



# 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

# POUŽITÍ CHROMATOGRRAFIE NA TENKÉ VRSTVĚ K FRAKCIONACI HUMINOVÝCH LÁTEK IZOLOVANÝCH Z OXYHUMOLITU

USE OF THIN LAYER CHROMATOGRAPHY FOR FRACTIONATION OF HUMIC SUBSTANCES ISOLATED FROM OXYHUMOLITE

## DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

## AUTOR PRÁCE

AUTHOR

**Bc. Nela Hegrová**

## VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

**Ing. Vojtěch Enev, Ph.D.**

**BRNO 2022**

## Zadání diplomové práce

Číslo práce: FCH-DIP1622/2021 Akademický rok: 2021/22  
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie  
Studentka: **Bc. Nela Hegrová**  
Studijní program: Spotřební chemie  
Studijní obor: Spotřební chemie  
Vedoucí práce: **Ing. Vojtěch Enev, Ph.D.**

### Název diplomové práce:

Použití chromatografie na tenké vrstvě k frakcionaci huminových látek izolovaných z oxyhumolitu

### Zadání diplomové práce:

Cílem této diplomové práce je frakcionace HL pomocí chromatografie na tenké vrstvě a následně podrobit jednotlivé frakce spektrometrické charakterizaci za použití UV/Vis a fluorescenční spektrometrie.

Nejprve bude studentkou provedena podrobná a aktuální literární rešerše na zadané téma.

Následně budou izolovány HL z oxyhumolitu.

Izolované HL bude fyzikálně–chemicky charakterizován za použití termických a spektrometrických metod.

Izolované HL budou frakcionovány pomocí chromatografie na tenké vrstvě a dále charakterizovány pomocí UV/Vis a fluorescenční spektrometrie.

### Termín odevzdání diplomové práce: 13.5.2022:

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

-----  
Bc. Nela Hegrová  
studentka

-----  
Ing. Vojtěch Enev, Ph.D.  
vedoucí práce

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

V Brně dne 1.2.2022

-----  
prof. Ing. Michal Veselý, CSc.  
děkan

## **ABSTRAKT**

Hlavním cílem této diplomové práce byla optimalizace frakcionace huminových látek (HL) pomocí metody chromatografie na tenké vrstvě TLC, aby mohla být využitelná k fyzikálně-chemické charakterizaci získaných jednotlivých organických frakcí. Z důvodu vysokého obsahu HL v přírodní matrici oxyhumolit bylo toto oxidované hnědé uhlí zvoleno jako zdroj těchto biokoloidních sloučenin, které byly izolovány na základě mezinárodního postupu IHSS. Vzorek nativního oxyhumolitu a oxyhumolit po extrakci byl charakterizován termickými technikami jako je termogravimetrická (TGA) a elementární analýza (EA). Výše zmíněné vzorky oxyhumolitu byly dále analyzovány pomocí infračervené spektrometrie s Fourierovou transformací, a to zejména z důvodu hlubšího pochopení jejich struktury ve smyslu organické matrice obsahující HL. Charakteristika izolovaných HL byla provedena následujícími thermochemickými a spektrometrickými technikami, elementární analýzou, termogravimetrií, molekulovou absorpční spektrometrií v ultrafialové a viditelné oblasti elektromagnetického záření (UV/Vis), infračervenou spektrometrií s Fourierovou transformací a fluorescenční spektrometrií v ustáleném stavu. K fyzikálně-chemické charakterizaci jednotlivých organických frakcí byla využita metoda molekulové absorpční spektrometrie (UV/Vis) a steady-state fluorescenční spektrometrie.

## **KLÍČOVÁ SLOVA**

Oxyhumolit, huminové látky, frakcionace, tenkovrstvá chromatografie (TLC), fluorofory

## **ABSTRACT**

The main goal of this thesis was to optimize the fractionation of humic substances (HS) using the method of Thin-layer chromatography, so that it can be used for physico-chemical characterization of the obtained individual organic fractions. Due to the high content of HS in the natural oxyhumolite matrix this oxidized brown coal was selected as a source of these biocolloid compounds which were isolated according to the international IHSS procedure. The sample of native oxyhumolite and oxyhumolite after extraction was characterized by thermal techniques such as thermogravimetric (TGA) and elemental analysis (EA). The above-mentioned oxyhumolite samples were further analyzed by Fourier transform infrared spectroscopy, mainly for deeper understanding of their structure in terms of an organic matrix containing HS. Characterization of isolated HSs was performed by the following thermochemical and spectrometric techniques, elemental analysis, thermogravimetry, ultraviolet and visible electromagnetic absorption (UV/Vis) molecular spectroscopy, Fourier transform infrared spectroscopy and steady-state fluorescence spectroscopy. Molecular absorption spectroscopy (UV/Vis) and steady-state fluorescence spectroscopy were used for physicochemical characterization of individual organic fractions.

## **KEY WORDS**

Oxyhumolite, humic substances, fractionation, thin-layer chromatography (TLC), fluorophores

HEGROVÁ, Nela. *Použití chromatografie na tenké vrstvě k frakcionaci huminových látek izolovaných z oxyhumolitu*. Brno, 2022. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav fyzikální a spotřební chemie. Vedoucí práce Vojtěch Enev.

### **ČESTNÉ PROHLÁŠENÍ**

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

.....  
Nela Hegrová

### **PODĚKOVÁNÍ**

*Na tomto místě bych ráda poděkovala především vedoucímu své diplomové práce Ing. Vojtěchu Enevovi, Ph. D., za všestranné vedení, cenné rady, vstřícný přístup, čas a hodně energie, který mi během vypracovávání této diplomové práce věnoval. Dále bych chtěla poděkovat své rodině, která mi poskytla podmínky k psaní této práce a bez které by její realizace nebyla možná.*

# OBSAH

ÚVOD.....	6
<b>1 TEORETICKÉ ZÁKLADY.....</b>	<b>7</b>
1.1 Vznik uhlí .....	7
1.1.1 Biochemická fáze .....	7
1.1.2 Geochemická fáze .....	8
1.2 Složení uhlí .....	9
1.2.1 Chemická struktura organické hmoty uhlí.....	10
1.2.2 Oxyhumolit.....	11
1.3 Huminové látky.....	12
1.3.1 Rozdělení huminových látek.....	13
1.3.2 Vznik huminových kyselin .....	16
1.3.3 Molekulární struktura huminových látek.....	19
1.3.4 Využití huminových látek .....	22
1.4.1 Anorganická činidla .....	24
1.4.2 Organická činidla.....	26
<b>2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY .....</b>	<b>28</b>
2.1 Fyzikální frakcionace .....	29
2.2 Chemická frakcionace .....	29
2.3 Frakcionace chromatografickými metodami .....	30
<b>3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....</b>	<b>32</b>
3.1 Použité metody a přístroje .....	32
3.2 Použité chemikálie .....	32
3.3 Základní fyzikálně-chemická charakterizace oxyhumolitu.....	32
3.3.1 Elementární analýza .....	32
3.3.2 Termogravimetrická analýza .....	33
3.3.3 Infračervená spektrometrie .....	33
3.4 Izolace huminových látek z oxyhumolitu.....	33
3.5 Separace huminových kyselin.....	33
3.6 Separace fulvinových kyselin .....	34
3.6.1 Příprava kolony s pryskyřicí DAX-8 .....	34
3.6.2 Adsorpce fulvinových kyselin na pryskyřici DAX-8 .....	34
3.6.3 Protonace fulvinových kyselin na pryskyřici.....	35
3.7 Charakterizace huminových a fulvinových kyselin a huminu.....	35

3.7.1	<i>Elementární analýza</i> .....	36
3.7.2	<i>Termogravimetrická analýza</i> .....	36
3.7.3	<i>UV/Vis spektrometrie</i> .....	36
3.7.4	<i>Fluorescenční spektrometrie</i> .....	37
3.8	Postup přípravy vzorků organických frakcí HL pro TLC chromatografii.....	38
3.9	Základní fyzikálně-chemická charakterizace frakcí HL.....	39
3.9.1	<i>UV/Vis spektrometrie organických frakcí HL</i> .....	39
3.9.2	<i>Fluorescenční spektrometrie organických frakcí HL</i> .....	39
<b>4</b>	<b>VÝSLEDKY A DISKUZE</b> .....	<b>40</b>
4.1	Elementární a termogravimetrická analýza oxyhumolitu.....	40
4.2	Infračervená spektrometrie oxyhumolitu.....	41
4.3	Elementární a termogravimetrická analýza HL .....	42
4.4	UV/Vis spektrometrie HL.....	44
4.5	Infračervená spektrometrie HL .....	45
4.6	Fluorescenční spektrometrie HL .....	46
4.7	Kvalitativní vyhodnocení TLC chromatografie.....	48
4.8	UV/Vis spektrometrie organických frakcí HL.....	49
4.9	Fluorescenční spektrometrie organických frakcí HL .....	51
<b>5</b>	<b>ZÁVĚR</b> .....	<b>55</b>
<b>6</b>	<b>LITERATURA</b> .....	<b>57</b>
<b>7</b>	<b>SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ</b> .....	<b>63</b>
7.1	Seznam použitých zkratk .....	63
7.2	Seznam použitých symbolů .....	64
<b>8</b>	<b>PŘÍLOHY</b> .....	<b>65</b>

## ÚVOD

Huminové látky (HL) jsou sloučeniny přirozeně se vyskytující v půdní organické hmotě (SOM) vznikající složitými chemickými a biochemickými reakcemi v procesu zvaném humifikace. HL jsou po tomto procesu rezistentní vůči další biodegradaci. Ve vědeckých pracích se lze dočíst, že tyto biokoloidní látky jsou nejrozšířenějšími organickými látkami nacházejícími se na Zemi. V přírodě se HL vyskytují v různých formách, nacházejí se volně ve sladkovodních a mořských vodách nebo v půdě od stopových množství (jíl, písek), přes jednotky procent (běžná půda) až v desítkách procent u hnědého uhlí, lignitu a rašeliny. Nejvyšší výskyt HL je v oxyhumolitech (až do 90 hm. %).

Oxyhumolit (oxidované mladé hnědé uhlí) je druh zrnitého uhlí tmavě hnědé až hnědošedé barvy. Vyskytuje se v ložiskách hnědého uhlí, se kterým má podobné fyzikálně-chemické vlastnosti. Jedná se o směs vysokomolekulárních látek, které obsahují karboxylové, hydroxylové či amidové funkční skupiny.

Huminové látky jsou chemicky komplexní sloučeniny bez jasně definované chemické struktury. Ačkoliv struktura HL nebyla doposud objasněna, je známo, že huminové látky obsahují karboxylové, karbonylové, hydroxylové, esterové, atd. funkční skupiny, které mezi sebou vzájemně interagují za vzniku agregátových koloidů supramolekulové povahy. HL se tedy skládají z řady molekul s relativně nízkou molekulovou hmotností a jsou k sobě vázány pomocí slabých vazebných interakcí, jako jsou van der Waalsovy síly,  $\pi$ - $\pi$  interakce nebo vodíkové můstky. Jednotlivé frakce HL, huminové kyseliny (HK), fulvinové kyseliny (FK) a humin (HU), se vyskytují v různých formách. Huminové kyseliny jsou důležitou součástí v půdním ekosystému, napomáhají transportu živin z půdy do rostlin, pomáhají zadržovat vodu v přírodě i zrychlovat růst rostlin. Důležitou roli ale hrají nejen v životním prostředí, ale i v medicínské oblasti či průmyslu [1, 2].

Protože aplikační potenciál těchto biokoloidních látek je velký, znalost jejich struktury a fyzikálně-chemických vlastností je nezbytná. Cílem této práce bylo izolovat HL z oxyhumolitu pomocí standardní metody navržené Mezinárodní společností pro výzkum huminových látek (IHSS). Poté bylo nutné navrhnout a optimalizovat metodu frakcionace těchto biokoloidních látek. Proto byla v této diplomové práci vybrána metoda chromatografie na tenké vrstvě (TLC), která by mohla pomoci objasnit a získat informace o struktuře těchto organických látek.

# 1 TEORETICKÉ ZÁKLADY

## 1.1 Vznik uhlí

Uhlí je hořlavý sediment organického původu ze skupiny kaustobiolitů uhelné řady (humolitů). Vzniklo akumulací rostlinných zbytků nacházejících se v oblastech mírného pásma v řekách, jezerech, mořských zálivech a lagunách. Docházelo k postupnému vytváření bažin, které byly v určitých geologických obdobích pokryté další vegetací. K tvorbě organických sedimentů přispívaly i odumřelé zbytky živočichů či plankton. Vznik uhlí byl podmíněn chemickou a fyzikální přeměnou organických zbytků v tzv. stadiu diagenese za účasti biodegradčních procesů a za dlouhodobého účinku teploty a tlaku. Maximum geologických zásob uhlí bylo vytvořeno zejména v třetihorách, kdy atmosférické a geologické podmínky byly nejpříznivější. Výskyt černého a hnědého uhlí nelze odlišit časově, i když obecně platí, že od geologického období křída je naprostá většina uhlí hnědá. Proces vzniku kaustobiolitů probíhá ve dvou fázích, a to biochemických a geochemických [3, 4, 5].

### 1.1.1 Biochemická fáze

Během biochemické fáze dochází nejprve k hromadění rostlinného materiálu a dále k jeho rozkladu. Nahromaděním rostlinného materiálu dochází ke vzniku rašelinišť. Rozkladné procesy, které se uskutečňují ještě před překrytím rozkládající se nekromasy sedimentem, můžeme rozdělit na tlení, trouchnivění, hnití a rašelinění. Tyto procesy jsou uskutečňovány pomocí mikroorganismů, anaerobních a aerobních bakterií, larev, hub a za účasti vody a plynů [3].

Při dokonalém okysličování dochází k tlení, kdy nastává rozklad zbytků organické hmoty. Dále nastává za menšího přístupu vzduchu a prostoupení vodou trouchnivění. Kvůli nedokonalému přístupu vzduchu nedochází k úplnému rozkladu biomasy, ale zůstává pevný zbytek, tzv. trouch. Převážně anaerobním procesem je hnití, ke kterému dochází ve stojatých a nedokonale větraných vodách. Podléhají mu odumřelé části rostlin a živočišných organismů, které jsou bez přístupu vzduchu. Hnitím vznikají plynné produkty jako  $\text{CH}_4$ ,  $\text{NH}_3$ ,  $\text{H}_2\text{S}$  a  $\text{CO}_2$ . Zbytek, tvořený tekutými nebo tuhými látkami bohatými na vodík, je nazýván hnilokal (sapropel) [3].

Rašelinění nastává v místech s částečným přístupem vzduchu. Oblast typického a kvantitativně výrazného rašelinění neboli humifikace jsou rašeliniště nacházející se v pásmu mírného až tropického klimatu. Rašelinění vede ke vzniku uhlí pouze za předpokladu, že dochází k ochranně odumřelé biomasy před úplným rozkladem. Pokud by rašelinění a hnití pokračovalo dále, došlo by k úplnému rozkladu nekromasy. Pomocí chemických, biologických a geologických ochranných faktorů ale dochází k zachování částečně rozložené nekromasy pro další procesy, které vedou k tvorbě fosilních paliv. Biologická ochrana je založena na vytvoření jedovatých látek, které omezují dobu života mikroorganismů. Chemická ochrana spočívá v dehydrataci koloidů, která způsobí smrt rozkladných mikroorganismů. Omezení přístupu vzdušného kyslíku je základním principem geologické ochrany [3].

Jakmile neexistují vhodné podmínky pro rozkladné mikroorganismy, nastává konec veškerých rozkladných procesů a tím i konec biochemické fáze. Dojde k tomu v případě, když



se rozložená a sedimenty pokrytá hmota dostane hlouběji pod zemský povrch. U té zde dochází vlivem dlouhodobého působení zejména tlaku a teploty k dalším chemickým reakcím, pomocí kterých se organická hmota pouze přeměňuje, ale už nerozkládá. Rašelinění je tak nahrazeno prouhelňováním a začíná geochemická fáze vzniku kaustobiolitů.

Odumřelou biomasu hornin zemské kůry dělíme do tří kategorií podle rozpustnosti:

- Bitumen – jedná se o organickou látku s výraznou luminiscencí, je rozpustná v organických rozpouštědlech, ke které patří přírodní uhlovodíky tvořící ropu a uhlovodíky zemního plynu.
- Huminové látky – jsou to organické hydrosoly a gely rozpustné v alkalických rozpouštědlech, nacházející se hlavně v rašelině a hnědém uhlí.
- Kerogen – organické spalitelné látky, nerozpustné v organických ani alkalických rozpouštědlech.

Uhlík, vodík, kyslík, dusík a síra jsou základními prvky biomasy, ze které se později stává odumřelá organická hmota, přičemž zastoupení dalších prvků je minoritní. Stavební látky biomasy jsou lignin, sacharidy, proteiny a lipidy, které jsou označovány jako biopolymery. Elementární složení některých stavebních látek uvádí Tabulka 1 [3].

Tabulka 1: *Elementární složení vybraných stavebních látek, ze kterých vznikaly hořlavé horniny* [3]

Biosloučeniny (biopolymery)	Průměrné složení (% hořlaviny)		
	C	H	O
celulóza	44,4	6,2	49,4
lignin	63,2	6,1	30,7
proteiny	53,5	7,0	22,0
tuky a vosky	82,0	14,2	3,8

### 1.1.2 Geochemická fáze

V průběhu geochemické fáze dochází k překrytí rašeliny nebo mořských sedimentů další vrstvou horniny, což způsobí posun vrstvy do nitra země. Nekromasa postupně klesá a za pomoci faktorů jako je čas, teplota a tlak, z ní vznikají prouhelňováním kaustobiolity uhelné řady. Bituminací dochází ke vzniku plynných a kapalných uhlovodíků. Stádium diagenese a epigenese odpovídá intenzitě procesu. Jestli došlo ještě k intenzivnější proměně, uhelná hmota se mění v grafit. Hlavním prouhelňovacím faktorem je teplota, kdy se její změnou snadno mění chemická a strukturní stavba biomasy. Tlak je významný zejména jako faktor, který ovlivňuje objem plynné fáze a tím i intenzitu reakcí probíhajících při prouhelňování. Posledním faktorem prouhelňování je čas. Čím je nekromasa v geochemické fázi déle, tím z ní až na výjimky vznikají kvalitnější fosilní paliva [3, 6].

Během primárního rozkladu organických zbytků, tzv. stadia diagenese dochází k procesu tvorby uhlí. Je zde ale nezbytná ochrana organických částí před úplným rozkladem na prvky. U následujícího stadia epigenese došlo k zpevnění uhelné hmoty a ztrátě vody dehydratací.

Rozklad, který nastal během diagenese byl ovlivněn zakrytím zbytkové hmoty sedimenty a navazující proces stárnutí tzv. metamorfóza je stádiem prouhelňování spojeným s geologickým místem. Metamorfóza uhlí je závislá na teplotě a tlaku působícího po určitou dobu. Teplo je z těchto tří faktorů považováno za ten nejdůležitější faktor. Podstatou prouhelňování je rozklad složitějších velkých molekul biopolymerů, které tvoří odumřelou organickou hmotu. Ze vzniklých monomerů se syntetizují nové, složitější makromolekuly, které jsou bohatější na uhlík a vodík. Během prouhelňování docházelo k utváření uhlí různými procesy, což způsobilo, že vzniklá uhlí jsou velice odlišná. Změny, které vedly ke vzniku různých typů uhlí můžeme dělit na chemické, fyzikální a geochemické. Hlavní chemické reakce, které způsobily změnu, jsou kondenzace, polymerace, aromatizace a ztráta funkčních skupin obsahujících kyslík, síru a dusík. Dochází k nelineárnímu zvyšování obsahu uhlíku. Hlavní fyzikální změny jsou změny porozity, hustoty a tvrdosti. V raných fázích prouhelňování pórovitost klesá v důsledku rostoucího tlaku [3, 7].

## 1.2 Složení uhlí

Uhlí je možno rozdělit z různých hledisek, například podle stupně prouhelňování nebo podle prostředí vzniku. Podle stupně prouhelňování je uhlí rozdělováno do čtyř skupin:

- rašelina – obsahuje přibližně 55 % uhlíku. Jedná se o organogenní sediment vzniklý přeměnou rostlinného materiálu téměř nebo zcela pod vodou za nedostatku kyslíku,
- hnědé uhlí – je hnědé až černohnědé barvy obsahující 70 až 75 % uhlíku. Podle stupně prouhelňování lze rozlišit hemifázní uhlí (např. lignit), které je nejméně prouhelňované, dále středně prouhelňované ortofázní a poslední metafázní uhlí, u kterého je stupeň prouhelňování nejvyšší,
- černé uhlí – obsahuje 72 až 92 % uhlíku. Je černé barvy, matné nebo lesklé a vyskytuje se v hemifázních, ortofázních a metafázních typech. Jedná se o křehký kaustobiolit,
- antracit – je nejvíce prouhelňované uhlí (nad 92 % uhlíku), které je tvrdé, vysoce lesklé, bez páskování a homogenní struktury [5].

Míra prouhelňování se zvyšuje s rostoucím obsahem uhlíku, který můžeme nejlépe vyjádřit ve vztahu k organické hmotě uhlí v suchém a bezpopelnatém stavu a s klesajícím obsahem prchavé hořlaviny [3]. Celou řadu uhelných kaustobiolitů v závislosti na zvyšujícím se obsahu uhlíku a klesajícím obsahu prchavé hořlaviny uvádí Obrázek 1.



Obrázek 1: Uhlíková řada kaustobiolitů [8]

Uhlí je možno z hlediska struktury dělit i podle petrograficko-chemické klasifikace macerálových skupin a macerálů. Mikroelementy uhlí jsou označovány jako macerálové skupiny, jejichž původ je odvozen z macerace původního rostlinného materiálu. Do macerálových skupin černého uhlí patří například vitrinit, do skupin hnědého uhlí patří huminit a inertinit. Rozdílnost macerálů i odlišnost macerálových skupin je určena různorodostí původního rostlinného materiálu a podmínek, které působily na proces prouhelňování. To způsobuje odlišnost chemického složení např. z hlediska hlavních organogenních prvků uhlíku, vodíku a kyslíku v jednotlivých macerálových skupinách, které mají rozdílnou chemickou strukturu [3, 4].

### *1.2.1 Chemická struktura organické hmoty uhlí*

Základními složkami uhelné hmoty jsou hořlavina, popeloviny a voda. Voda je v uhlí vázaná různými způsoby. Je ovšem nehořlavá, a proto je nežádoucí složkou paliva. Tuhá paliva obsahují 1–60 hm. % vody, podle jejich stupně prouhelňování, rašelina obsahuje i nad 90 % vody. Pouze její malá část, voda vázaná na popeloviny tzv. hydrátová voda, a voda konstituční, která je chemicky vázaná na hořlavinu, není stanovována analyticky. Zbývající voda, označována jako veškerá voda, se dělí na hygroskopickou, hrubou a okludovanou vodu. Ztrátou vody se mění fyzikální vlastnosti uhlí. U vytěžených hnědých uhlí obsahující značné množství vody, dochází k jejímu vypařování na vzduchu a následnému rozpadu uhlí [4, 9].

Obsah vody ovlivňuje i samozápalnost uhlí. Bylo zjištěno, že smáčením suchého uhlí nebo částečně vysušeného uhlí dochází k vyvíjení smáčecího tepla. Obsah fyzikálně vázané vody, resp. její kapilární vlastnosti působí přímo na vazbu uhelných částic [4].

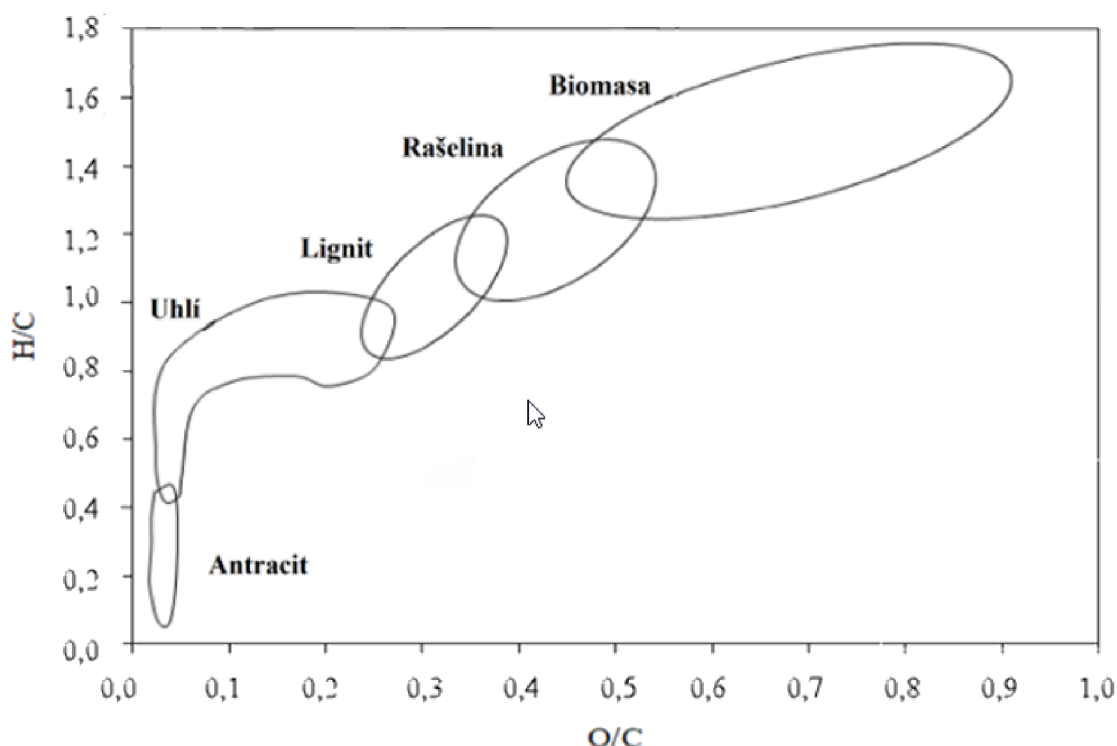
Popeloviny obecně vznikly z anorganických složek výchozí odumřelé biologické matrice poté pak z minerálních látek mechanicky přimíšených, naplavených, vnesených nebo během prouhelňování přimíchaných do uhelného ložiska z okolí. Minerální podíl nahromaděný v uhelném ložisku během stádia syngeneze se nazývá primární popeloviny. Popeloviny vnesené do ložiska v pozdějších stádiích jsou nazývány jako druhotné [9].

V hnědouhelných i černouhelných vzorcích uhlí byly nalezeny minerály jako kaolinit, křemen, muskovit, pyrit, kalcit a sádrovec. Minerální látky hnědého uhlí jsou částečně chemicky vázány na huminové kyseliny. Většina vázaných huminových kyselin nacházejících se v hnědých uhlích u nás je vázána na vápník a hnědá uhlí, lignity a rašeliny obsahující také humáty železa, hliníku, hořčíku a alkalických kovů [9]. Hnědá uhlí obsahují převážně jílové materiály a pyrit. Popeloviny hnědých uhlí obsahují 20–60 % CaO, přičemž jeho větší podíl je vázán v podobě humátu vápenatého. V popelovinách hnědých uhlí se nacházejí i humáty železa a hliníku. Naproti tomu obsah hořčíku, alkálií, fosforečnanů a síranů v nich bývá malý [9].

Hořlavina uhlí je složena převážně z uhlíku, menšího množství vodíku a z malých množství dusíku a síry, přičemž velmi rozdílné je množství kyslíku. Množství kyslíku a vodíku klesá se vzrůstajícím stupněm prouhelňování, zatímco množství uhlíku v uhlí roste. Obsah uhlíku stoupá až k 82 hm. % v černém uhlí. Obsah vodíku klesá na 4 hm. %, a u kyslíku dochází k poklesu na 10 hm. %. Elementární složení hořlaviny vyjádřené v hmotnostních procentech je z hlediska pochopení struktury organické hmoty nevýstižné a zavádějící. Zastírá totiž důležitou roli vodíku, který je nejlehčím prvkem periodického systému, ale z hlediska různých procesů jako zkapalňovacích a extrakčních procesů sehrává v řadě případů

rozhodující úlohu. Síra nacházející se v hořlavině je většinou vázaná v sirných heterocyklech, jako jsou thiofeny, benzothiofeny, thioxantheny apod. Při zvyšujícím se stupni prouhelnění dochází ke snížení množství bočních řetězců, které jsou vázané na makromolekulární systém hořlaviny [3, 5]. Kyslík se vyskytuje v periferních částech systému ve funkčních skupinách karboxylových, hydroxylových, karbonylových a methoxylových. S rostoucím prouhelněním dochází ke ztrátě nejprve methoxylové, potom karboxylové a teprve poté i karbonylové a hydroxylové funkční skupiny [3, 4].

Atomové poměry prvků uhlíku, kyslíku a vodíku lze využít ke zjednodušené charakteristice odlišnosti macerátových skupin, ale také ke zjednodušené charakteristice vztahu jejich struktury k prouhelnění. Postupným prouhelněním dochází ke snižování atomového poměru H/C. Na Obrázku 2, kde je zobrazena závislost atomového poměru H/C na atomovém poměru O/C organické hmoty s odlišným původem, lze tento trend očividně pozorovat.



Obrázek 2: Van Krevelenův diagram [10]

Kromě anorganických sloučenin se v uhlí nacházejí různé organické sloučeniny jako jsou celuloza, hemiceluloza, lignin a organické zbytky jako jsou huminy, bitumeny, huminové kyseliny, aromatické uhlovodíky, aminové kyseliny a další [9].

### 1.2.2 Oxyhumolit

Oxyhumolit, tzv. oxidované mladé hnědé uhlí, je druh zrnitého nesoudržného uhlí tmavě hnědé až hnědošedé barvy s vysokým obsahem huminových kyselin. Nachází se v ložiskách hnědého uhlí, se kterým má obdobné fyzikálně-chemické vlastnosti, ale pro svou nízkou výhřevnost se nehodí ke spalování [11]. Oxyhumolity (kapucín) mohou obsahovat až 90 hm. % biochemicky vysoce aktivních huminových látek. Jsou směsí přírodních látek,

kteřá vznikla tisícietyými biochemickými, biologickými a oxidativními procesy z rostlinného materiálu uloženého v zemské kůře. Z chemického hlediska můžeme oxyhumolit charakterizovat jako směs vysokomolekulárních látek huminových kyselin s nízkým obsahem fulvinových kyselin, obsahujících hydroxylové, karboxylové, methoxylové a amidové skupiny. Vytváří komplexy organických látek, převážně huminových kyselin s anorganickými látkami (20 až 25 hm. %) z velké části sloučeninami vápníku, železa, hliníku a křemíku. Je výchozí surovinou pro výrobu sodných a draselných humátů a fulvátů, tzn. solí HL, kde jsou oxyhumolity zpracovány na humát sodný a humát draselný [12, 13, 14].

V omezené míře jsou pak i zpracovávány například na huminové kyseliny tzn. v nerozpustné naprotonované formě a humáty dalších kovů. Díky jejich vazebným schopnostem je lze použít jako sorbenty při čištění odpadních vod, odstraňování těžkých kovů apod. Kovy jsou na oxyhumolit vázány nevratným způsobem, a tudíž se neuvolňují ze svého povrchu do vody. Jinými slovy, tento typ kaustobiolitu vytváří velmi stabilní cheláty s rozličnými zástupci makro a mikro nutrientů, i těch, které můžeme považovat za rizikové (těžké kovy atd.). Jeho sorpční vlastnosti jsou ovlivněny pH prostředím. Při pH vyšším 7 dochází k reakci oxyhumolitu s alkáliemi a organické sloučeniny se začínají rozpouštět do vodného roztoku. Z tohoto důvodu s ním nelze pracovat v alkalickém prostředí, ale je to principem extrakce HL v něm obsažených [13].

Jeho sorpční vlastnosti (popř. iontově výměnné vlastnosti) lze ještě vylepšit např. oxidací vzdušným kyslíkem (za tepla), sulfonací či promytím minerálními kyselinami, při kterém dochází k odblokování, resp. aktivaci funkčních skupin obsahujících hlavně ionty  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Al}^{3+}$  a  $\text{Fe}^{2+}$ . Také lze zvýšit selektivitu sorpce některých kovových iontů pomocí předčištění oxyhumolitu kyselinou. Oxyhumolity nacházející se v České republice obsahují více než 80 hm. % huminových kyselin, nízký obsah bitumenu (méně jak 1 %) a anorganické látky a příměsi, například písek, jíla [13, 14].

### 1.3 Huminové látky

Huminové látky (HL) jsou hlavní organické složky půd a sedimentů. Jsou široce rozšířeny po zemském povrchu a vyskytují se téměř ve všech suchozemských oblastech a vodních prostředích. Huminové látky hrají významnou roli cyklu uhlíku v přírodě, kde je hlavní zdroj  $\text{CO}_2$ , protože uhlík obsažený v huminových látkách představuje 60–70 % celkového uhlíku nacházejícího se v půdě. HL vznikají chemickou a biologickou degradací organické hmoty rostlinného nebo živočišného původu a ze syntetické činnosti mikroorganismů, což se nazývá humifikace. Takto vytvořené produkty mají tendenci se vázat do složitých struktur, které jsou stabilnější než výchozí materiály. Důležitá vlastnost HL je jejich schopnost tvořit ve vodě rozpustné a nerozpustné komplexy s kovovými ionty a interagovat s organickými sloučeninami, jako jsou alkany, mastné kyseliny a pesticidy [15].

Přirozeně se vyskytují především v sedimentech, zeminách, rašelině, hnědém uhlí, lignitu a v některých dalších materiálech. Obsah HL v přírodních matricích se pohybuje od stopových množství v jílech a píscích, přes jednotky procent v běžné zemině až k desítkám procent huminových látek, které obsahuje hnědé uhlí a lignit. Velice vysoký obsah HL (80 % a více) vykazuje například rašelina [13].

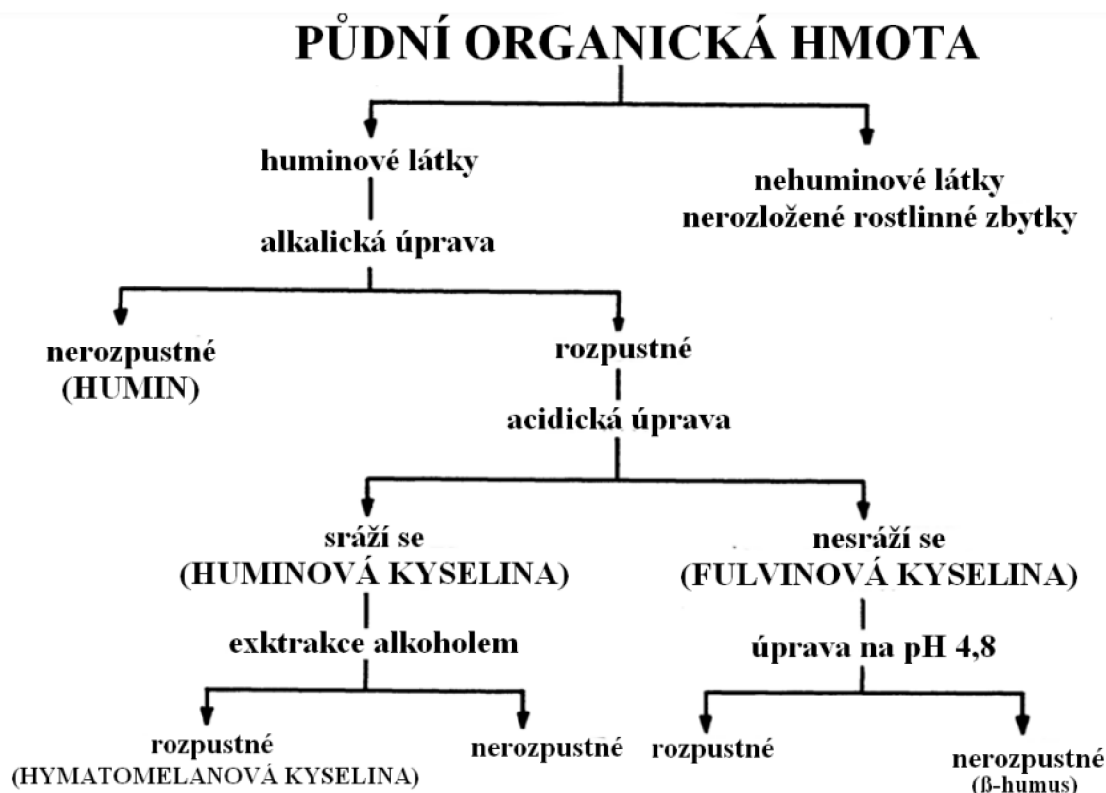
Obecně můžeme říci, že se jedná o koloidní polycyklické sloučeniny žluté až hnědočerné barvy pohybující se v molekulových hmotnostech od několika stovek po tisíce Daltonů (Da).

Jedná se o složitou směs aromatických a alifatických uhlovodíkových struktur s mnoha typy funkčních skupin, jako amidové skupiny, karboxylové, ketonické, hydroxylové a dalšími, které mají různé fyzikální i chemické vlastnosti. Jednotlivá aromatická jádra jsou spojena s alifatickými strukturními jednotkami pomocí esterových ( $R_1-COO-R_2$ ), etherových ( $R_1-O-R_2$ ) a také alkoxylových ( $R_1-O$ ) vazeb. Huminové látky jsou převážně tvořeny uhlíkem, dále kyslíkem, vodíkem, dusíkem ale také sírou [17].

### 1.3.1 Rozdělení huminových látek

Huminové látky lze rozdělit podle chemických a fyzikálně-chemických vlastností na huminové kyseliny, fulvinové kyseliny, hymatomelanové kyseliny a huminy. S termínem humusové uhlí se setkáváme především v odborných publikacích pedologického zaměření a je terminologickým ekvivalentem výše zmíněného nerozpustného huminu [16, 17].

Někteří autoři rozlišovali huminové látky ještě podle jiných kritérií. Například Waksman [18] rozlišoval ještě další dvě fulvinové frakce – rozpustnou frakci a nerozpustnou frakci, kterou nazval  $\beta$ -humus. Ten byl získán úpravou pH na 4,8 po izolaci. Rozdělení podle Waksmana a Stevensona je popsáno na Obrázku 3, kde lze vidět, že huminovou kyselinu ještě dále dělí na hymatomelanovou kyselinu, která je rozpustná v alkoholu a  $\alpha$ -humus, který je nerozpustný jak v kyselině, tak v alkoholu [19].



Obrázek 3: Rozlišení půdní organické hmoty [19]

Většina autorů jako Khan a Schnitzer [15] rozlišuje jen tři skupiny huminových látek, a to huminové kyseliny HK, které jsou rozpustné ve zředěných alkáliích, ale vysráží se při okyselení alkalického extraktu, fulvinové kyseliny (FK), které jsou rozpustné jak v alkáliích, tak kyselině a huminy (HU), což je ta huminová frakce, kterou nelze extrahovat

z půdy; nebo sedimentu zředěnou kyselinou nebo zásadou. Z analytických údajů publikovaných v literatuře [15] je zřejmé, že všechny tři frakce jsou strukturálně podobné ve smyslu obsahu jednotlivých stavebních kamenů, které mají původ v biopolymerních sloučeninách, jako je celulóza, lignin, hemi-celulóza, bílkoviny, vosky, tuky atd., ale že se liší v molekulové hmotnosti. Dále se liší obsahem rozmanitých funkčních skupin, rozpustností v některých rozpouštědlech a typickou barvou po jejich izolaci resp. extrakci, jak uvádí Obrázek 4.



Obrázek 4: Rozdělení HL a jejich základních fyzikálně-chemických vlastností dle Stevensona (1982) [1]

#### Fulvinové kyseliny

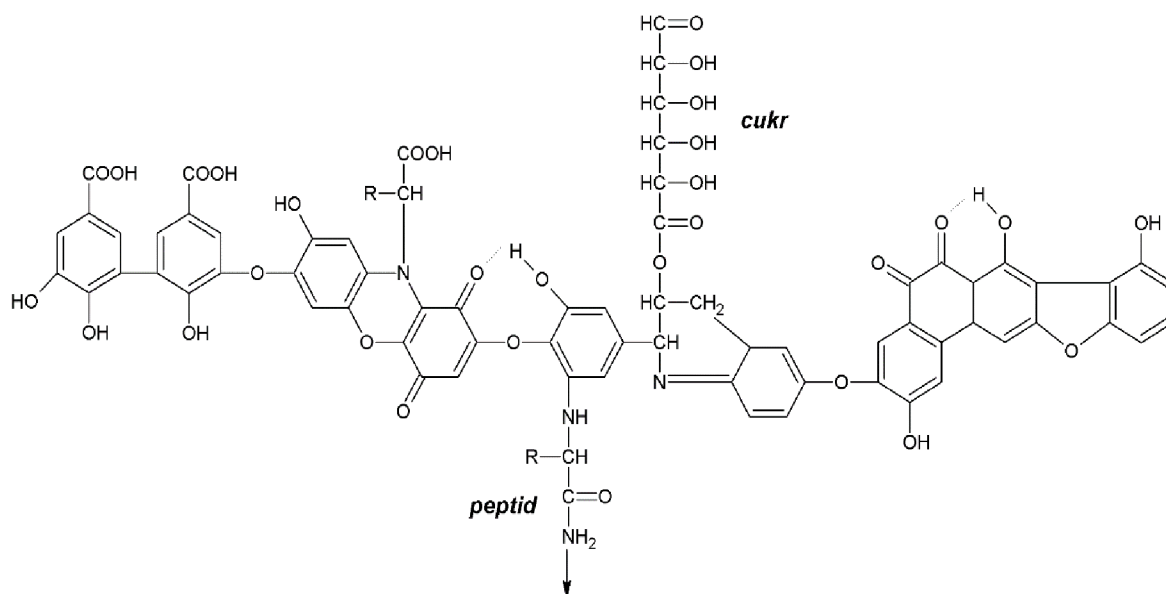
Fulvinové kyseliny (FK) jsou frakcí huminových látek, která je rozpustná jak v kyselém, tak bazickém prostředí. Schopnost FK rozpouštět se je zachována v celé škále pH. Předpokládá se, že se jedná o koloidní polydispergované látky, které mají žluté zabarvení při nízké hodnotě pH a až světle hnědou barvu při vyšším pH. Vyznačují se větším počtem bočních, alifatických řetězců a menším počtem aromatických strukturálních motivů [17].

Fulvinové kyseliny mají nižší molekulovou hmotnost, která se pohybuje v rozmezí od 175 do 3570 Da, obsahují méně uhlíku a dusíku a více kyslíku. Fulvinové kyseliny jsou tvořeny tímto rozsahem biogenních prvků: C 40–52 hm. %, H 4–6 hm. %, O 40–48 hm. % a N 2–6 hm. %. Tato frakce huminových látek má hydrofilní charakter a je silně kyselé povahy. Je to způsobeno tím, že FK obsahují více kyslíkatých funkčních skupin, jako karboxylové, hydroxylové resp. –OH fenolické, které jsou substituované na aromatickém jádře oproti huminovým kyselinám a huminu. Díky těmto kyselým funkčním skupinám jsou nejreaktivnější frakcí HL ve vodném prostředí [1]. Důležitá vlastnost fulvinových kyselin je schopnost tvořit komplexy s kovovými ionty [20].

#### Huminové kyseliny

Huminové kyseliny (viz Obrázek 5) jsou látky rozpustné v alkalických roztocích, omezeně rozpustné ve vodě, ale nerozpustné v kyselinách. V kyselém prostředí dochází ke vzniku koagulátů HK, přičemž musí být splněna podmínka, že pH roztoku bude menší než 2, což znamená, že bude dosahovat hodnoty izoelektrického bodu. Je možné je vyextrahovat alkalickým roztokem ve vhodné přírodní matici a poté je okyselit [21, 22].

Jejich složení je ovlivněno podmínkami humifikace, typem přírodní matrice a také chemickým složením živočišných a rostlinných zbytků. Odborné výzkumy ukazují, že huminové kyseliny z aerobních půd jsou podobné těm z anaerobních prostředí. HK jsou charakterizovány vysokou sorpční schopností přes  $4\ 000\ \text{mmol}\cdot\text{kg}^{-1}$ . Prvkové složení se pohybuje v rozmezí: uhlík 52–65 hm. %, kyslík 30–39 hm. %, vodík 2–6 hm. %, dusík 2–6 hm. % a síra 0–2 hm. % [22, 23].



Obrázek 5: Předpokládaná struktura HK dle Stevensona [1]

Huminové kyseliny jsou koloidní polydisperzní látky bez zápachu, hydrofobní a kyselé povahy. Jejich základní stavební jednotkou jsou aromatická jádra fenolového, naftalenového, kumarinového, hydroxykumarinového a dalších typů, na která se substitují v bočních řetězcích rozmanité funkční skupiny, zejména karboxylové, hydroxylové, fenolové a v neposlední řadě i amidické, které mají svůj původ v residuích bílkovin. Na HK se mohou vázat kationy elektrostatickými interakcemi, neiontové organické sloučeniny pomocí vodíkových vazeb, interakcemi dipól-dipól nebo hydrofobními interakcemi. Ačkoli je huminová kyselina považována za amorfni, po lyofilizaci má většina částic huminové kyseliny kosočtvercový nebo rhombohedrální tvar (jako kostka cukru). Předpokládá se, že mají vysoký elektrostatický náboj, protože jsou částice okamžitě přitahovány kovovou špachtlí, což platí zejména pro jemnější částice [15].

Huminové kyseliny mají obvykle nízký obsah popela, jelikož jeho obsah je vázán na purifikační kroky během izolace těchto koloidních látek. Stejně jako v případě fulvinové kyseliny se kyselina huminová při zahřívání neroztaje. Dochází však k její termické degradaci při zahřívání v atmosféře vzduchu nebo dusíku nebo dokonce ve vakuu. Orlov (1985) uvádí, že během zahřívání ve vakuu tvoří pryskyřičnou látku doprovázenou uvolňováním vody. Podobně jako u kyseliny fulvinové probíhá rozklad huminové kyseliny bez spalování, ale postupným procesem zuhelnatění. Může však začít hořet při 150–240 °C v přítomnosti oxidačních činidel. K nevratným změnám dochází při zahřátí nad teplotu 105 °C, přičemž v teplotním rozsahu 25–105 °C dochází ke ztrátě semikrystalické a volné vody [15].



### *Hymatomelanové kyseliny*

Další frakcí huminových látek jsou hymatomelanové kyseliny (HY). Jedná se o podíl huminových kyselin rozpuštěných v alkoholu, který se získává u extrakce huminové kyseliny při použití zásady. Atomový poměr N/C u hymatomelanových kyselin je nicméně výrazně nižší než u HK, což naznačuje, že peptidy a další molekuly obsahující dusík mají tendenci zůstat ve spojení s neextrahovatelnou polymerní strukturou. Tato frakce má oproti huminové kyselině světlejší barvu a vyšší obsah uhlíku (přibližně 62 hm. %) [24].

### *Humin*

Huminy (HU) jsou poslední důležitou složkou, která tvoří huminové látky. Jedná se o typ huminové látky velmi tmavého anebo černého zbarvení, která je nerozpustná v alkalických a kyselých rozpouštědlech. Je to látka, která zůstává po extrakci půdy nebo sedimentu zředěnou zásadou pro huminové a fulvinové kyseliny. Vzhledem ke své nerozpustnosti a následným obtížím při extrakci a izolaci je humin sloučeninou, která přitahuje nejmenší pozornost ze všech frakcí HL. Řada vědců (Stevenson 1966, Somani a Saxena 1982, Kononova 1966) vyslovila hypotézu, že je humin směs vysoce kondenzovaných aromátů silně vázaných na jílové materiály a parafinické sloučeniny. Naproti tomu podle Schnitzera a Khana (1972) se jedná o frakci, která má blízké složení huminových kyselin, i když možná je o něco méně aromatická než HK. Předpokládá se, že to souvisí s alifatickými sacharidovými složkami v molekule huminu, které způsobují, že je humin nerozpustný. Vyšší obsah polysacharidů v huminu se někdy používá k odlišení od huminové kyseliny [15]. Vykazují vysoký stupeň kondenzace a polymerace a nedochází k hydrolyze a podle Najmra ztratil humin funkci pravého humusu. Humin obsahuje 20 až 30 % dusíku z celkového obsahu dusíku v půdě [22].

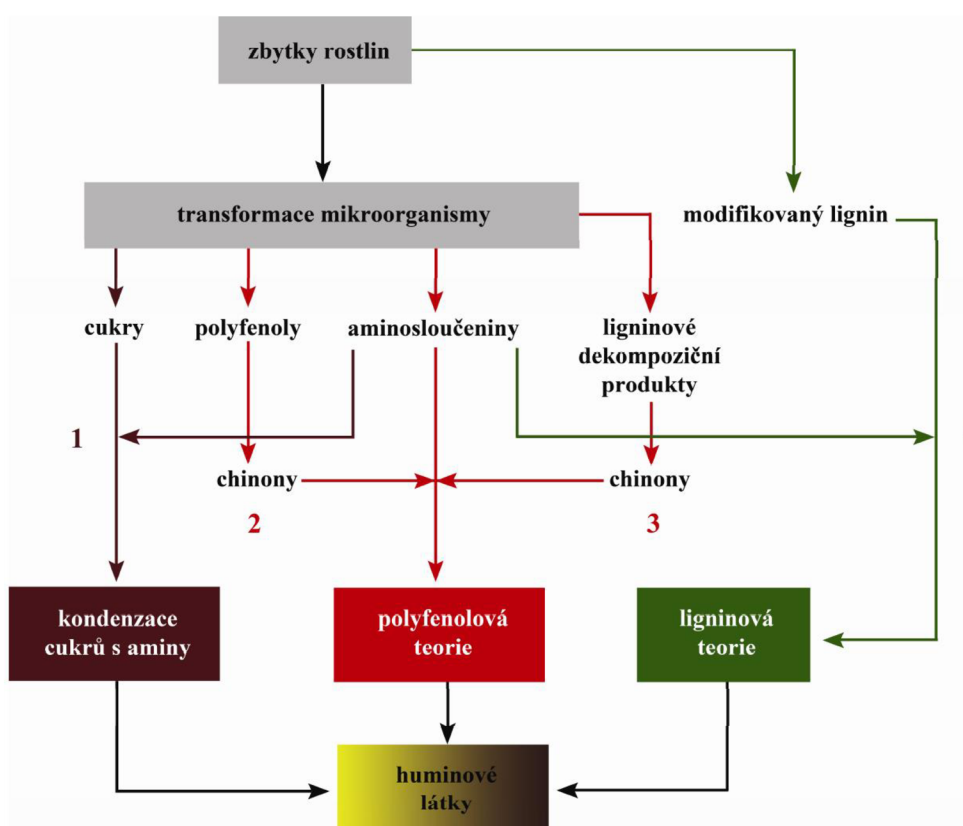
#### *1.3.2 Vznik huminových kyselin*

Ačkoliv jsou huminové látky již po řadu desetiletí předmětem intenzivního vědeckého zájmu, původ huminových látek není zcela objasněn. Proces rozkladu organických zbytků v půdě nazývaný humifikace, představuje sled mnoha biochemických reakcí, během kterých dochází k rozkladu komplexních molekul organické matrice na menší a v následujícím kroku dochází k syntéze jednoduchých sloučenin za vzniku HL. Díky expanzi studia huminových látek do jiných vědeckých oborů (geologie, hydrologie, atd.) došlo k získání nových myšlenek a konceptů, které obohatily jejich poznání. Existuje mnoho teorií, které popisují proces vzniku huminových látek. Jedná se například o degradační (ligninovou), syntetickou (polyfenolovou) a kondenzační teorii (viz Obrázek 6) [15, 17, 22].

Klasická teorie popularizovaná Waksmanem říká, že huminové látky představují modifikované ligniny (cesta 4). Avšak většina současných vědců upřednostňuje mechanismus zahrnující chinony (cesta 2 a 3). Tyto cesty včetně teorie kondenzace (cesta 1) mohou fungovat ve všech půdách, ale ne ve stejném rozsahu. Ligninová dráha může převládat ve špatně odvodněných půdách a vlhkých sedimentech (bažiny), zatímco syntéza z polyfenolů může mít značný význam v některých lesních půdách. Časté a prudké kolísání teploty a vlhkosti v suchozemských povrchových půdách může podporovat syntézu humusu kondenzací cukru a aminu [15, 25].

## Ligninová teorie

Po mnoho let bylo předpokládáno, že huminové látky byly odvozeny z biopolymerní sloučeniny ligninu. Podle Fischera a Schradera (1921) byl lignin s největší pravděpodobností základní látkou huminových sloučenin a tento návrh byl přijat po mnoho let. Hlavním problémem „ligninové“ teorie bylo to, že nedokázala vysvětlit vysoký obsah dusíku v HL. Waksman a kol. upravili „ligninovou teorii“, tak že mikrobiálně produkovaný protein byl chemicky spojen s mikrobiálně modifikovaným ligninem za vzniku centrální části makromolekuly HK. Tato teorie, dnes již zastaralá, popisuje vznik HL mikrobiálním rozkladem odumřelého rostlinného materiálu, kdy z těžko rozložitelných látek jako je lignin, kutin nebo melanin dochází ke vzniku vysokomolekulárních huminů. Ty jsou pak oxidací postupně přeměněny na huminové kyseliny, dále na fulvinové kyseliny, a ještě na menší molekuly. Kdyby degradační mechanismus pokračoval, huminové látky by byly postupně rozloženy na oxid uhličitý a vodu, což jsou produkty tzv. mineralizace OM [15, 17, 26].



Obrázek 6: Schéma vzniku půdních HL [1]

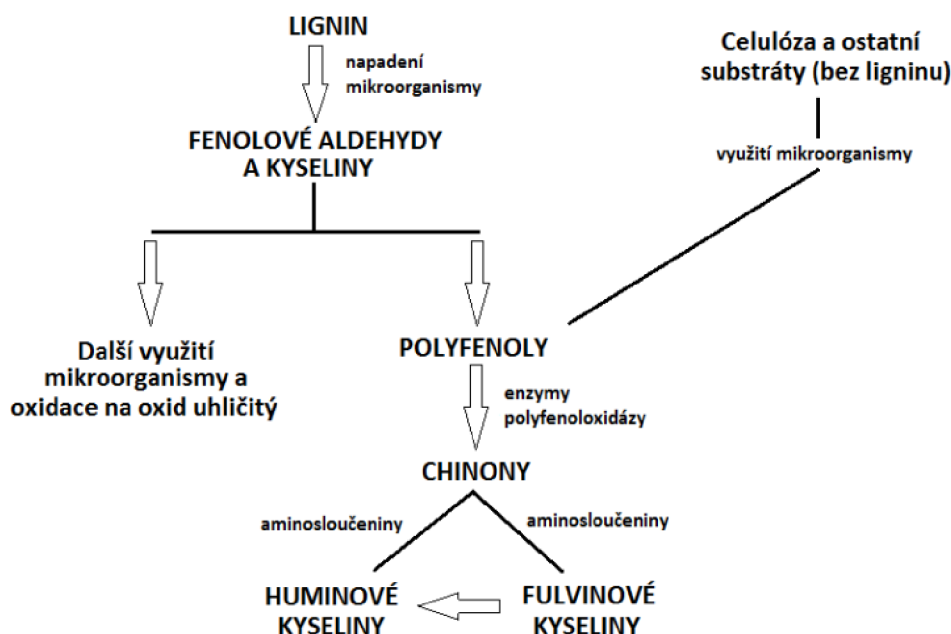
V této teorii dochází k modifikaci ligninu zahrnující ztrátu methoxylových  $-OCH_3$  funkčních skupin, čímž dochází ke zvýšení množství fenolických funkčních skupin za vzniku hydrochinonů. Další změnou je oxidace alifatických postranních řetězců, během které dochází ke vzniku karboxylových  $-COOH$  skupin. Vzniklý hydrochinon může dále oxidovat na para-benzochinon, který podléhá kondenzačním reakcím s amoniakem, který vznikl rozkladem organických látek bohatých na dusík. Modifikovaný materiál podléhá dalším změnám za vzniku nejprve vysokomolekulárních huminů a následnou oxidací na huminové a poté fulvinové kyseliny [15, 25].

Další hypotézou je tvorba huminových sloučenin prostřednictvím trans-aminových reakcí ligninových monomerů, které vznikají ze sacharidů. Dekarboxylací konečného produktu, tyrosinu, může vzniknout látka se strukturou amonného ligninového monomeru. Taková sloučenina patří do kategorie lignoproteinových sloučenin a lze ji tedy považovat za jednu z frakcí HL [15].

### *Polyfenolová teorie*

Polyfenolová teorie (viz Obrázek 7) nazývaná také syntetická, nahradila degradační teorii v 60. letech 20. století. Podle polyfenolové teorie syntéza huminových látek může probíhat dvěma způsoby. V prvním mechanismu má stále klíčovou roli lignin, ze kterého dochází k uvolňování fenolických aldehydů a kyselin. U nich dochází vlivem mikrobiálního působení k enzymatické přeměně na chinony. Ty dále polymerují za přítomnosti aminosloučenin, ale i bez nich, za vzniku huminových biomakromolekul.

Druhým mechanismem je předpoklad, že polyfenoly mohou být syntetizovány mikroorganismy i ze zdrojů, které neobsahují lignin (např. celulóza nebo jiné polysacharidy). Polyfenoly přejdou enzymatickou oxidací na chinony a následně dochází k jejich přeměně na huminové látky. Nejprve by vznikaly fulvinové kyseliny, poté huminové kyseliny a nakonec huminy [1, 25].



Obrázek 7: *Polyfenolová teorie* [27]

### *Teorie kondenzovaných sacharidů s aminy*

Podle tohoto konceptu sacharidy a aminokyseliny, vznikající jako vedlejší produkty mikrobiálního metabolismu, jsou základními složkami pro syntézu huminových látek. Redukující monosacharidové jednotky a aminokyseliny podléhají neenzymatické polymeraci za vzniku dusíkatých polymerů.

První krok reakce zahrnuje přidání aminu k aldehydové skupině sacharidu za vzniku *n*-substituovaného glykosylaminu. Ten následně podléhá tvorbě *N*-substituované-1-amino-deoxy-2-ketóze. To je podmíněno fragmentací a dehydratací díky čemuž dojde ke vzniku

výsledných produktů, jako je acetol, diacetyl a hydroxymethylfurfuralů. Všechny tyto sloučeniny jsou vysoce reaktivní a snadno polymerují v přítomnosti aminosločenin za vzniku syntetizovaných polymerů charakteristického hnědého zbarvení, které jsou podobné huminovým látkám.

Hlavním názorem oponujícím tuto teorii je, že reakce probíhá poměrně pomalu za normálních podmínek tzn. teploty, vlhkosti, iontové síly roztoku atd. Avšak drastické a nárazové změny v půdním prostředí (změna teploty, vysychání a smáčení) spolu s promícháváním reaktantů s materiálem s katalytickými vlastnostmi mohou kondenzaci usnadnit [1, 25].

#### *Hypotéza benzenkarboxylových kyselin*

Tato teorie je založena na informacích získaných z chemické degradace převážně fulvinových kyselin. Schnitzer a Khan (1972) zastávají názor, že ke genezi FK je nutné huminové látky rozložit na menší jednotky. Podle nich existují čtyři základní typy degradačních postupů: za první oxidace alkalickým manganistanem, kdy produkty degradace byly vždy benzenkarboxylové kyseliny, za druhé redukce pomocí Na amalgámu nebo Zn prachu, kdy se FK rozkládají na deriváty benzenu, dále hydrolyza horkou vodou, kyselinami nebo zásadami, kdy FK poskytla kyselině benzenové deriváty, a posledním typem je biologická degradace, kdy dochází k rozkladu FK pomocí mikroorganismů. Na základě převládajícího objevu derivátů benzenu Schnitzer a Khan předpokládají, že fulvinová kyselina je složena z fenolových a benzenkarboxylových kyselin spojených vodíkovými vazbami za vzniku polymerní struktury. Ta obsahuje mnoho dutin, ve kterých mohou být zachyceny další organické sloučeniny, jako jsou residua bílkovin a polysacharidů [15].

#### *1.3.3 Molekulární struktura huminových látek*

Ačkoliv jsou huminové látky předmětem studií již po řadu desetiletí a je známo, že HL hrají klíčovou roli v mobilitě stopových prvků v půdách a vodách, složitá struktura huminových látek stále nebyla zcela popsána. Přitom znalost molekulární struktury HL je zcela zásadní pro pochopení jejich fyzikálně-chemických vlastností a jejich funkce v půdě. Huminové látky jsou polydispergované polyelektrolyty s molekulovou hmotností od  $10^2$  do  $10^5$  Daltonů a jako takové mají charakteristický vysoký stupeň molekulární nepravidelnosti a heterogenitu. V důsledku toho neexistují žádné dvě identické molekuly huminových látek jak ve vodě, tak v půdě. To způsobuje, že nelze dát žádný obecný strukturní vzorec pro tuto organickou matici. I když nelze uvést žádný obecný strukturní vzorec pro HL, jsou publikovány studie o strukturních vzorcích molekulárních fragmentů a existuje několik strukturních vzorců HL [13, 28].

Bylo navrženo několik modelů struktury huminových látek, kde jsou HL složeny buď z makromolekulárních polyelektrolytů, které mohou tvořit molekulární agregáty nebo se jedná o nadmolekulární uskupení malých molekul bez makromolekulárního charakteru, které je spojeno dohromady slabými přitažlivými silami [29].

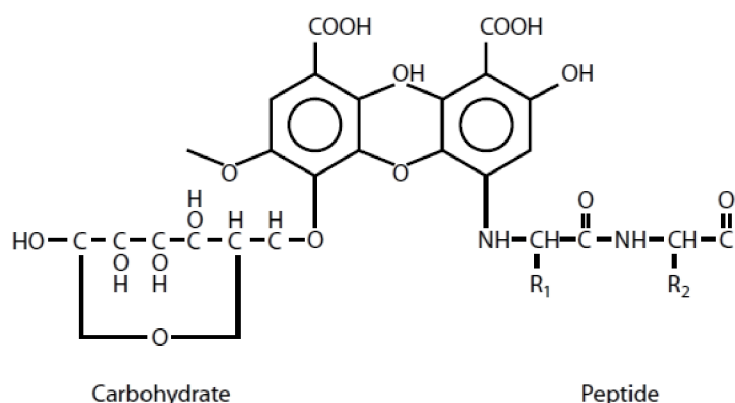
#### *Polymerní teorie*

Z historického hlediska byla polymerní teorie struktury HL považována za nejpravděpodobnější. Na základě polymerního modelu bylo publikováno několik teorií o struktuře huminových kyselin, ale všechny jsou odlišné a stále je kolem nich spousta

neshod. Nejvýznamnějšími představiteli této hypotézy jsou například Stevenson, Buffle, Flaig a Schnitzer a Schulten [15].

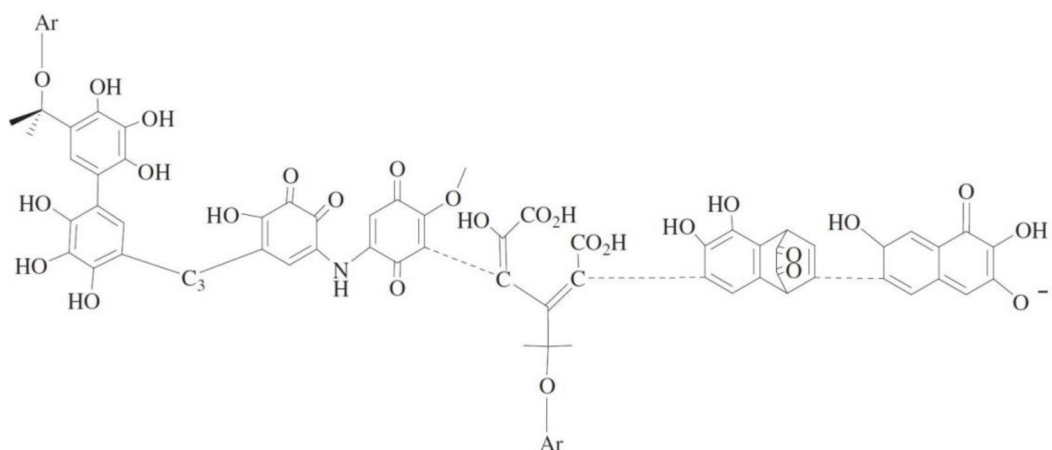
Podle prvních polymerních modelů je struktura HL lineární, elipsoidního tvaru a pružnějšího charakteru a také náhodně stočená polymerní konformace, tzv. random coil. Díky dalším experimentům byla pozorována měnící se makromolekulární struktura ze sférického do lineárního tvaru podle měnící se koncentrace HL, pH a iontové síly roztoku. Při rostoucím pH nebo koncentraci HL dochází ke změně tvaru z klubkovitého na náhodně propletenou síť lineárních řetězců, které se spojují do listu označovaného jako  $\beta$ -sheet [30].

Nejnámějším modelem je strukturální model podle Stevensona [1]. Autor předpokládá, že všechny mechanismy vzniku HL (ligninová, polyfenolová teorie a teorie kondenzovaných cukrů a aminů) přispěly k vytvoření molekulární struktury huminových látek. Stevensonův koncept struktury HL je typický vysokým podílem aromatických i fenolických stavebních jednotek. Ty mohou být volné, ale i vázané pomocí vodíkových vazeb. Lze si povšimnout i karboxylových funkčních skupin, které jsou z velké části vázané přímo na aromatické struktury. Autor zařadil do strukturálního vzorce také zbytky sacharidů a bílkovin. Pro zjednodušení strukturálního vzorce Stevenson navrhl tzv. koncept dimeru fenolu (Obrázek 8), kde předpokládal vazbu dvou fenolových jednotek, ke kterým je připojen protein, jako základní strukturální jednotku huminové molekuly. Rovněž se domnívá, že dimer je vynikající jednotkou, která vysvětluje chemické reakce charakteristické pro huminové látky.



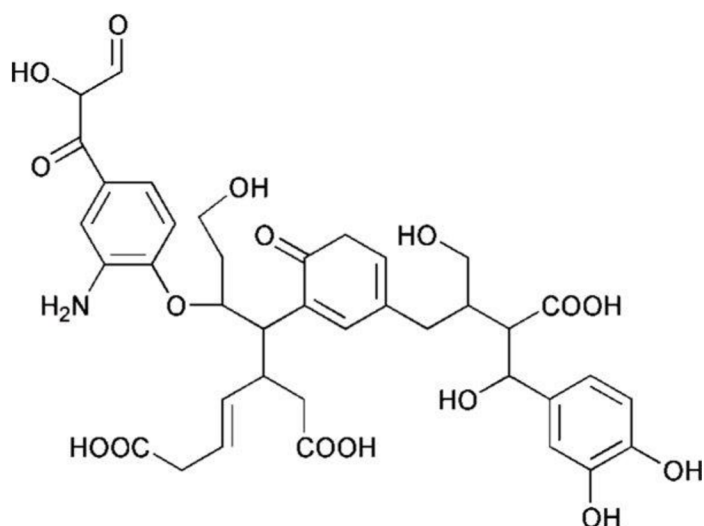
Obrázek 8: Model struktury HK založený na konceptu dimeru dle Stevensona [15]

Strukturální model huminových kyselin na bázi ligninových monomerních jednotek navrhl Flaig a kol. [31] (viz Obrázek 9). Flaig studoval rozklad ligninu na jednodušší monomery a jejich degradaci na menší fenolové jednotky. Tyto základní jednotky nejdříve podléhají oxidaci, následně demethylaci na substituované polyfenoly a poté další oxidaci na deriváty chinonu. Kondenzací skupin chinonu s polysacharidy a aminokyselinami lze formovat látky podobné huminové kyselině. Při hydrolýze huminových kyselin byly detekovány produkty ligninové degradace [15].



Obrázek 9: Molekulární struktura HK podle Flaiga [30]

Dalším vysoce zdokumentovaným modelem je Steelinkův model (viz Obrázek 10). V tomto modelu huminová kyselina obsahuje aromatické kruhy, fenoly a chinony. Tyto sloučeniny jsou spojené alifatickými jednotkami s mnoha hydroxylovými skupinami. Karboxylové funkční skupiny jsou v tomto modelu vázány pouze na alifatickou část [32].



Obrázek 10: Steelinkův model HK [32]

Na modelu Schnitzera a Schultena [15] jsou zobrazené aromatické kruhy, které tvoří strukturu huminových kyselin. Ty jsou spojeny s alkylovými strukturami s dlouhými řetězi. Jak na alifatických řetězcích, tak na aromatických jednotkách je mnoho hydroxylových a karboxylových funkčních skupin [33].

#### Supramolekulární teorie

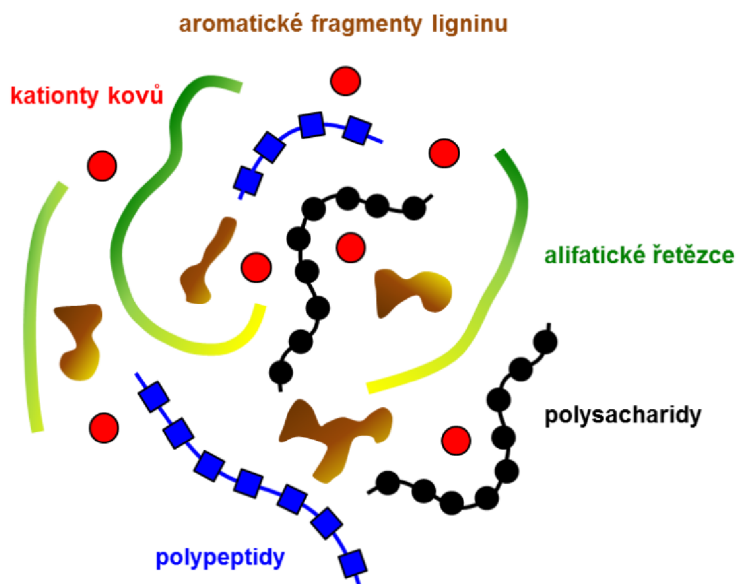
S pokročilejšími a moderními instrumentálními analytickými metodami (SEC, MS, termochemolýza a hlavně NMR izotopu  $^{13}\text{C}$ ) došlo ke změně pohledu na strukturu huminových látek. A. Piccolo a kol. [34] navrhli nový supramolekulární model, který měl nahradit ten dosavadní polymerní. Vyvrátili dosud známou teorii, která popisuje HL jako biopolymery v různých organických maticích. Tato teorie je totiž založená pouze na základě

laboratorních experimentů s modelovými molekulami a není podložena žádnými přímými důkazy [33, 34].

Autoři popsali HL jako micelární asociace, které jsou převážně stabilizovány hydrofobními silami (van der Waalsovy síly,  $\pi$ - $\pi$  vazby, CH- $\pi$  vazby) při pH=7. Usoudili, že organické kyseliny by pronikaly do vnitřního (hydrofobního) jádra micelární struktury při neutralizaci kyselých funkcí huminových látek z pH 7 na 2. Došlo by k asociaci mezi organickými kyselinami a HL kvůli amfifilním vlastnostem kyselin, které jsou schopny interagovat jak s hydrofobními, tak hydrofilními doménami huminových agregátů. Tyto interakce jsou schopny narušit slabé síly, které stabilizují huminovou strukturu [34].

Pomocí studií bylo zjištěno, že struktura a uspořádání HK je složitější, než se původně předpokládalo a s prvními experimenty bylo definováno nové pojetí, které nahlíželo na HK jako na supramolekuly. Vzniklo tvrzení, že HL jsou relativně malé heterogenní molekuly (< 2 000 Da), které nejsou stabilizovány silnými kovalentními vazbami, jako v polymerní teorii, ale slabými disperzními hydrofobními silami a vodíkovými vazbami, které jsou zodpovědné za velkou molekulární strukturu, která se zvyšuje s rostoucím pH. V oblastech nízkého pH vznikají vodíkové vazby, které způsobují destabilizaci supramolekulární struktury, kvůli čemuž dochází ke zmenšení velikosti částic HK [34].

Simpson [35] navrhl model (viz Obrázek 11), ve kterém se HL sdružují v přítomnosti kovů za vzniku agregátů. Popsal huminové materiály jako komplexní směsi, které se skládají z velkého počtu komponentů, jako jsou například aromatické fragmenty ligninu, alifatické řetězce, polysacharidy, polypeptidy, ethery, estery, polysacharidy, atd.



Obrázek 11: Supramolekulární struktura dle Simpsona [35]

#### 1.3.4 Využití huminových látek

Huminové látky byly v dřívějších dobách používány při léčení onemocnění (např. léčení ran, bahenní koupele). V poslední době se zvýšil zájem o využití těchto látek v průmyslu, zemědělství, v ochraně životního prostředí, ale i ve veterinární a humánní medicíně [2, 36].

### *Medicínské využití*

V medicíně se využívají k léčbám různých nemocí, zejména k odstranění těžkých kovů z organismu díky jejich schopnosti tvořit komplexy s těžkými kovy, jako  $Pb^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$ . Ačkoliv huminové látky nemají žádný vliv na srážlivost krve, krvácivost nebo počet červených destiček, bylo zjištěno, že za přítomnosti HL disponují červené krvinky vyšší schopností transportovat kyslík v organismu. To napomáhá k rychlejšímu léčení různých zranění a zanětů a dochází ke zkrácení nutné doby k vyléčení. HL také zvyšují propustnost buněčné stěny, díky čemuž je možný snadnější přenos minerálních látek z krve do kosti a buněk. Díky svým protizánětlivým a antivirovým účinkům a estrogenní aktivitě se staly v lékařství důležitými. Některé studie popisují, že huminové látky, především FK, chrání před rakovinou a viry způsobujícími rakovinu [2, 35].

Huminové látky mají i ve veterinární medicíně široké využití. HL mají stimulující účinek na trávení a využití živin, zvyšují ochranu mladých zvířat proti infekcím, atd. Doplněk HK do krmiva vede k tvorbě zdravého střevního epitelu, vyrovnání střevní mikroflóry a pH v trávicím traktu [2].

### *Využití v zemědělství*

Díky huminovým látkám dochází v zemědělství ke zvyšování kvality a produktivity půdy. HL zlepšují její fyzikální a chemické vlastnosti, úrodnost i obsah vlhkosti. Pro své schopnosti tvořit chelátové komplexy s prvky ulehčuje příjem živin rostlinnými buňkami, což se používá při klíčení a růstu rostlin. Napomáhají příjmu makro (P, K, N) i mikro (Zn, Fe) prvků, vážou na sebe toxické látky, díky čemuž zabraňují jejich hromadění v rostlinách. Díky urychlování biologických procesů dochází ke zvyšování obsahu živin (sacharidy, lipidy) a vitamínů v rostlinách. Podporují syntézu rostlinných enzymů, klíčivost, zvyšují životaschopnost rostlin a odolnost proti škůdcům. Dokážou zlepšovat skladbu půdy, stmelují její částice a díky tomu i mají vliv na zadržení vody. V dnešní době se HL používají jako aditiva v hnojivech. Různé huminové soli, jako humát vápenatý a draselný, zvyšují úrodnost půdy [2, 35].

### *Průmyslové využití*

Významného využití dosáhly huminové látky také v průmyslové oblasti. Dříve byly používány jako součást uhlí v energetice, ale kvůli zvyšování ochrany životního prostředí byl tento způsob výroby energie omezen a nahrazen. Ve stavebnictví jsou huminové látky používány jako přísady, díky kterým lze kontrolovat rychlost tuhnutí betonu. Mohou ovlivňovat smáčivost materiálů, disperzitu i vytvrzování. Našly uplatnění také v keramickém průmyslu, kde se staly součástí aditiv, které zvyšují odolnost materiálu. Tyto přísady na bázi huminových kyselin také pozitivně ovlivňují reologické chování porcelánových hmot. Materiály s huminovými látkami také našly uplatnění v koželužství při přípravě kůže, kdy se ze začátku používaly jako barvivo, později jako prostředek k úpravě povrchu kůže. Pro svoji schopnost zvýšit viskozitu byly HL použity v brusných a řezacích přístrojích, kde byly přidávány do chladicích kapalin.

Huminové látky našly využití při výrobě plastů, a to zejména jako barviva pro barvení Nylon 6 nebo PVC nebo jako změkčovadla při výrobě PVC. Uplatnění našly HL také ve výrobě filtrů, které obsahují jádro s HK. Tato jádra slouží k odstraňování karcinogenních iontů chromu, pesticidů, barviv a fenolů a různých uhlovodíkových sloučenin z průmyslových a městských odpadních vod [35, 37, 38].



## *Ochrana životního prostředí*

Přírodní organické huminové látky (huminové a fulvinové kyseliny) jsou důležité díky schopnosti tvořit ve vodě nerozpustné komplexy s mnoha kovy včetně radionuklidů. Tyto organické látky proto mohou být důležitými látkami pro transport radionuklidů v životním prostředí. Důležitým úkolem huminových látek je odstraňování toxických kovů, jako  $\text{Pb}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Cr}^{3+}$ , organických chemikálií a dalších znečišťujících látek. Byly vyvinuty iontoměničové materiály na bázi humátu vápenatého, které byly vhodné pro jejich odstranění. Materiály obsahující HL jsou schopné sorbovat plyny, což se využívá např. pro odstraňování odpadních plynů z kafilérií či k čištění zemního plynu od thiolů a sirovodíků [35].

### **1.4 Izolace huminových látek z pevných matic**

Vlastnosti půdní organické matrice a zejména huminových látek lze studovat pouze ve volném stavu, to znamená ve stavu, když je vzorek zbaven anorganických složek půdy. Proto je nejdříve nutné oddělit organickou hmotu od anorganické matrice například písku, bahna a jílu. Existují různé techniky, které jsou používány v závislosti na povaze materiálu. Nepochybně sloučeniny jako vosky, tuky, pryskyřice, atd., lze extrahovat pomocí organických rozpouštědel (např. hexan, ether, směsi alkohol-benzen a další). Pro izolaci jednotlivých monomerních jednotek (jako aminokyseliny a sacharidy) byly použity postupy hydrolyzy.

Ideální extrakční metoda je univerzální a je možné ji aplikovat na všechny typy půdy a kaustobilitů. Vede k izolaci materiálu extrahovaného z huminové látky, která dále neobsahuje anorganické nečistoty tzn. jílu a vícemocné kationty, případně residua přírodní matrice [25, 33].

#### *1.4.1 Anorganická činidla*

V průběhu let byla hodnocena účinnost mnoha anorganických roztoků používaných při extrakci huminových látek na základě jejich efektivity. Některá anorganická činidla použitá při extrakci jsou uvedena v Tabulce 2. Mezi uvedenými činidly se NaOH nejvíce blíží ideálnímu extrakčnímu činidlu díky své efektivitě a snadnosti odstranění při purifikačním procesu. Nevýhodou použití tohoto činidla je, že pravděpodobně dochází k autooxidaci huminových látek. Huminové látky získané pomocí NaOH se proto liší svým obsahem C, N, O v porovnání s HK, které jsou extrahované jinými činidly. Provedení extrakce v dusíkové atmosféře by však mohlo pomoci v odstranění tohoto problému [25, 33].

Z jiných studií na druhou stranu vyplývá, že rozdíly v množstvích a vlastnostech extrahovaných HL získaných pomocí extrakce NaOH ve vzduchu a v prostředí inertní atmosféry jsou zanedbatelné. Problém nejspíše není ani tak v typu extrakčního činidla, jako v normě pro stanovování huminových sloučenin, jelikož je obtížné porovnávat data, která jsou získána jinými vědci v důsledku rozdílu v metodách izolace vzorků HL. Z důvodu nejednotnosti metod izolace, která byla překážkou ve studiu huminových látek, Mezinárodní společnost huminových látek (IHSS) připravila jednotnou metodu k získání standardních vzorků HL [25, 33, 39].

Tabulka 2: *Anorganická činidla používaná na extrakci HL (N – normalita) [33]*

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

Při použití metody IHSS je navrženo použití 0,1 M roztoku NaOH pro extrakci kvůli jeho mírnější povaze resp. omezení hydrolýzy. Tímto způsobem se snižují šance na škodlivé změny, které by mohly nastat při extrakci 0,5 M NaOH. U NaOH platí, že čím vyšší koncentrace roztoku, tím více bude extrahované látky, ale zároveň bude i vyšší šance, že dojde k chemickým změnám v extrahovaných HL. Mimo jiné se často používá také pyrofosforečnan sodný, Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>, pro extrakci HL z půd s vysokým obsahem seskvioxidů, který ale oproti NaOH není tak účinný. Předpokládá se, že chelace fosforečnanem hlinitým nebo železitým a dalších kovových seskvioxidických iontů zvyšuje rozpustnost HL a tím zvyšuje účinnost extrakce. Mezi další chelatační činidla patří např. EDTA. Pro zvýšení účinnosti pyrofosfátů se doporučuje roztok s hodnotou pH 9 a 10. Extrahované množství HL je nicméně obvykle menší než množství získané s NaOH. Nevýhodou metody s použitím Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub> je velmi obtížné čištění extrahované huminové matrice. Schnitzer a kol. [15] po provedení extrakce HL kyselinami např. HCl, získali pouze fulvinové kyseliny, z důvodu rozpustnosti pouze této frakce v kyselých roztocích [33].

#### 1.4.2 Organická činidla

Volba použití organických činidel při extrakci a izolaci huminových látek z půd a dalších přírodních matric vychází z touhy vyhnout se chemické změně v extrahovaném produktu. Byla testována řada organických rozpouštědel, která lze vidět v Tabulce 3, ačkoliv žádné z nich nebylo uspokojujivé. Z experimentů bylo zjištěno, že použití organických rozpouštědel je problematičtější oproti použití anorganických rozpouštědel. Organická činidla se ukázala být slabšími extrakčními činidly, ale v procesu čištění se obtížněji odstraňovala. Předpokládá se, že jejich možná interakce s HL ztěžuje čištění extrahovaných frakcí z HL [25, 33].

Výzkumy s použitím kyseliny mravenčí pro extrakci HL ukazují, že za určitých podmínek lze extrahovat až 55 % organické hmoty z minerálních půd a až 80 % HL z humusu kyselinou mravenčí obsahující LiF nebo LiBr. Kyselina mravenčí je neúčinnější u půd, kde velká část organické hmoty je částečně zvlhčena [33].

Tabulka 3: *Organická činidla pro extrakci HL* [33]

kyseliny	zásadité a neutrální látky
kyselina mravenčí	acetonitril
kyselina šťavelová	benzen
	chloroform
	dichlormetan
	dimetylsulfoxid
	dioxan
	ethanol
	ether
	fenol

#### *IHSS metoda*

Metoda, která byla vyvinutá Mezinárodní společností pro výzkum huminových látek (*International Humic Substance Society IHSS*), je přijatelnou metodou pro extrakci HL z kaustobiolitů a dalších přírodních matric. IHSS uvedlo, že se nejedná o doporučenou nebo schválenou metodu, ale o metodu, která byla shledána jako vyhovující pro většinu typů přírodních matric a kterou lze provádět ve většině laboratoří. Poskytuje relativně vysoké výtěžky a lze ji použít jako standardní metodu pro srovnávání mezi laboratořemi jakož i v rámci nich. Tato metoda je založená na alkalické extrakci v dusíkové atmosféře, jak bylo psáno dříve. Využívá solubilizační vlastnosti jednotlivých frakcí HL k jejich oddělení. Důležitou součástí této metody je použití sorpční pryskyřice XAD-8 v procesu čištění [25, 39, 40].

#### *NAGOYA metoda*

Metoda NAGOYA (podle univerzity Nagoya v Japonsku) určuje typ huminové kyseliny na základě jejího množství a optické hustoty resp. absorbance jejich vodných roztoků. Tato metoda byla v porovnání s metodou IHSS efektivnější v alkalické extrakci. Zatímco je v metodě IHSS použit 0,1 M NaOH o objemu desetinásobku hmotnosti vzorku přírodní matrice, v NAGOYA metodě je použitý objem činidla 300–násobku obsahu uhlíku ve vzorku půdy. Objem extrakčního činidla v této metodě tedy ve velké míře závisí na obsahu HL v původní přírodní matrici. Dalším rozdílem mezi těmito metodami je postup čištění fulvinových kyselin. Frakce FK obsahují látky, které se označují jako huminové látky, ale obsahují i jiné organické látky nehuminového charakteru, jako lipidy, peptidy, uhlovodíky. V NAGOYA metodě bylo uvedeno, že fulvinové kyseliny se skládají z huminových i nehuminových látek, což způsobuje, že je velmi těžké rozlišit ve frakcích FK, co jsou huminové látky a co ne. Proto u této metody nedochází k vylučování neadsorbovaných materiálů na pryskyřici, protože se předpokládá, že tyto materiály jsou důležitými složkami fulvinových kyselin z hlediska jejich množství a úlohy v přírodním prostředí. Fulvinové kyseliny se v této metodě purifikují pomocí dvou druhů pryskyřic – nerozpustného polyvinylpyrolidónu (PVP) a XAD-8 [40].

## 2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

Studium a charakterizace jednotlivých organických frakcí HL se často liší kvůli technikám, které byly použity pro izolaci. Frakcionace huminových látek obohacuje naše vědomosti o velikost částic HL, o molekulovou hmotnost, o obsahu funkčních skupin nebo o prvkovém složení. Jednotlivé organické frakce lze určit na základě různých fyzikálních a chemických parametrů, podle kterých frakcionační metody dělíme na fyzikální a chemické. Chemické metody bývají často destruktivní oproti těm fyzikálním. S rozvojem instrumentálních technik jsou frakcionační metody čím dál tím častěji upřednostňovány, hlavně ty chromatografické [41]. Pro charakterizaci huminových látek lze použít řadu analytických metod jako UV/Vis a fluorescenční spektrometrii, plynovou chromatografii s hmotnostní spektrometrií (GC/MS), hmotnostní spektrometrii s elektrosprejovou ionizací (ESI/MS), ale žádná z nich sama o sobě není dostačující k objasnění molekulární struktury těchto koloidních látek [42].

Kurková M. a kol. [43] se ve své práci zabývali izolací, charakterizací HL a následně porovnávali vzorky huminových kyselin (HK) z oxidovaného uhlí (tzv. oxyhumolitu). Pro izolaci huminových kyselin byly použity tyto vzorky – černé uhlí zvětralé na povrchu, černé uhlí pozměněné oxidací a vzorky HK vytvořené oxidací černého uhlí za různých teplot a časů. Sada vzorků byla doplněna vzorkem huminových kyselin izolovaných z oxyhumolitu a vzorkem HK izolovaných z lignitu. Zjistili, že huminové kyseliny izolované z jednotlivých vzorků uhlí se navzájem liší stupněm zuhelnatění a podmínkami, za kterých byly vytvořeny. Složení HK izolovaných z lignitu oproti oxidovanému černému uhlí bylo dáno vyššími hodnotami vodíku a nižšími hodnotami uhlíku, kyslíku a stupněm aromaticity. Bylo potvrzeno, že složení a další vlastnosti (např.  $pK_{app}$ , stupeň aromaticity) huminových kyselin izolovaných z černého uhlí jsou ovlivňovány teplotou a dobou oxidace.

Doskočil a kol. [44] se ve své práci zabývali studiem HK izolovaných z lignitů z různých lokalit ve střední a východní Evropě, konkrétně se jednalo o vzorky z Bulharska (Balsha a Maritza), Srbska (Kostolac), Polska (Konin) a České republiky (Jižní Morava). Huminové kyseliny byly extrahovány z lignitů pomocí upraveného postupu doporučeného IHSS. Vzorky byly nejdříve jemně namleté na zrnitost menší jak 0,2 mm a následně byly dekalciřikovány 0,1 M roztokem kyseliny chlorovodíkové. Tento proces měl za následek snížení anorganických příměsí (popela) v preparátech HK. Obsah popela v studovaných huminových kyselinách se pohyboval v rozmezí 0,5 – 23,5 hm. %, přičemž se autorům podařilo zjistit, že vzorky Balsha a Kostolac mají nejvyšší obsah popela. Dále bylo zjiřtěno, že vzorky lignitu z Jižní Moravy a Polska byly nejbohatřím zdrojem HK. Nejvyšřím obsah uhlíku byl analyzovaným u vzorku polského lignitu, kde zároveň byl zjiřtěn nejnižřím obsah kyslíku. Nejnižřím obsah uhlíku byl analyzován u vzorku HK pocházející z bulharské lokality Balsha.

Fong a kol. [45], jejichž cílem byla extrakce a charakterizace huminových kyselin vzorku uhlí pomocí FTIR a UV/Vis analýzy, ve své práci dospěli k závěru, že výtěžek extrakce závisí na extrakčním činidle a jeho koncentraci. Extrakce KOH poskytovala HK s více kyselými funkčními skupinami a nižřím obsahem popela a rovněž poskytla lepší výtěžek ve srovnání s NaOH. Infračervená spektra HK extrahovaných KOH a NaOH si byla podobná stejně jako spektra získaná metodou UV/Vis.

## 2.1 Fyzikální frakcionace

Jednou z nejčastěji používaných metod fyzikální frakcionace je ultrafiltrace s použitím filtrů s různou velikostí pórů. Filtry se obecně oddělují na základě lineárních velikostí nebo rozměrů, a ne nutně podle velikosti molekul. Nejčastěji se používají dva typy filtrů, a to hloubkové a membránové. Hloubkové filtry, např. ze skleněných vláken, fungují na principu síta. Membránové filtry fungují také jako síta a oproti hloubkovým filtrům nepropouští látky větší, než je velikost pórů. Mezi membránové filtry se řadí acetát celulózové, dusičnan celulózové nebo stříbrné filtry. Další metodou je například separace s usazováním částic s rozdílnou hustotou [33].

Lobartini a kol. [46] ve své práci extrahovali ultrafiltrací frakce huminové kyseliny s různou molekulovou hmotností a analyzovali je infračervenou spektrometrií, elektronovou mikroskopií a metodou izotachoforézy. HL byly extrahovány 0,1 M roztokem NaOH v poměru půda:NaOH 1:10. Huminová kyselina byla oddělena od kyseliny fulvinové okyselením roztoku HCl a byl uplatněn postup pro izolaci HL dle IHSS. Frakcionace HK byla provedena rozpuštěním 0,5 g lyofilizované HK v 0,5 M NaOH pomocí ultrafiltrační Amicon cely. Pomocí uvedených metod bylo zjištěno, že frakce podobných molekulových hmotností obsahovaly podobné sloučeniny. Tyto výsledky nepodporují koncept HK jako heterogenní směsi sloučenin, ale ukazují, že huminové kyseliny mohou mít složení více homogenní.

Ukalska-Jaruga a kol. [47] ve své práci zkoumali molekulární charakterizaci frakcí půdních organických látek (huminových a fulvinových kyselin a huminu), které jsou nejreaktivnějšími složkami půdy. V této práci byly použity spektroskopické (UV/Vis a Vis/near IR spektrometrii) a elektrochemické (zeta potenciál, polydisperzní index) metody k nalezení rozdílů formování, složení a sorpčních vlastností frakcí HL pocházejících z různých půd. HK a FK byly izolované sekvenční extrakcí v alkalických a kyselých roztocích podle IHSS, zatímco huminy HU byly stanoveny z půdního zbytku digescí minerální frakce za použití směsi 0,1 M HCl a 0,3 M HF. Spektrometrická analýza potvrdila nižší molekulovou hmotnost u vzorků FK s vysokým obsahem sloučenin podobných ligninu. Humin byl charakterizován kondenzovanou strukturou spojenou s nejvyšší molekulovou hmotností. HK a HU molekuly vykazovaly množství kyselých, fenolických a aminových funkčních skupin v aromatickém kruhu a v postranních řetězcích, zatímco FK vykazovaly především přítomnost methyly, methyleny, ethenylu a karboxylových reaktivních skupin.

## 2.2 Chemická frakcionace

Metody chemické frakcionace lze rozdělit na základě rozdílné rozpustnosti organických sloučenin v různých extrakčních činidlech a rozpouštědlech, pomocí kterých lze extrahovat huminové kyseliny, fulvinové kyseliny a huminy. Extrakce je nejčastěji prováděna ve vodě, ve vodných roztocích o různé iontové síle, v zásadách (NaOH). Kromě extrakce mezi chemické metody separace patří také oxidace a hydrolýza, která se provádí vodou nebo kyselinami (HCl nebo HF). Výhodou těchto metod je, že díky nim získáváme čisté organické frakce bez minerálního podílu [1, 48, 49].

Jednou z nejrozšířenějších a nejvyužívanějších oxidačních metod je tzv. Stevensonova alkalická extrakce s využitím extrakčního činidla NaOH a Na<sub>2</sub>PO<sub>7</sub>. Dochází během ní k extrakci huminových a fulvinových kyselin do roztoku, zatímco huminy jsou součástí

pevného zbytku vzorku. Poté je roztok okyselen koncentrovanou HCl na pH = 2 nebo menší, díky čemuž dojde k vysrážení HK a pomocí centrifugace se oddělí od FK. Nevýhodou této metody je rozpuštění doposud nehumifikované organické hmoty, která představuje pouze fragmenty dekompozice OM a oxidace organických sloučenin při kontaktu se vzduchem [1].

Neyroud a kol. [50] studovali huminové a fulvinové kyseliny, které byly podrobeny čtyřem za sebou jdoucím hydrolyzám s roztokem 2 N NaOH při 170 °C po dobu tří hodin. Po každé hydrolyze byly produkty degradace extrahovány v ethylacetátu, metylovány, separovány chromatografickými metodami a identifikované hmotnostní spektrometrií a IR spektroskopií. Pomocí hydrolyzy s roztokem NaOH byly získány čtyři frakce HK a stejný počet FK. Frakce, které byly rozpustné v ethylacetátu, byly označovány jako HAI, HAI, atd. Každá frakce rozpustná v ethylacetátu byla vysušena na rotační odparce v malém objemu CH<sub>3</sub>OH. Bylo zjištěno, že zatímco je alkalická hydrolyza štěpící C–O vazby do určité míry vhodná pro degradaci strukturních fenolových složek HK a FK, pro složité aromatické struktury, které jsou navzájem vázané C–C vazbou a které obsahují minimum kyslíku, jsou relativně neúčinné.

Ve své práci [51] autoři navrhli mírnou frakcionaci pro odstranění molekul z komplexu huminových látek. Tento typ frakcionace, který je možné nazvat sekvenční chemickou frakcionací, začíná nejdříve extrakcí organickými rozpouštědly, kdy nedochází k porušení jakékoli kovalentní vazby. Poté nastává transesterifikace slabým roztokem BF<sub>3</sub> v methanolu a solvolýza alkalickým roztokem KOH v methanolu, kdy dochází ke štěpení kovalentních vazeb mezi slabě vázanými esterovými jednotkami. Charakteristika výchozího a konečného materiálu byla provedena pomocí GC-MS, HPSEC-ESI-MS v závislosti na rozpustnosti získaných frakcí molekul ve vodě, přičemž metodou NMR spektrometrie byly získány další strukturní informace. Bylo zjištěno, že část nasycených kyselin je volně vázaná v huminové látce, avšak většina n-alkylových kyselin se podílela na esterových vazbách a byla oddělena pouze hydrolyzou. Hydroxylové kyseliny a n-alkoholy se nacházely ve všech frakcích, i když v rozdílných množstvích, přičemž největší množství hydroxylových sloučenin měly frakce pojmenované ORG1 a ORG2. Polyhydroxylované sloučeniny jako karbohydráty, aminocukry a jejich deriváty byly zastoupeny nejvíce ve frakci AQU2, což je příčinou vysoké hygroskopicity této frakce. V organických frakcích ORG2 a ORG3 bylo objeveno největší množství lineárních sacharidů a steroidů, což dokládá, že tyto organické frakce jsou nejpevněji vázané v huminové matici.

### 2.3 Frakcionace chromatografickými metodami

Chromatografické metody patří mezi nejdůležitější separační metody, kterými je možné analyzovat složité směsi biologických molekul, analyzovat plyny, stanovovat ionty. Jedná se o separační metody, které jsou založené na rozdílné afinitě dělených látek k mobilní (pohyblivé) a stacionární (nepohyblivé) fázi, které musí být nemísitelné. Stacionární fáze může být tvořena pevnou látkou nebo kapalinou, která je zachycena v pevném materiálu. Mobilní fáze je tvořena kapalinou nebo plynem. Díky jejich vysoké účinnosti jsou tyto techniky schopné rozdělit extrahovanou organickou hmotu na několik frakcí na základě odlišné velikosti molekul, rozdílné polaritě, na základě rozdílného náboje nebo na odlišné adsorpci k danému sorbentu [52, 53].

Technika frakcionace molekulové hmotnosti pomocí gelové chromatografie se využívá v charakterizaci organického materiálu nacházejícího se v půdě, sedimentech a v přírodních vodách. Zejména použití Sephadex gelů se nejčastěji pro tento účel uvádí v literatuře. K zjištění co nejreálnější molekulové hmotnosti je nutné vzít v úvahu několik faktorů např. rozměr kolony, množství aplikovaného vzorku, pH a koncentrace a složení eluentu atd., které mají na ni vliv. V této práci [54] autoři navrhovali změny některých z těchto proměnných a jejich důsledky s účinností techniky. Pro účely této práce byla HK v koncentraci  $800 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$  ve vodě frakciovaná pomocí Sephadex Gel G-75. Bylo zjištěno, že gelová permeace je závislá na interakcích gel-rozpuštěná látka a do jaké míry k nim dochází. Aby bylo možné nežádoucí interakce eliminovat, je nutný výběr eluentu. Autoři zjistili, že účinné změny vzorku nebo eluentu způsobují změny v permeačních chromatogramech gelu Sephadex, které nelze jednoznačně interpretovat. Iontová síla a interakce gel-roztok mohou ovlivnit transport HL skrz gelový sloupec a vést k nesprávným profilům střední molekulové hmotnosti.

V této práci [55] se autoři zabývali extrakcí atrazinu ze zemědělské půdy Soxhletovou metodou, přičemž vzorky byly poté charakterizovány pomocí UV/Vis a FTIR spektrometrií. TLC chromatografie byla poté použita pro kontrolu čistoty vzorku extrahovaného z půdy. TLC analýza byla provedena v systému rozpouštědel methanol:voda v poměru 80:20. Na základě výsledků bylo zjištěno, že metoda TLC je účinná a mohla by být použitelná jako jednoduchá laboratorní metoda k detekci herbicidů.

## 3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 3.1 Použité metody a přístroje

- váhy,  $d=0,01$  g, (MERCİ, S.R.O.);
- elementární analýza CHNS/O – Euro Vector EA 3000;
- termogravimetrický analyzátor TG Q5000, TA Instruments;
- UV/Vis spektrometrie (Hitachi U3900H);
- FTIR spektrometr (Nicolet iS50, Thermo Fischer Scientific, Inc);
- fluorescenční spektrometr (steady-state) Edinburgh Instruments FS5;
- lyofilizace (lyofilizátor Vir-Tis);
- rotační odparka;
- skleněná kolona malá pro DAX-8;
- skleněná kolona velká pro Amberlite IR 120;
- TLC destičky, Silica gel na TLC Al folie (Sigma Aldrich);
- pozorovací box s UV zdrojem záření.

### 3.2 Použité chemikálie

- 0,1 M NaOH (Sigma Aldrich s.r.o.);
- 0,1 M HCl (Sigma Aldrich s.r.o.);
- 0,3 M HF (Sigma Aldrich s.r.o.);
- $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (Sigma Aldrich s.r.o.);
- KCl (Sigma Aldrich s.r.o.);
- KBr pro FTIR spektrometrii (Sigma Aldrich s.r.o.);
- methanol p.a. (Sigma Aldrich s.r.o.);
- ethylacetát (Sigma Aldrich s.r.o.);
- aceton (Sigma Aldrich s.r.o.).

### 3.3 Základní fyzikálně-chemická charakterizace oxyhumolitu

Vzorek oxyhumolitu byl charakterizován základními fyzikálně-chemickými metodami jako je metoda elementární analýzy (EA), termogravimetrické analýzy (TGA) a infračervenou spektrometrií s Fourierovou transformací (FTIR), díky kterým bylo možné zjistit jeho prvkové složení a obsah funkčních skupin.

#### 3.3.1 Elementární analýza

Pomocí elementárního analyzátoru EA 3000 bylo získáno elementární složení vzorku oxyhumolitu. Kalibrace elementárního analyzátoru byla provedena pomocí standardní látky 4-amino-benzen-sulfonamidu. Navážené vzorky nativního oxyhumolitu a oxyhumolitu po extrakci byly spáleny v kyslíkové atmosféře při pracovní teplotě reaktoru  $980$  °C. Prvkové složení oxyhumolitu bylo zjištěno pomocí vyhodnocovacího programu *Callidus*, verze 5.1. Získané elementární složení bylo přepočteno na atomová procenta (*at. %*).



### 3.3.2 Termogravimetrická analýza

Termogravimetrická analýza byla provedena pro vzorek nativního oxyhumolitu a pro vzorek oxyhumolitu po extrakci HL na přístroji TA Instruments TGA Q5000, jehož výsledky měření byly zaznamenávány počítačovým softwarem. Vzorky oxyhumolitu byly spáleny z laboratorní teploty na konečnou teplotu pece 1000 °C v atmosféře vzduchu s průtokem 50 ml·min<sup>-1</sup> a s rychlostí ohřevu pece 10 °C·min<sup>-1</sup>. Ze získaných dat byl stanoven obsah nespalitelného podílu (tj. popela) a také obsah celkové vlhkosti.

### 3.3.3 Infračervená spektrometrie

Infračervená spektrometrie s Fourierovou transformací byla v této diplomové práci použita k získání základních informací o struktuře, povaze a obsahu jednotlivých funkčních skupin nacházejících se v oxyhumolitu. Pro získání FTIR spekter byla použita metoda DRIFT (*Diffuse Reflectance Infrared Fourier Transform Spectroscopy*).

Vzorek pro měření infračerveného spektra oxyhumolitu byl připraven rozetřením 100 mg předem vyžihaného KBr v achátové třecí misce a poté byly přidány 3 mg oxyhumolitu. Tato směs byla následně homogenizována, a takto připravený vzorek byl vložen do nástavce difuzně-reflexní jednotky spektrometru. DRIFT spektra byla naměřena na FTIR spektrometru Nicolet iS50. Všechna infračervená spektra byla měřena v rozmezí vlnočtů od 4000–400 cm<sup>-1</sup> s rozlišením 8 cm<sup>-1</sup> a s celkovým počtem akumulovaných skenů 512. FTIR spektrum bylo převedeno na jednotky Kubelka-Munk, které odpovídají jednotkám absorbance při transmisním měření. Infračervené spektrum vzorku bylo normalizováno na hodnotu nejintenzivnějšího absorpčního pásu nacházejícího se ve spektru.

## 3.4 Izolace huminových látek z oxyhumolitu

Izolace huminových látek z oxyhumolitu Bílina byla provedena na základě postupu mezinárodní společnosti pro výzkum huminových látek (IHSS). K 50 g vzorku oxyhumolitu, naváženého s přesností na 2 desetinná místa, bylo přidáno 1000 ml 0,1M roztoku HCl a toto množství se nechalo třepat na rotační třepačce po dobu jedné hodiny s rychlostí 10 ot·min<sup>-1</sup>. Tento krok byl určený k odstranění anorganických příměsí ze vzorku, jako jsou např. uhličitany atd. Suspenze byla dále odstředěná při 4800 ot·min<sup>-1</sup> po dobu 15 minut. Kapalný podíl byl odstraněn a k pevnému podílu bylo přidáno 1000 ml 0,1M roztoku NaOH. Takto vzniklá suspenze byla nechána na rotační třepačce přes noc při 10 ot·min<sup>-1</sup>. Tímto krokem vznikl výloh ze vzorku oxyhumolitu, který obsahoval HK, FK, HU a lehce hydrolyzovanou OM. Suspenze byla poté znovu odstředěna v odstředivce při 4800 ot·min<sup>-1</sup> po dobu 45 minut. Vzniklý supernatant byl dále přefiltrován za sníženého tlaku kvůli odstranění případných nečistot, které nebyly odstraněny při centrifugaci.

## 3.5 Separace huminových kyselin

Alkalický roztok s obsahem HL z předcházející kapitoly byl dále okyselen koncentrovanou HCl (35 obj. %) na hodnotu pH~1. Okyselením roztoku došlo ke koagulaci HK, během které docházelo k úplnému zabalení „makromolekulárního“ klubka HK. Roztok byl ponechán v lednici po dobu dvou dní. Vysrážené HK byly následně odstraněny centrifugací od supernatantu při otáčkách 4800 ot·min<sup>-1</sup> po dobu 45 minut. Roztok nad vysráženými HK

byl přefiltrován a ponechán pro pozdější izolaci FK. Vysrážené HK byly poté znovu rozpuštěny v demineralizované vodě a dané na rotační třepačku při 10 ot·min<sup>-1</sup> přes noc. Suspenze byla znovu odstředěna při 4800 ot·min<sup>-1</sup> a roztok nad vysráženými HK byl přefiltrován a ponechán na pozdější izolaci FK. Vysrážené HK byly znovu rozpuštěny přidávkem 500 ml 0,1M roztoku KOH. K roztoku bylo následně přidáno 11 g KCl a poté byl roztok odstředěn v odstředivce při 4800 ot·min<sup>-1</sup> po jednu hodinu. V tomto kroku docházelo k uvolňování nerozpustných frakcí, jako jsou HU a anorganických příměsí, z makromolekulárního klubka HK. Je nutno podotknout, že během koagulace HK dochází k adsorpci nerozpustných HU nacházejících se v supernatantu na povrchu koagulovaných HK, a následně jsou tyto nerozpustné frakce HL „uzamčeny“ ve sférické struktuře HK. Po odstranění nerozpustné frakce byl roztok HK okyselen koncentrovanou HCl (35 obj. %) na hodnotu pH~1 a byl ponechán, stejně jako v předchozím případě v lednici. Vysrážené HK byly následně oddělené od supernatantu centrifugací při 4800 ot·min<sup>-1</sup> za dobu jedné hodiny. Roztok vysrážený nad HK byl přefiltrován a uchován pro pozdější izolaci FK. K vysráženým HK bylo přidáno 500 ml roztoku směsi 0,1M HCl a 0,3M HF. Tato vzniklá suspenze byla ponechána na rotační třepačce po dobu jednoho týdne. Následně byly HK oddělené od supernatantu centrifugací při 4800 ot·min<sup>-1</sup> po dobu jedné hodiny. HK byly dále převedeny do dialyzační membrány s póry o velikosti 1000 Da. Dialýza probíhala 8 dní v ultračisté vodě. Po dialýze byly HK převedené do lyofilizačních baněk, dále byly vymražené na rotační vakuové odparce a poté byly lyofilizované na laboratorním lyofilizátoru do úplného vysušení.

### 3.6 Separace fulvinových kyselin

Kvůli tomu, že jsou FK rozpustné v alkalickém, ale i v kyselém prostředí a roztoky, ze kterých byly fulvinové kyseliny izolované obsahovaly i jiné rozpuštěné organické látky, bylo nutné využít metodu selektivní adsorpce na hydrofobní pryskyřici DAX-8.

#### 3.6.1 Příprava kolony s pryskyřicí DAX-8

Množství pryskyřice DAX-8, které bylo dáno rozměry skleněné kolony, bylo převedeno do kádinky, která se naplnila methanolem tak, aby hladina nad vrstvou DAX-8 byla minimálně 2 cm vysoká. Takto získaná suspenze pryskyřice a methanolu byla míchána pomocí tyčinky po dobu 15 min. Následně byl methanol slit a pryskyřice byla promyta destilovanou vodou (tento postup byl proveden 10krát). Po převedení pryskyřice do kolony sahala destilovaná voda přibližně 2 cm nad pryskyřici, aby nedocházelo k vysychání pryskyřice.

#### 3.6.2 Adsorpce fulvinových kyselin na pryskyřici DAX-8

Roztok FK byl před separací podroben ultrafiltraci s filtrem s póry o velikosti 0,45 μm. Tímto krokem byl roztok zbaven případných nežádoucích pevných částic, případně vysrážených zbytků HK z roztoku. Poté byl přefiltrován roztok nadávkován na kolonu. Po nadávkování veškerého obsahu FK byla kolona promývána destilovanou vodou, dokud nebyla absorbance vody na výstupu z kolony při vlnové délce 350 nm menší než 0,015. Tento krok měl za úkol odstranit z kolony rozpuštěnou organickou hmotu, která je tvořena z velké části nežádoucími lehce hydrolyzujícími organickými kyselinami. Následně byla provedena

desorpce fulvinových kyselin z pryskyřice pomocí roztoku 0,1M NaOH, dokud nebyla absorbance desorpčního roztoku na výstupu z kolony při vlnové délce 350 nm menší než 0,03. Po adsorpci FK na pryskyřici DAX a jejich následné desorpci bylo nezbytné provést regeneraci použité pryskyřice a připravit ji tedy k dalšímu použití. Tato regenerace byla provedena promýváním pryskyřice 0,1 M HCl. Promývání probíhalo, dokud hodnota pH HCl vytékající z kolony nebyla stejná s pH HCl na vstupu do kolony. Na závěr pak byla kolona 32krát promyta destilovanou vodou dokud, stejně jako v předchozím případě, nebyla hodnota pH vody na výstupu z kolony stejná jako na vstupu do kolony. Destilovaná voda byla poté ponechána v koloně tak, aby sahala přibližně 2 cm nad pryskyřici a nedošlo tedy k vysychání pryskyřice.

### 3.6.3 Protonace fulvinových kyselin na pryskyřici

Protože předešlým krokem z pryskyřice DAX-8 byly získány fulvinové kyseliny ve formě sodných solí – fulvátů, bylo nutné FK znovu naprotonovat. Z alkalického roztoku FK byly pomocí katexu Amberlite IR 120 odstraněny sodné kationty  $\text{Na}^+$ , které byly nahrazeny vodíkovými protony  $\text{H}^+$ .

Katex byl zalitý ultračistou vodou a takto vzniklá suspenze byla míchána pomocí tyčinky po dobu 15 minut. Následně byla suspenze převedena do skleněné kolony a hladina destilované vody sahala přibližně 2 cm nad pryskyřici, aby nedocházelo k jejímu vysychání.

Roztok FK získán z předešlého kroku byl opakovaně proléván kolonou, dokud neklesla hodnota vodivosti pod hodnotu  $120 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ . Poté byla kolona promývána deionizovanou vodou, dokud hodnota absorbance na výstupu z kolony při vlnové délce 350 nm nedosáhla hodnoty  $<0,015$ . Po dosažení této hodnoty absorbance bylo potřeba provést regeneraci použité pryskyřice a připravit ji k dalšímu použití. Vymytí adsorbovaných sodných iontů bylo provedeno pomocí 0,1M HCl. Nejprve byla kolona promyta objemem 1000 ml 0,1M HCl a poté byla promývána destilovanou vodou, dokud se pH vody na výstupu z kolony nepohybovalo kolem hodnoty 7. Do kolony bylo opět nalito takové množství vody, aby její hladina byla cca 2 cm nad pryskyřici a nedocházelo tedy k vysychání pryskyřice. Vstup dokolony byl následně zakryt parafilmem.

Roztoky FK byly dále zakoncentrovány a vymrazeny na rotační vakuové odparce a následně lyofilizovány na laboratorním lyofilizátoru do úplného vysušení. Poté byl z lyofilizačních baněk odebrán výtěžek FK ve formě světle hnědého prášku, který byl zvážen na analytických vahách.

## 3.7 Charakterizace huminových a fulvinových kyselin a huminu

Huminové látky získané izolací byly podrobeny základní fyzikálně-chemické charakterizaci za účelem stanovení elementárního složení, čistoty, aromaticity, stupně humifikace, obsahu funkčních skupin a dalších informací, které se týkají struktury těchto látek. Získané vzorky huminových a fulvinových kyselin a huminu byly charakterizovány metodou elementární analýzy (EA), termogravimetrie (TGA), infračervené spektrometrie (FTIR), UV/Vis spektrometrie a ustálené fluorescenční spektrometrie (*steady-state*).

### 3.7.1 Elementární analýza

Prvkové složení vzorků HK, FK a HU bylo zjištěno pomocí elementárního analyzátoru EA 3000. Vzorky HL získané z oxyhumolitu byly podrobeny elementární analýze stejným způsobem jako v případě oxyhumolitu. Pomocí standardní látky 4-amino-benzen-sulfoamidu byly získány kalibrační křivky pro jednotlivé prvky. Navážené vzorky huminových látek byly spáleny v kyslíkové atmosféře při pracovní teplotě 980 °C. Všechny vzorky huminových látek (HK, FK, HU) byly naváжены celkem ve třech opakováních. Elementární složení bylo zjištěno pomocí vyhodnocovacího programu *Callidus*, verze 5.1. Získané elementární složení bylo přepočteno na atomová procenta (*at. %*).

### 3.7.2 Termogravimetrická analýza

Termogravimetrická analýza byla provedena pro všechny vzorky HL, tj. HK, FK a HU. Rovněž jako v předchozím případě byl i zde použit přístroj TA Instruments TGA Q5000, jehož výsledky měření byly zaznamenávány počítačovým softwarem. Vzorky HK, FK, HU, jejichž navážka činila ~ 1 mg, byly spáleny z laboratorní teploty na konečnou teplotu 1000 °C v atmosféře vzduchu s průtokem 50 ml/min a s rychlostí ohřevu pece 10 °C/min. Z naměřených dat byl stanoven obsah nespalitelného podílu (tj. popela) a celkové vlhkosti.

### 3.7.3 UV/Vis spektrometrie

Podstatou UV/Vis spektroskopie je absorbance ultrafialového a viditelného záření, což je oblast 200 až 1000 nm. Tato metoda byla použita v této diplomové práci za účelem primární charakterizace získaných vzorků huminových a fulvinových kyselin a huminu. Na základě provedené literární rešerše byly vybrány následující absorpční koeficienty  $E_2/E_4$ ,  $E_2/E_3$ ,  $E_4/E_6$  a  $E_{ET}/E_{BZ}$ , které byly získané poměrem absorpčních při přesně definovaných vlnových délkách.

Pro určení absorpčního koeficientu  $E_4/E_6$ , tzv. humifikačního indexu byly použity roztoky vzorků o koncentraci  $50 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ . Nejprve byly připraveny zásobní roztoky studovaných HK, FK a HU o hmotnostní koncentraci  $100 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$  vzniklého rozpuštěním 5 mg vzorků HL v 0,1 M roztoku NaOH v 50 ml odměrných baňkách. Poté bylo z těchto zásobních roztoků HL odpipetováno 12,5 ml rozpuštěného vzorku do 25 ml odměrné baňky a doplněno standardním fosfátovým pufrem o hodnotě pH 7, směsí  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  a  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  v poměru 1:1,79. pro získání absorpčních koeficientů  $E_2/E_4$ ,  $E_2/E_3$  a  $E_{ET}/E_{BZ}$  byly dále připraveny roztoky huminových a fulvinových kyselin a huminu o hmotnostní koncentraci  $10 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ . Roztoky vzorků byly připraveny ze stejného zásobního roztoku, který byl použit k přípravě roztoků HL o koncentraci  $50 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ .

K změření těchto vzorků byl využit spektrometr Hitachi U-3900H, na kterém byly vzorky změřeny v křemenné kyvetě s optickou dráhou 1 cm v rozmezí 400–800 nm u vzorků o koncentraci  $50 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$  a 200–700 nm u vzorků HL o koncentraci  $10 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ .

Absorpční koeficient  $E_4/E_6$ , který je též nazýván jako *humifikační index*, byl získán jako poměr absorpčních při vlnových délkách 465 a 665 nm. Nízká hodnota tohoto absorpčního koeficientu souvisí s vyšší molekulovou hmotností HL a je závislá na pH roztoku. Hodnota humifikačního indexu také souvisí s přítomností funkčních skupin obsahující kyslík (hydroxylové, karbonylové, karboxylové a esterové skupiny) [56]. Vzhledem ke skutečnosti, že je absorbance při 665 nm je velmi nízká a humifikační index je zatížen značnou chybou, je

tento absorpční koeficient nahrazován ekvivalentním absorpčním koeficientem  $E_2/E_4$ , který byl získán z poměru absorbancí při vlnových délkách 265 a 465 nm [57].

Absorpční koeficient  $E_2/E_3$  je spojován s molekulovou hmotností HL a se stupněm aromaticity, získaném z poměru absorbancí při vlnových délkách 250 a 365 nm. U tohoto absorpčního koeficientu platí, že jeho klesající hodnota vypovídá o vzrůstající aromaticity a molekulové hmotnosti HL. Poslední absorpční koeficient  $E_{ET}/E_{BZ}$ , určen poměrem absorbancí při 253 nm a 203 nm, je výrazně citlivý k obsahu polárních substituentů na aromatičtém jádře HL. Poskytuje informace o typu těchto substituentů a jestliže je ve struktuře zapojeno více alifatických substituentů, hodnota tohoto absorpčního koeficientu se snižuje. Absorbance při 203 nm je však nepříznivě ovlivněna možnou přítomností dusičnanových aniontů ve vzorku HL, a proto je tento absorpční koeficient nahrazen poměrem absorbancí při 253 nm a 220 nm, který koreluje s původně vypočítaným koeficientem [56].

### 3.7.4 Fluorescenční spektrometrie

Fluorescenční spektrometrie (*steady-state*) byla v této diplomové práci použita za účelem získání informací o struktuře, heterogenitě, stupni humifikace, kondenzaci aromatičtých struktur a přítomnosti elektron-donorních a elektron-akceptorních funkčních skupin. Studium HK, FK a HU bylo provedeno pomocí excitačních a emisních spekter, ze kterých byly odečteny polohy jednotlivých fluorescenčních maxim. Pro měření fluorescenčních spekter byly použity stejné roztoky HK, FK a HU o koncentraci  $10 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ , které byly připraveny v kapitole 3.7.3 pro měření UV/Vis spekter.

Fluorescenční spektra vzorků byla změřena pomocí *steady-state* fluorescenčního spektrometru Edinburg Instruments FS5. Byla nastavena šířka štěrbin excitačního a emisního monochromátoru na 4 nm a byla použita křemenná kyveta pro fluorescenční spektrometrii s optickou dráhou 1 cm. Fluorescenční spektra byla u vzorků HL změřena v rozsahu vlnových délek 380–600 nm při konstantní vlnové délce excitačního záření 360 nm. Excitační spektra vzorků huminových a fulvinových kyselin a huminu byla změřena v rozsahu 300–500 nm při konstantní vlnové délce emitujícího záření 520 nm. Z důvodu silného vnitřního filtračního efektu roztoků HL byla všechna naměřená fluorescenční spektra, resp. jejich intenzity fluorescence korigovány pomocí matematického aparátu navrženého podle Lakowicze [58], jehož matematický zápis je definován rovnicí:

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

kde  $F_{obs}$  je experimentálně zjištěná intenzita fluorescence,  $A_{ex}$  je absorbance při excitační vlnové délce,  $A_{em}$  je absorbance při emisní vlnové délce a  $F_{corr}$  je korigovaná intenzita fluorescence.

K charakterizaci HL je možno využít tzv. fluorescenční koeficienty, získané jako poměry intenzit fluorescence, případně jako plochy pod křivkou při vhodně zvolených vlnových délkách emise. Pro tuto práci byly vybrány fluorescenční koeficienty *FI*, *BIX*, *HIX* a *Milori index*.

Fluorescenční koeficient *FI* též nazýván *fluorescenční index* je definován jako poměr intenzit fluorescence při emisních vlnových délkách 450 a 500 nm. Tyto emisní fluorescenční spektra byla měřena v rozsahu vlnových délek 390–600 nm, přičemž excitační vlnová délka

byla 370 nm. Hodnota fluorescenčního indexu vypovídá o původu HL a DOM. Huminové látky pocházející z terestriálních přírodních matric mají nízké hodnoty *FI* (0,2–1,4), zatímco FK a DOM, které jsou vzniklé na základě mikrobiologické aktivity vodní flóry, jsou charakterizovány vyššími hodnotami fluorescenčního indexu (>1,9) [59].

Fluorescenční koeficient *BIX* je definován jako poměr  $I_F$  při emisních vlnových délkách 380 nm (fluorofor *M* – *marine humic-like*) a 430 nm (fluorofor *C* – *humic-like*). Hodnoty vlnových délek byly odečteny z fluorescenčního spektra roztoků vzorků změřených v rozmezí vlnových délek 330–600 nm při konstantní vlnové délce budícího záření 310 nm. HL izolované z terestriálních, případně kaustobiolitických přírodních matric jsou charakteristické nižší hodnotou tohoto koeficientu (<0,8), což vypovídá o jejich alochtonním původu. Huminové látky mají však zpravidla vyšší hodnoty *BIX* (0,8–1), které jsou charakteristické pro látky autochtonního původu vznikající biologickou aktivitou vodních mikroorganismů [60].

Fluorescenční koeficient podle Zsolnaye (*HIX*) vychází z poměru ploch pod křivkou emisního spektra, kde příslušné plochy  $A_1$  a  $A_4$  jsou vypočteny jako plošné integrály v rozmezí vlnových délek 435–480 nm (plocha  $A_4$ ) a 300–345 nm (plocha  $A_1$ ). Z tohoto důvodu byla změřena fluorescenční spektra vzorků v rozmezí vlnových délek emise 280–600 nm při konstantní vlnové délce budícího záření 254 nm. Podle Zsolnaye a spol. [61] je tento fluorescenční koeficient výrazně citlivý k přítomnosti aromatických jader a poskytuje tedy informace o stupni humifikace HL. Zvýšení obsahu aromatických struktur vede ke zvýšení intenzity fluorescence v oblasti  $A_4$ , což způsobuje nárůst humifikačního indexu *HIX*. Huminové látky izolované z terestriálních a kaustobiolitických matric mají vyšší hodnoty *HIX* (> 5) oproti HL pocházejících z přírodních vod, které mají hodnoty nižší (<5).

Podobným způsobem byl získán i *Milori Index*. Tento fluorescenční index je definován jako plošný integrál pod celým emisním spektrem. Fluorescenční spektra vzorků byla změřena v rozsahu vlnových délek 460–650 nm při konstantní vlnové délce budícího záření 400 nm. Obecně můžeme říci, že se zvyšující se hodnotou *Milori Indexu* roste stupeň humifikace [62].

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

Ze sypkých vzorků HK, FK a HU, izolovaných z oxyhumolitu, bylo nejprve potřeba připravit roztoky, které bylo možné nanášet na TLC fólii. Pevné vzorky byly rozpuštěny v 1 ml roztoku vzniklého z ethylacetátu, acetonu a methanolu v poměru 1:2:4 a ponechány na rotační třepačce 4 dny. Poté byly vzniklé roztoky HL přefiltrovány a postupně aplikovány na TLC fólii pomocí skleněné kapiláry. Po odpaření směsi se TLC fólie nechala vyvíjet ve skleněné nádobě obsahující směs ethylacetátu, acetonu a methanolu v poměru 1:2:4. Chromatografický záznam byl vyvíjen po dobu 60 minut. Po této době se nechala TLC fólie uschnout. Pod UV lampou bylo pozorováno u vzorků HK a FK pět zón, které odpovídají jednotlivým organickým frakcím, pojmenovaným HKEA – HKEE, resp. FKEA – FKEE. U TLC huminu (HU) bylo pozorováno šest zón, které byly pojmenovány HUEA – HUEF.

Každá frakce byla individuálně odstraněna z destičky seškrábáním silikagelu s TLC záznamem a rozpuštěna v 0,1 M NaOH a převedena do standardního fosfátového pufru. Tímto způsobem byly připraveny roztoky všech frakcí HK, FK a HU.

### 3.9 Základní fyzikálně-chemická charakterizace frakcí HL

U jednotlivých organických frakcí huminových látek byla provedena základní analýza pomocí metod UV/Vis spektrometrie a ustálené fluorescenční spektrometrie.

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

Z připravených roztoků organických frakcí HL byly naměřeny jejich UV/Vis spektra, ze kterých byly následně vypočteny absorpční koeficienty  $E_2/E_4$ ,  $E_2/E_3$  a  $E_{ET}/E_{BZ}$ . Známý a používaný absorpční koeficient  $E_4/E_6$ , daný poměrem absorbancí při 465 a 665 nm nebyl použit z důvodu nízké absorpce frakcí v oblasti vlnových délek 550–800 nm. Namísto něj byl použit absorpční koeficient  $E_2/E_4$ , který je definován poměrem absorbancí při 265 nm a 465 nm. Dále byl použit absorpční koeficient  $E_2/E_3$  definovaný jako poměr absorbancí při 250 a 365 nm a koeficient  $E_{ET}/E_{BZ}$ , definovaný při 253 a 220 nm.

Měření UV/Vis spekter těchto vzorků probíhalo při stejném experimentálním nastavení UV/Vis spektrometru Hitachi U3900H (viz. podkapitola 3.7.3)

#### 3.9.2 Fluorescenční spektrometrie organických frakcí HL

Podstatná část této diplomové práce je věnována studiu organických frakcí izolovaných z HL oxyhumolitu pomocí ustálené (*steady-state*) fluorescenční spektrometrie. Jednotlivé organické frakce HK, FK a HU byly změřeny na fluorescenčním spektrometru Edinburgh Instruments FS5 s nastavenou šířkou štěrbin excitačního a emisního monochromátoru 4 nm v křemenné kyvetě SUPRASIL<sup>®</sup> pro fluorescenční spektrometrii s optickou dráhou 1 cm. Emisní fluorescenční spektra roztoků organických frakcí připravených podle postupu viz. kapitola 3.8 byla změřena v rozsahu vlnových délek 380–600 nm při konstantní vlnové délce excitačního záření 360 nm.

Hodnoty fluorescenčních intenzit ( $I_F$ ) byly korigovány pomocí matematického aparátu navrženého Lakowiczem [58] k odstranění silného vnitřního filtračního efektu roztoků organických frakcí HL, stejně jako v kapitole 3.7.4.

## 4 VÝSLEDKY A DISKUZE

### 4.1 Elementární a termogravimetrická analýza oxyhumolitu

Naměřené hodnoty obsahu biogenních prvků nativního oxyhumolitu a oxyhumolitu po extrakci, jeho atomových poměrů H/C, O/C a N/C a obsahu nespalitelného podílu, tj. popela a celkové vlhkosti jsou uvedeny v Tabulce 4.

Tabulka 4: *Elementární složení oxyhumolitu v at. %, atomové poměry H/C, O/C a N/C a obsah popela a celkové vlhkosti*

Vzorek	Elementární složení v at. %				H/C	O/C	N/C	vlhkost (hm. %)	popel (hm. %)
	C	H	N	O					
nativní oxyhumolit	37,89	57,58	0,82	3,71	1,52	0,10	0,02	13,34	24,76
oxyhumolit po extrakci	29,31	64,07	0,46	6,16	2,19	0,21	0,02	3,20	42,32

Jak si lze povšimnout, elementární složení oxyhumolitu je uvedeno v atomových procentech (at. %) kvůli podhodnocení obsahu vodíku vlivem jeho nízké atomové hmotnosti v případě použití hmotnostních procent (hm. %). Atomové poměry H/C, O/C a N/C reprezentují vhodnou metodu, pomocí které lze charakterizovat některé fyzikálně-chemické vlastnosti organických látek jako míru hydrogenace, oxidaci, dekarboxylaci či podíl aromatických nebo alifatických strukturních jednotek.

Z Tabulky 4 je zřejmé, že oxyhumolit je tvořen převážně uhlíkem, vodíkem, kyslíkem a minoritně i dusíkem. Síra ve vzorcích nebyla detekována vůbec. Absence síry ve vzorcích HK a HU by mohla být vysvětlena tím, že v této diplomové práci byla použita GC kolona, která umožňuje stanovení tohoto biogenního prvku v minimální hmotnostní koncentraci 0,5 hm.%. Z naměřených výsledků je zřejmé, že oxyhumolit po extrakci je tvořen vyšším obsahem kyslíku, který je převážně vázán s obsahem funkčních skupin, jako jsou karboxylové a –OH fenolické a alkoholové skupiny pocházející z polysacharidů, jako je celulóza a hemi-celulóza (původní matrice). Atomový poměr H/C, který popisuje míru hydrogenace, je vyšší u oxyhumolitu po extrakci. Hodnota atomového poměru O/C, která se pohybovala od 0,10–0,21 značí, že nativní oxyhumolit, který má nižší hodnotu tohoto poměru, má nižší obsah karboxylových, fenolických –OH nebo alkoxylových funkčních skupin –OCH<sub>3</sub>.

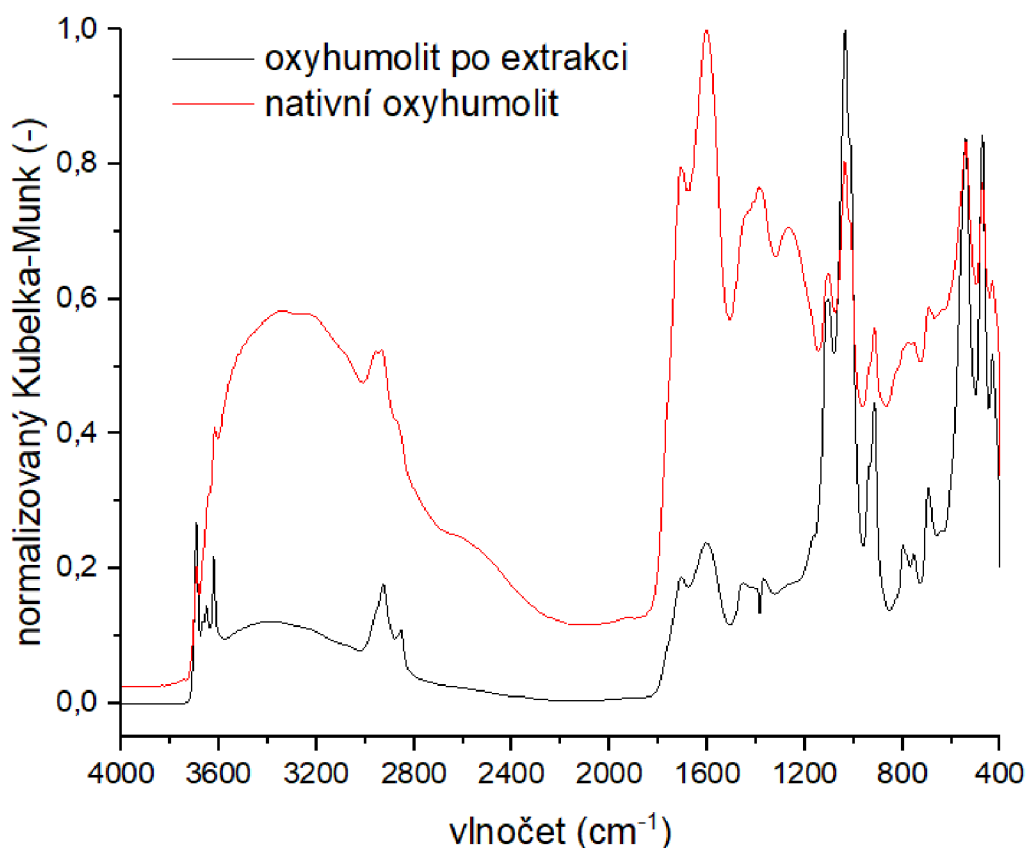
Termogravimetrickou analýzou byl zjištěn obsah popela a celkové vlhkosti. Ta byla způsobena hlavně adsorbovanou vzdušnou vlhkostí prostřednictvím fenolických a karboxylových funkčních skupin a pohybovala se v rozmezí 3,2–13,3 hm. %. Z hodnot uvedených v Tabulce 4, je zřejmé, že nativní oxyhumolit obsahuje menší množství nespalitelného podílu. Dále oxyhumolit po extrakci obsahoval větší množství popela, což znamená, že oxyhumolit po extrakci obsahuje velké množství anorganických příměsí tzn., že při extrakci byly ze vzorku izolovány převážně organické sloučeniny jako jsou HL a lehce hydrolyzovatelná OM, a tudíž zbylá hmota původního kaustobiolitu je tvořena nerozpustnou OM, jež obsahuje významné množství nespalitelného podílu tj. popela.



## 4.2 Infračervená spektrometrie oxyhumolitu

Infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací (FTIR) je důležitou metodou pro charakterizaci a identifikaci funkčních skupin a strukturních jednotek v huminových látkách.

Touto vybranou metodou se předešlo částečné deprotonaci huminových látek při iontové výměně karboxylových  $-\text{COOH}$  a fenolických skupin  $\text{OH}$  v průběhu lisování vzorku s  $\text{KBr}$  za vyššího tlaku. Podle autorů [63, 64, 65] dochází při lisování  $\text{KBr}$  tablety se vzorkem HL vlivem vysokých tlaků ( $p > 6 \text{ t/cm}^2$ ) k iontové výměně mezi vodíkovými kationty a kationtem použité soli ( $\text{KBr}$  nebo  $\text{NaCl}$ ) a kvůli tomu dochází k snížení intenzity absorpčního pásu v oblasti vlnočtů  $1720\text{--}1700 \text{ cm}^{-1}$ . Tato oblast odpovídá valenční symetrické vibraci  $\text{C=O}$  vazeb v karboxylových funkčních skupinách. Tento problém lze sice minimalizovat odstraněním absorbované vody z  $\text{KBr}$  zahřátím ve vakuu na teplotu  $70 \text{ }^\circ\text{C}$  po dobu 30 minut, případně sušením tablety v exsikátoru po dobu několika hodin, avšak zvýšená teplota při sušení tablet  $\text{KBr}$  se vzorkem může částečně pozměnit, resp. degradovat termolabilní frakce HL, které spoluvytvářejí strukturu huminových látek. DRIFT spektra jsou vyjádřena pomocí lineárních jednotek Kubelka–Munk, které odpovídají jednotkám absorbance ve spektru měřené transmisní technikou. Pro charakterizaci struktury HL a v oxyhumolitu byla měřena absorbance v rozsahu vlnočtů  $4000\text{--}400 \text{ cm}^{-1}$ .



Obrázek 12: Normalizovaná DRIFT spektra nativního oxyhumolitu a oxyhumolitu po extrakci  
V infračervených DRIFT spektrech oxyhumolitu (viz Obrázek 12) je patrný široký a intenzivní absorpční pás v oblasti vlnočtů  $3600\text{--}3100 \text{ cm}^{-1}$  zodpovědný za valenční

symetrickou vibraci O–H a N–H vazeb v karboxylových kyselinách, sekundárních amidech, a alifatických alkoholech a fenolech, resp. polyfenolech. Tyto polyfenoly jsou stavebními jednotkami odvozenými od ligninu, které vznikají v průběhu geneze HK. Méně intenzivní absorpční pás lokalizovaný při  $2940\text{ cm}^{-1}$  je z pravidla připisovaný valenční asymetrické vibraci C–H vazeb v methylenových skupinách. Ostrý a intenzivní absorpční pás lokalizovaný při  $1700\text{ cm}^{-1}$  odpovídá valenční symetrické vibraci C=O vazeb v karboxylových kyselinách substituovaných na aromátech. Tento absorpční pás je více intenzivní v případě standardu oxyhumolitu, a proto se můžeme domnívat, že tento vzorek obsahuje relativně více –COOH funkčních skupin. Přítomnost karboxylových skupin byla rovněž potvrzena poměrně intenzivním a širokým absorpčním pásem při  $2610\text{ cm}^{-1}$ , který odpovídá valenční symetrické vibraci O–H---O vazeb, tvořící ve struktuře oxyhumolitu dimerní formy karboxylových skupin. Dále ve DRIFT spektrech můžeme nalézt absorpční pás při  $1260\text{ cm}^{-1}$ , který je zpravidla přisuzován valenční symetrické vibraci C–O vazeb v karboxylových kyselinách. Nicméně lze tento absorpční pás připisat valenční vibraci C–C–O vazeb v aryl-esterech. Velmi intenzivní a ostrý pás nacházející se u nativního oxyhumolitu, jenž byl lokalizován při  $1600\text{ cm}^{-1}$ , je obvykle přisuzován valenční symetrické vibraci C=C vazeb v aromatických jednotkách oxyhumolitu. Dále se absorpčním DRIFT spektru nachází při  $1110\text{ cm}^{-1}$  valenční vibrace O–C–C vazeb v aryl-esterech, případně asymetrická vibrace C–O–C vazeb v alkyl-etherech (u polysacharidů). Více ostrý absorpční pás nacházející se při  $1030\text{ cm}^{-1}$  odpovídá valenční vibraci primárních alkoholů C–O. Z DRIFT spekter je zřejmé, že nativní oxyhumolit obsahuje více funkčních skupin nebo některých strukturních jednotek jako například C=C vazeb v aromatických jednotkách oxyhumolitu, které se nacházejí při  $1600\text{ cm}^{-1}$ . Naproti tomu u oxyhumolitu po extrakci HL se nachází ostrý a intenzivní absorpční pás lokalizovaný při  $1040\text{ cm}^{-1}$ , který odpovídá valenční vibraci primárních alkoholů C–O nebo také absorpční pás při  $918\text{ cm}^{-1}$ , který je přisuzován valenční symetrické vibraci Si–O vazeb v silikátech nebo karboxylovým C–O–H skupinám.

### 4.3 Elementární a termogravimetrická analýza HL

Vzorky HL, které byly v této diplomové práci použity k frakcionaci organické hmoty pomocí tenkovrstvé chromatografie (TLC), byly podrobeny stejně jako v případě oxyhumolitu základní fyzikálně-chemické charakterizaci pomocí elementární analýzy a termogravimetrie. Prvkové složení je uvedeno v Tabulce 5 opět v atomárních procentech (*at. %*) z důvodu podhodnocení obsahu vodíku.

Z výsledků uvedených v Tabulce 5 je zřejmé, že HL jsou převážně tvořeny uhlíkem, vodíkem a kyslíkem. Naproti tomu z ostatních sledovaných prvků byl dusík přítomen v minoritním množství a síra byla detekována pouze u FK. Tento fakt značí o tom, že vzorek FK má ve své struktuře vyšší zastoupení hydrofilních sulfonových skupin (–SO<sub>3</sub>H). Z naměřených výsledků je patrné, že vzorky HK a FK v porovnání se vzorkem huminu jsou tvořeny vyšším obsahem uhlíku a také kyslíku, který se vyskytuje v kyselých funkčních skupinách, jako jsou karboxylové (–COOH), fenolické (–OH), ketonové (C=O) nebo etherové, rovněž přicházejí v úvahu také alkoxy skupiny tzn. –OCH<sub>3</sub>. Obsah dusíku byl u vzorků HK a FK prakticky totožný, poněvadž rozdíl mezi nimi byl pouhých 0,06 *at. %*. Naopak tomu bylo v případě nerozpustného huminu, kde byl dusík zastoupen ve větším množství. Řada autorů dává ve

spojitost obsah dusíku v huminových látkách s mikrobiální činností při humifikačním procesu. Obsah vodíku byl v případě vzorků HK a FK nižší oproti HU a prakticky podobný, protože difference mezi nimi byla pouhých 2,11 at. %.

Tabulka 5: *Elementární složení HL izolovaných z oxyhumolitu v at. %, vypočítané atomové poměry H/C, O/C a N/C, obsah popela a celkové vlhkosti*

Vzorek	Elementární složení v at. %					H/C	O/C	N/C	vlhkost	popel
	C	H	N	S	O				(hm. %)	(hm. %)
HK	35,77	53,32	1,74	0,00	9,17	1,49	0,26	0,05	4,91	1,52
FK	33,19	51,21	1,68	1,06	12,85	1,54	0,39	0,05	7,07	7,69
HU	27,73	65,39	2,47	0,00	4,40	2,36	0,16	0,09	5,08	53,23

Z vypočtených hodnot prvkového složení byly získané atomové poměry H/C, O/C a N/C. Tyto atomové poměry jsou často používané k základnímu rozlišení hlavní struktury analyzovaného vzorku a jsou dobrými indikátory fyzikálně-chemických vlastností HL jako je stupeň aromaticity, obsahu kyselých funkčních skupin a hydrogenace. Vypočtené atomové poměry jsou uvedeny v Tabulce 5. Z Tabulky 5 je zřejmé, že atomový poměr H/C, který popisuje stupeň aromaticity a míru dehydrogenace, byl nejvyšší v případě vzorku HU a naopak nejnižší u vzorku huminové kyseliny (HK). Z tohoto důvodu lze říci, že vzorek HK je charakterizován vyšší mírou aromaticity a dehydrogenace v porovnání s ostatními dvěma vzorky.

Dalším z atomových poměrů je O/C, který nás informuje o množství kyslíkatých funkčních skupin, mezi které řadíme například karboxylové a fenolické skupiny nebo také karbonylové funkční skupiny. Tento atomový poměr byl největší u vzorku FK a nejmenší u huminu. Vyšší hodnota atomového poměru O/C u fulvinové kyseliny značí, že FK obsahuje větší množství kyslík obsahujících funkčních skupin oproti HK a HU.

Posledním z atomových poměrů je poměr N/C, který je u všech vzorků HL přibližně stejný (0,05–0,09). Z této skutečnosti vyplývá, že vzorky HL (huminové a fulvinové kyseliny a humin) obsahují ve svých strukturách srovnatelná množství dusík obsahujících funkčních skupin.

Celková vlhkost HL stanovena termogravimetricky se pohybovala v rozmezí 4,91–7,07 hm. %. Vyšší vlhkost u FK je pravděpodobně způsobena vyšším obsahem polárních funkčních skupin, které sorbují vzdušnou vlhkost na povrchu vzorku. Tuto skutečnost nám také dokazuje atomový poměr O/C. Z porovnání huminových látek je zřejmé, že HK vykazovala vyšší čistotu oproti FK a HU, u kterých byl obsah nespalitelného podílu stanoven na 7,69 hm. %, resp. 53,23 hm. %. Obsah popela je vázán na zvolené purifikační kroky během izolace HL z přírodní matrice, které v případě HK zahrnují působení směsi 0,3 M HF a HCl. Naproti tomu izolace FK probíhá podle standardního postupu izolace HL dle mezinárodní společnosti pro výzkum huminových látek IHSS nejdříve na koloně s pryskyřicí DAX-8 a poté, při zpětné protonaci, na koloně Amberlite IR 120, tudíž vzorek FK nebyl přečištěn pomocí směsi roztoků HCl-HF.

#### 4.4 UV/Vis spektrometrie HL

Molekulová absorpční spektrometrie v ultrafialové a viditelné oblasti elektromagnetického záření (UV/Vis) je metoda patřící k základní instrumentální technice, která se používá pro studium a charakterizaci rozpuštěné organické hmoty a huminových látek pocházejících z rozličných přírodních matric. Získané HK, FK a HU byly v této diplomové práci charakterizovány pomocí absorpčních koeficientů (viz Tabulka 6), které byly získány z naměřených absorpčních spekter. Lze říci, že tyto koeficienty nám poskytují informace o střední molekulové hmotnosti  $\overline{M}_w$ , aromaticitě, stupni humifikace a míře substituce aromatických struktur polárními funkčními skupinami ( $-\text{COOH}$ ,  $-\text{OH}$  a  $-\text{OCH}_3$ ) studovaných HL a DOM. Studované vzorky HL byly měřeny při konstantní hodnotě pH v prostředí fosfátového pufru o hodnotě pH  $\sim 7$  kvůli senzitivitě absorpčních koeficientů na hodnotu pH prostředí. Na Obrázku 21 (viz Přílohy) jsou znázorněna spektra huminových kyselin, fulvinových kyselin a huminu, které vykazovala kvaziexponenciální průběh, který je charakteristický pro tyto biokoloidní sloučeniny.

V Tabulce 6 můžeme vidět, že absorpční koeficienty  $E_2/E_4$  a  $E_4/E_6$  (humifikační index), byly výrazně vyšší v případě vzorku FK oproti ostatním vzorkům. Vysoké hodnoty absorpčního koeficientu  $E_2/E_4$  vypovídají o tom, že vzorek FK je charakterizován nižším stupněm humifikace a také nižší střední molekulovou hmotností. Při porovnávání všech izolovaných HL si lze povšimnout u vzorku FK také vyššího absorpčního koeficientu  $E_2/E_3$ . Ten společně s koeficientem  $E_2/E_4$  charakterizuje fulvinové kyseliny nižším stupněm aromaticity. Nižší hodnoty absorpčních koeficientů  $E_2/E_3$ ,  $E_2/E_4$  a  $E_4/E_6$  u vzorků HK a HU značí o vyšší střední molekulové hmotnosti, vyšším stupni aromaticity a také o vyšším stupni humifikace.

Tabulka 6: Absorpční koeficienty pro vzorky HK, FK a HU

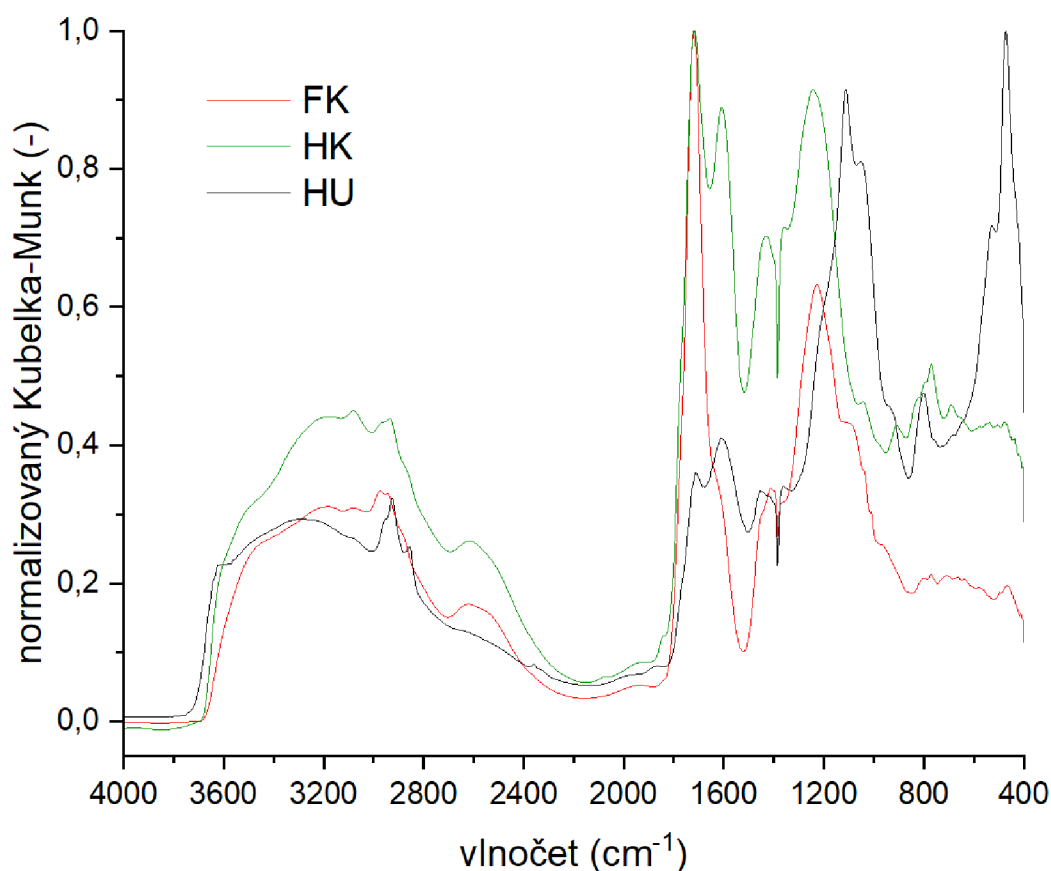
Vzorek	Absorpční koeficient			
	$E_{ET}/E_{Bz}$	$E_2/E_3$	$E_2/E_4$	$E_4/E_6$
HK	0,85	2,70	6,49	7,05
FK	0,61	8,20	36,61	27,00
HU	0,86	2,72	5,50	5,86

Z Tabulky 6 je patrné, že hodnota absorpčního koeficientu  $E_{ET}/E_{Bz}$  je u vzorku FK oproti druhým dvěma vzorkům nejnižší. Tento absorpční koeficient je definován jako poměr absorbancí, které korespondují s elektronovými přechody v benzenu, konkrétně při 253 nm substituenty na benzenovém jádře a při 220 nm benzenoidními strukturami. Absorpční koeficient  $E_{ET}/E_{Bz}$  je výrazně citlivý k přítomnosti polárních substituentů na aromatickém jádře a poskytuje informace o typu substituentů ve struktuře HL. Vypovídá o míře substituce aromatických struktur kyslíkatými funkčními skupinami, jako jsou karboxylové  $-\text{COOH}$ , karbonylové  $\text{C}=\text{O}$  nebo fenolické  $-\text{OH}$  [66]. Vzorek FK byl charakterizován nižší hodnotou koeficientu  $E_{ET}/E_{Bz}$ , což vypovídá o tom, že tento vzorek obsahuje více alifatických substituentů.

Při porovnávání zkoumaných vzorků HK, FK a HU lze říci, že vzorek FK má aromatická jádra více substituovaná hydrofobními skupinami. Naopak vzorky HK a HU jsou charakterizovány vyšší mírou substituce aromatického jádra polárními funkčními skupinami.

#### 4.5 Infračervená spektrometrie HL

Ve spektru vzorků HK, FK a HU, které je zobrazeno na Obrázku 13 se v rozmezí vlnočtu 3670–3100  $\text{cm}^{-1}$  nachází široký a intenzivní pás s maximem 3180  $\text{cm}^{-1}$  u vzorku FK, který odpovídá valenční symetrické vibraci O–H a N–H vazeb v karboxylových kyselinách, či sekundárních amidech a alifatických alkoholech a fenolech, resp. polyfenolech, které jsou stavebními jednotkami odvozenými od ligninu. Tyto stavební jednotky vznikají v průběhu geneze HK. Vzorek HU v tomto rozmezí vlnočtů obsahuje specifický pás při 3620  $\text{cm}^{-1}$ , který je připisován valenčním vibracím O–H vazeb v krystalové mřížce kaolinitu nebo montmorillonitu. V oblasti vlnočtů u vzorku FK 2942  $\text{cm}^{-1}$  a u HU v 2927  $\text{cm}^{-1}$  je přítomen méně intenzivní pás odpovídající asymetrické valenční vibraci C–H vazeb v  $-\text{CH}_2-$ . U vzorku FK byl charakterizován absorpční pás v 2977  $\text{cm}^{-1}$ , který připadá valenční asymetrické vibraci C–H vazeb v methylových funkčních skupinách. Vzorek FK obsahuje absorpční pás při 2946  $\text{cm}^{-1}$ , který je přisuzován asymetrické vibraci C–H vazeb v  $-\text{CH}_2-$  funkčních skupinách. U vzorku HK a HU je tento absorpční pás lokalizován v oblasti 2930  $\text{cm}^{-1}$ , resp. 2923  $\text{cm}^{-1}$ . U vzorku HU si lze povšimnout absorpčního pásu při 2854  $\text{cm}^{-1}$ , který odpovídá symetrické vibraci C–H vazeb v methylenových funkčních skupinách.



Obrázek 13: Normalizovaná DRIFT spektra HL

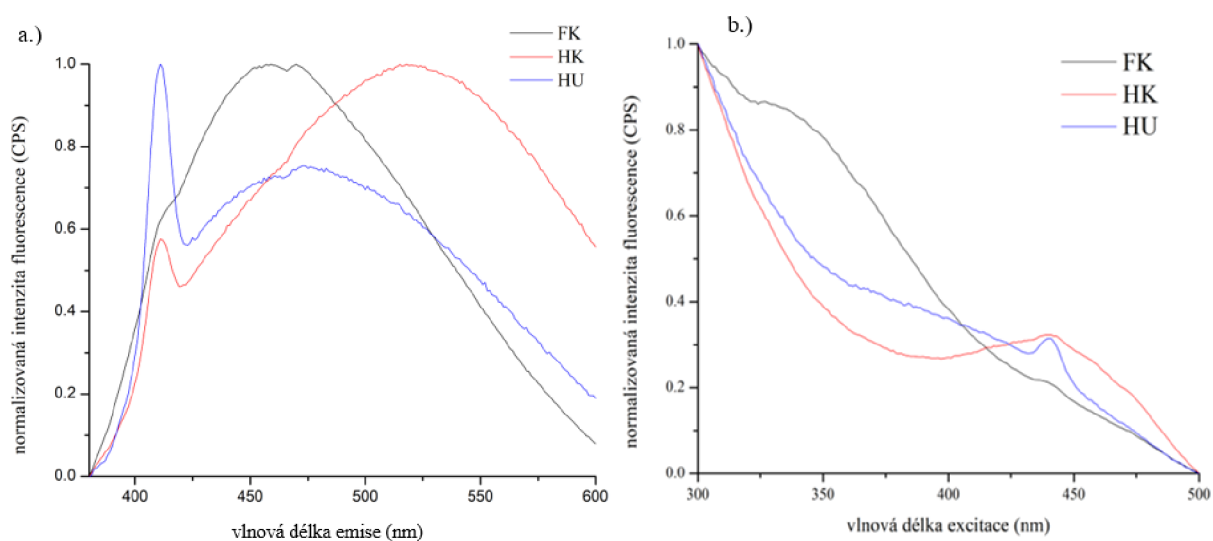
Přítomnost karboxylu  $\text{COO}^-$  ve vzorku FK byla v infračerveném spektru potvrzená méně intenzivním absorpčním pásem v  $1410\text{ cm}^{-1}$  a nepatrným absorpčním pásem ve vzorku HK ve  $1360\text{ cm}^{-1}$ , které je připisované deformační vibraci C–H vazeb v methylových skupinách. Ostrý a velmi intenzivní absorpční pás lokalizovaný při  $1720\text{ cm}^{-1}$  u HK a FK ( $1716\text{ cm}^{-1}$  u HU) odpovídá valenční symetrické vibraci C=O vazeb v karboxylových kyselinách substituovaných na aromátech. Tento absorpční pás je nejvíce intenzivní v případě FK. Proto se můžeme domnívat, že tento vzorek obsahuje více  $-\text{COOH}$  funkčních skupin na rozdíl od HK a HU. Přítomnost karboxylových skupin byla také potvrzena intenzivním a širokým absorpčním pásem při  $2600\text{ cm}^{-1}$ , který odpovídá valenční symetrické vibraci O–H–O vazeb tvořící v struktuře HL dimerní formy karboxylových skupin. Dále ve spektru FK můžeme najít absorpční pás při  $1403\text{ cm}^{-1}$ , který odpovídá valenční symetrické vibraci karboxylátového aniontu.

Ve vzorcích HL byl v jejich DRIFT spektrech lokalizovaný absorpční pás při  $1220$ , resp.  $1234\text{ cm}^{-1}$  u FK a HK a  $1100\text{ cm}^{-1}$  u HU, který je přisuzovaný valenční symetrické vibraci Si–O vazeb v silikátech nebo valenční vibraci C–O v primárních alkoholech. Do úvahy přichází i C–O–C valenční vibrace aryl-etherů. Ostrý a různě intenzivní absorpční pás v  $1600\text{ cm}^{-1}$  u vzorků HK je připisovaný výhradně valenční symetrické vibraci C=C vazeb v aromatických jednotkách HL. V případě vzorku HU s absorpčním pásem v  $1600\text{ cm}^{-1}$  se však jedná o valenční vibraci C=O sekundárních amidů  $-\text{NH}-\text{CO}-$ . V případě všech vzorků HL byl v jejich DRIFT spektrech identifikovaný absorpční pás při  $1040\text{ cm}^{-1}$  ( $1080\text{ cm}^{-1}$  v případě FK), který je spojený s valenční vibrací C–O v primárních alkoholech. Vzorek HU dále obsahuje dvojici absorpčních pásů v oblastech při  $1457$  a  $1365\text{ cm}^{-1}$ . Absorpční pás v oblasti  $1457\text{ cm}^{-1}$  odpovídá deformačním vibracím C–H vazeb v methylenových ( $-\text{CH}_2-$ ) a methylových ( $-\text{CH}_3$ ) funkčních skupinách, zatímco absorpční pás v oblasti  $1365\text{ cm}^{-1}$  je přisuzován pouze deformačním vibracím v methylových ( $-\text{CH}_3$ ) skupinách. Vzorek FK také obsahuje absorpční pás při  $1076\text{ cm}^{-1}$ , který je připisován valenční symetrické vibraci C–O–C a valenční symetrické vibraci C–O vazeb v alifatických etherech a sekundárních alkoholech. V oblasti deformačních vibrací aromatických C–H vazeb si lze u vzorku HK povšimnout absorpčního pásu v oblasti  $800-780\text{ cm}^{-1}$ , který je pokládán za indikátor *ortho*-substituovaných aromatických sloučenin. V této oblasti se u vzorku HU také nachází absorpční koeficient při  $810$ , který odpovídá *ortho*-substituovaným aromatickým sloučeninám. Méně výrazný absorpční pás lokalizovaný v oblasti  $3100-3000\text{ cm}^{-1}$  odpovídá valenční symetrické vibraci C–H vazeb v aromátech (HK a FK).

#### 4.6 Fluorescenční spektrometrie HL

Ustálená fluorescenční spektrometrie (steady-state) je považována za jednu z důležitých instrumentálních technik, které se využívají k charakterizaci HL, DOM, hDOM atd. Pomocí této metody lze získat informace o původu, obsahu jednotlivých strukturních jednotek a o stupni aromaticity. Jednou ze základních metod, kterou lze HL a DOM charakterizovat je změření jejich emisních a excitačních spekter.

Po korekci IFE (Inner filter effect) byly získány emisní a excitační spektra HL, které jsou zobrazeny na Obrázku 14. Obecně lze konstatovat, že emise v kratších vlnových délkách je specifická pro jednoduché aromatické struktury a nižší molekulové hmotnosti organických strukturních jednotek. Posun maxima fluorescence naopak k vyšším vlnovým délkám znamená, že se ve spektru nacházejí kondenzované aromatické struktury s vyšší mírou substituce elektron-donorními skupinami, jako jsou karbonyl obsahující konstituční jednotky, –OR, –OH, –NH<sub>2</sub> atd. [67]. Maximum emisního spektra v oblasti 340–430 nm je spojováno s přítomností tří anebo čtyř aromatických jader nacházejících se na strukturní jednotce. V případě terestriálních HL může dojít u určitých maxim ještě k bathochromnímu posunu [56, 69].



Obrázek 14: Spektra huminových látek: a.) emisní; b.) excitační

Jak je patrné z Obrázku 14, studované vzorky vykazují typická fluorescenční maxima huminových látek a DOM izolovaných z terestriálních přírodních matric. Mnozí autoři pokládají tyto fluofory za indukátory molekulové hmotnosti a stupně humifikace. Máme na mysli především ty fluofory, které se nacházejí v oblasti vyšších vlnových délek emise (450–520 nm). Tato skupina fluorescenčních maxim má zpravidla původ v tzv. *fulvic-like* fluoforu a *marine-like* fluoforu, který je některými autory považován za prekurzor *humic-like* fluoforu.

V emisním spektru vzorku HK (Obrázek 14 a.)) bylo lokalizováno fluorescenční maximum při 520 nm, které je tradičně připisováno fluoforu C (*humic-like*). Tento fluofor je typický pro HL izolované z různých přírodních matric, kam jsou zpravidla řazeny kaustobiolity, půdní matrice, sedimenty a řeky a jezera. U vzorku FK bylo toto maximum u 460 nm. Při porovnání spekter HK, FK a HU můžeme říci, že v případě vzorku FK byl fluofor *humic-like* lokalizován při kratších vlnových délkách emise než u vzorku HK. Lze konstatovat, že kratší emisní vlnové délky ve spektrech charakterizují daný vzorek nižším stupněm aromaticity a také nižší molekulovou hmotností. Naopak vyšší vlnové délky a nižší intenzity fluorescence  $I_F$ , jako u vzorku HK, vypovídají o tom, že je daný vzorek charakterizován přítomností kondenzovaných aromatických strukturních jednotek a elektron-donorních substituentů, především substituentů obsahujících hydroxylové a karboxylové funkční skupiny.

V Tabulce 7 jsou uvedeny vypočtené fluorescenční koeficienty. Koeficienty *FI* a *BIX* naznačují, že HL v této diplomové práci jsou terestriálního a alochtonního původu. Dle Senesioho [67] vyšší hodnota *FI* a posunuté fluorescenční maximum ke kratším vlnovým délkám vypovídá o jednodušší struktuře systému s méně kondenzovanými aromatickými jádry nebo o slabší konjugaci v alifatických řetězcích. Můžeme tedy říci, že HK, která má nejnižší hodnoty koeficientů *FI* a *BIX*, má nejvyšší stupeň aromaticity, což je v dobré shodě s výsledky z elementární analýzy.

Míru humifikace vyjadřuje index *HIX* a *Milori*. Koeficienty také vypovídají o množství strukturních jednotek odpovídajících fluoroforu *humic-like* a mikrobiálně derivovaných strukturních jednotek. Můžeme pozorovat, že nejvíce strukturních jednotek mikrobiálního původu obsahoval HU.

Tabulka 7: *Vypočítané fluorescenční koeficienty HL*

Vzorek	FI (-)	BIX (-)	HIX (-)	Milori $\times 10^5$ (-)
HK	0,72	0,31	10,6	39,60
FK	1,06	0,53	57,3	25,00
HU	0,95	0,41	15,3	3,96

Na základě výsledků lze konstatovat, že vzorek FK obsahuje vyšší množství hydroxylových a karboxylových funkčních skupin, což je v dobré shodě s elementární analýzou a UV/Vis spektrometrií. Vzorek HK je naproti tomu charakterizován vyšší molekulovou hmotností a vyšším stupněm aromaticity.

#### 4.7 Kvalitativní vyhodnocení TLC chromatografie

Pomocí TLC chromatografie bylo v této diplomové práci získáno u vzorku HK a FK pět zón, u vzorku HU 6 chromatografických zón, které odpovídají organickým frakcím nacházejících se v HL oxyhumolitu. Z jednotlivých chromatografických zón pozorovaných na TLC destičce (viz Obrázek 15) byly vypočteny náležité retardační faktory  $R_f$ . Chromatografické zóny vykazovaly světle hnědou barvu na silikagelu. Ty organické frakce, které se jeví jako bezbarvé, byly dále vizualizovány pomocí UV lampy (viz Obrázek 22 v kapitole Přílohy). Vypočtené retardační faktory jsou uvedeny v Tabulce 8, 9 a 10. Z naměřených výsledků a pozorování lze říci, že vzorek HU obsahuje takové organické frakce, které jsou slaběji poutány k adsorbentu TLC destičky, oproti ostatním dvěma frakcím. Také si můžeme povšimnout, že vzorky FK a HU obsahují frakce organických sloučenin, které mají velmi podobné hodnoty  $R_f$ . Z toho můžeme usuzovat, že tyto organické frakce mají podobné fyzikálně-chemické vlastnosti.

Tabulka 8: *Retardační faktory organických frakcí HK*

Organické frakce	HKEA	HKEB	HKEC	HKED	HKEE
$R_f$	0,04	0,19	0,34	0,49	1,00

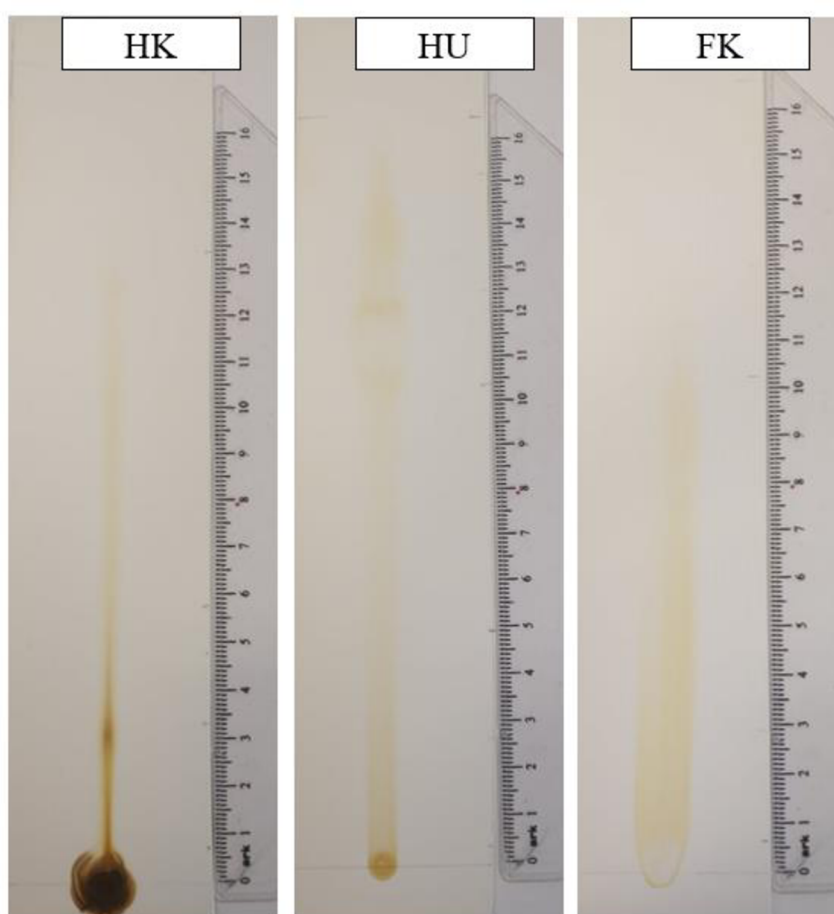


Tabulka 9: *Retardační faktory organických frakcí FK*

Organické frakce	FKEA	FKEB	FKEC	FKED	FKEE
R <sub>f</sub>	0,04	0,17	0,62	0,76	1,00

Tabulka 10: *Retardační faktory organických frakcí HU*

Organické frakce	HUEA	HUEB	HUEC	HUED	HUEE	HUEF
R <sub>f</sub>	0,02	0,29	0,62	0,74	0,90	1,00



Obrázek 15: *TLC chromatogramy organických frakcí HL oxyhumolitu*

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

UV/Vis spektrometrie a steady-state fluorescenční spektrometrie byla v této diplomové práci použita k výpočtu absorpčních koeficientů  $E_{ET}/E_{Bz}$ ,  $E_2/E_3$  a  $E_2/E_4$  jednotlivých organických frakcí HL oxyhumolitu, které byly získány díky chromatografii na tenké vrstvě. V Tabulce 11, 12 a 13 jsou uvedeny vypočítané absorpční koeficienty  $E_{ET}/E_{Bz}$ ,  $E_2/E_3$  a  $E_2/E_4$  pro jednotlivé frakce izolované ze vzorků HK, FK a HU.

Tabulka 11: *Vypočítané absorpční koeficienty pro HK*

Organická frakce	Absorpční koeficienty		
	$E_{ET}/E_{Bz}$	$E_2/E_3$	$E_2/E_4$
HKEA	0,85	3,00	8,00
HKEB	0,60	4,68	14,17
HKEC	0,52	5,53	17,00
HKED	0,50	4,87	11,36
HKEE	0,36	15,43	38,00

V naměřených UV/Vis spektrech (viz Obrázek 23 a 24) nebyly pozorovány žádné výrazné spektrální rysy. Absorpční spektra všech organických frakcí byla charakterizována bez jakýkoliv viditelných absorpčních maxim. Nicméně u některých frakcí byl průběh jejich UV/Vis spekter ovlivněn více či méně výraznými raménky, a to nejčastěji v oblasti vlnových délek 220–300 nm, kde se majoritně projevuje absorpce rozličně substituovaných aromátů. Naměřená UV/Vis spektra vzorků vykazovala kvaziexponenciální průběh, který je typický pro rozpuštěnou organickou hmotu. Všechny získané organické frakce absorbují výhradně v oblasti UVC a UVB ultrafialového záření. Z absorpce v této oblasti elektromagnetického záření vyplývá, že většina přítomných typů chromoforů obsahuje různě substituované aromatické struktury.

Tabulka 12: *Vypočítané absorpční koeficienty pro FK*

Organická frakce	Absorpční koeficienty		
	$E_{ET}/E_{Bz}$	$E_2/E_3$	$E_2/E_4$
FKEA	0,48	17,00	27,00
FKEB	0,60	8,42	53,33
FKEC	0,59	9,64	64,11
FKED	0,52	13,47	44,33
FKEE	0,40	21,80	–

Získané hodnoty absorpčních koeficientů pro organické frakce izolovaných z HK jsou zobrazeny v Tabulce 11. Z výsledků lze vidět, že se absorpční koeficient  $E_{ET}/E_{Bz}$  pohyboval v oblasti 0,36–0,85. Nejnižších hodnot dosahoval tento absorpční koeficient u organických frakcí HKED a HKEE, což znamená, že tyto získané frakce byly charakterizovány nižší mírou substituce aromatického jádra funkčními skupinami jako skupiny karboxylové, karbonylové a hydroxylové. Naproti tomu frakce HKEA a HKEB dosahovaly nejvyšších hodnot koeficientu  $E_{ET}/E_{Bz}$ , z čehož vyplývá, že míra substituce aromatického jádra kyslík obsahujícími funkčními skupinami byla vyšší. To znamená, že tyto organické frakce byly charakterizovány vyšší polaritou v porovnání s frakcemi, které byly eluovány nejrychleji. Nízké hodnoty koeficientu  $E_{ET}/E_{Bz}$  mohou znamenat vyšší substituci aromatických struktur nepolárními funkčními skupinami nebo alifatickými řetězci. Absorpční koeficienty  $E_2/E_3$  a  $E_2/E_4$  se pohybovaly v případě frakcí izolovaných z HK v rozmezí 3,0–15,4 resp. 8,0–38,0. Z Tabulky 11 je patrné, že nejvyšší molekulovou hmotností a aromaticitou byla charakterizována organické frakce HKEA, která se nachází v blízkosti startovní čáry TLC

chromatogramu. Naopak frakce nacházející se na konci TLC destičky jsou charakterizovány nízkou molekulovou hmotností a jsou oproti ostatním frakcím více alifatické.

Absorpční koeficient  $E_{ET}/E_{Bz}$  organické frakce FK měl nejvyšší hodnotu u frakce FKEB, která se nachází v blízkosti startu TLC destičky. Tato organická frakce byla charakterizována nejvyšší mírou substituce aromatického jádra polárními skupinami. Organické frakce nacházející se na konci resp. čelu TLC chromatogramu (FKED, FKEE) naopak obsahovaly větší množství aromatických struktur, které byly substituovány nepolárními skupinami, například methylové ( $-CH_3$ ) skupiny. Hodnoty absorpčních koeficientů  $E_2/E_3$  a  $E_2/E_4$  se pohybovaly u organických frakcí izolovaných z FK v rozmezí 8,4–21,8 resp. 27,0–64,1. Nejvyšší hodnoty absorpčních koeficientů měly frakce FKEC a FKEE, z čehož vyplývá, že tyto organické frakce mají nižší molekulovou hmotnost a jsou charakterizovány nižším stupněm aromaticity oproti ostatním frakcím. Nicméně je zapotřebí říci, že absorpční koeficient  $E_2/E_3$  je dle mnohých autorů více senzitivní pro odhad stupně aromaticity, než-li střední molekulové hmotnosti.

Tabulka 13: Vypočítané absorpční koeficienty pro HU

Organická frakce	Absorpční koeficienty		
	$E_{ET}/E_{Bz}$	$E_2/E_3$	$E_2/E_4$
HUEA	0,67	6,80	13,50
HUEB	0,51	5,20	16,80
HUEC	0,43	5,47	12,33
HUED	0,49	5,81	14,20
HUEE	0,41	9,78	20,67
HUEF	0,34	34,00	–

V případě organických frakcí nerozpustného huminu můžeme vidět, že hodnota absorpčního koeficientu  $E_{ET}/E_{Bz}$  klesá s rostoucí vzdáleností od startu TLC destičky, resp. s rostoucím retardačním faktorem. Z toho vyplývá, že organické frakce, které byly na destičce nejrychleji eluovány, jsou charakterizovány nižší polaritou, a proto nižší substituací aromatického jádra kyslík obsahujícími funkčními skupinami, jako jsou karboxylové, karbonylové a hydroxylové. Absorpční koeficienty  $E_2/E_3$  a  $E_2/E_4$  nabývaly hodnot od 5,2–34,0 resp. 12,3–20,7 a vykazovaly zvyšující se trend v závislosti s rostoucím retardačním faktorem  $R_f$ . Na základě těchto poznatků můžeme říci, že organické frakce izolované z HU, které se nacházejí v blízkosti startovní čáry TLC destičky, jsou charakterizovány vyšší střední molekulovou hmotností a vyšším stupněm aromaticity. Při pohledu na rozpětí hodnot absorpčních koeficientů  $E_2/E_3$  a  $E_2/E_4$  lze konstatovat, že vzorek HU byl charakterizován nejvyšší polydisperzitou konstitučních jednotek spoluvytvářejících supramolekuly, ze všech izolovaných HL.

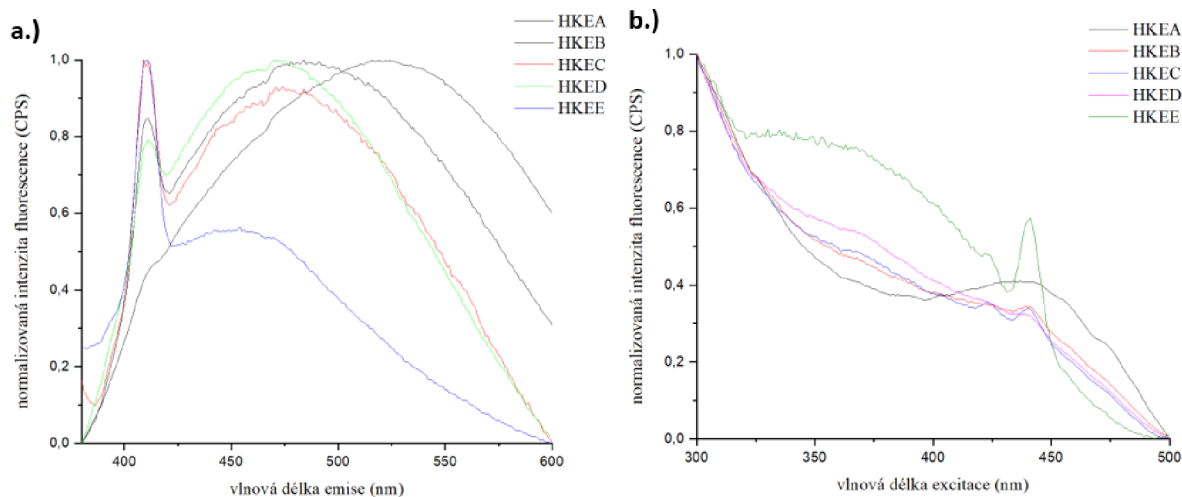
#### 4.9 Fluorescenční spektrometrie organických frakcí HL

Všechny organické frakce HL, získané pomocí TLC chromatografie, byly podrobeny základní charakterizaci pomocí steady-state fluorescenční spektrometrie. Excitační a emisní spektra frakcí HK, FK a HU jsou uvedeny na Obrázku 16, 17 a 18.

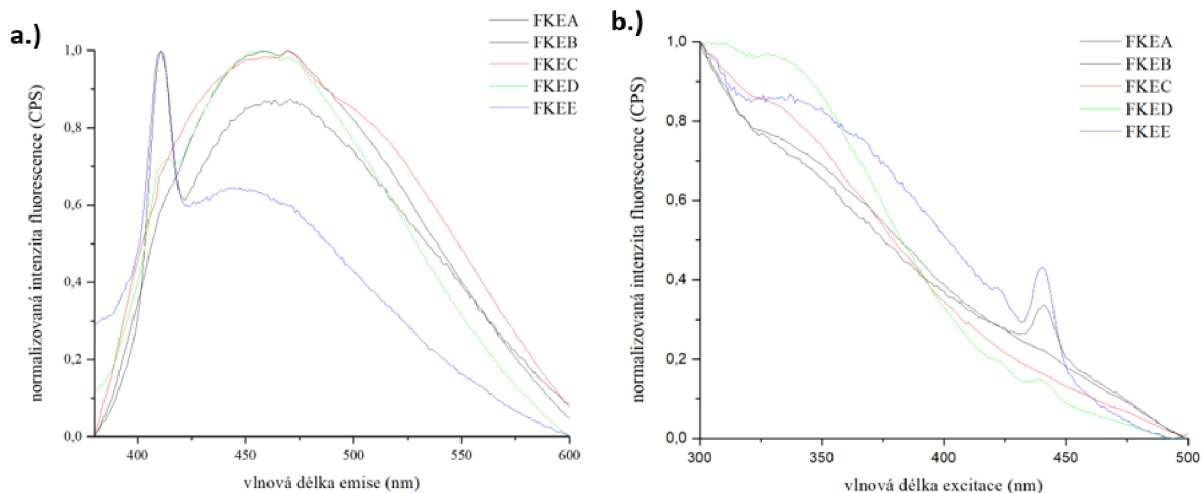
Jak lze pozorovat ve spektrech, HL obsahují fluorofory typické pro kaustobiolity jako jsou lignit, rašelina, leonardit a půdní organická hmota. Spektra HK obsahují charakteristická fluorescenční maxima při 523 nm u frakce HKEA a 480 nm a méně u ostatních frakcí HK, které mají zpravidla původ v tzv. *humic-like* fluoroforech. Podle [69] v důsledku přítomnosti vyššího obsahu funkčních skupin jako  $-NH_2$ ,  $C=O$ ,  $-OR$  a  $-OH$ , dochází k bathochromnímu (červenému) posunu k delším vlnovým délkám. Hypsochromní posun je spojován s přítomností jednodušších struktur s nižším obsahem aromatických jader a alifatických řetězců s konjugovaným systémem dvojných vazeb. Na základě těchto poznatků můžeme konstatovat, že s rostoucí eluční rychlostí na TLC destičce dochází ke snížení obsahu funkčních skupin a snížená intenzita fluorescence je spojována s vyšším obsahem elektron-akceptorních funkčních skupin.

V emisních spektrech organických frakcí HK, FK, a HU si lze povšimnout, že s rostoucí eluční rychlostí na TLC destičce dochází k výraznému modrému posunu fluorescenčního maxima v případě fluoroforů *humic-like*. To je způsobeno pravděpodobně nižším obsahem aromatických strukturních jednotek (snížení  $\pi$ -elektronového systému) či snížením obsahu konjugovaných dvojných vazeb způsobeném konverzí kondenzovaných aromatických struktur na nelineární, strukturně jednodušší systémy.

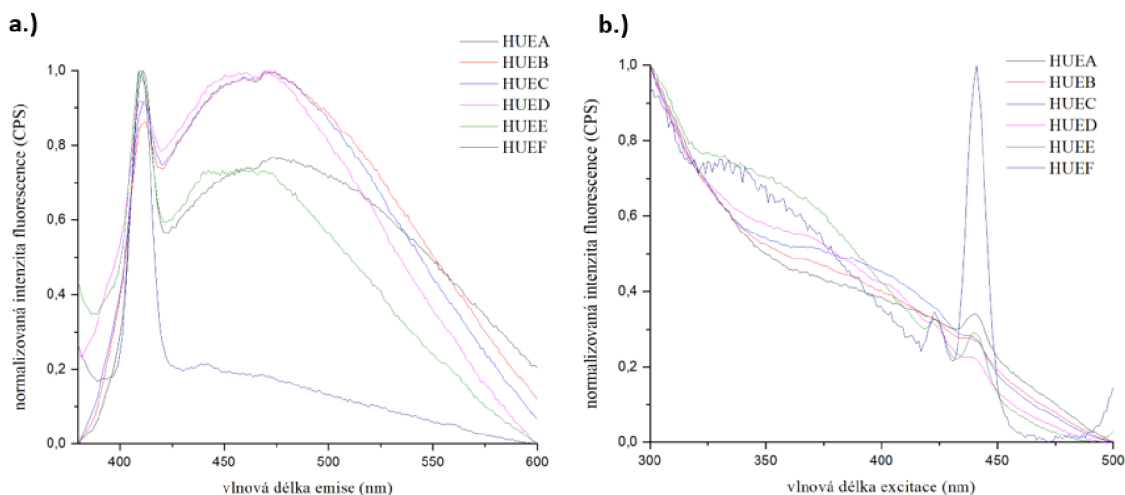
Obecně můžeme konstatovat, že s rostoucím retardačním faktorem  $R_f$  organických frakcí dochází ke snížení jejich střední molekulové hmotnosti, která je v přímé uměrnosti s počtem aromatických strukturních jednotek a dochází také k poklesu intenzity fluorescence. To je v dobré shodě s výsledky UV/Vis spektrometrií, kde dochází k poklesu hodnoty  $E_{ET}/E_{BZ}$ .



Obrázek 16: *Spektra jednotlivých frakcí HK (a. emisní; b. excitační)*



Obrázek 17: *Spektra jednotlivých frakcí FK (a. emisní; b. excitační)*



Obrázek 18: *Spektra jednotlivých frakcí HU (a. emisní; b. excitační)*

Jako v kapitole 4.6 byly i zde vypočítané fluorescenční koeficienty, které jsou uvedeny v Tabulce 14, 15 a 16. Koeficienty *FI* a *BIX* rostou se vzdáleností od startu TLC destičky, což vypovídá o tom, že s rostoucím retardačním faktorem  $R_f$  dochází k poklesu aromaticity a střední molekulové hmotnosti. Fluorescenční indexy *HIX* a *Milori*, vyjadřující míru humifikace, klesají se rostoucí eluční rychlostí. Z těchto poznatků můžeme vyvodit, že organické frakce nacházející se u čela TLC destičky mají nejnižší obsah aromátů ve struktuře. Koeficienty také vypovídají o množství strukturních jednotek odpovídající fluoroforům *humic-like* a *fulvic-like*, ale také o mikrobiálně derivovaných strukturních jednotek tzn. *tyrosin-like* a *tryptofan-like*. Můžeme pozorovat, že frakce *HKEE*, *FKEE*, *HUEE* a *HUEF* obsahují nejvíce těchto strukturních jednotek. Naopak frakce nacházející se na startu TLC destičky (*HKEA*, *FKEB*, *FKEC* a *HUEB*) byly charakterizovány strukturními jednotkami, které jsou více humifikované, jako jsou například chinony, které značně ovlivňují intenzitu fluorescence.

Tabulka 14: *Vypočítané fluorescenční koeficienty HK*

<b>Vzorek</b>	<b>FI (-)</b>	<b>BIX (-)</b>	<b>HIX (-)</b>	<b>Milori (-)</b>
HKEA	0,76	0,31	88,3	$1,60 \times 10^7$
HKEB	0,87	0,48	23,2	$1,49 \times 10^6$
HKEC	0,94	0,67	18,2	$6,01 \times 10^5$
HKED	0,94	0,64	524	$2,03 \times 10^6$
HKEE	1,23	1,01	13,1	$2,44 \times 10^4$

Tabulka 15: *Vypočítané fluorescenční koeficienty FK*

<b>Vzorek</b>	<b>FI (-)</b>	<b>BIX (-)</b>	<b>HIX (-)</b>	<b>Milori (-)</b>
FKEA	1,03	0,46	16,3	$3,69 \times 10^4$
FKEB	1,08	0,49	276,0	$4,28 \times 10^6$
FKEC	1,05	0,59	227,1	$1,26 \times 10^7$
FKED	1,11	0,54	26,4	$5,82 \times 10^5$
FKEE	1,08	0,94	1,28	$4,90 \times 10^4$

Tabulka 16: *Vypočítané fluorescenční koeficienty HU*

<b>Vzorek</b>	<b>FI (-)</b>	<b>BIX (-)</b>	<b>HIX (-)</b>	<b>Milori (-)</b>
HUEA	0,94	0,40	21,6	$3,69 \times 10^5$
HUEB	1,00	0,53	46,3	$1,18 \times 10^6$
HUEC	1,00	0,57	28,9	$1,13 \times 10^6$
HUED	1,08	0,70	18,2	$8,45 \times 10^5$
HUEE	1,14	0,94	$2,18 \times 10^{-1}$	$1,46 \times 10^5$
HUEF	1,28	1,07	$1,69 \times 10^{-2}$	$7,27 \times 10^4$

## 5 ZÁVĚR

Tato diplomová práce se zabývá detailní charakterizací struktury HL. Především se zaměřuje na jednotlivé frakce HK, FK a HU, které byly frakcionovány pomocí metody tenkovrstevné chromatografie (TLC) a jejich fyzikálně-chemických vlastností. Vzorky HL použité v této práci byly izolovány ze vzorku oxyhumolitu na základě postupu Mezinárodní společnosti pro výzkum huminových látek (IHSS). Fyzikálně-chemická charakterizace byla provedena nejdříve u nativního oxyhumolitu za využití elementární analýzy (EA), termogravimetrie (TGA) a infračervené spektrometrie s Fourierovou transformací (FTIR). Huminové látky, získané z oxyhumolitu, byly poté charakterizovány termickými metodami jako je elementární (EA) a termogravimetrická analýza (TGA), dále molekulovou absorpční spektrometrií v ultrafialové a viditelné oblasti elektromagnetického záření (UV/Vis), infračervenou spektrometrií s Fourierovou transformací (FTIR) a fluorescenční spektrometrie v ustáleném stavu. Jednotlivé frakce HK, FK a HU získané metodou TLC byly dále charakterizovány pomocí metod molekulové absorpční spektrometrie (UV/Vis) a steady-state fluorescenční spektrometrie.

Elementární a termogravimetrickou analýzou bylo potvrzeno, že oxyhumolit je přírodní matrice tvořena převážně uhlíkem, vodíkem, kyslíkem a minoritně dusíkem. Bylo zjištěno, že oxyhumolit po extrakci je tvořen vyšším obsahem kyslíku, který je převážně vázán s obsahem funkčních skupin, jako jsou karboxylové a fenolické skupiny, které pocházejí z polysacharidů. Nativní oxyhumolit, který má nižší hodnotu atomového poměru O/C, má nižší obsah karboxylových a fenolických funkčních skupin. Termogravimetrickou analýzou bylo zjištěno, že nativní oxyhumolit obsahuje menší množství popela oproti oxyhumolitu po extrakci, což znamená, že obsahuje menší množství anorganických příměsí.

Elementární analýza HL potvrdila, že HL jsou tvořeny převážně uhlíkem, vodíkem a kyslíkem a minoritně dusíkem. Síra byla detekována pouze u vzorku FK, což znamená, že vzorek FK má ve své struktuře vyšší zastoupení hydrofilních sulfonových skupin. Z atomových poměrů bylo prokázáno, že vzorek HK je charakterizován vyšší mírou aromaticity a dehydrogenace v porovnání s ostatními dvěma vzorky a že vzorek FK obsahoval větší množství kyslík obsahujících funkčních skupin oproti HK a HU. Bylo zjištěno, že HK měla vyšší čistotu oproti FK a HU (1,52 hm. % u HK). Vyšší obsah popela ve vzorku FK byl pravděpodobně způsoben vynecháním purifikace izolovaných FK za použití směsi HCl a HF. UV/Vis spektrometrie byla použita k výpočtům absorpčního koeficientu a humifikačního indexu. Bylo zjištěno, že vzorek HK byl charakterizován vyšším stupněm humifikace a také vyšší molekulovou hmotností. Vzorky HK a HU byly charakterizovány vyšší mírou substituce aromatického jádra polárními funkčními skupinami. Pomocí infračervené spektrometrie bylo zjištěno, že FK obsahovala na rozdíl od HK a HU nejvíce karboxylových funkčních skupin, což bylo prokázáno absorpčním pásem při  $1720\text{ cm}^{-1}$ . Fluorescenční spektrometrií bylo zjištěno, že vzorek HK měl nejvyšší stupeň kondenzace aromatického jádra a nejvyšší obsah strukturních jednotek s konjugovaným systémem dvojných vazeb.

Zóny jednotlivých organických frakcí nacházejících se v HL byly použity k výpočtu příslušných retardačních faktorů  $R_f$ . Nízké hodnoty retardačních faktorů vypovídají o tom, že HU obsahuje takové organické frakce, které jsou slaběji poutány k adsorbentu TLC destičky oproti ostatním dvěma frakcím. Také bylo zjištěno, že z některé organické frakce měly velmi podobné hodnoty  $R_f$ , což by mohlo znamenat, že mají podobné fyzikálně-chemické vlastnosti.

UV/Vis spektrometrií organických frakcí HL bylo zjištěno, že míra substituce aromatických struktur polárními funkčními skupinami klesala s rostoucím retardačním faktorem  $R_f$  jednotlivých organických frakcí. Z výsledků bylo zřejmé, že nejvyšší aromaticitou a molekulovou hmotností byly charakterizovány organické frakce nacházející se u startovní čáry TLC destičky. Naopak frakce nacházející se na konci TLC chromatogramu byly charakterizovány nízkou molekulovou hmotností a byly oproti ostatním frakcím více alifatické. Vzorek HU byl charakterizován nejvyšší polydisperzitou konstitučních jednotek spoluvytvářejících supramolekulární asociáty, ze všech izolovaných HL. Během měření fluorescenčních spekter vykazovaly všechny studované vzorky odpovídající fluorescenční maxima HL izolovaných z terestriálních přírodních matric. Na základě naměřených výsledků bylo zjištěno, že s rostoucí eluční rychlostí na TLC destičce dochází v případě *humic-like* fluoroforu k výraznému modrému posunu fluorescenčního maxima, což bylo pravděpodobně způsobeno nižším obsahem aromatických strukturních jednotek anebo snížením obsahu konjugovaných dvojných vazeb. Obecně lze konstatovat, že s rostoucím retardačním faktorem  $R_f$  frakcí docházelo k snížení jejich střední molekulové hmotnosti.

Díky této diplomové práci bylo zjištěno, že metoda chromatografie na tenké vrstvě je vhodná metoda pro frakcionaci, separaci i vizualizaci biokoloidních látek resp. huminových látek. Pomocí metody tenkovrstvé chromatografie došlo ke snížení molekulové heterogenity studovaných HL a jejich struktura a vlastnosti mohly být podrobně studovány.



## 6 LITERATURA

- [1] STEVENSON, F. J. Humus chemistry: genesis, composition, reactions. 2nd ed. New York: Wiley, 1994. ISBN 978-0-471-59474-1.
- [2] Huminové látky. *Envi Produkt* [online]. Envi Produkt, 2022 [cit. 2022-04-28]. Dostupné z: <https://www.enviprodukt.cz/huminove-latky>
- [3] ROUBÍČEK, Václav. Uhlí: zdroje, procesy, užití. Ostrava: Montanex, 2002. Odborné publikace. ISBN 80-722-5063-9.
- [4] ROUBÍČEK, Václav a Jaroslav BUCHTELE. Chemie uhlí a jeho využití. Ostrava: VŠB-Technická univerzita, 1996. ISBN 80-707-8406-7.
- [5] Uhlí. Geologická encyklopedie [online]. Prof. Jan Petránek, RNDr. Jaroslav Synek [cit. 2022-02-22]. Dostupné z: <http://www.geology.cz/aplikace/encyklopedie/term.pl?uhli>
- [6] DOPITA, Miloslav, Václav HAVLENA a Jiří PEŠEK. Ložiska fosilních paliv: celostátní vysokoškolská příručka pro studenty přírodovědeckých fakult skupiny oborů geologické vědy. Praha: Státní nakladatelství technické literatury, 1985.
- [7] Chaudhuri, S. N. (2016). Coalification. Encyclopedia of Mineral and Energy Policy, 1–2. doi:10.1007/978-3-642-40871-7\_92-1
- [8] MAJZLÍKOVÁ, P. Neenergetické aplikace lignitu. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2014. 131 s. Vedoucí disertační práce prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
- [9] HUBÁČEK, Josef. Chemie uhlí. 1. vyd. Praha: Státní nakladatelství technické literatury, 1962.
- [10] POUDEL, Jeeban, Sujeeta KARKI a Sea OH. Valorization of Waste Wood as a Solid Fuel by Torrefaction. *Energies* [online]. 2018, 11(7) [cit. 2022-04-26]. ISSN 1996-1073.
- [11] Humatex: Oxyhumolit [online]. [cit. 2021-6-6].
- [12] Humatex: Oxyhumolit. Carbounion [online]. [cit. 2021-6-6]. Dostupné z: <https://www.carbounion.cz/humatex>
- [13] VESELÁ, Lenka.; Martin KUBAL, Josef KOZLER a Petra INNEMANOVA: Struktura a vlastnosti přírodních huminových látek typu oxihumolitu. *Chem Listy* 99, 711-717, (2005)
- [14] CHLEBKOVÁ, Eva, Jiří SEDLÁČEK a Jan ŠMÍD. Způsob odstraňování sloučenin kovů z vodných roztoků. 277795. Uděleno 24.02.1993. Zapsáno 29.03.1991.
- [15] KHAN, S., M. SCHNITZER, ed. Developments in Soil Science 8: SOIL ORGANIC MATTER. First edition. New York: Elsevier science publishing company inc., 1978.
- [16] PITTEK, Pavel. Hydrochemie. 3. přeprac. vyd. Praha: Vydavatelství VŠCHT, 1999. ISBN 80-708-0340-1.
- [17] PIVOKONSKÝ, Martin, Lenka PIVOKONSKÁ, Petra BUBÁKOVÁ a Václav JANDA. Úprava vody s obsahem huminových látek. *Chem. Listy* 104. 1015-1022(2010).
- [18] WAKSMAN, S. A. (1936). Humus; origin, chemical composition, and importance in nature. Baltimore, The Williams & Wilkins Company.

- [19] STEVENSON, F. J. Gross Chemical Fractionation of Organic Matter. *Methods of Soil Analysis* [online]. Madison, WI, USA: American Society of Agronomy, Soil Science Society of America, 1965, 2016-12-12, 1409-1421 [cit. 2022-04-26]. Agronomy Monographs. ISBN 9780891182047. Dostupné z: doi:10.2134/agronmonogr9.2.c43
- [20] SAAR, Robert A. a James H. WEBER. *Fulvic acid: modifier of metal-ion chemistry* [online]. 1982, **16**(9), 510A-517A [cit. 2022-04-26]. ISSN 0013-936X. Dostupné z: doi:10.1021/es00103a723
- [21] INTERNATIONAL HUMIC SUBSTANCES SOCIETY (IHSS): O huminových látkách [online]. [cit. 2021-6-7]. Dostupné z: <http://ihss-cz.cz/o-huminovych-latkach.html>
- [22] SKOKANOVÁ, Martina a Katarína DERCOVÁ. HUMÍNOVÉ KYSELINY. POVOD A ŠTRUKTÚRA. *Chemické listy*. 2008, 102(4), 262268. ISSN 1213-7103.
- [23] JANDÁK, Jiří, Eduard POKORNÝ a Alois PRAX. *Půdoznalství*. 2., přeprac. vyd. Brno: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita, 2007. ISBN 978-80-7375-061-9.
- [24] GRIMALT, J.O. a C. SAIZ-JIMENEZ. Lipids of soil humic acids. I. The humatomelanic acid fraction. *Science of The Total Environment* [online]. 1989, **81-82**, 409-420 [cit. 2022-04-27]. ISSN 00489697. Dostupné z: doi:10.1016/0048-9697(89)90149-6
- [25] Soil Humic Substances [online]. [cit. 2022-04-27]. Dostupné z: <http://karnet.up.wroc.pl/~weber/humic.htm#start>
- [26] SCHULTEN, H. -R. a M. SCHNITZER. Three-dimensional models for humic acids and soil organic matter. *Naturwissenschaften* [online]. 1995, **82**(11), 487-498 [cit. 2022-04-29]. ISSN 0028-1042. Dostupné z: doi:10.1007/BF01134484
- [27] STEINBÜCHEL, A a M HOFRICHTER. *Biopolymers. Volume 1, Lignin, humic substances and coal*. Weinheim: Wiley-VCH, 2001, 513 s. ISBN 3-527-30220-4.
- [28] STEINBERG, C. *Ecology of Humic Substances in Freshwaters: Determinants from Geochemistry to Ecological Niches*. 1. Ed. Berlin: Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2003, 440 s. ISBN 978-3-662-06815-1.
- [29] PÉDROT, Mathieu, Aline DIA a Mélanie DAVRANCHE. Dynamic structure of humic substances: Rare earth elements as a fingerprint. *Journal of Colloid and Interface Science* [online]. 2010, **345**(2), 206-213 [cit. 2022-04-29]. ISSN 00219797. Dostupné z: doi:10.1016/j.jcis.2010.01.069
- [30] PICCOLO, A., S. NARDI a G. CONCHERI. Micelle-like conformation of humic substances as revealed by size exclusion chromatography. *Chemosphere* [online]. 1996, **33**(4), 595-602 [cit. 2022-04-29]. ISSN 00456535. Dostupné z: doi:10.1016/0045-6535(96)00210-X
- [31] FLAIG, W. *Chemie der humusstoffe*. *Acta chem. fenn. A*, 1960, 33: 229-251.
- [32] AL-FAIYZ, Yasair S.S. CPMAS 13 C NMR characterization of humic acids from composted agricultural Saudi waste. *Arabian Journal of Chemistry* [online]. 2017, **10**, S839-S853 [cit. 2022-04-29]. ISSN 18785352. Dostupné z: doi:10.1016/j.arabjc.2012.12.018
- [33] TAN, K. H. *Principles of soil chemistry*. 4th Ed. Boca Raton, Fla.: CRC Press, 2010, xxvii, 362 p. *Books in soils, plants, and the environment*. ISBN 978-143-9813-928.

- [34] PICCOLO, Alessandro. The supramolecular structure of humic substances: A novel understanding of humus chemistry and implications in soil science [online]. Elsevier, 2002, 2002, s. 57-134 [cit. 2022-04-29]. Advances in Agronomy. ISBN 9780120007936. Dostupné z: doi:10.1016/S0065-2113(02)75003-7
- [35] SIMPSON, André J., William L. KINGERY, Michael H. HAYES, et al. Molecular structures and associations of humic substances in the terrestrial environment. *Naturwissenschaften* [online]. 2002, 89(2), 84-88 [cit. 2022-04-29]. ISSN 0028-1042. Dostupné z: doi:10.1007/s00114-001-0293-8
- [36] PEÑA-MÉNDEZ, Eladia M., Josef HAVEL a Jiří PATOČKA. Humic substances - compounds of still unknown structure: applications in agriculture, industry, environment, and biomedicine. *Journal of Applied Biomedicine* [online]. 2005, 3(1), 13-24 [cit. 2022-04-28]. ISSN 1214021X. Dostupné z: doi:10.32725/jab.2005.002
- [37] SCHMEIDE, K., S. POMPE, M. BUBNER, K. H. HEISE, G. BERNHARD a Heino NITSCHE. Uranium(VI) sorption onto phyllite and selected minerals in the presence of humic acid. *Radiochimica Acta* [online]. 2000, 88(9-11), 723-728 [cit. 2022-04-29]. ISSN 2193-3405. Dostupné z: doi:10.1524/ract.2000.88.9-11.723
- [38] ERNY, Guillaume L., Bruna M. GONÇALVES a Valdemar I. ESTEVES. Immobilized humic substances and immobilized aggregates of humic substances as sorbent for solid phase extraction. *Journal of Chromatography A* [online]. 2013, 1306, 104-108 [cit. 2022-04-29]. ISSN 00219673. Dostupné z: doi:10.1016/j.chroma.2013.07.057
- [39] Isolation of IHSS Samples. *International Humic Substances Society* [online]. 2020 [cit. 2022-04-30]. Dostupné z: <https://humic-substances.org/isolation-of-ihss-samples/>
- [40] KUWATSUKA, Shozo, Akira WATANABE, Kazuhito ITOH a Shigemitsu ARAI. Comparison of two methods of preparation of humic and fulvic acids, IHSS method and NAGOYA method. *Soil Science and Plant Nutrition* [online]. 1992, 38(1), 23-30 [cit. 2022-04-30]. ISSN 0038-0768. Dostupné z: doi:10.1080/00380768.1992.10416948
- [41] WANDER, Michelle. Soil Organic Matter Fractions and Their Relevance to Soil Function. MAGDOFF, Fred a Ray WEIL, ed. *Soil Organic Matter in Sustainable Agriculture* [online]. CRC Press, 2004, 2004-05-27 [cit. 2022-04-30]. Advances in Agroecology. ISBN 978-0-8493-1294-6. Dostupné z: doi:10.1201/9780203496374.ch3
- [42] NEBBIOSO, Antonio a Alessandro PICCOLO. Basis of a Humeomics Science: Chemical Fractionation and Molecular Characterization of Humic Biosuprastructures. *Biomacromolecules* [online]. 2011, 12(4), 1187-1199 [cit. 2022-04-30]. ISSN 1525-7797. Dostupné z: doi:10.1021/bm101488e
- [43] KURKOVÁ, Monika, Zdenek KLIKA, Christiana KLIKOVÁ a Josef HAVEL. Humic acids from oxidized coals. *Chemosphere* [online]. 2004, 54(8), 1237-1245 [cit. 2021-02-20]. ISSN 00456535. Dostupné z: doi:10.1016/j.chemosphere.2003.10.020
- [44] 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* [online]. 2018, 213, 123-132 [cit. 2021-02-21]. ISSN 00162361. Dostupné z: doi:10.1016/j.fuel.2017.10.114

- [45] FONG, Sim Siong, Lau SENG, Wong Nan CHONG, Janice ASING, Muhammad Faizal b Md NOR a Amira Satirawaty bt Mohd PAUZAN. Characterization of the coal derived humic acids from Mukah, Sarawak as soil conditioner. *Journal of the Brazilian Chemical Society* [online]. 2006, 17(3), 582-587 [cit. 2021-02-21]. ISSN 0103-5053.
- [46] LOBARTINI, J. C., G. A. ORIOLI a K. H. TAN. Characteristics of soil humic acid fractions separated by ultrafiltration. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* [online]. 2008, 28(9-10), 787-796 [cit. 2022-04-30]. ISSN 0010-3624. Dostupné z: doi:10.1080/00103629709369830
- [47] UKALSKA-JARUGA, Aleksandra, Romualda BEJGER, Guillaume DEBAENE a Bożena SMRECZAK. Characterization of Soil Organic Matter Individual Fractions (Fulvic Acids, Humic Acids, and Humins) by Spectroscopic and Electrochemical Techniques in Agricultural Soils. *Agronomy* [online]. 2021, 11(6) [cit. 2022-05-01]. ISSN 2073-4395. Dostupné z: doi:10.3390/agronomy11061067
- [48] VON LÜTZOW, Margit, Ingrid KÖGEL-KNABNER, Klemens EKSCHEMITT, Heinz FLESSA, Georg GUGGENBERGER, Egbert MATZNER a Bernd MARSCHNER. SOM fractionation methods: Relevance to functional pools and to stabilization mechanisms. *Soil Biology and Biochemistry* [online]. 2007, 39(9), 2183-2207 [cit. 2022-05-01]. ISSN 00380717. Dostupné z: doi:10.1016/j.soilbio.2007.03.007
- [49] Chemical Fractionation. SOM fractionation [online]. [cit. 2022-05-01]. Dostupné z: <https://www.somfractionation.org/chemical-meth/>
- [50] NEYROUD, J.A. a M. SCHNITZER. The alkaline hydrolysis of humic substances. *Geoderma* [online]. 1975, 13(3), 171-188 [cit. 2022-05-01]. ISSN 00167061. Dostupné z: doi:10.1016/0016-7061(75)90016-6
- [51] NEBBIOSO, Antonio a Alessandro PICCOLO. Basis of a Humeomics Science: Chemical Fractionation and Molecular Characterization of Humic Biosuprastructures. *Biomacromolecules* [online]. 2011, 12(4), 1187-1199 [cit. 2022-05-01]. ISSN 1525-7797. Dostupné z: doi:10.1021/bm101488e
- [52] SANDRON, Sara, Alfonso ROJAS, Richard WILSON, et al. Chromatographic methods for the isolation, separation and characterisation of dissolved organic matter. *Environmental Science: Processes & Impacts* [online]. 2015, 17(9), 1531-1567 [cit. 2022-05-01]. ISSN 2050-7887. Dostupné z: doi:10.1039/C5EM00223K
- [53] ČÁSLAVSKÝ, prof. Ing. Josef, CSc. *Analytická chemie II.: Dělicí metody*. Fakulta chemická: VUT, 2019.
- [54] HINE, P.T. a D.B. BURSILL. Gel permeation chromatography of humic acid Problems associated with sephadex gel. *Water Research* [online]. 1984, 18(11), 1461-1465 [cit. 2022-05-01]. ISSN 00431354. Dostupné z: doi:10.1016/0043-1354(84)90018-6
- [55] KUMAR, Vijay, Niraj UPADHYAY, Simranjeet SINGH, Joginder SINGH a Parvinder KAUR. Thin-Layer Chromatography: Comparative Estimation of Soil's Atrazine. *Current World Environment Journal* [online]. 2013, 8(3), 469-472 [cit. 2022-05-01]. ISSN 09734929. Dostupné z: doi:10.12944/CWE.8.3.17

- [56] ENEV, V., L. POSPÍŠILOVÁ, M. KLUČÁKOVÁ, T. LIPTAJ a L. DOSKOČIL. Spectral characterization of selected humic substances. *Soil and Water Research* [online]. 2014, 9(1), 9-17 [cit. 2022-04-22]. ISSN 18015395. Dostupné z: doi:10.17221/39/2013-SWR
- [57] 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* [online]. 2002, 48(1), 59-68 [cit. 2022-04-22]. ISSN 00456535. Dostupné z: doi:10.1016/S0045-6535(02)00041-3
- [58] LAKOWICZ, Joseph R. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. 2nd Ed. New York: Kluwer Academic Publishers, 1999. ISBN 03-064-6093-9.
- [59] MCKNIGHT, Diane M., Elizabeth W. BOYER, Paul K. WESTERHOFF, Peter T. DORAN, Thomas KULBE a Dale T. ANDERSEN. Spectrofluorometric characterization of dissolved organic matter for indication of precursor organic material and aromaticity. *Limnology and Oceanography* [online]. 2001, 46(1), 38-48 [cit. 2022-04-22]. ISSN 00243590. Dostupné z: doi:10.4319/lo.2001.46.1.0038
- [60] HUGUET, A., L. VACHER, S. RELEXANS, S. SAUBUSSE, J.M. FROIDEFOND a E. PARLANTI. Properties of fluorescent dissolved organic matter in the Gironde Estuary. *Organic Geochemistry* [online]. 2009, 40(6), 706-719 [cit. 2022-04-23]. ISSN 01466380. Dostupné z: doi:10.1016/j.orggeochem.2009.03.002
- [61] ZSOLNAY, Adam, Erik BAIGAR, Miguel JIMENEZ, Bernd STEINWEG a Flavia SACCOMANDI. Differentiating with fluorescence spectroscopy the sources of dissolved organic matter in soils subjected to drying. *Chemosphere* [online]. 1999, 38(1), 45-50 [cit. 2022-04-23]. ISSN 00456535. Dostupné z: doi:10.1016/S0045-6535(98)00166-0
- [62] MILORI, Débora M. B. P., Ladislau MARTIN-NETO, Cimélio BAYER, João MIELNICZUK a Vanderlei S. BAGNATO. HUMIFICATION DEGREE OF SOIL HUMIC ACIDS DETERMINED BY FLUORESCENCE SPECTROSCOPY. *Soil Science* [online]. 2002, 167(11), 739-749 [cit. 2022-04-23]. ISSN 0038-075X. Dostupné z: doi:10.1097/00010694-200211000-00004
- [63] NOVÁK, F., MACHOVIČ, V., HRABALOVÁ, H., NOVOTNÁ, M. Kvantitativní FTIR spektrometrie huminových látek. *Chemické listy* [online]. 2017, r. 111, č. 6. ISSN 1213-7103. [cit.2022-04-04].
- [64] DICK, D. P., J. H. Z. SANTOS a E. M. FERRANTI. Chemical characterization and infrared spectroscopy of soil organic matter from two southern brazilian soils. *Revista Brasileira de Ciência do Solo* [online]. 2003, 27(1), 29-39 [cit. 2022-04-04]. ISSN 0100-0683. Dostupné z: doi:10.1590/S0100-06832003000100004
- [65] TINTI, Anna, Vitaliano TUGNOLI, Sergio BONORA a Ornella FRANCIOSO. Recent applications of vibrational mid-Infrared (IR) spectroscopy for studying soil components: a review. *Journal of Central European Agriculture* [online]. 2015, 16(1), 1-22 [cit. 2022-04-04]. ISSN 1332-9049. Dostupné z: doi:10.5513/JCEA01/16.1.1535
- [66] Korshin, G. V., Li, C.-W., & Benjamin, M. M. (1997). Monitoring the properties of natural organic matter through UV spectroscopy: A consistent theory. *Water Research*, 31(7), 1787–1795. doi:10.1016/s0043-1354(97)00006-7

[67] SENESI, NICOLA, TEODORO M. MIANO, MARIA R. PROVENZANO a GENNARO BRUNETTI. CHARACTERIZATION, DIFFERENTIATION, AND CLASSIFICATION OF HUMIC SUBSTANCES BY FLUORESCENCE SPECTROSCOPY. *Soil Science* [online]. 1991, 152(4), 259-271 [cit. 2022-05-07]. ISSN 0038-075X. Dostupné z: doi:10.1097/00010694-199110000-00004

[68] GAO, JinFeng, Sen DOU a ZhiGuo WANG. Structural Analysis of Humic Acid in Soil at Different Corn Straw Returning Modes through Fluorescence Spectroscopy and Infrared Spectroscopy. *International Journal of Analytical Chemistry* [online]. 2019, 2019, 1-9 [cit. 2022-05-07]. ISSN 1687-8760. Dostupné z: doi:10.1155/2019/1086324

[69]RODRÍGUEZ, Francisco J., Patrick SCHLENGER a María GARCÍA-VALVERDE. A comprehensive structural evaluation of humic substances using several fluorescence techniques before and after ozonation. Part I: Structural characterization of humic substances. *Science of The Total Environment* [online]. 2014, 476-477, 718-730 [cit. 2022-05-09]. ISSN 00489697. Dostupné z: doi:10.1016/j.scitotenv.2013.11.150

## 7 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

### 7.1 Seznam použitých zkratek

<sup>13</sup> C-NMR	<sup>13</sup> C nukleární magnetická rezonanční spektrometrie
BIX	autochtonní/biologický index
DOM	rozpuštěná organická hmota (Dissolved Organic Matter)
DRIFT	difuzní reflektance
EA	elementární analýza
FI	fluorescenční index
FK	fulvinová kyselina
FTIR	infračervená spektrometrie s Fourierovou transformací
hDOM	hydrolyzující rozpuštěná organická hmota
HIX	humifikační index
HK	huminová kyselina
HL	huminová látka
HU	humín
HY	hymatomelanová kyselina
IFE	Inner filter effect
IHSS	mezinárodní společnost pro výzkum huminových látek
OM	organická hmota
SEC	velikostně-vylučovací chromatografie
SOM	půdní organická hmota
TGA	termogravimetrická analýza
TLC	tenkovrstvá chromatografie
UV/Vis	ultrafialová a viditelná oblast elektromagnetického záření

## 7.2 Seznam použitých symbolů

$A_1$	integrál v rozmezí vlnových délek emise 300–345 nm	[–]
$A_4$	integrál v rozmezí vlnových délek emise 435–480 nm	[–]
$A_{254}/A_{410}$	poměr absorbancí při vlnových délkách 254 a 410 nm	[–]
<i>at. %</i>	elementární složení v atomových procentech	[%]
$E_2/E_3$	poměr absorbancí při vlnových délkách 250 a 365 nm	[–]
$E_2/E_4$	poměr absorbancí při vlnových délkách 265 a 465 nm	[–]
$E_4/E_6$	poměr absorbancí při vlnových délkách 465 a 665 nm	[–]
$E_{ET}/E_{Bz}$	poměr absorbancí při vlnových délkách 253 a 220 nm	[–]
<i>hm. %</i>	elementární složení v hmotnostních procentech	[%]
$R_f$	retardační faktory	[–]
<i>Milori index</i>	plošný integrál přes celé emisní spektrum	[–]



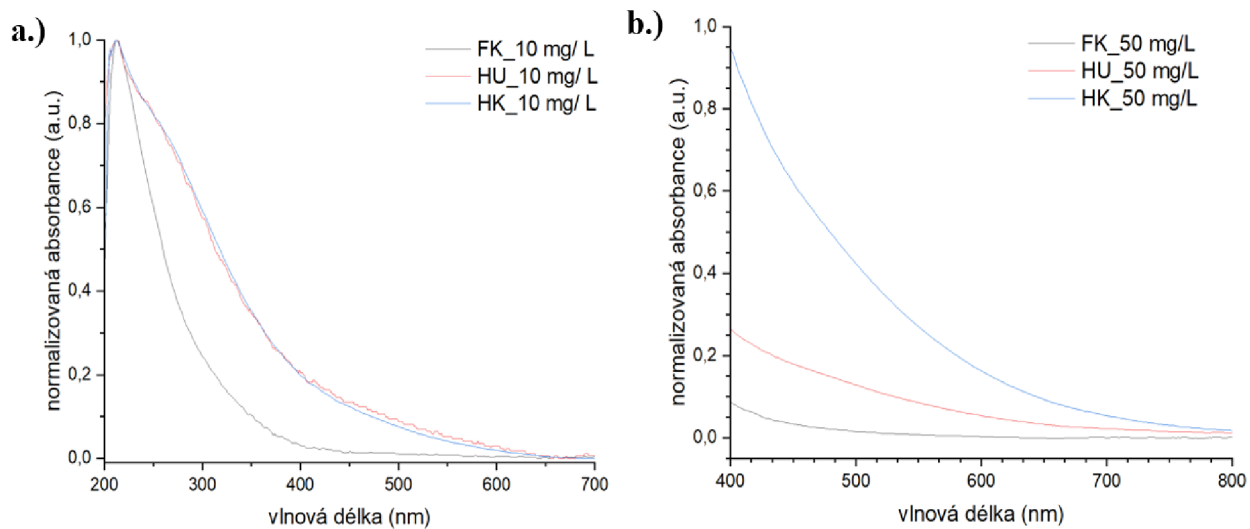
## 8 PŘÍLOHY



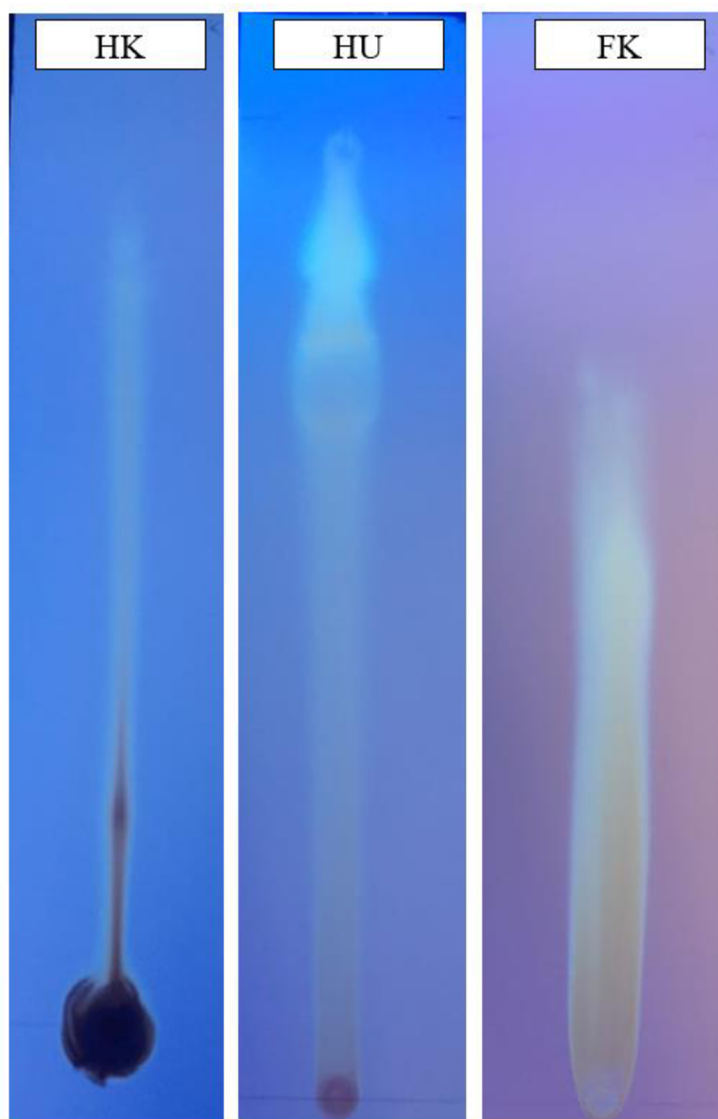
Obrázek 19: *Vzorky vysrážených HK (vlevo) a dialýza proti deionizované vodě (vpravo)*



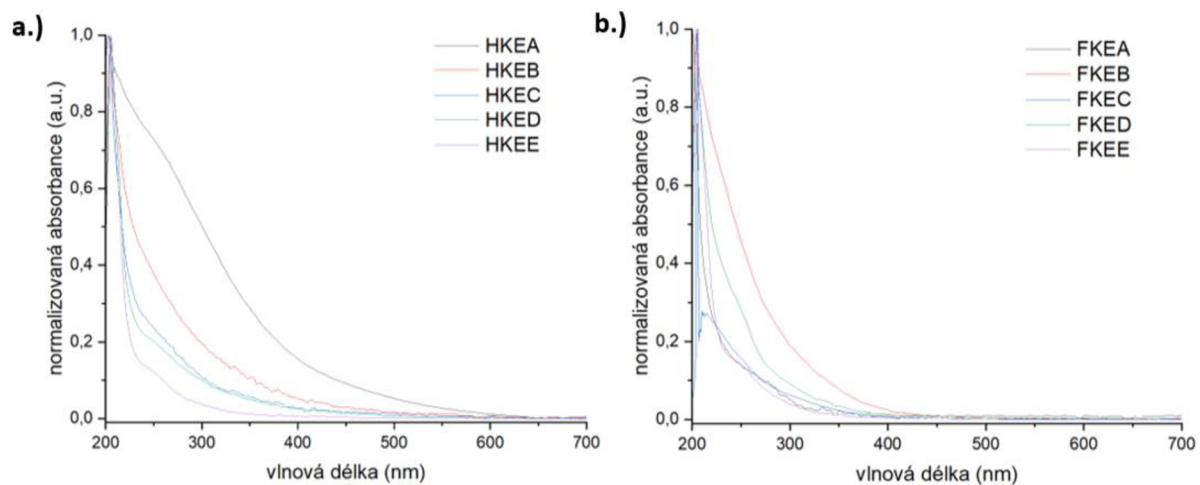
Obrázek 20: *Adsorpce FK na pryskyřici DAX-8*



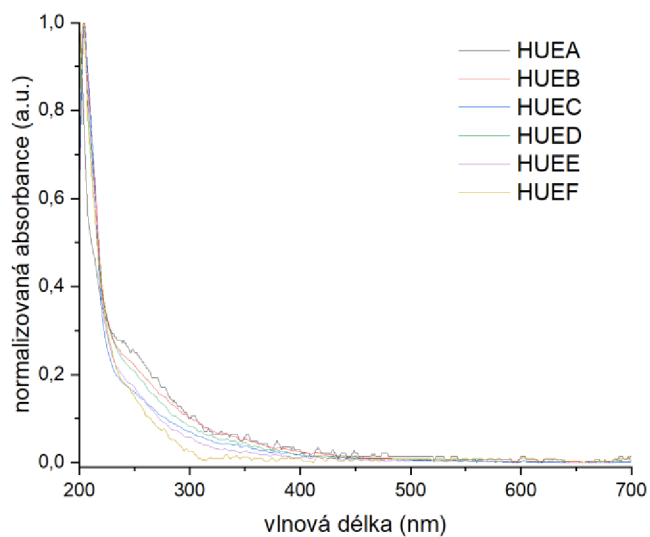
Obrázek 21: UV/Vis spektra *HL oxyhumolitu*



Obrázek 22: Pozorování TLC chromatogramů pod UV zářením v pozorovací komoře



Obrázek 23: UV/Vis spektra organických frakcí HL: **a.)** organické frakce izolované z HK; **b.)** organické frakce izolované z FK



Obrázek 24: UV/Vis spektra organických frakcí izolovaných z HU