

VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE

INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

VYUŽITÍ METOD IZOLACE A FRAKCIONACE PRO STANOVENÍ OBSAHU HUMINOVÝCH LÁTEK V LEONARDITU

ISOLATION AND FRACTIONATION METHODS FOR DETERMINATION OF HUMIC
SUBSTANCES CONTENT IN LEONARDITE

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Kateřina Lišková

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. Vojtěch Enev, Ph.D.

Brno 2019

ABSTRAKT

Hlavním cílem této bakalářské práce byla izolace huminových látek (HK a FK) z přírodního vzorku Leonarditu a jejich následná strukturní a fyzikálně-chemická charakterizace. Mimo jiné byl studován i standard huminových kyselin dodávaný společností IHSS, izolovaný z Leonarditu původem z Dakoty, USA. K charakterizaci příslušných vzorků izolovaných huminových látek byly zvoleny následující termické a spektrometrické metody: termogravimetrická analýza (TGA), elementární analýza (EA), molekulová absorpční spektrometrie v ultrafialové a viditelné oblasti elektromagnetického záření (UV/Vis) a infračervená spektrometrie s Fourierovou transformací (FTIR). Z výsledků elementární analýzy byly stanoveny atomové poměry. Z naměřených UV/Vis spekter byly vypočteny absorpční koeficienty, které byly použity k fyzikálně-chemické charakterizaci těchto biokoloidních sloučenin. Naměřená infračervená spektra byla použita k identifikaci jednotlivých funkčních skupin.

KLÍČOVÁ SLOVA

Leonardit, huminové kyseliny, fulvinové kyseliny, izolace, UV/Vis, FTIR

ABSTRACT

The main aim of this thesis was to isolate humic substances (HA and FA) from the natural sample of Leonardite, to characterize their structure and physical and chemical properties. Among other things, the humic acid standard supplied by IHSS, isolated from Leonardite, originally from Dakota, USA, was also studied. The following thermal and spectrometric methods were used to characterize the samples of isolated humic substances: thermogravimetric analysis (TGA), elemental analysis (EA), ultraviolet-visible spectrometry (UV / Vis) and infrared spectrometry with Fourier transformation (FTIR). The atomic ratios were determined from the results of the elemental analysis. Absorption coefficients were calculated from the measured UV/Vis spectra and were used for the physicochemical characterization of these biocolloid compounds. The measured infrared spectra were used to identify the individual functional groups.

KEYWORDS

Leonardite, humic acids, fulvic acids, isolation, UV/Vis, FTIR

LIŠKOVÁ, Kateřina. *Využití metod izolace a frakcionace pro stanovení obsahu huminových látek v leonarditu*. Brno, 2019. Bakalářská práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav fyzikální a spotřební chemie. Vedoucí práce Vojtěch Enev.

ČESTNÉ PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracoval samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně odcitoval. Bakalářská 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.

.....

podpis studenta

PODĚKOVÁNÍ

Na tomto místě bych ráda poděkovala svému vedoucí bakalářské práce Ing. Vojtěchu Enevovi, Ph.D. za trpělivost, ochotu, odborné rady, cenné podněty a čas, který mi věnoval.

OBSAH

ÚVOD	5
1. TEORETICKÉ ZÁKLADY	6
1.1. Vznik hnědého uhlí.....	6
1.1.1. Biochemická fáze	6
1.1.2. Geochemická fáze	6
1.2. Složení hnědého uhlí	6
1.3. Huminové látky	7
1.3.1. Rozdělení huminových látek	7
1.3.2. Vznik huminových látek.....	9
1.3.3. Molekulární struktura huminových látek	10
1.3.4. Využití huminových látek	12
1.4. Izolace huminových látek.....	13
1.4.1. Izolace z kapalných vzorků	14
1.4.2. Izolace z pevných matric	14
2. SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	15
3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	17
3.1. Použité chemikálie.....	17
3.2. Použité přístroje.....	17
3.3. Postup	17
3.3.1. Separace HK.....	17
3.3.2. Separace FK.....	18
3.4. Základní fyzikálně-chemická charakterizace	19
3.4.1. Elementární analýza	19
3.4.2. TGA a stanovení obsahu HK a FK ve vzorku.....	19
3.4.3. UV-VIS spektrometrie.....	20
3.4.4. FTIR spektrometrie	20
4. VÝSLEDKY A DISKUZE	21
5. ZÁVĚR	25
6. ZDROJE	26
SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ	30
Seznam použitých zkratk	30
Seznam použitých symbolů	31
PŘÍLOHY	32

ÚVOD

Huminové látky (HL) jsou přírodní organické sloučeniny, které obsahují širokou řadu molekul s relativně nízkou molekulovou hmotností (200-300 Da), které jsou navzájem vázány van der Waalsovými silami, π - π , CH- π a vodíkovými vazbami. Udává se, že HL jsou nejrozšířenější organický materiál na Zemi. Tyto látky hrají důležitou roli v celém ekosystému a podílí se na mnohých zásadních procesech. Jednotlivé frakce huminových látek – huminové kyseliny (HK), fulvinové kyseliny (FK) a huminy (HU) se v přirozeném prostředí mohou vyskytovat v mnoha různých formách. Nejčastěji se v přírodě setkáváme s huminovými látkami v pevné fázi jako součást tzv. organominerálního komplexu. Vyskytují se také jako součást rašeliny, uhlí, lignitu, Leonarditu či půdy. Huminové látky vznikají postupnou degradací biologického materiálu. V závislosti na původu, charakteru výchozího biologického materiálu, nalezišti, průběhu jeho degradace a mimo jiné i době odběru dochází ke značným diferencím v chemickém a strukturním složení HL. Nejen kvůli těmto důvodům není přesná struktura HL zcela objasněná a zůstává předmětem intenzivního výzkumu.

Leonardit je oxidovaná forma lignitu s hnědým a uhlíovým vzhledem, často se vyskytující v mělkých hloubkách, kde překrývá kompaktnější uhlí. Poprvé byl Leonardit definován geologem Arthurem G. Leonardem v Severní Dakotě, USA, jako "měkká, zemitá, středně hnědá, uhlí-podobná látka", která doprovázela tamní ložiska lignitu. Jedná se o směs huminových látek s minerály jako je sádrovec, jíl a křemen. Právě Leonardit je v poslední době čím dál tím častěji využíván jako výchozí zdroj pro izolaci HL, především díky jeho dostupnosti, nízké ceně a vysokému obsahu HL, z čehož je převážná část tvořena HK. V souvislosti s možnou budoucí aplikací HL izolovaných z Leonarditu je důležitá znalost jejich struktury a charakteru a množství funkčních skupin, které ovlivňují chování a reaktivitu těchto *biokoloidních* sloučenin. Zde se nabízí využití nedestruktivních analytických metod: molekulové absorpční spektrometrie v ultrafialové a viditelné oblasti záření (UV/Vis) a infračervené spektrometrie s Fourierovou transformací (FTIR). V obecném pohledu jsou tyto metody schopny poskytnout důležité informace týkající se charakteru, obsahu funkčních skupin, struktury a jejich reaktivity.

1. TEORETICKÉ ZÁKLADY

1.1. Vznik hnědého uhlí

Proces vzniku uhlí probíhá ve dvou fázích: *biochemické* a *geochemické*. V průběhu biochemické fáze dochází nejprve k nahromadění odumřelého rostlinného materiálu a později k jeho rozkladu. Rozkladné procesy jsou děleny na tlení, trouchnivění, hnití a rašelinění. Dochází k nim ještě předtím, než je rozkládající se biomasa zakryta sedimentem [1].

1.1.1. Biochemická fáze

Při dokonalém okysličování dochází ke tlení. Pokud je přístup vzduchu menší a biomasa je prostoupena vodou, nastává trouchnivění. V důsledku nedokonalého přístupu vzduchu nedochází k úplnému rozkladu biomasy, ale zůstává pevný zbytek, tzv. trouch. Hnití je z převážné části anaerobním procesem. Probíhá ve stojatých a nedokonale větraných vodách. Jako plynné produkty vznikají CH_4 , NH_3 , H_2S a CO_2 . Zbytek, tzv. sapropel, je tvořen tekutými či tuhými látkami bohatými na vodík. Rašelinění probíhá zčásti nebo úplně v subakvatickém prostředí, tedy v místech s dostatečným přístupem vody.

Aby vedlo rašelinění skutečně ke vzniku uhlí, je nutné, aby došlo k ochraně odumřelé biomasy před úplným rozkladem kombinací několika faktorů – biologických, chemických a geologických. Biologická ochrana spočívá v omezení života mikroorganismů tvorbou látek, které jsou pro ně jedovaté. Chemická ochrana zahrnuje ztrátu vody dehydratací koloidů, čímž dojde k odumření rozkladných mikroorganismů. Základním principem geologické ochrany je omezení přístupu vzdušného kyslíku. K tomu může dojít např. v důsledku zalití vodou či překrytím nánosem sedimentů. K ukončení biochemické fáze vzniku uhlí dochází, jakmile přestanou existovat vhodné podmínky pro existenci rozkladných organismů. K ukončení dochází tehdy, když se rozložená hmota překrytá sedimenty dostane hlouběji pod zemský povrch. Zde dochází k dalším chemickým reakcím, především v důsledku působení tlaku a teploty. Organická hmota se již dále nerozkládá, ale pouze přeměňuje. Rašelinění je tím vystřídáno prouhelňováním, čímž začíná geochemická fáze vzniku uhlí [1] [2] [3].

1.1.2. Geochemická fáze

Prouhelňování je definováno jako složitý geochemický proces vytvářející z vrstev rašeliny a sapropelu hnědouhelnou, černouhelnou či antracitovou sloj. Podstatou prouhelňování je rozklad složitých velkých molekul biopolymerů, které tvoří odumřelou biomasu. Ze vznikajících jednodušších molekul – monomerů – dochází k syntéze nových, složitějších makromolekul, které jsou bohatší na uhlík a vodík. Nejdůležitějšími faktory prouhelňování jsou teplota a tlak, vliv času není tak významný. Teplota hraje v procesu důležitou roli především proto, že její vzrůst snadno mění chemickou a strukturní stavbu organické hmoty. Tlak výrazně ovlivňuje objem plynné fáze a tím i intenzitu reakcí při prouhelňování [1] [4].

1.2. Složení hnědého uhlí

Mikrokonstituenty uhlí označujeme jako macerálové skupiny, jejichž původ je odvozován z macerace původního rostlinného materiálu. Macerálové skupiny hnědého uhlí jsou huminit, liptinit a inertinit. Odlišnost macerálových skupin je způsobena různorodostí původního rostlinného materiálu a podmínkami doprovázejícími proces prouhelňování. Důsledkem toho jsou pak v jednotlivých macerálových skupinách např. různé podíly hlavních organogenních prvků C, H, O.

Nedílnou součástí uhlí je voda. Podle úrovně svého prouhelňování obsahuje uhlí 1 až 60 hm. % vody. Voda je v uhlí vázána různými způsoby. Pouze její malá část, voda vázaná na

popeloviny a voda konstituční, se analyticky nestanovují. Zbývající voda je označována jako veškerá a dělí se na hrubou, hygroskopickou a okludovanou vodu.

Hořlavina uhlí se skládá převážně z uhlíku, menšího množství vodíku a z malých množství dusíku a síry. Velmi rozdílné je množství kyslíku. Opět se zde vyskytuje závislost na úrovni prouhelnatění. Množství uhlíku stoupá při vyšším zuhelnatění a zároveň s ním klesá množství vodíku a kyslíku. Síra nacházející se v hořlavině uhlí je většinou vázána v sirných heterocyklech jako je thiofen, benzothiofen, thioxanthen apod. Udává se, že na jeden atom síry připadá v uhlí 100 až 300 atomů kyslíku [1].

1.3. Huminové látky

Huminové látky jsou definovány jako směs amorfních, polydisperzních sloučenin žluté až hnědočerné barvy. Huminové látky patří mezi vůbec nejrozšířenější látky na Zemi. Jedná se o heterogenní skupinu přírodních organických molekul se složitou polymerní strukturou, vzniklou postupným rozkladem a přeměnou odumřelé biomasy. Tato přeměna se nazývá humifikace [5]. Huminové látky tvoří neodmyslitelnou součást *kaustobiolitů*, kam zpravidla řadíme hnědá uhlí (Leonardit, oxyhumolit, lignit a rašelinu) a v neposlední řadě jsou součástí půdních a vodních ekosystémů [6]. 60 – 80 % celkového organického uhlíku v půdě se vyskytuje ve formě huminových kyselin. 50 – 75 % rozpustné organické hmoty ve vodě tvoří právě fulvinové a huminové kyseliny [7].

Složení huminových látek se liší v závislosti na jejich zdroji, původu a způsobu extrakce. Diference elementárního složení huminových látek je relativně malá. Huminové látky extrahované z kaustobiolitů jsou tvořeny přibližně 40 – 60 hm. % uhlíku, 30 – 50 hm. % kyslíku, 4 – 5 hm. % vodíku, 1 – 4 hm. % dusíku, 1 – 2 hm. % síry a 0 – 0,3 hm. % fosforu [8]. Rovněž je na tomto místě nutné podotknout, že horní hranice elementárního složení atomů uhlíku, síry a fosforu se týká organické frakce HL, kterou nazýváme huminové kyseliny. Naproti tomu, fulvinové kyseliny jsou zpravidla charakterizovány vyšším obsahem kyslíku, jež je v těchto biokoloidních látkách vázán zejména ve formě kyselých funkčních skupin jako jsou karboxylové a –OH fenolické. [8].

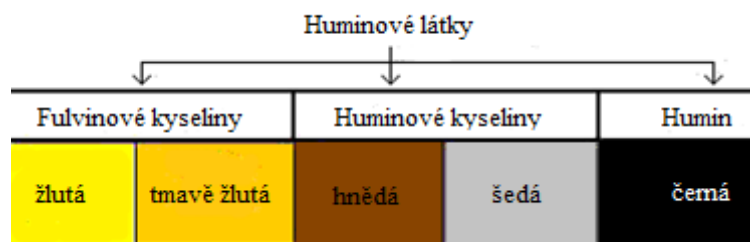
1.3.1. Rozdělení huminových látek

Huminové sloučeniny jsou hydrofilní, kyselé a mají vysokou molekulovou hmotnost, dosahující od několika stovek po tisíce daltonů (Da). Podle rozpustnosti ve vodných roztocích je možné rozdělit huminové látky na tři základní skupiny:

- Huminové kyseliny (HK), které jsou rozpustné v alkalických roztocích,
- Fulvinové kyseliny (FK), které jsou rozpustné v alkalických i kyselých roztocích,
- Huminy (HU), nerozpustné v alkalickém ani kyselém prostředí [9].

Mimo to byl zaveden pojem *hymatomelanové kyseliny*, který označuje frakci huminových kyselin oddělitelnou alkoholovou extrakcí. Tyto látky mají žluté až žlutohnědé zbarvení a oproti huminovým kyselinám mají menší molekulovou hmotnost. Dělení huminových látek dle jejich různé rozpustnosti je používáno již dlouhou dobu díky tomu, že rozpustnost je dobrým kritériem vzhledem k její závislosti na důležitých fyzikálně-chemických vlastnostech, jako je obsah kyselých funkčních skupin, molekulová hmotnost, aromaticita atd [10].

V odborné literatuře zabývající se huminovými látkami dominuje především diskuze o huminových a fulvinových kyselinách, zatímco humin je utlačován do pozadí. Právě zmiňovaná rozpustnost prvních dvou frakcí totiž výrazně usnadňuje jejich izolaci a následné studium [10].



Obrázek 1 – Rozdělení huminových látek [11]

1.3.1.1. Humínové kyseliny

Humínové kyseliny jsou látky charakteristické svou tmavou barvou. Většinou dochází k jejich nahromadění na místě vzniku. Je pro ně typická dobrá rozpustnost v roztocích hydrolyticky zásaditých solí. V kyselém prostředí dochází ke vzniku koagulátů huminových kyselin, přičemž musí být dodržena podmínka, že pH roztoku bude menší než 2, tedy bude dosahovat hodnoty izoelektrického bodu. S rostoucí hodnotou pH dochází k postupné disociaci nejdříve karboxylových a následně fenolických skupin [7] [12].

Elementární složení huminových kyselin je značně ovlivněno druhem přírodní matrice, chemickým složením původní organické hmoty a podmínkami, při kterých docházelo k procesu humifikace. Složení kolísá v následujícím rozmezí: uhlík – 52-62 %, vodík – 2,8-5,8 %, kyslík – 31-39 %, dusík – 1.7-4.9 % a síra – 0-2 %. Humínové kyseliny obsahují také až 10 % popelovin, které jsou tvořeny prvky jako křemík, hliník, železo, vápník, aj. Kyselinový charakter těchto látek je daný přítomností kyselých funkčních skupin, ze kterých jsou nejpodstatnější karboxylové a hydroxylové skupiny. Vodíkové ionty obsažené v těchto funkčních skupinách mají schopnost vyměňovat se za jiné ionty. Udává se, že v průměru 35% molekuly huminové kyseliny tvoří aromatická jádra, zatímco zbytek její struktury je ve formě alifatických uhlíkových řetězců. U HK izolovaných z kaustobiolitů však mohou aromatická jádra tvořit až 80 % molekuly HK. Molekulová velikost huminových kyselin se pohybuje přibližně v rozmezí od 10 000 do 100 000 Da. Polymery huminových kyselin snadno spojují jílu za tvorby stabilních organo-minerálních komplexů jílu [13] [12] [14].

1.3.1.2. Fulvinové kyseliny

Fulvinové kyseliny jsou frakcí huminových látek, která je rozpustná v celém rozsahu pH. Jedná se o látky žluté až hnědé barvy, velmi pohyblivé a lehce se přemísťující v půdním profilu. Jsou charakteristické dobrou rozpustností ve vodě, minerálních kyselinách, loužích i v roztocích hydrolyticky zásaditých solí. Od huminových kyselin se liší jednodušší stavbou makromolekuly i celkovým složením [12]. Jedná se o směs alifatických a aromatických organických kyselin. Jejich složení a tvar molekuly je poměrně variabilní. Ve vodném prostředí je velikost makromolekul fulvinových kyselin oproti huminovým kyselinám menší. Jejich molekulová hmotnost se pohybuje v rozmezí od 1000 do 10 000 Da.

Fulvinové kyseliny obsahují přibližně dvakrát více kyslíku, než humínové kyseliny. To je způsobeno především vysokým obsahem karboxylových –COOH skupin. Obsahují také velký podíl OH fenolických skupin. C=O karboxylové a C–O etherové funkční skupiny jsou oproti COOH a –OH zastoupeny v menší míře. Právě to má za následek vyšší reaktivitu, než vykazují humínové kyseliny [13].

1.3.1.3. Humíny

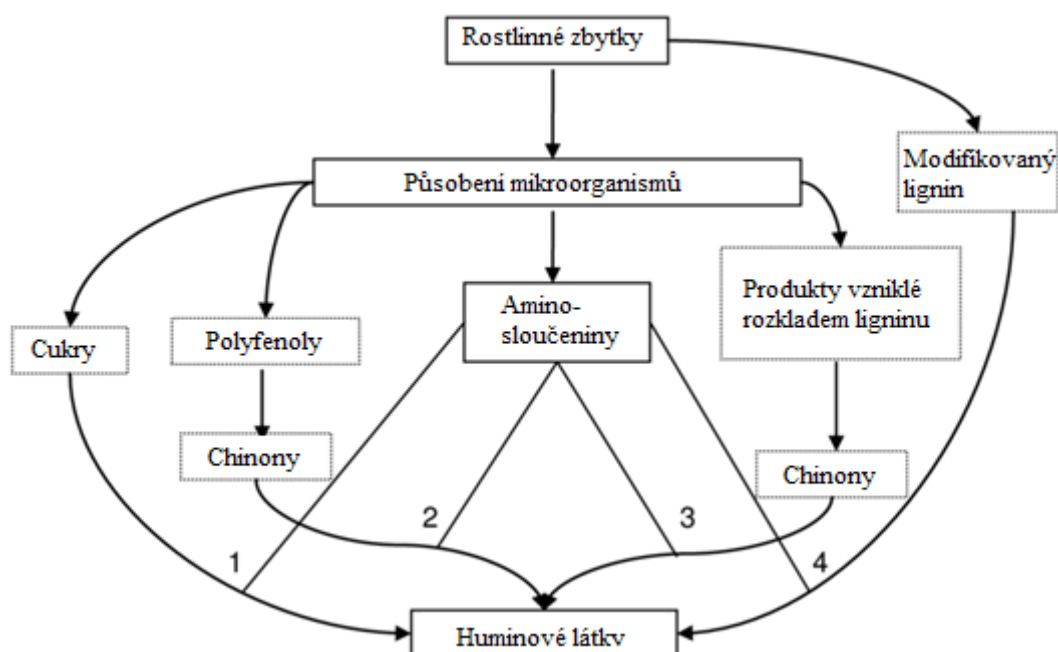
Jedná se pravděpodobně o silně karbonizovanou organickou hmotu, pevně vázanou na minerální podíl přírodní matrice. Proto se humín nedá získat ani mnohonásobnou extrakcí

alkáliemi z dekalcinované půdy (zbavené vápníku a hořčíku). Huminy jsou často charakterizovány jako nerozpustné formy huminových kyselin. [12].

1.3.2. Vznik huminových látek

Huminové látky vznikají při procesu zvaném humifikace. Dochází při něm k přeměně odumřelého rostlinného i živočišného materiálu. Samotná humifikace zahrnuje velký soubor na sebe navazujících biochemických a enzymatických reakcí. Úzce souvisí s uhlíkovým a dusíkovým cyklem. Existují čtyři teorie vzniku huminových látek. Tyto čtyři teorie se liší především v tom, jak se prvotní látky zužitkují v syntéze huminových látek [7] [11] [9].

Prvotní ligninová neboli degradační teorie, kterou zastával Waksman, říká, že huminové látky jsou přeměněné ligniny. Později se začali vědci přiklánět k tvrzení, že tento mechanismus zahrnuje i přeměnu z chinonů. Ve skutečnosti je celý proces vzniku huminových látek mnohem složitější a v přírodě se musí brát v úvahu jako možné mechanismy vzniku huminových a fulvinových kyselin všechny čtyři cesty přeměny (viz Obrázek 2).



Obrázek 2 – Mechanismus vzniku huminových látek dle Stevensona [11] [15]

1.3.2.1. Ligninová teorie

Podle této teorie je hlavním prekurzorem vzniku huminových látek lignin. Díky studiu rozkladu rostlinných složek je známo, že nejnáze podléhají humifikaci látky rozpustné ve vodě, hemicelulózy a nejméně snadno celulóza. Lignin se hromadí ve zbytcích rostlinného materiálu, kde je degradován mikroorganismy za postupné ztráty methoxylových skupin a následného vzniku o-hydroxyfenolů. Konečnou oxidací alifatických částí molekuly pak vznikají karboxylové skupiny. Takto pozměněné části ligninu jsou podrobeny dalším reakcím. Při oxidaci reagují s aminovými sloučeninami za vzniku kondenzačních produktů, ve kterých je dusík součástí heterocyklických sloučenin. Obrázek 2 zachycuje přeměnu podle ligninové teorie pod dráhou č. 4 [7] [11] [16].

1.3.2.2. Polyfenolová teorie

Ligninová teorie byla v 60. letech 20. století nahrazena polyfenolovou neboli syntetickou teorií. Polyfenolová teorie popisuje vznik huminových látek z polyfenolových stavebních

jednotek, které jsou z převážné syntetizovány mikroorganismy (viz Obrázek 2 – dráhy 2 a 3). Vzniklé chinony dále reagují se sloučeninami obsahujícími dusík. Polyfenolová teorie byla doplněna o hypotézu, která bere v potaz, že polyfenoly mohou být syntetizovány mikroorganismy i z neligninových zdrojů jako jsou celulóza či jiné polysacharidy, pak jsou enzymaticky oxidovány na chinony a přeměněny na huminové látky [7] [11].

1.3.2.3. Teorie podle Maillarda

Podle této teorie jsou huminové látky výsledkem syntetické reakce jednoduchých látek (aminokyseliny a monosacharidy) vzniklých rozkladem částí rostlin (viz Obrázek 2 – dráha č. 4). Mikroorganismy přítomné v půdě se podle této teorie přímo nepodílejí na vzniku huminových látek, jedná se tím pádem převážně o neenzymatické reakce. Maillardova teorie poskytuje vysvětlení pro tvorbu huminových látek také v prostředí, ve kterém se nevykytuje dostatečný podíl ligninu a produktů degradace ligninu. [11] [17].

1.3.3. Molekulární struktura huminových látek

Huminové látky tvoří řada různých sloučenin o relativní molekulové hmotnosti 700 až $2 \cdot 10^6$ Da [2]. O objasnění molekulární struktury se pokoušely mnohé vědecké týmy, ale navzdory četným studiím huminových látek se nepodařilo identifikovat pravidelně se opakující strukturní jednotku nebo skupinu jednotek, charakteristickou pro tyto materiály. Přitom pochopení struktury huminových látek je klíčové pro pochopení jejich fyzikálně-chemických interakcí v prostředí.

1.3.3.1. Polymerní teorie

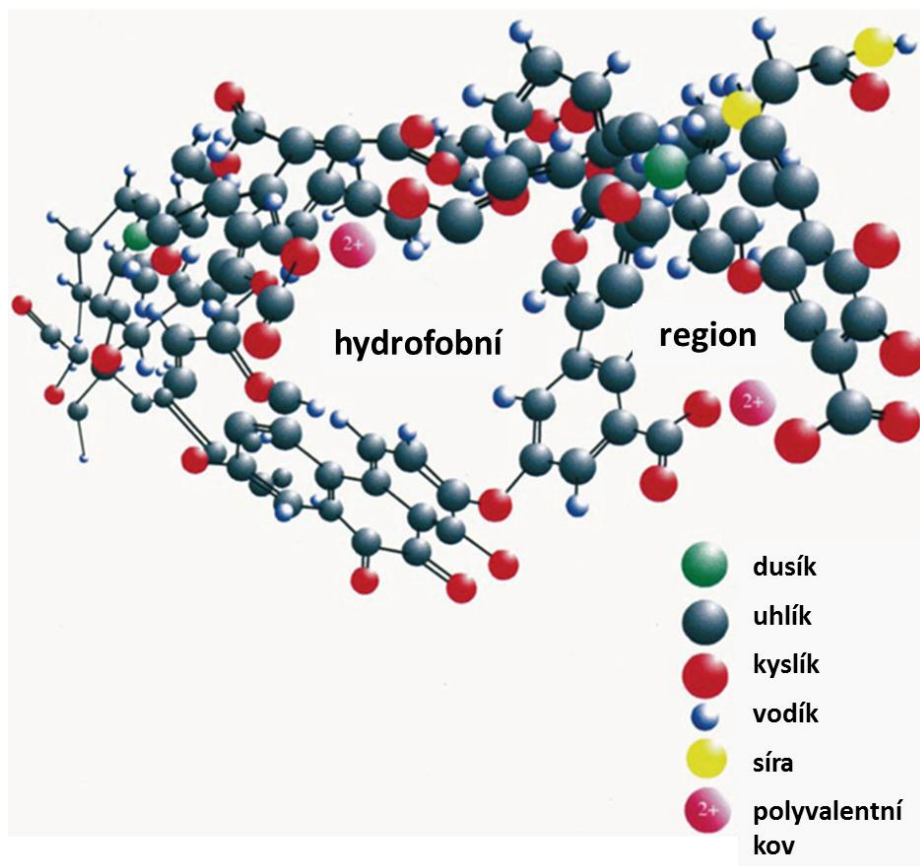
Polymerní teorie je historicky nejstarší publikovanou teorií, které nahlíží na tyto biokoloidní látky pomocí tzv. polymerního modelu HL. Tento model pohlíží na HL jako na makromolekuly s lineární strukturou. Z polymerního konceptu HL vychází mnoho strukturních modelů, z nichž nejvýznamnějšími modely jsou strukturní vzorce navrženými *Flaigem* (1960), *Kleinhumpelem* (1970) a v neposlední řadě i dlouho přijímaným strukturním vzorcem navrženým *Stevensonem* (1982). Obecně lze říci, že tyto polymerní modely definovaly HL jako lineární ohebné makromolekuly, které mohou zaujímat různé konformace makromolekulárního klubka v závislosti na náboji, hodnotě pH a přesného chemického složení polymerního řetězce. Při nízkých hodnotách pH zaujímá makromolekulární klubko HK klubkovitý tvar, a v takovém případě je jsou kyselé funkční skupiny na polymerním řetězci HK zcela protonované a dochází tak ke koagulaci těchto biokoloidních látek. Tohoto principu se využívá při izolaci a frakcionaci HL na tři základní skupiny. Pomocí tohoto modelu je nahlíženo na HL, jako na polyelektrolyty s různou střední molekulovou hmotností (Dubach & Mehta, 1963) [18], což platí i pro jiné přírodní makromolekuly jako jsou bílkoviny, polysacharidy nebo lignin. Předpoklad, že HL jsou tvořeny polymerní strukturou, byl podpořen zavedením jednoduchých fyzikálně-chemických měření určených k charakterizaci HL. Příkladem je index E_4/E_6 , tedy poměr absorbance huminových látek při 465 nm a 665 nm, zavedený Weltem (1955) a využívaný např. Chenem (1977) a Kononovem (1961). Díky rozsáhlým studiím se ukázalo, že tento absorpční koeficient je dobrým ukazatelem střední molekulové hmotnosti HL, avšak musíme mít na paměti, že tento absorpční koeficient je silně závislý na hodnotě pH roztoku.

Mezi další důvody pro přijetí polymerní teorie patří také to, že stabilní polymerní struktura lépe vysvětlovala jistou odolnost huminových látek při tepelné degradaci za použití termálních technik jako je např. termogravimetrie [19].

V roce 1989 Hayes publikoval teorii, že neexistují žádné důkazy o pravidelnosti ve strukturách těchto makromolekul. Naproti tomu, *polymerní model* HL byl podpořen Stevensonem, který tvrdil, že každá makromolekula HL je složena z opakující se série molekul různých velikostí, přičemž jen málo z nich má přesně stejnou strukturální konfiguraci nebo obsah rozličných funkční skupiny. Toto tvrzení vycházelo z publikovaných prací Dubach & Mehta, kteří tvrdili, že pravděpodobně neexistují dvě makromolekuly HL, které by byly naprosto strukturně totožné [20]. Časem začalo být zřejmé, že HL se skládají z heterogenní směsi sloučenin, pro které není možné vytvořit jednotný strukturní vzorec [10].

1.3.3.2. Supramolekulární teorie

S rozvojem moderních instrumentálních technik (pyrolytické techniky spojené s různými chromatografickými metodami, termochemolýza, SEC MALLS, MS, DLS a zejména ^{13}C NMR) nastává odklon od běžně přijímaného polymerního modelu HL, který ve vědecké společnosti způsobil jistou kontroverzi, o které svědčí mnoho publikovaných článků a monografií z této doby. Již s prvotními provedenými experimenty bylo jisté, že struktura a prostorová konformace HL je poněkud složitější, než se původně předpokládalo. V důsledku mnoha provedených experimentů je dnes na HL zejména HK pohlíženo jako na *supramolekuly*. Podle mnohých autorů jsou HL *supramolekulární agregáty* relativně malých heterogenních molekul, které jsou stabilizovány slabými vazebnými interakcemi, kam zpravidla řadíme van der Waalsovy síly, π - π a CH_3 - π interakce. Na základě této definice supramolekulární struktury HL je zřejmí rozdíl mezi tímto strukturním modelem a polymerní teorií, která předpokládá, že strukturní jednotky HL jsou poutány kovalentními vazbami. Simpson [21] a další autoři pohlízejí na HL jako na supramolekulární agregáty, které jsou tvořeny z velkého počtu nízkomolekulárních stavebních jednotek (aromatické fragmenty ligninu, alifatické řetězce, fragmenty polysacharidů a polypeptidů). Mimo jiné je velmi důležité podotknout, že tyto stavební jednotky jsou rovněž stabilizovány kovalentními vazbami těchto fragmentů s kovovými ionty případně sorpcí na povrchu částic. Tento supramolekulární koncept rovněž bere v úvahu i vznik hydrofobních domén ve struktuře HL. Vznik hydrofobních domén ve struktuře HL je z velké části realizován silně nepolárními stavebními jednotkami, které jsou orientovány do vnitřní části supramolekulární struktury [22].



Obrázek 3 - Schéma supramolekulární struktury huminových kyselin podle von Wandruszki

1.3.4. Využití huminových látek

Díky svým vlastnostem nacházejí huminové látky uplatnění v široké škále oblastí.

Zemědělství

Huminové látky hrají v přírodě klíčovou roli. Pomáhají totiž vytvářet příznivé prostředí pro život důležitých půdních mikroorganismů, usnadňují transport živin z půdy do rostlin a půdě samotné pak značně vylepšují schopnost udržovat kompaktní konzistenci. Půda se pak dokáže bránit například erozi a desertifikaci [5]. Kromě toho, že huminové kyseliny mají pozitivní vliv na strukturu půdy a pomáhají její částice ztmelovat, ovlivňují rovněž, jak dobře je půda schopna zadržovat vodu. Mezi zajímavé vlastnosti huminových kyselin patří také bezesporu jejich biologická aktivita. Je známo, že huminové látky zvyšují aktivitu enzymu protonové pumpy, který reguluje transport živin do rostliny. Rostliny ošetřované huminovými látkami pak v důsledku toho rychleji a silněji rostou. Aktivita huminových látek podporuje také kořenové vlášení rostlin [5] [23]. Huminové látky jsou používány samostatně nebo v kombinaci s kapalnými a tuhými hnojivy. Oxyhumolity lze přidávat do kontaminovaných půd, výhodně pak v kombinaci s vápněním. Huminové kyseliny obsažené v oxyhumolitech zachycují těžké kovy a organické polutanty. Roztoky huminových látek jsou využívány k postřiku na listy, protože působí jako inhibitory vzniku plísní [24].

Huminové látky také nalézají široké využití jak v chovech hospodářských zvířat, tak v chovech zájmových. Mají stimulační účinky na trávení a využití živin, zlepšují konverzi krmiva a tím příznivě ovlivňují růst zvířat. U dojeného skotu došlo při podávání huminových látek k mírnému zvýšení produkce mléka a k významnému zvýšení obsahu mléčného tuku a proteinu. Přídavek huminových kyselin do krmné dávky vede k tvorbě zdravého střevního

epitelu, stabilizaci střevní mikroflóry a pH v trávicím traktu a ke zlepšení kondice. Pro své antimikrobiální účinky se huminové látky využívají také pro zvýšení ochrany proti infekci, zejména u mladých zvířat [25].

Průmyslové využití

Vzhledem k tomu, že huminové látky tvoří velkou část lignitu a vyskytují se i v hnědém uhlí či jiných nízko prouhelnatěných hmotách, byly takto nepřímo využívány v energetickém průmyslu. V současné době je však využívání spalování uhlí jako zdroje energie nahrazováno jinými, pro životní prostředí méně škodlivými způsoby [23].

V papírenském průmyslu se uplatňují huminové kyseliny, resp. jejich sodná forma, humát sodný, který je používán jako barvivo papíru. Jeho přítomnost zároveň zlepšuje retenci papíroviny a snižuje průnik toxických látek do podsítných vod. Barvení je bezproblémové jak u technologie, kdy je barva přidávána přímo do hmoty rozvlákněného papíru, tak u technologie, kdy se barva na povrch papíru nanáší na klížícím lisu [24].

Ve stavebnictví se HL uplatňují jako účinná složka plastifikátorů betonových směsí. Plastifikátory s obsahem HK řeší základní problém transportbetonu, tj. zablokování hydratace cementu a zachování konzistence betonové směsi během její dopravy bez negativního vlivu na rychlost nárůstu počátečních pevností betonu. Plastifikátory na bázi HK jsou ve své třídě kvalitativně srovnatelné se zahraničními výrobky při nižší ceně [24].

Ochrana životního prostředí

Díky své struktuře jsou huminové a fulvinové kyseliny schopné interakcí s toxickými kovy (Pb, Hg, Cd, Cu, Zn, Ni, Cr), respektive jejich ionty, a organickými látkami jako jsou polycyklické aromatické uhlovodíky, znečišťujícími životní prostředí. Stejně jako ionexy se dají použít do kolon a regenerovat, nebo jsou používány ve formě přísad do odpadní vody s následným oddělením sedimentací nebo filtrací. Nejvhodnější použití těchto látek je tam, kde se koncentrace toxických kovů pohybuje v rozmezí 1 až 10 mg/l. Zbytková koncentrace kovů v odpadních vodách je zpravidla nižší než 0,3 mg/l. Jsou ekologicky nezávadné a vazebná síla vůči kovům je srovnatelná s průmyslovými ionexy. [10] [24].

Právě adsorpcí kadmia, resp. kademnatých iontů, na huminové kyseliny se zabývali ve svém výzkumu Meng a spol. [26]. K sorpci byly použity HK izolované z Leonarditu z oblasti Xinjiang Uyghur v Číně. K vysrážení HK byl místo HCl použit CaCl_2 , což vedlo k vyššímu obsahu popela než u HK izolovaných tradičně pomocí HCl. HK také vykazovaly menší obsah uhlíku. Samotná adsorpce zahrnovala iontovou výměnu a povrchovou komplexaci, což vedlo k velmi vysoké adsorpční kapacitě Cd^{2+} , a to od 110 - 129 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ HK. Tyto hodnoty jsou vyšší než hodnoty uvedené v literatuře pro huminové adsorbenty izolované z Leonarditu. Vzhledem k tomu, že huminové adsorbenty jsou levné, bezpečné a přínosné pro kvalitu půdy, mají dobrý potenciál pro použití v půdách kontaminovaných Cd.

1.4. Izolace huminových látek

V současnosti existuje řada metod izolace a frakcionace huminových látek. Základem všech těchto postupů je práce Konovové a Bělčikové (1963). Izolace probíhaly původně převážně z pevných vzorků, později začaly být izolovány a zkoumány také huminové látky rozpuštěné ve vodách [10].

1.4.1. Izolace z kapalných vzorků

Aiken popisuje různé postupy pro izolaci huminových látek z vod. Patří mezi ně filtrace a aplikace ultrafiltrace, reverzní osmózy, extrakce rozpouštědly, iontové výměny a sorpce, včetně použití oxidu hlinitého, uhlíkových a neiontových makroporézních pryskyřic. Velkou nevýhodou izolace z kapalných vzorků je poměrně nízká koncentrace huminových látek rozpuštěných v přírodních vodách. Koncentrace huminových látek se pohybuje v rozmezí od $20 \mu\text{g}\cdot\text{dm}^{-3}$ v podzemních vodách až do $30 \text{mg}\cdot\text{dm}^{-3}$ v povrchových vodách [10].

1.4.2. Izolace z pevných matric

Huminové a fulvinové kyseliny jsou obvykle extrahovány z pevných vzorků přírodních matric (kaustobiolitů, rašeliny, půd, sedimentů a v neposlední řadě i alginitu) ve formě sodných solí pomocí roztoku hydroxidu sodného. Zbývající materiál je tvořen nerozpustnou organickou frakcí tzn. huminy. Alkalický supernatant se okyselí na $\text{pH} = 2$ pomocí kyseliny chlorovodíkové. Za těchto podmínek dojde k vysrážení huminových kyselin z roztoku, zatímco fulvinové kyseliny v roztoku zůstávají, stejně tak jako jiné malé molekuly, např. jednoduché cukry nebo aminokyseliny. Tyto malé molekuly mohou být odděleny od fulvinových kyselin na hydrofobní methakrylátové pryskyřici jako je např. XAD-8. Zatímco bude docházet k nasorbování přítomných fulvinových kyselin na pryskyřici, zbylé, více hydrofilní molekuly budou procházet kolonou a nebudou pryskyřicí vůbec zadržovány. K vymytí fulvinových kyselin je používána zředěná báze [8].

2. SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

Vlastnostmi huminových látek a jejich potenciálním využitím se v poslední době nezabývají jen půdní chemici, ale vědci z široké škály oborů – biologové, lékaři, vědci zabývající se životním prostředím. Mimo jiné jsou v současné době mnohem častěji izolovány a zkoumány huminové látky pocházející z jiného prostředí, než z půdy [10].

Doskočil a spol. [27] ve své práci studovali HK izolované z evropských lignitů, které se lišily svým původem a lokalitou odběru vzorků. Především se jednalo o HK, které byly extrahovány z jihomoravského lignitu (důl Mír Mikulčice u Hodonína), bulharského lignitu (lokalita Balsha a Maritza East), srbského lignitu (lokalita Tijanje a Kostolac) a polského hnědého uhlí (lokalita Konin). HK byly izolovány standardním postupem podle mezinárodní společnosti pro výzkum huminových látek IHSS (International Humic Substances Society). Před samotnou izolací HK byla přírodní matrice dekalifikována pomocí zředěné kyseliny chlorovodíkové. Tato procedura měla za následek významné snížení anorganických příměsí (popelé) v preparátech HK. Obsah popelé se ve studovaných HK pohyboval v rozmezí 0,5–23,5 hm. %. Autorům se podařilo zjistit, že nejbohatším zdrojem huminových kyselin byl vzorek jihomoravského a polského lignitu. Mimo jiné autoři ve své práci uvádějí, že obsah biogenních prvků (C, H, N, S a O) je u všech HK podobný a odpovídá elementárnímu složení HK, které jsou izolovány z kaustobiolitických přírodních matric. Nejvyšší obsah uhlíku byl analyzován u vzorku HK pocházející z polského lignitu, zatímco nejnižší obsah byl zjištěn u vzorku bulharského lignitu z lokality Balsha, který se rovněž vyznačoval nejvyšším obsahem popela. Autoři uvádějí, že izolované HK mají velmi podobnou strukturu, která byla v této práci diskutována na základě naměřených infračervených a fluorescenčních EEM (excitačně-emisních) spekter. Toto tvrzení bylo rovněž podpořeno pomocí XPS analýzy.

Gondar a spol. [28] se ve své práci zabývali fyzikálně-chemickou charakterizací HL (HK a FK) izolovaných ze dvou různých horizontů ombrotrofické rašeliny. Jednotlivé frakce HL byly extrahovány z rašeliny, jejíž naleziště se nachází v oblasti Galicie (lokalita severozápadního Španělska). Tyto huminové látky byly izolovány standardním postupem podle společnosti IHSS, který využívá k izolaci FK adsorpční pryskyřici XAD-8. Izolované HL byly v této práci charakterizovány pomocí potenciometrické titrace, elementární a termální analýzy, UV/Vis, FTIR a ^{13}C NMR spektrometrie. Autoři ve své práci uvádějí, že nejbohatším zdrojem HL je svrchní horizont, jehož mocnost byla 0–60 cm. V tomto rašelinistním profilu byla koncentrace HK přibližně $80 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ tj. 8 hm. %. Naproti FK byly v této přírodní matrici přítomny v minoritním zastoupení ($0,14 - 0,70 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ tj. 0,014 - 0,070 hm. %). HK pocházející z horizontu 0 - 60 cm byly oproti HK z nižších vrstev charakterizovány vyšším obsahem dusíku a kyslíku, nižší střední molekulovou hmotností a aromaticitou, která byla vypočtena ze změřených ^{13}C NMR spekter. Naproti tomu FK se vyznačovaly velmi podobnými fyzikálně-chemickými vlastnostmi, které byly získány z výše uvedených instrumentálních technik. To pravděpodobně souvisí s vysokou mobilitou těchto organických látek, kdy FK nejsou majoritní součástí organominerálního komplexu v této přírodní matrici.

Enev a spol. [29] se ve své práci zabývali studiem střednědobého vlivu přídatku kompostu na půdní HK. K malo-parcelním pokusům byla vybrána lokalita Praha-Ruzyně, jejichž půda odpovídala dle klasifikace FAO černozemě luvické resp. iluviální. Kompost byl na pokusný pozemek aplikován ve třech různých množstvích ($124, 239$ a $478 \text{ t}\cdot\text{ha}^{-1}$) a následně byl zapraven do humózního horizontu Ap (0–15 cm). Neporušené půdní vzorky k izolaci HK byly odebírány v následujících třech letech od aplikace kompostu. Vzorky HK byly izolovány modifikovaným postupem podle společnosti IHSS. Pro studium HK autoři zvolili především

termální (elementární a termogravimetrická analýza) a spektrometrické instrumentální techniky (UV/Vis, ATR-FTIR a stacionární fluorescenční spektrometrii). Obsah popela se u studovaných HK pohyboval v rozmezí 0,44–3,03 hm. %. Nejvyšší obsah HK byl stanoven u aplikovaného kompostu, tzn. 18,5 g·kg⁻¹. Autorům se podařilo zjistit, že aplikace kompostu vedla ke zvýšení obsahu HK v půdním profilu Ap a to zejména po prvním roce od aplikace kompostu. Průměrný obsah HK se v případě nejvyššího přídávku organické hmoty zvýšil o 7,6 g·kg⁻¹. Mimo jiné ve své práci autoři diskutují, že během trvání pokusu dochází k postupnému snížení obsahu HK z 8,1 na 5,1 g·kg⁻¹. To je pravděpodobně způsobeno prostupem HK do nižších vrstev půdního profilu a tím dochází k obohacení těchto vrstev o tyto biokoloidní látky.

Simsek & Degirmenci [22] se ve své práci zabývali studiem vlivu atmosférických a teplotních podmínek na zvýšení extrakční účinnosti HK. Z hlediska vysokého obsahu HK v porovnání s ostatními přírodními matricemi (půda, sedimenty, rašelina, čistírenské kaly, mrva atd.) si autoři vybrali jako přírodní substrát Leonardit. Leonardit byl podroben termální degradaci při teplotách 200, 300 a 400° C a to v atmosféře kyslíku a dusíku (pyrolyzní proces). Z takto upravených matric byly izolovány HK a to postupem podle společnosti IHSS. Izolované vzorky byly charakterizovány pomocí elementární analýzy, FTIR a UV/Vis spektrometrie a v neposlední řadě i pomocí XRD. Autoři ve své práci uvádějí, že ke zlepšení extrakční účinnosti došlo u vzorku Leonarditu, který byl ošetřen při 200° C v inertní atmosféře N₂. V případě vyšších teplot tj. 300 a 400°C byla přírodní matrice již termicky degradována a naopak docházelo ke snížení extrakční účinnosti pro tyto biokoloidní látky. Pomocí FTIR spektrometrie bylo zjištěno, že při vyšších teplotách dochází k de-karboxylaci HK a k postupné degradaci absorpčního pásu při 1030 cm⁻¹, který je zpravidla připisován C–O vibraci v polysacharidech či sacharidových jednotkách HL.

Stefanova a kol. [30] se ve své práci zabývala simulací stárnutí lignitu v období miocénu pomocí redukční pyrolýzy. Autorkou ke studiu byly vybrány dva typy bulharského lignitu (Maritza-East a Stanjanci). Vyšší obsah HK byl stanoven v případě lignitu Stanjanci, který odpovídá geologickému věku Pliocénu až pozdnímu Miocénu. Obsah HK v této přírodní matrici byl 83 hm. %. Tento vzorek HK byl rovněž charakterizován vyšším obsahem kyslíku a dusíku, alkylovaných Ar, furanu, naftalenu, látek obsahujících dusík a produktů degradace polysacharidů.

Conselvan a spol. [31] se ve své práci zabývali izolací huminových látek z Leonarditu za účelem charakterizace jejich biostimulační aktivity. K izolaci byl použit Leonardit pocházející z dolu v Jižní Dakotě a z tureckých dolů. Huminové látky byly extrahovány působením 0,1 M KOH a ponechány na magnetické míchačce při rychlosti 130 ot./min po dobu 16 hodin při teplotě 50° C. Extrakty byly následně centrifugovány při 7000 rpm po dobu 30 minut, a podrobeny filtraci přes Whatmanův filtr č. 2 (Whatman, Boston, USA). Huminový extrakt byl odsolen za použití dialýzy proti destilované vodě, která byla denně měněna, dokud nebylo dosaženo neutrálního pH. Následně byly extrakty odsoleny pomocí pryskyřice Amberlite IR-120 (H⁺ forma). 20 ml huminových extraktů bylo podrobeno lyofilizaci pro IR, CNS a stanovení obsahu popela. Izolované huminové kyseliny byly tvořeny 45 až 50 % uhlíku, 1 až 2 % dusíku a 1,3 až 5 % síry.

3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1. Použité chemikálie

- přírodní vzorek Leonarditu;
- katex pryskyřice Amberlite 120 IR H⁺ form, výrobce Sigma Aldrich;
- hydrofobní pryskyřice XAD-8, výrobce Sigma Aldrich;
- ultra-čistá voda PURELAB Flex, výrobce Purelab[®];
- chlorid draselný p.a., Lach-Ner s.r.o., Neratovice;
- 0,1M HCl, 0,1M NaOH – Normanal Lach-Ner s.r.o., Neratovice;
- methanol p.a., výrobce Sigma Aldrich

3.2. Použité přístroje

- skleněná kolona malá pro XAD-8 (l ~ 250 mm, d ~ 40 mm);
- skleněná kolona velká pro Amberlite IR 120 (l ~ 600 mm, d ~ 50 mm);
- membránový filtr MCE 0,45 μm, výrobce ChemLand;
- skleněná aparatura na ultrafiltraci;
- rotační odparaka
- pH a konduktometr Mettler Toledo;
- lyofilizátor Vir-Tis;
- termogravimetrický analyzátor TG Q5000, TA Instruments;
- elementární analýza – Euro Vector EA3000;
- Hitachi U3900H – UV/Vis spektrometr;
- Nicolet iS50, Thermo Fisher Scientific, Inc – FTIR spektrometr

3.3. Postup

Z pevného vzorku Leonarditu bylo nejprve nutné připravit pomocí alkalické extrakce výluh HL, který obsahuje HK, FK a snadno hydrolyzující organické kyseliny. Do PE nádoby bylo s přesností na čtyři desetinná místa naváženo přibližně 5 g Leonarditu. K navážce Leonarditu bylo přidáno 1000 ml extrakčního činidla (0,1 M \odot NaOH). Takto připravená suspenze byla ponechána na rotační třepačce přes noc s rychlostí 10 ot. \cdot min⁻¹. Pevný podíl byl od supernatantu odstraněn odstředěním při 2700 \times g po dobu 20 minut. K odstranění případného Leonarditu z roztoku HL byl supernatant filtrován přes papírový filtr za sníženého tlaku. Extrakty HL a snadno hydrolyzujících organických kyselin byly tímto způsobem připraveny ve třech opakováních.

3.3.1. Separace HK

Alkalický roztok HL byl okyselen přidavkem koncentrované kyseliny chlorovodíkové o koncentraci ~ 35 % obj. Celkový přídavek kyseliny chlorovodíkové byl zvolen na základě pH \odot , kdy výsledná hodnota pH byla < 2. Ke koagulaci HK docházelo přes noc tj. ~ po dobu 18 hod, kdy docházelo k úplnému zabalení makromolekulárního klubka HK. Po uplynutí této doby byly HK z roztoku odstraněny centrifugací při 2700 \times g po dobu 30 minut. Roztok nad vysráženými HK byl uchován pro následnou izolaci FK(1). Vysrážené HK byly znovu rozpuštěny přidavkem 100 ml 0,1 M roztoku hydroxidu draselného. Poté bylo k roztoku přidáno 2,2 g chloridu draselného. Takto vzniklý roztok HK byl odstředěn při 2700 \times g po dobu 30 minut. Z hlediska purifikačních procedur je tento krok velmi důležitý, kdy dochází k uvolnění nerozpustných frakcí zejména HU z makromolekulárního klubka HK. Po odstranění nerozpustné frakce byl roztok HK okyselen přidavkem kyseliny chlorovodíkové na hodnotu pH < 2. Jako v předešlém případě ke koagulaci HK docházelo přes noc tj. ~ po dobu

18 hod. Po uplynutí této doby byly HK z roztoku odstraněny centrifugací při $2700 \times g$ po dobu 30 minut. Roztok nad vysráženými HK byl uchován pro následnou izolaci FK(2). K vysrážené HK bylo přidáno 500 ml směsi roztoku 0,1 M HCl a 0,3 M HF. Tato suspenze byla ponechána na třepačce po dobu 7 dnů. Tímto purifikačním krokem jsou z vysrážených HK odstraněny především sorbované křemičitany případně některé sloučeniny iontů kovů (kaulinit a montmorillonit). Po uplynutí této doby byly HK odděleny od supernatantu centrifugací při $2700 \times g$ po dobu 30 minut. Poté byly HK převedeny do dialyzační membrány o velikosti pórů 1000 Da. Dialýza probíhala po dobu pěti dnů proti ultračisté vodě. Následně byly HK vymrazeny na rotační odparce v lyofilizačních baňkách a lyofilizovány na laboratorním lyofilizátoru do úplného vysušení.

3.3.2. Separace FK

Vzhledem k rozpustnosti fulvokyselin v alkalických i kyselých roztocích a také tomu, že roztoky pro izolaci FK obsahovaly i jinou nežádoucí rozpustnou organickou hmotu tj. snadno hydrolyzující organické kyseliny, bylo nutné využít k jejich separaci selektivní adsorpci na hydrofobní pryskyřici DAX.

Příprava pryskyřice DAX

Požadované množství pryskyřice, které je dáno rozměry skleněné kolony, bylo převedeno do kádinky a zalito takovým množstvím methanolu, aby jeho hladina nad vrstvou pryskyřice byla alespoň 2 cm vysoká. Suspenze pryskyřice byla ponechána na magnetické míchačce při 350 ot/min po dobu 15 min. Metanol byl slit. Pryskyřice byla promyta destilovanou vodou. Voda sahala cca 2 cm nad pryskyřici, aby nedošlo k vysychání pryskyřice.

Adsorpce FK na pryskyřici DAX

Před samotnou separací FK na chromatografické koloně byl získaný roztok fulvokyselin podroben ultrafiltrací na filtru o velikosti 0,45 μm , aby došlo k odstranění případných nežádoucích tuhých částic, případně zbytkům vysrážených huminových kyselin z roztoku. Přefiltrovaný roztok s obsahem FK byl opakovaně proléván kolonou. Po nadávkování veškerého obsahu fulvokyselin byla chromatografická kolona promývána vodou, dokud hodnota absorbance vody na výstupu z kolony nedosáhla při vlnové délce 350 nm hodnoty $A < 0,015$. Tímto způsobem byla z kolony eluována rozpuštěná organická hmota (DOM), jejíž majoritní část je tvořena snadno hydrolyzujícími organickými kyselinami. Desorpce fulvinových kyselin z pryskyřice byla provedena pomocí roztoku 0,1M NaOH, dokud hodnota absorbance desorpčního roztoku na výstupu z kolony nedosáhla při vlnové délce 350 nm hodnoty $A < 0,03$.

Regenerace pryskyřice DAX

Po nadávkování a vymytí každého vzorku FK bylo nutné pryskyřici připravit na nové použití. Toho bylo docíleno pomocí promývání pryskyřice 0,1 M HCl. Promývání probíhalo tak dlouho, dokud hodnota pH roztoku vytékajícího z kolony nebyla shodná s pH roztoku na vstupu do kolony.

Následně byla kolona promývána vodou, a to opět tak dlouho, dokud hodnota pH vody na výstupu do kolony nebyla stejná jako na vstupu z kolony.

Příprava katexu Amberlite IR 120

Požadované množství pryskyřice, které je dáno rozměry skleněné kolony, bylo převedeno do kádinky a zalito takovým množstvím methanolu, aby jeho hladina nad vrstvou pryskyřice byla alespoň 2 cm vysoká. Suspenze pryskyřice byla ponechána na magnetické míchačce při

350 ot/min po dobu 15 min. Metanol byl slit. Pryskyřice byla promyta destilovanou vodou. Voda sahala cca 2 cm nad pryskyřici, aby nedošlo k vysychání pryskyřice.

Zpětná protonace FK na pryskyřici Amberlite

Protože promýváním z pryskyřice DAX byly získány FK ve formě sodných solí, bylo nutné kyseliny zpět naprotonovat. Z alkalického roztoku fulvokyselin byly kationty Na^+ odstraněny pomocí katexu Amberlite IR 120 výměnou za H^+ ionty.

Roztok fulvinových kyselin byl opakovaně proléván kolonou, dokud hodnota elektrické vodivosti vytékajícího roztoku neklesla pod $120 \mu\text{S}/\text{cm}$. Následně byla kolona promývána vodou, dokud hodnota absorbance vody na výstupu z kolony nedosáhla při vlnové délce 350 nm hodnoty $A < 0,015$.

Regenerace pryskyřice Amberlite

Obdobně jako u pryskyřice DAX bylo nutné pryskyřici zregenerovat, aby byla znovu použitelná. Ke zpětné protonaci pryskyřice a vymytí nachytaných Na^+ iontů byla využita 0,1 M HCl.

Kolona byla promyta celkovým objemem 1000 ml 0,1 M HCl. Následně byla promývána takovým množstvím destilované vody, aby se hodnota pH vody vytékající z kolony pohybovala kolem hodnoty 7. Poté byla kolona připravena pro další použití.

Pokud se bezprostředně po regeneraci nepokračovalo v izolaci FK, bylo nutné kolonu konzervovat. Protože pryskyřice nesměla vyschnout, bylo do kolony dolito takové množství destilované vody, aby její hladina neklesla pod vrstvu pryskyřice. Vstup do kolony pak byl zakryt parafilmem.

Zakoncentrování získaných fulvinových kyselin

Získané roztoky byly zakoncentrovány pomocí rotační vakuové odparky. Pomocí lyofilizátoru Vir-Tis byla odstraněna vlhkost a byly získány pevné vzorky fulvinových kyselin ve formě světle hnědého prášku.

3.4. Základní fyzikálně-chemická charakterizace

Aby bylo možné blíže charakterizovat vlastnosti a strukturu HK a FK, byly získané výtěžky huminových i fulvinových kyselin podrobeny elementární analýze (EA), termogravimetrické analýze (TGA), molekulové absorpční spektrometrii v ultrafialové a viditelné oblasti záření (UV/Vis) a infračervené spektrometrii s Fourierovou transformací (FTIR).

3.4.1. Elementární analýza

Elementární složení vzorků HL izolovaných z Leonarditu bylo zjištěno pomocí elementárního analyzátoru EA3000. Kalibrace elementárního analyzátoru byla provedena pomocí standardní látky 4-amino-benzen-sulfonamidu. Navážené vzorky HL byly spáleny v kyslíkové atmosféře při pracovní teplotě reaktoru 980°C . Elementární složení izolovaných HL bylo zjištěno pomocí vyhodnocovacího programu *Callidus*, verze 5.1. Získané elementární složení HL bylo přepočteno na atomová procenta (*at. %*).

3.4.2. TGA a stanovení obsahu HK a FK ve vzorku

Všechny vzorky HL a přírodní matrice (Leonarditu) použité v této bakalářské práci byly termogravimetricky analyzovány na analyzátoru TGA Q5000, TA Instruments. Vzorky HL a Leonarditu o navážce $\sim 7\text{--}20$ mg byly spáleny z laboratorní teploty na konečnou teplotu

900°C v atmosféře vzduchu s průtokem 50 ml·min⁻¹ a s rychlostí ohřevu pece 10°C·min⁻¹. Získaná data byla následně použita ke stanovení obsahu nespalitelného podílu (tj. popela) a celkové vlhkosti.

3.4.3. UV-VIS spektrometrie

Molekulová absorpční spektrometrie v ultrafialové a viditelné oblasti elektromagnetického záření (UV/Vis) byla v této bakalářské práci vybrána k fyzikálně-chemické charakterizaci izolovaných HL. Na základě provedené literární rešerše byly za tímto účelem vybrány následující absorpční koeficienty: E_4/E_6 , E_2/E_4 a E_{ET}/E_{Bz} , které jsou zpravidla definovány jako poměry absorbancí při vhodně zvolených vlnových délkách. Za účelem fyzikálně-chemické charakterizace izolovaných HL pomocí absorpčního koeficientu E_4/E_6 tzv. *humifikační index* a E_2/E_4 byly připraveny roztoky HL o koncentraci 10 a 50 mg·dm⁻³ ve standardním fosfátovém pufru o hodnotě pH 7,05 (směs Na₂HPO₄·2H₂O a NaH₂PO₄·2H₂O v poměru 0,61:0,39). Za účelem studia HL pomocí absorpčního koeficientu E_{ET}/E_{Bz} byly připraveny soly těchto *biokoloidních* látek o koncentraci 10 mg·dm⁻³ ve standardním fosfátovém pufru při hodnotě pH 7,10.

Takto připravené roztoky HL byly změřeny na UV/Vis spektrometru Hitachi U3900H v rozmezí vlnových délek 200–900 nm v křemenné kyvetě SUPRASIL[®] s optickou dráhou 1 cm.

3.4.4. 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, namysli reaktivní funkční skupiny či základní stavební jednotky HL). ATR-FTIR spektra vzorků HL byla naměřena na FTIR spektrometru Nicolet iS50. Všechna infračervená spektra HL byla změřena v rozmezí vlnočtů 4000–400 cm⁻¹ s rozlišením 4 cm⁻¹ a s celkovým počtem akumulovaných skenů 128. Dále je nutné podotknout, že pro měření FTIR spekter byl použit *Ge*-krystal, který je především vhodný pro silně absorbující vzorky.

4. VÝSLEDKY A DISKUZE

Vypočtený obsah HL (přepočtený na sušinu), které byly izolovány z Leonarditu standardním postupem podle mezinárodní společnosti pro výzkum huminových látek (IHSS), jsou uvedeny v Tabulce 1. Výsledky ukazují, že vzorek Leonarditu obsahuje 56 hm. % veškerých huminových látek, které jsou dány jako suma izolovaných HK a FK. Tento výsledek je v dobré shodě se závěry, které byly publikovány ostatními autory, kteří se ve svých pracích věnovali stanovení obsahu HL v kaustobiolitických maticích. V obecném pohledu můžeme konstatovat, že organická hmota Leonarditu je majoritně tvořena HK. Naproti tomu FK byly přítomny v této přírodní matici v minoritním množství, které se pohybovalo přibližně kolem 2 hm. %. Zjištěný obsah FK je cenným výsledkem, a to z toho důvodu, že doposud nebyl vědeckou společností, která se zabývá studiem HL, publikován obsah FK v této přírodní matici.

Tabulka 1 - Obsah huminových látek ve studovaném vzorku Leonarditu

vzorek Leonardit	HK (hm. %)	FK (hm. %)	HL (hm. %)
1	51,77	2,24	54,01
2	55,05	1,20	56,24
3	55,84	1,71	57,55
Průměr	54,22	1,72	55,93
Směrodatná odchylka	1,76	0,43	1,46

Veškeré HL a HK IHSS (referenční vzorek) použité v této bakalářské práci byly podrobeny základní fyzikálně-chemické charakterizaci pomocí elementární a termogravimetrické analýzy. Výsledky elementárního složení termogravimetrické analýzy určující obsah nespalitelného podílu tj. popel a sorbované vlhkosti jsou uvedeny v Tabulce 2.

Tabulka 2 - Elementární složení HL 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	S				
Leonardit HK	45,98	35,99	0,56	17,47	0,00	0,78	0,38	0,83	4,81
Leonardit FK	33,60	49,56	0,62	16,22	0,00	1,47	0,48	6,12	4,73
IHSS HK	48,08	33,22	0,79	17,69	0,21	0,69	0,37	2,58	7,20

Elementární složení izolovaných HL a standardu HK IHSS (Leonardit, č.š. 1S104H) je v Tabulce 2 uvedeno v atomových procentech (at. %). Při použití hmotnostních procent (hm. %) by totiž docházelo k silnému podhodnocení obsahu vodíku. Výsledky elementární analýzy ukazují, že získané HL jsou tvořeny převážně uhlíkem, vodíkem, kyslíkem a v minoritním zastoupení také dusíkem. Síra byla stanovena pouze ve vzorku standardu HK. Je to způsobeno tím, že v této bakalářské práci byla pro elementární analýzu použita GC kolona, která umožňuje stanovení obsahu síry při hmotnostní koncentraci vyšší než 0,5 hm. %. Z naměřených výsledků je zřejmé, že HK jsou v porovnání s FK tvořeny vyšším obsahem uhlíku. Mimo jiné si v Tabulce 2 můžeme povšimnout, že z hlediska obsahu uhlíku je diference mezi izolovanou HK a jejím standardem velmi malá. Jistý rozdíl v obsahu

organického uhlíku, vodíku a dusíku je pravděpodobně způsoben odlišnou lokalitou odebrání vzorku (vzorek Leonarditu – Turecko a standard IHSS Dakota, USA) resp. geomorfologickými odlišnostmi naleziště. Obsah kyslíku byl u studovaných HK prakticky totožný. Nejvyšší obsah dusíku byl identifikován u vzorku standardu HK. Mnoho autorů dává ve spojitost obsah dusíku v HL s mikrobiální činností během humifikačního procesu. Naproti tomu byla izolovaná FK charakterizována nižším obsahem uhlíku a kyslíku a v neposlední řadě i vyšším obsahem vodíku. Jak je patrné z výsledků uvedených v Tabulce 2, vlhkost HL se pohybovala v rozmezí 5–7 hm. %, kdy nejvyšší obsah sorbované vlhkosti byl stanoven u vzorku standardu HK. Vlhkost je z velké části sorbována prostřednictvím kyselých funkčních skupin, kam z pravidla řadíme –COOH a –OH fenolické skupiny. Z porovnání použitých HL a standardu IHSS je zřejmé, že HK vykazovaly vyšší čistotu, jejichž popel byl stanoven v úzkém rozmezí 1,0–2,5 hm. %. Nejnižší obsah popela byl stanoven u HK izolované z Leonarditu metodou IHSS. Obecně je obsah popela (anorganických příměsí) v přímé souvislosti s použitými purifikačními kroky. Tento závěr je velmi dobře vidět v případě izolované FK, která nebyla přečištěna pomocí směsi roztoků HCl a HF. Mimo jiné na tomto místě můžeme konstatovat, že použitá metoda izolace HL vedla k získání velmi čistých preparátů z hlediska obsahu anorganických příměsí jako je vápník, hořčík, křemík a hliník, o čemž svědčí zjištěný obsah popela ve studovaných HL.

Ze získaných hodnot elementárního složení jednotlivých vzorků byly vypočteny atomové poměry H/C a O/C, které slouží k interpretaci fyzikálně-chemických vlastností HL, jako je stupeň aromaticity či míra hydrogenace, oxidace a dekarboxylace. Vypočtené atomové poměry H/C a O/C jsou sumarizovány v Tabulka 2. V širším pohledu na prezentované výsledky můžeme říci, že HK se v porovnání s FK vykazovaly nižšími hodnotami atomového poměru H/C, který je indikátorem míry dehydrogenace a aromaticity HL. Jinými slovy, studované HK jsou charakterizovány vyšší mírou aromaticity a dehydrogenace v porovnání s FK. Naproti tomu vysoká hodnota atomového poměru O/C v případě FK svědčí o vyšším obsahu kyselých funkčních skupin, kam řadíme karboxylové a –OH fenolické funkční skupiny. V případě studovaných HK byl tento atomový poměr prakticky totožný. Velmi vysoká hodnota atomového poměru H/C v případě FK značí, že tato biokoloidní sloučenina je tvořena nižším obsahem aromatických struktur a vyšším obsahem alifatických stavebních jednotek. Tyto výsledky jsou v dobré shodě se závěry UV/Vis a FTIR spektrometrie.

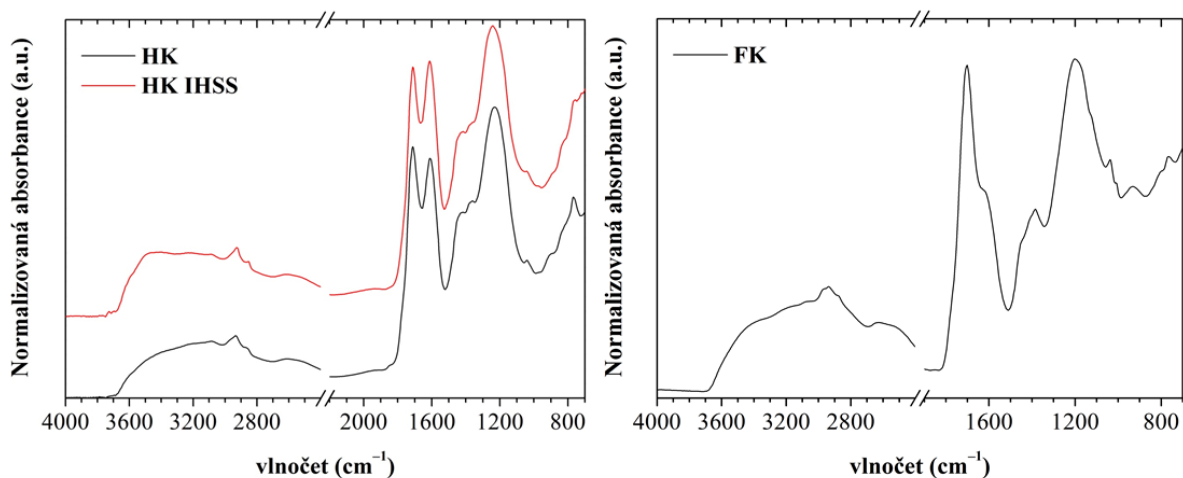
Z naměřených UV/Vis spekter izolovaných vzorků byly vypočteny absorpční koeficienty, které jsou uvedeny v Tabulce 3. Naměřena UV/Vis spektra HL vykazovaly kvaziexponenciální průběh, který je charakteristický pro tyto biokoloidní molekuly. Absorpce HL zejména HK probíhá v oblasti vlnových délek 200–800 nm. Z UV/Vis spekter HL je zřejmé, že k silné absorpci dochází zvláště v UV oblasti, naproti tomu HK jsou charakterizovány poměrně zřetelnou absorpcí v oblasti vyšších vlnových délek. Vyšší absorpce ve VIS oblasti spektra je ukazatelem vyššího obsahu aromatických struktur a alifatických strukturních jednotek s konjugovaným systémem dvojných vazeb [32].

Tabulka 3 – Získané hodnoty absorpčních koeficientů

Vzorek	Absorpční koeficienty		
	E_4/E_6	E_2/E_4	E_{ET}/E_{BZ}
HK	6,55	5,30	0,82
FK	–	68,21	0,92

Z vypočteného absorpčního koeficientu E_{ET}/E_{Bz} je zřejmé, že izolovaná FK je více substituována polárními funkčními skupinami, než je tomu u HK. Tento absorpční koeficient je výrazně citlivý k přítomnosti polárních funkčních skupin na aromátech [33] [34]. V případě FK se jedná především o –OH fenolické funkční skupiny, které byly identifikovány v FTIR spektru. Dále byly z naměřených UV/Vis spekter vypočteny absorpční koeficienty E_2/E_4 a E_4/E_6 , který je znám pod označením humifikační index. Tyto absorpční koeficienty jsou dobrými ukazateli odhadu střední molekulové hmotnosti, stupně aromaticity a kondenzace aromatického jádra. Z vypočtených koeficientů je zřejmé, že studované HL vykazují obvyklé hodnoty absorpčních koeficientů pro HL izolované z kaustobiolitických přírodních matric. Poměr E_4/E_6 byl stanoven pouze pro vzorek HK, protože vzorek FK v této oblasti záření nevykazoval žádnou absorpci (viz. Příloha 7). Z uvedených výsledků je zřejmé, že HK v porovnání s FK je charakterizována vyšší střední molekulovou hmotností a stupněm aromaticity. Vysoká hodnota absorpčního koeficientu E_2/E_4 , který je ekvivalentem humifikačního indexu, v případě izolované FK svědčí o tom, že tento vzorek je charakterizován nižší střední molekulovou hmotností a stupněm aromaticity. Jinými slovy, tato FK je tvořena jednoduššími aromatickými organickými kyselinami, které jsou substituovány kyselými, ale i alifatickými funkčními skupinami jako jsou aryl estery a ethery. Avšak tyto skupiny nebyly v FTIR spektrech identifikovány, a to z důvodu širokého absorpčního pásu při 1203 cm^{-1} , který odpovídá specifické absorpci –OH fenolických skupin. Tento problém by se dal řešit pomocí de-konvoluce tohoto širokého absorpčního pásu.

Na Obrázku 4 jsou uvedena ATR-FTIR spektra HL izolovaných z Leonarditu a vzorku standardu HK pocházející od společnosti pro výzkum huminových látek IHSS. Absorpční pásy byly popsány a interpretovány na základě odborné literatury [8] [35] [36] [37] [38].



Obrázek 4 – FTIR spektrum izolovaných HK srovnané s IHSS standardem a FTIR spektrum izolovaných FK

Ve všech infračervených spektrech byl identifikován široký absorpční pás v oblasti vlnočtů $3700\text{--}3100\text{ cm}^{-1}$, který odpovídá valenční symetrické vibraci O–H vazeb v rozličných funkčních skupinách, kam zpravidla řadíme karboxylové, –OH fenolické, alkoholové a v neposlední řadě i amidové funkční skupiny. Tento absorpční pás je rovněž indikátorem sorbované vlhkosti v HL. U všech studovaných vzorků byl identifikován dublet absorpčních pásů při 2938 cm^{-1} a 2860 cm^{-1} , který odpovídá valenční asymetrické a symetrické vibraci C–H vazeb v methylenových skupinách. Pouze u vzorku FK byl tento absorpční pás potvrzen méně výrazným raménkem při 1453 cm^{-1} , který je zpravidla připisován deformačním vibracím C–H vazeb v –CH₃ a –CH₂– skupin. Rovněž byl u tohoto vzorku identifikován méně

výrazný absorpční pás při 2968 cm^{-1} , který odpovídá asymetrické valenční vibraci C–H vazeb v methylových skupinách. Tento závěr je rovněž v dobré shodě s výsledky atomového poměru H/C, který je v případě FK $2\times$ vyšší a svědčí tedy o vyšším obsahu alifatických struktur v tomto vzorku. V případě HK byl v jejich FTIR spektrech lokalizován intenzivní a ostrý absorpční pás při 1610 cm^{-1} , který odpovídá symetrické valenční vibraci C=C vazeb v aromatických strukturách HK. Tento absorpční pás byl v případě standardu IHSS vyšší, než u izolované HK. Tato hypotéza byla rovněž podpořena méně intenzivním absorpčním pásem a raménkem při 3086 cm^{-1} , který je zpravidla přisuzován valenční symetrické vibraci C–H vazeb v aromátech. V případě FK byly tyto absorpční pásy přítomny v ATR spektrech spíše jako méně výrazné raménka a to především díky silné absorpci karboxylových funkčních skupin, které tyto absorpční pásy překrývaly. Ve všech infračervených spektrech byl lokalizován ostrý a velmi intenzivní absorpční pás při $1720\text{--}1700\text{ cm}^{-1}$, který odpovídá symetrické valenční vibraci C=O vazeb v karboxylových funkčních skupinách. V případě FK byl tento absorpční pás posunut k nižším vlnovým číslům, a proto se můžeme domnívat, že studovaná FK obsahuje nejen aromatické karboxylové kyseliny, ale i určitou část alifatických a jednoduchých organických kyselin. Ve FTIR spektrech HK si nelze nepovšimnout absorpčního pásu při 1420 cm^{-1} , který odpovídá rovinné deformační vibraci C–O–H vazeb v karboxylových kyselinách. O přítomnosti karboxylových funkčních skupin rovněž vypovídá i absorpční pás, který byl lokalizován při 1245 cm^{-1} a odpovídá valenční symetrické vibraci C–O vazeb v –COOH skupinách. U tohoto pásu nelze rovněž vyloučit i příspěvek valenčních vibrací aromatických esterů. V případě FK byl v jejím ATR-FTIR spektru lokalizován široký a intenzivní absorpční pás při 1203 cm^{-1} , který je zpravidla připisován valenční symetrické vibraci C–O vazeb v –OH fenolických skupinách. Tento závěr je rovněž podpořen i vyšším atomovým poměrem O/C v porovnání s HK. U všech studovaných HL byl lokalizován méně intenzivní absorpční pás při 1040 cm^{-1} , který je podle mnohých autorů připisován valenční symetrické vibraci C–O vazeb v primárních alkoholech, polysacharidech a v neposlední řadě i vibracím Si–O v silikátech. Na tomto místě je nutné podotknout, že tento absorpční pás spíše odpovídá specifické absorpci silikátů, jehož intenzita je úměrná obsahu popela v HL. Z infračervených spekter HK je zřejmé, že použitá metoda izolace HK byla z hlediska kvalitativních vlastností těchto *biokoloidních* látek úspěšná, a to z důvodů, že v ATR spektru izolované HK nebyly lokalizovány jiné absorpční pásy, které by odpovídaly odlišným konstitučním jednotkám či případným sorbovaným kontaminantům jako jsou jednoduché snadno hydrolyzující organické kyseliny.

5. ZÁVĚR

Cílem této bakalářské práce bylo izolovat huminové a fulvinové kyseliny z přírodního vzorku Leonarditu, stanovit v příslušném vzorku Leonarditu jejich obsah a získané huminové látky podrobit fyzikálně-chemické charakterizaci. S ohledem na úplnost této práce byl studován i standard HK, který je běžně komerčně dostupný od mezinárodní společnosti pro výzkum huminových látek IHSS.

Bylo zjištěno, že přírodní vzorek Leonarditu obsahoval v přepočtu na sušinu celkové množství 56 hm. % HL, z toho byla majoritní část tvořena HK (54 hm. %), zatímco FK byly zastoupeny pouze v minoritním množství (2 hm. %). Izolované HL vykazovaly nízký obsah popela a tím pádem i vysokou čistotu, v případě izolovaných HK se jednalo o 1 hm. %, oproti tomu obsah popela ve vzorku FK dosahoval téměř 6 hm. %. Vyšší obsah popela ve vzorku FK byl pravděpodobně způsoben vynecháním purifikace izolovaných FK pomocí směsi HCl a HF. Čistota izolovaných HL byla mimo jiné potvrzena i při vyhodnocení naměřených FTIR spekter, kdy ani u jednoho ze vzorků nebyly lokalizovány absorpční pásy odpovídající odlišným a nežádoucím konstitučním jednotkám nebo případným kontaminantům. Naopak byly lokalizovány takové absorpční pásy, které odpovídají typickým funkčním skupinám vyskytujícím se ve struktuře HL. V FTIR spektrech HK i FK byl lokalizován velmi intenzivní absorpční pás při 1720–1700 cm^{-1} , odpovídající symetrické valenční vibraci C=O vazeb v karboxylových funkčních skupinách. Přítomnost karboxylových funkčních skupin ve struktuře HL byla potvrzena i absorpčním pásem lokalizovaným při vlnové délce 1245 cm^{-1} . Ten odpovídá právě valenční symetrické vibraci C–O vazeb v –COOH skupinách. Kyselejší charakter FK oproti HK byl potvrzen přítomností širokého a intenzivního pásu lokalizovaného v FTIR spektru FK při 1203 cm^{-1} , který odpovídá valenční symetrické vibraci C–O vazeb v –OH fenolických skupinách. Cenné informace byly získány také díky výsledkům elementární analýzy a vypočteným atomovým poměrům. Výše zmiňovaný kyselejší charakter typický pro FK byl potvrzen i vyšším atomovým poměrem O/C v porovnání s HK. Další důležité parametry pro studium HL, které byly v této práci diskutovány, představují v neposlední řadě i absorpční koeficienty, jež vypovídají o molekulové hmotnosti, stupni humifikace, obsahu polárních funkčních skupin substituovaných na aromátech, původu aj.

Klíčovým přínosem této bakalářské práce je zjištěný obsah FK v přírodním vzorku Leonarditu včetně veškeré provedené fyzikálně-chemické charakterizace těchto látek, neboť doposud nebyl vědeckou společností, která se zabývá studiem HL, stanoven a publikován obsah FK v této přírodní matici.

6. ZDROJE

- [1] ROUBÍČEK, Václav a Jaroslav BUCHTELE. *Uhlí: zdroje, procesy, užití*. Ostrava: Montanex, 2002. Odborné publikace. ISBN 80-722-5063-9.
- [2] ROUBÍČEK, Václav a Jaroslav BUCHTELE. *Chemie uhlí a jeho využití*. Ostrava: VŠB-Technická univerzita, 1996. ISBN 80-707-8406-7.
- [3] SCHOBERT, Harold H. *Lignites of North America*. 2. New York: Elsevier, 1995. Coal science and technology, v. 23. ISBN 978-0-444-89823-4.
- [4] MEHL JR., James P., Julia A. JACKSON a Klaus K.E. NEUENDORF. *GLOSSARY OF GEOLOGY*. 5. Alexandria, Virginia: American Geosciences Institute, 2011. ISBN 978-0-922152-89-6.
- [5] DAVID, Jan a Jiří KUČEŘÍK. HUMINOVÉ LÁTKY – budoucnost "zelené" chemie?. *ChemPoint* [online]. Fakulta chemická, Vysoké učení technické v Brně: Fakulta chemická, VUT v Brně, 2018 [cit. 2018-11-18]. Dostupné z: <http://www.chempoint.cz/huminove-latky>
- [6] KLUČÁKOVÁ, Martina. Size and Charge Evaluation of Standard Humic and Fulvic Acids as Crucial Factors to Determine Their Environmental Behavior and Impact. *Frontiers in Chemistry*. 2018, **6**. DOI: 10.3389/fchem.2018.00235. ISSN 2296-2646. Dostupné také z: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fchem.2018.00235/full>
- [7] SKOKANOVÁ, Martina a Katarína DERCOVÁ. HUMÍNOVÉ KYSELINY. POVOD A ŠTRUKTÚRA. *Chemické listy*. 2008, **102**(4), 262268. ISSN 1213-7103.
- [8] GAFFNEY, Jeffrey S., Nancy A. MARLEY a Sue B. CLARK. *Humic and fulvic acids: isolation, structure, and environmental role*. Washington, DC: American Chemical Society, 1996. ISBN 08-412-3468-X.
- [9] MIKULÁŠKOVÁ, Barbora, Lubomír LAPČÍK a Ivan MAŠEK. Lignit - struktura, vlastnosti a použití. *Chemické listy*. 1997, **91**, 160-168.
- [10] AIKEN, George R. *Humic substances in soil, sediment, and water: Geochemistry, isolation, and characterization*. New York: Wiley, 1985. ISBN 04-718-8274-7.
- [11] STEVENSON, F. *Humus chemistry: genesis, composition, reactions*. 2nd ed. New York: Wiley, 1994. ISBN 04-715-9474-1.
- [12] JANDÁK, Jiří, Eduard POKORNÝ a Alois PRAX. *Půdoznalství*. V Brně: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita, 2001. ISBN 978-80-7157-559-7.
- [13] 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.
- [14] CHINACHANTA, Kawiporn a Arawan SHUTSRIRUNG. *Chemical characterization of leonardite and its potential use as soil conditioner and plant growth enhancement*. 2016, **22**.

- [15] Major pathways proposed for the formation of soil humic substances. In: *ResearchGate* [online]. ResearchGate GmbH. All rights reserved., 2008-2019 [cit. 2019-02-02]. Dostupné z: https://www.researchgate.net/profile/Kris_Hart/publication/233868644/figure/fig5/AS:669438634377236@1536618016946/Major-pathways-proposed-for-the-formation-of-soil-humic-substances-where-pathway-1.png
- [16] SUFFET, I. a Patrick MACCARTHY. *Aquatic humic substances: influence on fate and treatment of pollutants*. Washington, DC: American Chemical Society, 1989. ISBN 978-084-1214-286.
- [17] MAILLARD, L. Synthesis of humus-like substances by the interaction of amino acids and reducing sugars. *Annali di Chimica Applicata*. 1916, (5), 258–317. ISSN 0365-1037.
- [18] MARTIN, F., P. DUBACH, N. C. MEHTA a H. DEUEL. Bestimmung der funktionellen Gruppen von Huminstoffen. *Zeitschrift für Pflanzenernährung, Düngung, Bodenkunde*. 1963, **103**(1), 27-39. DOI: 10.1002/jpln.19631030106. ISSN 03729702. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1002/jpln.19631030106>
- [19] PICCOLO, Alessandro. The supramolecular structure of humicsubstances: A novel understanding of humus chemistry and implications in soil science. *Soil science*. 2011, **166**(11), 810-832.
- [20] GHABBOUR, Elham A. a Geoffrey DAVIES. *Humic substances: structures, models and functions*. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 2001. Special publication (Royal Society of Chemistry (Great Britain)), no. 273. ISBN 08-540-4811-1.
- [21] SIMPSON, André J. Determining the molecular weight, aggregation, structures and interactions of natural organic matter using diffusion ordered spectroscopy. *Magnetic Resonance in Chemistry*. 2002, **40**(13), 72-82. DOI: 10.1002/mrc.1106. ISSN 0749-1581. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1002/mrc.1106>
- [22] SIMSEK, Yunus Emre a Levent DEGIRMENCI. Effect of Atmosphere and Temperature Treatment on Leonardite for Increasing Humic Acid Yield. *Journal of the Geological Society of India*. 2018, **92**(2), 209-214. DOI: 10.1007/s12594-018-0983-x. ISSN 0016-7622. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s12594-018-0983-x>
- [23] O huminových látkách. *INTERNATIONAL HUMIC SUBSTANCES SOCIETY (IHSS)* [online]. www.ihss-cz.cz, 2019 [cit. 2019-03-03]. Dostupné z: <http://www.ihss-cz.cz/o-huminovych-latkach.html>
- [24] TYL, Pavel, Martin ŘIMNÁČ, Roman ŠPÁNEK, Július ŠTULLER, Zdeňka LINKOVÁ, Josef KOZLER, Barbora ANTOŠOVÁ a Vojtěch VÁŇA. Tvorba ontologie huminových látek. *ICS AS ČR, Technical Report*. 2011.
- [25] Huminové látky. *Agropress* [online]. [Agropress.cz](http://www.agropress.cz) – Zemědělství, živočišná výroba, články, reportáže a rozhovory, 2019 [cit. 2019-05-19]. Dostupné z: <http://www.agropress.cz/huminove-latky/>
- [26] MENG, Fande, Guodong YUAN, Jing WEI, Dongxue BI a Hailong WANG. Leonardite-derived humic substances are great adsorbents for cadmium. *Environmental Science and*

- Pollution Research*. 2017, **24**(29), 23006-23014. DOI: 10.1007/s11356-017-9947-8. ISSN 0944-1344. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s11356-017-9947-8>
- [27] DOSKOČIL, Leoš, Jana BURDÍKOVÁ-SZEWIECZKOVÁ, Vojtěch ENEV, Lukáš KALINA a Jaromír WASSERBAUER. Spectral characterization and comparison of humic acids isolated from some European lignites. *Fuel*. 2018, **213**, 123-132. DOI: 10.1016/j.fuel.2017.10.114. ISSN 00162361. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0016236117313637>
- [28] GONDAR, D., R. LOPEZ, S. FIOL, J.M. ANTELO a F. ARCE. Characterization and acid–base properties of fulvic and humic acids isolated from two horizons of an ombrotrophic peat bog. *Geoderma*. 2005, **126**(3-4), 367-374. DOI: 10.1016/j.geoderma.2004.10.006. ISSN 00167061. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0016706104002538>
- [29] ENEV, V., L. DOSKOČIL, L. KUBÍKOVÁ a M. KLUČÁKOVÁ. The medium-term effect of natural compost on the spectroscopic properties of humic acids of Czech soils. *The Journal of Agricultural Science*. 2018, **156**(7), 877-887. DOI: 10.1017/S0021859618000874. ISSN 0021-8596. Dostupné také z: https://www.cambridge.org/core/product/identifier/S0021859618000874/type/journal_article
- [30] STEFANOVA, Maya, Lenia GONSALVESH, Stefan MARINOV, Jan CZECH, Robert CARLEER a Jan YPERMAN. Reductive pyrolysis of Miocene-aged lignite humic acids, Bulgaria. *Fuel*. 2016, **165**, 324-330. DOI: 10.1016/j.fuel.2015.10.032. ISSN 00162361. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0016236115010376>
- [31] CONSELVAN, Giovanni Battista, Diego PIZZEGHELLO, Ornella FRANCIOSO, Michele DI FOGGIA, Serenella NARDI a Paolo CARLETTI. Biostimulant activity of humic substances extracted from leonardites. *Plant and Soil*. 2017, **420**(1-2), 119-134. DOI: 10.1007/s11104-017-3373-z. ISSN 0032-079X. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s11104-017-3373-z>
- [32] CHEN, Jie, Baohua GU, Eugene J. LEBOEUF, Hongjun PAN a Sheng DAI. Spectroscopic characterization of the structural and functional properties of natural organic matter fractions. *Chemosphere*. 2002, **48**(1), 59-68. DOI: 10.1016/s0045-6535(02)00041-3. ISSN 00456535.
- [33] FUENTES, Marta, Gustavo GONZÁLEZ-GAITANO a José Ma GARCÍA-MINA. The usefulness of UV–visible and fluorescence spectroscopies to study the chemical nature of humic substances from soils and composts. *Organic Geochemistry*. 2006, **37**(12), 1949-1959. DOI: 10.1016/j.orggeochem.2006.07.024. ISSN 01466380. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0146638006001896>
- [34] FERGUSON, Lloyd. Interpretation of the ultraviolet spectra of natural products (Scott, A. I.). *Journal of Chemical Education*. 1965, **42**(1). DOI: 10.1021/ed042pA62. ISSN 0021-9584. Dostupné také z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ed042pA62>

- [35] DICK, Deborah P., Antonio S. MANGRICH, Sonia M. C. MENEZES a Betania F. PEREIRA. Chemical and Spectroscopical Characterization of Humic Acids from two South Brazilian Coals of Different Ranks. *Journal of the Brazilian Chemical Society*. 2002, **13**(2), 177-182. DOI: 10.1590/S0103-50532002000200008. ISSN 0103-5053.
- [36] STEVENSON, F.J. a K.M. GOH. Infrared spectra of humic acids and related substances. *Geochimica et Cosmochimica Acta*. 1971, **35**(5), 471-483. DOI: 10.1016/0016-7037(71)90044-5. ISSN 00167037. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0016703771900445>
- [37] NOVÁK, František, Martina ŠESTAUBEROVÁ a Richard HRABAL. Structural features of lignohumic acids. *Journal of Molecular Structure*. 2015, **1093**, 179-185. DOI: 10.1016/j.molstruc.2015.03.054. ISSN 00222860. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022286015002896>

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

Seznam použitých zkratek

ATR	<i>attenuated total reflection</i>
DLS	<i>dynamic light scattering</i>
DOM	<i>dissolved organic matter</i>
EA	elementární analýza
FK	fulvinová kyselina
FTIR	infračervená spektrometrie s Fourierovou transformací
HK	humínová kyselina
HL	humínová látka
HU	humín
IHSS	mezinárodní společnost pro výzkum huminových látek
MS	hmotnostní spektrometrie
SEC-MALLS	<i>Size Exclusion Chromatography – Multi-Angle Laser Light Scattering</i>
TGA	termogravimetrická analýza
UV/Vis	ultrafialová a viditelná oblast elektromagnetického záření

Seznam použitých symbolů

Atom. %	elementární složení v atomových procentech	[%]
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	[%]

PŘÍLOHY



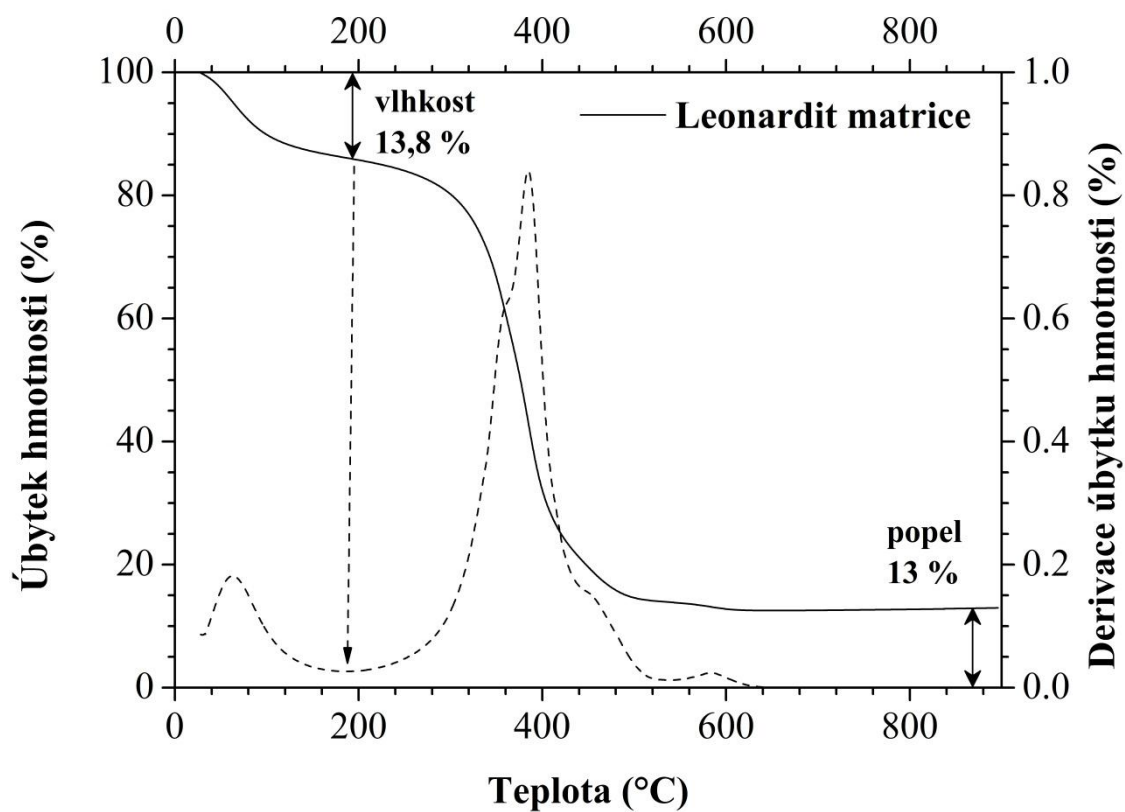
Příloha 1- Vzorek HK na rotační vakuové odparce; filtrace roztoku FK před zahájením dávkování na kolonu



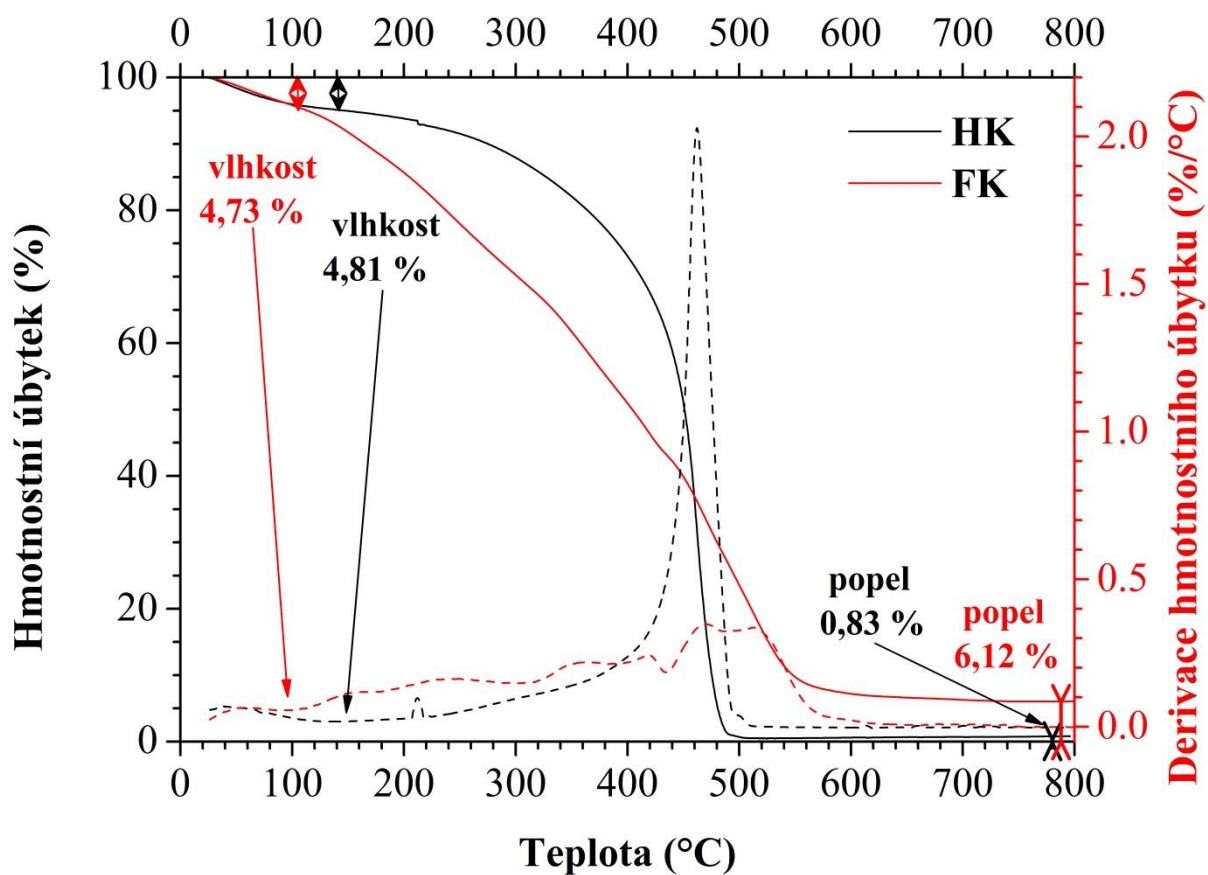
Příloha 2 - Sorpce FK na pryskyřici DAX-8; zpětná protonace roztoku FK pomocí pryskyřice Amberlite



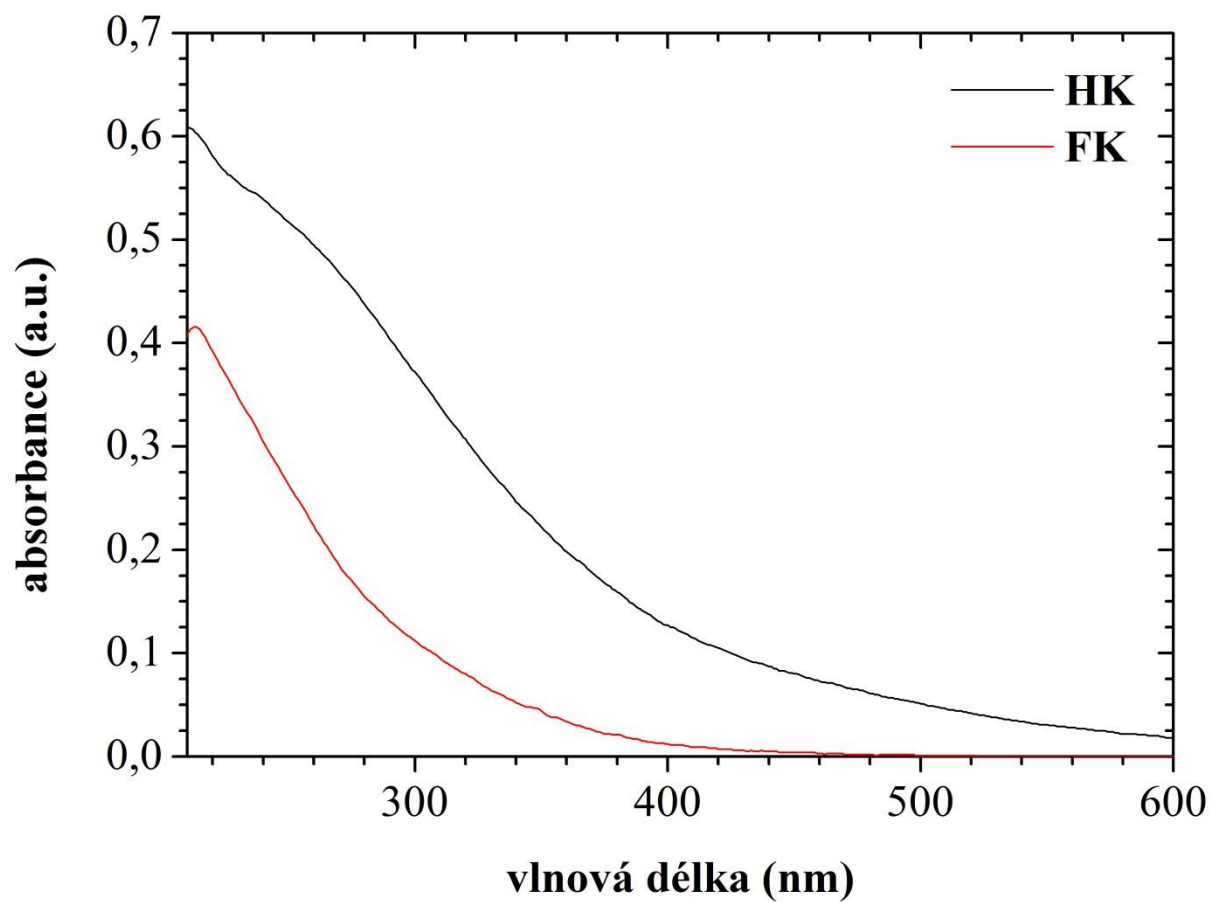
Příloha 3- Lyofilizace jednotlivých vzorků FK



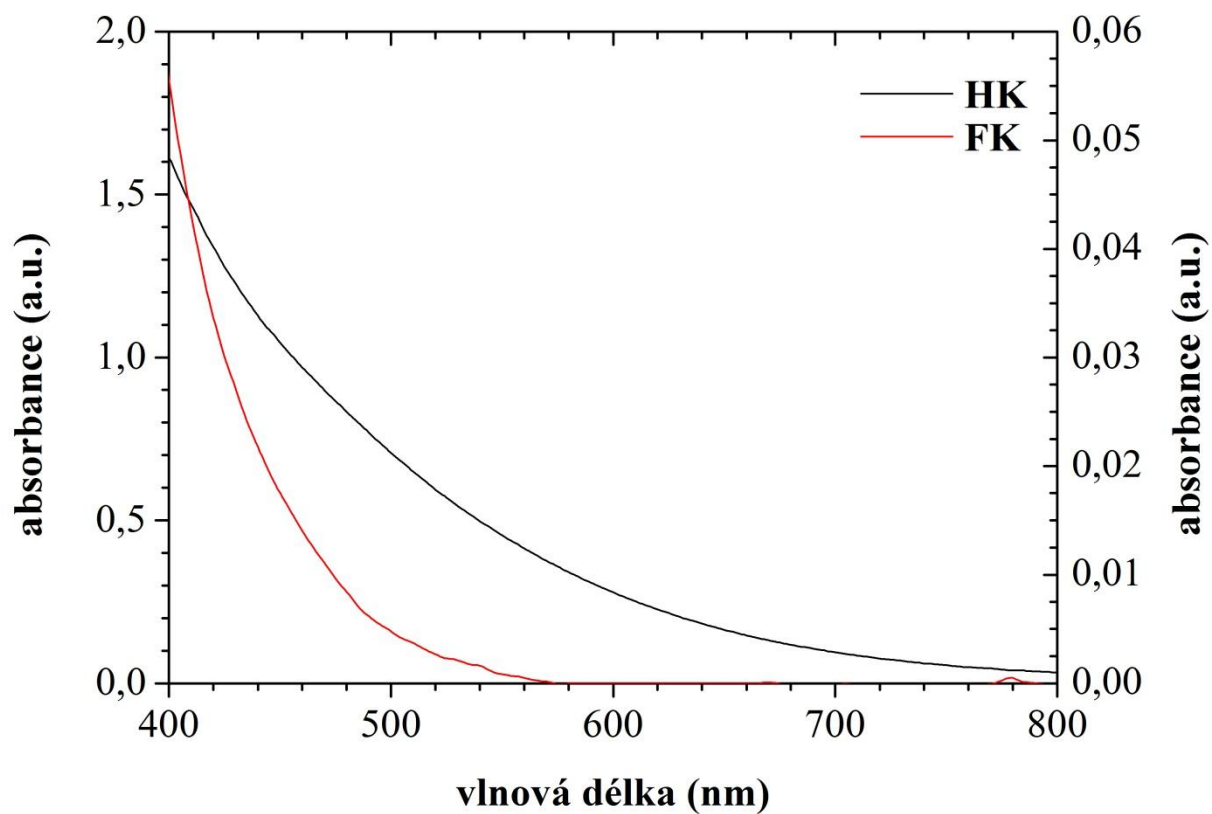
Příloha 4 - Termogravimetrická křivka pro vzorek Leonarditu



Příloha 5 - Termogravimetrická křivka pro vzorek HK a FK



Příloha 6 - UV-VIS spektrum HK a FK, c = 10mg/l



Příloha 7 - UV-VIS spektrum HK a FK, c = 50mg/l