

VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ
ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE

FACULTY OF CHEMISTRY
INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

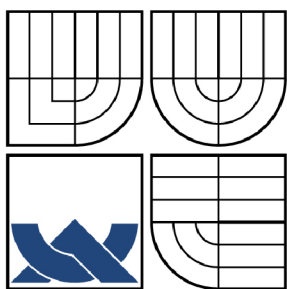
ROZPUSTNOST A DISOCIACE HUMINOVÝCH KYSELIN

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE
BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE
AUTHOR

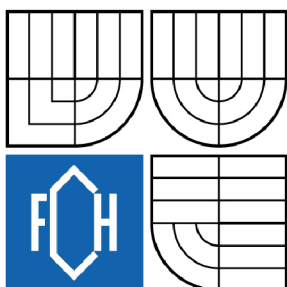
ROMANA KOLAJOVÁ

BRNO 2010



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA CHEMICKÁ

ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE

FACULTY OF CHEMISTRY

INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

ROZPUSTNOST A DISOCIACE HUMINOVÝCH KYSELIN

SOLUBILITY AND DISSOCIATION OF HUMIC ACIDS

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

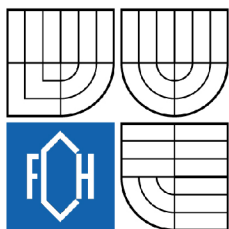
ROMANA KOLAJOVÁ

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

doc. Ing. MARTINA KLUČÁKOVÁ,
Ph.D.

BRNO 2010



Vysoké učení technické v Brně
Fakulta chemická
Purkyňova 464/118, 61200 Brno 12

Zadání bakalářské práce

Číslo bakalářské práce: **FCH-BAK0425/2009** Akademický rok: **2009/2010**
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie
Student(ka): **Romana Kolajová**
Studijní program: Chemie a chemické technologie (B2801)
Studijní obor: Spotřební chemie (2806R002)
Vedoucí bakalářské práce: **doc. Ing. Martina Klučáková, Ph.D.**
Konzultanti bakalářské práce: Ing. Eva Čechová

Název bakalářské práce:

Rozpustnost a disociace huminových kyselin

Zadání bakalářské práce:

Cílem práce je stanovit zdánlivé disociační konstanty huminových kyselin spektrofotometricky a posoudit možnosti využití této metody ve výzkumu huminových látek.

Termín odevzdání bakalářské práce: 28.5.2010

Bakalářská práce se odevzdává ve třech exemplářích na sekretariát ústavu a v elektronické formě vedoucímu bakalářské práce. Toto zadání je přílohou bakalářské práce.

Romana Kolajová
Student(ka)

doc. Ing. Martina Klučáková, Ph.D.
Vedoucí práce

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
Ředitel ústavu

V Brně, dne 1.12.2009

prof. Ing. Jaromír Havlica, DrSc.
Děkan fakulty

ABSTRAKT

Chování huminových kyselin ve vodných roztocích úzce souvisí s obsahem kyselých funkčních skupin a jejich disociačními schopnostmi. Pro studium acido-bazických vlastností huminových kyselin jsou nejčastěji využívány titrační metody, jejichž výsledky by měly vést ke stanovování obsahu jednotlivých funkčních skupin a jejich pK_a . Stanovené hodnoty ovšem závisí na mnoha faktorech včetně rychlosti titrace. Tato práce si klade za cíl ověřit možnost využití UV/VIS spektrofotometrie jako alternativní metody pro stanovení pK_a huminových kyselin a srovnat dosažené výsledky s dosud využívanou metodou podle Hendersona-Hasselbacha. Principem nově použité spektrofotometrické metody je příprava roztoků huminových kyselin ve třech různých prostředích s rozdílnými hodnotami pH. V silně zásaditém prostředí jsou kyselé skupiny huminových kyselin prakticky úplně disociované a měřená absorbance je způsobena anionem „humátu“. Naopak v silně kyselém prostředí je jejich disociace potlačena natolik, že měříme absorbanci nedisociovaných molekul huminových kyselin. Bylo zjištěno, že po úpravách je možné spektrofotometrickou metodu použít pro stanovení pK_a těchto látek, přičemž použitelnost metody byla ověřena na třech různých vzorcích huminových kyselin. Na základě naměřených dat byl stanoven optimální poměr huminové kyseliny – voda a rozsah vlnových délek pro měření UV/VIS spekter. Bylo potvrzeno, že hodnoty pK_a stanovené touto metodou lépe popisují skutečné disociační chování huminových kyselin ve vodě než tradiční Henderson-Hasselbachova metoda. Získaná UV/VIS spektra v kombinaci s výsledky měření pH a vodivosti dále prokázala odlišnosti v chování různě připravených vzorků huminových kyselin.

ABSTRACT

The behaviour of humic acids in aqueous solutions is closely connected to the content of acid functional groups and their dissociation abilities. The titration methods are the most often used for the research of acid-basic characteristics of humic acids, their results should lead to the determination of the content of functional groups and their pK_a . However the determined values depend on many factors including the titration speed. The aim of this bachelor's thesis is to verify the possibility of UV/VIS spectrophotometry's use as alternative method for the determination of pK_a of humic acids and to compare the gained results with so far used method according to Henderson-Hasselbach. The principle of newly used spectrophotometry method is the preparation of humic acids solutions in three different media with different pH values. Acid groups of humic acids are practically completely dissociated in intensely basic environment and the measured absorbance is caused by anion of „humate“. On the contrary their dissociation in acid environment is suppressed so much that we measure the absorbance of non-dissociated molecules of humic acids. It was found out that after the modification it was possible to use the spectrophotometry method for the determination of pK_a of these substances, while the use of method was verified within the three different samples of humic acids. The optimal ratio humic acids – water and the extent of wavelength for measuring UV/VIS spectra were determined. It was proved that the values of pK_a determined by these methods better describe the real dissociation behaviour of humic acids in water than traditional Henderson-Hasselbach method. The UV/VIS spectra gained in combination with the results of pH measuring and the conductivity next showed the differences in the behaviour of differently prepared samples of humic acids.

KLÍČOVÁ SLOVA

humínové kyseliny, disociace, rozpustnost, polyelektrolyty

KEY WORDS

humic acids, dissociation, solubility, polyelectrolytes

KOLAJOVÁ, R. *Rozpustnost a disociace huminových kyselin*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2010. 32 s. Vedoucí bakalářské práce doc. Ing. Martina Klučáková, Ph.D.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citovala. Bakalářská práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího diplomové práce a děkana FCH VUT.

.....
podpis autora

Poděkování

Na tomto místě bych velice ráda poděkovala vedoucí mé bakalářské práce doc. Ing. Martině Klučákové, Ph.D. za vynikající vedení, cenné rady a především čas, který mi věnovala.

Dále děkuji Ing. Evě Čechové za osobní konzultace a především pomoc při řešení experimentální části.

OBSAH

| | |
|---|----|
| 1. ÚVOD | 7 |
| 2. TEORETICKÁ ČÁST..... | 8 |
| 2.1 Huminové látky | 8 |
| 2.1.1 Rozdělení huminových látek | 8 |
| 2.1.2 Složení huminových kyselin | 9 |
| 2.1.3 Obsah kyselých funkčních skupin v huminových kyselinách..... | 11 |
| 2.2 Rozpustnost a disociace huminových kyselin | 12 |
| 2.2.1 Metody studia rozpustnosti a disociace huminových kyselin | 13 |
| 2.2.1.1 Titrační metody | 13 |
| 2.2.1.2 Spektrofotometrické metody | 15 |
| 3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST | 17 |
| 3.1 Použité přístroje..... | 17 |
| 3.2 Použité chemikálie | 17 |
| 3.3 Příprava vzorků huminových kyselin..... | 17 |
| 3.4 Charakterizace huminových kyselin | 18 |
| 3.5 Stanovení pK_a huminových kyselin..... | 18 |
| 4. VÝSLEDKY A DISKUZE | 19 |
| 4.1 Charakterizace huminových kyselin | 19 |
| 4.2 Stanovení pK_a huminových kyselin..... | 20 |
| 5. ZÁVĚR..... | 29 |
| 6. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY | 30 |
| 7. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ..... | 32 |

1. ÚVOD

Huminové kyseliny jsou řazeny do široké skupiny organických látek, které mají rostlinný původ. Jsou definovány jako frakce huminových látek, které nejsou rozpustné v kyselém prostředí. Jedná se o vysokomolekulární organické sloučeniny, v jejichž struktuře se nacházejí aromatické cykly a hlavně velké množství kyselých funkčních skupin. Pro stanovení jejich obsahu a pK_a existuje řada metod poskytujících často rozdílné výsledky. Celková kyselost i obsah jednotlivých funkčních skupin často závisí na způsobu jejich stanovení. Využívány jsou zejména titrační metody, u kterých však hrají roli takové faktory, jako je obsah huminových kyselin v titrované suspenzi, rychlost titrace apod. Vzhledem ke složitosti struktury huminových kyselin v nich existují kyselé skupiny různé síly, a tedy i různé pK_a . Přesto je snaha charakterizovat huminové kyseliny jednou střední hodnotou pK_a , která by mohla být snadno využita ke srovnání různých vzorků.

Tato bakalářská práce je zaměřena na studium disociace huminových kyselin. Jejím cílem je spektrofotometrické stanovení zdánlivých disociačních konstant a posouzení možnosti využití této metody ve výzkumu huminových látek. Dále se tato studie zabývá vlivem izolace a způsobu úpravy vzorků huminových kyselin na jejich acido-bazické vlastnosti.

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Huminové látky

Huminové látky jsou řazeny mezi nejvíce rozšířené přírodní produkty na zemském povrchu. Jsou zastoupeny ve vodách, v půdě a v kaustobiolitech (rašelině, hnědém uhlí a lignitu). Vznikají procesem humifikace, což je chemický či biochemický rozpad (tlení) organické hmoty a případně do ní může být zahrnována i syntézu mikroorganismů. Jelikož složení živočišných i rostlinných těl je velice rozmanité, vede ke vzniku nekonečného počtu molekul, z čehož vyplývá, že se huminové látky nedají charakterizovat jednotnou strukturou ani vlastnostmi. Jejich velikost, molekulová hmotnost, struktura, složení, počet a poloha funkčních skupin je závislá na materiálu, z něhož vznikly [1].

2.1.1 Rozdělení huminových látek

Existuje několik způsobů klasifikace huminových látek. Jedno z nejčastějších je dělení do tří skupin na základě rozpustnosti ve vodných roztocích:

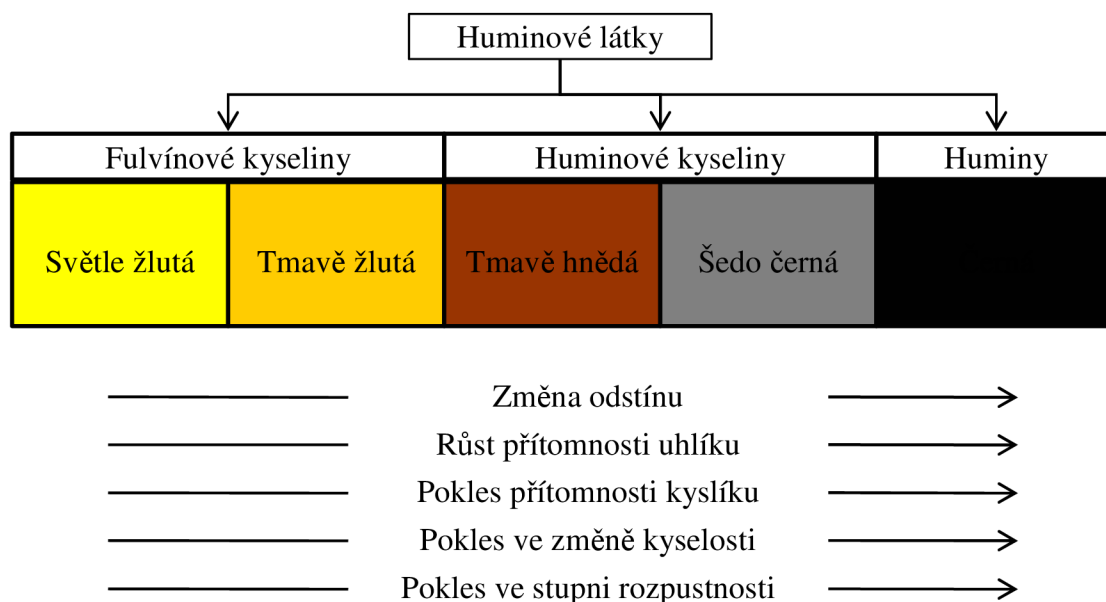
- fulvínové kyseliny – rozpustné v kyselinách i zásadách
- huminové kyseliny – rozpustné ve zředěných zásaditých roztocích a částečně jsou i v roztocích kyselých
- huminy – nerozpustné ani v kyselinách ani v zásadách

Fulvínové kyseliny jsou nejmenší částice mezi huminovými látkami. Jejich molekulová hmotnost je nejnižší ze všech huminových látek. Obsahují více O a S, ale méně C, H a N. Ve své struktuře mají více nasycených řetězců a méně aromatických jader. Přítomnost většího množství karboxylových a hydroxylových skupin zapříčiňuje jejich rozpustnost v celé škále pH [2], [3].

Huminové kyseliny mají molekulovou hmotnost vyšší než fulvínové kyseliny a zároveň nižší než huminy. Jejich špatná rozpustnost v kyselém prostředí je zapříčiněna protonací karboxylových skupin, která vede až k jejich srážení [1].

Huminy mají vysokou molekulovou hmotnost, relativně malý specifický povrch a nízký počet karboxylových skupin. Těmito vlastnostmi je zapříčiněna jejich nerozpustnost [2].

Je známé dělení huminových látek podle barvy – hnědé huminové kyseliny, které se v bazickém roztoku nesráží přidávkem elektrolytu a šedé huminové kyseliny, které se naopak sráží po přidání elektrolytu. Je zde jedna charakteristika, která udává, že tmavé huminové látky obsahují složky s vysokou molekulovou hmotností. Z Obr. 1 je patrné, že fulvínové kyseliny jsou žluté, huminové kyseliny jsou hnědé nebo šedé a huminy jsou obvykle černé. Na molekulovou hmotnost huminových kyselina mají vliv i změny v obsahu uhlíku a kyslíku a změny v kyselosti [4].



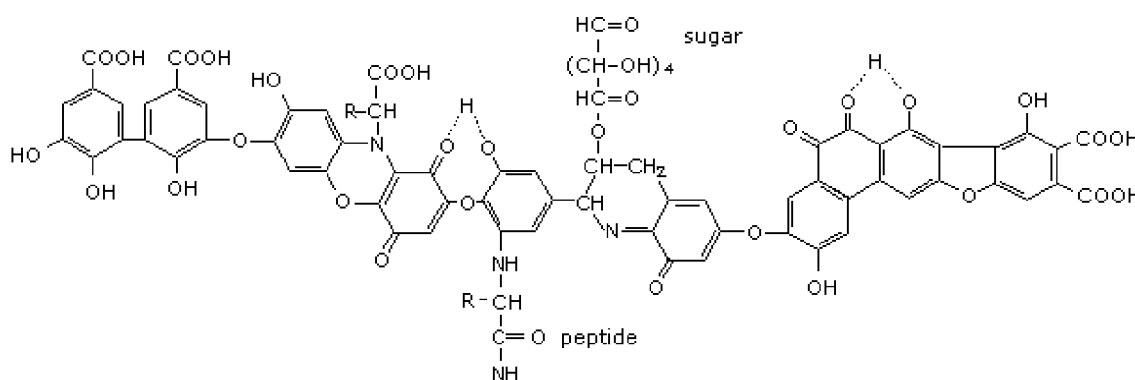
Obr. 1 Klasifikace huminových kyselin [5]

2.1.2 Složení huminových kyselin

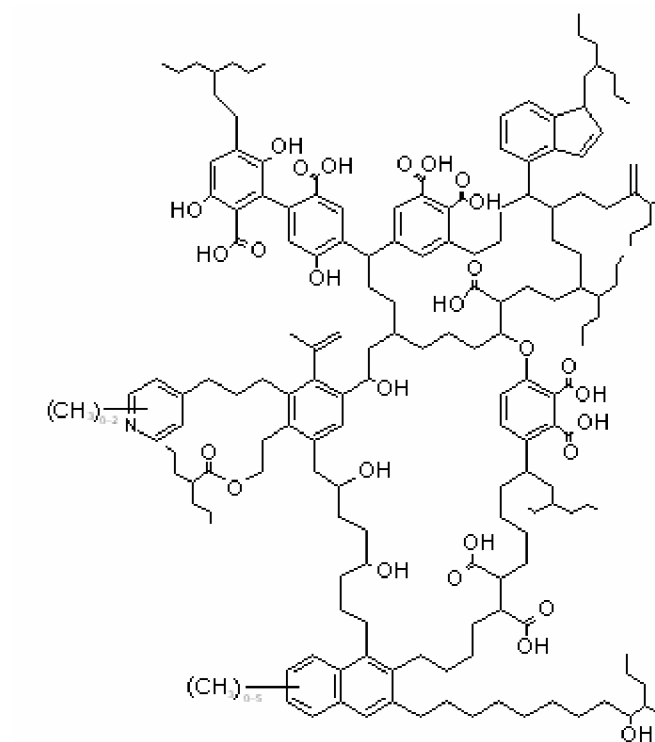
Huminové kyseliny mají velice rozmanitou strukturu, která nebyla doposud přesně určena a to i přes to, že se hojně vyskytují v životním prostředí. V jejich stavbě se totiž objevuje obrovské množství různých funkčních skupin [1].

Základní složení huminových kyselin závisí na původu, vzniku, stáří a způsobu získání vzorku. Na jejich kompozici má velký vliv i rychlost extrakce těchto látek po odebrání vzorku. Huminové kyseliny obsahují zejména prvky uhlík, vodík a kyslík. V menší míře jsou zde pak přítomny dusík, síra a fosfor. Množství uhlíku v půdních huminových kyselinách bylo stanoveno na 36 – 49 atomových %, vodíku na 29 – 47 atomových %, dusíku na 0,6 – 3,3 atomových % a kyslíku na 18 – 25 atomových % [3].

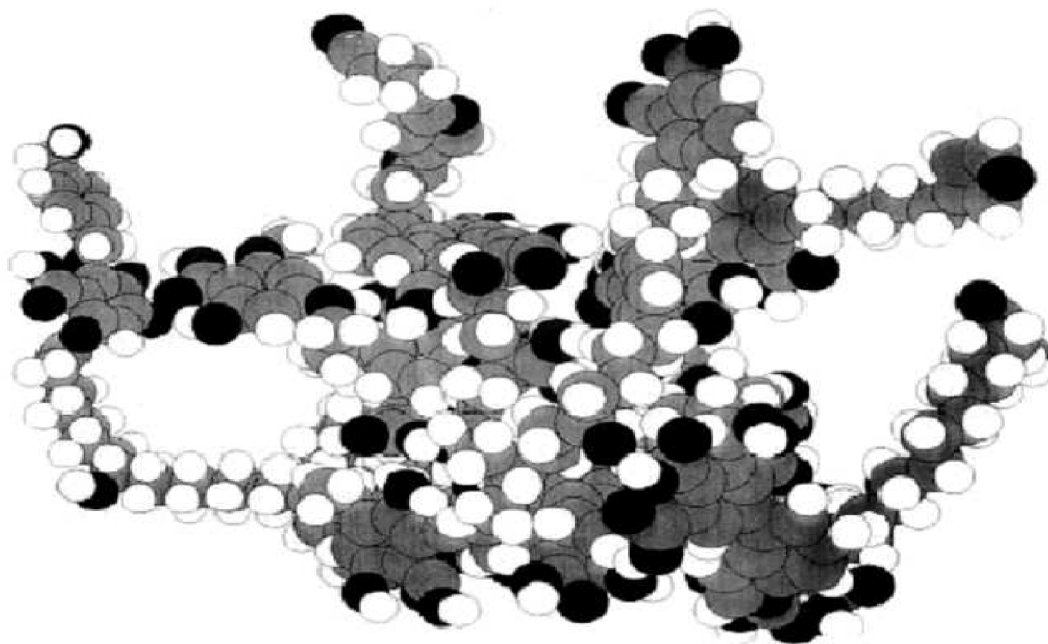
V literatuře se objevuje mnoho pokusů o objasnění struktury huminových kyselin a vytvoření jejich obecného vzorce. Na obrázcích (Obr. 2, Obr. 3, Obr. 4, Obr. 5) jsou uvedeny příklady některých z nich.



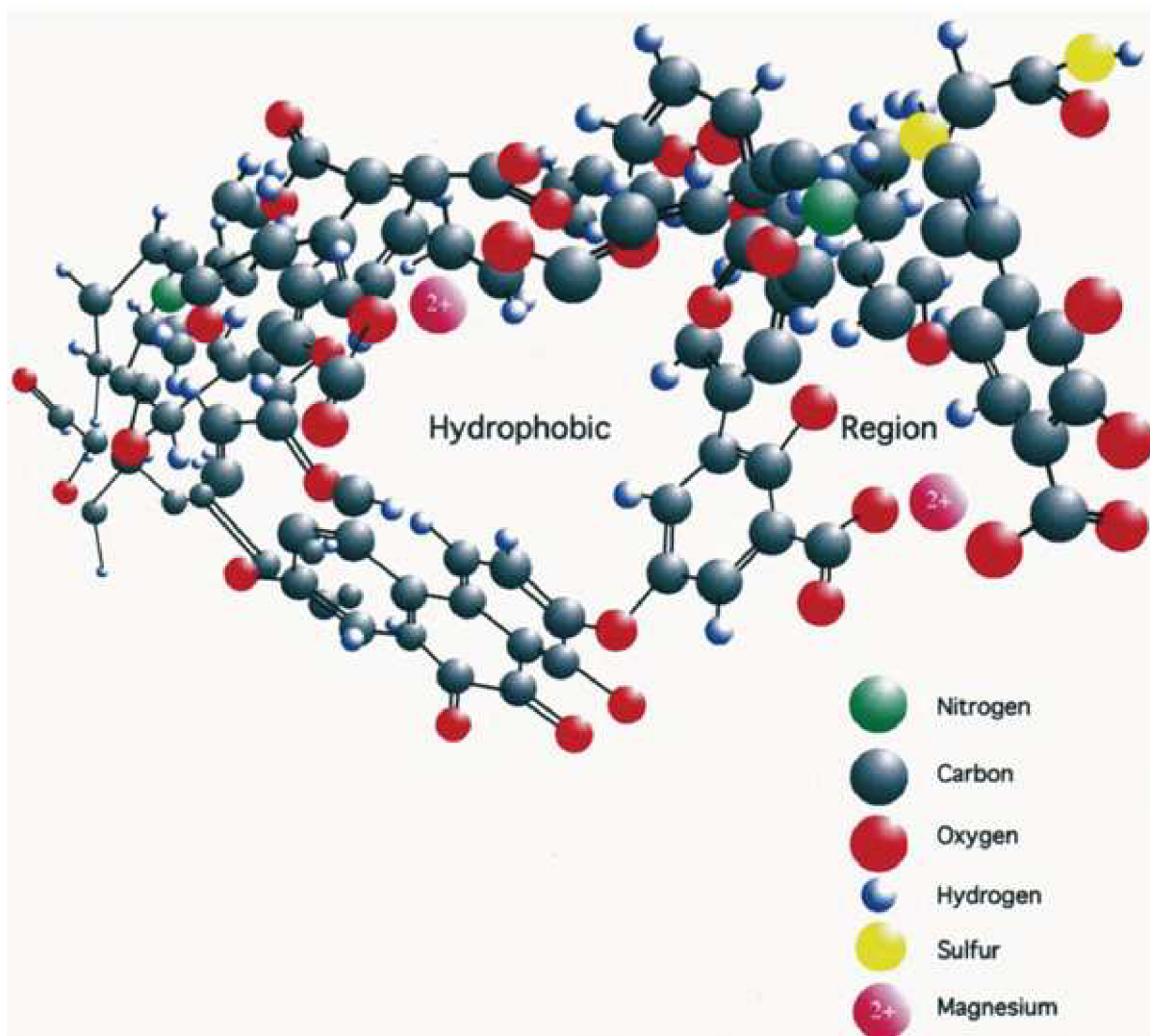
Obr. 2 Struktura huminových kyselin podle Stevensona [6]



Obr. 3 Část strukturního vzorce huminové kyseliny od Schultena a Schnitzera [6]



Obr. 4 Počítačově vytvořený model huminové kyseliny [6]



Obr. 5 Část struktury huminové kyseliny [7]

2.1.3 Obsah kyselých funkčních skupin v huminových kyselinách

Huminové kyseliny jsou tvořeny alifatickými řetězci a aromatickými cykly, na něž jsou navázány funkční skupiny. Mezi tyto charakteristické funkční skupiny se řadí zejména karboxylová skupina – COOH, která tvoří majoritní část celkové kyselosti, skupiny alkoholů a fenolů – OH, dále pak chinolová, hydroxychinolová, laktonová skupina, atd. Základní jednotky mohou být spojeny pomocí můstků, kterými jsou např. – O –, – S –, – NH –, – NH₂ [4].

Metody pro stanovení obsahu funkčních skupin v huminových látkách jsou založeny na kyselých vlastnostech těchto skupin. Avšak výsledky takovýchto stanovení musí být brány s ohledem na možnost překrývání kyselostí některých skupin mezi sebou navzájem. Další nevýhody tkví zejména ve špatné rozpustnosti huminových kyselin ve vodě a ve většině organických rozpouštědlech. Další problémy mohou způsobovat oxidační a redukční vlastnosti.

Nejběžnější metodou stanovení jsou nepřímé potenciometrické titrace a to konkrétně metoda určování kyselosti pomocí hydroxidu barnatého a určování karboxylových skupin metodou výměny acetátu vápenatého. Analýza kyselých funkčních skupin však může být prováděna

celou řadou různých titrací, např. přímou titrací, přerušovanou titrací, nepřímou titrací, nepřímou spojenou titrací, atd. U huminových kyselin se určení obsahu kyselých funkčních skupin může rozdělit na metodu stanovení celkové kyselosti huminových kyselin nebo na určování obsahu karboxylových a fenolových funkčních skupin.

U huminových kyselin je důležitý obsah kyslíkatých funkčních skupin, který se určuje zjištěním obsahu kyslíku v těchto látkách, jenž je přítomen zejména v karboxylových skupinách a dále pak i ve fenolových, enolových a alkoholových skupinách. Takto získané hodnoty jsou však dosti nespécifické, a proto je třeba brát je s rezervou.

Závěrem lze konstatovat, že celková kyselost je mnohem vyšší u fulvíkových kyselin než u huminových. Rovněž bylo zjištěno, že fulvíkové kyseliny obsahují mnohem více kyslíkatých funkčních skupin než ostatní organické polymery, které se běžně vyskytují na Zemi [5].

2.2 Rozpustnost a disociace huminových kyselin

Rozpustnost látek je obecně velmi významným jevem v chemické praxi, zejména u kapalných roztoků. Rozpustnost určité látky je definována jako koncentrace nasyceného roztoku určité látky při určitých fyzikálních podmínkách (teplota, tlak) [9].

Rozpustnost huminových kyselin je zkoumána zejména proto, aby byly objasněny děje mezi huminovými kyselinami a vodou v půdě. Rozpustnost huminových kyselin se odvíjí od jejich pH, iontové síly a síly elektrolytických iontů. Huminové kyseliny jsou mírně disociovány díky jejich polyaniontovému charakteru, což zapříčiňuje, že se mohou spojovat s kationy [4].

Přítomnost disociovatelných funkčních skupin ve struktuře huminových kyselin způsobuje, že se chovají jako slabě kyselé polyelektrolyty [4]. Disociací vzniká polyaniont o velkém počtu elementárních nábojů a ekvivalentní počet malých protiiontů opačného náboje (H_3O^+). Důležitý je fakt, že silně kyselé skupiny disociují úplně, zatímco slabě kyselé skupiny disociují pouze do určitého stupně [10].

Chování huminových kyselin ve vodných roztocích lze charakterizovat disociační konstantou podobně jako u jednoduchých organických kyselin.

Slabá jednosytná kyselina HA disociuje podle rovnice



Rovnovážná konstanta této reakce se nazývá disociační konstantou kyseliny. Platí pro ni:

$$K = \frac{a_{\text{H}^+} \cdot a_{\text{A}^-}}{a_{\text{HA}}} = \frac{c_{\text{H}^+} \cdot c_{\text{A}^-} \cdot \gamma_{\pm}^2}{c_{\text{HA}} \cdot \gamma_{\text{HA}} \cdot c_{\text{st}}} \quad (2)$$

Jestliže se v systému neuvažuje žádná další reakce (např. disociaci vody), může být složení rovnovážné směsi vyjádřeno pomocí stupně disociace:

$$c_{\text{HA}} = (1 - \alpha) \cdot c \quad (3)$$

$$c_{\text{H}^+} = \alpha \cdot c \quad (4)$$

$$c_{\text{A}^-} = \alpha \cdot c \quad (5)$$

kde a je aktivita, c je molární koncentrace, γ je aktivitní koeficient a α je stupeň disociace.

Rovnici (2) lze potom napsat ve tvaru:

$$K = \frac{\alpha^2 \cdot c \cdot \gamma_{\pm}^2}{(1 - \alpha) \cdot \gamma_{\text{HA}^-} \cdot c_{\text{st}}} \quad (6)$$

kde c je počáteční koncentrace kyseliny.

Silná dvojsytná kyselina H_2A disociuje do prvního stupně úplně



a do druhého stupně do ustavení rovnováhy



Pro disociační konstantu reakce (8) platí:

$$K = \frac{c_{\text{H}^+} \cdot c_{\text{A}^{2-}} \cdot \gamma_{\pm}^4}{c_{\text{HA}^-} \cdot c_{\text{st}}} \quad (9)$$

V souladu s Debyeovým-Hückelovým limitním vztahem se předpokládá, že:

$$\gamma_{\text{HA}^-} = \gamma_{\pm} \quad (10)$$

$$\gamma_{\text{A}^{2-}} = \gamma_{\pm}^4 \quad (11)$$

Neuvažují-li se v roztoku žádné jiné ionty než ty, které vznikly reakcemi (7) a (8), může být rovnice (9) přepsána na:

$$K = \frac{c \cdot \alpha \cdot (1 + \alpha) \cdot \gamma_{\pm}^4}{c_{\text{HA}^-} \cdot c_{\text{st}}} \quad (12)$$

kde c je počáteční koncentrace kyseliny a α stupeň disociace aniontu HA^- .

2.2.1 Metody studia rozpustnosti a disociace huminových kyselin

2.2.1.1 Titrační metody

Pro studium disociačních rovnovah se často používají titrační metody. Jako titrační činidlo se nejčastěji používá hydroxid sodný nebo barnatý. Zpravidla se předpokládá disociace koncentrovaných funkčních skupin, jako jsou COOH skupiny, enolické a fenolické OH skupiny a za určitých podmínek také aminoskupiny.

Pro určení zdánlivé disociační konstanty se obvykle používá Henderson-Hasselbachova metoda, která je popsána v publikaci [12] následující rovnicí:

$$\text{pH} = \text{p}K_{\text{app}} - n \log \frac{\alpha}{1 - \alpha} \quad (13)$$

kde $\text{p}K_{\text{app}}$ je zdánlivá disociační konstanta a α je stupeň disociace.

Stupeň disociace α může být vyjádřen z titrační křivky pro celkovou kyselost:

$$\alpha = \frac{c_{\text{NaOH}} \cdot V_{\text{NaOH}} + [\text{H}^+] \cdot (V_{\text{susp}} + V_{\text{NaOH}})}{b_c \cdot g_{\text{HA}}} \quad (14)$$

kde c_{NaOH} je molární koncentrace odměrného roztoku a V_{NaOH} je jeho objem, V_{susp} je objem suspenze před titrací, $[\text{H}^+]$ je koncentrace H^+ , b_c je celková kyselost a g_{HA} je navážka vzorku huminové kyseliny potřebná pro titraci.

Titrační křivka podle Hendersona-Hasselbacha se vyjadřuje jako závislost pH na $\log\left[\frac{\alpha}{1-\alpha}\right]$.

Autoři práce [17] titrovali huminové kyseliny v prostředí s různou iontovou silou a podle svých výsledků rozdělili jejich funkční skupiny do dvou podskupin: na silné a slabé, přičemž každé podskupině přisoudili jistou distribuci $\text{p}K_a$. Experimentální data prokládají vlastním modelem odvozeným na základě Debye-Hückelovy teorie. Výsledky srovnávají s daty získanými pro kyselinu galovou, jako modelovou aromatickou hydroxykyselinu.

V práci [13] se zkoumají vlastnosti ionizovatelných funkčních skupin huminových kyselin. Potenciometrickou titrací se stanovuje stechiometrie a $\text{p}K_a$ těchto funkčních skupin. Podle výsledků bylo určeno, že existují dva až tři různé druhy karboxylových kyselin vyskytujících se ve zkoumaných huminových kyselinách. Z výsledků lze rovněž usuzovat, že heterogenita mezi funkčními skupinami významně ovlivňuje acidobazické vlastnosti huminových kyselin.

Velice jednoduchý způsob potenciometrické titrace byl použit v práci [14]. Byly zde zkoumány acidobazické vlastnosti u dvou různých vzorků půdních huminových kyselin. Titrací byla u huminových kyselin určena pufrací kapacita, hodnoty zánlivých disociačních konstant a povrchový náboj.

V práci [15] se vychází opět z Debye-Hückelovy teorie. Je jí popsán efekt elektrostatické interakce na protonovou disociaci huminových kyselin. Aplikace této teorie poskytuje způsob oddělení elektrostatického efektu na protonovou disociaci od působení heterogenity mezi disociovanými skupinami.

Autoři článku [16] provedli potenciometrickou titraci u huminových kyselin extrahovaných ze sprašových půd. K získání experimentálních dat navrhli afinitní spektrum, podle něž určili správný postup titrace. Z titračních křivek potom určili množství kyselých funkčních skupin a jejich disociační konstanty. Podle těchto údajů odvodili průběh celé disociace a potvrdili, že huminové kyseliny obsahují velké množství různých druhů kyselých funkčních skupin. Celkový stupeň disociace může být stanoven na základě následující rovnice:

$$\alpha = \frac{\sum [L_i]}{c_L} = \sum \left(\frac{K_i}{K_i + [\text{H}^+]} \right) \cdot \left(\frac{c_i}{c_L} \right) \quad (15)$$

kde c_i je koncentrace kyselých funkčních skupin přítomných v molekulách huminové kyseliny a K_i je jejich disociační konstanta, $[L_i]$ je koncentrace ionizovaných funkčních skupin.

V publikaci [17] určovali vědci u různě získaných huminových kyselin acidobazické vlastnosti, včetně jejich disociační konstanty. Používali k tomu speciální snímací diferenciální potenciometrii. Výsledky této metody porovnávali s běžnými metodami určování disociační konstanty a to i s potenciometrickou titrací. Autoři dospěli k závěru, že jejich data se shodují s hodnotami z jiných metod.

Potenciometrická titrace heterogenních přírodních polyelektrolytů je v práci [18] aplikována na huminové kyseliny. Tato metoda je založena na srážecí teorii polyelektrolytů. Cílem autorů

tohoto článku bylo objasnit podstatu acidobazických vlastností polyelektrolytů s různými typy iontových skupin. Bylo prokázáno, že huminové kyseliny mohou být v částech jejich struktur považovány za lineární polyelektrolyty.

V práci [19] byly zkoumány metody frakcionace funkčních skupin huminových kyselin pomocí konduktometrických titrací. Funkční skupiny byly v této studii rozděleny do tří skupin: na skupiny, které obsahují hydroxylové skupiny a část karboxylových skupin, dále na karboxylové skupiny různých alifatických a aromatických monomerních jednotek a na skupiny, které obsahují karboxylové skupiny s nízkými hodnotami disociačních konstant, silicyláty a ftaláty.

Publikace [20] se věnuje nevodným titracím fulvinových kyselin. Jedná se o velice jednoduchý a spolehlivý způsob, jak získat informace o spektru kyselosti daných látek. V této práci byl jako nevodné prostředí použit dimethylformamid a jako titrant tetrabutylamonium hydroxid. Jako vnitřní standard byla použita p-hydroxybenzoová kyselina. Tato metoda umožňuje porovnávat rozložení funkcí karboxylových a hydroxylových skupin použitím vnitřní referenční sloučeniny během nevodných titrací, nabízí možnost lépe zkoumat různorodost huminových látek a poskytuje jednoduchý postup jak porovnávat huminové kyseliny z různých zdrojů.

2.2.1.2 *Spektrofotometrické metody*

Určení disociační konstanty pK_a u huminových kyselin je důležitou metodou studia jejich vlastností. Tato práce je zaměřena na relativně jednoduchou, ale i přesto přesnou metodu a to na absorpční spektrofotometrii v UV/VIS oblasti. Absorpční spektra huminových kyselin všeobecně závisejí na pH prostředí. Spektroskopická metoda stanovení pK_a je založena na změně tvaru a intenzity absorpčních spekter při změně pH prostředí.

Spektrofotometrické určení disociační konstanty se objevuje i v publikaci [21][12], kde je tato metoda použita ke stanovení disociační konstanty výluhů pykrátů alkalických kovů a pykrátu tetrabutylamonného, které jsou rozpouštěny v roztoku 4-methyl-2-pentanonu. Touto studií se potvrdilo, že k úplné disociaci dochází v roztocích s nízkou koncentrací a se zvyšující se koncentrací disociace klesá. Disociace pykrátů alkalických kovů se mezi sebou navzájem skoro neliší. Pykrát tetrabutylamonný disociuje o něco lépe než pykráty alkalických kovů.

V práci [22] byl zjišťován vliv disociační konstanty na povrchovou koncentraci. Zkoumanou látkou byl pralidoxim, který je řazen mezi oximy, jež vážou α -nukleofilní skupinu. Pralidoxim byl rozpouštěn v čisté vodě nebo v 50% roztoku acetonitrilu. Bylo prokázáno, že disociační konstanta pralidoximu nemá vliv na jeho povrchovou koncentraci.

V publikaci [23] se uvádí, že spektrofotometrické určení disociační konstanty není vhodné pro některé kyselé herbicidy. K tomuto závěru se dospělo na základě porovnání výsledků s daty získanými z potenciometrické a konduktometrické titrace.

Vědci v publikaci [24] rozpouštěli methyloranž, methylčerveň a methylvioleť ve vodě nebo v micelárních roztocích o různých koncentracích. Rozpouštěné látky značně měnily hodnoty disociačních konstant, což bylo způsobeno zejména štěpením částic a působením elektrostatických sil.

V práci [25] byly porovnávány výsledky spektrofotometrické a potenciometrické metody. Disociační konstanty byly určovány u tří derivátů 2-merkpto-5-R-amino-1,3,4-thiadiazolu. Obě metody prokázaly, že všechny deriváty mají velice nízkou kyselost. Potvrdila se zde teorie, že hodnoty disociačních konstant jsou ovlivněny zejména vlastnostmi amino skupin. Z výsledků jasně vyplývá, že spektrofotometrické stanovení je jedno z nejvhodnějších a nejužitečnějších pro určení disociačních konstant organických látek.

3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Použité přístroje

- pH-metr METTLER TOLEDO, Seven Easy
- konduktometr METTLER TOLEDO
- UV/VIS spektrofotometr HITACHI U-3900H

3.2 Použité chemikálie

- vzorky huminových kyselin: HK 1, HK 2, HK 3
- HCl 35% p.a., Lach-Ner., s.r.o.
- NaOH p.a., Merci, s.r.o.
- deionizovaná voda

3.3 Příprava vzorků huminových kyselin

V rámci řešení této práce byly použity tři různé vzorky huminových kyselin tak, aby byl zároveň studován vliv izolace a úpravy vzorků na jejich acido-bazické vlastnosti a chování ve vodných prostředích.

HK 1 je vzorek technické kvality a je izolován následujícím způsobem. 60 g lignitu bylo zalito 2 dm³ extrakčního roztoku (0,1 g·dm⁻³ NaOH + 0,084 g·dm⁻³ Na₄P₂O₇). Extrakce probíhala přes noc za stálého protřepávání suspenze. Následující den byl roztok zfiltrován přes hustou tkaninu a tuhý zbytek po filtraci byl znovu extrahován stejným činidlem, tentokrát pouze 60 minut. Poté byla opět provedena filtrace. Oba filtráty byly spojeny a okyseleny 20% HCl do pH = 1. Roztok byl ponechán v lednici přes noc. Druhého dne byla odsáta kapalina nad usazeninou, zbytek byl 10 minut odstředován v centrifuze při 4000 otáčkách za minutu a termostatu nastaveném na 10 °C. Usazenina byla třikrát promyta HCl o koncentraci 0,2 g·dm⁻³ (pH < 1) a jednou destilovanou vodou. Nakonec byly získané huminové kyseliny vysušeny při 50 °C.

HK 2 je vzorek izolovaný podobným způsobem jako HK 1 s tím rozdílem, že jako extrakční roztok byla použita směs 0,5 g·dm⁻³ NaOH + 0,1 g·dm⁻³ Na₄P₂O₇. Vysušené huminové kyseliny byly dále přečištěny směsí HCl a HF (10 cm³ konc. HCl + 20 cm³ konc. HF + 1970 cm³ H₂O). Tento roztok byl ponechán 24 hodin třepat a následně byl odstředěn. Po dekantaci byla usazenina znovu zalita zředěným roztokem HCl + HF a 24 hodin protřepávána. Roztok byl znovu slit a usazenina promývána vodou, dokud nebyla zkouška AgNO₃ na Cl⁻ negativní. Poté byly získané huminové kyseliny vysušeny při 50 °C.

HK 3 je vzorek izolovaný stejným extrakčním činidlem jako HK 2, ale výchozí poměr lignit : extrakční činidlo byl 50 g : 1 dm³. Po odstředění byla směs HCl a HF přidána rovnou ke sraženině a vše bylo ponecháno na míchačce přes noc. Následující den byl vzorek promyt destilovanou vodou, znovu odstředěn a následně dialyzován v membránách (3500 Da) proti

destilované vodě po dobu jednoho týdne (voda byla měněna každý den za čerstvou). Sušení bylo provedeno v lyofilizátoru ($-15\text{ }^{\circ}\text{C}$).

3.4 Charakterizace huminových kyselin

Získané vzorky byly charakterizovány pomocí elementární analýzy a stanovením celkové kyselosti.

Elementární analýza byla provedena na přístroji CHNSO Mikroanalyzátor Flash 1112 (Carlo Erba) v Ústavu struktury a mechaniky hornin AVČR v Praze.

Celková kyselost byla stanovena na základě konduktometrické titrace suspenze huminových kyselin ($1\text{ g} : 50\text{ cm}^3$) roztokem NaOH o koncentraci $0,1\text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$. V průběhu titrace byl zaznamenán vliv přídavku odměrného roztoku na vodivost. Bod ekvivalence byl vyhodnocen jako průsečík dvou lineárních částí (viz Obr. 6).

3.5 Stanovení pK_a huminových kyselin

Hodnoty pK_a huminových kyselin byly stanoveny dvěma různými způsoby. První způsob spočíval ve vyhodnocení potenciometrických titračních křivek, které byly získány při stanovení celkové kyselosti vzorků (viz kapitola 3.4), tradiční metodou podle Hendersona-Hasselbacha.

Druhým způsobem bylo spektrofotometrické stanovení pK_a provedené následujícím způsobem. Byly připraveny vodné suspenze huminových kyselin o různých koncentracích (2, 20, 40, 100 a $500\text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$). Po 24-hodinovém třepání bylo u výluhů změřeno pH, vodivost, UV/VIS spektrum. Poté byly výluhy zředěny v poměru 1:10 s vodou (bylo změřeno pH), HCl a NaOH o koncentracích $0,1\text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$. Byla proměřena UV/VIS spektra v rozsahu vlnových délek $\lambda \in \langle 200; 800 \rangle\text{ nm}$. Disociační konstanta byla stanovena podle následujícího vztahu:

$$pK_a = pH + \log \frac{A_{ve\ vodě} - A_{v\ NaOH}}{A_{v\ HCl} - A_{ve\ vodě}}, \quad (16)$$

Absorbance A byly dosazovány vždy pro stejnou vlnovou délku, $\lambda \in \langle 250; 300 \rangle\text{ nm}$. Za pH bylo dosazováno pH výluhů vody.

4. VÝSLEDKY A DISKUZE

4.1 Charakterizace huminových kyselin

U jednotlivých vzorků huminových kyselin byla provedena elementární analýza, která určila obsah popela u jednotlivých vzorků huminových kyselin a dále procentuální zastoupení uhlíku, vodíku, kyslíku, dusíku a síry. Výsledky elementární analýzy jsou uvedeny v Tab. 1.

Ve zkoumaných huminových kyselinách byl obsah kyslíku stanoven v rozmezí 39,0 až 47,7 atomových % a obsah kyslíku se pohybuje mezi 10,0 a 16,7 atomových %. Nejméně kyslíku je obsaženo v huminové kyselině HK 2 a nejvíce pak v huminové kyselině HK 3.

Je patrné, že v huminových kyselinách jsou nejvíce zastoupeny prvky kyslík, uhlík a vodík. Prvky síra a dusík jsou v těchto látkách zastoupeny pouze ve stopovém množství.

Tab. 1 Elementární analýza vzorků huminových kyselin (atomová % přepočtena na suché bezpopelové huminové kyseliny)

| vzorek | atomová % | | | | | hm. % |
|--------|-----------|------|------|-----|-----|-------|
| | C | H | O | N | S | popel |
| HK 1 | 39,0 | 43,7 | 16,1 | 0,9 | 0,3 | 28,8 |
| HK 2 | 43,9 | 40,2 | 15,0 | 0,7 | 0,2 | 1,9 |
| HK 3 | 47,7 | 33,9 | 16,7 | 1,0 | 0,7 | 3,6 |

Během analýzy vzorků huminových kyselin bylo zjištěno, že výrazně nejvíce popela je obsaženo v HK 1. Nejméně popela bylo přítomno v HK 2. To souvisí se způsobem přípravy vzorků. Jak je uvedeno v kapitole 3.3. HK 1 byla totiž pouze třikrát promývána HCl a jednou destilovanou vodou, kdežto HK 2 byla důkladně promyta směsí HCl s HF a potom vodou až do úplného odstranění Cl⁻ iontů. U HK 2 je rovněž obsah popela nízký, byla totiž promyta směsí HCl a HF a poté byla pročištěna dialýzou proti vodě.

Tab. 2 Celková kyselost huminových kyselin

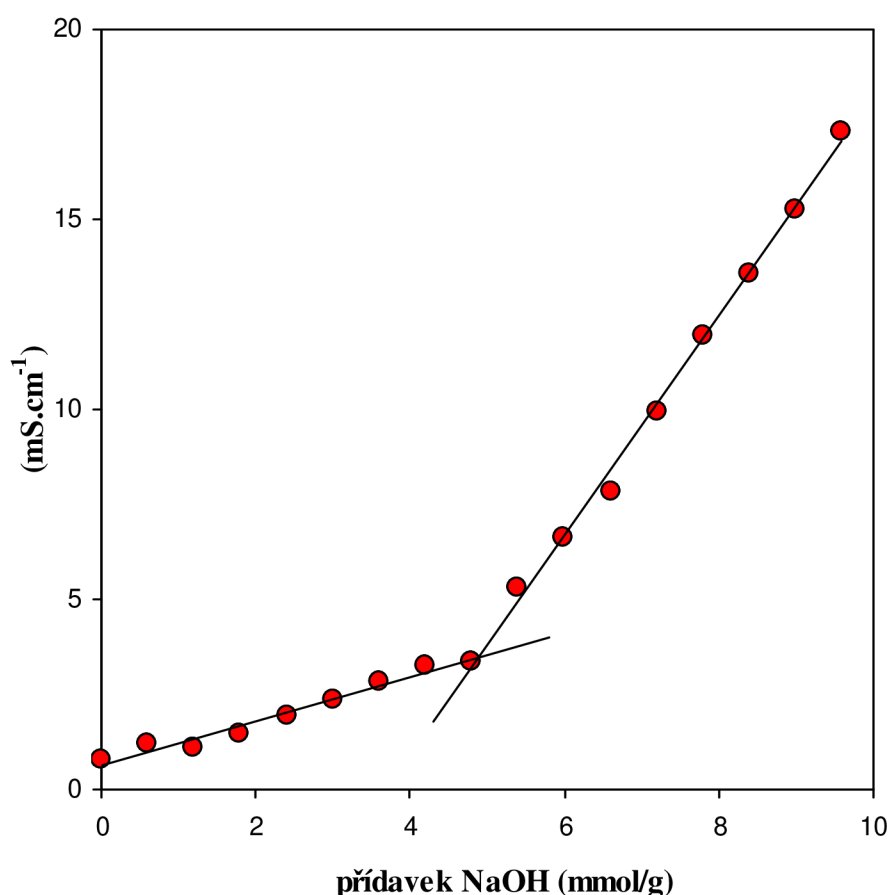
| vzorky | celková kyselost [mm·g ⁻¹] |
|--------|--|
| HK 1 | 6,38 |
| HK 2 | 4,94 |
| HK 3 | 5,75 |

Tady se opět projevilo to, že vzorky huminových kyselin byly připravovány různými metodami. HK 1 byla připravena bez zvláštního čištění, proto má nejvíc obsahu popela, na druhé straně se vynecháním čištění zamezuje vymytí nejrozpuštěnějších frakcí, čili těch které obsahují nejvíce kyselých skupin. HK 3 prodělala během své přípravy dialýzu a lyofilizaci. HK 2 byla opakovaně čištěná zředěným roztokem HCl + HF. Z toho vyplývá, že

HK 3 i HK 2 mají nižší celkovou kyselost způsobenou vymýváním kyselých funkčních skupin během přípravy.

Ze zjištěných hodnot celkové kyselosti (viz. Tab. 2) je patrné, že ze všech pozorovaných huminových kyselin je nejkyslejší HK 1. Naopak nejméně kyselá je HK 2.

HK 2 má nejméně kyslíku i nejnižší kyselost (viz. Tab. 1, Tab. 2). HK 3 obsahuje nejvíce kyselých funkčních skupin, přestože má kyslíku méně než HK 2. To vypovídá o různém rozložení kyslíku mezi jednotlivé funkční skupiny a to zejména mezi karboxylové skupiny, které jsou nejvýznamnější v podílu celkové kyselosti, ale i mezi skupinami alkoholů a fenolů. Rovněž se kyslík může vyskytovat např. v heterocyklických strukturách nebo jako můstek – O –.

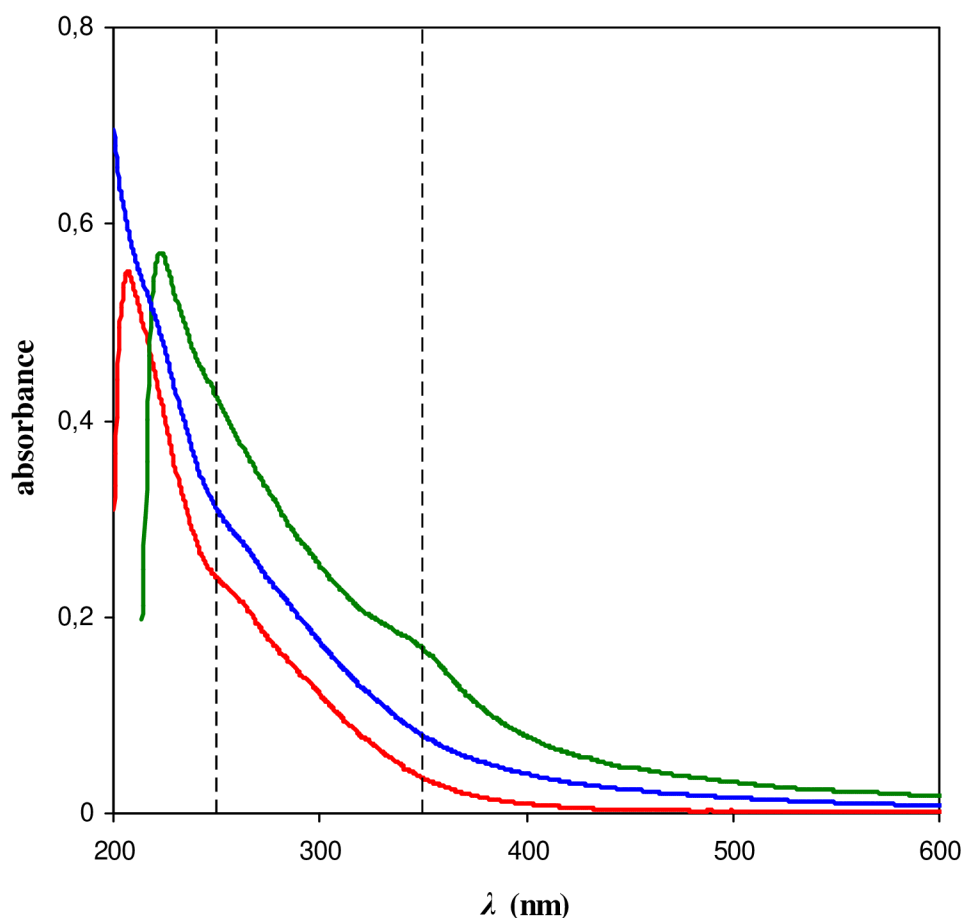


Obr. 6 Titrace suspenze HK 2 pro stanovení celkové kyselosti

4.2 Stanovení pK_a huminových kyselin

Pro stanovení hodnoty pK_a byly používány pouze hodnoty absorbcí v rozsahu vlnových délek 250 – 350 nm a to z důvodu, aby absorpce nebyly moc nízké ani moc vysoké a spektra jednotlivých vzorků huminových kyselin se nekřížila. V Obr. 7 je vidět, že hodnoty absorbcí pod hranicí vlnové délky 250 nm dosahují absorpčního maxima a dokonce zde dochází i ke křížení jednotlivých spekter. Na stejném grafu je patrné, že hodnoty absorbcí

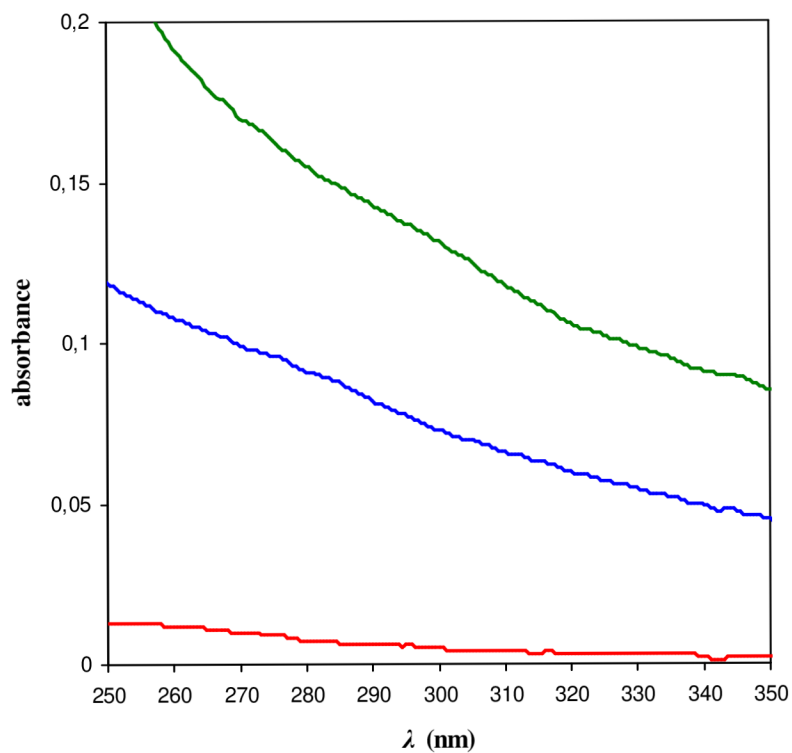
nad hranicí vlnové délky 350 nm jsou příliš nízké a rozdíly mezi absorbancemi u jednotlivých vzorků jsou minimální, což by mohlo při jejich porovnávání vést k poměrně velké chybivosti.



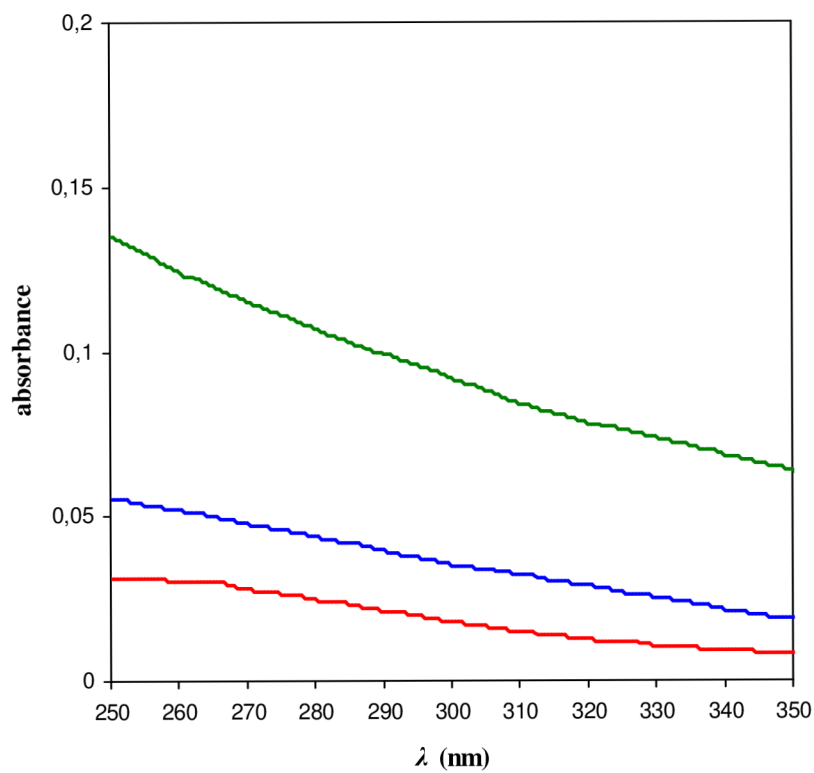
Obr. 7 UV/VIS spektrum ve vodě (modrá), v roztoku HCl (červená) a NaOH (zelená) pro HK 1 při koncentraci $40 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$.

V grafu na Obr. 8 je znázorněno UV/VIS spektrum výluhů HK 1 ve vodě, v HCl a v NaOH při koncentraci $2 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$. Je zde vidět, že nejnižší hodnoty absorbance má výluh HK 1 rozpouštěný v HCl. Tyto hodnoty jsou v řádech setin a pro vlnové délky nad 350 nm se blíží nule. Dosazení takovýchto hodnot do rovnice (17) by vedlo ke značně nepřesně stanoveným hodnotám pK_a . Obr. 9 představuje graf UV/VIS spekter u výluhů HK 2 ve stejných prostředích jako u HK1. Situace je zde obdobná jako u HK 1. Výluhy rozpouštěné v HCl mají příliš nízké hodnoty absorbance. U HK 2 je poměrně nízká absorbance i u výluhů zředěných s vodou.

U koncentrace $2 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ jsou příliš nízké hodnoty absorbance, zejména u výluhů zředěných s HCl a někdy i u výluhů zředěných s vodou. Z tohoto důvodu je u této koncentrace zaznamenána velká chyba v měření i ve výpočtu. Tato koncentrace je nevhodná pro spektrofotometrické stanovení disociační konstanty.

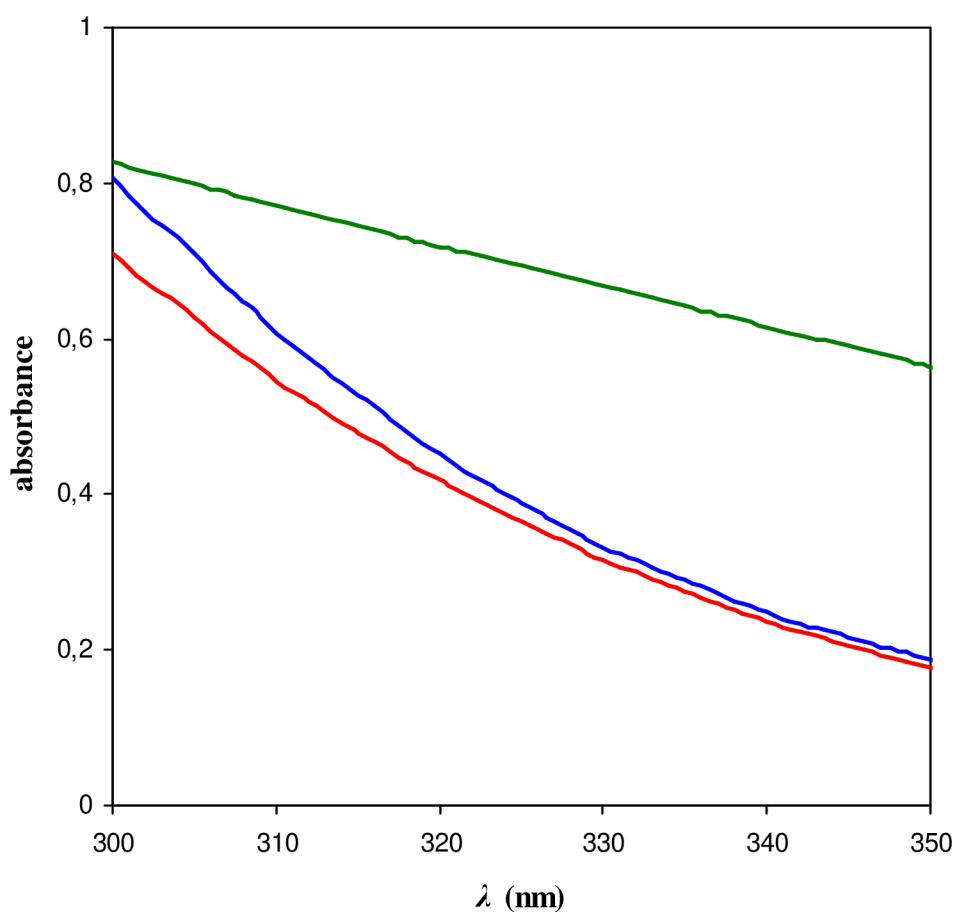


Obr. 8 UV/VIS spektrum ve vodě (modrá), v roztoku HCl (červená) a NaOH (zelená) pro HK 1 při koncentraci $2 \text{ g} \cdot \text{dm}^3$



Obr. 9 UV/VIS spektrum ve vodě (modrá), v roztoku HCl (červená) a NaOH (zelená) pro HK 2 při koncentraci $2 \text{ g} \cdot \text{dm}^3$

Koncentrace $500 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$ je rovněž nevhodná pro spektrofotometrické stanovení disociační konstanty. Absorbance výluhů ve vodě mají velice podobné hodnoty jako absorbance výluhů v HCl. Je to zapříčiněno tím, že při takto vysoké koncentraci samotná disociace huminových způsobí takový pokles pH, že výluh je i bez přidání HCl poměrně silně kyselý (viz. Tab. 4). Z tohoto důvodu jsou hodnoty získané při ředění vodou a HCl velmi podobné. Tato situace je zachycena na obrázku Obr. 10, kde je uveden příklad UV/VIS spektra u HK 1 při koncentraci $500 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$. Je zde vidět, že UV/VIS spektrum HK 1 ve vodě se jen minimálně liší od spektra vzorku měřeného v HCl.

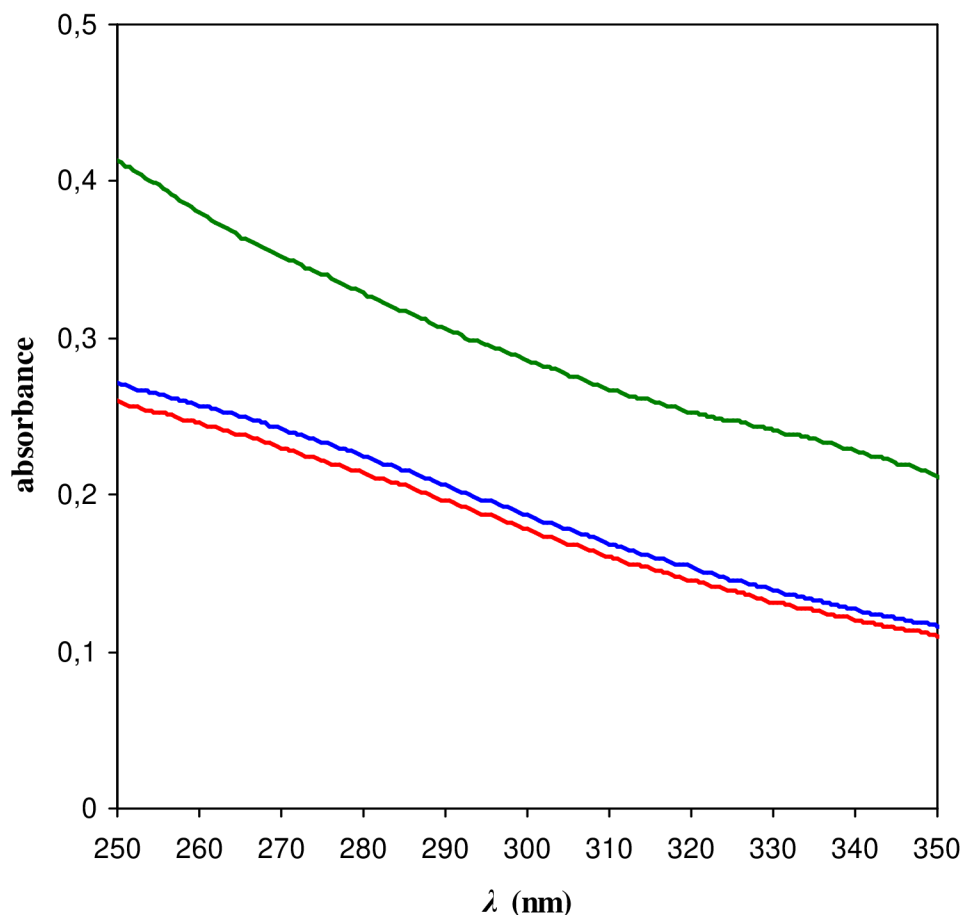


Obr. 10 UV/VIS spektrum ve vodě (modrá), v roztoku HCl (červená) a NaOH (zelená) pro HK 1 při koncentraci $500 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$

Tab. 3 Hodnoty pH výluhů po ředění vodou (v tabulce jsou uvedeny koncentrace suspenzí před ředěním)

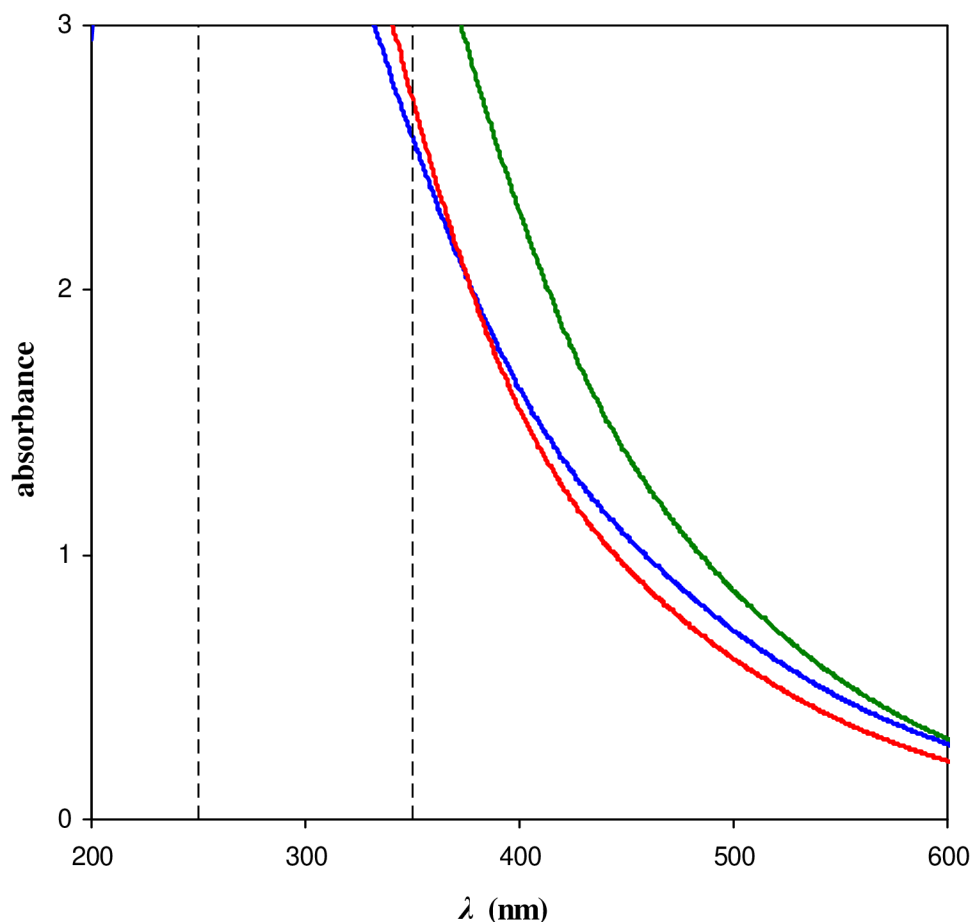
| vzorek | pH | | | | |
|--------|----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|
| | $2 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$ | $20 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$ | $40 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$ | $100 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$ | $500 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$ |
| HK 1 | 4,74 | 3,94 | 3,48 | 3,24 | 2,57 |
| HK 2 | 5,54 | 3,48 | 3,50 | 2,82 | 2,11 |
| HK 3 | 8,87 | 7,44 | 6,37 | 4,61 | 3,65 |

Na Obr. 11 je uveden příklad UV/VIS spektra HK 2 při koncentraci $100 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$. Opět zde dochází k tomu, že pH výluhu ve vodě je příliš nízké díky disociaci, a proto jsou UV/VIS spektra výluhů ve vodě a v HCl téměř stejná.



Obr. 11 UV/VIS spektrum ve vodě (modrá), v roztoku HCl (červená) a NaOH (zelená) pro HK 2 při koncentraci $100 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$

Nevhodnost koncentrace $100 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ je patrná i z UV/VIS spektra HK 3 uvedeného na obrázku Obr. 12. Hodnoty absorbancí u HK 3 jsou velice vysoké a tedy nepoužitelné pro výpočet pK_a . Je vidět, že i když na ose y jsou absorbance až do tří (což jsou pořád příliš vysoké hodnoty), spektra téměř mívají požadované rozmezí vlnových délek pro vyhodnocování získaných dat. Rovněž je zde hodnota absorbancí výluhů ve vodě velmi podobná těm v HCl a v některých místech dokonce hodnoty absorbancí výluhů v HCl převyšují hodnoty koncentrací výluhů ve vodě. Tato koncentrace mohla být použita pro výpočet pK_a pouze u vzorku HK 1, kdy naměřená spektra odpovídala požadavkům jak v hodnotách absorbancí, tak v dostatečných rozdílech mezi ředěním vodou a HCl, obecně ji však pro tento účel nelze doporučit.

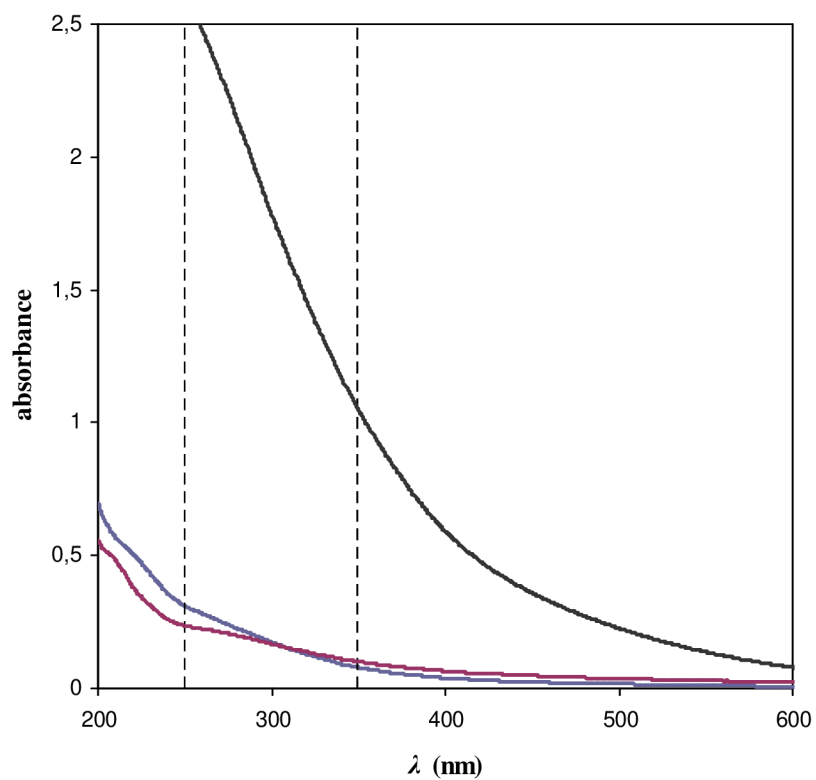


Obr. 12 UV/VIS spektrum ve vodě (modrá), v roztoku HCl (červená) a $NaOH$ (zelená) pro HK 3 při koncentraci $100 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$

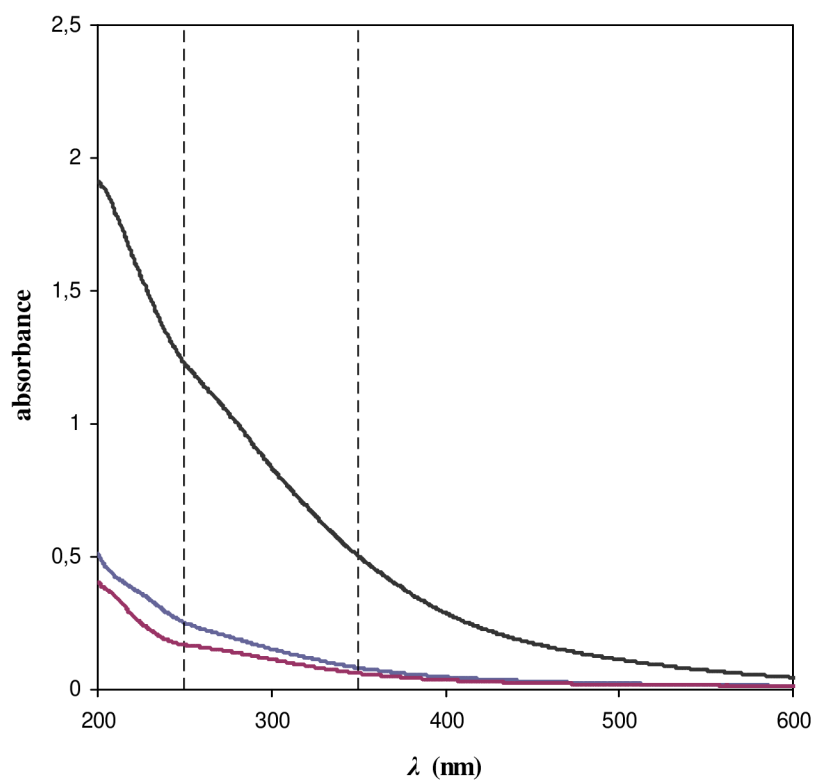
Tab. 4 Zdánlivé disociační konstanty získané spektrofotometrickou metodou

| vzorek | $20 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ | | $40 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ | | $100 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ | |
|--------|-------------------------------------|-------|-------------------------------------|-------|--------------------------------------|-------|
| | pK_{app} | \pm | pK_{app} | \pm | pK_{app} | \pm |
| HK 1 | 3,86 | 0,06 | 3,73 | 0,05 | 3,19 | 0,25 |
| HK 2 | 4,27 | 0,11 | 3,88 | 0,11 | x | x |
| HK 3 | 7,68 | 0,11 | 6,49 | 0,28 | x | x |

Ideální pro porovnávání jsou proto koncentrace $20 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ a $40 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$. Stanovené hodnoty pK_a pro jednotlivé vzorky jsou uvedeny v Tab. 4. Podle nich nejspíše disociuje HK 1, nejhůře HK 3. Výsledky získané pro HK 1 a 2 jsou poměrně blízké, což je způsobeno podobností přípravy. Mírně snížená schopnost disociace u HK 2 je zřejmě způsobena vymytím nejrozpuštěnějších frakcí při čištění vzorku. Vzorek HK 3 je velmi odlišný a podle jeho pK_a by se mohlo zdát, že bude též nejméně rozpustný. Z grafů na obrázcích Obr. 13 a Obr. 14 je ale patrné, že HK 3 se dobře rozpouští a má vysoké hodnoty absorbancí v porovnání s HK 1 i HK 2. To je zřejmě způsobeno odlišným způsobem přípravy, zejména lyofilizací.



Obr. 13 UV-VIS spektrum ve vodě pro HK 1 (modrá), HK 2 (fialová) a HK 3 (černá) při koncentraci $40 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$.



Obr. 14 UV-VIS spektrum HK 1 (modrá), HK 2 (fialová) a HK 3 (černá) při koncentraci $20 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$.

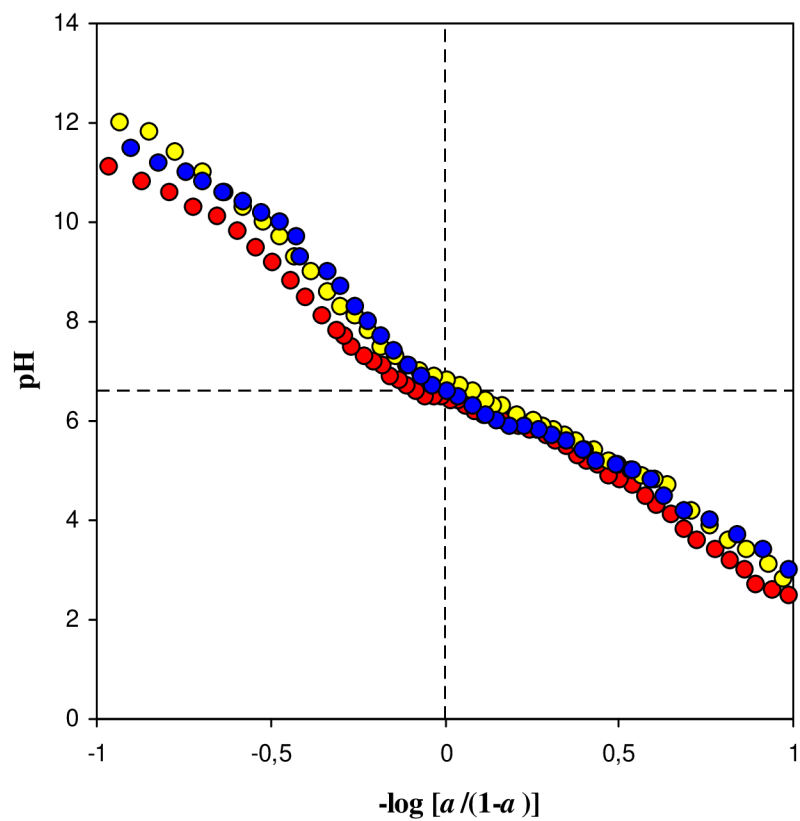
Posuzujeme-li stanovené hodnoty pK_a v závislosti na použité koncentraci výchozí suspenze, zjistíme, že hodnoty s rostoucí koncentrací mírně klesají. To bylo zjištěno u všech tří vzorků, i když pouze u HK 1 se podařilo získat výsledky pro tři různé koncentrace (viz. Tab. 4). Pokles je způsoben tím, že při vyšších koncentracích přednostně disociují více kyselé frakce huminových kyselin, pokles pH pak posunuje rovnováhu disociace méně kyselých funkčních skupin směrem k jejich protonizované formě. U vyšších koncentrací, pak zpravidla též roste chyba stanovení, což je patrné zejména u koncentrace $100 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$.

Z těchto výsledků uvedených v tabulce Tab. 4 lze vyvodit, že nevhodnější koncentrací pro spektrofotometrické stanovení disociačních konstant je $20 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$. Výsledky pro tuto koncentraci byly proto vybrány pro srovnání s výsledky podle Hendersona-Hasselbacha, které jsou uvedeny v Tab. 5. Příklad stanovení pK_a touto metodou pro HK 1 je uveden na Obr. 15, hodnoty pK_a jsou pak v Tab. 5.

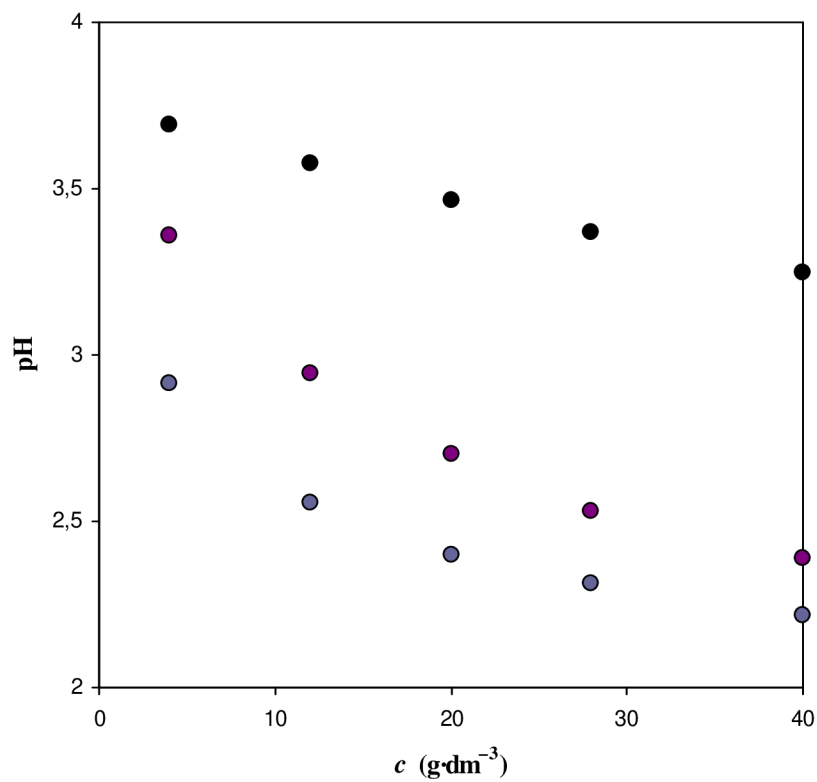
Podle Hendersona-Hasselbacha by měla nejméně disociovat HK 2, což ovšem není pravda. Srovnáme-li hodnoty pH u výluhů suspenzí jednotlivých vzorků před ředěním (Obr. 16), zjistíme, že produkce H^+ iontů je největší u HK 1, následuje HK 2 a nejméně kyselý výluh dává HK 3. Pořadí tedy odpovídá hodnotám pK_a stanoveným spektrofotometricky a tato metoda nám tedy zprostředkovává takové hodnoty disociačních konstant, které korespondují se skutečnými disociačními schopnostmi, což je výhoda oproti datům získaných podle Hendersona-Hasselbacha. Spektrofotometrické stanovení disociační konstanty je i mnohem jednodušší, neboť u metody podle Hendersona-Hasselbacha je nutno provádět mnohdy dosti komplikované titrace.

Tab. 5 Zdánlivé disociační konstanty získané metodou podle Hendersona_Hasselbacha

| vzorky | Henderson-Hasselbach ($20 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$) | |
|--------|--|-------|
| | pK_{app} | \pm |
| HK 1 | 6,63 | 0,15 |
| HK 2 | 9,33 | 0,10 |
| HK 3 | 7,89 | 0,12 |



Obr. 15 Henderson-Hasselbachova závislost u HK 1



Obr. 16 Závislost pH na koncentraci. HK 1 (modrá), HK 2 (fialová), HK 3 (černá).

5. ZÁVĚR

Cílem této bakalářské práce bylo ověřit možnost využití UV/VIS spektrofotometrie jako alternativní metody pro stanovení pK_a huminových kyselin a srovnat dosažené výsledky s dosud využívanou metodou podle Hendersona-Hasselbacha. Práce byla založena na shromáždění materiálů pro rešeršní část, která tvoří její teoretický základ. Dále byla provedena experimentální část, která navazovala na předchozí provedené práce na Ústavu fyzikální a spotřební chemie Fakulty chemické VUT v Brně.

Na experimentální část byly použity vzorky huminových kyselin extrahovaných z lignitu. U výluhů huminových kyselin bylo proměřeno pH, vodivost a UV-VIS spektra. Z výluhů byly připraveny roztoky huminových kyselin ve třech různých prostředích s rozdílnými hodnotami pH. Výluhy byly ředěny vodou, HCl a NaOH.

Z naměřených dat byly určeny koncentrace huminových kyselin, které se hodí pro UV/VIS spektrofotometrické stanovení pK_a huminových kyselin.

U dat pro nejvhodnější koncentraci byly vyhodnoceny hodnoty disociačních konstant jak UV/VIS spektrofotometricky, tak metodou podle Hendersona-Hasselbacha. Po porovnání výsledků jsem došla k názoru, že UV/VIS spektrofotometrická metoda koresponduje se skutečnými disociačními schopnostmi kyselin, což je výhodou oproti hodnotám z metody podle Hendersona-Hasselbacha, které se doposud běžně používají. Co se týče provedení, je spektrofotometrické stanovení mnohem jednodušší. Titrace u Hendersona-Hasselbacha jsou totiž často dosti složité a zdlouhavé.

Spektrofotometrická metoda má jistě uplatnění v dalším výzkumu. V budoucnu by bylo lepší místo vody používat pufr, aby nebylo pH roztoků tak moc ovlivněno disociací kyselin a bylo by tak možné pozorovat i hodnoty disociačních konstant pro vyšší koncentrace. Pro upřesnění použití této metody, by bylo dobré proměřit disociační konstanty pro vzorky huminových kyselin IHSS.

6. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] Oficiální stránky společnosti Humatex, a.s [online]. 1999, poslední revize 20.3.2010 [cit. 22. 3. 2010]. Dostupné z:< <http://www.humatex.cz/himinove-latky.html>>.
- [2] Oficiální stránky The University of British Columbia, Faculty of Land and Food Systems [online]. 1999, last revision 20th February 2010 [cit. 21. 2. 2010]. Dostupné z: <http://www.landfood.ubc.ca/soil200/components/organic_compunds.htm>.
- [3] Kumada, K.: *Chemistry of Soil Organic Matter*. 1st edition. Tokyo: Japan Scientific Societies Press, 1987. 242 p. ISBN 4-7622-0534-6.
- [4] Čechová, E.: Chování huminových kyselin ve vodných roztocích, diplomová práce, FCH VUT Brno, 2008.
- [5] Weber, J.: Soil Humic Substances [online]. 1997, last modified 1997 [cited 2010-03-15]. Accessible from: <http://www.ar.wroc.pl/~weber/humic.htm#start>.
- [6] Stevenson, F. J.: *Humus chemistry: Genesis, Composition, Reaction*. 2nd edition. New York: Wiley, 1994. 512 p. ISBN 0-471-59474-1.
- [7] Engebretson R.R. and von Wandruszka R.: Microorganization in dissolved humic acids, *Environmental & Science Technology*, 28 (11), 1934, 1994
- [8] MacCarthy, P.: The principles of humic substances: An introduction to the first principle. In: E. A. Ghabbour, G. Davies (Eds.) *Humic substances: Structures, Models and Functions*. Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK, 1998, p. 19–30.
- [9] Klikorka, J.: *Obecná a anorganická chemie*. 2. vydání. Praha: SNTL, 1985. 591 s.
- [10] Pouchlý, J.: *Fyzikální chemie makromolekulárních a koloidních soustav*. 2. vydání. Praha: VŠCHT, 2001. 198 s. ISBN 80-7080-331-2.
- [11] Malijevský, A.: *Breviář z fyzikální chemie*. 1. vydání. Praha: VŠCHT, 2000. 280 s. ISBN 80-7080-403-3.
- [12] Fukushima M., Tanaka S., Hasebe K., Taga M., Nakamura H.: Interpretation of the acid-base equilibrium of humic acid by a continuous pK distribution and electrostatic model. *Analytica Chimica Acta*, 1995, no. 2-3, vol. 302, pp. 365-373.
- [13] Masini, J.C.: Evaluation of neglecting electrostatic interactions on the determination and characterization of the ionizable sites in humic substances. *Analytica Chimica Acta*, 1993, vol. 93, no. 3, pp. 803 – 810.
- [14] Ceppi, S.B., Velasco, M.I., Pauli, C.P.: Differential scanning potentiometry: surface charge development and apparent dissociation constants of natural humic acids. *Elsevier*, 1999, vol. 50, no. 5, pp. 1057–1063, ISSN 0039-9140.
- [15] Tipping, E., Reddy, M. M., Hurley, M. A.: Modelling Electrostatic and Heterogeneity Effects on Proton Dissociation from Humic Substances. *Environmental Science Technology*, 1990, vol. 24, no. 11, pp. 1700–1705. ISSN 0013–396.
- [16] Jin-Zhou, D., Zheng, Ch., Zi-Ping, Z., Zu-Yi, T., Chang-Qing, L.: Acid Dissociation Constants of Functional Groups in Humic Substances: I. Affinity Spectrum Model

- Analysis of Potentiometric Data of Fulvic and Humic Acids Solutions from Weathered Coal and Dark Loessial Soil. *Pedosphere*, 1994, vol. 4, No. 3, pp. 201-208. ISSN 1002–0160.
- [17] Campitelli, P. A., Velasco, M., I., Ceppi, S., B.: Chemical and physicochemical characteristics of humic acids extracted from compost, soil and amended soil. *Talanta*, 2006, vol. 69, No. 5, pp. 1234-1239. ISSN 0039-9140.
- [18] Porasso, R. D., Benegas, J. C., Hoop, M. A. G. T., Paoletti, S.: Analysis of potentiometric titrations of heterogenous natural polyelectrolytes in terms of counterion condensation theory: application to humic acid. *Biophysical Chemistry*, 2000, vol.86, no. 1, pp. 59-69. ISSN 0301-4622.
- [19] Arai, S., Kumada, K.: An interpretation of the conductometric titration curve of humic acid. *Geoderma*, 1977, vol. 19, no. 1, pp. 21-35. ISSN 0016-7061.
- [20] Ephraim, J. H.: Non – aqueous titration of a fulvic acid sample, with use of an internal reference compound. *Talanta*, 1989, vol. 36, no. 3, pp. 379-382. ISSN 0039-9140.
- [21] Naganawa, H., Sekine, T.: Spectrophotometric Determination of Disociation Constant of Picrates in 4-Methyl-2-pentanone. *Analytical science*, 1987, vol. 3, pp. 427-431.
- [22] Tiwari, S., Ghosh, K. K. Marek, J., Kuca, K.: Spectrophotometric Determination of the Acidity Constants of Some Oxime-Based α -Nucleophiles. *J. Chem. Eng. Data*, 2010, vol. 55, no. 3, pp 1153-1157.
- [23] Cessna, A. J., Grover, R.: Spectrophotometric Determination of Disociation Constants of Selected Acidic Herbicides. *J. Agric. Food Chem.*, 1978, vol. 26, no. 1, pp 289-297.
- [24] Niazi, A., Zolgharnein, J., Davoodabadi, M. R.: Spectrophotometric determination of acidity constant of some indicators in various mecellar media solutions by rank annihilation factor analysis. *Spectrochimica acta*, 2008, vol. 70, pp. 343-349.
- [25] Roman, L., Mirel, S., Florean, E., Oprean, R. The potentiometric and spectrophotometric determination of dissociation constants for same 2-mercapto-5-R-amino-1,3,4-thiadiazole derivatives. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 1998, vol. 18, no. 1-2, pp 137-44.

7. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

| | |
|----------------|--|
| pK_a | disociační konstanta |
| pH | hodnoty pH |
| UV | oblast ultrafialového světla elektromagnetického záření |
| VIS | viditelná oblast elektromagnetického záření |
| HA | slabá jednosytná kyselina |
| K | rovnovážná konstanta |
| a | aktivita |
| c | molární koncentrace |
| α | stupeň disociace |
| γ | aktivitní koeficient |
| γ_{\pm} | střední aktivitní koeficient |
| H_2A | silná dvojsytná kyselina |
| pK_{app} | zdánlivá disociační konstanta |
| V | objem |
| b_c | celková kyselost |
| g_{HA} | navážka vzorku huminové kyseliny |
| L | ionizované funkční skupiny |
| λ | vlnová délka |
| HA 1 | vzorek huminové kyseliny |
| HA 2 | vzorek huminové kyseliny |
| HA 3 | vzorek huminové kyseliny |
| IHSS | vzorky huminových kyselin z International Humic Substances Society |