

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

# STANOVENÍ PKA HUMINOVÝCH KYSELIN POMOCÍ UV/VIS SPEKTROMETRIE

DETERMINATION OF PKA OF HUMIC ACIDS BY MEANS OF UV/VIS SPECTROMETRY

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. ROMANA KOLAJOVÁ

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

doc. Ing. MARTINA KLUČÁKOVÁ,  
Ph.D.

BRNO 2012



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

## Zadání diplomové práce

Číslo diplomové práce:	<b>FCH-DIP0616/2011</b>	Akademický rok: <b>2011/2012</b>
Ústav:	Ústav fyzikální a spotřební chemie	
Student(ka):	<b>Bc. Romana Kolajová</b>	
Studijní program:	Spotřební chemie (N2806)	
Studijní obor:	Spotřební chemie (2806T002)	
Vedoucí práce	<b>doc. Ing. Martina Klučáková, Ph.D.</b>	
Konzultanti:		

### Název diplomové práce:

Stanovení pKa huminových kyselin pomocí UV/VIS spektrometrie

### Zadání diplomové práce:

Cílem práce je stanovit pKa huminových kyselin v jejich vodných výluzích spektrofotometricky a srovnat získané výsledky s dosud používanými titračními metodami

### Termín odevzdání diplomové práce: 11.5.2012

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

-----  
Bc. Romana Kolajová  
Student(ka)

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

-----  
prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.  
Ředitel ústavu

V Brně, dne 16.1.2012

-----  
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 stanovení obsahu jednotlivých funkčních skupin a jejich  $pK_a$ . Stanovené hodnoty ovšem závisí na mnoha faktorech včetně rychlosti titrace. Proto bylo použito spektroskopické stanovení disociační konstanty, což je metoda, jejíž použitelnost byla ověřena v předcházející bakalářské práci, kde bylo potvrzeno, že hodnoty  $pK_a$  stanovené touto metodou popisují skutečné disociační chování huminových kyselin ve vodě lépe než tradiční titrační metody. 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 disociovány a měřená absorbance je způsobena aniontem „humátu“. Naopak v silně kyselém prostředí je jejich disociace potlačena natolik, že měříme absorbanci nedisociovaných molekul huminových kyselin. Jako neutrální prostředí byla v předchozí práci použita deionizovaná voda. Rozpouštění huminových kyselin ve vodě a další ředění však v některých případech značně ovlivňovalo pH výluhu, proto byla v rámci této diplomové práce voda nahrazena octanovým pufrům buď při ředění nebo již při samotném rozpouštění. V obou případech bylo použitím tlumivého roztoku dosaženo stabilnějších hodnot pH, což pozitivně ovlivnilo stanovení  $pK_a$  touto metodou. Tato práce si konkrétně klade za cíl proměření UV/VIS spekter roztoků huminových kyselin při různých hodnotách pH a stanovení jedné střední hodnoty  $pK_a$ , která by mohla být snadno využita ke srovnání disociačního chování různých vzorků. Na základě naměřených dat byly stanoveny střední hodnoty  $pK_a$  huminových kyselin a srovnány s hodnotami získanými alkalimetry. 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-base 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 spectrophotometric determination of dissociation constant was used in this diploma thesis. Reliability of this method was confirmed in bachelor thesis where is mentioned that spectrophotometric determination of  $pK_a$  corresponds with realistic dissociation behaviour of humic acids in the water much more better than values obtained from titration methods. 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. Deionized water was used like neutral solvent. Water was replaced by acetic buffer in this thesis because of water's properties which have significant influence on solutions' pH. Buffer was used for diluting or for solubilisation and in these both cases more stable pH values were occurred. The aim of this diploma thesis is investigate UV/VIS spectra of various solutions of humic acids with different values of pH and determinate mean value of  $pK_a$  of humic acids which could be used like comparison of dissociation behaviours for vary samples. Values of acid dissociation constant were determined from measured dates and compared with values obtained by titration 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, UV/VIS spektrofotometrie, polyelektrolyty

## **KEY WORDS**

humic acids, dissociation, UV/VIS spectrophotometry, polyelectrolytes

KOLAJOVÁ, R. *Stanovení pKa huminových kyselin pomocí UV/VIS spektrometrie*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2012. 43 s. Vedoucí diplomové práce doc. Ing. Martina Klučáková, Ph.D..

## PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citovala. Diplomová 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 diplomové práce doc. Ing. Martině Klučákové, Ph.D. za vynikající vedení, cenné rady a především za čas, který mi věnovala. Tato práce byla podpořena projektem č. CZ.1.05/2.1.00/01.0012 (ERDF).*

## OBSAH

1. ÚVOD.....	8
2. TEORETICKÁ ČÁST .....	9
2.1 Huminové látky.....	9
2.1.1 Rozdělení huminových látek.....	9
2.1.2 Složení huminových kyselin .....	10
2.1.3 Obsah kyselých funkčních skupin v huminových kyselinách .....	12
2.2 Rozpustnost a disociace huminových kyselin .....	14
2.2.1 Metody studia rozpustnosti a disociace huminových kyselin.....	15
2.2.1.1 Titrační metody .....	15
2.2.1.2 Spektrofotometrické metody.....	18
3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....	21
3.1 Použité přístroje .....	21
3.2 Použité chemikálie .....	21
3.3 Příprava vzorků huminových kyselin.....	21
3.4 Charakterizace huminových kyselin .....	22
3.5 Stanovení $pK_a$ huminových kyselin .....	22
4. VÝSLEDKY A DISKUZE .....	24
4.1 Charakterizace huminových kyselin .....	24
4.2 Stanovení $pK_a$ huminových kyselin .....	27
5. ZÁVĚR .....	38
6. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY .....	40
7. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ .....	43

# 1. ÚVOD

Huminové kyseliny jsou řazeny do široké skupiny organických látek rostlinného původu. 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.

Existuje celá řada metod, které se používají pro stanovení množství kyselých funkčních skupin a  $pK_a$ . Tyto metody však často poskytují rozdílné výsledky. Zvolený způsob stanovení může do značné míry ovlivnit hodnoty celkové kyselosti i obsahu jednotlivých funkčních skupin. Zejména to platí u titračních metod, kde je důležité brát v úvahu obsah huminových kyselin v titrované suspenzi, rychlost dané titrace apod.

Struktura huminových kyselin je velice rozmanitá zejména díky velkému zastoupení různých funkčních skupin. Vzhledem ke složitosti struktury huminových kyselin v nich existují kyselé skupiny různé síly, a tedy i různé  $pK_a$ . Přesto je snahou vědců určit jednu střední hodnotu  $pK_a$  huminových kyselin, která by usnadnila jejich budoucí výzkum a práci s nimi.

Určení disociační konstanty  $pK_a$  u huminových kyselin je důležitou metodou studia jejich vlastností. V této práci k tomu bude použita relativně jednoduchá, ale přesto velmi přesná absorpční spektrofotometrie v UV/VIS oblasti. Tato metoda je založena na porovnávání změny tvaru a intenzity absorpčních spekter při změně pH prostředí a to tak, že vzorek huminové kyseliny bude v zásaditém prostředí plně disociován a v kyselém naopak vůbec, což se na UV/VIS spektru projeví v rozdílných hodnotách naměřené absorbance.

V práci [1] bylo cílem 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. Zjištěním této práce byl fakt, že UV/VIS spektrofotometrická metoda koresponduje se skutečnými disociačními schopnostmi kyselin oproti hodnotám z metody podle Hendersona-Hasselbacha, jejichž získání je navíc poměrně složité a zdlouhavé.

Obsahem této práce je i rešerše, která uvádí výběr některých alternativních metod pro stanovení  $pK_a$  huminových kyselin a rovněž porovnává aplikovatelnost UV/VIS spektrofotometrické metody na jiné látky, jako např. na pykráty, alkalické kovy atd.

Hlavním cílem celé studie je porovnání UV/VIS spekter roztoků huminových kyselin při různých hodnotách pH a z naměřených dat stanovit střední hodnotu  $pK_a$  huminových kyselin.

## 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 syntéza 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 [2].

#### 2.1.1 Rozdělení huminových látek

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

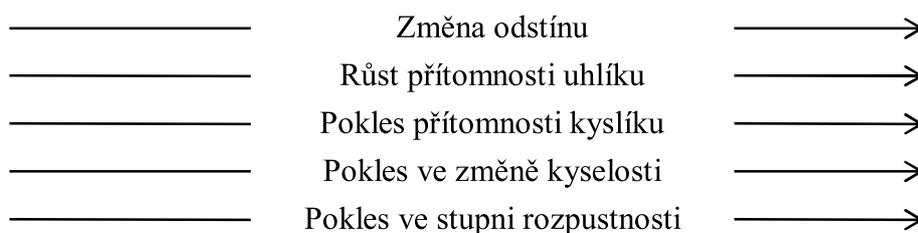
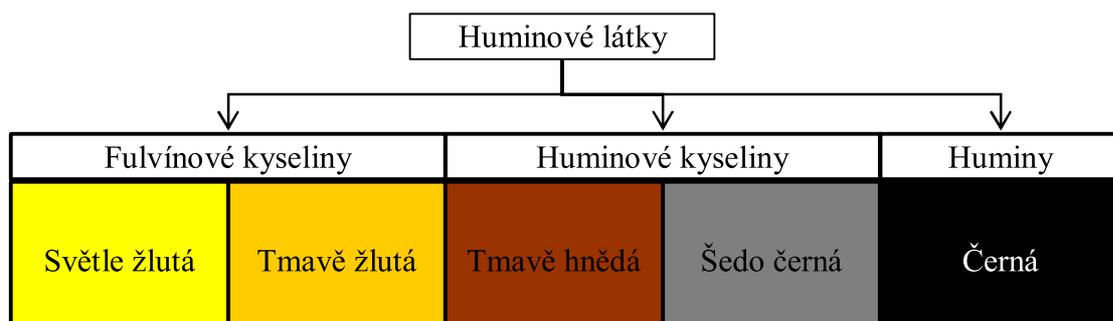
- fulvínové kyseliny – rozpustné v kyselinách i zásadách
- huminové kyseliny – rozpustné ve zředěných zásaditých roztocích a částečně i v roztocích kyselých
- huminy – nerozpustné ani v kyselinách ani v zásadách

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].

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 [2].

Huminy mají vysokou molekulovou hmotnost, relativně malý specifický povrch a nízký počet karboxylových skupin. Těmito vlastnostmi je zapříčiněna jejich nerozpustnost [1].

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 [3].



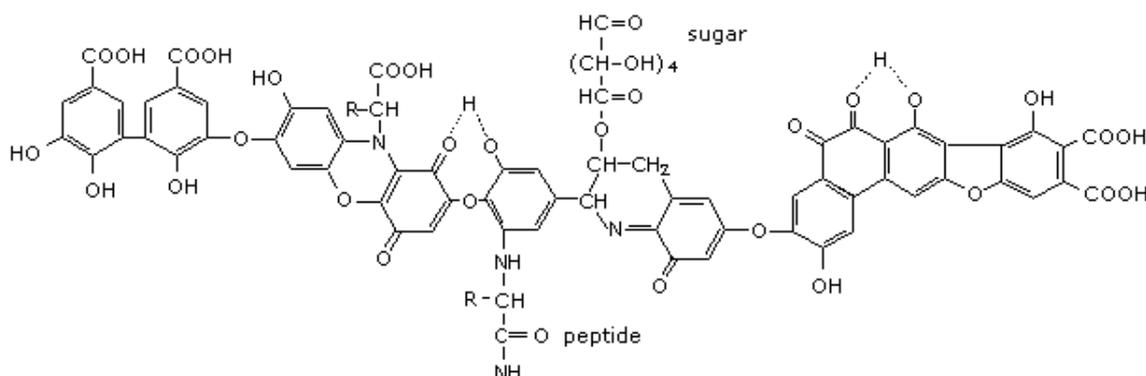
Obr. 1 Klasifikace huminových kyselin [4]

### 2.1.2 Složení huminových kyselin

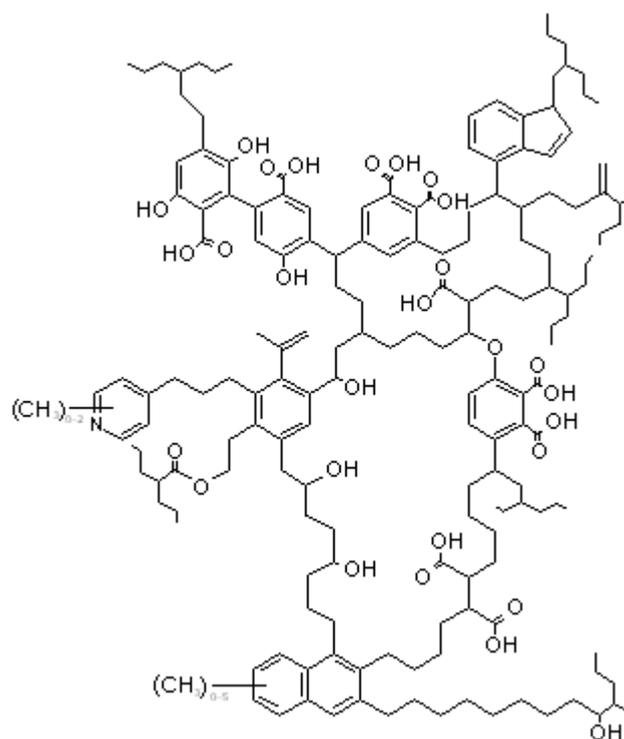
I přes to, že se huminové kyseliny hojně vyskytují v životním prostředí, doposud nebyla jejich složitá struktura přesně určena. V jejich stavbě se totiž objevuje obrovské množství různých funkčních skupin [2].

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 % [2].

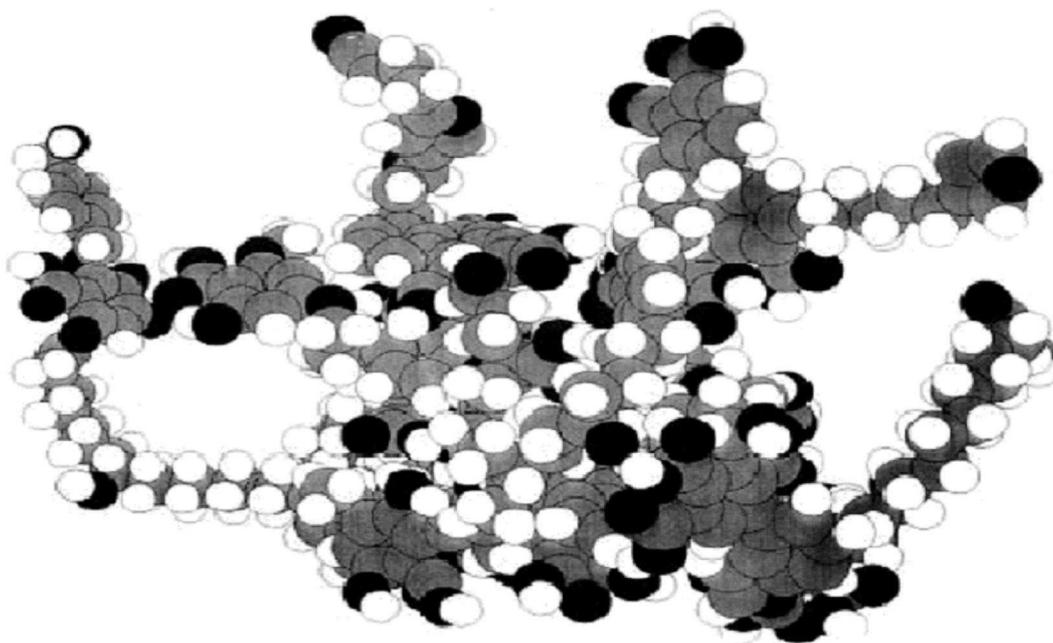
V literatuře se objevuje mnoho pokusů o objasnění struktury huminových kyselin a vytvoření jejich obecného vzorce. Na obrázcích (Obr. 2, Obr. 3, Obr. 4, Obr. 5) jsou uvedeny příklady některých z nich.



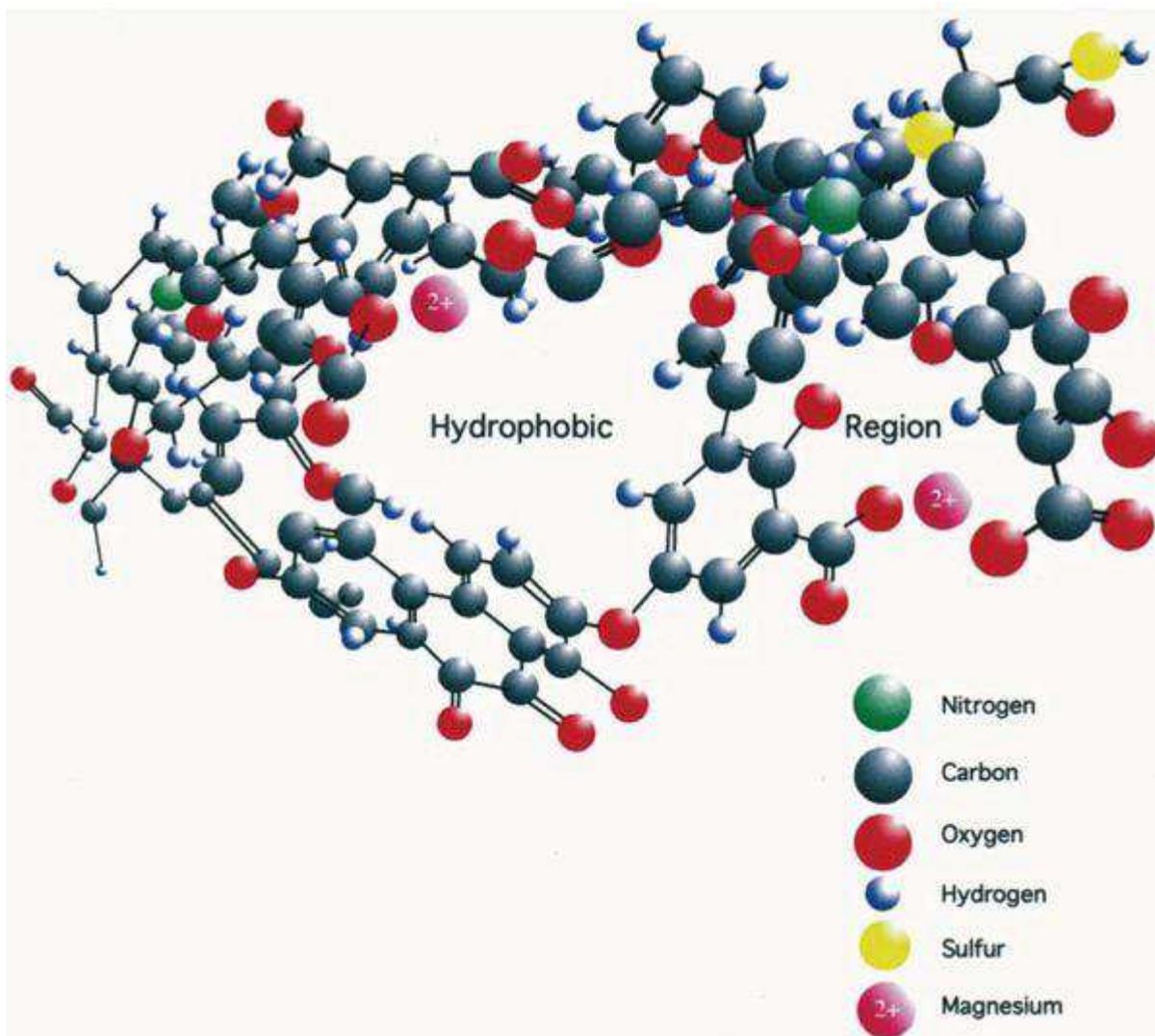
Obr. 2 Struktura huminových kyselin podle Stevenson [5]



Obr. 3 Část strukturního vzorce huminové kyseliny od Schultena a Schnitzera [5]



Obr. 4 Počítačově vytvořený model huminové kyseliny [5]



Obr. 5 Část struktury huminové kyseliny [6]

### 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 –, – NH<sub>2</sub> [3].

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. Nevýhody tkví zejména ve špatné rozpustnosti huminových kyselin ve vodě a ve většině organických rozpouštědel. Další problémy mohou způsobovat oxidační a redukční vlastnosti [6].

Nejběžnější metodou stanovení obsahu funkčních skupin 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 [6].

Obsah karboxylových funkčních skupin se nejčastěji stanovuje octanem vápenatým, který reaguje s huminovými látkami za vzniku kyseliny octové, jež je následně titrována roztokem hydroxidu sodného. Methylace huminových látek s následným zmýdelněním výsledného methylesteru není příliš uznávaná metoda díky velice obtížnému opětovnému zužitkování použitého materiálu a to zejména kvůli procesu zmýdelňování. Výsledky iodometrického stanovení karboxylových skupin byly po mnohých pokusech a vyhodnoceních označeny jako nereprodukovatelné [7].

Acetylace anhydridu kyseliny octové slouží ke stanovení hydroxylových skupin. Anhydrid, který se nachází v reakčním systému v nadbytku, je hydrolyzován za vzniku kyseliny octové. Další metodou je methylace dimethylsulfátu v alkalickém prostředí. Není zde ale stoprocentně potvrzeno, že by tento způsob stanovení určoval pouze alkoholové a fenolové OH skupiny [7].

Množství fenolových hydroxylů se dá snadno stanovit odečtením množství karboxylových skupin od hodnoty úplné kyselosti. Refluxuje-li se huminový materiál alkoholovým roztokem hydroxidu draselného, nadbytek zásady je odstraněn filtrací, filtrační koláč je promyt 85 % alkoholem syčeným oxidem uhličitým a zbylá kapalina je titrována standardizovanou kyselinou pro určení uhličitanu draselného. Z této titrace je rovněž možné stanovit množství fenolových hydroxylů [7].

V současné době neexistuje žádná vhodná metoda pro stanovení alkoholových OH skupin v huminových látkách. Tyto skupiny jsou totiž mnohem méně reaktivní než ty fenolové. Množství alkoholových hydroxylů se dá stanovit leda nepřímo a to tak, že odečteme množství fenolových hydroxylů od celkového množství hydroxylů [7].

Na počátku výzkumu huminových látek se používaly pro stanovení karboxylových skupin zejména metody založené na vzniku derivátů, který se určuje z nárůstu obsahu dusíku v porovnání s původním vzorkem. Jako deriváty se nejčastěji používají oximy a fenylylhydraziny. Fritz popisuje metodu, při které se obsah karboxylových skupin stanovuje titrací hydroxylaminu, který nezreagoval během reakce s methanol-2-propanolem, standardizovaným roztokem kyseliny chloristé. Schnitzer pro toto stanovení využíval polarografii. Nejprve nechal huminový materiál pod refluxem v kyselém prostředí 2, 4 – dinitrofenylhydrazinu. Výsledný obsah karboxylových skupin následně vypočítal z množství spotřebovaného reagentu. Schnitzerova metoda poskytuje v porovnání s ostatními metodami poměrně dosti spolehlivé výsledky. Obsah karboxylových skupin v huminových látkách lze zjistit i pomocí Brownova postupu, který je založen na redukci  $-CH_2OH$  pomocí borohydridu sodného v alkalickém prostředí. Rovněž se jedná o velice spolehlivou metodu [7].

Methoxylové skupiny jsou u huminových látek nejčastěji stanovovány jejich izolováním ze vzorku vřící kyselinou iodovodíkovou a převedením na iodometan, který je později oxidován bromem na kyselinu jodičnou. Přesné určení množství methoxylových skupin se provádí titrací standardizovaným roztokem thiosíranu sodného [7].

Přestože některé publikace zpochybňují výskyt chinolů v huminových látkách, existuje několik metod, které slouží k jejich stanovení. Kukharenko navrhl způsob, kde je huminový materiál zahříván v uzavřené trubici spolu s  $\text{SnCl}_2$  ve zředěné  $\text{HCl}$ . Po následné filtraci a promytí je stanoveno množství chinolových skupin titrací standardizovaným roztokem jodu. Vasilyevskaya navrhla metodu, kde je využit  $\text{SnCl}_2$  v alkalickém prostředí, jehož nadbytek je zpětně potenciometricky titrován a tím se dá dospět ke konkrétní hodnotě chinolových skupin obsažených ve vzorku huminové látky. Glebko popisuje metodu, která využívá redukci  $\text{Fe}^{2+}$  iontů v alkalické roztoku následovanou amperometrickou titrací nadbytku redukčního činidla [7].

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 nespecifické, a proto je třeba brát je s rezervou [6].

Závěrem lze konstatovat, že celková kyselost je mnohem vyšší u fulvínových kyselin než u huminových. Rovněž bylo zjištěno, že fulvínové 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 [3].

Přítomnost disociovatelných funkčních skupin ve struktuře huminových kyselin způsobuje, že se chovají jako slabě kyselé polyelektrolyty [3]. Disociací vzniká polyaniont o velkém počtu elementárních nábojů a ekvivalentní počet malých protiiontů opačného náboje ( $\text{H}_3\text{O}^+$ ). Důležitý je fakt, že silně kyselé skupiny disociují úplně, zatímco slabě kyselé skupiny disociují pouze do určitého stupně [11].

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. disociace 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,  $\gamma$  je aktivitní koeficient a  $\alpha$  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  $\text{H}_2\text{A}$  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  $\alpha$  stupeň disociace aniontu  $\text{HA}^-$  [12].

## 2.2.1 Metody studia rozpustnosti a disociace huminových kyselin

### 2.2.1.1 Titrační metody

Pro studium disociačních rovnováh 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, alkoholové a fenolové OH skupiny a za určitých podmínek také aminové skupiny.

Pro určení zdánlivé disociační konstanty se obvykle používá Henderson-Hasselbachova metoda, která je popsána v publikaci [13] 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  $\alpha$  je stupeň disociace.

Stupeň disociace  $\alpha$  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  $c_{\text{NaOH}}$  je molární koncentrace odměrného roztoku a  $V_{\text{NaOH}}$  je jeho objem,  $V_{\text{susp}}$  je objem suspenze před titrací,  $[\text{H}^+]$  je koncentrace  $\text{H}^+$ ,  $b_c$  je celková kyselost a  $g_{\text{HA}}$  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 [13] 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  $pK_a$ . Experimentální data prokládají vlastním modelem odvozeným na základě Debye-Hückelovy teorie. Výsledky srovnávají s daty získanými pro kyselinu galovou, jako modelovou aromatickou hydroxykyselinu.

Publikace [14] se zabývá potenciometrickou titrací prováděnou na huminových kyselinách obecně. Ke stanovení disociační konstanty je i zde využita rovnice Hendersona-Hasselbacha. V závěru práce autoři konstatují, že potenciometrická titrace je pro huminové kyseliny velice důležitou metodou a to zejména co se týče určení jejich acidobazických vlastností.

V práci [15] se zkoumají vlastnosti ionizovatelných funkčních skupin huminových kyselin. Potenciometrickou titrací se stanovuje stechiometrie a  $pK_a$  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 [16]. Byly zde zkoumány acidobazické vlastnosti u dvou různých vzorků půdních huminových kyselin. Titrací byla u huminových kyselin určena pufrační kapacita, hodnoty zdánlivých disociačních konstant a povrchový náboj.

S cílem stanovení celkové kyselosti huminových kyselin byla potenciometrická titrace použita v kombinaci s průtokovou coulometrií. Hodnoty disociačních konstant slouží pro kontrolu správnosti každého experimentu [17].

Potenciometrická titrace byla použita i při stanovení disociační konstanty ve článku [18], který zkoumá disociaci kovových kationů z huminových látek, která řídí disociaci těchto iontů přes membránu. Bylo zjištěno, že se snižujícím se pH a se zvýšením iontové síly roste rychlost iontové výměny.

Titrační hystereze běžné nastává u potenciometrické titrace prováděné na huminových kyselinách. Znamená to, že náboj huminových kyselin nelze popsat jako funkci pH a je nutno podotknout, že chování těchto látek při nižším pH než 3 je zcela nepředvídatelné. Dále kinetika protonačních a deprotonačních reakcí u huminových kyselin svědčí o tom, že titrační hystereze může být způsobena nerovnováhou a to zejména při vyšších hodnotách pH. Proto byla navržena sedmidenní automatizovaná titrační procedura, která vzniklou hysterezi eliminuje [19].

V práci [20] 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 [21] 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:

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

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 [22] 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 [23] 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. Tento fakt využívají autoři k tomu, aby zkoumali interakce huminových kyselin s různými stopovými kovy, jak je popsáno v publikaci [24]. Z výsledků potenciometrické titrace vyplývá, že vlivem stopových kovů dochází v průběhu titrace k mnohem většímu nárůstu pH, což vede ke snížení efektu iontové síly. Různé průběhy titračních křivek dokládají přítomnost funkčních skupin.

Sorpce vzácných kovů u bezpopelových huminových kyselin byly zkoumány v publikaci [25]. Autoři zde stanovují disociační konstantu z výsledků pH-metrické titrace a to přes transformovanou Langmuirovu rovnici nelineární metodou nejmenších čtverců. Hodnoty disociační konstanty zde posloužily pro stanovení distribuční funkce, která hraje důležitou roli při určování sorpční kapacity.

V práci [26] byly zkoumány metody frakcionace funkčních skupin huminových kyselin pomocí konduktometrických titrací. Funkční skupiny byly v této studii rozděleny do tří kategorií: první obsahuje skupiny hydroxylové a část karboxylových, druhá obsahuje karboxylové skupiny různých alifatických a aromatických monomerních jednotek a do poslední kategorie patří karboxylové skupiny s nízkými hodnotami disociačních konstant, silikáty a ftaláty.

Publikace [27] se věnuje nevodným titracím fulvínových 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.

Na stanovení  $pK_a$  lze aplikovat i výpočetní techniku, která dokáže s dosti velkou přesností odhadnout hodnotu  $pK_a$  organické látky, u níž lze tuto veličinu stanovit titračními metodami. Samotný výpočet se provádí přes složitý mechanismus, který stojí na porovnání rozdílů energií plynné fáze a na solvatační energii protonizovaných a deprotonizovaných částic vzorku [28].

### 2.2.1.2 *Spektrofotometrické metody*

Spektroskopické metody jsou pro výzkum huminových látek vhodné v mnoha ohledech. Jedná se totiž o zcela nedestruktivní procedury, které vyžadují pouze minimální množství vzorku, jsou jednoduché na provedení, při němž nejsou vyžadovány žádné speciální dovednosti a často poskytují hodnotné informace o struktuře molekul a o chemických interakcích.

Barevnost vodných roztoků huminových látek doslova vybízí k optickému porovnání, která jsou často založena na absorpci světelného záření, jež se řídí Lambert-Beerovým zákonem, který tvrdí, že zářivý tok se po průchodu vrstvou látky, která je schopna světlo absorbovat, zeslabí. Lambert-Beerův zákon je popsán následující rovnicí:

$$\phi = \phi_0 \cdot 10^{-\varepsilon \cdot c \cdot l} \quad (16)$$

kde  $\phi$  je zářivý tok po průchodu vrstvou látky,  $\phi_0$  je primární zářivý tok,  $\varepsilon$  je dekadický (molární) extinkční koeficient,  $c$  je koncentrace látky, kterou zářivý tok prochází a  $l$  je dráha zářivého toku skrz látku.

Vodné roztoky relativně vysokomolekulárních huminových látek poskytují jednotvárná spektra bez jasného maxima či minima v rozsahu vlnových délek pro viditelné světlo. V oblasti ultrafialového světla nejsou viditelné rovněž žádné specifické absorpce. Absorpční maximum bývá v UV oblasti rozpoznáno kolem 260 – 300 nm vlnové délky [7].

Určení disociační konstanty  $pK_a$  u huminových kyselin je důležitou metodou studia jejich vlastností. Tato diplomová 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 [29], 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 [30] byl zjišťován vliv disociační konstanty na povrchovou koncentraci. Zkoumanou látkou byl pralidoxim, který je řazen mezi oximy, jež vážou  $\alpha$ -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 [31] 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 [32] rozpouštěli methyloranž, methylčerveně 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 [33] byly porovnávány výsledky spektrofotometrické a potenciometrické metody. Disociační konstanty byly určovány u tří derivátů 2-merkapt-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.

Autoři článku [34] rozšiřují použitelnost této metody tím, že vyvinuly způsob, kterým je možné přesně určit pH hodnoty ze spektrofotometrického měření v kombinaci s experimentálně zjištěnými hodnotami aktivitního koeficientu. Tuto metodu lze díky tomu aplikovat i na látky o iontové síle v rozsahu  $0 - 3 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  a to až do teploty  $65 \text{ }^\circ\text{C}$ , protože u takovýchto vzorků je stanovení pH pomocí skleněné elektrody poněkud nepřesné. Tato spektrometrická pH metoda byla použita pro určení disociační konstanty  $pK_a$  kyseliny arsenité  $\text{HAsO}_2$  s přesností  $pK_a$  0,005.

Deriváty acridonu jsou velmi slabé kyseliny a k jejich disociaci proto dochází pouze v prostředí pufru o velmi vysoké hodnotě pH. V těchto podmínkách ale rovněž nastávají problémy s určením pH pomocí skleněné elektrody. V práci [35] byla proto použita spektrofotometrická titrace velmi silnou bází a použitím Benesi-Hildebrandového vyhodnocení byly získány hodnoty disociačních konstant u derivátů acridonu.

V publikaci [36] je představena metoda, která je založena na stejném principu jako ta, která byla použita v této diplomové práci. Její výhodou je to, že uživatel nemusí určovat koncentraci ani extinkční koeficient vzorku a umožňuje určení  $pK_a$  i u velice slabých nebo silných kyselin a zásad. Konkrétní hodnota disociační konstanty je stanovena dle následující rovnice:

$$pK_a = I - \log \frac{(10^b - 10^a)A_1 + (1 - 10^b)A_2 + (10^a - 1)A_3}{(10^a - 10^b)A_1 + (10^{a+b} - 10^a)A_2 + (10^b - 10^{a+b})A_3} \quad (17)$$

kde  $pK_a$  je zdánlivá disociační konstanta,  $pH = I$ ,  $A_1$ ,  $A_2$  a  $A_3$  jsou absorbance měřené při různých hodnotách pH  $a$  a při  $I$ ,  $I + a$ ,  $I + b$ , kde  $a \neq b \neq 0$ .

Autoři práce [37] stanovovali spektrofotometricky  $pK_a$  u acidobazického indikátoru methylové žluti ve snaze o zlepšení její aplikovatelnosti na nevodné titrace. Zkoumali zejména vliv velikosti alkylových řetězců alkoholů, které byly v této práci použity jako rozpouštědla, na disociační konstantu. Zjistili, že hodnoty  $pK_a$  klesají se zvyšující se velikostí alkylového řetězce alkoholů. Tyto výsledky vědcům rovněž napomohly k objasnění faktu, že změnou rozpouštědla dochází k posunu absorpčních spekter a zejména ke změně rozsahu barevného přechodu u titrace s použitím methylové žluti jako indikátoru.

### 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 A, HK B
- HCl 35% p.a., Lach-Ner., s.r.o.
- NaOH p.a., Merci, s.r.o.
- $\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3 \text{H}_2\text{O}$  p.a., Lachema n.p. Brno
- $\text{CH}_3\text{COOH}$  80 % p.a., Lach-Ner., s.r.o.
- deionizovaná voda

#### 3.3 Příprava vzorků huminových kyselin

V rámci řešení této práce byly použity dva 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 A je vzorek izolován následujícím způsobem. 60 g lignitu bylo zalito 2 dm<sup>3</sup> extrakčního roztoku (0,5 g·dm<sup>-3</sup> NaOH + 0,1 g·dm<sup>-3</sup> Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>). 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<sup>-3</sup> (pH < 1) a jednou destilovanou vodou. Nakonec byly získané huminové kyseliny vysušeny při 50 °C a dále byly přečištěny směsí HCl a HF (10 cm<sup>3</sup> konc. HCl + 20 cm<sup>3</sup> konc. HF + 1970 cm<sup>3</sup> H<sub>2</sub>O). Tento roztok byl protřepáván 24 hodin 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 AgNO<sub>3</sub> na Cl<sup>-</sup> negativní. Poté byly získané huminové kyseliny vysušeny při 50 °C.

Vzorek huminových kyselin HK B je standard IHSS (International Humic Substances Society) Leonardite (1S104H). HK B byl izolován z leonarditu, což je neprouhelněná část organických látek, která je součástí některých uhelných nalezišť. Ten byl nejprve temperován při pokojové teplotě v prostředí HCl o koncentraci 1 mol·dm<sup>-3</sup> při pH = 1 – 2. Suspenze o koncentraci 10 ml tekutiny na 1 g suchého vzorku byla hodinu protřepávána, následně byla

pevná složka oddělena dekantací a byla neutralizována roztokem NaOH o koncentraci  $1 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$  na  $\text{pH} = 7$ . Poté byl přidán roztok NaOH o koncentraci  $0,1 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$  pod atmosférou dusíku  $\text{N}_2$  tak, aby výsledný poměr suspenze činil opět 1:10. Tato suspenze byla protřepávána 4 hodiny pod atmosférou  $\text{N}_2$ , přes noc byla ponechána v klidu a následně byla pevná fáze oddělena dekantací. Znovu byl vzorek okyselen roztokem HCl o koncentraci  $6 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$  na  $\text{pH} = 1,0$  a po té byl ponechán 16 hodin v klidu. Odstředěním byla odstraněna sraženina huminové kyseliny, která byla znovu rozpuštěna v minimálním množství roztoku KOH o koncentraci  $0,1 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$  pod  $\text{N}_2$ . Bylo přidáno potřebné množství pevného KCl, aby byla koncentrace směsi  $0,3 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ . Poté byla odstředěním odstraněna pevná residua. Přídavkem roztoku HCl o koncentraci  $6 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$  do  $\text{pH} = 1,0$  došlo k opětovnému vysrážení produktu. Takto vzniklá směs byla 16 hodin ponechána v klidu. Ke sraženině byla přidána HCl o koncentraci  $1 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$  s HF o koncentraci  $0,3 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$  a tato soustava byla přes noc protřepávána při pokojové teplotě. Proces promytí byl opakován do snížení množství přítomného popela pod 1 %. Výsledná sraženina byla dialyzována proti destilované vodě, dokud nebyl test s  $\text{AgNO}_3$  na přítomnost  $\text{Cl}^-$  iontů negativní. Na závěr byl výsledný vzorek huminových kyselin HK B lyofilizován [38][37].

### 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 $\text{pK}_a$ huminových kyselin

Hodnoty  $\text{pK}_a$  huminových kyselin byly stanoveny dvěma různými způsoby. První 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  $\text{pK}_a$  provedené následujícím způsobem. Nejprve byl připraven z roztoku  $\text{CH}_3\text{COOH}$  o koncentraci  $0,1 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$  a z roztoku  $\text{CH}_3\text{COONa}$  o koncentraci  $0,2 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$  tlumivý roztok tak, aby jeho  $\text{pH}$  mělo hodnotu 5,6. Byly připraveny suspenze huminových kyselin v octanovém pufru o koncentracích 20 a  $40 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$ . Po dvaceti čtyř hodinovém třepání bylo u výluhů změřeno  $\text{pH}$ , vodivost, UV/VIS spektrum. Poté byly výluhy zředěny v poměru 1:10 s pufrům (bylo změřeno  $\text{pH}$ ), HCl a NaOH o koncentracích  $0,1 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$ . Toto rozředění bylo provedeno i u vodných výluhů HK A. Byla proměřena UV/VIS spektra v rozsahu vlnových délek  $\lambda \in \langle 200; 800 \rangle \text{ nm}$ . Disociační konstanta byla stanovena podle následujícího vztahu:

$$\text{pK}_a = \text{pH} + \log \frac{A_{v \text{ pufru}} - A_{v \text{ NaOH}}}{A_{v \text{ HCl}} - A_{v \text{ pufru}}}, \quad (18)$$

Absorbance  $A$  byly dosazovány vždy pro stejnou vlnovou délku,  $\lambda \in \langle 250; 350 \rangle$  nm nebo pro  $\lambda \in \langle 400; 500 \rangle$  nm v případě, že byly naměřeny příliš vysoké hodnoty absorbancí v rozsahu vlnových délek  $\lambda \in \langle 250; 350 \rangle$  nm, protože takové hodnoty způsobují poměrně velkou chybovost při stanovení disociační konstanty z důvodu omezení platnosti Lambert-Beerova zákona. Za pH bylo dosazováno pH výluhu huminové kyseliny po zředění pufrům.

## 4. VÝSLEDKY A DISKUZE

### 4.1 Charakterizace huminových kyselin

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

Ve zkoumaných huminových kyselinách byl obsah uhlíku stanoven v rozmezí 43,9 až 48,1 atomových % a obsah kyslíku se pohybuje mezi 15,0 a 17,7 atomových %. Méně kyslíku je obsaženo v huminové kyselině HK A.

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.

Pro disociační chování huminových kyselin má největší význam obsah kyslíku, neboť nepřímě vypovídá o obsahu kyselých funkčních skupin (COOH, OH, příp. SO<sub>3</sub>H). K tomuto účelu se často používá srovnání poměru C/O pro různé huminové vzorky, který má u HK A hodnotu 2,93 a u HK B 2,72. Nižší hodnota tohoto poměru u vzorku HK B ukazuje na vyšší obsah kyselých funkčních skupin, což plně koresponduje s výsledky stanovení celkové kyselosti (viz Tab. 2).

Z poměru C/H pak lze usuzovat na výskyt nenasycených vazeb a tedy i aromatických struktur v huminových látkách. Tento poměr je výrazně vyšší u vzorku HK B (1,45) než HK A (1,09). Lze tedy předpokládat, že vzorek HK B obsahuje ve své struktuře více násobných vazeb a kondenzovaných aromatických jader než HK A, neboť na uhlíkový skelet o stejném počtu atomů (C) zde připadá méně atomů vodíku.

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

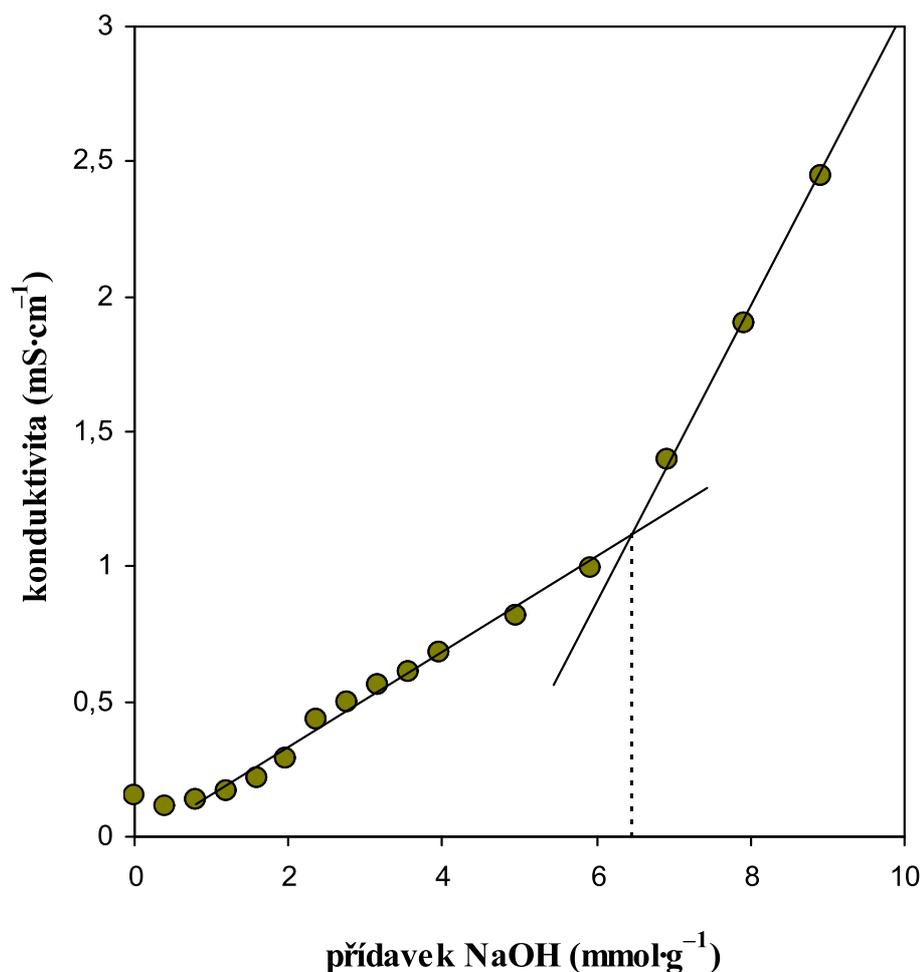
vzorek	atomová %					hm. %
	C	H	O	N	S	popel
HK A	43,9	40,2	15,0	0,7	0,2	1,9
HK B	48,1	33,2	17,7	0,8	0,2	2,6

Během analýzy obou vzorků huminových kyselin bylo zjištěno, že obsahují pouze malé množství popela. Tento fakt souvisí zejména s tím, že byl zvolen vhodný způsob přípravy, zejména ve fázi čištění vzorků. Oba vzorky totiž byly důkladně promyty směsí HCl s HF a bylo provedeno úplné odstranění Cl<sup>-</sup> iontů, což bylo potvrzeno kvalitativním testem s AgNO<sub>3</sub>. Dále následovalo pročištění dialýzou proti vodě. Podrobný způsob přípravy vzorků je popsán v kapitole 3.3.

Tab. 2 Celková kyselost huminových kyselin

vzorky	celková kyselost [mmol·g <sup>-1</sup> ]
HK A	4,94
HK B	6,47

Z Tab. 2 je patrné, že celková kyselost je mnohem vyšší u huminové kyseliny HK B. Je tomu tak zřejmě proto, že HK B je izolována z leonarditu, což je neprouhelněná část organických látek, která je součástí některých uhelných nalezišť, obsahuje mnohem více kyslíku a tím pádem i mnohem více kyselých funkčních skupin, které mají za následek vysokou celkovou kyselost HK B. Vzorek HK A je izolován z lignitu, který obecně obsahuje mnohem méně kyslíku než leonardit, a proto má vzorek HK B mnohem vyšší kyselost, i když během jeho přípravy při vymývání popela směsí HCl + HF muselo nutně dojít k vymytí určitého množství frakcí huminových kyselin bohatých na kyselé funkční skupiny, které podporují jejich rozpustnost. Příklad experimentálních dat získaných při titraci vzorku HK B je uveden na Obr. 6. Celková kyselost obou vzorků byla určena z průsečíku dvou lineárních větví konduktometrické titrační křivky řešením soustavy dvou rovnic daných přímkami.

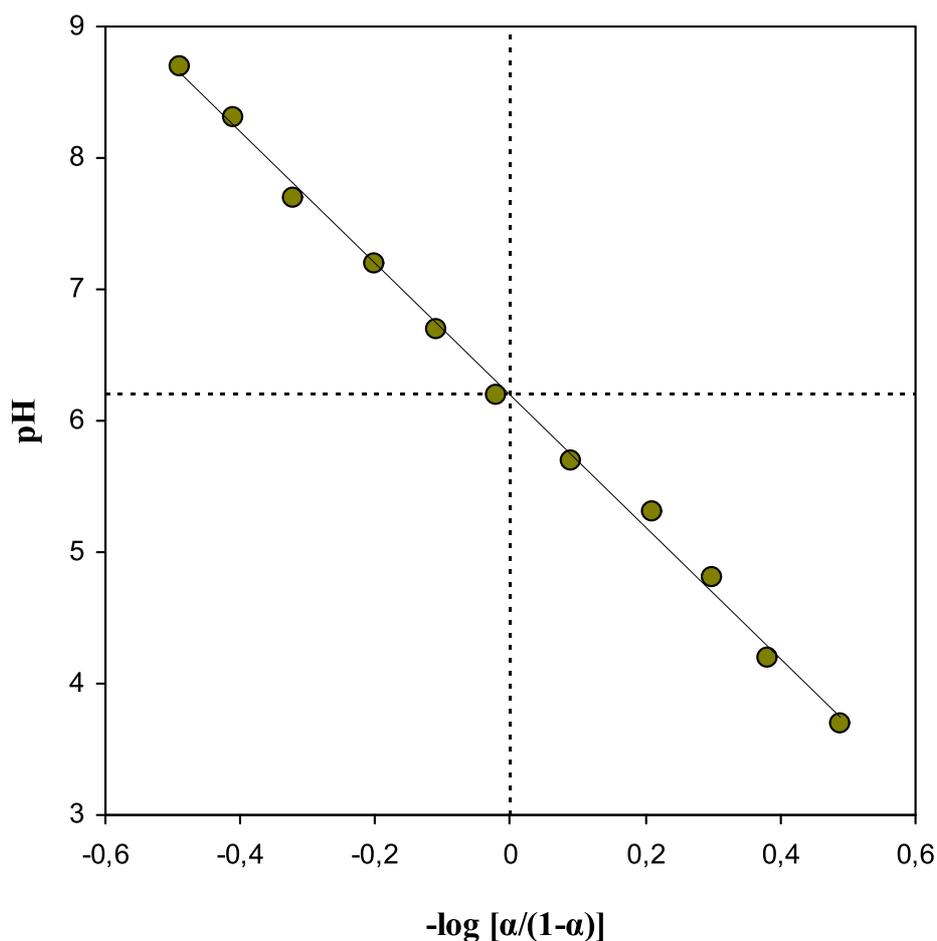


Obr. 6 Titrace suspenze HK B pro stanovení celkové kyselosti

Vzorek huminové kyseliny HK A byl částečně prozkoumán již dříve v bakalářské práci [1], kde je představen jako vzorek HK 2. Oba vzorky HK A i HK B byly porovnány v publikaci [39], kde byly stanoveny hodnoty jejich zdánlivých disociačních konstant titrační metodou podle Hendersona-Hasselbacha. Příklad grafického stanovení touto metodou je uveden na Obr. 7, kde je vyobrazena titrační závislost HK B vzorku. Hodnoty  $pK_a$  jsou podle této metody vypočteny jako pH stanovené pro 50 % disociovaných kyselých funkčních skupin při potenciometrické titraci vodné suspenze huminových kyselin – viz. též rovnice (18). Takto získané výsledky pro vzorky HK A a HK B jsou uvedeny v tabulce Tab. 3.

Tab. 3 *Zdánlivé disociační konstanty získané metodou podle Hendersona-Hasselbacha v rámci práce [1]*

vzorky	Henderson-Hasselbach	
	$pK_{app}$	$\pm$
HK A	9,33	0,10
HK B	6,16	0,16



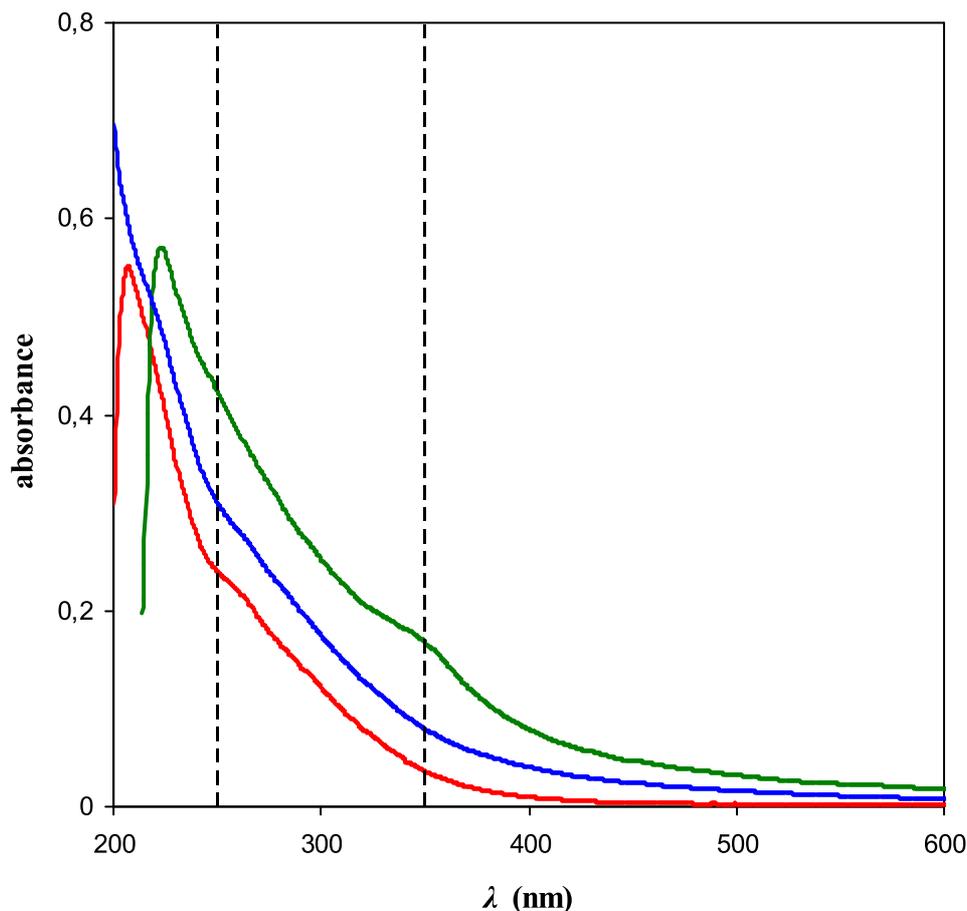
Obr. 7 *Henderson-Hasselbachova závislost u HK B*

Podle výsledků uvedených v Tab. 3 by vzorek HK B měl obsahovat mnohem vyšší podíl silnějších kyselých funkčních skupin než vzorek HK A. Obecně jsou z kyselých funkčních skupin v huminových látkách nejsilnější  $\text{SO}_3\text{H}$ , ovšem vzhledem k velmi nízkému obsahu síry u obou vzorků (viz. Tab. 1) lze jejich vliv na celkovou kyselost vzorků použitých v této práci a jejich disociační chování zanedbat. Oba vzorky pak obsahují jak  $\text{COOH}$ , tak  $\text{OH}$  skupiny, které se spolupodílí na jejich acido-bazickém chování. Jejich vzájemný poměr a zejména okolí jednotlivých kyselých funkčních skupin pak rozhodují o střední hodnotě  $\text{p}K_a$ . Standard IHSS HK B by pak měl ve vodných roztocích za jinak stejných podmínek disociovat mnohem lépe než HK B izolované z lignitu. Ovšem už hodnota  $\text{p}K_a$  pro vzorek HK A (9,33) napovídá, že disociační konstanty stanovené metodou Henderson-hasselbacha příliš neodpovídají reálnému chování huminových kyselin, neboť to je hodnota odpovídající spíše disociaci fenolických  $\text{OH}$  skupin než karboxylových  $\text{COOH}$ , které jsou v lignitických HK vždy hojně zastoupeny [7], [8], [39].

#### 4.2 Stanovení $\text{p}K_a$ huminových kyselin

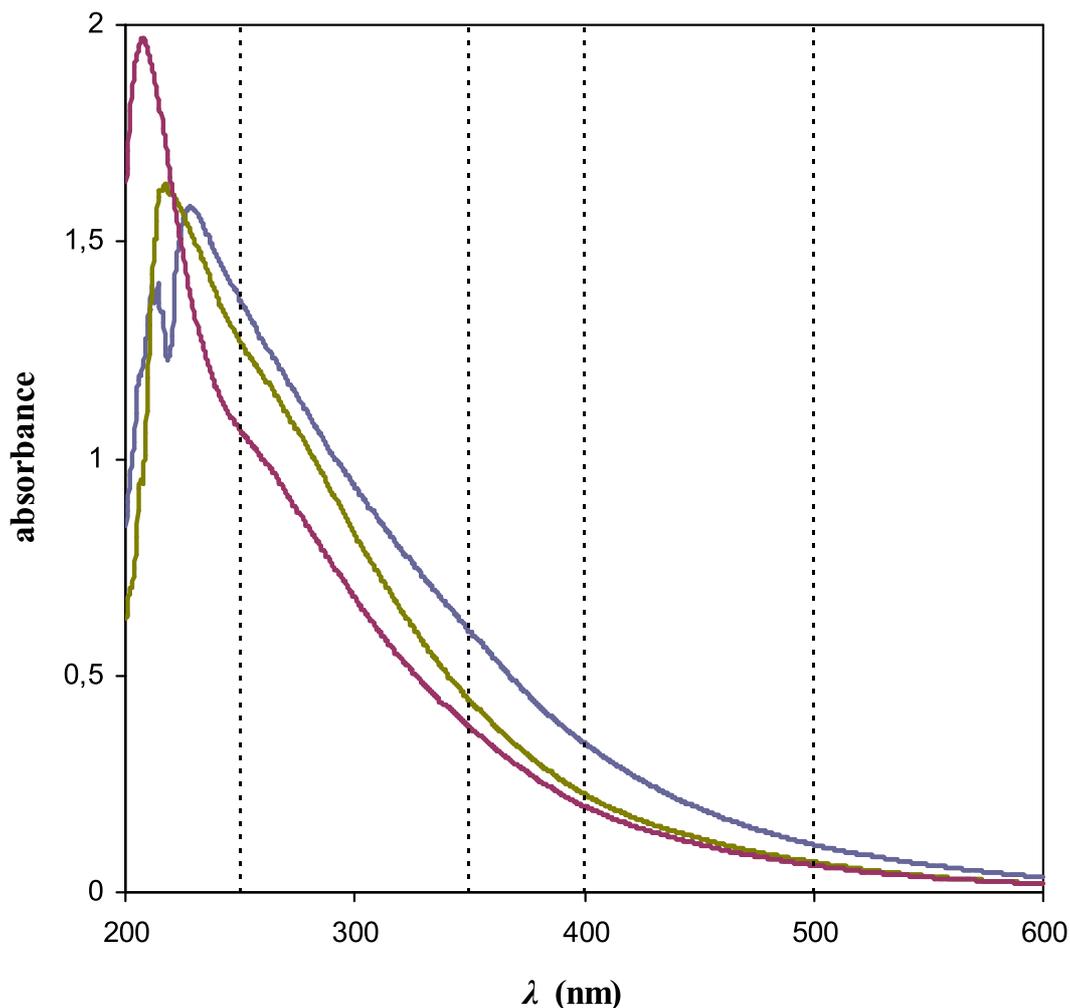
Na základně poznatků obdržených během řešení bakalářské práce [1] byla i zde snaha o to, aby pro stanovení hodnoty  $\text{p}K_a$  byly používány pouze hodnoty absorbancí v rozsahu vlnových délek 250 – 350 nm a to z důvodu, aby absorpce nebyly moc nízké, což by mohlo vést ke snadné chybě při výpočtu a ani moc vysoké, protože vyšší hodnoty absorpce jsou podle Lambert-Beerova zákona málo přesné. Spektra jednotlivých vzorků huminových kyselin by se rovněž neměla křížit.

Experimentální důkaz těchto vlastností spekter je vidět na Obr. 8, který reprezentuje chování vzorku huminové kyseliny HK 1, která byla použita v bakalářské práci [1]. Spektrum vypovídá o tom, že hodnoty absorbancí pod hranicí vlnové délky 250 nm dosahují absorpčního maxima a zde dochází i ke křížení jednotlivých spekter. Na stejném grafu je patrné, že hodnoty absorbancí nad hranicí vlnové délky 350 nm jsou příliš nízké a rozdíly mezi absorbancemi u jednotlivých vzorků jsou minimální, což by mohlo při výpočtu  $\text{p}K_a$  vést k poměrně velké chybovosti. Ideální rozmezí vlnových délek pro výpočet disociační konstanty je proto 250 – 350 nm, kde se spektra jednotlivých roztoků nekříží a jejich pořadí odpovídá reálným disociačním vlastnostem. Čili výluhy ředěné roztokem  $\text{HCl}$  dosahují nejnižších hodnot absorpce a výluhy ředěné roztokem  $\text{NaOH}$  mají absorpce nejvyšší.



Obr. 8 UV/VIS spektrum výluhu HK 1 o koncentraci suspenze  $40 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$  zředěného v poměru 1:10 vodou (modrá), roztokem HCl (červená) a NaOH (zelená). V grafu je vyznačen rozsah vlnových délek 250 – 350 nm, který byl použit pro výpočet  $pK_a$  [1].

Průběh spekter výluhů huminových kyselin v pufru dokládá Obr. 9. Jde o výluhy, kde již v prvním kroku byl místo vody použit stejný pufr jako pro následné ředění v další fázi. Opět zde dochází ke křížení jednotlivých spekter pod hodnotou 250 nm vlnové délky. Rozsah vlnových délek 250 – 350 nm sice poskytuje jednotlivá spektra, která se navzájem nekříží a jejich pořadí odpovídá reálným disociačním chováním huminových kyselin, ale hodnoty absorbancí jsou pro výpočet disociační konstanty poněkud vysoké a mohou tak způsobit poměrně dosti velkou chybu. Pro výpočet  $pK_a$  u výluhů s pufrům se proto lépe hodí data z rozmezí vlnových délek 400 – 500 nm, kde jsou přijatelnější hodnoty absorbancí.

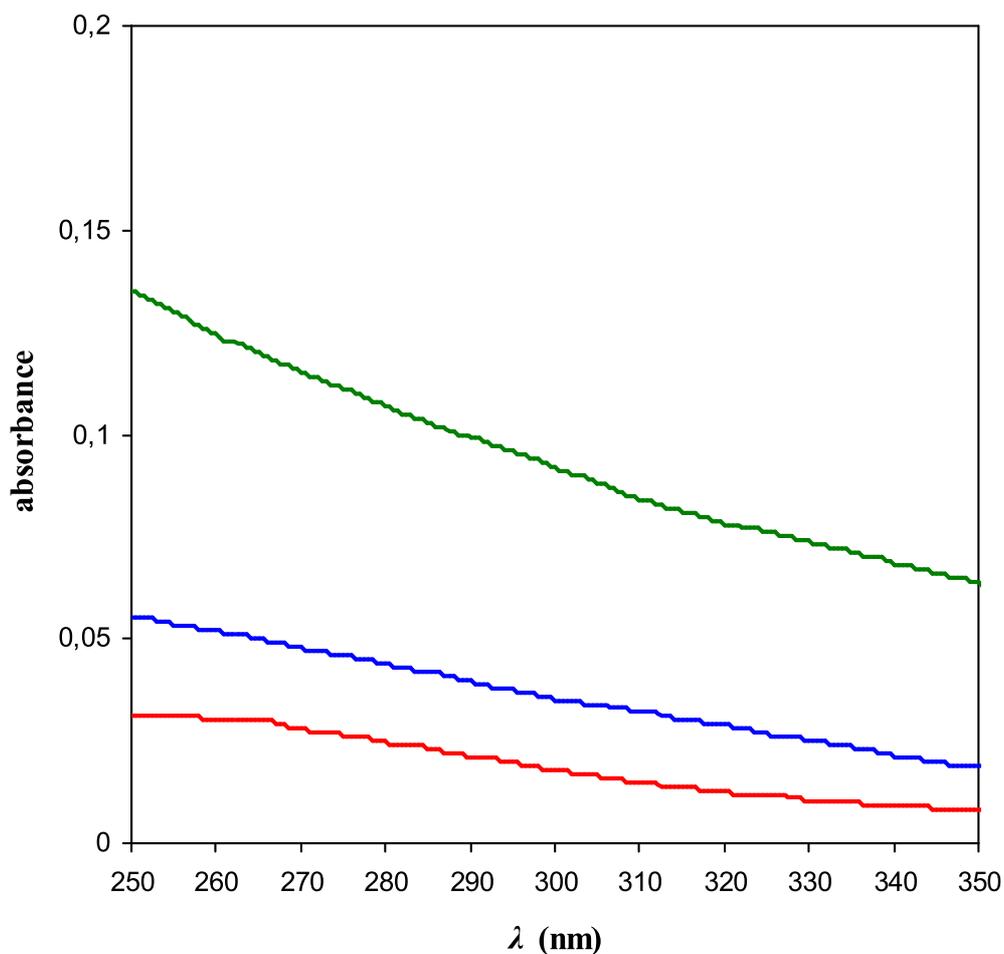


Obr. 9 UV/VIS spektrum výluhu HK A o koncentraci suspenze  $20 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$  zředěného v poměru 1:10 roztokem NaOH (modrá), roztokem HCl (fialová) a puřrem (zelená). V grafu jsou vyznačeny rozsahy vlnových délek 250 – 350 nm a 400 – 500 nm, které byly použity pro výpočet  $pK_a$

Proto i v této diplomové práci byla pro stanovení hodnot disociační konstanty spektrofotometrickou UV/VIS metodou v rámci možností použita data v rozmezí 250 – 350 nm, v nichž spektra jednotlivých výluhů poskytují reprezentovatelné průběhy, umožňují kvalitní a přesné vyhodnocení a zcela odpovídají reálným disociačním vlastnostem. Byla zde však použita i data z rozmezí vlnových délek 400 – 500 nm, které svým průběhem jednotlivých spekter rovněž vyhovují podmínkám pro stanovení disociační konstanty. Pro oba vzorky huminových kyselin byly hodnoty  $pK_a$  vypočteny z absorbancí v obou oblastech a srovnány mezi sebou. Účelem bylo jednak vybrat vhodnou oblast pro zpracování dat u obou použitých vzorků a jednak ověřit, zda změnou vlnových délek použitých pro výpočet nedochází ke změně výsledků, tj. hodnot  $pK_a$ .

V předcházející bakalářské práci [1] bylo zjištěno, jaké je ideální množství vzorku huminových kyselin pro přípravu jejich suspenzí na UV/VIS spektrofotometrické stanovení disociační konstanty. Experimentálním stanovením prošly suspenze s různým obsahem huminových kyselin (2, 20, 40, 100 a 500 g·dm<sup>-3</sup>). Takto široký rozsah obsahu huminových kyselin v suspenzích byl použit zejména proto, aby byl ověřen vliv koncentrace na stanovení střední hodnoty pK<sub>a</sub>. Dalším důvodem bylo najít vhodný interval vlnových délek, kde pro měřené absorbance platí Lambert-Beerův zákon a do výpočtů se tak nezavádí zbytečné chyby z vlastního měření.

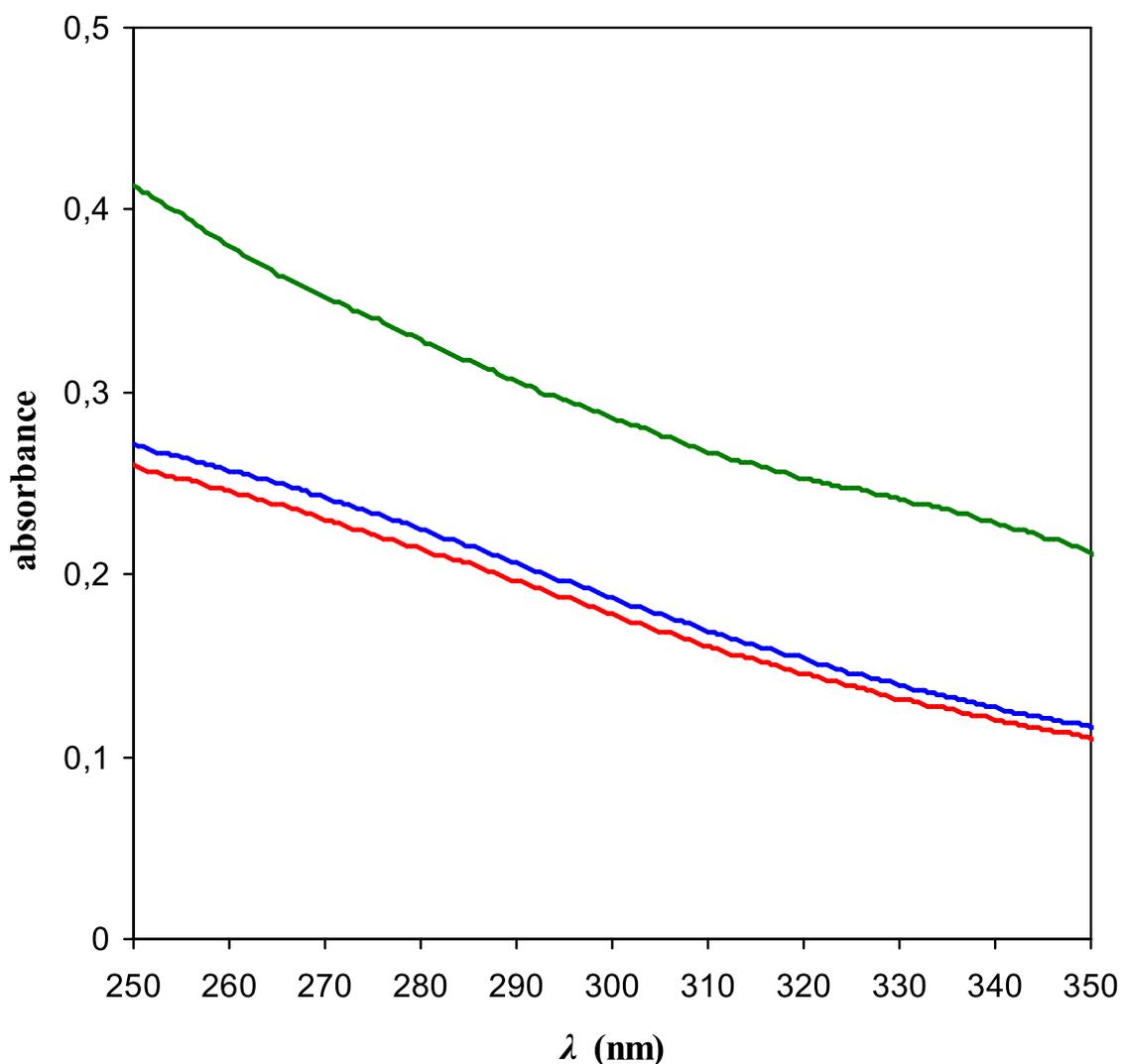
U spekter roztoků připravených z výluhu suspenze o obsahu huminových kyseliny 2 g·dm<sup>-3</sup> jsou příliš nízké hodnoty absorbance, zejména u výluhů zředěných s HCl a někdy i u výluhů zředěných s vodou, jak je vidět na obrázku Obr. 10, který představuje graf UV/VIS spekter výluhu HK A zředěného s vodou, NaOH a HCl v poměru 1:10. Je vidět, že výluhy v prostředí HCl a rovněž i výluhy v prostředí vody mají příliš nízké hodnoty absorbance. Z tohoto důvodu je u této koncentrace zaznamenána velká chyba v měření i ve výpočtu. Obsah huminových kyselin 2 g·dm<sup>-3</sup> je nevhodný na přípravu suspenzí na výluhy pro UV/VIS spektrofotometrické stanovení disociační konstanty.



Obr. 10 UV/VIS spektrum výluhu HK A o koncentraci suspenze 2 g·dm<sup>-3</sup> zředěného v poměru 1:10 vodou (modrá), roztokem HCl (červená) a NaOH (zelená).

Obsah huminových kyselin  $500 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$  v suspenzi na přípravu výluhu je rovněž nevhodný 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 vysokém obsahu huminových kyselin jejich samotná disociace způsobí takový pokles pH, že výluh je i bez přidání HCl poměrně silně kyselý. Z tohoto důvodu jsou hodnoty získané při ředění vodou a HCl velmi podobné.

Na Obr. 11 je uveden příklad UV/VIS spektra HK 2 s obsahem huminových kyselin  $100 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$ . 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. U některých vzorků huminových kyselin o této koncentraci došlo dokonce k tomu, že hodnoty absorbancí v rozmezí vlnových délek 250 – 350 nm byly příliš vysoké, a proto nepoužitelné pro výpočet  $pK_a$ . Výluh ze suspenze o obsahu huminových kyselin  $100 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$  proto rovněž nelze pro tento způsob stanovení  $pK_a$  doporučit.



Obr. 11 UV/VIS spektrum výluhu HK A o koncentraci suspenze  $100 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$  zředěného v poměru 1:10 vodou (modrá), roztokem HCl (červená) a NaOH (zelená).

Z výsledků bakalářské práce [1] je patrné, že nejvhodnější pro spektrofotometrické stanovení disociačních konstant je, aby byly pro stanovení  $pK_a$  použity výluhy ze suspenze o obsahu huminových kyselin v rozmezí 20 – 40  $\text{g}\cdot\text{dm}^{-3}$ . Výsledné hodnoty odpovídající 20  $\text{g}\cdot\text{dm}^{-3}$  huminových kyselin v suspenzi použité pro přípravu výluhu jsou uvedeny v Tab. 4. Pro srovnání jsou též uvedeny hodnoty  $pK_a$  stanovené podle metodiky Hendersona-Hasselbacha (viz. Tab. 5), v rámci které se prováděly titrace suspenzí o stejném obsahu huminových kyselin.

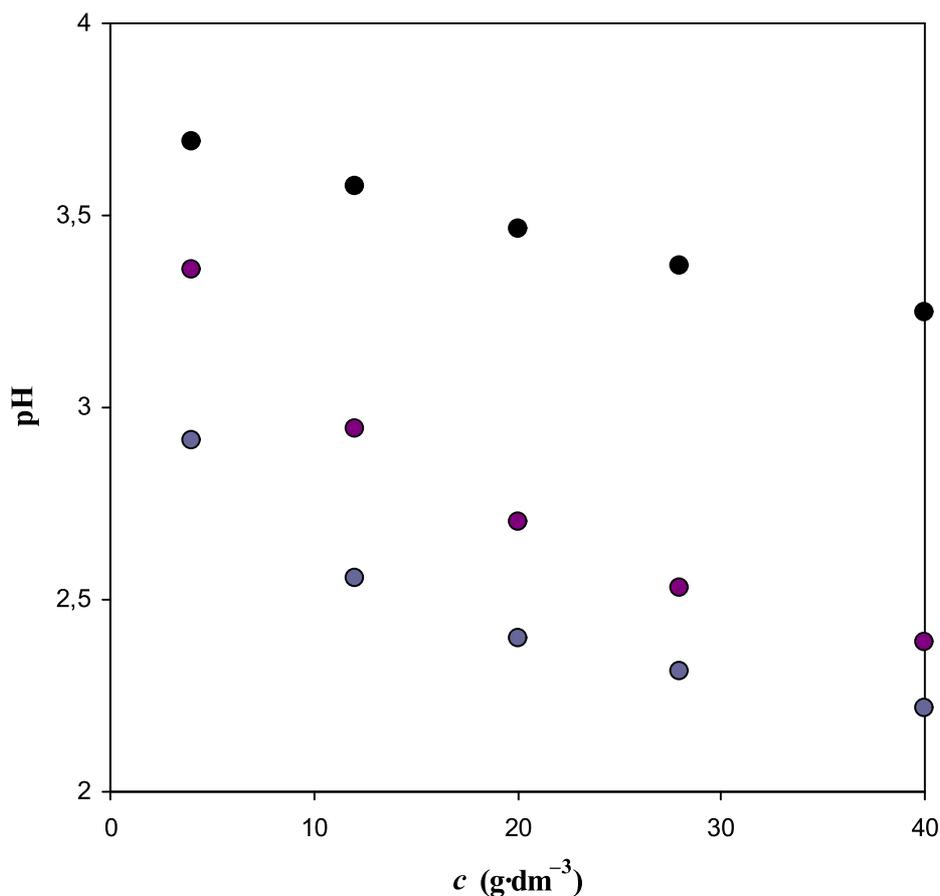
Tab. 4 Zdánlivé disociační konstanty získané spektrofotometrickou metodou v rámci předchozí bakalářské práce [1]

vzorek	20 $\text{g}\cdot\text{dm}^{-3}$	
	$pK_{\text{app}}$	$\pm$
HK 1	3,86	0,06
HK 2	4,27	0,11
HK 3	7,68	0,11

Tab. 5 Zdánlivé disociační konstanty získané metodou podle Hendersona-Hasselbacha v rámci bakalářské práce [1]

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

Podle hodnot v tabulce Tab. 5, které byly stanoveny titrační metodou 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. 12), zjistíme, že produkce  $\text{H}^+$  iontů je největší u HK 1, následuje HK 2 a nejméně kyselé výluhy dává HK 3. Pořadí tedy odpovídá hodnotám  $pK_a$  stanoveným spektrofotometricky a tato metoda nám zprostředkovává takové střední hodnoty disociačních konstant, které korespondují se skutečnými disociačními schopnostmi, což je výhoda oproti datům získaným podle Hendersona-Hasselbacha. Spektrofotometrické stanovení disociační konstanty je i mnohem jednodušší, neboť u metody podle Hendersona-Hasselbacha je nutno provádět mnohdy dosti komplikované titrace.



Obr. 12 Závislost pH na koncentraci. HK 1 (modrá), HK 2 (fialová), HK 3 (černá).

V bakalářské práci [1] byla prokázána využitelnost UV/VIS spektrofotometrické metody ke stanovení střední disociační konstanty a její výsledky byly srovnány s výsledky titrační metody podle Hendersona-Hasselbacha. Hodnoty disociačních konstant získaných ze spektroskopického stanovení plně korespondují s reálným disociačním chováním huminových kyselin a její proveditelnost je mnohem snazší než kterákoli alternativní titrační metoda.

Kvůli přítomnosti kyselých funkčních skupin ve struktuře huminových kyselin podléhají tyto látky velice snadno disociaci a i výluhy zředěné vodou mohou být při vyšších koncentracích mnohdy kyselé natolik, že se jejich spektra doslova překrývají se spektry výluhů zředěných kyselinou. Pro zabránění nežádoucí disociace je proto dobré použít tlumivý roztok. Hodnoty pH výluhů ředěných pufrům by se měly nacházet mezi pH výluhů zředěných s NaOH a s HCl.

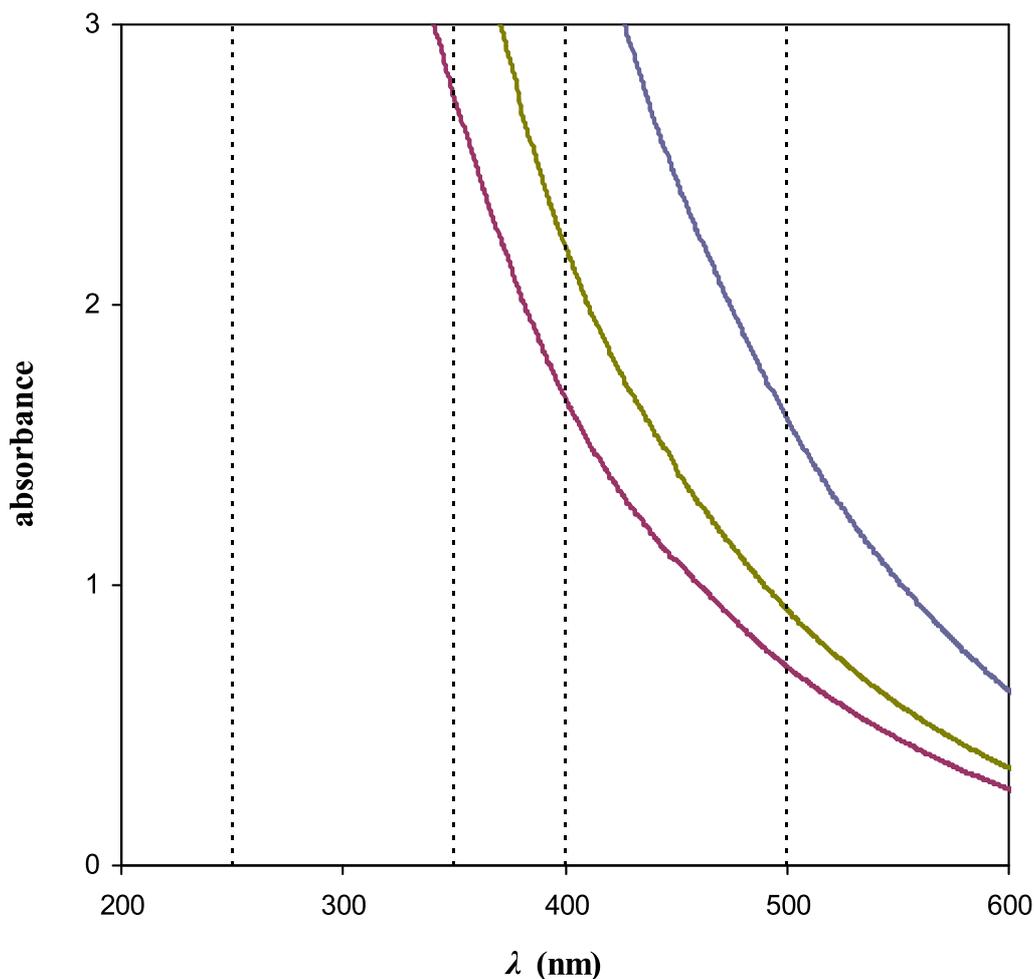
V této diplomové práci byl použit octanový pufr k udržení stálé hodnoty pH. Voda jím byla nahrazena při ředění vodných výluhů. Rovněž byla naměřena spektra vodných výluhů zředěných kyselinou a zásadou. V další fázi experimentu byl pufr využit i na přípravu výluhů huminových kyselin, které byly dále ředěny pufrům, kyselinou a zásadou.

Nejprve byly vodné výluhy o koncentraci suspenzí 20 a 40 g·dm<sup>-3</sup> zředěny puftrem, kyselým roztokem HCl a zásaditým roztokem NaOH. Výsledné hodnoty pK<sub>a</sub> byly vypočítány z rozsahu vlnových délek (250 – 350) nm a jsou uvedeny v tabulce Tab. 6. Dále byly připraveny výluhy obou vzorků huminových kyselin o koncentraci suspenzí 20 a 40 g·dm<sup>-3</sup> v octanovém pufru a ty byly následně zředěny puftrem, roztoky HCl a NaOH. Výsledné zdánlivé disociační konstanty takto připravených vzorků huminových kyselin jsou opět v tabulce Tab. 6.

Tab. 6 Zdánlivé disociační konstanty získané spektrofotometrickou metodou pro vodné výluhy zředěné dále puftrem a pro puftrové výluhy zředěné puftrem v rozsahu vlnových délek (250 – 350) nm.

c [g·dm <sup>-3</sup> ]	voda - pufr				pufr - pufr			
	20		40		20		40	
	pK <sub>a</sub>	±						
HK A	4,19	0,26	4,28	0,25	4,11	0,13	4,32	0,16
HK B	4,71	0,13	4,84	0,12	4,88	0,81	4,76	0,58

Z Tab. 6 je patrné, že pro výluh HK B z pufru, jehož roztoky byly připraveny ředěním puftrem, HCl a NaOH jsou hodnoty disociačních konstant poněkud nepřesné. Je tomu tak proto, že spektra tohoto vzorku dosahovala příliš velkých hodnot absorbancí v rozsahu vlnových délek 250 – 350 nm, jak dokládá obrázek Obr. 13 a rovněž je zde vyznačeno alternativní rozmezí vlnových délek 400 – 500 nm, které umožňuje provést výpočet pK<sub>a</sub> s mnohem větší přesností a rovněž v tomto rozmezí vlnových délek potvrzují spektra výluhu v různých prostředích pH reálné disociační chování.



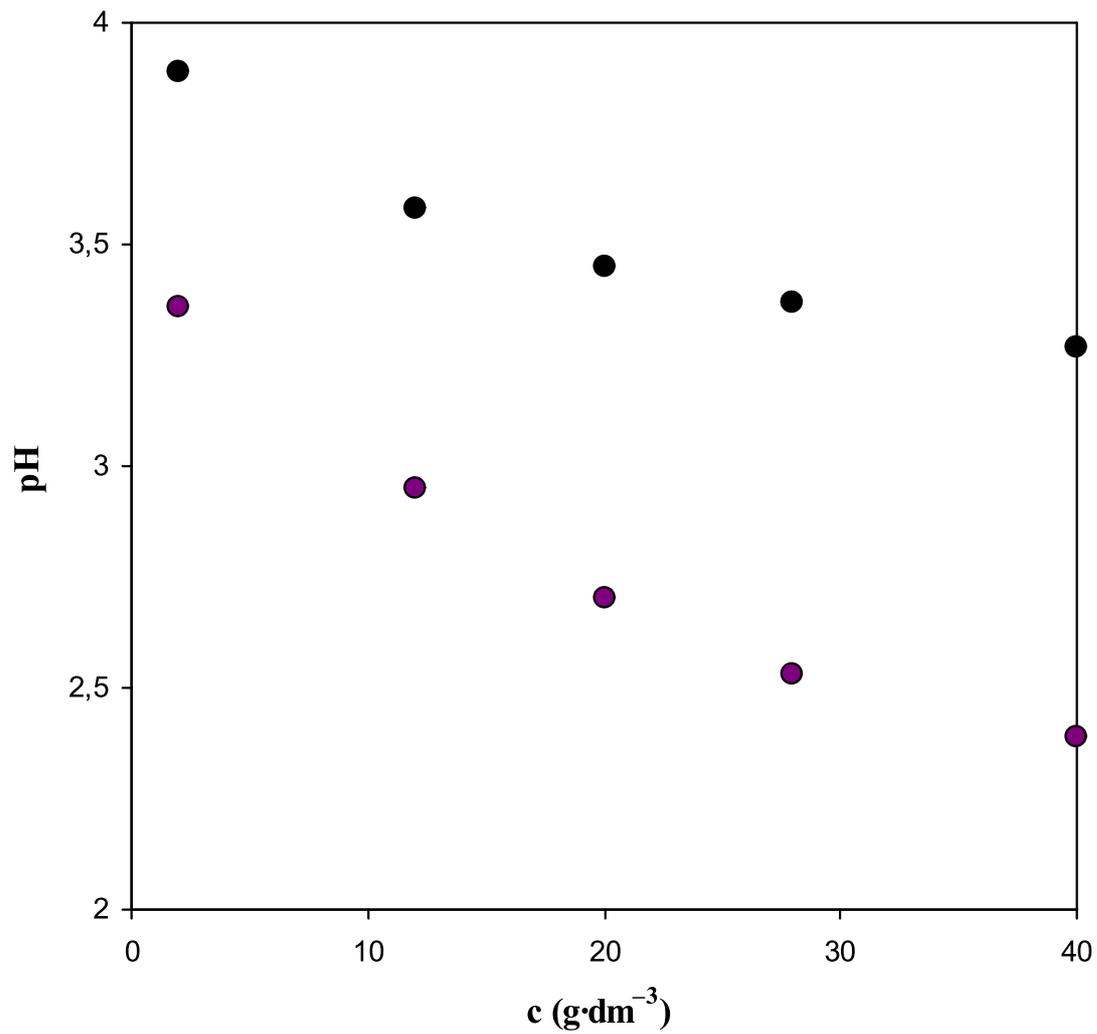
Obr. 13 UV/VIS spektrum výluhu HK B z pufru o koncentraci  $40 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$  v roztoku pufru (zelená), v HCl (fialová) a v NaOH (modrá).

Jak už bylo uvedeno výše, hodnoty absorbancí v rozmezí vlnových délek od 250 do 350 nm byly u některých vzorků příliš vysoké, a proto byly k výpočtu zdánlivé disociační konstanty použity hodnoty absorbancí z rozsahu vlnových délek od 400 do 500 nm. Hodnoty  $pK_a$  získané za těchto podmínek jsou uvedeny v tabulce Tab. 7. Vzorky HK A získané z vodných výluhů mají podle těchto výsledů schopnost disociovat lépe než stejně získané vzorky HK B a plně tak korespondují s výsledky získanými pro nižší vlnové délky (Tab. 6). U vzorků získaných ředěním výluhů z octanového pufru u koncentrace suspenze  $40 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$  byly u obou huminových kyselin zjištěny podobné hodnoty  $pK_a$ . Problém může být u poměrně vysoké absorbance výluhu ředěného NaOH (viz. Obr. 13).

Tab. 7 Zdánlivé disociační konstanty získané spektrofotometrickou metodou pro vodné výluhy zředěné dále pufrém a pro pufrové výluhy zředěné pufrém v rozsahu vlnových délek (400 – 500) nm.

c [g·dm <sup>-3</sup> ]	voda - pufr				pufr - pufr			
	20		40		20		40	
	pK <sub>a</sub>	±						
HK A	4,26	0,39	4,28	0,21	4,31	0,34	4,67	0,26
HK B	4,46	0,08	4,93	0,16	4,62	0,15	4,59	0,17

Podle Tab. 3 a Tab. 5, kde jsou uvedeny výsledky pK<sub>a</sub> stanovené metodou podle Hendersona-Hasselbacha, by měla lépe disociovat HK B. Na Obr. 14 je však vidět, že produkce H<sup>+</sup> iontů je větší u HK A, což si protirečí s výsledkem pK<sub>a</sub> získaným metodou podle Hendersona-Hasselbacha, ale naopak koresponduje s výsledkem, který byl stanoven spektrofotometricky. Výsledky dosažené v rámci této práce tak znovu potvrdily, že UV/VIS spektrofotometrie je vhodnou metodou pro stanovení střední hodnoty pK<sub>a</sub> huminových kyselin a tyto hodnoty vystihují lépe reálné disociační chování huminových kyselin ve vodných roztocích než tradiční titrační metoda. Vzhledem k tomu, že huminové kyseliny nejsou chemickým individuem ale směsí látek a že ve své struktuře obsahují kyselé funkční skupiny s rozdílnými disociačními schopnostmi, pK<sub>a</sub> takto stanovené jsou vždy pouze středními hodnotami. Míra disociace závisí vždy na více faktorech. Je ovlivněna pH prostředí, což je základem spektrofotometrického stanovení, kdy nastavením pH prostředí posunujeme cíleně disociační rovnováhu oběma směry. Je ovlivněna typem dané funkční skupiny v huminových kyselinách (COOH, OH). A je silně ovlivněna okolím dané funkční skupiny, takže skupina stejného typu (např. COOH) se může v huminových kyselinách vyskytovat v mnoha strukturně různých podobách a tedy i s různými disociačními schopnostmi. Výhodou metody použité v rámci této práce je ale její návaznost na skutečné disociační chování huminových kyselin ve vodných roztocích. Hodnoty pK<sub>a</sub> takto stanovené korespondují s reálnými koncentracemi H<sup>+</sup> iontů stanovenými ve vodných výluzích různých vzorků huminových kyselin. Pro spektrofotometrické stanovení se navíc používají výluhy a jejich ředěné roztoky, u nichž bylo dosaženo rovnováhy disociace. To je spolu s jednoduchostí a rychlostí další výhodou oproti klasickým titračním metodám, u kterých byl často pozorován silný vliv rychlosti titrace a koncentrací odměrných roztoků na výsledky disociačním konstant jimi stanovených.



Obr. 14 Závislost pH vodních výluhů na koncentraci. HK A (fialová), HK B (černá)

## 5. ZÁVĚR

Cílem této diplomové práce bylo proměřit UV/VIS spektra roztoků huminových kyselin při různých hodnotách pH a stanovit střední hodnotu  $pK_a$ , která by mohla být snadno využita ke srovnání disociačního chování různých vzorků těchto látek. Na základě naměřených dat byly stanoveny střední hodnoty  $pK_a$  huminových kyselin a srovnány s hodnotami získanými klasickou titrační metodou podle Hendersona-Hasselbacha.

Součástí teoretické práce je rešerše, která pojednává o klasických titračních metodách používaných pro stanovení disociační konstanty huminových kyselin a dále se zaměřuje na látky, jejichž disociační vlastnosti se dají zkoumat UV/VIS spektrofotometrií. Je zde diskutováno, jakým způsobem by se dala tato metoda dále rozvíjet k jejímu zdokonalení a rozšíření.

V rámci experimentální části práce byly použity dva vzorky huminových kyselin. Jeden byl extrahován z lignitu těženého v České republice, jde o vzorek izolovaný na naší fakultě pomocí alkalické extrakce popsané v kapitole 3.3. Druhý byl standard IHSS extrahovaný z leonarditu. Jde tedy o vzorky ze dvou různých zdrojů, u kterých byly použity též různé způsoby izolace. Z obou vzorků byly připraveny vodné výluhy o koncentraci huminových kyselin, která byla v předcházející bakalářské práci [1] shledána jako ideální pro UV/VIS spektrofotometrické stanovení  $pK_a$ . Z výluhů byly připraveny roztoky huminových kyselin ve třech různých prostředích s rozdílnými hodnotami pH. Výluhy byly ředěny octanovým pufrům, roztokem kyseliny chlorovodíkové a roztokem hydroxidu sodného. Absorpční spektra organických sloučenin s kyselými, resp. bazickými funkčními skupinami všeobecně závisejí na pH prostředí. Tato metodika stanovení  $pK_a$  je založena na změně tvaru a intenzity absorpčních spekter při změně pH prostředí. V silně kyselém prostředí huminové kyseliny prakticky nedisociují, což způsobuje nízké hodnoty absorbancí. V případě silně zásaditého prostředí je disociace huminových kyselin prakticky úplná a absorbance dosahují vyšších hodnot.

V souladu se závěry bakalářské práce [1], byl pro přípravu roztoků z výluhů huminových kyselin použit tlumivý roztok jako neutrální prostředí, protože původně použitá deionizovaná voda totiž způsobovala, že samotná disociace huminových kyselin má vliv na pH roztoků a tím znesnadňuje výpočet  $pK_a$ .

V další části experimentu byly připraveny z obou vzorků huminových kyselin výluhy přímo v pufru. Tyto výluhy byly stejně jako vodné výluhy dále ředěny pufrům, HCl a NaOH. U takto připravených roztoků huminových kyselin však musely být hodnoty  $pK_a$  vypočítány pro jiné rozmezí vlnových délek než je 250 – 350 nm, které bylo použito pro stanovení  $pK_a$  z vodných výluhů. V tomto rozsahu vlnových délek totiž spektra dosahují příliš vysokých hodnot absorbancí, které se už nedají považovat za přesné. Z tohoto důvodu byl pro výpočet  $pK_a$  z roztoků připravených ředěním pufrůvých výluhů použit rozsah vlnových délek 400 – 500 nm, v němž hodnoty absorbancí dosahují přijatelných hodnot a poskytují tak dostatečnou přesnost při výpočtu  $pK_a$ .

Takto stanovené hodnoty disociačních konstant byly porovnány s hodnotami  $pK_a$  získanými metodou podle Hendersona-Hasselbacha [1], [39]. Skutečné disociační chování huminových kyselin dokládá, že spolehlivější hodnoty  $pK_a$  poskytuje UV/VIS spektrofotometrické stanovení, které je navíc v porovnání s metodou podle Hendersona-Hasselbacha mnohem jednodušší na provedení.

## 6. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] Kolajová, R. *Rozpustnost a disociace huminových kyselin*. Brno, 2010. 32 s. Bakalářská práce na Fakultě chemické Vysokého učení technického v Brně. Vedoucí bakalářské práce doc. Ing. Martina Klučáková, Ph.D.
- [2] 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>>.
- [3] Oficiální stránky The University of British Columbia, Faculty of Land and Food Systems [online]. 1999, last revision 20<sup>th</sup> February 2010 [cit. 21. 2. 2010]. Dostupné z: <[http://www.landfood.ubc.ca/soil200/components/organic\\_compunds.htm](http://www.landfood.ubc.ca/soil200/components/organic_compunds.htm)>.
- [4] Kumada, K.: *Chemistry of Soil Organic Matter*. 1<sup>st</sup> edition. Tokyo: Japan Scientific Societies Press, 1987. 242 p. ISBN 4-7622-0534-6.
- [5] Čechová, E.: *Chování huminových kyselin ve vodných roztocích*. Brno, 2008. 88 s. Diplomová práce na Fakultě chemické Vysokého učení technického v Brně. Vedoucí diplomové práce doc. Ing. Martina Klučáková, Ph.D.
- [6] Weber, J.: Soil Humic Substances [online]. 1997, last modified 1997 [cit. 15. 3. 2010]. Dostupné z: <http://www.ar.wroc.pl/~weber/humic.htm#start>.
- [7] Schnitzer, M., Khan, S.U.: *Humic Substances in The Environment*. New York: Marcel Dekker, INC, 1972. 327 p.
- [8] Stevenson, F. J.: *Humus chemistry: Genesis, Composition, Reaction*. 2<sup>nd</sup> edition. New York: Wiley, 1994. 512 p. ISBN 0-471-59474-1.
- [9] Engebretson R.R. and von Wandruszka R.: Microorganization in dissolved humic acids, *Environmental & Science Technology*, 28 (11), 1934, 1994.
- [10] Klikorka, J.: *Obecná a anorganická chemie*. 2. vydání. Praha: SNTL, 1985. 591 s.
- [11] Pouchlý, J.: *Fyzikální chemie makromolekulárních a koloidních soustav*. 2. vydání. Praha: VŠCHT, 2001. 198 s. ISBN 80-7080-331-2.
- [12] Malijecký, A.: *Breviář z fyzikální chemie*. 1. vydání. Praha: VŠCHT, 2000. 280 s. ISBN 80-7080-403-3.
- [13] 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.
- [14] Khil'ko, S. L., Kovtun, A. I., Rybachenko, V. I.: Potentiometric titration of humic acids. *Solid Fuel Chemistry*, 2011, vol. 45, no. 5, pp 337 – 348, ISSN 0361-5219.
- [15] 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. 283, no. 2, pp. 803 – 810.
- [16] Ceppi, S.B., Velasco, M.I., Pauli, C.P.: Differential scanning potentiometry: surface charge development and apparent dissociation constants of natural humic acids. *Talanta*, 1999, vol. 50, no. 5, pp. 1057–1063, ISSN 0039-9140.

- [17] Palladino, G., Ferri, D., Manfredi, C., Vasca, E.: Potentiometric determination of the total acidity of humic acids by constant-current coulometry. *Analytica Chimica Acta*, 2007, vol. 582, pp 164 – 173, ISSN 0003-2670.
- [18] Mizera, J., Jansová, A., Hvoždová, I., Beneš, P., Novák, F.: Isotope exchange study of the dissociation of metal – humic substance complexes. *Czechoslovak Journal of Physics Supplement*, 2003, vol. 53, no.1, pp. A97 – A101.
- [19] Marshall, S. J., Young, S. D., Gregson, K.: Humic acid-proton equilibria: A comparison of two models and assessment of titration error. *European Journal of Soil Science*, 1995, vol. 46, no.3, pp 471 – 480, ISSN 1365-2389.
- [20] 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 0013–396X.
- [21] 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.
- [22] Campitelli, P, A., Velasco, M., I., Ceppi, S., B.: Chemical and physicochemical characteristics of humic acids extracted from compost, soil and amended soil. *Tantala*, 2006, vol. 69, No. 5, pp. 1234-1239. ISSN 0039-9140.
- [23] Porasso, R. D., Benegas, J. C., Hoop, M. A. G. T., Paoletti, S.: Analysis of potentiometric titrations of heterogeneous 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.
- [24] Porasso, R. D., Benegas, J. C., Hoop, M. A. G. T, Paoletti, S. : Analysis of Trace Metal Humic Acid Interactions Using Counterion Condensation Theory. *Eviron. Sci. Technol.*, 2002, vol. 36, pp. 3815 – 3821.
- [25] Varshal, G. M., Velyukhanova, T. K., Chkhetiya, D. N., Knolin, Yu. V., Shumskaya, T. V., Tyutyunnik, O. A., Koshcheeva, I. Ya., Korochantsev, A. V.: Sorption on humic acids as a basis for the mechanism of primary accumulation of gold and platinum group elements in black shales. *Lithology and Mineral Resources*, 2000, vol. 35, no. 6, pp. 538 – 545, ISSN 0024-4902.
- [26] 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.
- [27] 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.
- [28] Schmidt, M., Knapp, E.-W.: Accurate pKa Determination for a Heterogenous Group of Organic Molecules. *ChemPhysChem*, 2004, vol. 5, no.10, pp. 1513 – 1522
- [29] Naganawa, H., Sekine, T.: Spectrophotometric Determination of Disociation Constant of Picrates in 4-Methyl-2-pentanone. *Analytical science*, 1987, vol. 3, pp. 427-431.

- [30] Tiwari, S., Ghosh, K. K., Marek, J., Kuca, K.: Spectrophotometric Determination of the Acidity Constants of Some Oxime-Based  $\alpha$ -Nucleophiles. *J. Chem. Eng. Data*, 2010, vol. 55, no. 3, pp 1153-1157.
- [31] Cessna, A. J., Grover, R.: Spectrophotometric Determination of Dissociation Constants of Selected Acidic Herbicides. *J. Agric. Food Chem.*, 1978, vol. 26, no. 1, pp 289-297.
- [32] 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.
- [33] 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.
- [34] Yamazaki, H., Sperline, R. P., Freiser, H. Spectrophotometric determination of the dissociation constant ( $pK_a$ ) of arsenous acid. *Analytica Chimica Acta*, 1993, vol 284, pp 379 – 384.
- [35] Kádár, M., Biró, A., Tóth, K., Vermes, B., Huszthy, P. Spectrophotometric determination of the dissociation constants of crown ethers with grafted acridone unit in methanol based on Benesi-Hildebrand evaluation. *Spectrochimica Acta Part A*. 2005, vol. 62, pp 1032 – 1038.
- [36] Seok, Y. J., Yang, K. S., Kang, S. O. A simple spectrometric determination of dissociation constant of organic compounds. *Analytica Chimica Acta*. 1995, vol. 306, pp 351 – 356.
- [37] Fan, J., Shen, X., Wang, J. Spectrophotometric determination of the dissociation constants of methyl yellow in mixed protic solvents. *Talanta*. 1999, vol. 49, pp 843 – 850
- [38] Oficiální stránky IHSS <http://www.humicsubstances.org/soilhafa.html>
- [39] Klučáková, M., Čechová, E., Bachratá, R., Pekař, M. Behaviour of humic acids in water and aqueous solution. In *Solid Waste Management and Environmental Remediation. Environmental Remediation: Regulatory Requirements, Site Assessment and Health Effects*. New York, Nova Science Publishers, Inc. 2010. p. 453 - 464. ISBN 978-1-60741-761-3.

## 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
$\alpha$	stupeň disociace
$\gamma$	aktivitní koeficient
$\gamma_{\pm}$	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
$\lambda$	vlnová délka
$\phi$	zářivý tok po průchodu vrstvou látky
$\phi_0$	primární zářivý tok
$\varepsilon$	dekadický (molární) extinkční koeficient
$l$	dráha zářivého toku skrz vrstvou látky
A	absorbance
HK 1	vzorek huminové kyseliny z [1]
HK 2	vzorek huminové kyseliny z [1]
HK 3	vzorek huminové kyseliny z [1]
IHSS	International Humic Substances Society