



**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 CHROMATOGRAFIE NA TENKÉ VRSTVĚ  
(TLC) K FRAKCIONACI HUMINOVÝCH LÁTEK**

APPLICATION OF THIN LAYER CHROMATOGRAPHY (TLC) FOR FRACTIONATION OF HUMIC  
SUBSTANCES.

**BAKALÁŘSKÁ PRÁCE**

BACHELOR'S THESIS

**AUTOR PRÁCE**

AUTHOR

Nela Krčmová

**VEDOUCÍ PRÁCE**

SUPERVISOR

Ing. Vojtěch Enev, Ph.D.

BRNO 2020

## Zadání bakalářské práce

Číslo práce: FCH-BAK1494/2019 Akademický rok: 2019/20  
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie  
Studentka: **Nela Krčmová**  
Studijní program: Chemie a chemické technologie  
Studijní obor: Spotřební chemie  
Vedoucí práce: **Ing. Vojtěch Enev, Ph.D.**

### Název bakalářské práce:

Využití chromatografie na tenké vrstvě (TLC) k frakcionaci huminových látek

### Zadání bakalářské práce:

Provést literární rešerši na zadané téma.

Pomocí chromatografie na tenké vrstvě frakcionovat vzorky HL (standard HK a FK Pahokee Peat IHSS).

Fyzikálně–chemická charakterizace jednotlivých frakcí HL za použití spektrometrických metod UV/Vis a fluorescenční spektrometrie.

Dále provést kompletní charakterizaci původních vzorků HL Pahokee Peat.

### 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.

---

Nela Krčmová  
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**

Hlavním cílem této bakalářské práce bylo navrhnout a optimalizovat metodu frakcionace organické hmoty huminových látek (HL) pomocí tenkovrstevné chromatografie TLC. Standardy HL Pahokee Peat byly charakterizovány termochemickými a spektrometrickými technikami jako je termogravimetrie, elementární analýza, UV/Vis a infračervená spektrometrie s Fourierovou transformací. K fyzikálně-chemické charakterizaci organických frakcí bylo využito molekulové absorpční spektrometrie v ultrafialové a viditelné oblasti elektromagnetického záření a steady-state fluorescenční spektrometrie. Pomocí fluorescenční spektrometrie bylo zjištěno, že HL jsou složeny z fluoroforů huminového a ne-huminového (proteinového) charakteru. Organické frakce odpovídající huminovým fluoroforům byly charakterizovány vyšší aromaticitou, střední molekulovou hmotností a v neposlední řadě i vyšším obsahem kyslíkatých substituentů na aromatickém jádře. Naproti tomu organické frakce odpovídající proteinovým konstitučním jednotkám se vyznačovaly velmi nízkými hodnotami indexu humifikace, které vypovídají o mikrobiálním původu těchto organických látek během geneze HL Pahokee Peat.

## **ABSTRACT**

The main aim of this Bachelor thesis was to suggest and optimize a method of fractionation of organic matter of humic substances using thin-layer chromatography (TLC). HS Pahokee Peat standards have been characterized by thermochemical and spectrometric techniques such as thermogravimetry, elemental analysis, UV-Vis and Fourier-transform infrared spectrometry. Molecular absorption spectrometry in the ultraviolet and visible range of electromagnetic radiation and steady-state fluorescence spectrometry were used for physicochemical characterization of organic fractions. Using fluorescence spectrometry, humic substances were found to be composed of fluorophores of humic and non-humic (protein) character. Organic fractions corresponding to the humic fluorophores were characterized by a higher aromaticity, average molecular weight and higher content of oxygen substituents on the aromatic nucleus. In contrast, the organic fractions corresponding to the protein constitutional units were distinguished by low values of the humification index. These tell us about microbial origin of these organic substances during the genesis of HS Pahokee Peat.

## **KLÍČOVÁ SLOVA**

Huminové kyseliny, fulvinové kyseliny, frakcionace, tenkovrstvá chromatografie (TLC), fluorofory

## **KEY WORDS**

Humic acids, fulvic acids, fractionation, thin-layer chromatography (TLC), fluorophores

KRČMOVÁ, Nela. *Využití chromatografie na tenké vrstvě (TLC) k frakcionaci huminových látek*. Brno, 2020. Bakalářská práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav fyzikální a spotřební chemie. Vedoucí práce Vojtěch Enev.

### **ČESTNÉ PROHLÁŠENÍ**

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

.....

### **PODĚKOVÁNÍ**

*Na tomto místě bych chtěla poděkovat vedoucímu své bakalářské práce Ing. Vojtěchu Enevovi, Ph. D., za všechny cenné rady, čas, který mi věnoval, a vstřícný přístup. Dále bych chtěla poděkovat své rodině, která mi poskytla podmínky k psaní této práce a bez které by její realizace nebyla možná.*

# OBSAH

ÚVOD .....	7
<b>1 TEORETICKÉ ZÁKLADY .....</b>	<b>8</b>
1.1 Rašelina a humolity .....	8
1.1.1 Vrchovištní rašelina – vrchoviště .....	8
1.1.2 Slatiništní rašeliniště – slatiniště .....	8
1.1.3 Přechodová rašeliniště .....	9
1.2 Ulmifikace – rašelinění .....	9
1.2.1 Vznik rašelinišť .....	9
1.3 Složení rašeliny .....	10
1.3.1 Mikroedafon .....	11
1.4 Huminové látky .....	11
1.4.1 Rozdělení huminových látek .....	12
1.4.2 Vznik huminových látek .....	15
1.4.3 Molekulární struktura huminových látek .....	17
1.4.4 Využití huminových látek .....	18
1.5 Metody frakcionace huminových látek .....	20
1.5.1 Fyzikální frakcionace .....	20
1.5.2 Chemická frakcionace .....	21
1.5.3 Chromatografie .....	21
1.5.4 Termogravimetrická analýza .....	22
1.5.5 UV/Vis spektrometrie .....	22
<b>2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY .....</b>	<b>24</b>
<b>3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....</b>	<b>27</b>
3.1 Použité chemikálie .....	27
3.2 Použité přístroje .....	27
3.3 Základní fyzikálně-chemická charakterizace .....	27
3.3.1 Elementární analýza .....	27
3.3.2 Termogravimetrická analýza .....	27
3.3.3 UV/Vis spektrometrie .....	28
3.3.4 FTIR spektrometrie .....	28
3.4 Postup přípravy vzorků organických frakcí HL pro TLC chromatografii .....	28
3.5 UV/Vis spektrometrie organických frakcí HL .....	28
3.6 Fluorescenční spektrometrie organických frakcí HL .....	29

<b>4</b>	<b>VÝSLEDKY A DISKUZE .....</b>	<b>30</b>
4.1	Elementární analýza standardů HL Pahokee Peat .....	30
4.2	UV/Vis spektrometrie standardů HL Pahokee Peat .....	31
4.3	FTIR spektrometrie standardů HL Pahokee Peat .....	32
4.4	Kvalitativní vyhodnocení TLC chromatografie .....	34
4.5	UV/Vis spektrometrie organických frakcí HL .....	35
4.6	Fluorescenční spektrometrie organických frakcí HL .....	37
<b>5</b>	<b>ZÁVĚR .....</b>	<b>40</b>
<b>6</b>	<b>LITERATURA .....</b>	<b>42</b>
<b>7</b>	<b>SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ .....</b>	<b>45</b>
7.1	Seznam použitých zkratek .....	45
7.2	Seznam použitých symbolů .....	46
<b>8</b>	<b>PŘÍLOHY .....</b>	<b>47</b>

## ÚVOD

Huminové látky (HL) jsou sloučeniny přírodního původu, které jsou syntetizovány složitými chemickými a biochemickými reakcemi v procesu, který obecně nazýváme humifikace. Do tohoto procesu vstupují rozličné látky, které jsou stavebními kameny rostlinných a živočišných těl. V tomto případě máme výhradně na mysli celulózu, lignin, polysacharidy, bílkoviny a jiné látky, které tvoří výše zmíněné organismy. Mnohé vědecké práce začínají informací, že tyto (bio)koloidní látky jsou nejrozšířenějšími organickými látkami na Zemi a rovněž hrají nezastupitelnou roli v koloběhu a stabilizaci uhlíku na zemském povrchu.

Do nedávné doby bylo pohlíženo na tyto (bio)koloidní sloučeniny jako na biopolymery, avšak dnes tyto látky vnímáme jako supramolekuly. Tedy jinými slovy jako přírodní organické látky, které jsou tvořeny širokou řadou molekul s relativně nízkou molekulovou hmotností, jež jsou v supramolekulární struktuře vázány pomocí slabých vazebných interakcí jako jsou van der Waalovy síly,  $\pi$ - $\pi$ ,  $\pi$ -CH<sub>3</sub> interakce a také vodíkové můstky. Huminové látky se v přírodních ekosystémech mohou vyskytovat v různých formách, ať už jsou vázány na jílovité částice v půdě, se kterými tvoří tzv. organominerální komplex, anebo jsou volně dostupné v sladkovodních a mořských zdrojích. Nejbohatšími zdroji těchto látek jsou kaustobiolity, kam zpravidla řadíme rašeliny a uhlí (leonardit, lignit a oxyhumolit).

Mimo jiné stojí za zmínku, že fyzikálně-chemické vlastnosti těchto (bio)koloidních látek jsou silně závislé na místě vzniku tzn. druhu přírodní matrice, podmínkách humifikace a době odběru vzorku. Z tohoto důvodu není struktura HL, resp. organické hmoty doposud dobře známa, a tudíž je předmětem stálého vědeckého zájmu a bádání.

Rašelina vzniká v procesu, který nazýváme ulmifikace, což je půdotvorný proces, ve kterém vzniká tato organická hmota bohatá na HL. Tento proces je oproti humifikaci znatelně pomalejší v důsledku klimatických podmínek, které panují na vrchovištních rašeliništích. Naproti tomu slatinná rašelina vzniká v nižších polohách okolo stojatých vod a prameništích, a proto je tato přírodní matrice označována jako slatina. V současné době je rašelina čím dál tím více využívána jako dostupná a levná přírodní matrice k izolaci HL, resp. HK, které se zde mohou vyskytovat až z 60 hm. %.

V souvislosti s rozličným aplikačním potenciálem těchto (bio)koloidních látek je znalost jejich struktury a fyzikálně-chemických vlastností velmi důležitá. V tomto případě se nabízí využít chromatografii na tenké vrstvě (TLC), která by mohla být nápomocna k objasnění a získání informací o struktuře těchto organických látek, resp. k predikci jednotlivých stavebních kamenů těchto (bio)koloidních látek.

# 1 TEORETICKÉ ZÁKLADY

## 1.1 Rašelina a humolity

Rašelina je přírodní organická hmota (NOM – Natural Organic Matter), která vzniká procesem ulmifikace (rašelinění). Tento proces je zpravidla pomalejší, než je tomu v případě humifikace, a to především vlivem klimatických podmínek, které panují na místě vzniku rašeliny. Jedná se především o nižší teplotu a vyšší vlhkost půdotvorného substrátu. Rašelina zpravidla obsahuje více jak 50 hm. % spalitelných organických látek, z nichž nezastupitelná část je tvořena huminovými látkami, kam zpravidla řadíme huminové kyseliny (HK), fulvinové kyseliny (FK) a strukturně stabilní huminy (HU) [1, 2].

Obecně můžeme říci, že rašelina je zařazována do skupiny půd s vysokým obsahem humusu, resp. organické hmoty, které jsou souhrnně nazývány jako humolity. Toto označení pro vysoko-humózní půdy bylo schváleno v roce 1937 mezinárodní pedologickou společností v Curychu, a to z důvodu neujednocené nomenklatury těchto přírodních matric. Hlavním problémem v této oblasti byla nesourodost dosavadních poznatků a rozličné zaměření odborné společnosti, která se na tento fenomén dívala z pohledu své vědy, a to botanika, pedologa, geologa, palynologa aj. Proto jsou dnes tyto přírodní matrice označovány výše zmíněným termínem [1, 2].

Klasifikace humolitů (půdy s vysokým obsahem humusu) v sobě odráží několik faktorů, z nichž nejvýznamnější jsou: geografická poloha, resp. nadmořská výška, poloha v terénu (sedla, úbočí hor, náhorní planiny atd.), úživnost prostředí (tj. schopnost uživit určitý počet jedinců), výchozí rostlinný materiál, půdní reakci (pH), zdroj vody atd. Na základě těchto faktorů můžeme humolity dělit na tři základní skupiny: vrchovištní rašelinu, přechodovou rašelinu a slatinu, případně na jejich stanoviště: vrchovištní rašelině, přechodová rašelině a slatině [1, 2].

### 1.1.1 Vrchovištní rašelina – vrchoviště

Vrchovištní rašelina je především závislá na srážkové vodě, a proto se vyskytuje zejména v horských a podhorských oblastech s vlhkým klimatem. Tyto lokality vzniku rašelině jsou zpravidla charakterizovány prostředím, které je velmi chudé na živiny. Půdní reakce těchto přírodních matric je velmi kyselá. Dominujícím rostlinným druhem vrchoviště je rašeliník, který se vyznačuje schopností mnohonásobně zvětšit svůj objem resorpcí vody z okolí. Tímto způsobem jsou tato rašelině schopna až 20× zvětšit svoji hmotnost, a proto jsou velkou zásobárnou vody v horských ekosystémech. Rychlost narůstání mocnosti vrchoviště, resp. i přechodových rašelině je relativně pomalá. Obecně můžeme říci, že jeden metr slabě rozložené rašeliny se v tomto ekosystému tvoří 500–1000 let. V České republice je typickým rašeliněm tohoto typu např. Tříjezerní slat' u Modravy v Národním parku Šumava [1].

### 1.1.2 Slatiništní rašelině – slatině

Slatiništní rašelině jsou představiteli půd vyskytujících se především v úživném prostředí nížin. Obvykle jsou vytvářeny na vývěrech podzemních vod a prameništích sladkovodních zdrojů. Dále je nalézáme v ekosystémech, jako jsou zarostlé vodní nádrže či slepá říční ramena. Slatiništní rašelině můžeme dále rozdělit na slatině prostá, která



nejsou obohacována minerálními látkami a slatiniště mineralizovaná, která jsou v přímé koexistenci s vývěry hlubinných pramenů artéských vod. Slatiny jsou charakterizovány rychlejším nárůstem organické hmoty, než je tomu v případě vrchovištních rašelinišť. Můžeme konstatovat, že jeden metr tohoto typu humolitu je vytvářen v průběhu několika set let především prostřednictvím zarůstání vodních ploch. Typická slatina je vytvářena několika pásmy, která ji obklopují. Jedná se o pásma plovoucích rostlin, rostlin zakořeněných ve dně rašeliniště, pobřežní vegetace a křovinatých břehových porostů [1].

### *1.1.3 Přejímová rašeliniště*

Přejímová rašeliniště jsou charakterizována vlastnostmi obou výše zmíněných typů humolitových ekosystémů. Tato rašeliniště jsou geograficky situována především v oblastech chladnějších pahorkatin až po horské oblasti. Jsou tvořena především různými druhy mechů a travin. Někteří autoři uvádějí, že tento typ rašeliniště je uměle vykonstruovaný a má být především chápán jako pomocný článek v posloupnosti humolitových ložisek. Jako příklad takového typu rašeliniště v České republice můžeme uvést např. rašeliniště Diana v Českém lese [1].

## **1.2 Ulmifikace – rašelinění**

Rašeliněním se rozumí rozsáhlý soubor rozkladných chemických a biochemických reakcí, které probíhají formou oxidace nekromasy rozkladnými organismy. Za nepřístupu vzdušného kyslíku ji rozkládají organismy heterotrofní (anaerobní bakterie, plísňe, houby). Jedná se především o fermentační a putrefekční (hnilobné) reakce primárně působící na odumřelé části rostlinných a živočišných těl. Tyto anaerobní reakce probíhají v prostředí, které je silně nasycené vodou, ať už máme na mysli vodu srážkového nebo podzemního původu [2, 3, 4].

Lokalitami typického a kvantitativně výrazného rašelinění jsou rašeliniště rozšířená v pásmu mírného až tropického klimatu. Intenzita ulmifikace je nejvyšší v tzv. huminogenní zóně mezi povrchem a hloubkou asi 0,5 m. Podstatou nekromasy rašelinišť tvoří vyšší (cévnaté) rostliny. V tomto případě máme na mysli buď celá jejich odumřelá těla, anebo jejich vegetativní či generativní části, jako jsou stonek, list, kořen, květ, semeno či plod. Přístup vzdušného kyslíku je omezen, ale nikoli zcela uzavřen. Při rašelinění vznikají a unikají plyny  $\text{CO}_2$  a  $\text{CH}_4$ . Mezi typické znaky rašelinění patří rozkládající se lignin, celulóza a proteiny, syntéza degradačních produktů ligninu. Na tomto místě musíme podotknout, že pryskyřičné látky a pylová zrna nepodléhají tomuto degradačnímu a transformačnímu procesu, jež je označován jako rašelinění [5].

### *1.2.1 Vznik rašelinišť*

Je dobře známo, že velká část rašelinišť se vyvinula na prameništích podzemních vod před 10–15 tisíci lety v období, které nazýváme čtvrtohory, resp. holocén. Tento půdní typ se z počátku výhradně vyvíjel jako slatiniště, až v důsledku klimatických změn v období čtvrtohor se některá slatiniště přeměnila na vrchovištní rašeliniště. Avšak některá vrchoviště se v průběhu některých dramatických klimatických podmínek mohla přeměnit zpět na slatiniště. Tyto klimatické změny kromě přeměny slatiniště na vrchoviště a opačně měly významný vliv na rychlost tvorby humolitu. Rašeliniště se nejrychleji tvořila v geologickém

období, které nazýváme Atlantik tj. před 8000–6000 lety. V této době byla teplota na zemském povrchu přibližně o 3 °C vyšší, než je tomu dnes [1].

### 1.3 Složení rašeliny

Produktem rašelinění je rašelina, kterou lze definovat jako organickou, hydrofilní, koloidní směs látek, obsahující určitý podíl rostlinných těl a jejich částí, které se nacházejí v určitém stupni rašelinění. Až ze 75 hm. % je rašelina tvořena vodou, ve které jsou rozpuštěny, popřípadě rozptýleny některé anorganické látky.

Průměrné elementární složení rašeliny je následující: obsah organického uhlíku dosahuje až 60 hm. %. Další biogenní prvky klesají v následujícím pořadí: O (33–40 hm. %) > H (4,5–6 hm. %) > N (0,9–3,5 hm. %) > S (0,1–2 hm. %). Rašelina obsahuje až 20 hm. % bitumenu, 10–40 hm. % huminových látek, do 40 hm. % ligninu a až 40 hm. % látek patřících ke kerogenům.

V dnešních rašeliníštích se nekromasa vyšších rostlin hromadí a humifikuje ve velkém měřítku. Z poznatků jednoznačně vyplývá, že dnešní uhelné sloje jsou fosilní rašeliníště, jejichž rašelina byla prouhelňováním přeměněna v uhlí. Sloje, které vznikly z rašeliny nahromaděné na místě, se nazývají autochtonní. Akumulací nekromasy po určitém transportu mohly vzniknout sloje tzv. alochtonní. Vlastnosti rašelin jsou ovlivňovány rostlinným složením prvků (taxony), stupněm rozložení a příměsí anorganických složek.

Rašeliníště se klasifikují:

1. podle vzhledu a mineralizace svých vod
  - slatiny
  - přechodová rašeliníště
  - vrchoviště
2. podle vzniku
  - zarůstáním vodní nádrže (stagnační rašeliníště)
  - zamokřením určité lokality (irigační rašeliníště)
3. podle výskytu
  - ve vnitrokontinentální pánvi (limnický typ)
  - na pobřeží moře (paralický typ) [5,12]

Čisté slatiny, jejichž pH je dáno rozmezím hodnot 5,5–7,5 jsou složeny ze 75 hm. % organickými látkami. Naproti tomu celkový obsah organických látek v zemitých slatinách je obvykle nižší (50–75 hm. %). Obsah organického uhlíku se v čistých slatinách pohybuje mezi 55–60 hm. %, obsah vodíku kolísá mezi 4,5–5,8 hm. %, dusík je zastoupen rozmezím 2–3 hm. % a množství popelovin dosahuje v tomto typu rašelin až 18 hm. %. Přechodová rašeliníště obsahují obvykle okolo 80 hm. % organických látek, obsah uhlíku je 50–55 hm. %, 5,5–6,1 hm. % vodíku, dusíku 1,9–2 hm. % a popelovin 4–6 hm. %. Přechodová rašeliníště mají větší zastoupení bitumenů, pH kolísá mezi 4,5–6,5. Čistá vrchoviště jsou složena z 90 hm. % organických látek, 45–55 hm. % uhlíku, 5,1–6,1 hm. % vodíku, 0,9–1,3 hm. % dusíku a 2–4 hm. % popelovin. pH čistých vrchovišť je 2,5–4,5.

Výrazné termoakumulační vlastnosti má většina rašelinišť, jsou zásobníkem tepla, což ovlivňuje teplotu krajiny [6, 7].

### 1.3.1 Mikroedafon

Nejpočetnější skupinou půdních mikroorganismů jsou bakterie. Většinou se jedná o heterotrofní organismy. V organických zbytcích přítomných v tomto půdním ekosystému rozkládají především polysacharidy, bílkoviny, celulózu a řadu dalších organických látek. Jsou součástí důležitých procesů přeměn organických i minerálních látek, jako jsou humifikace, oxidace amoniaku, oxidace železa a síry. Jejich zastoupení v mikroedafonu znázorňuje Tabulka 1.

Tabulka 1: Zastoupení mikroorganismů v půdě [8]

Mikroedafon	Počet v 1g půdy	Hmotnost v kg·ha <sup>-1</sup>
Bakterie	600 000 000	10 000
Plísně a aktinomycety	400 000	10 000
Řasy	100 000	140
Prvoci	1 100 000	370

Houby představují další skupinu heterotrofních organismů nacházející se v mikroedafonu, i když v menším počtu než bakterie. Díky své enzymatické činnosti se podílí na procesech rozkladu tuků, bílkovin, uhlovodíků atd. Jsou součástí při rozkladných procesech aromatických sloučenin, např. ligninu, kde hrají důležitou roli.

Aktinomycety představují přechodnou formu mezi bakteriemi a houbami. Jsou citlivé na reakci prostředí (potřebují neutrální až slabě alkalickou půdní reakci), na vlhkost a teplotu půdy. Účastní se rozkladných procesů organických látek, které jsou pro ostatní mikroorganismy resistantní jako lignin, chitin, huminové látky, DOM apod. Stejně jako houby tvoří aktinomycety některé antibiotické látky.

Prvoci nacházející se v půdním ekosystému jsou zástupci jednobuněčných mikroorganismů. Většina z nich jsou heterotrofní organismy (pouze některé rody bičíkovců mají umožněnu autotrofní výživu díky barvivu podobnému chlorofylu). Jejich funkce v půdotvorném procesu není ještě zcela objasněna. Ve sklenicích a pařeništích mohou při svém přemnožení redukovat výskyt bakterií, kterými se živí [8].

## 1.4 Huminové látky

Huminové látky (HL) jsou sloučeniny organického původu, které vznikají postupným rozkladem organické hmoty tzn. zbytků rostlinných a živočišných těl a syntetickou činností mikroorganismů. Obecně je proces, kterým vznikají huminové látky nazýván odborným termínem *humifikace*. Huminové látky patří mezi nejrozšířenější látky na zemském povrchu. Nacházejí se v kaustobiolitech, kam zpravidla řadíme rašelinu, lignit, leonardit a oxyhumolit. Dále jsou nedílnou součástí půd, sedimentů a v neposlední řadě i sladkovodních a mořských vodních zdrojů [9].

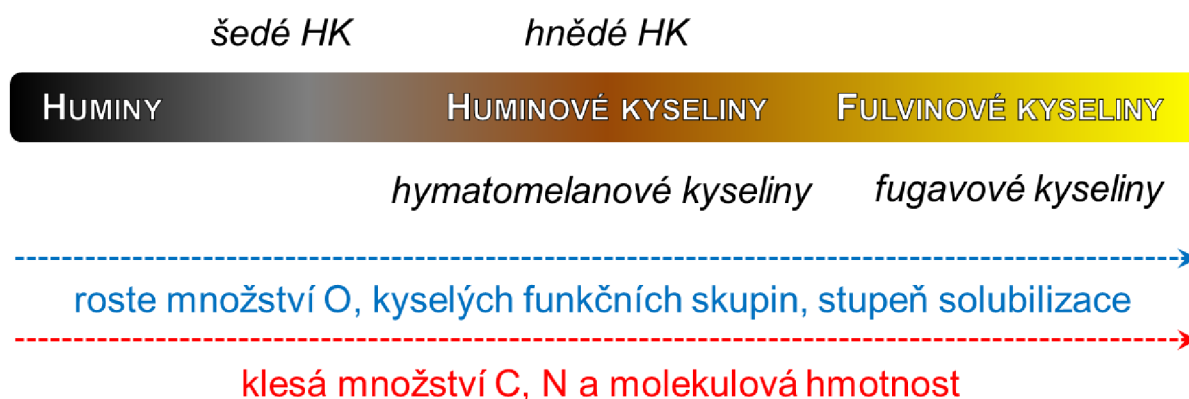
Huminové látky můžeme klasifikovat jako (bio)koloidní polycyklické sloučeniny žluté až hnědočerné barvy. Jsou převážně aromatického charakteru, kdy jednotlivá aromatická jádra bývají vzájemně spojena prostřednictvím alifatických strukturních jednotek. Tyto vazby jsou převážně realizovány pomocí esterových ( $R_1-COO-R_2$ ), etherových ( $R_1-O-R_2$ ) a v neposlední řadě i alkoxylových ( $R_1-O$ ) vazeb. Tyto sloučeniny se svou povahou řadí do skupiny polyaromatických karboxylových kyselin s jistou mírou substituce aromatického jádra fenolickými  $-OH$  funkčními skupinami. Typické funkční skupiny nacházející se ve struktuře HL jsou tzv. kyselé funkční skupiny ( $-COOH$  a  $-OH$  fenolické), dále pak sekundární amidické ( $-NH-CO-$ ), alkoxy skupiny a rovněž i karbonylové, které jsou převážně spojeny se strukturními jednotkami HL chinoidního typu. Z pohledu elementární analýzy tzn. obsahu biogenních prvků jsou huminové látky tvořeny převážně uhlíkem, kyslíkem, vodíkem, dusíkem a v případě HL izolovaných z kaustobiolitických přírodních matric i sírou [10].

#### 1.4.1 Rozdělení huminových látek

Jelikož absolutní struktura HL není doposud zcela objasněná, tak tyto unikátní (bio)koloidní látky jsou obecně považovány za aglomerát rozličných strukturních jednotek ligninového, polysacharidického, lipidického a peptidického typu. Jednotlivé frakce HL můžeme rozdělit podle chemických a fyzikálně-chemických vlastností na *huminové kyseliny* (HK), *fulvinové kyseliny* (FK) a *huminy* (HU). V případě silně karbonizované frakce HL tzn. huminu se rovněž používá termín humusové uhlí, avšak s tímto označením se můžeme především setkat v odborných publikacích pedologického zaměření. Z hlediska geneze HL jsou si všechny frakce strukturně podobné, pokud máme na mysli, že tyto sloučeniny vznikají obdobným způsobem v procesu humifikace, na stejném místě vzniku, z obdobných prekurzorů biomasy, resp. nekromasy a také ve stejném čase. Hlavní rozdíl mezi těmito frakcemi je obvykle pozorován ve střední molekulové hmotnosti  $\overline{M}_w$ , která se pohybuje v širokém rozmezí hodnot, a to od několika stovek po tisíce Daltonů (Da). Dále se liší obsahem rozličných funkčních skupin, rozpustností v některých rozpouštědlech a barvou, jak uvádí Obrázek [10, 11]. Huminy, resp. humusové uhlí jsou nerozpustné ve vodných roztocích silných minerálních kyselin a zásad, a proto jsou z environmentálního hlediska důležité pouze HK a FK, které hrají klíčovou roli např. ve výživě rostlin, imobilizaci anorganických a organických polutantů atd.

Huminové látky jakožto jednotlivé frakce organické hmoty tradičně rozdělujeme na tři základní skupiny:

- Huminové kyseliny (HK) jsou frakce HL, které jsou rozpustné v zásadách, ale ve vodných roztocích silných kyselin snadno koagulují, kdy makromolekulární (lineární) řetězec tohoto polyelektrolitu zaujme konformaci makromolekulárního klubka;
- Fulvinové kyseliny (FK) jsou rozpustné v celé škále pH hodnot;
- Huminy (HU) jsou nerozpustné jak v silných kyselinách, tak zásadách [10].



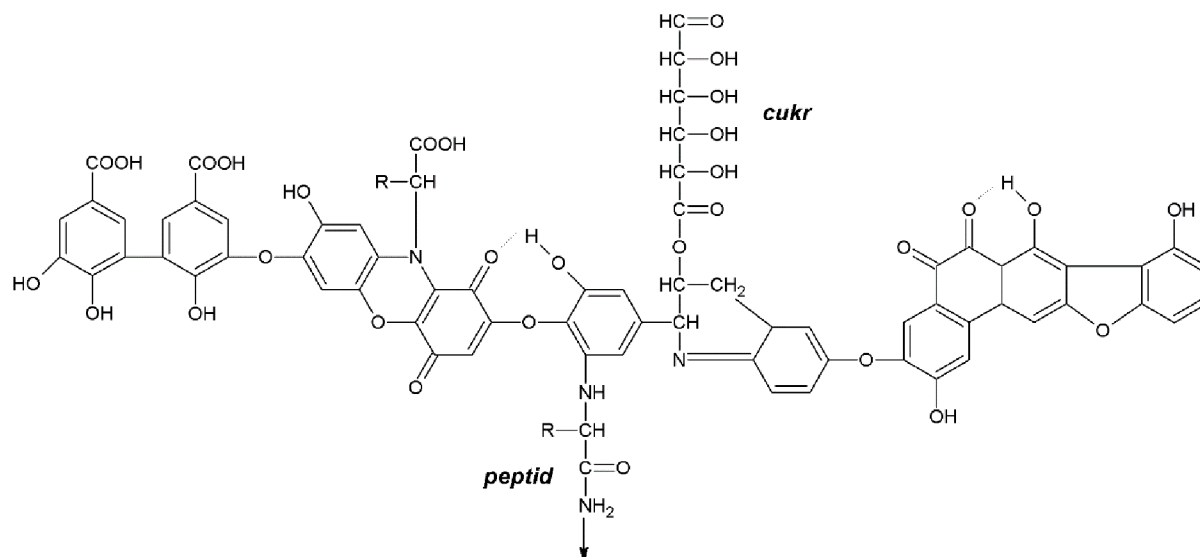
Obrázek 1: Rozdělení HL a jejich základní fyzikálně-chemických vlastností dle *Stevensona* (1982) [12]

### *Huminové kyseliny*

Huminové kyseliny (viz. Obrázek 2) mají z pravidla světle hnědou až černou barvou, kdy tmavší zbarvení HK je především charakteristické pro HK izolované z kaustobiolitických přírodních matric. Jsou velmi dobře rozpustné v zásaditých roztocích (roztoky hydroxidů a alkalických solí) a omezeně se rozpouštějí ve vodě. Rozpustnost ve vodě je především spojena s rozpustností některých frakcí, které tvoří supramolekulu HK. V kyselém prostředí dochází ke koagulaci, resp. k zabalení „makromolekulárního“ klubka HK, přičemž musí být dodržena podmínka, že pH roztoku bude menší než 2 a tedy bude dosahovat izoelektrického bodu [13].

Jejich složení je závislé na typu přírodní matrice, podmínkách humifikace a chemickém složení rostlinných a živočišných zbytků. Vyznačují se vysokou sorpční schopností přes 4 000 mmol·kg<sup>-1</sup> půdy. Mimo jiné jsou schopny ovlivňovat fyzikálně-chemické vlastnosti půdy (pH, strukturu, schopnost zadržovat vodu) a také její úrodnost, což hraje klíčovou roli v případě půd semiaridního klimatu. Elementární složení tzn. obsah biogenních prvků kolísá v rozmezí: uhlík 52–65 hm. %, vodík 2–6 hm. %, kyslík 30–39 hm. %, dusík 2–6 hm. % a síra 0–2 hm. %. Huminové kyseliny obsahují také až 10 hm. % nespalitelného podílu, tj. popela, jehož obsah je vázán na purifikační kroky při izolaci těchto (bio)koloidních látek.

HK jsou tvořeny trojrozměrnou sítí molekul, v jejichž centru je jádro aromatického charakteru (fenol, naftalen, kumarin, hydroxykumarin, flavonoidy atd.). Aromatické jádro HK je substituováno alifatickými řetězci a rozličnými funkčními skupinami, jako jsou karboxylové, –OH fenolické a v neposlední řadě i amidické II (–NH–CO–). Vodíkový ion karboxylových a –OH fenolických funkčních skupin může při určité hodnotě pH disociovat, přičemž vzniklý anion je schopen interakce s celou řadou iontů např. Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup> atd. Uvádí se, že v průměru 35 % „objemu“ molekuly HK tvoří aromatické jádro, zbytek struktury je ve formě alifatických konstitučních jednotek. V půdách jsou tyto (bio)polymerní látky převážně vázány na minerální podíl půdy, se kterým tvoří tzv. organo-minerální komplex [8, 14, 15]. HK se v půdním roztoku nacházejí v disociované formě, která hraje důležitou roli v oblasti výživy rostlin [16].



Obrázek 2: Předpokládaná struktura HK dle *Stevensona* (1982) [12]

Huminové kyseliny jsou nejhodnotnějším produktem procesu humifikace, výrazně ovlivňují úrodnost půdy. V nasyceném stavu jsou odolné vůči mineralizaci [8].

Hymatomelanové kyseliny jsou považovány za jednu z frakcí huminových kyselin. Mají žluté až hnědožluté zabarvení, jejich molekulová hmotnost je oproti HK menší [8].

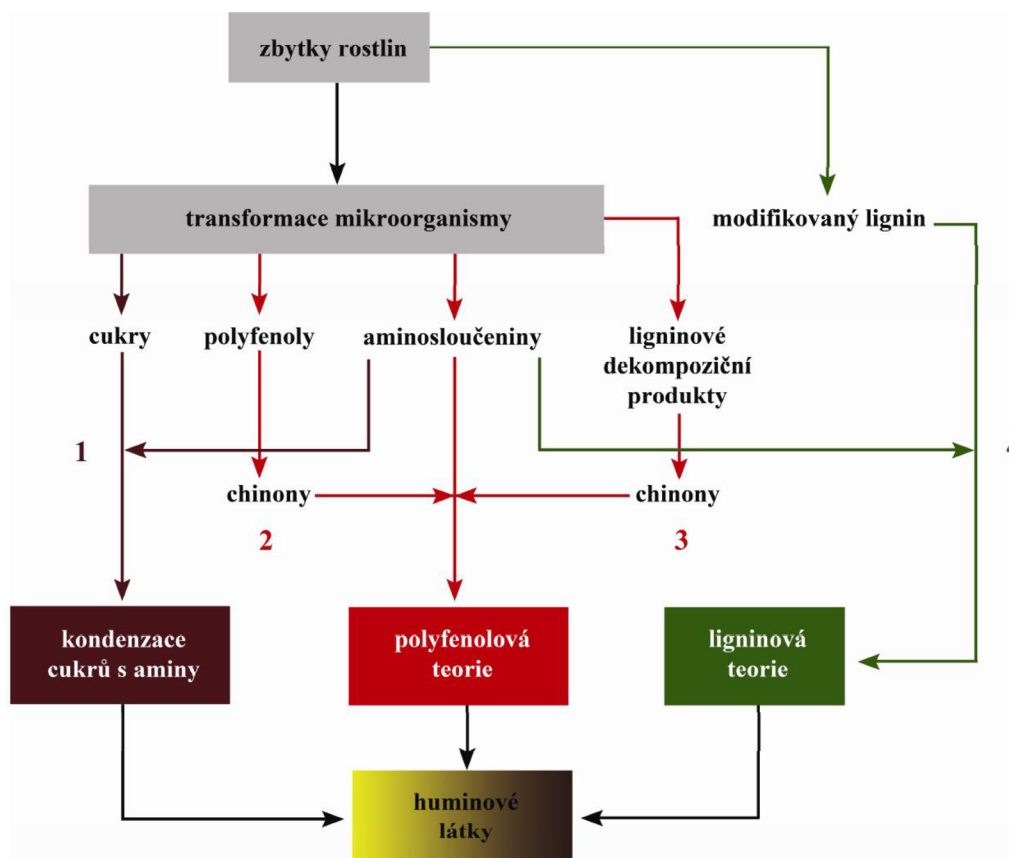
#### *Fulvinové kyseliny*

Fulvinové kyseliny (FK) neboli fulvokyseliny (viz. Obrázek 3) mají žluté až světle hnědé zabarvení a jsou pravděpodobně směsí aromatických organických kyselin s různou mírou substituce aromatického jádra –OH funkčními skupinami. Mimo jiné určitá minoritní část FK je tvořena lehce hydrolyzujícími organickými kyselinami, které jsou v odborné literatuře označovány jako hDOM. Oproti HK, které se hromadí na místě vzniku, jsou fulvinové kyseliny poměrně velmi mobilní, a proto mohou lehce migrovat v půdním profilu. Tímto způsobem se mohou dostávat do zdrojů podzemních a artézských vod. Jsou dobře rozpustné ve vodě, v minerálních kyselinách a hydroxidech. V porovnání s HK mají jednodušší stavbu a nižší stupeň diverzifikace. Střední molekulová hmotnost FK je v porovnání s HK řádově několiknásobně nižší, přičemž typickými hodnotami jsou 500–10 000 Da.

Fulvinové kyseliny jsou oproti HK charakterizovány nižším obsahem uhlíku a až dvakrát vyšším obsahem kyslíku, a to především díky vysokému obsahu karboxylových skupin. Fulvinové kyseliny jsou tvořeny průměrně těmito obsahy biogenních prvků: C 40–52 hm. %, H 4–6 hm. %, O 40–48 hm. % a N 2–6 hm. %. Obsah nespalitelného podílu je v případě FK poněkud vyšší, a to z důvodu izolace těchto frakcí HL, kdy některé purifikační kroky nejsou v izolačním schématu zařazeny, tak jak je tomu v případě HK. Tyto (bio)koloidní sloučeniny obsahují velké množství kyselých funkčních skupin, a tudíž jsou považovány za velmi reaktivní v porovnání s HK.

Mimo jiné je na tomto místě nutné říci, že fulvinové kyseliny ochuzují minerální část půdy o živiny a koloidní látky, kvůli silně kyselé reakci a dobré rozpustnosti ve vodě [8, 14].





Obrázek 4: Schéma teorie vzniku HL [12]

Nejstarší (první) teorie vzniku HL se opírá o fakt, že HL jsou odvozeny od lignifikovaných pletiv vyšších rostlin. Druhá teorie na prvotní navázala ve smyslu transformace residuí ligninu pomocí mikroorganismů za vzniku polyfenolických látek, které jsou oxidovány až na sloučeniny chinoidního typu. Třetí teorie podporovala vznik huminových látek z jednoduchých cukrů, přičemž by měly probíhat reakce mezi redukcujícími cukry a aminokyselinami za vzniku hnědých dusík obsahujících polymerů [14].

### Ligninová teorie

Ligninová teorie považuje rostlinný lignin za hlavní prekurzor při vzniku huminových látek v půdě. V prvním kroku jsou méně stabilní molekuly rozloženy díky mikroorganismům (plísně, bakterie, řasy, prvoci), stabilnější části biopolymerů jsou zachovány nebo jsou částečně rozloženy (viz. Obrázek 4; cesta č. 4). Během tohoto procesu dochází k odštěpení methoxylových skupin ( $-OCH_3$ ) a vzniku *o*-hydroxyfenolů. Další změnou je oxidace alifatických částí molekuly za vzniku karboxylových skupin ( $-COOH$ ). Takto pozměněné části biopolymeru ligninu jsou podrobeny dalším následným reakcím. Během oxidace reagují s amoniakem za vzniku kondenzačních produktů, ve kterých je dusík součástí heterocyklických sloučenin.

Při ztrátě methoxylových skupin a následné oxidaci koncových alifatických částí molekuly obsahuje prekurzor huminových látek vyšší obsah kyslíku a menší obsah uhlíku [12, 14, 19].



## *Polyfenolová teorie*

Polyfenolová teorie nahradila v 60. letech 20. století teorii ligninovou. Polyfenolová neboli syntetická teorie předpokládá, že huminové látky vznikají z polyfenolových jednotek nebo jsou syntetizovány mikroorganismy (viz. Obrázek 4; cesta 2 a 3). V první cestě dochází k rozkladu všech rostlinných biopolymerů na jejich základní strukturní jednotky. Poté, co je lignin zbaven vazby s celulórou, dochází k demethylaci postranních alifatických řetězců a následné oxidaci na polyfenoly, které jsou přeměněny na chinony. Chinony reagují s aminosloučeninami a během následné polymerizace jsou syntetizovány huminové látky. Nejdříve dochází ke vzniku fulvinových kyselin (FK), dále huminových kyselin (HK) a nakonec huminů (HU) [12, 14, 20].

## *Teorie kondenzovaných sacharidů s aminy*

Jedním z rysů této teorie kondenzovaných sacharidů s aminy nebo také *Maillardovy teorie* je, že reaktanty jsou produkovány v půdě díky aktivitě mikroorganismů, které se ale přímo na tvorbě huminových látek nepodílejí. Mikroorganismy zajišťují štěpení polysacharidů na monosacharidy a bílkovin na jednotlivé aminokyseliny (viz. Obrázek 4; cesta 1). Huminové látky jsou tvořeny syntézou jednoduchých látek (aminů a monosacharidů), které vznikly degradací části rostlin. Dále Maillardova teorie vysvětluje tvorbu huminových látek v prostředí, kde produkty ligninu nejsou převládající [12, 19].

### *1.4.3 Molekulární struktura huminových látek*

Huminové látky jsou relativně stabilní komplexní sloučeniny, jejichž molekulová hmotnost se pohybuje od  $10^2$  do  $10^5$  Daltonů. Podle jejich extrahovatelnosti zásadami a kyselinami se dělí na fulvokyseliny, huminové kyseliny a humin, každá skupina se vyznačuje odlišnou chemickou strukturou a molekulovou hmotností [21]. Ačkoliv se o objasnění molekulární struktury pokoušelo mnoho vědců a vědeckých týmů, huminové látky jsou strukturně velice složité a jejich strukturní jednotka není doposud zcela popsána. Přitom znalost struktury huminových látek je potřebná k pochopení jejich fyzikálně-chemických vlastností (reaktivnost, rozpustnost) a jejich funkce v půdě [12]. V důsledku vývoje moderních analytických metod bylo navrženo několik strukturních modelů huminových látek, kde jejich struktura je buď makropolymerní nebo supramolekulární. Makropolymerní struktura popisuje HL jako lineární makromolekulární polyelektrolyty, které mohou tvořit molekulární agregáty za specifických podmínek např. kyselé pH, vysoká iontová síla. Supramolekulární model je komplexem směsi různých molekul, které jsou navzájem poutány pomocí slabých vazebných interakcí [22, 23].

## *Polymerní teorie*

Polymerní teorie byla dlouhou dobu nejpravděpodobnější teorií, která nahlíží na huminové látky pomocí tzv. polymerního modelu. Nejvýznamnějšími představiteli polymerní teorie, podle kterých známe některé strukturní modely, jsou například Stevenson (viz. Obrázek 2), Buffle (viz. Obrázek 3) a Flaig. Pomocí různých instrumentálních technik se pokusili zjistit složení a molekulovou hmotnost huminových látek. Protože jsou ale HL složitá směs, bylo zjištěno, že huminová látka různého původu má variabilní složení. Proto je stanoven rozsah molekulové hmotnosti, kde ale existuje značná nejistota velikosti a skutečné hodnoty

molekulové hmotnosti [24]. Podle prvních polymerních modelů je struktura huminových látek lineární, pružnějšího charakteru a elipsoidního tvaru. Později jim bylo přikládáno uspořádání náhodně stočené polymerní konformace (tzv. random coil). Na základě dalších experimentů bylo zjištěno, že se molekulární struktura měnila ze sférického tvaru do tvaru lineárního podle koncentrace vzorku, pH a iontové síly rozpouštědla. Při rostoucím pH nebo koncentraci huminových látek dochází ke změně tvaru huminových látek, z klubkovitého tvaru se stává náhodně propletená síť lineárních řetězců, které se spojují do struktur listu označovaného jako  $\beta$ -sheet [25].

Předpoklad, že huminové látky mají polymerní strukturu, která však postrádá opakující se stavební jednotku tzv. *mer*, byla i tak tato teorie struktury HL mnohými vědeckými skupinami považována za zcela správnou a uspokojující. Dále také jistá odolnost HL během tepelné degradace za použití termálních technik např. termogravimetrie, podporovala polymerní teorii. Mimo jiné jejich koloidní vlastnosti, které lze přirovnat k vlastnostem polyelektrolytů ve vodném prostředí, přispěly k polymernímu pohledu na HL [27].

### *Supramolekulární teorie*

S rozvojem moderních analytických metod (SEC, C-NMR, MS, ...) se změnil pohled na strukturu huminových látek. A. Piccolo aplikoval novou teorii, která měla nahradit dosavadní polymerní model, a to supramolekulární teorii. Jedním z důvodů, proč se Piccolo snažil změnit doposud zavedenou a uznávanou teorii byla neschopnost polymerní teorie nalézt molekulární hmotnost huminových látek [27]. S prvními experimenty bylo zjištěno, že huminové látky jsou složitější, než se prvotně předpokládalo. Struktura takových supramolekul nebyla stabilizována silami kovalentních vazeb jako v případě polymerního modelu, ale slabými disperzními hydrofobními silami (van der Waalsovy síly,  $\pi$ - $\pi$  vazby, CH- $\pi$  vazby) a vodíkovými vazbami, které jsou zodpovědné za velkou molekulární strukturu huminových látek, která se zvyšuje s rostoucím pH. Toto zjištění bylo velmi kritizováno zastánci polymerní teorie, avšak tento nový model byl potvrzen i jinými vědeckými týmy [26].

Tato teorie vysvětluje, že vysoká molekulová hmotnost je pravděpodobně způsobena sdružením malých konstitučních jednotek za vzniku agregátů ve vodném roztoku s makromolekulárními vlastnostmi [28].

Tento nový popis struktury huminových látek lépe odpovídá jejich zásadní úloze přizajišťování a udržování fyzikální a chemické kvality půdy a jejich reaktivity vůči pesticidům a jiným znečišťujícím látkám, které se nacházejí v půdě [26].

#### *1.4.4 Využití huminových látek*

V současnosti mají HL díky svým vlastnostem poměrně rozsáhlé využití, které můžeme rozdělit do několika oblastí: průmyslové použití, aplikace v zemědělství, využití v oblasti ochrany životního prostředí a farmakologické použití.

#### *Průmyslové využití*

S materiály obsahujícími HL se můžeme setkat například ve stavebnictví, kde se vyskytují jako aditiva kontrolující rychlost tuhnutí betonu. Huminové látky nacházejí uplatnění také

v koželužství, kde jsou používány jako barvivo kůže, později jako prostředek pro povrchovou úpravu kůže. Dřevařský průmysl je další oblastí, kde byly použity HL k přípravě přírodního indiga sloužícího k barvení dýhy. V keramickém průmyslu se staly součástí přísad ke zlepšení odolnosti materiálu, zejména porcelánu. Mimo jiné našly tyto (bio)koloidní látky uplatnění jako změkčovadla při výrobě PVC a Nylonu 6 nebo v papírenském průmyslu, kde jejich sodnou formu tzn. humát sodný, resp. draselný lze s výhodou použít jako netoxické přírodní barvivo [29].

Huminové látky nacházející se v uhlí našly využití i v energetickém průmyslu. S postupem času se však zvyšovala ochrana životního prostředí a proces spalování fosilních paliv byl omezen a zároveň nahrazen zdroji šetrnějšími k životnímu prostředí [30].

### *Využití v zemědělství*

HL hrají důležitou roli z agronomického hlediska, významně ovlivňují kvalitu a produktivitu půdy. Kromě zlepšení fyzikálních a chemických vlastností půdy, vykazují vysokou výměnnou kapacitu pro výživové prvky rostlin, ať už máme na mysli makronutrienty či stopové prvky, které jsou důležité pro zvýšení úrodnosti půdy. Rovněž napomáhají vytváření pórů, které jsou důležité k výměně plynů mezi půdou a atmosférou. Zlepšují strukturu půdy, pomáhají její částice stmelovat a díky tomu i ovlivňují schopnost zadržet vodu. HL jsou zdrojem minerálních a organických látek, jež jsou dále použity jako zdroj energie při procesech v půdě. V současné době se HL používají jako aditiva v hnojivech. Různé soli HL, jako je humát vápenatý a zejména draselný, zvyšují úrodnost půdy, ať už jsou tyto látky aplikovány do půdy anebo přímo na list jako foliální hnojivo. V případě nedostatku dusíku v půdě lze tento problém řešit pomocí humátu amonného, který je výhradně aplikován do půdy. Mimo jiné je potřeba zmínit, že HL jsou schopny interagovat s velkou částí polyvalentních kationů ( $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ), ale i s organickými molekulami (růstové hormony, signální molekuly mikroorganismů vyskytujících se v půdě), které přispívají k vyšší úrodnosti půdy a dobré biotické kondici půdního ekosystému. Huminové látky mohou být součástí krmiv, kde hrají klíčovou roli při výživě zvířat. Například ve výzkumném ústavu zemědělském v Brně byly lignitické HK aplikovány jako profylaxe průjmů u jatečných zvířat [29, 31].

Huminové látky mají stimulační účinky na trávení a využití živin, zlepšují konverzi krmiva a tím příznivě ovlivňují růst zvířat nebo zvýšení produkce mléka u dojného skotu. Díky přidávku HL do krmiva dochází k tvorbě zdravého střevního epitelu, ustálení střevní mikroflóry a pH v trávicím traktu. Zabraňují také infekci díky svým antimikrobiálním účinkům [32].

### *Využití při ochraně životního prostředí*

Přírodní organické koloidy (HK, FK) díky své struktuře ve vodě tvoří nerozpustné komplexy s mnoha kovy včetně radionuklidů, proto jsou důležité jako zprostředkovatelé radionuklidového transportu skrz životní prostředí. Hlavní úlohou HL je odstranění toxických kovů ( $\text{Pb}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Cr}^{3+}$ ), organických chemikálií a dalších znečišťujících látek, a to z půdy i z vody. K odstraňování oleje a barviv z odpadních vod byl vyvinut půdní filtr, který je také používán k odstraňování pesticidů z průmyslových odpadních vod. Materiály obsahující huminové látky jsou používány také pro sorpci plynů. HL mají schopnost

interagovat s různými organickými polutanty, a tedy je lze s výhodou použít k odstranění některých látek jako např. herbicidů, estrogenní sloučeniny, dioxinů [29].

### *Biomedicínské využití*

Huminové látky vyráběné v komerčním měřítku se používají především v medicíně a veterinářství. Pro své antivirové, profibrinolycké, protizánětlivé účinky a estrogenní aktivity se staly v medicínské oblasti důležitými. Potenciál HL tvořit komplexy s těžkými kovy, jako je  $\text{Cd}^{2+}$ , se používá k odstranění těžkých kovů z organismu. Studie ukazují, že léčba virových respiračních nemocí běžných u dětí se významně zkracuje v případě výživových doplňků, jejichž majoritní částí jsou fulvinové kyseliny. Mnoho lékařských studií ukazuje, že HL, zejména FK, mají schopnost chránit před rakovinou a virem způsobujícími rakovinu. Na druhé straně bylo dokázáno, že HK jsou toxické pro mnoho savčích buněk, mohou působit mutageně a poškozovat DNA [29].

## **1.5 Metody frakcionace huminových látek**

Jednotlivé frakce HL jsou i v dnešní době předmětem poměrně rozsáhlého výzkumu, i když v počtu odborných publikací HK převyšují ostatní frakce HL (FK a hDOM). Studium a charakterizace HL a hDOM se často liší v důsledku technik, které byly použity k izolaci. Frakce HL a hDOM jsou definovány na základě různých fyzikálních nebo chemických parametrů. Mezi fyzikální patří například velikost částic nebo jejich hustota, k chemickým například reaktivnost, prvkové složení apod. Chemické metody bývají obvykle destruktivní, zatímco fyzikální ne [33]. Podle Konové a Bělčikové (1963) princip frakcionace spočívá v dekalcinaci půdy a poté v rozrušování stabilních sloučenin humátů vápenatých a hořečnatých, které tvoří s jílovými částicemi tzv. organominerální komplex za použití roztoku pyrofosforečnanu sodného o určité hodnotě pH. Tímto způsobem je částice organominerálního komplexu narušena, kdy dochází k uvolnění HL ve formě sodných solí do supernatantu, ve kterém lze kvantitativně stanovit celkový obsah HL a hDOM. V současnosti užívaná frakcionace a izolace HL z půdy se označuje jako mezinárodní standardní metoda IHSS [13].

### *1.5.1 Fyzikální frakcionace*

Fyzikální metody frakcionace zahrnují celou škálu postupů. Nejčastěji je používána separace podle velikosti částic v kombinaci s ultrazvukovou nebo mechanickou disperzí za použití sít s různou velikostí ok. Dalším typem je například separace s usazováním částic o rozdílné hustotě. Fyzikální frakcionace umožňuje separaci organické hmoty a primárních či sekundárních organominerálních komplexů. Separace založená na velikosti částic se provádí přes síta o různých velikostech ok buď pod proudem vody nebo za sucha, hustotní frakcionace kombinovaná s centrifugací je separace na základě rozdílné hmotnosti a hustoty půdních částic. Tím dochází k separaci půdy do několika velikostních tříd, největší složkou jsou např. částice písku, menší např. jílové částice. Každá tato izolovaná frakce obsahuje určitý podíl organické hmoty, frakce písku bude obsahovat hrubou nekomplexovanou organickou hmotu, jílové částice budou mít organickou hmotu uzavřenou ve svých pórech nebo asociovanou na povrchu [33, 34].

Postupy frakcionace se snaží minimalizovat chemické procesy v půdě, ale způsobují částečnou likvidaci mikrobiální komunity v ní [35].

### *Hustotní frakcionace*

Podstatou hustotní frakcionace je skutečnost, že organická hmota podléhající humifikaci je během ní asociována na minerální částice půdy, a tím získává mnohem větší hustotu v porovnání s nehumifikovanou organickou hmotou. Samotná separace je založena na homogenizaci objemu různě dispergovaného vzorku s roztokem, jehož hustota je v rozmezí  $1,6\text{--}2,6\text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$ . Tím dochází k jeho rozdělení na lehkou a těžkou frakci. Lehká frakce, jejíž hustota je nižší, než je hustota roztoku, splývá na hladině, těžká frakce, jejíž hustota je vyšší, klesá ke dnu. K přípravě roztoku o dané hustotě se využívá SPT (sodium polytungstate), který má molární hmotnost přibližně  $3000\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$  a je dobře rozpustný ve vodě [35, 36].

### *1.5.2 Chemická frakcionace*

Metody chemické separace jsou posuzovány na základě rozdílné rozpustnosti organických sloučenin v různých rozpouštědlech a extrakčních činidel, jejichž působením dochází k extrakci fulvinových kyselin (rozpustné v celém rozsahu pH), huminových kyselin (rozpustné při zvýšeném pH) a huminů, které jsou zcela nerozpustné [12, 33].

Jednou z nejrozšířenějších a nejvyužívanějších metod je tzv. *Stevensonova alkalická extrakce* s využitím extrakčního činidla NaOH a  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  ve vodě. Dochází k extrakci HK a FK do roztoku a HU jsou součástí pevného zbytku vzorku. Získaný roztok je okyselen HCl na  $\text{pH} = 2$  nebo menší, což způsobuje vysrážení HK, které se od roztoku FK oddělí centrifugací. Avšak tato metoda má několik nevýhod jako rozpouštění čerstvého organického odpadu nebo oxidaci organických sloučenin při kontaktu se vzduchem [12].

Mezi hydrolytické metody patří například extrakce horkou vodou, jejíž teplota výrazně ovlivňuje vlastnosti extraktu. Leinweber a kol. [37] prokázali, že půda extrahovaná horkou vodou je z velké části složena ze sacharidů a sloučenin obsahující dusík (zejména aminů). Výťažky extrahovaného uhlíku se pohybovaly od 1–5 hm. %, což je až 18krát vyšší ve srovnání s extrakcí studenou vodou.

### *1.5.3 Chromatografie*

Chromatografie je jedna z nejvýznamnějších separačních metod, pomocí které se dají stanovovat ionty, analyzovat plyny, separace anorganických či organických látek. Chromatografie je separační proces, založený na rozdělování mezi dvě vzájemně nemísitelné fáze, pohyblivou (mobilní) a nepohyblivou (stacionární). Stacionární fázi může tvořit pevná látka nebo kapalina, která je zachycena v pevném materiálu, mobilní fázi tvoří kapalina nebo plyn. Molekuly, nacházející se v mobilní fázi, jsou unášeny, ty, co se nacházejí v stacionární fázi, jsou nehybné a zůstávají na místě. Má-li sloučenina vysokou afinitu ke stacionární fázi a malou afinitu k mobilní fázi, dochází k tomu, že všechny molekuly v systému přechází do stacionární fáze a tato sloučenina tudíž nemigruje. Jestliže je tomu naopak a sloučenina má vysokou afinitu k mobilní fázi, všechny molekuly přechází do fáze mobilní, sloučenina je unášena chromatografickým systémem rychlostí toku mobilní fáze. Tato látka pak opouští systém v tzv. mrtvém čase, což je nejkratší možný čas. Mezi další možnost patří látka s určitou afinitou k oběma fázím, která se rozdělí napůl. Podle uspořádání stacionární fáze

rolišujeme chromatografii na sloupcovou a planární, kam patří tenkovrstvá chromatografie [38, 39].

#### *Chromatografie na tenké vrstvě (TLC)*

Tenkovrstvá chromatografie je případ adsorpční chromatografie, jejímž principem je dělení látek ze směsi na základě rozdílné adsorpce. Základem je tenká vrstva adsorbentu nanesená na pevné podložce a zpevněna pojídlem. Nejčastěji používané adsorbenty jsou silikagel nebo alumina, vrstva je zpevněna škrobem nebo sádrou. Tato směs se umísťuje na hliníkovou podložku nebo sklo.

Pro detekci se užívá celá řada metod, např. osvětlení UV zářením při použití adsorbentů s obsahem fluorescenčního indikátoru nebo postřikem s vhodným činidlem.

Předností TLC je její jednoduchost a rychlost vyvíjení, díky tomu slouží jako rychlá dělicí a identifikační metoda, může být použita i k preparativním účelům [38, 39].

#### *1.5.4 Termogravimetrická analýza*

Termogravimetrie (TG) je metoda, při níž je měřena změna hmotnosti látky v závislosti na teplotě. Lze ji zařadit mezi termické analýzy, kterými jsou sledovány změny jejich složení, popř. změny jejich vlastností. V průběhu zahřívání vzorku dochází k vyvolání nebo změně intenzity procesu, např. chemické reakce, rozkladu, dehydratace, které mohou být doprovázeny změnou hmotnosti, objemu, změnou vodivosti atd. Výsledkem je termogravimetrická křivka, která znázorňuje závislost hmotnosti na teplotě nebo čase a lze z ní odečíst teploty hmotnostních změn. Na ose  $y$  se nachází jednotky hmotnosti nebo procenta úbytku hmotnosti, na ose  $x$  je teplota nebo čas. Termogravimetrická křivka je schopna říci, kolik rozkladných reakcí ve vzorku probíhá, při jakých teplotách tyto reakce začínají a končí a kolik procent hmotnosti při každé konkrétní reakci ubývá.

Termogravimetrie jako taková může být prováděna v různých atmosférických podmínkách, od termogravimetrie za běžného atmosférického tlaku, ale s přítomností různých přídavných plynů, až po termogravimetrii za vysokého tlaku nebo za vakua [40, 41].

#### *1.5.5 UV/Vis spektrometrie*

Základem viditelné a ultrafialové spektrometrie je absorpce ultrafialového a viditelného záření (200 až 1000 nm) zředěnými roztoky molekul. Při absorpci dochází k excitaci valenčních elektronů, které jsou součástí molekulových orbitalů. Proto molekulová absorpční spektra v ultrafialové a viditelné oblasti jsou svou podstatou elektronová spektra.

Patří mezi nejstarší fyzikálně-chemické metody. Tato metoda vyniká přesností, rychlostí a citlivostí. Pomocí UV/Vis spektrometrie lze identifikovat neznámé látky (v kombinaci s ostatními spektroskopickými metodami) a stanovit koncentraci známých látek.

Huminové látky obsahují chromofory, což jsou funkční skupiny obsahující elektrony, převážně aromatické kruhy odlišně substituované různými typy funkčních skupin včetně fenolů, karboxylových kyselin atd., které mohou absorbovat elektromagnetické záření o určité vlnové délce. HL mají vysokou schopnost absorpce v UV/Vis oblasti, proto můžeme použít elektronová absorpční spektra pro charakterizaci těchto (bio)koloidních látek, a díky tomu

přibližně určit chemickou strukturu a odhadnout relativní míru substituce aromatického jádra kyslík obsahujícími funkčními skupinami ( $-\text{COOH}$ ,  $-\text{OH}$ ,  $-\text{OR}$  atd.) [13, 42, 43].

Z naměřených absorpčních spekter HL lze získat tzv. absorpční koeficienty, které jsou definovány jako poměry absorbancí při vhodně zvolených vlnových délkách. Díky nim získáváme informace o huminových látkách. Například poměr  $E_2/E_3$  získaný z absorbancí při vlnových délkách 250 a 365 nm, se často používá jako ukazatel humifikace a molekulové hmotnosti HL. Nižší hodnoty poměru  $E_2/E_3$  naznačují přítomnost struktur s vyšší molekulovou hmotností a aromaticitou. Poměr  $E_4/E_6$  je znám jako index humifikace. Tento absorpční koeficient je definován jako poměr absorbancí při vlnových délkách 465 a 665 nm [44].

Absorpční koeficient  $E_{\text{ET}}/E_{\text{Bz}}$  je definován jako poměr absorbance tzv. pásu substituentů přenosu náboje (253 nm) a benzoidního pásu, který je definován v oblasti vlnových délek 203–230 nm. Tento poměr slouží pro odhad polárních funkčních skupin ( $-\text{COOH}$ ,  $-\text{OH}$ , atd.) [44].

## 2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

Huminové látky jsou dlouho považovány za komplexní agregáty odvozených molekul z degradované vegetace v půdě a sedimentech. Jako takové představují výzvu pro všechny zájemce o vymezení jejich strukturálního složení. V průběhu let bylo dosaženo mnoho pokroků ve strukturálním pojetí jejich molekulární organizace a to díky novým technikám, které slouží k analýze složitých organických molekul [45].

Ma & Green [46] se ve své práci zabývali studiem a charakterizací organických frakcí, které byly izolovány z komerční HK Acros Organics. Jednotlivé organické frakce byly získány z FK, která byla izolována z komerční HK při hodnotě pH extrakčního činidla  $\approx 2$ . Frakcionace vzorku FK byla realizována pomocí chromatografie na tenké vrstvě, kdy jako eluční činidlo byla použita směs methanolu a ethylacetátu v objemovém poměru 2:1. Vyvíjení jednotlivých zón obsahujících organické frakce bylo ukončeno po uplynutí 50 min. Tímto způsobem bylo získáno celkem osm organických frakcí, z nichž tři byly detekovány vizuálně a ostatní se jevíly jako bezbarvé. K přesné lokalizaci jednotlivých bezbarvých organických frakcí na TLC destičce tzn. poloh příslušných zón byla použita rtuťová výbojka s maximem zářivého toku při 350–500 nm. Organické frakce byly desorbovány z povrchu silikagelu pomocí MeOH o čistotě odpovídající spektrometrickým stanovením. Organické frakce byly v této odborné práci charakterizovány pomocí UV/Vis a fluorescenční spektrometrie. Mimo jiné byly vypočteny retardační faktory  $R_f$  a procentuální obsah jednotlivých organických frakcí. Nejvíce byly ve vzorku FK zastoupeny organické frakce jejichž retardační faktory byly 0 (místo nanesení vzorku) a 0,69. Na základě vyhodnocení EEM fluorescenčních spekter se autorům podařilo zjistit, že organická frakce A2 s hodnotou  $R_f=0$  obsahuje výhradně fluorofory, které jsou v literatuře označovány jako humic-like. Tato fluorescenční maxima byla lokalizována v oblasti vlnových délek emisní a excitační osy ( $\lambda_{ex}/\lambda_{em}$ ) 435–465/519–533 nm. Druhá hmotnostně nejvíce zastoupená organická frakce byla charakterizována přítomností fluoroforů, které odpovídají fluorescenčním maximům fulvic-like a marine-like. Výše zmíněná fluorescenční maxima byla v EEM spektru lokalizována v oblasti vlnových délek 240–260/400–450 nm a 290–315/370–410 nm. Dále se autorům podařilo zjistit, že mobilnější organické frakce tzn. hodnota  $R_f$  v rozmezí 0,06–0,84 jsou převážně charakterizovány fluorofory, jejichž pozice je v EEM spektrech dána vlnovými délkami excitační a emisní osy 274–281/314–316 nm. Toto fluorescenční maximum je v literatuře označováno jako tyrosin-like a má původ v doposud nehumifikované organické hmotě, která je v přímé souvislosti se sloučeninami mikrobiálního původu. Na základě provedené literární rešerše se autoři pokusili predikovat jednotlivé organické sloučeniny v analyzovaných frakcích. Podle autorů by se mohlo jednat v případě nejméně mobilní frakce A2 o sloučeniny, které mají svůj původ v látkách jako je riboflavin tetrabutyrát, kyselina pulvinová, bilirubin, chinizarin, kyselina xerokomová, FMN a FAD. Za specifickou fluorescenci domény marine-like jsou pravděpodobně odpovědné sloučeniny jako je 7-hydroxy-6-methoxy-3-methylchromon, 3-hydroxykumarin, 3-aminobenzoová kyselina, 4-hydroxycynamová kyselina, gallová kyselina, pyridoxin a nystatin. Naproti tomu fulvic-like fluorofory jsou převážně tvořeny sloučeninami bifenylového typu, 5 $\alpha$ -androstan-3-on, TMPO, 2-aminobenzoovou kyselinou a kyselinou salicylovou. Dále autoři ve své práci uvádějí, že fluorescenční maximum označované jako tyrosin-like může mít spojitost nejen s tyrosinem, ale i např. s taniny.



Mirave & Orioli [47] se ve své práci zabývali studiem mobility frakcí HL v půdním profilu. Za tímto účelem byla vybrána typická argentinská půda s obsahem organických látek 5,5 hm. %. HK byly izolovány z půdního horizontu A1 (svrchní humózní horizont), jehož půdní reakce byla dle klasifikace FAO mírně kyselá. K samotné izolaci HK byla autory použita standardní metoda navržená mezinárodní společností pro výzkum huminových látek IHSS. K získání nízkomolekulární ( $\overline{M}_w \leq 10^4 Da$ ), středněmolekulární ( $10^4 \leq \overline{M}_w \leq 10^5 Da$ ) a vysokomolekulární ( $\overline{M}_w \geq 10^5 Da$ ) frakce HK byl zásaditý roztok podroben ultrafiltraci přes membránový filtr o příslušných velikostech pórů. Po dialýze byly příslušné roztoky vymrazeny a lyofilizovány. Frakcionace na tenké vrstvě byla v této práci nahrazena pomocí ultrafiltrace roztoku HK. Jednotlivé frakce HK byly charakterizovány pomocí absorpčního koeficientu  $E_4/E_6$ , který je definován jako poměr absorbancí při 465 nm a 665 nm. Dále byly organické frakce podrobeny charakterizaci pomocí infračervené spektrometrie s Fourierovou transformací. A v neposlední řadě byly vzorky studovány pomocí isotachoforézy. Autoři v této práci uvádějí, že absorpční koeficient  $E_4/E_6$  je silně vázán na hodnotu střední molekulové hmotnosti, kdy se zvyšující se hodnotou  $\overline{M}_w$  klesá absorpční koeficient  $E_4/E_6$  s poměrně významnou hodnotou směrnice lineární regrese. Pomocí FTIR analýzy bylo zjištěno, že obsah karboxylových funkčních skupin, jejichž specifická absorpce je lokalizována při 1720–1700  $cm^{-1}$ , poměrně dobře koreluje s hodnotou střední molekulové hmotnosti HK. Pomocí isotachoforézy bylo zjištěno, že středně a nízkomolekulární frakce jsou charakterizovány vysokou mobilitou při pH 7–10, a tudíž může docházet v půdním ekosystému k ochuzování půdního roztoku o tyto organické frakce.

Khairy [48] se ve své práci zabýval studiem obsahu jednotlivých frakcí huminových kyselin pomocí chromatografie na tenké vrstvě (TLC). V této práci bylo studováno sedm vzorků přírodních HK a jedna syntetická HK, která byla připravena autooxidací hydrochinonu při pH 14. Přírodní HK byly extrahovány z hnědého uhlí, dvou svrchních horizontů půdy Erica-Podzol a silně humifikované rašeliny, která je těžena v blízkosti jezera Dümmer v severní části Spolkové republiky Německo. Vzorky HK byly rozpuštěny v dimethylformidu (DMF) o koncentraci 5  $mg \cdot ml^{-1}$ . Po úplném rozpuštění HK byly vzorky nanášeny na TLC destičku s fluorescenčním indikátorem F254 nm. Vzorky HK byly frakcionovány pomocí roztoku hydroxidu amonného a n-propanolu o koncentraci mobilní fáze (70:30 obj. %). Všechny vzorky HK obsahovaly tři frakce, jejichž obsah byl silně vázán na použité přírodní matrici a na metodě izolace HK resp. pH extrakčního činidla. Huminová kyselina izolovaná z hnědého uhlí byla charakterizována nejvyšším obsahem frakce 2 a 3. Naproti tomu HK izolované z půdních horizontů A a B se vyznačovaly velmi podobnými množstvími jednotlivých frakcí, jejichž poloměry frakcionačních zón se nacházely v rozmezí 3,1–3,4 mm. Dále autor uvádí, že syntetická HK byla charakterizována rovněž třemi frakcemi, avšak jejich difference v obsahu byla velmi malá. Mimo jiné autor uvádí, že tento vzorek nebyl rozdělen na jednotlivé zóny, ale spíše tvořil jediný pás na sebe navazujících frakcí, přičemž bylo obtížné stanovit hranice mezi jednotlivými frakcemi f1–f3.

José M. Andrés a Clemente Romero [49] studovali surové a methylované fulvinové kyseliny z lignitu, které byly podrobeny tenkovrstvé chromatografii na silikagelu za použití simplexní metody k optimalizaci analytického složení eluentu. Uhlí, ze kterého byly získané FK, bylo extrahováno 0,5 M NaOH. Extrakt byl okyselen na pH  $\approx 1$ , při kterém byly vysráženy huminové kyseliny. Zbývající roztok byl koncentrován a z čistých, rozpuštěných FK byly odstraněny sodné ionty. Elementární analýza FK byla: C 48,8 hm. %, H 3,8 hm. %, O 47,4 hm. %.

N 0,9 hm. %, O 46,5 hm. %, obsah kyselých funkčních skupin byl 6,75 mEq·g<sup>-1</sup> COOH, 5,16 mEq·g<sup>-1</sup> fenolických –OH a 6,28 mEq·g<sup>-1</sup> alifatického –OH. FK byly methylovány pomocí tří po sobě jdoucích kroků dimethylsíranem a uhličitánem draselným v butanolu. Přebytek činidla byl hydrolyzován zředěným roztokem HCl, organická fáze obsahující FAM byla extrahována vodou do odstranění anorganických solí, následně bylo rozpouštědlo odpařeno ve vakuu. Elementární složení FAM bylo: C 56,4 hm. %, H 5,8 hm. %, N 0,7 hm. %, O 37,1 hm. %. Po třicetiminutovém sušení silikagelových destiček byl na ně nanesen vzorek a destičky byly umístěny do eluční směsi, kde byly ponechány do dosažení 10 cm od čela aplikace. Během následného sušení a skenování paprskem denzitometru bylo zjištěno vyvinutí dvou frakcí na každé desce. Přípravný TLC byl rozdělen do dvaceti sekcí, každá 0,5 cm široká, silikagel z každé sekce byl odstraněn. U FA každá oddělená sekce byla smíchána s vodou a filtrována k odstranění silikagelu, po přidání KBr k filtrátu byl roztok odpařen ve vakuu. Výsledný prášek byl sušen a slisován do formy KBr tablety. Každá sekce FAM byla umístěna do malé trubky společně s matricí KBr, po přidání acetonu došlo k odpaření a vytvoření koncentrace vzorku v horní části matrice, po kterém došlo k sušení a lisování KBr tablety. Autoři uvedli, že kvantitativní měření ploch pomocí denzitometru bylo obtížné kvůli přítomnosti neizolovaných skvrn, ale spíše souvislého profilu. Nejlepší složení optimální zóny pro provedení preparativní TLC FA bylo 0,6 obj. % toluenu, 51,4 obj. % acetonu, 21,7 obj. % n-butanolu a 20,3 obj. % kyseliny octové. Nejvíce reprodukovatelné složení optimální zóny pro FAM bylo 55,6 obj. % n-hexanu, 3,8 obj. % toluenu, 34,5 obj. % n-butanolu. Získané výsledky o složení FA ukazují, že hlavní složkou jsou polysacharidové látky. Frakcionace se hůře prováděla na FAM, kvůli snížené polaritě, která brání dobrému oddělení složek.

Woelki a kol. [50] se ve své práci zabývali HPLC frakcionací HK extrahovaných z půdy a ze sodných solí HK, jejich cílem bylo dosáhnout zlepšené separace HL, při jejich maximálním obnovení, pro další spektroskopickou analýzu a pro zkoumání strukturní dynamiky jednotlivých frakcí huminových látek. V této práci bylo použito devět vzorků HK s různou kontaminací, dva vzorky byly extrahovány poblíž Lipska, sedm bylo extrahováno z půdy v určitých vzdálenostech od řeky nacházející se v regionu Bitterfeld. Pro HPLC frakcionaci byly vzorky sodných solí HK rozpuštěny ve vodě, extrahované HK byly rozpuštěny v 0,01 M NaOH pomocí ultrazvukové lázně. Autorům se podařilo zjistit, že obnova sodné soli HK v závislosti na počtu po sobě jdoucích chromatografických separací roste z 87,8–91,4 %. Během procesu se uplatňuje postup čištění, který byl během série po sobě jdoucích měření uplatněn třikrát. Během procesu extrakce z půdy byly HL filtrovány přes 0,45 μm membránový filtr. Díky vynikajícím výsledkům by metoda HPLC mohla být používána pro monitorování životního prostředí. Pro zkoumání strukturní dynamiky v půdních frakcích byly všechny vzorky odděleny gradientovým programem (acetonitril:voda), všechny vzorky obsahovaly nejméně pět frakcí bez ohledu na původ nebo kontaminaci HL. Pomocí reverzibilní chromatografie byly potvrzeny konformační studie proteinů, které odhalily reverzibilní změny v sekundární struktuře. Bylo prokázáno, že může hydrofobní matrice spolu s nepolárním rozpouštědlem denaturovat protein. Hydrofobicita huminových molekul se odpovídajícím způsobem zvyšuje a separace HL pomocí RS chromatografie je ovlivněna změnou hydrofobicity v důsledku narušení terciální struktury.

## 3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 3.1 Použité chemikálie

- vzorek huminové kyseliny (HK) a fulvinové kyseliny (FK) – standard IHSS *Pahokee Peat*;
- methanol p.a., výrobce Sigma Aldrich;
- ethylacetát, výrobce Sigma Aldrich;
- TLC Al folie, výrobce Sigma Aldrich;
- 0,1 M NaOH, výrobce Sigma Aldrich;
- $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , výrobce Sigma Aldrich.

### 3.2 Použité přístroje

- váhy,  $d=0,01$  g, (MERCI, s.r.o.);
- elementární analýza CHNS/O – Euro Vector EA 3000;
- termogravimetrický analyzátor TG Q5000, TA Instruments;
- Hitachi U3900H – UV/Vis spektrometr;
- pozorovací box s UV zdrojem záření;
- Nicolet iS50, Thermo Fisher Scientific, Inc – FTIR spektrometr;
- Fluorescenční spektrometr (steady-state) Edinburgh Instruments FS5.

### 3.3 Základní fyzikálně-chemická charakterizace

Všechny vzorky huminových a fulvinových kyselin byly charakterizovány metodou elementární analýzy (EA), termogravimetrické analýzy (TGA), molekulovou absorpční spektrometrií v ultrafialové a viditelné oblasti záření (UV/Vis) a infračervenou spektrometrií s Fourierovou transformací (FTIR), díky kterým bylo možné charakterizovat strukturu a vlastnosti jednotlivých HL.

#### 3.3.1 Elementární analýza

Pomocí elementárního analyzátoru EA 3000 bylo zjištěno prvkové složení vzorků huminových a fulvinových kyselin. Kalibrace elementárního analyzátoru byla provedena pomocí standardu 4-amino-benzen-sulfonamidu. Navážené vzorky byly spáleny v kyslíkové atmosféře při pracovní teplotě reaktoru  $980\text{ }^\circ\text{C}$ . Elementární složení bylo zjištěno pomocí vyhodnocovacího programu *Callidus*, verze 5.1. Získané elementární složení bylo přepočteno na atomová procenta (*at. %*).

#### 3.3.2 Termogravimetrická analýza

Termogravimetrická analýza byla provedena pro všechny vzorky, tj. Pahokee Peat HK a FK. Byl použit přístroj TA Instruments TGA Q5000, jehož výsledky měření byly zaznamenávány počítačovým softwarem. Vzorky HK a FK byly spáleny z laboratorní teploty na konečnou teplotu  $800\text{ }^\circ\text{C}$  v atmosféře vzduchu s průtokem  $50\text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$  a s rychlostí ohřevu pece  $10\text{ }^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ . Z naměřených dat byl stanoven obsah nespalitelného podílu (tj. popela) a celkové vlhkosti.

### 3.3.3 UV/Vis spektrometrie

Podstatou UV/Vis spektroskopie je absorpce ultrafialového a viditelného záření, tedy oblasti 200 až 1000 nm. Tato metoda byla vybrána k fyzikálně-chemické charakterizaci vzorků HK a FK. Na základě provedené literární rešerše byly vybrány následující absorpční koeficienty:  $E_2/E_4$ ,  $E_4/E_6$  a  $E_{ET}/E_{Bz}$ , což jsou poměry absorbancí při vhodně zvolených vlnových délkách. Poměr  $E_4/E_6$  získaný z absorbancí při vlnových délkách 465 až 665 nm, se nazývá humifikační index. Byly připraveny roztoky HL o koncentraci 10 a 50 mg·l<sup>-1</sup> ve standardním fosfátovém pufru o hodnotě pH 7, směs Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O a NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O v poměru 1:1,79.

Takto připravené roztoky HK a FK byly proměřeny na UV/Vis spektrometru Hitachi U3900H v rozmezí vlnových délek 200–800 nm v křemenné kyvetě SUPRASIL<sup>®</sup>, s optickou dráhou 1 cm.

### 3.3.4 FTIR spektrometrie

Infračervená spektrometrie s Fourierovou transformací byla v této bakalářské práci použita k základnímu screeningu těchto biokoloidních látek (informace o struktuře, povaze, obsahu jednotlivých funkčních skupin, ať už máme na mysli reaktivní funkční skupiny či základní stavební jednotky HL). DRIFT spektra vzorků HL byla naměřena na FTIR spektrometru Nicolet iS50. Všechna infračervená spektra HL byla změřena v rozmezí vlnočtů 4000–400 cm<sup>-1</sup> s rozlišením 8 cm<sup>-1</sup> a s celkovým počtem akumulovaných skenů 512. Dále je nutné podotknout, že metoda měření DRIFT spekter nezpůsobuje de-protonaci kyselých funkčních skupin HL, jak je tomu v případě použití transmisní techniky, kdy vzorek je lisován při vysokých tlacích (≈ 80 kN·cm<sup>-1</sup>) ve směsi s KBr.

## 3.4 Postup přípravy vzorků organických frakcí HL pro TLC chromatografii

Ze sypkého vzorku HK bylo nejprve potřeba připravit roztok, který by bylo možné nanášet na TLC fólii. Vzorek HK byl rozpuštěn v 1 ml methanolu, přičemž vznikl tmavě hnědý roztok, který byl aplikován na TLC fólii pomocí skleněné kapiláry. Po odpaření methanolu (přes noc), se TLC fólie nechala vyvíjet ve skleněné nádobě, na jejímž dně byl filtrační papír nasáklý ve směsi methanolu a ethylacetátu (2:1). Chromatografický záznam byl vyvíjen po dobu 50 min. Po této době se TLC fólie nechala uschnout. Pod UV lampou bylo pozorováno sedm zón, které odpovídají jednotlivým studovaným organickým frakcím (pojmenovány HKEA – HKEG). Každá skupina byla individuálně odstraněna z destičky a extrahována pomocí methanolu pro UV/Vis spektrometrii. Celá skupina spektra byla měřena v methanolu. Stejný postup byl aplikován u FK. Pod UV lampou bylo pozorováno v porovnání s HK pouze 5 zón, které odpovídají jednotlivým rozděleným organickým frakcím (tyto frakce byly označeny jako FKEA – FKEE).

## 3.5 UV/Vis spektrometrie organických frakcí HL

Z připravených roztoků organických frakcí HL byly naměřeny jejich UV/Vis spektra, ze kterých byly následně vypočteny absorpční koeficienty  $E_{ET}/E_{Bz}$  a  $E_2/E_3$ . Absorpční koeficient  $E_2/E_3$  je definován jako poměr absorbancí při 250 a 365 nm. Měření UV/Vis

spekter těchto vzorků probíhalo při stejném experimentálním nastavení UV/Vis spektrometru Hitachi U3900H (viz. podkapitola 3.3.3)

### 3.6 Fluorescenční spektrometrie organických frakcí HL

Podstatná část této bakalářské práce je věnována studiu organických frakcí izolovaných ze standardů HL *Pahokee Peat* pomocí ustálené (steady-state) fluorescenční spektrometrie. Organické frakce byly změřeny na steady-state fluorescenčním spektrometru Edinburgh Instruments FS5® s nastavenou šířkou štěrbin excitačního a emisního monochromátoru 4 nm v křemenné kyvetě SUPRASIL® pro fluorescenční spektrometrii s optickou dráhou 1 cm. Emisní fluorescenční spektra roztoků organických frakcí připravených podle postupu viz. podkapitola 3.4 byla změřena v rozsahu vlnových délek 300–600 nm při konstantní vlnové délce excitačního záření 280 nm.

Fluorescenční koeficient podle Zsolnaye (HIX) [51] byl získán z poměru ploch emisního spektra organické frakce, kde příslušné plochy  $A_1$  a  $A_4$  jsou vypočteny jako plošné integrály v rozmezí vlnových délek 435–480 nm (plocha  $A_4$ ) a 300–345 nm (plocha  $A_1$ ). K tomuto účelu byla použita emisní fluorescenční spektra připravených organických frakcí.

Hodnoty fluorescenčních intenzit ( $I_F$ ) byly korigovány pomocí matematického aparátu navrženého Lakowiczem [52] k odstranění IFE prvního a druhého druhu organických frakcí HL.

## 4 VÝSLEDKY A DISKUZE

### 4.1 Elementární analýza standardů HL Pahokee Peat

Standardy HL, které byly použity v této bakalářské práci k frakcionaci organické hmoty pomocí chromatografie na tenké vrstvě (TLC), byly podrobeny základní fyzikálně-chemické charakterizaci pomocí elementární a termogravimetrické analýzy. Výsledky obsahu biogenních prvků, sorbované vlhkosti a obsahu nespalitelného podílu, tj. popela jsou uvedeny v Tabulce 2.

Tabulka 2: Elementární složení standardů HL Pahokee Peat v at. %, atomové poměry H/C a O/C, obsah popela a celkové vlhkosti

Vzorek	Elementární složení v at. %				H/C	O/C	popel (hm. %)	vlhkost (hm. %)
	C	H	N	O				
Pahokee Peat HK	43,23	42,16	1,95	12,66	0,98	0,29	1,15	6,95
Pahokee Peat FK	35,40	42,50	1,35	20,76	1,20	0,59	6,89	9,39

Dříve, než se budeme věnovat diskuzi dosažených výsledků je na tomto místě nutné podotknout, že elementární složení standardů HL je v Tabulce 2 uvedeno v atomových procentech (at. %). A to z důvodu, že při použití hmotnostních procent (hm. %) by obsah vodíku byl velmi podhodnocen vlivem jeho nízké atomové hmotnosti.

Jak je z Tabulky 2 zřejmé, standardy HL jsou převážně tvořeny uhlíkem, vodíkem a kyslíkem. Naproti tomu z ostatních sledovaných prvků byl dusík přítomen v minoritním množství a síra nebyla ve vzorcích detekována vůbec. Absence síry ve vzorcích HL zejména HK by mohla být vysvětlena tím, že v této bakalářské práci byla použita GC kolona, která umožňuje stanovení tohoto biogenního prvku v minimální hmotnostní koncentraci 0,5 hm. %. Z naměřených výsledků je zřejmé, že HK Pahokee Peat je v porovnání s FK Pahokee Peat tvořená vyšším obsahem kyslíku, který je převážně vázán s obsahem kyselých funkčních skupin, jako jsou karboxylové a –OH fenolické skupiny, rovněž přicházejí v úvahu i alkoxy skupiny tzn. –OCH<sub>3</sub>. Rovněž je na tomto místě nutné podotknout, že mnoho autorů dává ve spojitost obsah dusíku s mikrobiální aktivitou během humifikačního procesu. Obsah vodíku byl v případě těchto HL prakticky totožný, jelikož difference mezi nimi byla pouhých 0,34 at. %. Z výsledků uvedených v Tabulce 2 je zřejmé, že vlhkost HL se pohybovala v rozmezí 7,0–9,4 hm. %. Vyšší vlhkost FK je pravděpodobně způsobena vyšším obsahem polárních funkčních skupin, které hrají klíčovou roli v sorpci vzdušné vlhkosti na povrchu vzorku. Z porovnání použitých standardů IHSS je zřejmé, že HK vykazovala vyšší čistotu, jejíž obsah nespalitelného podílu byl stanoven na 1,2 hm. %. Obecně můžeme říci, že obsah anorganických příměsí, tj. popela je závislý na zvolených purifikačních krocích během izolace HL z přírodní matrice. Toho si můžeme povšimnout v případě standardu FK, který nebyl přečištěn pomocí směsi roztoků HCl-HF, jelikož FK jsou dle standardního postupu izolace

HL dle mezinárodní společnosti pro výzkum huminových látek IHSS izolovány pomocí hydrofobních pryskyřic XAD-8 a DAX-8.

Z vypočtených hodnot elementárního složení byly získány atomové poměry H/C a O/C, které jsou dobrými indikátory fyzikálně-chemických vlastností HL jako je stupeň aromaticity, obsahu kyselých funkčních skupin a hydrogenace. Získané atomové poměry jsou sumarizovány v Tabulce 2. Jak je z hodnot atomového poměru H/C zřejmé, standard HK v porovnání se svojí fulvinickou frakcí vykazoval nižší hodnotou tohoto atomového poměru, který je indikátorem stupně aromaticity a míry dehydrogenace. Z tohoto důvodu můžeme konstatovat, že studovaný standard HK je charakterizován vyšší mírou aromaticity a dehydrogenace v porovnání s FK. Dále, vysoká hodnota atomového poměru O/C v případě FK Pahokee Peat svědčí o vyšším obsahu kyslíku obsahujících funkčních skupin, kam zpravidla řadíme karboxylové, –OH fenolické, –OR alkoxylové a –O– etherové funkční skupiny. Tyto výsledky jsou v dobré shodě se závěry UV/Vis a FTIR spektrometrie.

## 4.2 UV/Vis spektrometrie standardů HL Pahokee Peat

Molekulová absorpční spektrometrie v ultrafialové a viditelné oblasti elektromagnetického záření (UV/Vis) patří mezi základní instrumentální techniky studia a charakterizace HL a DOM. K tomuto účelu byly navrženy tzv. absorpční koeficienty, které jsou definovány jako poměry absorbancí při vhodně zvolených vlnových délkách. Obecně můžeme říci, že tyto koeficienty v sobě odrážejí střední molekulovou hmotnost  $\overline{M}_w$ , aromaticitu, stupeň humifikace a míru substituce aromatických struktur kyslík obsahujícími funkčními skupinami (–COOH, –OH a –OCH<sub>3</sub>) studovaných HL a DOM. Tyto absorpční koeficienty jsou výrazně citlivé na hodnotu pH prostředí, a proto byly studované vzorky HL měřeny při konstantní hodnotě pH v prostředí fosfátového pufru o hodnotě pH ~ 7.

Vypočtené absorpční koeficienty  $E_{ET}/E_{Bz}$ ,  $E_2/E_4$ ,  $E_2/E_3$  a  $E_4/E_6$  resp.  $Q_{465/665}$  jsou uvedeny v Tab. 3.

Tabulka 3: Vypočtené hodnoty absorpčních koeficientů

Vzorek	Absorpční koeficient			
	$E_{ET}/E_{Bz}$	$E_2/E_3$	$E_2/E_4$	$E_4/E_6$
HK	0,79	2,82	6,49	5,08
FK	0,73	4,24	13,19	8,50

Z Obr. 5 (viz. kapitola Přílohy) je zřejmé, že všechna UV/Vis spektra studovaných HL byla charakterizována kvaziexponenciálním průběhem s dominantní absorbancí v oblasti UVC a UVB ultrafialového záření. Z vypočtených hodnot absorpčních koeficientů vyplývá, že studované HL jsou charakterizovány obvyklými hodnotami absorpčních indexů, které odpovídají HL izolovaných z kaustobiolitů [52]. Hodnota absorpčního koeficientu  $E_{ET}/E_{Bz}$  vzorku HK dává tušit, že tento vzorek obsahuje ve své struktuře více aromatických jednotek, které jsou substituovány kyslík obsahujícími funkčními skupinami, jako jsou karboxylové a –OH fenolické. Naproti tomu byl standard FK charakterizován nižší hodnotou tohoto absorpčního koeficientu, a proto se můžeme domnívat, že tento vzorek obsahuje více

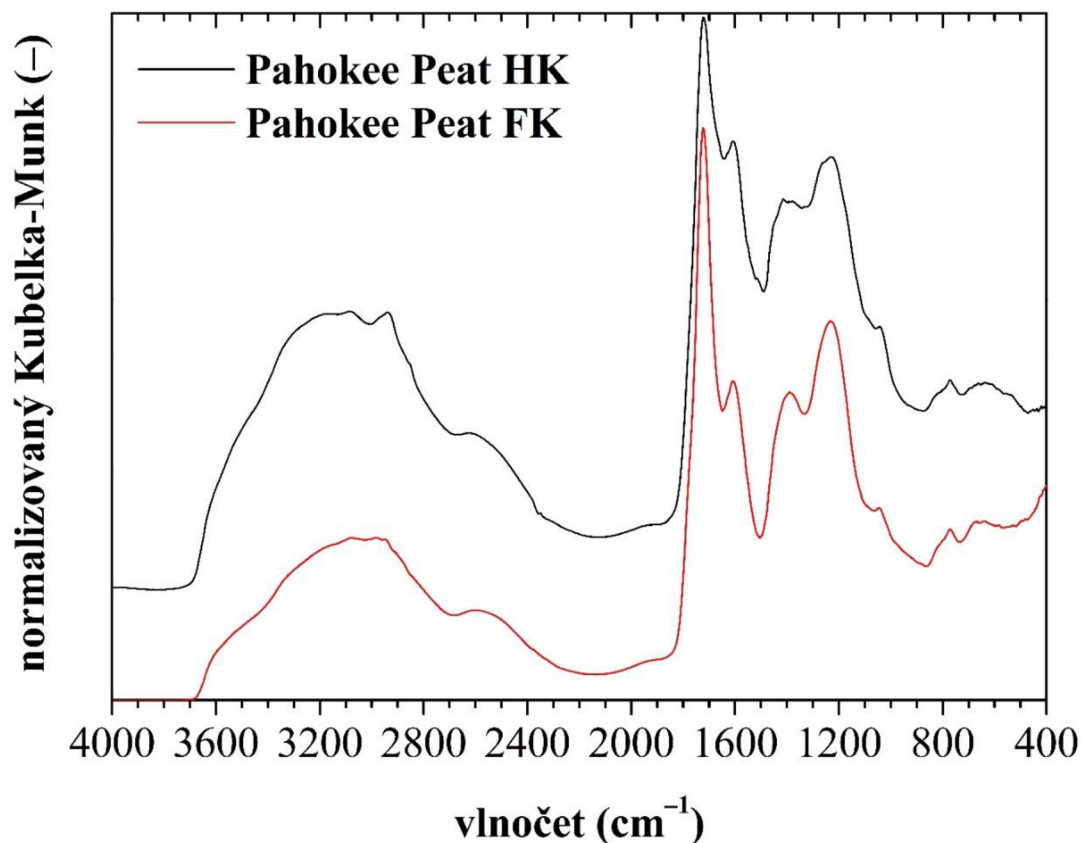
alifatických substituentů na karboxylových resp. –OH fenolických skupinách. Tento závěr je v dobré shodě s výsledky získanými pomocí infračervené spektrometrie, kde v DRIFT spektru byl lokalizován absorpční pás, který odpovídá valenční symetrické vibraci C=O vazeb v aryl-esterech (Ar–O–CH<sub>3</sub>).

Ostatní absorpční koeficienty, které jsou uvedeny v Tab. 3 jsou převážně ukazateli aromaticity, stupně humifikace a střední molekulové hmotnosti. Z vypočtených hodnot absorpčních koeficientů E<sub>2</sub>/E<sub>4</sub>, E<sub>2</sub>/E<sub>3</sub> a E<sub>4</sub>/E<sub>6</sub> je zřejmé, že vzorek standardu HK se vyznačuje vyšší aromaticitou, střední molekulovou hmotností a vyšším stupněm humifikace v porovnání s FK izolovanou ze stejné přírodní matrice. V případě, kdy je absorbance vzorku HL v rozmezí vlnových délek 500–700 nm příliš nízká, absorpční koeficient E<sub>4</sub>/E<sub>6</sub> se stává méně citlivým k strukturálním změnám těchto biokoloidních látek. Proto je vhodné použít absorpční koeficient E<sub>2</sub>/E<sub>4</sub>, který je definován jako poměr absorbancí při 265 nm a 465 nm. Toho si můžeme povšimnout v Obr. 5 v případě vzorku Pahokee Peat FK, kde se absorbance v příslušných vlnových délkách blíží limitně k nule.

### 4.3 FTIR spektrometrie standardů HL Pahokee Peat

Na Obr. 6 jsou uvedena infračervená DRIFT spektra standardů HL Pahokee Peat dodávaných společností pro výzkum huminových látek IHSS (*International Humic Substances Society*). Infračervená spektra těchto „*bio-koloidů*“ byla měřena pomocí FTIR modulu difuzní reflektance (*Diffuse Reflectance Infrared Fourier Transform Spectroscopy*), díky které nedocházelo ve vzorcích k deprotonaci, resp. dekarboxylaci kyselých funkčních skupin (–COOH a fenolické –OH), jak by k tomu pravděpodobně docházelo v případě standardně používané metody lisování KBr tablety (transmisní metoda). Podle Davise a kol. [53], dochází při lisování KBr tablety se vzorkem HL vlivem vysokých tlaků ( $p > 6 \text{ t}\cdot\text{cm}^{-2}$ ) k iontové výměně mezi vodíkovými kationy a kationem použité soli tzn. K<sup>+</sup> anebo Na<sup>+</sup>, a tudíž může docházet k nežádoucímu snížení intenzity absorpčního pásu v oblasti vlnočtů 1720–1700 cm<sup>-1</sup>, který odpovídá valenční symetrické vibraci C=O vazeb v karboxylových funkčních skupinách. DRIFT spektra jsou vyjádřena v lineárních jednotkách Kubelka–Munk, které odpovídají jednotkám absorbance ve spektru měřeného transmisní technikou.





Obrázek 6: DRIFT spektra standardů HL

Široký a intenzivní absorpční pás lokalizovaný v oblasti vlnočtů  $3500\text{--}3200\text{ cm}^{-1}$  odpovídá valenční symetrické vibraci O–H a N–H vazeb v karboxylových kyselinách, sekundárních amidech, alifatických alkoholech a fenolech. Méně intenzivní absorpční pásy lokalizované při  $2951\text{ cm}^{-1}$  a  $2940\text{ cm}^{-1}$  jsou zpravidla připisovány valenční asymetrické vibraci C–H vazeb v methylenových skupinách. Vzorek standardu FK byl charakterizován absorpčním pásem při  $2981\text{ cm}^{-1}$ , který je obvykle připisován valenční asymetrické vibraci C–H vazeb v methylových skupinách. Tento výsledek je v dobré shodě s absorpčním koeficientem  $E_{\text{ET}}/E_{\text{Bz}}$ , který byl v případě tohoto vzorku nižší v porovnání se standardem rašeliništní HK. Přítomnost  $-\text{CH}_3$  funkčních skupin byla v infračervených spektrech standardů HL potvrzena absorpčním pásem při  $1380\text{ cm}^{-1}$ , který je výhradně připisován symetrické deformační vibraci C–H vazeb v methylových skupinách. Tento vibrační mód je v odborné literatuře označován jako *deštníková vibrace*. Ostrý a velmi intenzivní absorpční pás lokalizovaný při  $1722\text{ cm}^{-1}$  odpovídá valenční symetrické vibraci C=O vazeb v karboxylových kyselinách substituovaných na aromátech. Jelikož je tento absorpční pás posunut k vyšším vlnočtům, tak přicházejí v úvahu i konstituční jednotky jako jsou aryl-estery. Tento absorpční pás je více intenzivní v případě standardu FK, a proto se můžeme domnívat, že tento vzorek obsahuje více  $-\text{COOH}$  funkčních skupin. Přítomnost karboxylových skupin byla rovněž potvrzena poměrně intenzivním a širokým absorpčním pásem při  $2623\text{ cm}^{-1}$ , který odpovídá valenční symetrické vibraci O–H---O vazeb, tvořící ve struktuře HL dimerní formy karboxylových skupin. Dále v infračervených spektrech standardů HL můžeme nalézt absorpční pás při  $1230\text{ cm}^{-1}$ , který je zpravidla přisuzován valenční symetrické vibraci C–O vazeb v karboxylových kyselinách. V infračervených DRIFT spektrech standardů HL si nelze nepovšimnout absorpčního pásu lokalizovaného v oblasti vlnočtů  $3085\text{--}3078\text{ cm}^{-1}$ , který je

výhradně přisuzován valenční symetrické vibraci C–H vazeb v aromatických jednotkách studovaných HL. Ostrý absorpční pás s proměnlivou intenzitou, jenž byl lokalizován při  $1607\text{ cm}^{-1}$ , je obvykle přisuzován valenční symetrické vibraci C=C vazeb v aromatických jednotkách HL. Tato hypotéza je rovněž potvrzena méně intenzivním absorpčním pásem při  $1515\text{ cm}^{-1}$ , který odpovídá valenční symetrické vibraci C=C vazeb v aromatických prekurzorech ligninu. Tento absorpční pás byl identifikován pouze ve vzorku HK. V případě obou standardů HL byl v jejich DRIFT spektrech identifikován absorpční pás při  $1045\text{ cm}^{-1}$ , který je připisován valenční symetrické vibraci C–O vazeb v sekundárních alkoholech.

#### 4.4 Kvalitativní vyhodnocení TLC chromatografie

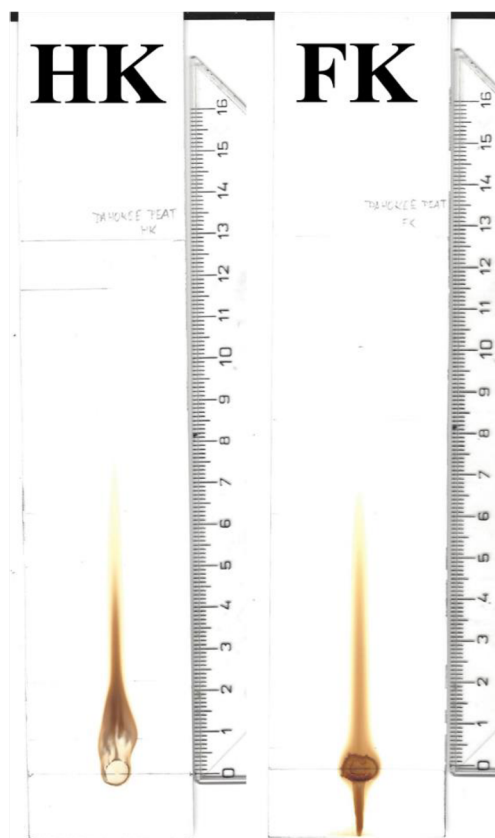
Z jednotlivých chromatografických zón pozorovaných na TLC destičce, které odpovídají organickým frakcím přítomných v HL Pahokee Peat, byly vypočteny jejich příslušné retardační faktory  $R_f$ . V případě organických frakcí, které se na chromatografické destičce jevily jako bezbarvé, byla pro jejich vizualizaci použita pozorovací komora s UV světlem (viz. Obrázek 9 v kapitole Přílohy). Vypočtené retardační faktory jsou uvedeny v Tabulce 4 a 5. Z naměřených výsledků a pozorování je zřejmé, že vzorek standardu HK v porovnání se standardem FK obsahuje takové organické frakce, které jsou silněji poutány k adsorbentu TLC destičky, kdy jejich nízká mobilita je reprezentována nízkými hodnotami retardačních faktorů. Mimo jiné si v Tabulce 4 a 5 nelze nepovšimnout, že některé frakce organických sloučenin studovaných HL mají velmi podobné hodnoty  $R_f$ . A proto se můžeme domnívat, že tyto frakce mají podobné fyzikálně-chemické vlastnosti.

*Tabulka 4: Retardační faktory organických frakcí HK*

Organické frakce	HKEA	HKEB	HKEC	HKED	HKEE	HKEF	HKEG
$R_f$	0,07	0,18	0,40	0,50	0,76	0,91	1,00

*Tabulka 5: Retardační faktory organických frakcí FK*

Organické frakce	FKEA	FKEB	FKEC	FKED	FKEE
$R_f$	0,04	0,48	0,65	0,79	1,00



Obrázek 7: TLC chromatogramy organických frakcí standardů Pahokee Peat

#### 4.5 UV/Vis spektrometrie organických frakcí HL

UV/Vis a steady-state fluorescenční spektrometrie byla v této bakalářské práci použita k výpočtu absorpčních koeficientů  $E_{ET}/E_{Bz}$ ,  $E_2/E_3$  a humifikačního indexu HIX jednotlivých organických frakcí standardu HL Pahokee Peat, které byly získány pomocí chromatografie na tenké vrstvě. Vypočtené absorpční koeficienty  $E_{ET}/E_{Bz}$ ,  $E_2/E_3$  a humifikační index HIX jsou uvedeny v Tabulce 6 a v Tabulce 7.

Tabulka 6: Vypočtené absorpční koeficienty a humifikační index pro HK

Organická frakce	Absorpční koeficienty		HIX
	$E_{ET}/E_{Bz}$	$E_2/E_3$	
HKEA	0,55	4,28	0,38
HKEB	0,73	3,90	7,64
HKEC	0,66	4,53	7,22
HKED	0,46	6,30	0,57
HKEE	0,46	5,62	0,56
HKEF	0,38	4,94	0,04
HKEG	0,27	11,50	0,03

Tabulka 7: Vypočtené absorpční koeficienty a humifikační index pro FK

Organická frakce	Absorpční koeficienty		HIX
	$E_{ET}/E_{Bz}$	$E_2/E_3$	
FKEA	0,82	5,48	27,44
FKEB	0,72	6,15	26,09
FKEC	0,34	–	0,07
FKED	0,40	5,83	0,03
FKEE	0,31	7,00	0,004

Naměřená UV/Vis spektra organických frakcí byla charakterizována kvaziexponenciálním průběhem, který je příznačný pro rozpuštěnou organickou hmotu DOM (viz. Obrázek 10 Přílohy). Jak je patrné z výsledků uvedených v Tabulce 6 a 7, organické frakce vykazují typické hodnoty absorpčních koeficientů DOM izolovaných z kaustobiolitických přírodních matric (rašeliny, lignitu a leonarditu). Z vypočteného absorpčního koeficientu  $E_{ET}/E_{Bz}$  je zřejmé, že organické frakce HL (HKEB, HKEC, FKEA, FKEB) jsou charakterizovány vyšší mírou substituce aromatického jádra kyslík obsahujícími funkčními skupinami jako jsou –COOH, –OH a –OR. Jinými slovy byly tyto organické frakce charakterizovány vyšší polaritou v porovnání s organickými frakcemi, které byly eluovány na TLC nejdříve resp. nejrychleji. Dále si v Tabulce 6 a 7 můžeme povšimnout, že míra substituce aromatických struktur polárními funkčními skupinami klesala s rostoucím retardačním faktorem  $R_f$  jednotlivých organických frakcí. V případě organických frakcí HKEF, HKEG, FKED a FKEE mohou nízké hodnoty tohoto absorpčního koeficientu také znamenat vyšší substituci aromatických struktur nepolárními skupinami, jako jsou zejména –CH<sub>3</sub> případně alifatickými řetězci, které mají pravděpodobně původ v látkách jako je bitumen či lipidických stavebních jednotek HL.

V případě organických frakcí izolovaných z HK se absorpční koeficient  $E_2/E_3$  pohyboval v rozmezí 3,9–11,5. Naproti tomu organické frakce izolované z FK byly charakterizovány užším rozpětím hodnot tohoto absorpčního koeficientu, to znamená i užší distribucí střední molekulové hmotnosti  $\overline{M}_w$ . Z výsledků uvedených v Tabulce 6 a 7 je patrné, že nejvyšší molekulovou hmotností a aromaticitou byly charakterizovány organické frakce HKEA, HKEB a FKEA, které se nacházely v blízkosti startovní čáry TLC chromatogramu. Z tohoto důvodu se můžeme domnívat, že vyšší molekulová hmotnost a aromaticita organických frakcí je v přímé souvislosti s obsahem polárních funkčních skupin. Naproti tomu nejnižším stupněm aromaticity a střední molekulové hmotnosti se vyznačovaly poslední frakce, které byly lokalizovány v blízkosti čela TLC destičky. Obecně můžeme konstatovat, že vzorek HK byl charakterizován vyšší polydisperzitou konstitučních jednotek supramolekuly.

Humifikační index HIX je definován jako poměr dvou ploch pod emisním spektrem při vhodně zvolených regionech vlnových délek. Tento index je velmi dobrým indikátorem odhadu aromaticity DOM. Z vypočtených hodnot humifikačního indexu HIX je patrné, že aromaticita organických frakcí izolovaných z HL Pahokee Peat se snižovala s rostoucím retardačním faktorem  $R_f$ . Tyto závěry jsou v dobré shodě s výsledky pořízenými pomocí

steady-state fluorescenční spektrometrie, ve kterých byly analyzovány fluorofory huminového a nehuminového charakteru (tyrosin-like a tryptofan-like).

#### 4.6 Fluorescenční spektrometrie organických frakcí HL

V dnešní době je ustálená fluorescenční spektrometrie (*steady-state*) považována za jednu z nepostradatelných instrumentálních technik v oblasti studia a charakterizace HL, DOM, hDOM aj. Tato spektrometrická technika nám poskytuje mnoho cenných informací o původu, genezi, obsahu jednotlivých strukturních jednotek, množství substituentů uplatňujících elektron-donorní a elektron-akceptorní efekt, „bio-molekulární“ heterogenitu, stupeň aromaticity, resp. kondenzace aromatického jádra HL.

Veškeré organické frakce HL použité v této bakalářské práci byly podrobeny základní charakterizaci pomocí ustálené fluorescenční spektrometrie, resp. měření jejich emisních fluorescenčních spekter. Rovněž je na tomto místě nutné podotknout, že všechna naměřená fluorescenční spektra resp. jejich intenzity fluorescence byly korigovány pomocí matematického aparátu navrženého Lakowiczem [51], a to z důvodu silného vnitřního filtračního efektu roztoků organických frakcí HL. Hlavními důvody proč by měl být vnitřní filtrační efekt prvního a druhého druhu korigován je fakt, že IFE (*Inner filter effect*) ovlivňuje nejen výslednou intenzitu fluorescence ( $I_F$ ), ale i vypočtené hodnoty fluorescenčních indexů např. HIX a v neposlední řadě zejména polohu fluorescenčních maxim v emisních spektrech. Opomenutím tohoto fenoménu bychom se dopustili v případě vyhodnocení a následné diskuzi experimentálních dat závažných zkreslení či chybných interpretací. Vnitřní filtrační efekt byl v této bakalářské práci korigován podle Lakowicze, jehož matematický zápis je definován rovnicí:

$$F_{corr} = F_{obs} \times 10^{0,5(A_{ex}+A_{em})}, \quad (1)$$

kde  $F_{obs}$  je experimentálně zjištěná intenzita fluorescence,  $A_{ex}$  je absorbance při excitační vlnové délce v našem případě  $A_{ex}=\lambda_{280\text{ nm}}$ ,  $A_{em}$  je absorbance při emisní vlnové délce v našem případě je dána rozmezím  $A_{em}=\lambda_{300-600\text{ nm}}$  a  $F_{corr}$  je korigovaná intenzita fluorescence.

Jednou z fundamentálních metod, jak mohou být HL a DOM charakterizovány, je měření jejich emisních spekter. Po korekci IFE byly z naměřených emisních spekter organických frakcí odečteny polohy fluorescenčních maxim a jejich příslušných intenzit  $I_F$  (max), které jsou sumarizovány v Tab. 8 a v Tab. 9.

Tabulka 8: Polohy a intenzity příslušných maxim HK

Organická frakce	fulvic-like		marine-like		tryptofan-like		tyrosin-like	
	$\lambda$ (nm)	I <sub>F</sub> (CPS)	$\lambda$ (nm)	I <sub>F</sub> (CPS)	$\lambda$ (nm)	I <sub>F</sub> (CPS)	$\lambda$ (nm)	I <sub>F</sub> (CPS)
HKEA	518	0,20	–	–	–	–	309	1,00
HKEB	520	1,00	–	–	–	–	308	0,20
HKEC	504	1,00	–	–	–	–	308	0,46
HKED	458	0,14	–	–	–	–	309	1,00
HKEE	–	–	408	0,21	–	–	309	1,00
HKEF	–	–	–	–	324	0,73	309	1,00
HKEG	–	–	–	–	323	0,70	309	1,00

Tabulka 9: Polohy a intenzity příslušných maxim FK

Organická frakce	fulvic-like		marine-like		tryptofan-like		tyrosin-like	
	$\lambda$ (nm)	I <sub>F</sub> (CPS)	$\lambda$ (nm)	I <sub>F</sub> (CPS)	$\lambda$ (nm)	I <sub>F</sub> (CPS)	$\lambda$ (nm)	I <sub>F</sub> (CPS)
FKEA	494	1,00	–	–	–	–	308	0,10
FKEB	470	1,00	–	–	–	–	308	0,10
FKEC	–	–	409	0,10	–	–	308	1,00
FKED	–	–	–	–	325	0,66	308	1,00
FKEE	–	–	–	–	324	0,75	308	1,00

Jak je zřejmé z výsledků uvedených v Tabulce 8 a 9, studované vzorky vykazují typická fluorescenční maxima HL a DOM izolovaných z terestriálních přírodních matric. V tomto ohledu máme především na mysli ty fluorofory, které se nacházejí v oblasti vyšších vlnových délek emise (400–500 nm). Do této skupiny fluorescenčních maxim řadíme fluorofory, které jsou v přímé souvislosti s konstitučními jednotkami HL, jedná se o *fulvic-like* a *marine-like*, který je některými autory považován za prekurzor fluoroforu *humic-like*. Dále si v Tabulce 8 a 9, resp. Obrázku. 11 a, b (viz. kapitola Přílohy) nelze nepovšimnout, že všechny organické frakce HL (HK a FK) obsahují i fluorofory ne-huminového charakteru tzn. *tyrosin-like* a *tryptofan-like*. Tyto fluorofory jsou produkovány na základě biologické aktivity mikroorganismů, jež mají svůj původ v látkách, jako jsou aminokyseliny tyrosin a tryptofan. Mimo jiné zde musíme konstatovat, že fluorescenční maximum označované jako tryptofan-like se v naměřených emisních spektrech jeví jako méně výrazné raménko. Z naměřených výsledků uvedených v Tabulce 4 a 5 vyplývá, že s rostoucí eluční rychlostí na TLC destičce dochází v případě fluoroforů fulvic-like k výraznému modrému posunu

fluorescenčního maxima. To je pravděpodobně způsobeno nižším obsahem aromatických strukturních jednotek (snížení  $\pi$ -elektronového systému) anebo snížením obsahu konjugovaných dvojných vazeb vlivem konverze kondenzovaných aromatických struktur na nelineární, strukturně jednodušší systémy. Tento výsledek je v dobré shodě se závěry pořízenými pomocí HIX a UV/Vis absorpčních koeficientů. Obecně můžeme říci, že s rostoucím retardačním faktorem  $R_f$  organických frakcí klesá jejich střední molekulová hmotnost  $\overline{M}_w$ , která je v přímé úměrnosti s počtem aromatických strukturních jednotek. Dále si v Tabulce 8 a 9 můžeme povšimnout, že zjištěná intenzita fluorescence je v případě huminových fluoroforů nižší, než je tomu u konstitučních jednotek mikrobiálního původu. Toto můžeme s jistou pravděpodobností vysvětlit tím, že fluorescenční maxima, která jsou lokalizována v oblasti vyšších vlnových délek emise s nižší intenzitou fluorescence, se zpravidla vyznačují kondenzovaným systémem aromatických strukturních jednotek anebo strukturními jednotkami s vysokým stupněm konjugace dvojných vazeb. V emisních fluorescenčních spektrech si můžeme povšimnout, že fluorescenční maxima označována jako fulvic-like extrahované z FK se v porovnání s HK nacházejí v oblasti nižších vlnových délek emise.

Na základě provedené literární rešerše se nám nepodařilo identifikovat fluorescenční maximum, které bylo lokalizováno v organické frakci FKEC při velmi vysoké hodnotě  $\lambda_{em}$ , která byla stanovena na 552 nm. Jelikož bylo měření realizováno v MeOH o kvalitě vyhovující spektrometrickým analýzám, tak se jistě nejedná o Ramanův pík druhého řádu, který by přicházel v úvahu měření fluorescenčních spekter realizovaných ve vodném prostředí. Kvalitativní analýza tohoto fluorescenčního maxima by mohla být námětem další badatelské činnosti v rámci navazujícího magisterského studia. Jednou z možných cest kvantifikace tohoto fluoroforu by byla možnost využití infračervené nebo Ramanovské spektrometrie.

## 5 ZÁVĚR

Tato bakalářská práce se zaměřuje na charakterizaci struktury HL, především na jednotlivé frakce HK a FK a jejich chemicko-fyzikální vlastnosti. Vzorky HK a FK použité v měření, byly získané od mezinárodní společnosti pro výzkum huminových látek IHSS. Standardy huminových a fulvinových kyselin byly charakterizovány pomocí elementární analýzy (EA), termogravimetrické analýzy (TGA), molekulové absorpční spektrometrie (UV/Vis) a infračervené spektrometrie s Fourierovou transformací (FTIR). Dále byla použita TLC chromatografie k získání jednotlivých frakcí HK a FK. Každá frakce byla dále charakterizována pomocí molekulové absorpční chromatografie (UV/Vis) a fluorescenční spektrometrie v ustáleném stavu.

Pomocí elementární analýzy bylo potvrzeno, že HL jsou složeny převážně z uhlíku, vodíku, kyslíku a v menším množství i dusíku. Při porovnání HK a FK můžeme říci, že huminové kyseliny obsahují oproti fulvinovým kyselinám větší množství uhlíku, menší množství kyslíku a stejnou míru vodíku a dusíku. Pomocí atomových poměrů H/C bylo zjištěno, že standard HK je oproti fulvinové kyselině charakterizován vyšší mírou aromaticity a dehydrogenace. Vysoká hodnota atomového poměru O/C v případě FK Pahokee Peat svědčí o vyšším obsahu kyslíkatých funkčních skupin. Metodou termogravimetrické analýzy bylo zjištěno, že Pahokee Peat FK obsahuje vyšší míru popela a vlhkosti narozdíl od HK.

Hodnoty absorpčních koeficientů v UV/Vis spektrometrii pomohly k charakterizaci standardů HK a FK. Huminová kyselina se vyznačovala vyšší mírou aromaticity a stupně humifikace. Naproti tomu fulvinová kyselina byla charakterizována vyšší mírou substituce aromatických jednotek kyslík obsahujícími funkčními skupinami s určitým podílem  $-OCH_3$ . Toto tvrzení je v dobré shodě s výsledky získanými pomocí infračervené spektrometrie.

Jednotlivé zóny na TLC destičce, odpovídající organickým frakcím přítomných v HL, byly použity k výpočtu příslušných retardačních faktorů  $R_f$ . Nízké hodnoty retardačních faktorů standardu HK značí, že vzorek v porovnání se standardem FK obsahuje organické frakce, které jsou silněji poutány k adsorbentu TLC destičky. Některé frakce organických sloučenin HL mají velmi podobné hodnoty  $R_f$ , což by mohlo znamenat, že mají podobné fyzikálně-chemické vlastnosti.

UV/Vis spektrometrie byla také použita k výpočtům absorpčních koeficientů a humifikačního indexu jednotlivých organických frakcí. Míra substituce aromatických struktur polárními funkčními skupinami klesala s rostoucím retardačním faktorem  $R_f$  jednotlivých organických frakcí. Dále je z výsledků zřejmé, že nejvyšší molekulovou hmotností a aromaticitou byly charakterizovány organické frakce nacházející se v blízkosti startovní čáry TLC chromatogramu. Díky vypočteným hodnotám humifikačního indexu můžeme říci, že aromaticita organických frakcí izolovaných z HL Pahokee Peat se snižovala s rostoucím retardačním faktorem.

Během měření fluorescenčních spekter všechny studované vzorky vykazovaly odpovídající fluorescenční maxima HL izolovaných z terestriálních přírodních matric. Na základě naměřených výsledků bylo zjištěno, že s rostoucí eluční rychlostí na TLC destičce dochází v případě *fulvic-like* fluoroforů k výraznému modrému posunu fluorescenčního maxima. To je pravděpodobně způsobeno nižším obsahem aromatických strukturních jednotek anebo snížením obsahu konjugovaných dvojných vazeb vlivem konverze kondenzovaných



aromatických struktur na nelineární. Tento výsledek je v dobré shodě se závěry pořízenými pomocí HIX a UV/Vis absorpčních koeficientů. Obecně lze říci, že s rostoucím retardačním faktorem  $R_f$  organických frakcí klesá jejich střední molekulová hmotnost.

Bohužel se nám nepodařilo určit fluorescenční maximum lokalizované v organické frakci FKEC. Kdyby bylo měření provedeno ve vodném prostředí, namísto MeOH, mohlo by se jednat o Ramanův pík druhého řádu. Předmětem další práce by mohla být kvalitativní analýza tohoto fluorescenčního maxima.

## 6 LITERATURA

- [1] Dohnal, Z., Kunst, M., Mejstřík, V., Raučina Š., Vydra, V. (1965). Československá rašeliniště a vrchoviště. 1. vydání, nakladatelství ČSAV, pp. 336.
- [2] Parent, L-E., Ilnicki, P., 2002. Organic Soils and Peat Materials for Sustainable Agriculture. 1st Ed., CRC Press. pp. 224. ISBN 9780849314582
- [3] Montanarella, L., Jones R.J.A., Hiederer, R. 2006. The distribution of peatland in Europe. Mires and Peat, Vol. 1, pp. 1—11
- [4] Inisheva, L. I., 2006. Peat soils: Genesis and classification. Euroasia Soil Science, Vol. 39, pp. 699–704. doi:<https://doi.org/10.1134/S1064229306070027>
- [5] DOPITA, Miloslav, Václav HAVLENA a Jiří PEŠEK. Ložiska fosilních paliv: celostátní vysokoškolská příručka pro studenty přírodovědeckých fakult skupiny oborů geologické vědy. Praha: Státní nakladatelství technické literatury, 1985.
- [6] Rašeliny, využití a ochrana [online]. Ústav geologie a pedologie, Lesnické a dřevařské fakulty, Mendelovy univerzity v Brně [cit. 2020-04-05]
- [7] FUCHSMAN, Charles H. Peat, industrial chemistry and technology. New York: Academic Press, 1980. ISBN 01-226-4650-9.
- [8] JANDÁK, Jiří, Eduard POKORNÝ a Alois PRAX. Půdoznalství. 2., přeprac. vyd. Brno: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita, 2007. ISBN 978-80-7375-061-9.
- [9] VESELÁ, Lenka, Martin KUBAL, Josef KOZLER a Petra INNEMANOVÁ. Struktura a vlastnosti přírodních huminových látek typu oxihumolitu. Chemické listy 99 [online]. 2005
- [10] PIVOKONSKÝ, Martin, Lenka PIVOKONSKÁ, Petra BUBÁKOVÁ a Václav JANDA. Úprava vody s obsahem huminových látek. Chemické listy 104 [online].
- [11] MIKULÁŠKOVÁ Barbora, LAPČÍK Lubomír, MAŠEK Ivan, LIGNIT - STRUKTURA, VLASTNOSTI A POUŽITÍ [online]. 1997(03), 91(160-168)
- [12] STEVENSON, F. J. Humus chemistry: genesis, composition, reactions. 2nd ed. New York: Wiley, 1994. ISBN 04-715-9474-1.
- [13] SKOKANOVÁ, Martina a Katarína DERCOVÁ. HUMÍNOVÉ KYSELINY. POVOD A ŠTRUKTÚRA. Chemické listy. 2008, 102(4), 262268. ISSN 1213-7103.
- [14] ROBERT E. PETTIT, Dr. Organic matter, humus, humate, humic acid, fulvic acid and humin: Their importance in soil fertility and plant health: Their importance in soil fertility and plant health. 2012
- [15] Kawiporn Chinachanta Arawan Shutsrirung, Chemical characterization of leonardite and its potential use as soil conditioner and plant growth enhancement. Home Feed: ResearchGate [online]. 2016 [cit. 2020-01-04].
- [16] MANZAK, Aynur, Cem KURŞUN a Yasemin YILDIZ. Characterization of humic acid extracted from aqueous solutions with polymer inclusion membranes. Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers. 2017, 81, 14-20. DOI: 10.1016/j.jtice.2017.10.024. ISSN 18761070.
- [17] Utilization of Coconut Copra as Low Cost Biosorbents for Removal of Humic Substances from Peat Swamp Run-Off: Journal of Advanced Research in Fluid Mechanics and Thermal Sciences [online]. 2014, 3(No.1 (6-16) [cit. 2020-02-03]. ISSN 2289-7879.
- [18] VRBA, Vladimír a Ludvík HULEŠ. Humus - půda - rostlina (2) Humus a půda. Biom.cz [online]. In: . 2006 [cit. 2020-02-12]. ISSN 1801-2655.
- [19] STEINBÜCHEL, A. a M. HOFRICHTER. Biopolymers. Chichester: Wiley-VCH, 2003. ISBN 978-3527302208.
- [20] JONES, Malcolm N. a Nicholas D. BRYAN. Colloidal properties of humic substances. Advances in Colloid and Interface Science. 1998, 78(1), 1-48. DOI: 10.1016/S0001-8686(98)00058-X. ISSN 00018686.
- [21] HAVELCOVÁ, Martina, Jiří MIZERA, Vladimír MACHOVIČ, Oldřich PŘIBYL, Lenka BORECKÁ a Ivana KRAUSOVÁ. Sorbenty na bázi huminových látek a chitosanu. Chemické listy [online]. 2011(105), 913-917 [cit. 2020-02-16].

- [22] SWIFT, Roger S. MACROMOLECULAR PROPERTIES OF SOIL HUMIC SUBSTANCES: FACT, FICTION, AND OPINION. *Soil Science* [online]. 1999, 164(11), 790-802 [cit. 2020-02-16]. DOI: 10.1097/00010694-199911000-00003. ISSN 0038-075X.
- [23] PÉDROT, Mathieu, Aline DIA a Mélanie DAVRANCHE. Dynamic structure of humic substances: Rare earth elements as a fingerprint. *Journal of Colloid and Interface Science* [online]. 2010, 345(2), 206-213 [cit. 2020-02-16]. DOI: 10.1016/j.jcis.2010.01.069. ISSN 00219797.
- [24] PICCOLO, Alessandro a Pellegrino CONTE. MOLECULAR SIZE OF HUMIC SUBSTANCES. SUPRAMOLECULAR ASSOCIATIONS VERSUS MACROMOLECULAR POLYMERS. *Advances in Environmental Research*. 2000, 3(4), 508-521.
- [25] PICCOLO, A., S. NARDI a G. CONCHERI. Micelle-like conformation of humic substances as revealed by size exclusion chromatography. *Chemosphere*. 1996, 33(4), 595-602. DOI: 10.1016/0045-6535(96)00210-X. ISSN 00456535.
- [26] PICCOLO, Alessandro. The supramolecular structure of humic substances: A novel understanding of humus chemistry and implications in soil science. Elsevier, 2002, 2002, , 57-134. *Advances in Agronomy*. DOI: 10.1016/S0065-2113(02)75003-7. ISBN 9780120007936.
- [27] TAN, Kim H. *Humic matter in soil and the environment: principles and controversies*. Second edition. Boca Raton, FL, 2014. Books in soils, plants, and the environment. ISBN 978-1482234459.
- [28] SIMPSON, André J., William L. KINGERY, Michael H. HAYES, et al. Molecular structures and associations of humic substances in the terrestrial environment. *Naturwissenschaften*. 2002, 89(2), 84-88. DOI: 10.1007/s00114-001-0293-8. ISSN 0028-1042.
- [29] PEÑA-MÉNDEZ, Eladia M., Josef HAVEL a Jiří PATOČKA. Humic substances - compounds of still unknown structure: applications in agriculture, industry, environment, and biomedicine. *Journal of Applied Biomedicine*. 2005, 3(1), 13-24. DOI: 10.32725/jab.2005.002. ISSN 1214021X.
- [30] *Biopolymers for medical and pharmaceutical applications*. Weinheim: Wiley-VCH, 2005. ISBN 35-273-1154-8.
- [31] WEBER, Jerzy. Definition of soil organic matter, Humintech [online]. 2002 [cit. 2020-02-25]. Dostupné z: <http://www.humintech.com/001/>.
- [32] *Huminové látky: Výživa a krmení*. Agropress.cz [online]. 2015 [cit. 2020-02-25]. Dostupné z: <https://www.agropress.cz/huminove-latky/>
- [33] WANDER, Michelle. *Soil Organic Matter Fractions and Their Relevance to Soil Function*. Soil Organic Matter in Sustainable Agriculture. CRC Press, 2004, 2004-05-27. *Advances in Agroecology*. DOI: 10.1201/9780203496374.ch3. ISBN 978-0-8493-1294-6.
- [34] CHRISTENSEN, B. T. a . Evaluation of Soil Organic Matter Models. POWLSON, D. S., SMITH, P., SMITH, J. U. Matching measurable soil organic matter fractions with conceptual pools in simulation models of carbon turnover: revision of model structure. Berlin: Springer, 1996, s. 143-160. ISBN 978 3 642 64692 8
- [35] CHRISTENSEN, B. T. Physical fractionation of soil and structural and functional complexity in organic matter turnover. *European Journal of Soil Science* [online]. 2001, 52(3), 345-353 [cit. 2020-03-05]. DOI: 10.1046/j.1365-2389.2001.00417.x. ISSN 1351-0754.
- [36] GRÜNEWALD, Gritta, Klaus KAISER, Reinhold JAHN a Georg GUGGENBERGER. Organic matter stabilization in young calcareous soils as revealed by density fractionation and analysis of lignin-derived constituents. *Organic Geochemistry* [online]. 2006, 37(11), 1573-1589 [cit. 2020-03-07]. DOI: 10.1016/j.orggeochem.2006.05.002. ISSN 01466380.
- [37] VON LÜTZOW, Margit, Ingrid KÖGEL-KNABNER, Klemens EKSCHMITT, Heinz FLESSA, Georg GUGGENBERGER, Egbert MATZNER a Bernd MARSCHNER. SOM fractionation methods: Relevance to functional pools and to stabilization mechanisms. *Soil Biology and Biochemistry*. 2007, 39(9), 2183-2207. DOI: 10.1016/j.soilbio.2007.03.007. ISSN 00380717.
- [38] *Sborník pedagogické fakulty v Plzni: chemie : sborník katedry chemie*. 2004. Plzeň: Západočeská univerzita v Plzni, 1973. ISBN 80-704-3296-9.
- [39] ČÁSLAVSKÝ, prof. Ing. Josef, CSc. *Analytická chemie II.: Dělicí metody*. Fakulta chemická: VUT, 2019.
- [40] POLANSKÝ, R. *Teorie a praxe termogravimetrické analýzy*. Katedra technologií a měření. Fakulta elektrotechnická, ZČU v Plzni.

- [41] KLOUŽKOVÁ, A a kol. Termická analýza. 2012. VŠCHT Praha.
- [42] KLOUDA, Pavel. Moderní analytické metody. 2., upr. a dopl. vyd. Ostrava: Pavel Klouda, 2003. ISBN 80-863-6907-2.
- [43] NOVOTNÁ, Radka a kol. Spektrální metody studia chemických látek. 2011. Přírodovědecká fakulta Univerzity Palackého v Olomouci.
- [44] ENEV, V., L. POSPÍŠILOVÁ, M. KLUČÁKOVÁ, T. LIPTAJ a L. DOSKOČIL. Spectral characterization of selected humic substances. Soil and Water Research. 2014, 9(1), 9-17. DOI: 10.17221/39/2013-SWR. ISSN 18015395.
- [45] HATCHER, Patrick G., Karl J. DRIA, Sunghwan KIM a Scott W. FRAZIER. MODERN ANALYTICAL STUDIES OF HUMIC SUBSTANCES. Soil Science. 2001, 166(11), 770-794. DOI: 10.1097/00010694-200111000-00005. ISSN 0038-075X. Dostupné také z: <http://journals.lww.com/00010694-200111000-00005>
- [46] Ma, X., Green, S.A., 2008. Fractionation and spectroscopic properties of fulvic acid and its extracts. Chemosphere. Vol. 72, pp. 1425–1434.
- [47] Mirave, J. P., Orioli G. A., 1987. Edaphic mobility of complete humic acid and fractions of high and medium molecular weight. Plant and Soil. Vol. 104, pp. 169–174.
- [48] KHAIRY, Ahmed H. Contribution to the quantification of humic acids by thin layer chromatography. Zeitschrift für Pflanzenernährung und Bodenkunde. 1990, 153(3), 133-140. DOI: 10.1002/jpln.19901530302. ISSN 00443263.
- [49] ANDRÉS, JoséM. a Clemente ROMERO. Fractionation of raw and methylated fulvic acids from lignite by thin-layer chromatography. Fuel. 1988, 67(3), 441-443. DOI: 10.1016/0016-2361(88)90333-X. ISSN 00162361.
- [50] WOELKI, G., S. FRIEDRICH, G. HANSCHMANN a R. SALZER. HPLC fractionation and structural dynamics of humic acids. Fresenius' Journal of Analytical Chemistry. 1997, 357(5), 548-552. DOI: 10.1007/s002160050211. ISSN 0937-0633.
- [51] DOSKOČIL, L.; BURDÍKOVÁ, J.; ENEV, V.; KALINA, L.; WASSERBAUER, J. Spectral characterization and comparison of humic acids isolated from some European lignites. FUEL, 2018, roč. 213, č. 3, s. 123-132. ISSN: 0016-2361.
- [52] LAKOWICZ, J. R. *Principles of fluorescence spectroscopy*. 3rd ed. New York: Springer, 2006, 980 p. ISBN 978-038-7463-124.
- [53] W.M. Davis, C.L. Erickson, C.T. Johnston, J.J. Delfino, J.E. Porter, Quantitative Fourier Transform Infrared spectroscopic investigation humic substance functional group composition, Chemosphere, Volume 38, Issue 12, 1999, Pages 2913-2928, ISSN 0045-6535, [https://doi.org/10.1016/S0045-6535\(98\)00486-X](https://doi.org/10.1016/S0045-6535(98)00486-X).

## 7 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

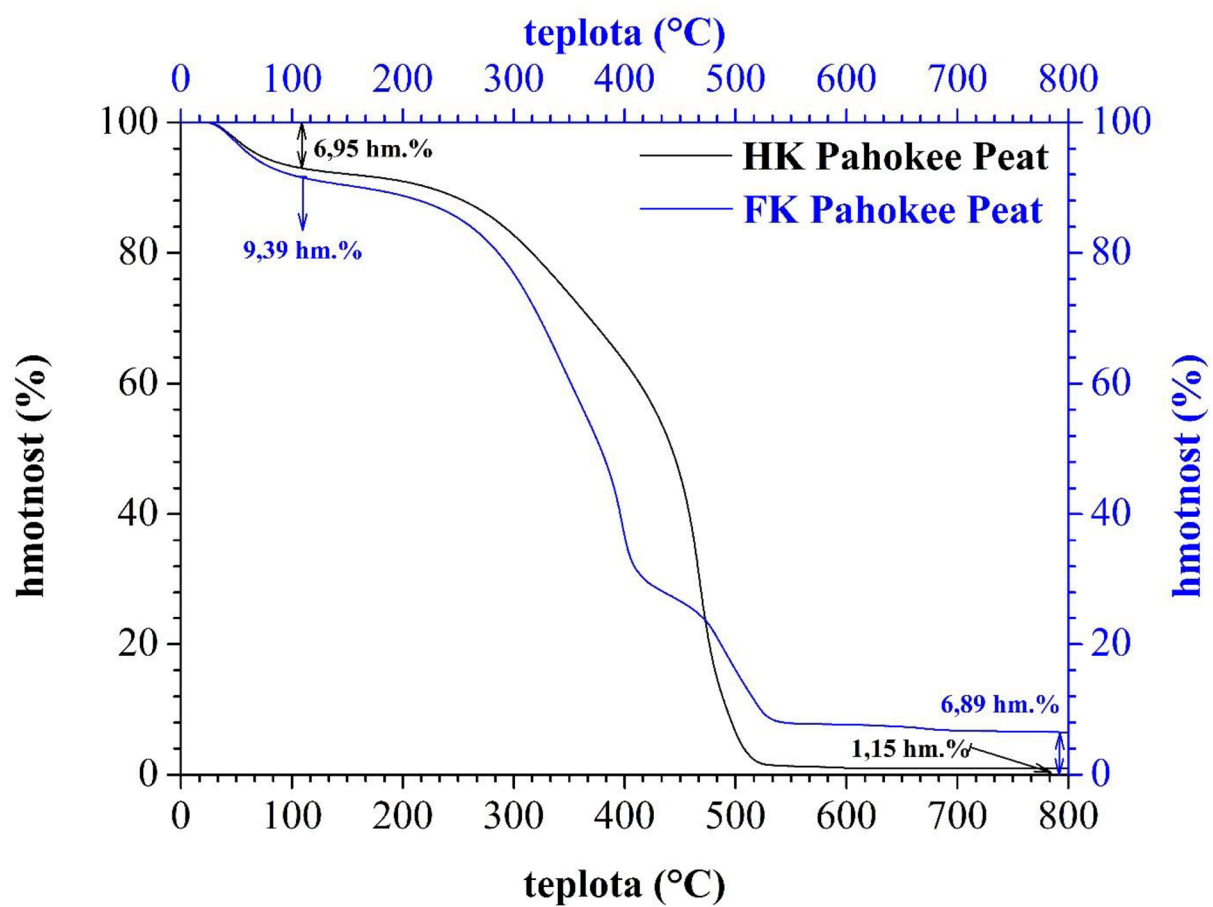
### 7.1 Seznam použitých zkratek

C-NMR	carbon-nuclear magnetic resonance
DOM	dissolved organic matter
EA	elementární analýza
FK	fulvinová kyselina
FTIR	infračervená spektrometrie s Fourierovou transformací
HK	humínová kyselina
HL	humínová látka
HPLC	high-performance liquid chromatography
HU	humín
IHSS	mezinárodní společnost pro výzkum huminových látek
MS	hmotnostní spektrometrie
NOM	natural organic matter
SEC	size exclusion chromatography
TGA	termogravimetrická analýza
TLC	tenkovrstvá chromatografie
UV/Vis	ultrafialová a viditelná oblast elektromagnetického záření

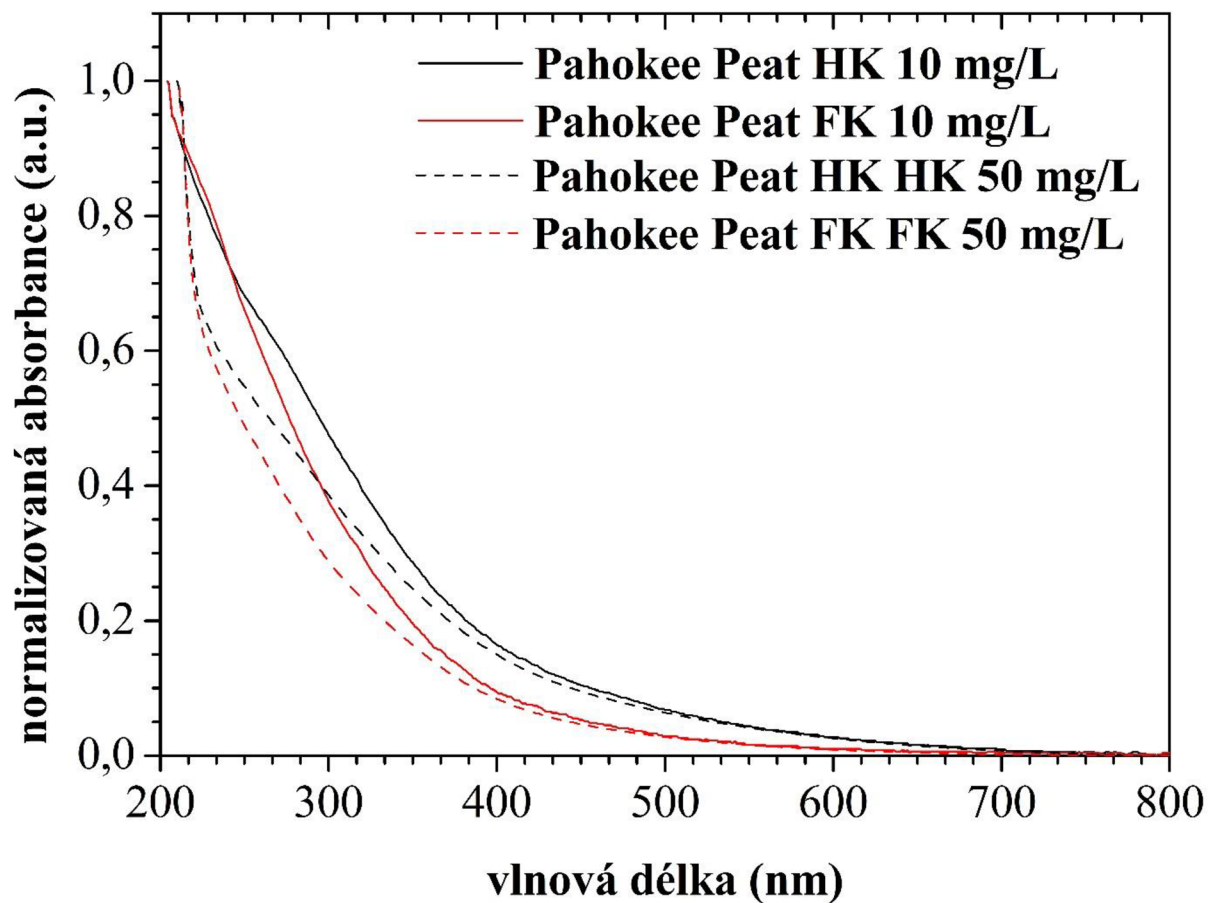
## 7.2 Seznam použitých symbolů

at. %	elementární složení v atomových procentech	[%]
$E_2/E_3$	poměr absorbancí při vlnových délkách 250 a 365 nm	[-]
$E_2/E_4$	poměr absorbancí při vlnových délkách 265 a 465 nm	[-]
$E_4/E_6$	poměr absorbancí při vlnových délkách 465 a 665 nm	[-]
$E_{ET}/E_{Bz}$	poměr absorbancí při vlnových délkách 253 a 220 nm	[-]
Hm. %	elementární složení v hmotnostních procentech	[%]

## 8 PŘÍLOHY

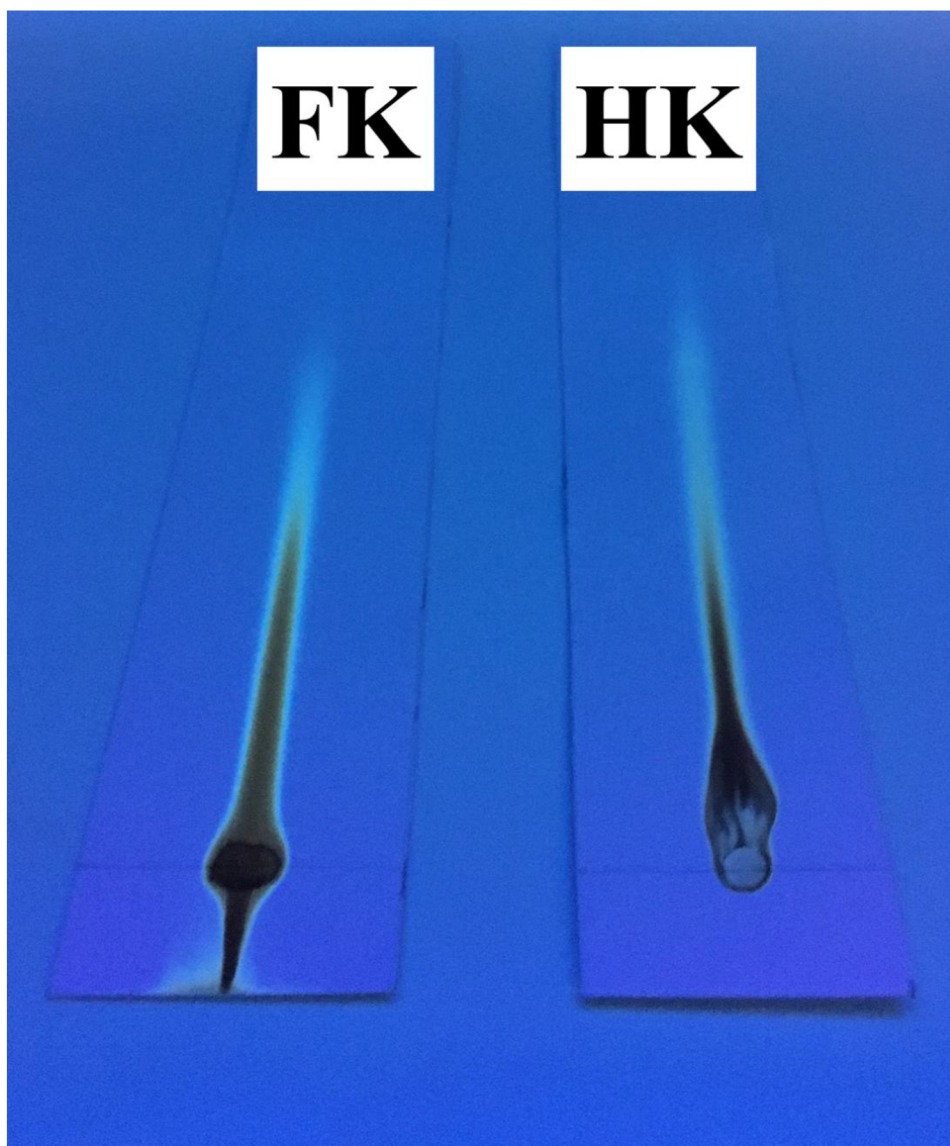


Obrázek 8: TG křivky standardů HL Pahokee Peat

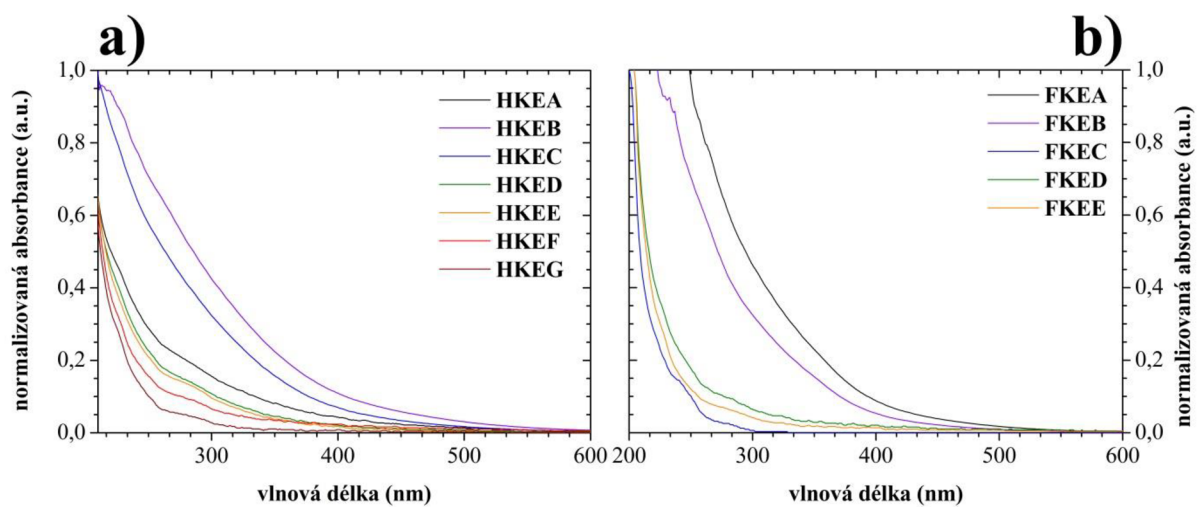


Obrázek 5: UV/Vis spektra standardů HL Pahokee Peat

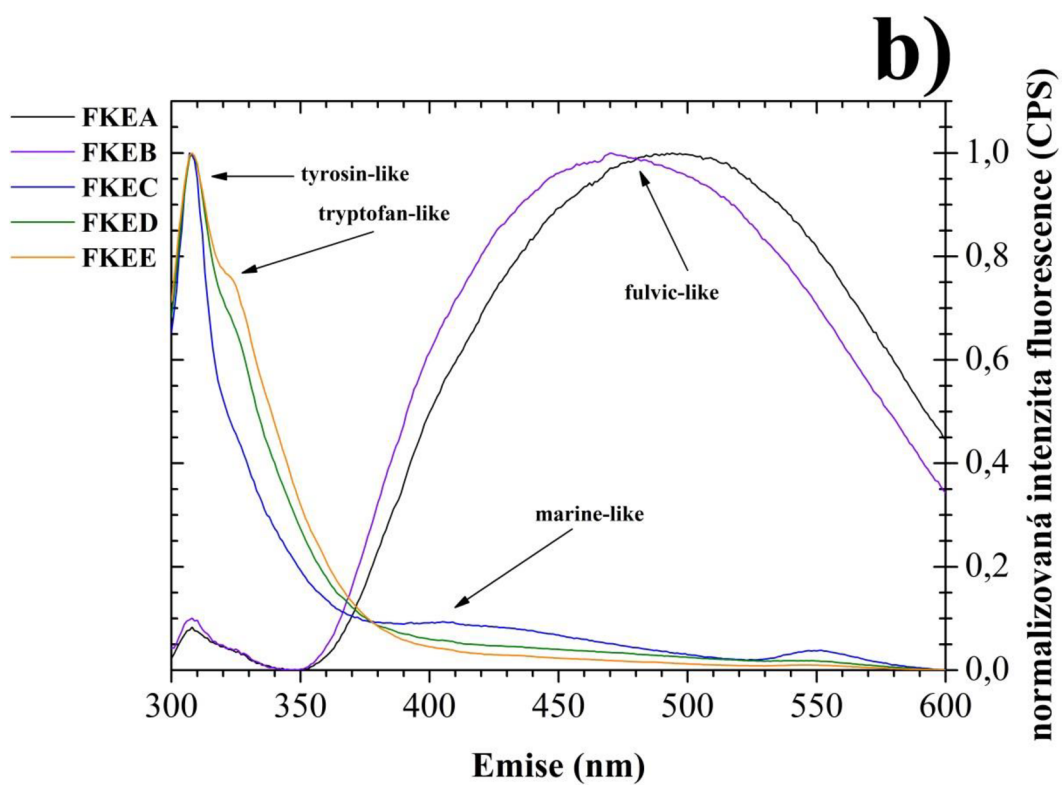
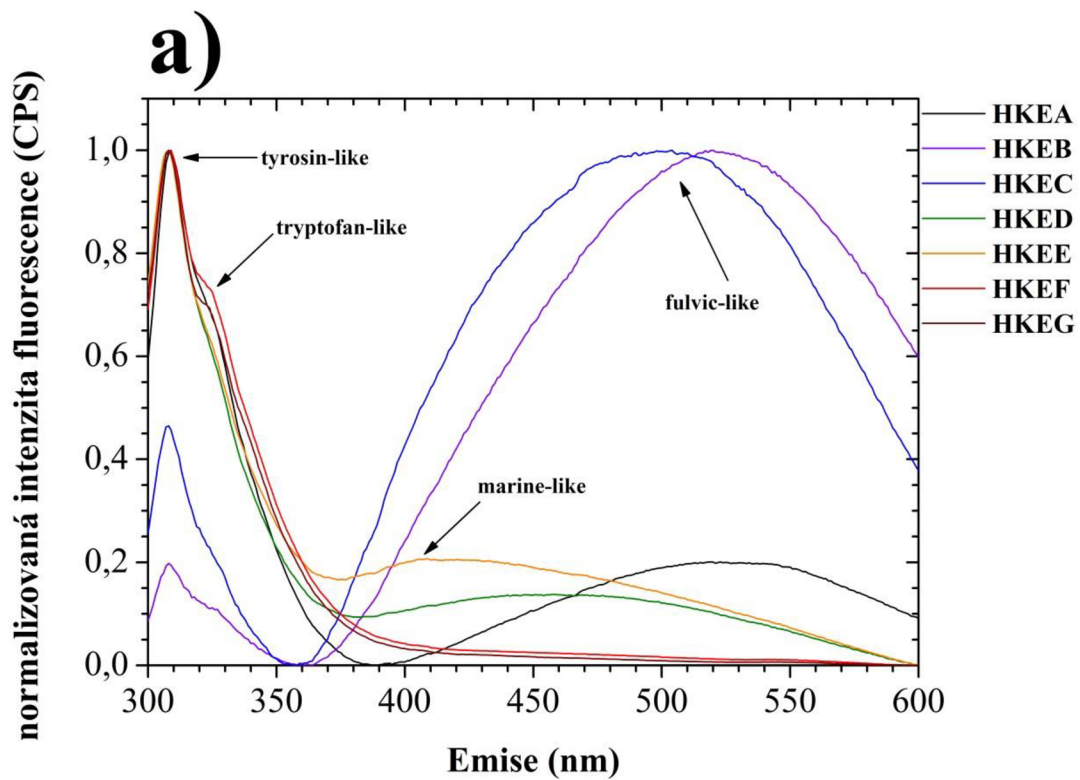




Obrázek 9: Pozorování TLC chromatogramů pod UV zářením v pozorovací komoře



Obrázek 10: UV/Vis spektra organických frakcí HL: **a)** organické frakce izolované z HK Pahokee Peat; **b)** organické frakce izolované z FK Pahokee Peat.



Obrázek 11: Emisní spektra organických frakcí HL: **a)** organické frakce izolované z HK Pahokee Peat; **b)** organické frakce izolované z FK Pahokee Peat.