nezmeneného materiálu,
2. extrahované humínové látky musia byť bez anorganických kontaminantov ako sú íly a polyvalentné kationy,
3. extrakcia je ukončená tak, že je zaistená reprezentácia frakcií z celého rozsahu molekulových hmotností,
4. metódu je univerzálne možno aplikovať na všetky typy pôdy. [27]

1.3.1 Anorganické činidlá

Postupom času bolo mnoho činidiel hodnotených na základe ich efektivity v extrahovaní humínových látok, väčšinou mali zmiešané výsledky. Niektoré používané činidlá sú zobrazené v Tabuľka 2. Aj na základe dlhého hľadania nových činidiel, sa NaOH stále považuje za najviac efektívne činidlo v kvantitatívnej izolácii HL. Jeho ľahké odstránenie pri procese purifikácie je ešte k tomu prídavný benefit. Avšak pri používaní tohto činidla je podozrenie, že dochádza k autooxidácii HL a humínové kyseliny extrahované pomocou NaOH sa líšia v obsahu C, N, O od humínových kyselín extrahovaných inými činidlami. Na odstránenie tohto problému z časti môže pomáhať prevádzanie extrakcie v dusíkovej atmosfére.

Pri používaní metódy NaOH sa odporúča používať roztok 0,1 M NaOH, kvôli jeho miernejšej povahe, čím sa znížia šance na škodlivé zmeny. Pri NaOH teda platí, že čím väčšia koncentrácia roztoku, tým viac bude extrahovanej látky, ale tým je aj väčšia šanca, že sa extrahované HL chemicky zmenia. [17, 27]

Tabuľka 2: Anorganické činidlá používané na extrakciu HL [17] (N – normalita)

kyseliny	zásady a soli
0,1 N HCl	0,1 N NaOH
0,025 N HF	0,5 N NaOH
1% H ₃ BO ₃	0,1 M Na ₂ CO ₃
	0,5 M Na ₂ CO ₃ , pH 10,5
	0,2 M Na citrát, pH 7,0
	0,1 M NaF
	0,1 M Na ₄ P ₂ O ₇ , pH 7,0
	0,1 M Na ₄ P ₂ O ₇ , pH 9-10
	0,2 M Na ₂ – EDTA
	0,1 M Na ₂ B ₄ O ₇
	močovina

Ostatné činidlá sa používajú viac na špecifické extrakcie, ako napríklad pyrofosforečnan sodný, $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$, ktorý je často používaný na extrakcie pôd bohatých na seskvioxydy. Predsa len, všetky metódy oproti NaOH majú menšiu výťažnosť extrahovaných HL. Extrakcie pomocou kyselín by technicky mali poskytovať iba fulvínové kyseliny, keďže iba fulvínová frakcia je rozpustná v kyslom prostredí. [17, 27]

1.3.2 Organické činidlá

Voľba organických činidiel vychádzala z túžby vyhnúť sa chemickým zmenám v extrahovaných produktoch pri izolácii HL. Niektoré z organických činidiel sú zobrazené v Tabuľka 3, aj keď ich využitie nebolo tak uspokojujúce ako sa očakávalo. Použitie organických činidiel spôsobuje ešte viac problémov, ako použitie anorganických činidiel. Nie len, že boli preukázané ako slabšie extrahujúce činidlá, ale ešte k tomu sú po extrakcii oveľa ťažšie odstrániteľné. [17, 27]

Tabuľka 3: Organické činidlá používané na extrakciu HL [17]

kyseliny	neutrálne a zásadité látky
kyselina mravčia	acetonitril
kyselina šťaveľová	benzén
	chloroform
	dichlórmetán
	dimetylformamid
	dimetylsulfoxid
	dioxán
	etanol
	éter
	fenol

IHSS metóda

Táto metóda nepredstavuje odporúčanú alebo schválenú metódu, ale jedná sa o metódu, ktorá je akceptovaná a vyhovujúca pre väčšinu pôd a dá sa vykonať vo väčšine laboratórií. Produkuje vysoké výťažky a môže sa použiť ako štandardná metóda na porovnávanie medzi rozdielnymi laboratóriami. Táto metóda spočíva už vo vyššie spomínanej alkalickéj extrakcii pri dusíkovej atmosfére. Využívajú sa solubilizačné vlastnosti jednotlivých frakcií HL na ich oddelenie (napríklad okyslenie na separáciu HK od FK frakcie). Veľmi dôležitý je krok čistenia FK pomocou adsorpčnej živice XAD-8. Táto metóda bola použitá s drobnými úpravami aj v tejto práci, teda jej podrobný popis je zobrazený v kapitole 3 *Experimentálna časť*. [39]

NAGOYA³ metóda

Jedná sa o vylepšenú predošlú IHSS metódu, jedným z hlavných rozdielov medzi týmito metódami je objem použitého extrakčného činidla. Zatiaľ čo v IHSS metóde je použité činidlo 0,1 M NaOH o objeme 10-násobku hmotnosti pôdnej vzorky, v NAGOYA metóde je použitý

³ Pomenované podľa japonskej Nagoya univerzity

objem činidla 300-násoboku obsahu uhlíka v pôdnej vzorke. Objem extrakčného činidla v NAGOYA metóde sa teda do veľkej miery líši v závislosti od obsahu HL v pôde. Ďalším hlavným rozdielom medzi týmito metódami je purifikačný proces FK. Frakcie fulvínových kyselín obsahujú látky, ktoré sa označujú ako humínové látky, ale obsahujú aj iné organické látky, ako sú napríklad uhľovodíky, peptidy, lipidy, ktoré sa označujú ako látky nehumínového charakteru. V IHSS metóde sa vo frakciách považujú za FK iba humínové látky, pričom tieto látky sa, ako už bolo spomínané, adsorbujú na živici. V NAGOYA metóde bolo zvažované, že FK pozostávajú z humínových aj z nehumínových látok (je veľmi ťažké rozlíšiť vo frakciách FK, čo sú humínové látky, a čo už nie), preto sa pri tejto metóde nevyklúčujú neadsorbované materiály na živici, lebo sa predpokladá, že tieto materiály sú tiež dôležitými zložkami FK z hľadiska ich množstva a úlohy v pôdnom prostredí. Navyše v tejto metóde sa FK purifikujú pomocou dvoch druhov živíc, XAD-8 a nerozpustného polyvinylpyrolidónu (PVP). [40]

2 SÚČASNÝ STAV RIEŠENEJ PROBLEMATIKY

Veľmi dobrú prácu publikoval v roku 2014 Lamar a kol. [41], kde predstavili novú štandardizovanú metódu izolácie a kvantifikácie HK a FK v komerčných produktoch obsahujúcich humínové látky. Navrhnutie tejto metódy bolo iniciované predovšetkým z rád výrobcov a spotrebiteľov, ktorí vyžadovali novú a spoľahlivú metódu k overeniu deklarovaných množstiev HL v komerčných výrobkoch. Metóda bola vytvorená s pomocou IHSS a vychádza z alkalickéj extrakcie 0,1 M roztokom NaOH, po ktorej nasleduje okyslenie roztoku silnou minerálnou kyselinou, ktoré spôsobí fázové oddelenie HK od fulvínovej frakcie. Následne sú FK oddelené od DOM (dissolved organic matter) adsorpciou na neiónovej makroporéznej živici DAX v kyslom pH. Metóda sa odlišuje od predošlých tým, že množstvo HK a FK je stanovené gravimetricky a obsah je prepočítaný na bezpopolovú vzorku. K overeniu správnosti tejto metódy boli analyzované tri kvapalné komerčné produkty a štyri v pevnej (sypkej) forme. Testovanie referenčného štandardu a testovaných HL ukázalo, že metóda je spoľahlivá, presná a vysoko selektívna k HL prírodného pôvodu a jednoznačne odhalila cudzorodé organické zlúčeniny, ktoré boli pridané do humínových produktov. Taktiež autori uvádzajú, že táto metóda umožňuje odlíšiť FK od ostatných organických frakcií, ktoré sú prítomné vo fulvínovom extrakte. To platí aj pre cudzorodé látky, ktoré sú do komerčných výrobkov zámerne pridávané k zvýšeniu celkového podielu organického uhlíka. Autori ďalej uvádzajú, že metóda je dostatočne citlivá na stanovenie nízkych koncentrácií HL a na kompenzáciu neschopnosti odlíšenia FK extrahovaných z lignohumátu uvádzajú alternatívny prístup, a to prostredníctvom elementárneho stanovenia obsahu síry a meraním FTIR spektier jednotlivých preparátov.

Doskočil a kol. [42] vo svojej práci študovali HK izolované z európskych lignitov, konkrétne sa jednalo o vzorky z Bulharska (Balsha a Maritza), Srbska (Dragačevo a Kostolac), Poľska (Konin) a z Českej republiky (Južná Morava). HK boli extrahované zo vzoriek lignitov pomocou upraveného postupu odporúčaného spoločnosťou pre výskum humínových látok IHSS. Pred samotnou izoláciou HK boli prírodné matrice jemne mleté na zrnitosť menšiu ako 0,2 mm a následne boli vzorky dekalciifikované pomocou 0,1 M roztoku kyseliny chlorovodíkovej. Tento purifikačný krok mal za následok významné zníženie anorganických prímiesí – popola v preparátoch HK. Autori vo svojej práci uvádzajú, že obsah popola sa v študovaných HK pohyboval v rozmedzí 0,5–2,5 hm. %, pričom dve vzorky, konkrétne Balsha a Kostolac, vynikali od ostatných svojím pomerne vysokým obsahom popola (Balsha 15 hm. %, Kostolac 23,5 hm. %). Autori uvádzajú, že obsah popola môže závisieť aj na metóde spracovania vzorky, ale aj na jej geografickom pôvode. Lignity s takto vysokým obsahom popola a nízkym obsahom HK sú menej vhodné ako surovina pre komerčné spracovanie. Ďalej sa autorom podarilo zistiť, že najbohatším zdrojom HK bola vzorka z Českej republiky s výťažkom 11,4 %. Vlhkosť izolovaných HK sa pohybovala v rozmedzí 2,7–6,8 hm. %. Okrem HK izolovaných z lignitov Balsha a Kostolac bol obsah biogénnych prvkov podobný a zodpovedá elementárnemu zloženiu HL izolovaných z kaustobiolitických prírodných matric. Najnižší obsah uhlíka bol analyzovaný u vzorky HK, pochádzajúcej z lignitu Kostolac, ktorý bol taktiež charakterizovaný najvyšším obsahom kyslíka.

Wali a kol. [43] sa vo svojej práci zaoberajú efektivitou extrakcie HK z lignitu pochádzajúceho z Tuniska. Extrakčná metóda bola optimalizovaná pomocou matematických

a štatistických experimentov/testov ako napríklad „full factorial design“ alebo ANOVA, založených na interaktívnych efektoch koncentrácií NaOH a Na₄P₂O₇, extrakčnej teploty, či času miešania alebo iných vstupných faktoroch. Extrakčné činidlá boli pripravené o rôznych koncentráciách, v prípade NaOH v rozmedzí 0,1–0,8 M, naproti tomu pyrofosforečnan sodný bol pripravený o koncentráciách v rozmedzí 0,015–0,060 M. Z týchto roztokov bolo pripravených 16 extrakčných činidiel vždy v objemovom pomere 1:1 (NaOH:Na₄P₂O₇). Izolované HK boli hodnotené na základe pomeru absorpcií pri 465 a 665 nm, čo predstavuje humifikačný index E₄₆₅/E₆₆₅. Tento index je výrazne citlivý k odhadu strednej molekulovej hmotnosti \overline{M}_w , aromaticity a v neposlednom rade aj odhadu kyslých funkčných skupín ako sú –COOH a –OH skupiny. Autori v svojej práci uvádzajú, že v prípade optimalizovaných podmienok – koncentrácia NaOH 0,8 M, koncentrácia Na₄P₂O₇ 0,06 M, teplota 85 °C a čas miešania 6 hodín, sú izolované HK charakterizované vyššou strednou molekulovou hmotnosťou, aromaticitou a vyšším obsahom kyslých funkčných skupín, čo je možné vyčítať z nízkej hodnoty absorpčného koeficientu E₄₆₅/E₆₆₅, ktorého hodnota bola 1,37. Tieto závery boli podporené taktiež infračervenými spektrami, ktoré vykazujú, že tieto HK boli charakterizované intenzívnejšími absorpčnými pásmi, ktoré zodpovedajú špecifickým absorpciám aromatických štruktúrnych jednotiek a karboxylovým a –OH fenolickým funkčným skupinám.

Publikácia od autora de Souza a kol. [44] predstavuje extrakciu a charakterizáciu HK z uhlia, konkrétne sa jedná o sub-bitúmenové uhlie z bane Candiota, ktorá sa nachádza v južnej Brazílii. Surový materiál mal stredný priemer častíc 0,032 mm, čo bolo stanovené pomocou laserovej granulometrie. Extrakcia HK bola prevedená pomocou roztoku NaOH o koncentrácii 0,5 M v pomere 1:10 (uhlie:extrakčné činidlo). Takto vzniknutá suspenzia bola 3 hodiny miešaná a následne bola 12 hodín ponechaná stáť a potom bola centrifugovaná. Supernant obsahujúci HK bol okyslený pomocou koncentrovanej HCl za konštantného miešania. Po oddelení HK bola na odstránenie anorganických nečistôt prevedená purifikačná metóda pomocou 0,2 dm³ 5% roztoku HCl/HF v pomere 1:1. Purifikované HK boli prepláchnuté deionizovanou vodou a vysušené pri 60 °C. Autor uvádza, že aj napriek purifikačným krokom sa očakáva malé množstvo anorganických nečistôt v izolovaných HK, pričom sa odkazuje na termogravimetrickú analýzu, ktorá stanovila obsah popola na 5 hm. %. Ďalej poukazuje na fakt, že obsah popola v HK pozostáva hlavne z kremíka a hliníka, malých množstiev železa a titánu a zo stopových množstiev ťažkých kovov. To, že purifikačný krok s roztokom HCl/HF bol účinný potvrdzuje aj infračervené spektrum, čo možno vyčítať z malého absorpčného pásu pri 1100 cm⁻¹ a slabého rozlíšenia absorpčných pásov pod 760 cm⁻¹. Samotné sub-bitúmenové uhlie pozostávalo z 53,36 hm. % popola, 24,28 hm. % prchavých látok a 5 hm. % vlhkosti. Charakterizácia izolovaných HK ukázala vysoký obsah uhlíka a kyslíka (68,79 hm. % a 23,64 hm. %). Hodnoty atómových pomerov H/C a O/C sú podobné ako HK z uhlia s nižším stupňom metamorfizmu. Množstvo kyslíka môže súvisieť s prítomnosťou kyslíkatých funkčných skupín na povrchu HK, ako sú hlavne karboxylové a fenolické –OH skupiny. Autor uvádza, že toto tvrdenie je taktiež možné potvrdiť pomocou výsledkov v infračervenom spektre.

3 EXPERIMENTÁLNA ČASŤ

3.1 Použité chemikálie a prístroje

Chemikálie:

- vzorka juhomoravského lignitu, Dŕl Mír Mikulčice
- katex živice Amberlite 120 IR H⁺ form, Sigma Aldrich
- hydrofóbná živica XAD-8, Sigma Aldrich
- metanol p.a., Sigma Aldrich
- ultračistá voda PURELAB Flex, PURELAB[®]
- chlorid draselný p.a., Lach-Ner s.r.o.
- 0,1M HCl; 0,1M NaOH – normal, Lach-Ner s.r.o.
- kyselina fluorovodíková 35–40%, Lach-Ner s.r.o.
- hydroxid draselný p.a., Lach-Ner s.r.o.

Prístroje:

- kyvety Hellma Suprasil[®]
- odstredivka Hettich Rotina 46R
- rotačná odparka
- pH meter a konduktometer Mettler Toledo
- lyofilizátor Vir-Tis
- termogravimetrický analyzátor TG Q5000, TA Instruments
- elementárna analýza EuroVector EuroEA3000
- UV/Vis spektrofotometer Hitachi U3900H
- Thermo Scientific[™] Nicolet[™] iS50 FTIR spektrometer
- Metrohm Titrando automatický titrátor

3.2 Izolácia humínových látok z lignitu

K 10 g vzorky lignitu, naváženej s presnosťou na štyri desatinné miesta, bolo pridaných 500 ml 0,1M roztoku HCl a takto vzniknutá zmes sa nechala trepať na rotačnej trepačke po dobu jednej hodiny. Tento krok bol určený na odstránenie nečistôt zo vzorky, ako sú napríklad uhličitaný. Po hodine bola suspenzia zneutralizovaná pomocou 1M roztoku NaOH na hodnotu pH približne 7. Suspenzia bola odstredená pri 4000 otáčkach za minútu ($2700 \times g$) po dobu 15 minút, kvapalný podiel bol odstránený a k pevnému podielu bolo pridaných 1000 ml 0,1M roztoku NaOH. Suspenzia bola nechaná v rotačnej trepačke cez noc pri 10 otáčkach za minútu. Týmto krokom bol vytvorený výluh zo vzorky lignitu s obsahom HK, FK a ľahko hydrolyzujúcich aromatických a alifatických organických kyselín. Po trepaní bol z výluhu oddelený kvapalný podiel od pevného centrifugáciou pri 4000 otáčkach za minútu po dobu 20 minút. Vzniknutý supernant bol ešte navyše prefiltrovaný za zníženého tlaku pre odstránenie prípadných nečistôt, ktoré neboli odstránené pri centrifugácii. Týmto celým postupom boli súčasne spracovávané dve vzorky z totožnej prírodnej matrice lignitu.

3.3 Separácia humínových kyselín

Vzniknutý roztok s obsahom HL z predchádzajúcej podkapitoly bol okyslený pomocou koncentrovanej HCl na hodnotu pH približne 1. Okyslením roztoku došlo ku koagulácii HK, roztok bol ponechaný v zníženej teplote cez noc (15 hodín), počas čoho došlo k úplnému zabaleniu makromolekulárneho kĺbka HK. Vyzrážané HK boli následne odstránené od supernantu centrifugáciou pri 4000 otáčkach za minútu po dobu 20 minút. Roztok nad vyzrážanými HK bol uchovaný pre neskoršiu izoláciu FK. Vyzrážané HK boli znovu rozpustené prídavkom 100 ml 0,1M roztoku KOH. Následne bolo pridaných 2,2 g KCl. Takto vzniknutý roztok bol odstredený pri 4000 otáčkach za minútu po dobu 30 minút. Po odstránení nerozpustných častí ako sú humíny a prípadné nečistoty, bol roztok HK okyslený pomocou koncentrovanej HCl na hodnotu pH približne 1. Takto pripravený roztok bol opäť ponechaný v zníženej teplote cez noc (15 hodín), pričom dochádzalo k vyzrážaniu HK. Vyzrážané HK boli následne oddelené od supernantu centrifugáciou pri 4000 otáčkach za minútu po dobu 20 minút. Roztok nad vyzrážanými HK bol uchovaný pre neskoršiu izoláciu FK. K vyzrážaným HK bolo pridaných 500 ml roztoku zmesi 0,1M HCl a 0,3M HF. Táto suspenzia bola ponechaná na rotačnej trepačke po dobu dvoch dní. Následne boli HK oddelené od supernantu centrifugáciou pri 4000 otáčkach za minútu po dobu 20 minút, HK boli prevedené do dialyzačnej membrány s pómi o veľkosti 1000 Da. Dialýza prebiehala 5 dní v ultračistej vode. Po dialýze boli HK prevedené do lyofilizačných baniek, najskôr boli vymrazené na rotačnej vákuovej odparke a následne boli lyofilizované na lyofilizátore do úplného vysušenia.

3.4 Separácia fulvínových kyselín

Vzhľadom na to, že FK sú rozpustné v alkalickom aj v kyslom prostredí a na to, že roztoky, z ktorých boli FK izolované obsahovali aj iné rozpustené organické látky, bolo potrebné využitie selektívnej adsorpcie na hydrofóbnej živici DAX-8.

3.4.1 Adsorpcia fulvínových kyselín na živicu

Živica DAX-8 bola pripravená nadávkovaním požadovaného množstva potrebného na veľkosť sklenenej kolóny do kadičky, kde bola zaliata metanolom aby jeho hladina bola aspoň 2 cm nad hladinou živice. Táto suspenzia bola ponechaná na magnetickej miešačke pri 350 otáčkach za minútu po dobu 15 minút. Suspenzia bola nadávkovaná do kolóny, metanol bol odliaty a kolóna bola premytá destilovanou vodou, pričom hladina vody v kolóne musela byť vždy nad hladinou živice aby nedochádzalo k vysychaniu živice. Pred samotnou adsorpciou FK na živicu DAX-8 bola táto živica aktivovaná pomocou 0,1 M roztoku NaOH a 0,1 M roztoku HCl. Ďalej bola kolóna premytá deionizovanou vodou. Premývanie kolóny bolo ukončené v prípade, kedy hodnota pH na výstupe bola zhodná s hodnotou pH deionizovanej vody dávkovanej na vstupe kolóny.

Roztok FK bol podrobený ultrafiltrácii s filtrom s pómi veľkosti 0,45 μm , aby došlo k odstráneniu pevných častíc, či zbytkom vyzrážaných HK. Takto pripravený roztok FK bol dávkovaný na kolónu, kedy sa fulvínové kyseliny adsorbovali na živicu. Následne bola kolóna premývaná deionizovanou vodou, až kým výtok z kolóny nedosahoval hodnotu absorbancie pri vlnovej dĺžke 350 nm menej ako 0,015. Tento krok mal za úlohu vyplaviť z kolóny

rozpustenú organickú hmotu, hlavne ľahko hydrolyzujúce organické kyseliny. Následne bola prevedená desorpcia FK zo živice, a to pomocou roztoku 0,1M NaOH. Kolóna bola premývaná týmto roztokom až dovtedy, kým výtok z kolóny nedosahoval hodnotu absorpcie pri vlnovej dĺžke 350 nm menej ako 0,03.

Po ukončení desorpcie FK bolo nutné kolónu regenerovať, aby bola pripravená na ďalšie použitie. Kolóna bola regenerovaná premývaním roztokom 0,1M HCl. Premývanie prebiehalo až dokým výtok z kolóny nemal takú istú hodnotu pH ako roztok, ktorý bol dávkovaný do kolóny z hora. Následne bolo nutné kolónu premyť vodou, a to tiež až dokým nebolo zhodné pH na vstupe a na výstupe z kolóny.

3.4.2 Protonácia fulvínových kyselín na živici

Predošlým krokom boli získané FK vo forme sodných solí – fulvátov, a preto bolo nutné FK znovu naprotonovať. Z alkalického roztoku FK boli kationy Na^+ odstránené pomocou katexu Amberlite IR 120 výmenou za H^+ ióny.

Katex bol zaliaty deionizovanou vodou a táto suspenzia bola miešaná na magnetickej miešačke po dobu 15 minút. Následne bola suspenzia prevedená do sklenenej kolóny a živica bola aktivovaná ako v predošlom prípade pomocou 0,1 M roztoku NaOH a 0,1 M roztoku HCl, kedy následne bola kolóna premytá deionizovanou vodou a premývanie kolóny bolo ukončené v prípade, kedy hodnota pH na výstupe bola zhodná s hodnotou pH deionizovanej vody dávkovanej na vstupe kolóny.

Roztok FK získaný z predošlého kroku bol opakovane premývaný cez kolónu, až pokým hodnota vodivosti výtok z kolóny neklesla pod $120 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$. Následne bola kolóna premývaná vodou, až kým výtok z kolóny nedosahoval hodnotu absorpcie pri vlnovej dĺžke 350 nm menej ako 0,015.

Po dosiahnutí hodnoty absorpcie pri vlnovej dĺžke 350 nm menšej ako 0,015 bolo treba kolónu regenerovať, aby bola pripravená na ďalšie použitie. Bolo potrebné živicu znovu naprotonovať a vymyť adsorbované Na^+ ióny. Na tento účel bol použitý roztok 0,1M HCl, kolóna bola premytá objemom 1000 ml tohto roztoku, následne bola kolóna premývaná destilovanou vodou, až dokým výtok z kolóny nemal takú istú hodnotu pH ako voda, ktorý bola dávkovaná z hora do kolóny.

Získaná vzorka FK o objeme 2000 ml bola zakoncentrovaná na vákuovej rotačnej odparke, kedy bolo odparených približne 80 % pôvodného rozpúšťadla. Ďalej boli roztoky FK prevedené do lyofilizačných baniek, najskôr boli vymrazené na rotačnej vákuovej odparke a následne boli lyofilizované na lyofilizátore do úplného vysušenia.

3.5 Základná fyzikálne chemická charakterizácia

3.5.1 Elementárna analýza

Elementárne zloženie izolovaných vzoriek HL a lignitu bolo získané pomocou CHNS-O elementárneho analyzátoru EuroVector EuroEA3000. Kalibrácia analyzátoru bola prevedená štandardnou látkou 4-aminobenzensulfonamidom. Navážené vzorky HL a lignitu boli spálené v atmosfére kyslíka pri pracovnej teplote 980°C . Všetky vzorky boli merané v troch opakovaniach. Elementárne zloženie bolo zistené pomocou vyhodnocovacieho

programu *Callidus*TM 5.1. Následne bolo získané elementárne zloženie prepočítané na atómové percentá.

3.5.2 Termogravimetrická analýza

Vzorky HL a lignitu boli termogravimetricky analyzované na prístroji TGA Q5000. Navážka jednotlivých vzoriek činila ~ 5 mg, vzorky boli spálené z laboratórnej teploty na konečnú teplotu 800 °C v atmosfére vzduchu s prietokom 50 ml·min⁻¹ a s rýchlosťou ohrevu pece 10 °C·min⁻¹. Zo získaných dát bol následne určený obsah vlhkosti a nespáliteľného podielu, čo predstavuje popol. Tieto hodnoty boli použité na dopočítanie hmotnostného podielu kyslíka. Stanovený obsah HK a FK v lignite bol pomocou stanovenej vlhkosti a popola prepočítaný na suchú a bezpopolovú vzorku.

3.5.3 UV/Vis spektrometria

UV/Vis spektrá boli získané pomocou Hitachi U3900H UV/Vis spektrofotometra v rozmedzí vlnových dĺžok 200–900 nm. Boli pripravené vzorky HK a FK o koncentráciách 10 mg·dm⁻³ a 50 mg·dm⁻³ v štandardnom fosfátovom pufre (NaH₂PO₄, Na₂HPO₄) o pH 6,95. Vzorky boli merané v 1 cm kremennej kyvete. Hlavným účelom UV/Vis spektrometrie je určenie absorpčných koeficientov E_{ET}/E_{BZ}, E₂/E₄, E₂/E₃ a E₄/E₆, ktoré sú ukazovateľmi niektorých štruktúrnych a fyzikálne chemických vlastností humínových látok.

3.5.4 FTIR spektrometria

Infračervená spektrometria s Fourierovou transformáciou (FTIR) bola použitá k získaniu informácií o štruktúre, povahe a obsahu jednotlivých funkčných skupín, či už reakčných alebo stavebných jednotiek humínových látok. V tejto práci bol použitý spektrometer Nicolet iS50, pomocou ktorého boli namerané infračervené spektrá metódou difúzneho odrazu DRIFT (Diffuse Reflectance Infrared Fourier Transform Spectroscopy), všetky v rozmedzí vlnočetu 4000–400 cm⁻¹ s rozlíšením 8 cm⁻¹ a s celkovým počtom akumulovaných skenov 512. Bola prevedená konverzia do Kubelka-Munk jednotiek, pričom v grafickej podobe boli výsledky normalizované. Metóda merania DRIFT spektier nespôsobuje deprotonáciu kyslých funkčných skupín HL, ako je tomu v prípade použitia transmisnej techniky, kedy je vzorka lisovaná pri vysokých tlakoch (≈ 80 kN·cm⁻¹) v zmesi s KBr.

3.5.5 Stanovenie kyslosti

Spätná titrácia

Táto titrácia slúžila k určeniu celkovej kyslosti. Navážka 100 mg HK bola rozpustená v 100 ml 0,01M NaOH a bola ponechaná po dobu 24 hodín na magnetickej miešačke. Následne bola vzorka titrovaná 0,05M roztokom HCl s prídavkom 0,1 ml·min⁻¹ pomocou automatického titrátoru Metrohm Titrando. Titrácia bola ukončená po dosiahnutí pridaného objemu kyseliny 60 ml.

Karboxylátová titrácia

Bolo navážených 50 mg vzorky HK izolovanej z prírodnej matrice lignitu, táto navážka bola kvantitatívne prevedená do roztoku 40 ml octanu vápenatého o koncentrácii 0,5 M a 10 ml destilovanej vody. Slepá vzorka bola pripravená z 40 ml octanu vápenatého a 60 ml vody. Obe vzorky boli ponechané na magnetickej miešačke po dobu 24 hodín, po čom boli prefiltrované a doplnené destilovanou vodou na objem 100 ml. Titrácia bola prevedená pomocou automatického titrátoru Metrohm Titrando 0,1M roztokom NaOH s prídavkom $1 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ do konečného objemu pridávaného titračného činidla 10 ml.

4 VÝSLEDKY A DISKUSIA

4.1 Stanovenie obsahu HK a FK

Izolované množstvá HL z prírodnej matrice lignitu boli prepočítané na sušinu a výsledné hodnoty sú zobrazené v Tabuľka 4. Z výsledných hodnôt je možné pozorovať, že HL tvoria $(28,62 \pm 1,40)$ hm. % z celkovej navážky lignitu, pričom v majoritnom množstve sú zastúpené HK, FK sú obsiahnuté iba ako približne 1 hm. % z celkovej navážky lignitu. Toto zistenie je v zhode s tvrdením, že HK sú produktom kondenzácie FK, kedy väčšina fulvínových kyselín prejde transformáciou na humínové kyseliny [45].

Tabuľka 4: Obsah HL izolovaných z prírodnej matrice lignitu vyjadrený v hm. %

navážka lignitu	HK (hm. %)	FK (hm. %)	HL (hm. %)
1	26,22	1,01	27,23
2	28,77	1,26	30,03
priemer	$27,49 \pm 1,27$	$1,13 \pm 0,13$	$28,62 \pm 1,40$

4.2 Elementárna analýza a TGA

Izolované vzorky HK a FK boli podrobené fyzikálne chemickej charakteristike, počnúc elementárnou analýzou, ktorá bola vykonaná na prístroji EuroVectro EuroEA 3000. Relatívne zastúpenie prvkov C, H, N a S v hmotnostných percentách bolo priamo odmerané prístrojom a následne boli dáta prepočítané na atómové percentá, keďže pri hmotnostných percentách by bol podhodnotený podiel vodíka. Príspevok kyslíka bol dopočítaný po termogravimetrickom meraní na prístroji TG Q5000, pomocou ktorého bolo zistené množstvo popola a vlhkosť vo vzorkách, rozdielom 100 % a súčtu príspevkov C, H, N, S, popola a vlhkosti. Výsledné hodnoty sa nachádzajú v Tabuľka 5, ktorá obsahuje navyše aj atómové pomery H/C a O/C.

Tabuľka 5: Elementárne zloženie, obsah popola, celková vlhkosť a vypočítané atómové pomery H/C a O/C pre vzorku prírodnej matrice lignitu a vzorky HK a FK izolovaných z prírodnej matrice lignitu

	at. %					hm. %			
	C	H	N	S	O	H/C	O/C	vlhkosť	popol
HK	45,78	37,23	1,10	2,13	13,77	0,81	0,30	3,83	1,69
FK	33,00	45,65	0,68	0,00	20,67	1,38	0,63	6,71	2,00
lignit	41,77	46,06	0,74	2,13	9,30	1,10	0,22	8,29	18,27

Z výsledných hodnôt je zreteľné, že HL sú tvorené prevažne uhlíkom, vodíkom, kyslíkom a v minoritnom množstve dusíkom, pričom HK sú charakterizované vyšším zastúpením uhlíka ako FK. Vo vzorke FK nebola detekovaná síra, čo je spôsobené tým, že bola použitá GC kolóna, ktorá umožňuje detekciu síry až pri $> 0,5$ hm. %. Dôležitými faktormi sú atómové pomery, kedy pomer H/C hovorí o miere aromaticity a dehydrogenácie skúmanej vzorky. Ako je možné vyčítať z Tabuľka 5, HK sú charakterizované nižšími hodnotami atómového pomeru H/C, čo znamená, že študované HK vykazujú vyššiu mieru aromaticity a dehydrogenácie ako FK, zjednodušene povedané analyzované FK sú viac alifatické.

Druhý atómový pomer, O/C, vyjadruje množstvo kyslíka viazaného na uhlík, a teda hovorí o obsahu kyslíkatých funkčných skupín, kam sú radené karboxylové, –OH fenolické

resp. aj alkoholové a alkoxylové $-OCH_3$ skupiny. Vzorka FK vykazuje vyššie hodnoty tohto pomeru, čo svedčí o jej vyššom obsahu spomínaných funkčných skupín, predovšetkým karboxylových. Tento záver je podporený výsledkom z FTIR spektrometrie, kde v infračervenom spektre FK bol lokalizovaný ostrý a veľmi intenzívny absorpčný pás zodpovedajúci válenčným vibráciám $C=O$ väzieb v karboxylových funkčných skupinách.

Ako bolo už spomínané, bola použitá termogravimetrická metóda na získanie obsahu nespáliteľného podielu – popola a vlhkosti analyzovaných vzoriek. Vlhkosť prevažne vzniká adsorbovaním vzdušnej vlhkosti prostredníctvom kyslíkatých funkčných skupín. Logicky sa teda očakáva vyšší obsah vlhkosti u FK, s čím naše výsledky korelujú, kedy nami analyzované FK majú takmer dvakrát väčší obsah vlhkosti ako HK. Obsah nespáliteľného podielu odráža čistotu analyzovanej vzorky a je v priamej súvislosti s použitými purifikačnými krokmi. Vzorka HK bola purifikovaná pomocou zmesi roztokov HCl a HF, čo sa odráža na jej nižšej hodnote obsahu popola ako u FK. Výsledné hodnoty obsahu popola sú na nízkej úrovni, čo odráža vysokú čistotu izolovaných vzoriek HL.

4.3 UV/Vis spektrometria

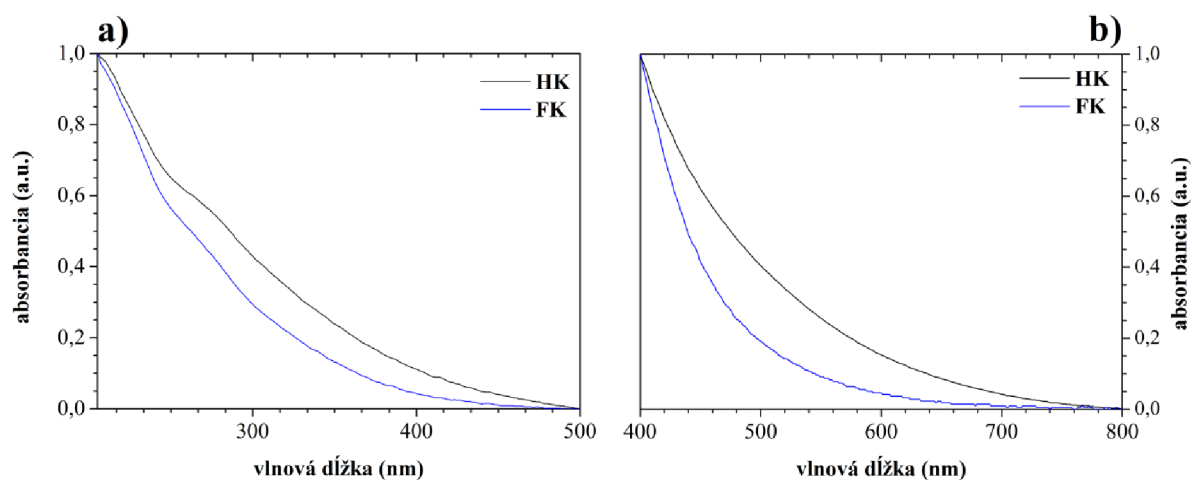
UV/Vis spektrometria je mnohými autormi považovaná za základnú metódu charakterizácie HL. Z absorpčných spektier sú za účelom charakterizácie HL určované absorpčné koeficienty, ktoré sú definované ako pomery absorbancií pri vhodne zvolených vlnových dĺžkach elektromagnetického žiarenia. Dané absorpčné koeficienty predikujú fyzikálne chemické vlastnosti HL, ako napríklad strednú molekulovú hmotnosť \overline{M}_w , aromaticitu, stupeň humifikácie alebo aj mieru substitúcie aromatických štruktúr kyslíkatými funkčnými skupinami ($-COOH$, $-OH$, $-OCH_3$). Pretože sú tieto absorpčné koeficienty výrazne citlivé na hodnotu pH prostredia, boli študované vzorky HL merané pri konštantnej hodnote pH v prostredí fosfátového pufru o hodnote pH 6,95. Vypočítané absorpčné koeficienty sú uvedené v Tabuľka 6.

Tabuľka 6: Vypočítané absorpčné koeficienty E_{ET}/E_{BZ} , E_2/E_4 , E_2/E_3 a E_4/E_6 pre vzorky HK a FK izolovaných z prírodnej matrice lignitu

	E_{ET}/E_{BZ}	E_2/E_4	E_2/E_3	E_4/E_6
HK	0,74	6,38	2,49	6,24
FK	0,64	29,44	4,65	18,00

Na Obrázok 8 (a, b) sú znázornené UV/Vis spektrá izolovaných lignitických HL. Spektrá sú charakterizované kvaziexponenciálnym priebehom s dominantnou absorbanciou v oblastiach UV-C a UV-B elektromagnetického žiarenia. Naše vypočítané absorpčné koeficienty zodpovedajú obvyklým hodnotám pre HL izolované z kaustobiolitov ako sú lignit alebo leonardit. [31]

Absorpčný koeficient E_{ET}/E_{BZ} vypovedá o miere substitúcie aromatických štruktúr kyslíkatými funkčnými skupinami ako sú karboxylové a hlavne $-OH$ fenolické. Naša vzorka lignitickej HK bola charakterizovaná vyššou hodnotou, čo vypovedá o vyššej miere spomínanej substitúcie. Naproti tomu, vzorka FK, charakterizovaná nižšou hodnotou, bude obsahovať viac alifatických substituentov na aromatických konštitučných jednotkách. A teda táto vzorka je



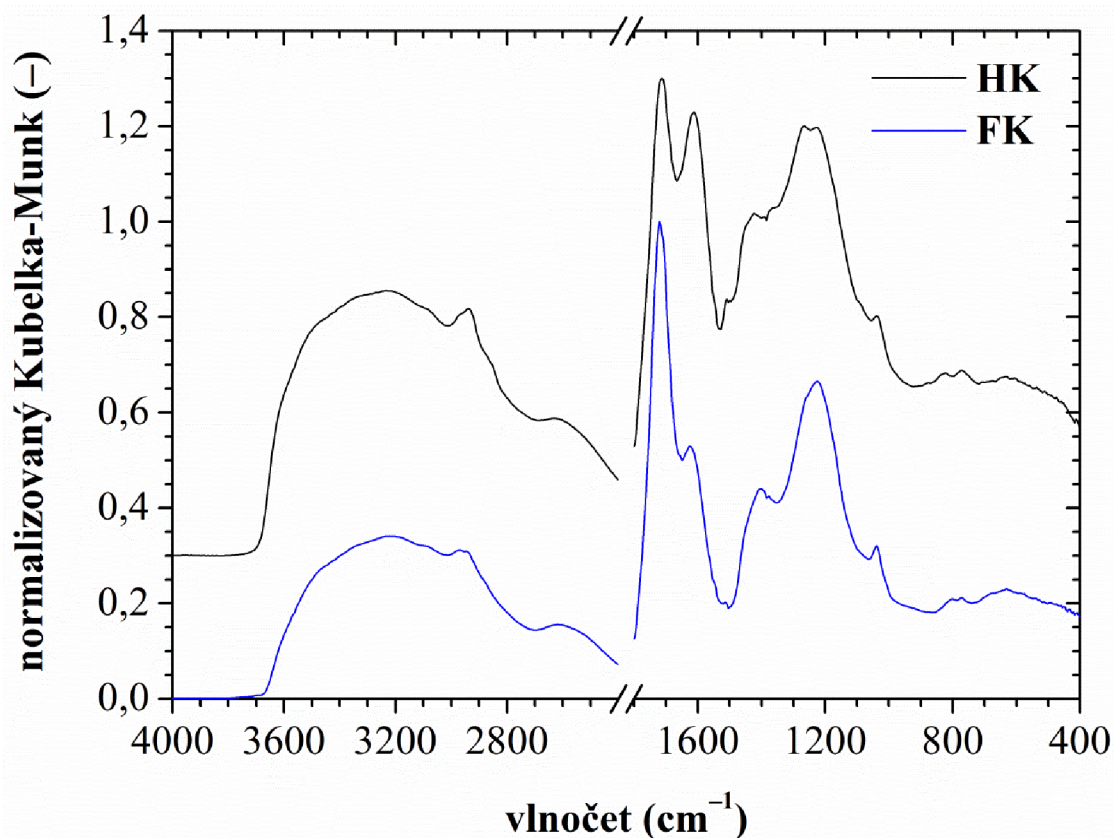
Obrázok 8: Grafické znázornenie UV/Vis spektrometrie pre vzorky HK a FK izolované z prírodnej matrice lignitu; závislosť absorbancie na vlnovej dĺžke – a) o koncentrácii 10 mg/L, b) o koncentrácii 50 mg/L

charakterizovaná vyšším obsahom aryl- esterových a éterových funkčných skupín. Tento záver je v dobrej zhode s výsledkami z FTIR spektrometrie.

Ďalšie absorpčné koeficienty z Tabuľka 6 sú ukazovateľmi aromaticity, stupňa humifikácie a strednej molekulovej hmotnosti. Z vypočítaných hodnôt E_2/E_4 , E_2/E_3 a E_4/E_6 vyplýva, že vzorka lignitickej HK je charakterizovaná vyššou aromaticitou, strednou molekulovou hmotnosťou a vyšším stupňom humifikácie v porovnaní so vzorkou FK izolovanou z rovnakej matrice. Pri koeficiente E_4/E_6 sa môže stať, že v rozmedzí vlnových dĺžok 500–700 nm je veľmi nízka absorbanca, čo možno vidieť na Obrázok 8, kde v prípade FK sa hodnoty absorbancie v spomínaných vlnových dĺžkach blížia limitne k nule. V takom prípade sa absorpčný koeficient E_4/E_6 stáva menej citlivým k štruktúrnym zmenám týchto biokoloidných látok a je vhodnejšie použiť koeficient E_2/E_4 , ktorý je definovaný ako pomer absorbancií pri 265 nm a 465 nm.

4.4 FTIR spektrometria

FTIR spektrometria poskytuje dôležité informácie o povahe, reaktivite a priestorovom usporiadaní kyslíkatých funkčných skupín humínových látok. Z tohto dôvodu sa FTIR spektrometria považuje za hlavnú metódu na štruktúrnú charakterizáciu HL. Na Obrázok 9 sú uvedené infračervené DRIFT spektrá humínových a fulvínových kyselín izolovaných z rovnakej matrice juhomoravského lignitu. Infračervené spektrá týchto biokoloidných látok boli získané pomocou difúznej reflektancie (metóda DRIFT), kedy pri meraní nie je nutné použitie matrice, ako je to v prípade štandardne používanej metódy lisovania KBr tablety, kedy môže dochádzať vo vzorkách k deprotonácii HL pri ionizácii karboxylových a fenolických –OH skupín v priebehu lisovania vzorky s KBr za vyššieho tlaku. Podľa viacerých autorov [46,47,48] dochádza pri lisovaní KBr tablety so vzorkou HL vplyvom vysokých tlakov ($p > 6 \text{ t}\cdot\text{cm}^{-2}$) k iónovej výmene medzi vodíkovými kationmi a kationom použitej soli (KBr alebo NaCl) a teda dochádza k zníženiu intenzity absorpčného pásu v oblasti vlnočetu $1720\text{--}1700 \text{ cm}^{-1}$, ktorý zodpovedá valenčnej symetrickej vibrácii C=O väzieb v karboxylových funkčných skupinách. DRIFT spektrá sú vyjadrené pomocou lineárnych jednotiek



Obrázok 9: Grafické znázornenie FTIR spektrometrie pre vzorky HK a FK izolované z prírodnej matrice lignitu; závislosť normalizovanej funkcie Kubelka-Munk na vlnočete

Kubelka–Munk, ktoré zodpovedajú jednotkám absorpcie v spektre meraného transmisnou technikou.

Široký a intenzívny pás lokalizovaný v oblasti vlnočetu $3400\text{--}3200\text{ cm}^{-1}$ zodpovedá valenčnej symetrickej vibrácii O–H a N–H väzieb v karboxylových kyselinách, sekundárnych amidoch, alifatických a aromatických alkoholoch. Menej intenzívne absorpčné pásy lokalizované pri 2940 cm^{-1} a 2947 cm^{-1} sú pripisované valenčnej asymetrickej vibrácii C–H väzieb v metylénových skupinách. Vzorka lignitickej FK bola charakterizovaná absorpčným pásom pri 2970 cm^{-1} , ktorý výhradne pripadá valenčnej asymetrickej vibrácii C–H väzieb v $-\text{CH}_3$ funkčných skupinách. Tento výsledok je v dobrej zhode s absorpčným koeficientom $E_{\text{ET}}/E_{\text{BZ}}$, ktorý mal nižšiu hodnotu v porovnaní s HK. Prítomnosť metylových skupín bola v infračervenom spektre FK potvrdená menej intenzívnym absorpčným pásom pri 1378 cm^{-1} , ktorý je výhradne pripisovaný symetrickej deformačnej vibrácii C–H väzieb v metylových skupinách. Ostrý a veľmi intenzívny absorpčný pás lokalizovaný pri $1719\text{--}1713\text{ cm}^{-1}$ zodpovedá valenčnej symetrickej vibrácii C=O väzieb v karboxylových kyselinách substituovaných na aromátoch. Tento absorpčný pás je viac intenzívny v prípade FK, a preto sa môžeme domnievať, že táto vzorka obsahuje viac $-\text{COOH}$ funkčných skupín. Prítomnosť karboxylových skupín bola taktiež potvrdená pomerne intenzívnym a širokým absorpčným pásom pri 2630 cm^{-1} , ktorý zodpovedá valenčnej symetrickej vibrácii O–H...O väzieb, tvoriace v štruktúre HL dimérne formy karboxylových skupín. Ďalej v spektrách HL môžeme nájsť absorpčné pásy pri 1422 cm^{-1} a 1401 cm^{-1} , z nich prvý zodpovedá deformačnej rovinnej vibrácii C–O–H väzieb v protonovaných $-\text{COOH}$ funkčných skupinách a druhý pás zodpovedá

valenčnej symetrickej vibrácii karboxylátového aniónu. Toto zistenie je v dobrej zhode s výsledkami nespáliteľného podielu (popola) u vzorky FK. V prípade vzoriek HL bol v ich DRIFT spektrách lokalizovaný absorpčný pás pri 1226 cm^{-1} , ktorý je spravidla prisudzovaný valenčnej symetrickej vibrácii C–O väzieb v karboxylových kyselinách. Vzorka FK bola charakterizovaná pomerne intenzívnym absorpčným pásom pri 1266 cm^{-1} , ktorý zodpovedá valenčnej symetrickej vibrácii C–O v aryl-esteroch. Ostrý a rôzne intenzívny absorpčný pás lokalizovaný pri 1620 cm^{-1} je výhradne pripisovaný valenčnej symetrickej vibrácii C=C väzieb v aromatických jednotkách HL. Táto hypotéza je taktiež potvrdená menej intenzívnym absorpčným pásom pri 1510 cm^{-1} , ktorý zodpovedá valenčnej symetrickej vibrácii C=C v aromatických štruktúrach odvodených od lignínu. V prípade oboch vzoriek HL bol v ich DRIFT spektrách identifikovaný absorpčný pás pri 1038 cm^{-1} , ktorý je spojený s valenčnou symetrickou vibráciou C–O väzieb v sekundárnych alkoholoch.

4.5 Stanovenie kyslosti

HL sú charakterizované prítomnosťou funkčných skupín, ktoré obsahujú kyslé protóny, ako napríklad karboxylové kyseliny, fenoly a amíny. Preto boli HK podrobené titračnému stanoveniu kyslosti. Dôvodom prečo nebola stanovovaná aj kyslosť FK je ich nízky obsah v prírodnej matrici lignitu. Obecne je možné použiť na stanovenie celkovej kyslosti dve možnosti: priamu a spätnú titráciu. V našej práci bola použitá spätná titrácia, pomocou ktorej bola určená celková kyslosť a následne využitím karboxylátovej titrácie bola získaná karboxylátová kyslosť. Fenolická kyslosť bola dopočítaná. Výsledné hodnoty sú vyobrazené v Tabuľka 7.

Tabuľka 7: Celková, karboxylátová a fenolická kyslosť vzorky humínovej kyseliny izolovanej z prírodnej matrice lignitu

HK	kyslosť ($\text{mmol}\cdot\text{g}^{-1}$)		
	celková	karboxylátová	fenolická
	6,20	4,26	1,94

Z nameraných hodnôt možno vyčítať, že väčší podiel celkovej kyslosti je spôsobený karboxylovými funkčnými skupinami, kedy karboxylátová kyslosť má hodnotu $4,26\text{ mmol}\cdot\text{g}^{-1}$ z celkovej kyslosti $6,20\text{ mmol}\cdot\text{g}^{-1}$. Nami získané výsledky sú v dobrej zhode s inými autormi [49].

5 ZÁVER

Predložená bakalárska práca sa zaoberá izoláciou a frakcionáciou humínových látok z lignitu a ich následnou charakterizáciou. Humínové látky sú rozmanité biokoloidy, ktoré aj napriek dlhému záujmu odbornej obce ešte stále nie sú dokonale popísané. To vyplýva hlavne z faktu, že HL sa líšia podľa ich zdroja, z ktorého sú izolované. Preto sa v našej práci zaoberáme humínovými látkami izolovanými z konkrétneho zdroja – lignitu z južnej Moravy z dolu Mír Mikulčice.

V teoretickej časti sa študuje problematika lignitu, jeho vznik a štruktúra a následne problematika humínových látok, ich rozdelenie, vznik, štruktúra a využitie. V poslednej časti je rozobraná problematika izolácie HL z pevných matric, kde sú vyobrazené rozličné používané extrakčné činidlá a dve rôzne metódy izolácie HL.

V experimentálnej časti nás predovšetkým zaujímali humínové a fulvínové kyseliny. Tieto dve skupiny látok boli postupne izolované zo spomínanej prírodnej matrice lignitu. Izolácia bola prevedená dvakrát, z dvoch navážok 10 g lignitu. Pomocou štandardného postupu izolácie a frakcionácie sme stanovili obsah humínových látok v prírodnej matrici lignitu, a to na hodnotu $28,62 \pm 1,40$ hm. %, z čoho humínové kyseliny predstavujú $27,49 \pm 1,27$ hm. % a fulvínové kyseliny $1,13 \pm 0,13$ hm. %. Následne bolo nutné previesť fyzikálne chemickú charakterizáciu izolovaných HL. Pomocou charakterizácie sa dozvedáme o dôležitých vlastnostiach daných HL a získavame bližšie informácie ohľadom ich štruktúry a reaktivity. Tieto znalosti sú veľmi dôležité pre budúce aplikácie a môžu priniesť cenné informácie v ďalších výskumoch lignitických humínových látok.

Elementárna analýza spolu s termogravimetrickou analýzou nám priniesli dôležité informácie o obsahu biogénnych prvkov, vlhkosti a obsahu popola, z čoho boli vypočítané atómové pomery H/C a O/C, z hodnôt ktorých možno vyčítať vlastnosti skúmaných látok ako napríklad aromaticita, dehydrogenácia a obsah kyslíkatých funkčných skupín. Pri oboch atómových pomeroch je vzorka FK charakterizovaná vyššími hodnotami, čo znamená, že FK sú charakterizované nižšou mierou aromaticity, hydrogenácie a vyšším obsahom kyslíkatých funkčných skupín ako HK.

Analýzou pomocou UV/Vis spektrometrie sa zisťujú absorpčné koeficienty E_{ET}/E_{BZ} , E_2/E_4 , E_2/E_3 a E_4/E_6 , ktoré predpovedajú vlastnosti skúmaných HL. Konkrétne sa jedná o aromaticitu, strednú molekulovú hmotnosť a stupeň humifikácie. Hodnota absorpčného koeficientu E_{ET}/E_{BZ} pre HK je vyššia ako pre FK, z čoho vyplýva, že vzorka HK bude charakterizovaná vyššou mierou substitúcie aromatických štruktúr kyslíkatými funkčnými skupinami. Všetky ostatné absorpčné koeficienty HK majú nižšie hodnoty ako absorpčné koeficienty FK, preto možno predikovať, že vzorka HK bude charakterizovaná vyššou aromaticitou, strednou molekulovou hmotnosťou a vyšším stupňom humifikácie.

Aj napriek zložitej štruktúre humínových látok môžeme pozorovať v ich infračervenom spektre radu absorpčných pásov, ktoré sú charakteristické pre špecifické molekulárne štruktúry. FTIR spektrometria poskytuje dôležité informácie o štruktúre, reaktivite a priestorovom usporiadaní funkčných skupín. Analýza pomocou FTIR spektrometrie nám poskytuje pomerne rozsiahle informácie o štruktúre a o funkčných skupinách. Výsledky FTIR analýzy sú v dobrej zhode s ostatnými analýzami.

Poslednou fyzikálne chemickou analýzou bolo stanovenie kyslosti, kedy bola stanovovaná celková, karboxylátová a fenolická kyslosť. Celková kyslosť bola stanovená na hodnotu $6,20 \text{ mmol}\cdot\text{g}^{-1}$, z ktorej majoritný podiel je spôsobený karboxylovými funkčnými skupinami, nakoľko karboxylátová kyslosť má hodnotu $4,26 \text{ mmol}\cdot\text{g}^{-1}$ z celkovej. Z toho možno logicky vyčítať väčší obsah karboxylových funkčných skupín ako fenolických v štruktúre izolovanej vzorky HK.

Obecne možno použiť ďaleko viac fyzikálne chemických metód na charakterizáciu ako napríklad ^{13}C NMR spektrometria, GC – MS, XRD a XRF spektroskopia a ďalšie. Preto je ešte možnosť ďalšieho hlbšieho výskumu v tejto oblasti, či už širšia charakterizácia izolovaných HL alebo výskum v oblasti aplikácie lignitických humínových látok.

6 ZOZNAM POUŽITEJ LITERATÚRY A ZDROJOV

- [1] KING, Hobart. Coal. *Geology.com* [online]. U.S. Pennsylvania: GeoShops, ©2005-2019 [cit. 2019-11-14]. Dostupné z: <https://geology.com/rocks/coal.shtml>
- [2] STRACHER, Glenn B., Anupma PRAKASH a Ellina V. SOKOL. *Coal and Peat Fires: A Global Perspective*. Boston: Elsevier, 2013. ISBN 978-044-4528-582. Dostupné také z: <https://app.knovel.com/hotlink/toc/id:kpCPFAGPV5/coal-peat-fires-global/coal-peat-fires-global>
- [3] *Energy Technology Perspectives 2014* [online]. Paris: IEA, 2014 [cit. 2019-11-15]. Dostupné z: <https://www.iea.org/reports/energy-technology-perspectives-2014>
- [4] Lignite coal - health effects and recommendations from the health sector. In: *HEAL* [online]. Brussels: HEAL-Health and Environmental Alliance, 2018, December 2018 [cit. 2019-12-14]. Dostupné z: https://www.env-health.org/wp-content/uploads/2018/12/HEAL-Lignite-Briefing-en_web.pdf
- [5] CLIFFORD, Jones. *Lignites: Their Occurrence, Production and Utilisation*. Scotland: Whittles Publishing, 2016. ISBN 9781849951807.
- [6] DI GIANFRANCESCO, Augusto. *Materials for ultra-supercritical and advanced ultra-supercritical power plants: Part Three. Materials' development programs worldwide*. Amsterdam: Elsevier ; Woodhead Publishing, [2017]. ISBN 978-008-1005-521.
- [7] SPEIGHT, James G. *Handbook of Industrial Hydrocarbon Processes: Chapter 5 - Hydrocarbons from Coal*. U.S. Utah: Gulf Professional Publishing, 2011. ISBN 9780750686327.
- [8] *World coal association* [online]. London, ©2019 [cit. 2019-11-15]. Dostupné z: <https://www.worldcoal.org/>
- [9] The macromolecular structures of coals. SCHOBERT, Harold H. *Chemistry of fossil fuels and biofuels* [online]. New York: Cambridge University Press, 2013, s. 306-312 [cit. 2019-12-10]. ISBN 05-211-1400-4. Dostupné z: <https://app.knovel.com/hotlink/pdf/id:kt00C840N1/chemistry-fossil-fuels/macromolecular-structures>
- [10] ROUBÍČEK, Václav a Jaroslav BUCHTELE. *Chemie uhlí a jeho využití*. I. vydání. Ostrava: VŠB-Technická univerzita, 1996. ISBN 80-707-8406-7.
- [11] *Fundamentals of enhanced oil and gas recovery from conventional and unconventional reservoirs*. Cambridge, CA: Elsevier, 2018. ISBN 978-0-12-813027-8.
- [12] Macerals. SEIDLE, John. *Fundamentals of coalbed methane reservoir engineering* [online]. Tulsa, Okla.: PennWell, c2011, s. 29-31 [cit. 2019-12-10]. ISBN 1593700016. Dostupné z: <https://app.knovel.com/hotlink/pdf/id:kt00A9NEV1/fundamentals-coalbed/macerals>
- [13] Organic Petrography: Macerals and Microlithotypes. SUAREZ-RUIZ, Isabel a John CRELLING. *Applied coal petrology: The role of petrology in coal utilization* [online]. Boston: Elsevier / Academic Press, c2008, s. 20-31 [cit. 2019-12-

- 09]. ISBN 9780080450513. Dostupné z:
<https://app.knovel.com/hotlink/pdf/id:kt008GHQSI/applied-coal-petrology/macerals>
- [14] BHOI, Sanjukta, Tamal BANERJEE a Kaustubha MOHANTY. Insights on the combustion and pyrolysis behavior of three different ranks of coals using reactive molecular dynamics simulation. *RSC Advances* [online]. 2016, **6**(4), 2559-2570 [cit. 2020-01-18]. DOI: 10.1039/C5RA23181G. ISSN 2046-2069. Dostupné z:
<http://xlink.rsc.org/?DOI=C5RA23181G>
- [15] SÝKOROVÁ, I., W. PICKEL, K. CHRISTANIS, M. WOLF, G.H. TAYLOR a D. FLORES. Classification of huminite—ICCP System 1994. *International Journal of Coal Geology* [online]. 2005, **62**(1-2), 85-106 [cit. 2019-12-12]. DOI: 10.1016/j.coal.2004.06.006. ISSN 01665162. Dostupné z:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0166516204001399>
- [16] TAN, Kim H. *Humic matter in soil and the environment: principles and controversies*. 2nd ed. Boca Raton: CRC Press, c2014. Books in soils, plants, and the environment. ISBN 978-148-2234-459.
- [17] TAN, Kim H. *Humic matter in soil and the environment: principles and controversies*. New York: Marcel Dekker, c2003. ISBN 08-247-4272-9.
- [18] FLAIG, Wolfgang. An introductory review on humic substances: aspects of research on their genesis, their physical and chemical properties, and their effect on organisms. In: *Humic Substances. Their Structure and Function in Biosphere*, D. Povoledo and H. L. Golterman. Meeting, Nieuwersluis, The Netherlands, May 29-31, 1972. Publishing and Documentation, 1975, Wageningen, The Netherlands.
- [19] SCHULTEN, H.-., SCHNITZER, M. A state of the art structural concept for humic substances. *Naturwissenschaften* **80**, 29–30 (1993).
<https://doi.org/10.1007/BF01139754>
- [20] PENA-MENDEZ EM, HAVEL J, PATOCKA J. *Humic substances – compounds of still unknown structure: applications in agriculture, industry, environment, and biomedicine*. *J Appl Biomed* 2005; 3: 13–24.
- [21] AIKEN, George R. *Humic substances in soil, sediment, and water: geochemistry, isolation, and characterization* [online]. Vol. 21. New York: Wiley, c1985 [cit. 2020-01-16]. ISBN 04-718-8274-7. Dostupné z:
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/gj.3350210213>
- [22] SCHULTEN, H. -R. a M. SCHNITZER. A state of the art structural concept for humic substances. *Naturwissenschaften* [online]. 1993, **80**(1), 29-30 [cit. 2020-02-28]. DOI: 10.1007/BF01139754. ISSN 0028-1042. Dostupné z:
<http://link.springer.com/10.1007/BF01139754>
- [23] DE MELO, Bruna Alice Gomes, Fernanda Lopes MOTTA a Maria Helena Andrade SANTANA. Humic acids: Structural properties and multiple functionalities for novel technological developments. *Materials Science and Engineering: C* [online]. 2016, **62**, 967-974 [cit. 2020-01-27]. DOI: 10.1016/j.msec.2015.12.001. ISSN 09284931. Dostupné z:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0928493115306123>

- [24] JONES, Malcolm N. a Nicholas D. BRYAN. Colloidal properties of humic substances. *Advances in Colloid and Interface Science* [online]. 1998, **78**(1), 1-48 [cit. 2020-01-27]. DOI: 10.1016/S0001-8686(98)00058-X. ISSN 00018686. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S000186869800058X>
- [25] O huminových látkách. *IHSS Česká republika* [online]. Brno, [2008] [cit. 2020-01-17]. Dostupné z: <http://ihss-cz.cz/o-huminovych-latkach.html>
- [26] OUNI, Y., T. GHNAYA, F. MONTEMURRO, Ch. ABDELLY a A. LAKHDAR. The role of humic substances in mitigating the harmful effects of soil salinity and improve plant productivity. *International Journal of Plant Production* [online]. 2014, **8**(3), 353-374 [cit. 2020-01-27]. DOI: 10.22069/ijpp.2014.1614. Dostupné z: http://ijpp.gau.ac.ir/article_1614_d21a65de0aebdbd39542c9ec32e92eda.pdf
- [27] *Soil Humic Substances* [online]. Poľsko: Weber, 1997 [cit. 2020-01-15]. Dostupné z: <http://karnet.up.wroc.pl/~weber/humic.htm>
- [28] SAIZ-JIMENEZ, Cesaero. *Origin and chemical nature of soil organic matter*. Delft, 1988. PhD. Thesis, Technische Universiteit Delft.
- [29] RUPIASIH N. N., VIDYASAGAR P., “A Review: Compositions, Structures, Properties and Applications of Humic Substances,” *Journal of Advances in Science and Technology*, vol 8 (I&II), pp. 16-25, 2005.
- [30] SKYBOVÁ, M., *Humínové kyseliny – prínos pre environmentálny výzkum*, *Acta Montanistica Slovaca*, 2006, vol. 11, s. 362-366. ISSN 1335-1788.
- [31] STEVENSON, F. J. *Humus chemistry: genesis, composition, reactions*. 2nd ed. New York: Wiley, 1994. ISBN 978-0471594741.
- [32] PICCOLO, Alessandro. The supramolecular structure of humic substances: A novel understanding of humus chemistry and implications in soil science. *Soil Science* [online]. Elsevier, 2002, **2001**(11), 57-134 [cit. 2020-02-17]. *Advances in Agronomy*. DOI: 10.1016/S0065-2113(02)75003-7. ISBN 9780120007936. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0065211302750037>
- [33] SUTTON, Rebecca a Garrison SPOSITO. Molecular Structure in Soil Humic Substances: The New View. *ENVIRONMENTAL SCIENCE & TECHNOLOGY* [online]. 2005, **39**(23), 9009-9015 [cit. 2020-02-17]. DOI: 10.1021/es050778q. ISSN 0013-936X. Dostupné z: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/es050778q>
- [34] SIMPSON, André J., William L. KINGERY, Michael H. HAYES, et al. Molecular structures and associations of humic substances in the terrestrial environment. *Naturwissenschaften* [online]. 2002, **89**(2), 84-88 [cit. 2020-03-22]. DOI: 10.1007/s00114-001-0293-8. ISSN 0028-1042. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00114-001-0293-8>
- [35] Huminové látky. *Envi Produkt* [online]. Praha, c2019 [cit. 2020-01-17]. Dostupné z: <http://www.enviprodukt.cz/huminove-latky>

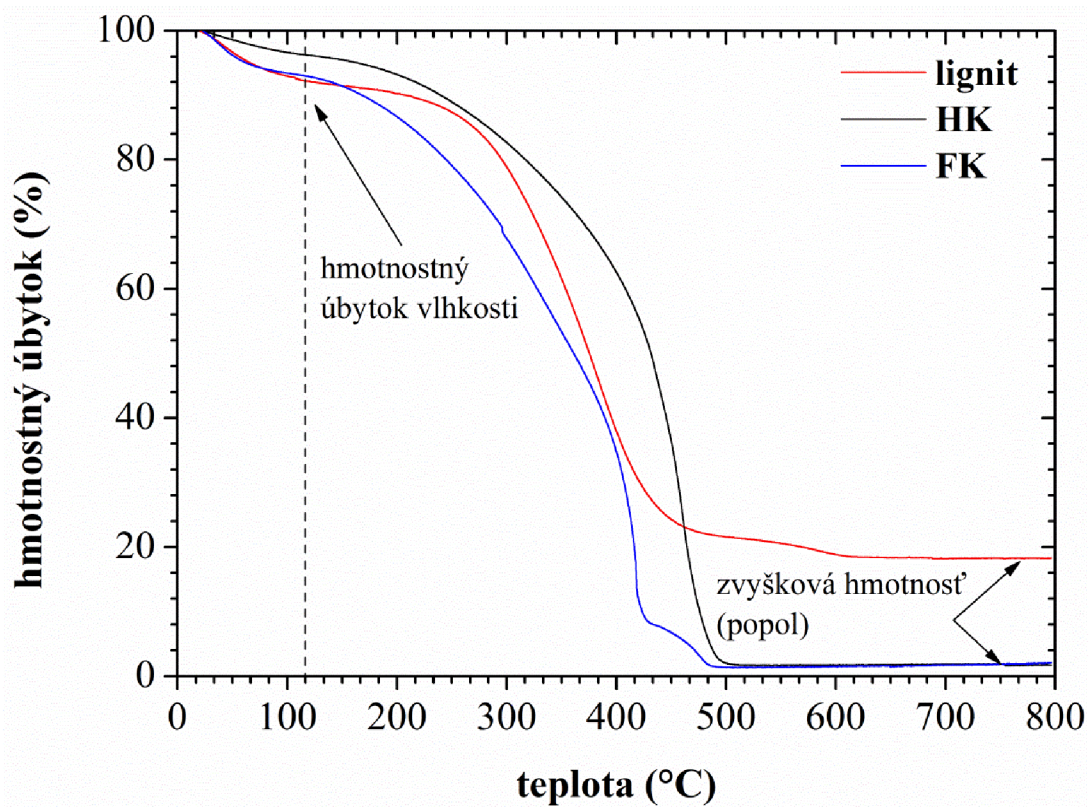
- [36] What are humic acids? *Humintech* [online]. Grevenbroich, c2020 [cit. 2020-01-17]. Dostupné z: <https://www.humintech.com/agriculture/information/what-are-humic-acids>
- [37] BRZOZOWSKI T., DEMBINSKI A., KONTUREK S.: *Influence of Tolpa Peat Preparation on gastroprotection and on gastric and duodenal ulcers*. *Acta Pol. Pharm.* 51:103-107, 1994.
- [38] KLÖCKING, R., SPRÖSSIG, M., WUTZLER, P., THIEL K. D. a B. HELBIG. Antiviral wirksame Huminsäuren und huminsäureähnliche Polymere. *Physikalische Medizin, Rehabilitationsmedizin, Kurortmedizin*. 1983, r. 35, č. 2, s. 95-101. DOI: 10.1055/s-2008-1065760.
- [39] Isolation of IHSS Soil Fulvic and Humic Acids. In: *IHSS* [online]. Minnesota: International Humic Substances Society, c2019 [cit. 2020-02-27]. Dostupné z: <http://humic-substances.org/isolation-of-ihss-soil-fulvic-and-humic-acids/>
- [40] KUWATSUKA, Shozo, Akira WATANABE, Kazuhito ITOH a Shigemitsu ARAI. Comparison of two methods of preparation of humic and fulvic acids, IHSS method and NAGOYA method. *Soil Science and Plant Nutrition* [online]. 1992, **38**(1), 23-30 [cit. 2020-02-27]. DOI: 10.1080/00380768.1992.10416948. ISSN 0038-0768. Dostupné z: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/00380768.1992.10416948>
- [41] LAMAR, Richard T, Daniel C. OLK, Lawrence MAYHEW, Paul R. BLOOM. A New Standardized Method for Quantification of Humic and Fulvic Acids in Humic Ores and Commercial Products. *Journal of AOAC INTERNATIONAL* [online], Volume 97, Issue 3, 1 May 2014, Pages 721–730, [cit. 2020-04-03]. <https://doi.org/10.5740/jaoacint.13-393>
- [42] DOSKOČIL, L., BURDÍKOVÁ, J., ENEV, V., KALINA, L., WASSERBAUER, J. Spectral characterization and comparison of humic acids isolated from some European lignites. *FUEL* [online]. 2018, roč. 213, č. 3, s. 123-132. [cit. 2020-04-03]. ISSN: 0016-2361.
- [43] WALI, A., BEN SALAH, I., ZERROUKI, M. *et al.* A novel humic acid extraction procedure from Tunisian lignite. *Euro-Mediterr J Environ Integr* **4**, [online]. 24 (2019). [cit. 2020-04-03]. <https://doi.org/10.1007/s41207-019-0115-z>
- [44] DE SOUZA, Fabiana a Saulo Roca BRAGANÇA. Extraction and characterization of humic acid from coal for the application as dispersant of ceramic powders. *Journal of Materials Research and Technology* [online]. 2018, **7**(3), 254-260 [cit. 2020-04-03]. DOI: 10.1016/j.jmrt.2017.08.008. ISSN 22387854. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2238785417304982>
- [45] RASHID, M. A. *Geochemistry of Marine Humic Compounds*. New York: Springer Science & Business Media, 2012. ISBN 978-1-4615-7100-1.
- [46] DICK, D. P.; SANTOS, J. H. Z. and FERRANTI, E. M.. Chemical characterization and infrared spectroscopy of soil organic matter from two southern brazilian soils. *Rev. Bras. Ciênc. Solo* [online]. 2003, vol. 27, n. 1, pp. 29-39. ISSN 1806-9657. [cit. 2020-04-04] <https://doi.org/10.1590/S0100-06832003000100004>.

- [47] 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. 2020-04-06]. DOI: 10.5513/JCEA01/16.1.1535. ISSN 1332-9049. Dostupné z: <http://jcea.agr.hr/volumes.php?search=Article:1535>
- [48] NOVÁK, F., MACHOVIČ, V., HRABALOVÁ, H., NOVOTNÁ, M. Kvantitativní FTIR spektrometrie huminových látek. *Chemické listy* [online]. 2017, r. 111, č. 6. ISSN 1213-7103. [cit. 2020-04-06]. Dostupné z: <http://www.chemicke-listy.cz/ojs3/index.php/chemicke-listy/article/view/70/70>
- [49] ALDMOUR, Suha T., Ian T. BURKE, Andrew W. BRAY, et al. Abiotic reduction of Cr(VI) by humic acids derived from peat and lignite: kinetics and removal mechanism. *Environmental Science and Pollution Research* [online]. 2019, **26**(5), 4717-4729 [cit. 2020-03-27]. DOI: 10.1007/s11356-018-3902-1. ISSN 0944-1344. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s11356-018-3902-1>

7 ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK A SYMBOLOV

HL	humínové látky
IHSS	International Humic Substances Society
EA	elementárna analýza
TGA	termogravimetrická analýza
FTIR	Fourier-transform infrared
DRIFT	Diffuse Reflectance Infrared Fourier Transform Spectroscopy
HK	humínové kyseliny
FK	fulvínové kyseliny
HU	humín
DOM	dissolved organic matter – rozpustená organická hmota
E_{ET}/E_{BT}	pomer absorbancií pri vlnových dĺžkach 253 nm a 220 nm
E_2/E_4	pomer absorbancií pri vlnových dĺžkach 265 nm a 465 nm
E_2/E_3	pomer absorbancií pri vlnových dĺžkach 265 nm a 365 nm
E_4/E_6	pomer absorbancií pri vlnových dĺžkach 465 nm a 665 nm
at. %	zloženie v atómových percentách
hm. %	zloženie v hmotnostných percentách

PRÍLOHY



Obrázok 10: Grafické znázornenie termogravimetrickej analýzy pre vzorku prírodnej matrice lignitu a izolovaných humínových látok z danej prírodnej matrice lignitu



Obrázok 11: Aparatúra na ultrafiltráciu; rotačná odparka



Obrázok 12: Kolona naplnená živcou DAX-8, použitá v kapitole 3.4.1 *Adsorpcia fulvínových kyselín na živcu*; kolona naplnená katexom Amberlite IR 120 použitá v kapitole 3.4.2 *Protonácia fulvínových kyselín na živci*