

VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

Fakulta chemická

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Brno, 2017

Bc. Kateřina Karbanová



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

DISOCIAČNÍ CHOVÁNÍ PŘÍRODNÍCH BIOKOLOIDŮ

DISSOCIATION BEHAVIOUR OF NATURAL BIOCOLLOIDS

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Kateřina Karbanová

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

prof. Ing. Martina Klučáková, Ph.D.

BRNO 2017

Zadání diplomové práce

Číslo práce: FCH-DIP1008/2016
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie
Studentka: **Bc. Kateřina Karbanová**
Studijní program: Spotřební chemie
Studijní obor: Spotřební chemie
Vedoucí práce: **prof. Ing. Martina Klučáková, Ph.D.**
Akademický rok: 2016/17

Název diplomové práce:

Disociační chování přírodních biokoloidů

Zadání diplomové práce:

Seznámit se s problematikou disociace přírodních biokoloidů, literární rešerše. Zvolit vhodný způsob studia, vybrat systémy vhodné pro studium a metody analýzy. Navrhnout a realizovat vlastní experimenty, zpracovat data a vyvodit závěry ze získaných výsledků.

Termín odevzdání diplomové práce: 5.5.2017

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

Bc. Kateřina Karbanová
student(ka)

prof. Ing. Martina Klučáková, Ph.D.
vedoucí práce

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2017

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

ABSTRAKT

Tato diplomová práce je zaměřena na studium disociačního chování přírodních biokoloidů, a to konkrétně huminových kyselin a fulvinových kyselin. Huminové a fulvinové kyseliny jsou přírodní, heterogenní, vysokomolekulární látky, které se chovají jako slabě kyselé polyelektrolyty a mají složitou doposud ne zcela přesně popsanou strukturu. Vznikají biochemickými přeměnami organických zbytků (převážně rostlinných). Jsou součástí půd, vod, rašelin, sedimentů nebo uhlí. Rozpustnost huminových kyselin je značně ovlivněna hodnotou pH, čím vyšší je hodnota pH, tím větší je i jejich rozpustnost. Fulvinové kyseliny jsou dobře rozpustné v celém rozsahu pH.

Cílem této diplomové práce je stanovit disociační konstanty u pěti druhů huminových kyselin a čtyř druhů fulvinových kyselin, které byly izolovány z různých přírodních zdrojů, a které byly zakoupeny od společnosti IHSS. Disociační konstanty byly stanovovány pomocí metody konduktometrické a kombinací měření pH a obsahu kyselých funkčních skupin v Na_2SO_4 . Metoda UV–VIS spektrofotometrie byla v této práci použita k charakterizaci kvality huminových a fulvinových kyselin.

ABSTRACT

This diploma thesis is focused on the study of dissociation behaviour of natural biocolloids, namely humic acids and fulvic acids. Humic and fulvic acids are natural, heterogeneous, high molecular weight substances which behave as weakly acidic polyelectrolytes and they have complex not exactly described structure. They are formed by biochemical transformations of organic residues (mainly plants). They are part of the soil, water, peat, sediments and coal. Solubility of humic acids is affected by pH value. The higher the pH value is the higher the solubility is. Fulvic acids are soluble in whole range of pH values.

The aim of this diploma thesis is to determine the dissociation constant for the five kinds of humic acids and four kinds of fulvic acids, which have been isolated from various natural sources. These samples were purchased from IHSS. Dissociation constants were determined by the conductometric method and a combination of measurement pH and the content of acidic functional groups in Na_2SO_4 . UV-VIS spectrophotometry method was used to characterize the quality of humic acids and fulvic acids.

KLÍČOVÁ SLOVA

Huminové kyseliny, fulvinové kyseliny, disociace, disociační konstanta, rozpustnost

KEYWORDS

Humic acids, fulvic acids, dissociation, dissociation constant, solubility

KARBANOVA, K. *Disociační chování přírodních biokoloidů*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2017. 57 s. Vedoucí diplomové práce prof. Ing. Martina Klučáková, Ph.D..

PROHLÁŠENÍ

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

.....

podpis studenta

Poděkování:

Na tomto místě bych velice ráda poděkovala vedoucí mé diplomové práce prof. Ing. Martině Klučákové Ph.D. za odborné vedení, cenné rady a především čas, který mi věnovala. Velké díky patří také mé rodině a příteli, kteří mi poskytli zázemí a po celou dobu studia mě podporovali.

OBSAH

1	ÚVOD	7
2	TEORETICKÁ ČÁST	8
	2.1 Huminové látky	8
	2.1.1 Vznik huminových látek	8
	2.1.2 Dělení huminových látek	10
	2.1.3 Struktura a vlastnosti huminových látek	11
	2.1.4 Využití huminových látek	13
	2.1.5 Huminové kyseliny	14
	2.1.6 Fulvinové kyseliny	15
	2.1.7 Rozpustnost a kyselé funkční skupiny	16
	2.2 Disociace huminových a fulvinových kyselin	17
	2.2.1 Disociace slabé jednosytné kyseliny	18
	2.2.2 Disociace slabé vícesytné kyseliny	19
	2.2.3 Disociace silné vícesytné kyseliny	19
	2.2.4 Metody používané ke studiu disociace a stanovení pK_a huminových a fulvinových kyselin	20
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	30
	3.1 Použité přístroje	30
	3.2 Použité chemikálie	30
	3.3 Vzorky huminových a fulvinových kyselin	30
	3.4 Pracovní postup	31
	3.4.1 Příprava roztoků pro studium disociačních konstant	31
	3.4.2 Charakterizace huminových a fulvinových kyselin	32
	3.4.3 Stanovení pK_a huminových a fulvinových kyselin	32
4	VÝSLEDKY A DISKUZE	34
	4.1 Charakterizace huminových a fulvinových kyselin	34
	4.1.1 Acidobazické vlastnosti	34
	4.1.2 Kvalitativní vlastnosti	34
	4.2 Stanovení pK_a huminových a fulvinových kyselin	38
	4.2.1 Konduktometrická metoda	38
	4.2.2 Kombinace měření pH a obsahu kyselých funkčních skupin v Na_2SO_4	41

5	ZÁVĚR.....	47
6	SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ	48
7	SEZNAM ZKRATEK A SYMBOLŮ.....	53
	7.1 Použité symboly	53
	7.2 Použité zkratky	53
8	PŘÍLOHY	55

1 ÚVOD

Huminové látky jsou skupinou látek, o kterých mnoho lidí vůbec neslyšelo, a když už slyšelo, tak jen málo a to i přes to, že se vyskytují všude kolem nás. Jsou součástí půdy, rašeliny, hnědého uhlí, lignitu a v neposlední řadě také některých vod. Jsou to složité vysokomolekulární organické látky. Vznikají nejčastěji rozkladem organické hmoty nebo syntetickou činností mikroorganismů. Mají složitou, doposud ne zcela přesně popsanou strukturu. Jejich struktura se liší podle původu, naleziště a doby odběru vzorku a to z toho důvodu, protože se chovají jako živý organismus a za vhodných podmínek mění svou strukturu. Podle jejich chování v kyselinách nebo zásadách se dělí na huminy, které jsou nerozpustné ve vodě při kyselé i alkalické hodnotě pH, dále na huminové kyseliny, které jsou rozpustné v alkáliích a nerozpustné v kyselinách a nakonec na fulvinové kyseliny, které jsou rozpustné ve všech vodných roztocích bez ohledu na pH. Obsahují velké množství různých funkčních skupin, z nichž největší zastoupení a největší reaktivitu mají skupiny obsahující kyslík, hlavně karboxylové a hydroxylové, které nejvíce přispívají k celkové kyselosti huminových látek. Unikátních vlastností těchto látek je využíváno už celá staletí. Využívají se hlavně v zemědělství, zejména jako hnojivo v podobě humátů a ke stimulaci růstu rostlin, další využití nacházejí i v průmyslu, ochraně životního prostředí, farmacii a kosmetice.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Huminové látky

Huminové látky jsou přírodní organické sloučeniny. Představují největší a z hlediska globální stability na Zemi nejvýznamnější zásobu organického uhlíku. Vznikají chemickým a biologickým rozkladem organické hmoty (např. zbytků rostlin a živočichů) a syntetickou činností mikroorganismů, tento proces nazýváme jako humifikace. Nejdůležitějšími látkami, účastnicími se tohoto procesu jsou lignin a produkty jeho přeměny, dále polysacharidy, melanin, kutin, lipidy, nukleové kyseliny aj. Na organické sloučeniny připadají téměř dvě třetiny půdních zásob uhlíku, z toho nejméně polovinu tvoří chemicky relativně odolné huminové látky. Další zásoby HL jsou rozpuštěny ve vodách nebo uloženy v sedimentech moří, jezer, vodních toků a v ložiscích rašeliny, lignitu a uhlí. Díky tomu huminové látky zásadním způsobem ovlivňují život na Zemi – určují kvalitu půd, vod a vázáním uhlíku v relativně stabilních sloučeninách také složení atmosféry [1, 2].

Jsou to složité vysokomolekulární polycyklické sloučeniny s relativní molekulovou hmotností v rozmezí několika tisíců až stovek tisíců daltonů ($2000 - 200\,000 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$). Co se týče jejich struktury, tak ta je velice rozmanitá, složitá a doposud není přesně známa. Liší se podle původu, naleziště a doby odběru vzorku. Je to dáno tím, že huminové látky se chovají jako živý organismus a za vhodných podmínek mění svou strukturu [3].

Obsah huminových kyselin a fulvokyselin se v různých přírodních zdrojích liší, což můžeme vidět v Tab. 1. Nejvíce huminových a fulvinových kyselin obsahuje Leonardite a černá rašelina a nejméně naopak černé uhlí.

Tab. 1: Obsah huminových a fulvinových kyselin v přírodních zdrojích [2]

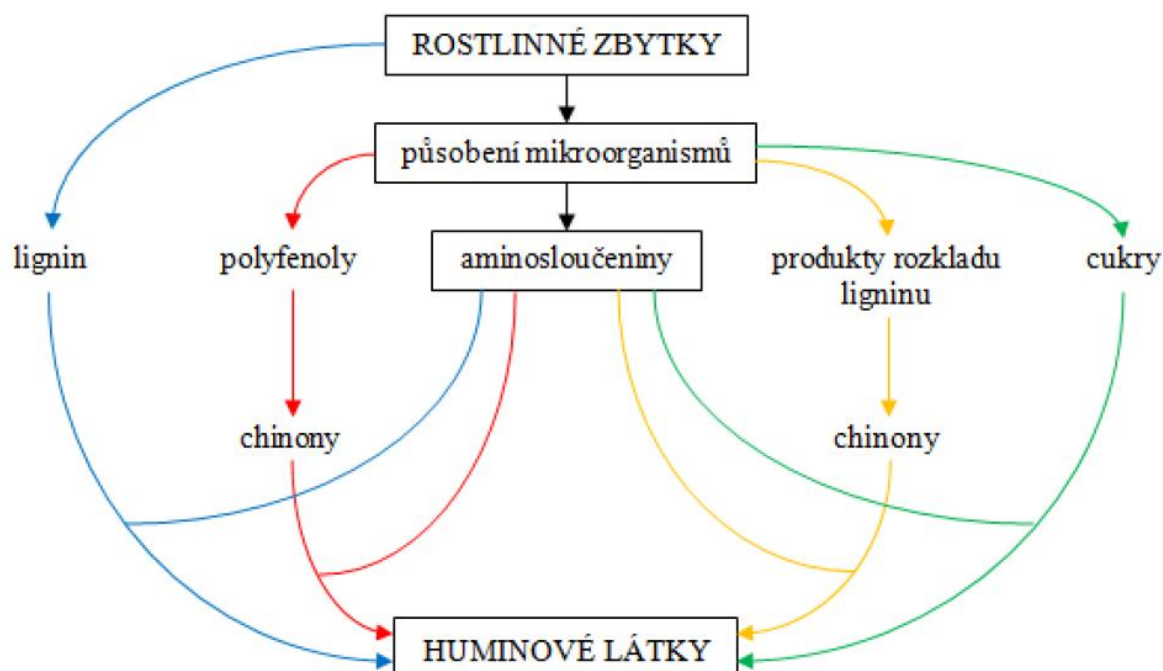
Přírodní zdroj	Obsah huminových kyselin a fulvokyselin (hm. %)
Leonardite/humát	40–85
Černá rašelina	10–40
Sapropelová rašelina	10–20
Hnědé uhlí	10–30
Hnůj	5–15
Kompost	2–5
Půda	1–5
Černé uhlí	0–1

2.1.1 Vznik huminových látek

Vznik huminových látek není zcela objasněn. Existuje několik teorií jejich vzniku, které můžeme vidět na Obr. 1 [4].

Ligninová teorie předpokládá, že huminové látky vznikají z ligninu degradačním mechanismem, nicméně většina vědců dává v současnosti přednost syntetickému mechanismu zahrnujícímu chinony, tj. polyfenolové teorii. Další teorie vychází z předpokladu, že huminové látky vznikají kondenzací cukrů s aminy, které vznikají jako produkty mikrobiálního metabolismu. Je pravděpodobné, že všechny tyto mechanismy existují vedle sebe a mohou se i různě prolínat. Degradální mechanismus dominuje hlavně ve vodních

ekosystémech, špatně odvodněných půdách a vlhkých sedimentech, zatímco syntetický mechanismus převažuje v terestrických ekosystémech. Časté a prudké výkyvy teploty, vlhkosti a slunečního záření můžou v terestrických ekosystémech upřednostnit syntézu huminových látek kondenzací cukrů s aminy [4, 5].



Obr. 1: Mechanismy vzniku huminových látek [2]

Ligninová teorie

Ligninová teorie popisuje vznik huminových látek mikrobiálním rozkladem odumřelého rostlinného materiálu, kdy z těžko rozložitelných látek, jako je lignin, kutin nebo melanin, vznikají vysokomolekulární huminy. Ty jsou pak oxidací postupně transformovány přes huminové kyseliny na fulvokyseliny a dále na ještě menší molekuly. Pokud degradační mechanismus pokračuje, jsou huminové látky postupně a velmi pomalu rozloženy až na oxid uhličitý a vodu [4].

Polyfenolová teorie

Polyfenolová teorie vychází z předpokladu, že rostlinné tkáně jsou nejprve degradovány na malé molekuly (karboxylové kyseliny, fenoly, atd.) a z nich se pak syntézou tvoří huminové látky. Jelikož tato teorie probíhá syntetickým mechanismem, při kterém z malých molekul vznikají molekuly složitější, vznikaly by tedy nejprve fulvokyseliny, až pak huminové kyseliny a nakonec huminy [4].

Kondenzace cukrů s aminy

Tato teorie je založena na kondenzaci redukujících cukrů s aminy za vzniku hnědých dusíkatých polymerů. Reaktanty (cukry, aminokyseliny) vznikají ve velkém množství v půdě díky činnosti mikroorganismů. Počátek reakce vyžaduje přidavek aminu na aldehydovou skupinu cukru za vzniku Schiffovy báze a N-substituovaného glykosylaminu. Glykosylamin

podléhá Amadoriho přesmyku. Výsledkem přesmyku je vznik aldehydů a ketonů. Ty jsou dehydratovány na reduktony a ty jsou dále dehydratovány na hydroxymethylfurfuraly. Nevýhodou je, že při teplotách, které se za běžných podmínek vyskytují v půdě, by tato reakce probíhala velmi pomalu. Nicméně smíchání reaktantů s minerály a výrazné a časté změny v půdním prostředí (tání, mrznutí, schnutí, zvlhčování) mají katalytický účinek, urychlující kondenzaci [6].

2.1.2 Dělení huminových látek

Huminové látky tvoří 60–80 % celkové půdní organické hmoty. Dělí se podle jejich chování ve vodných roztocích, respektive podle toho, jestli se rozpouští v kyselinách nebo zásadách. Podle toho rozlišujeme tři základní skupiny huminových látek, a to huminové kyseliny, fulvinové kyseliny a humin. Mezi jednotlivými skupinami neexistuje ostrá hranice [7, 8].

Huminové kyseliny

Co se týče velikosti huminových kyselin, tak mají menší velikost než huminy, ale větší než fulvokyseliny (přibližně koloidní velikost) a obsahují více karboxylových skupin než huminy [7].

Představují frakci huminových látek, která není rozpustná v kyselých a neutrálních vodných roztocích, ale je v těchto roztocích rozpustná při vyšších hodnotách pH. Mohou být tedy získány alkalickým loužením vhodné matrice a následným okyselením výluhu. Tvoří nejkvalitnější složku huminových látek. Jsou to polymery tmavohnědé až černé barvy [2, 9].

Fulvinové kyseliny

Fulvinové kyseliny mají nejmenší velikost ze všech tří skupin. Představují takovou frakci huminových látek, která je rozpustná ve všech vodných roztocích v zásadě v celém rozmezí pH, a která zůstává v roztoku po odstranění huminových kyselin [9].

Jejich obsah v přírodních systémech je obvykle řádově nižší než obsah huminových kyselin a huminů a jsou poměrně obtížně izolovatelné [8].

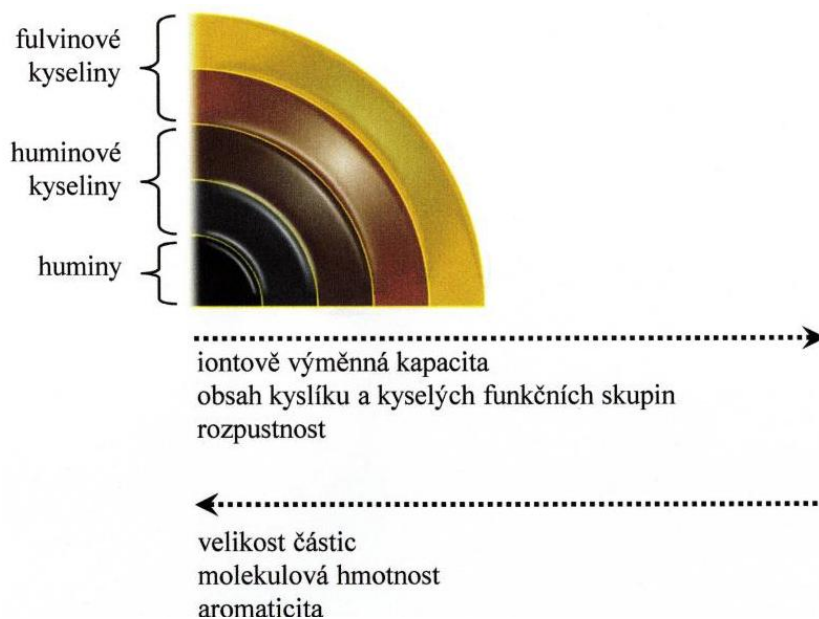
Mají vysoký obsah karboxylových skupin na jednotku hmotnosti. Díky tomu jsou nejreaktivnějšími složkami huminových látek. Zabarvení fulvokyselin se pohybuje v rozmezí od světle žlutého do žlutohnědého [7, 9].

Huminy

Huminy jsou částice s velkou molekulovou hmotností a relativně malým specifickým povrchem. Obsahují poměrně nízký obsah karboxylových skupin a jsou nereaktivní [7].

Představují takovou frakci huminových látek, která je ve vodě nerozpustná jak při kyselé, tak při alkalické hodnotě pH. Jsou kondenzovanější a silněji dehydratované než huminové kyseliny. Jsou to karbonizované organické látky, které jsou pevně vázány na minerální podíl vody a nedají se získat ani mnohonásobnou extrakcí alkáliemi z dekalcinované půdy. Huminy vykazují černou barvu [2, 9].

Od tohoto dělení huminových látek se odvíjí i jejich další charakteristiky, které jsou pro přehlednost znázorněny na Obr. 2.



Obr. 2: Dělení a vlastnosti huminových látek [8]

2.1.3 Struktura a vlastnosti huminových látek

Huminové látky definujeme jako směs amorfních, polydisperzních sloučenin žluté až hnědočerné barvy. Jsou heterogenní skupinou přírodních organických molekul s komplikovanou polymerní strukturou. Tvoří neoddělitelnou součást půdní a vodní organické hmoty [2].

Huminové látky jsou tedy strukturně velmi složité. Na jejich strukturu má vliv mnoho faktorů, jelikož základní složení těchto sloučenin závisí na původu, vzniku, stáří a v neposlední řadě na způsobu a době odběru vzorku [3].

V minulosti se objevilo více pokusů předpovědět jejich typickou nebo průměrnou strukturu. V současnosti, hlavně z důvodu značného pokroku a vývoje metod a postupů používaných na řešení jejich složení a struktury, existují početné studie zabírající se touto problematikou [2].

I přes to, že jsou huminové látky předmětem studia více než 100 let, tak nejsou doposud přesně popsány. Existují pouze tzv. hypotetické struktury. Některé z navrhovaných předpokládaných hypotetických struktur a konformací jedné z nejdůležitějších frakcí huminových látek – huminových kyselin jsou uvedené na Obr. 3 a Obr. 4. I přes to, že jednotlivé varianty předpokládaných struktur huminových kyselin měly sloužit na objasnění chemie huminových látek, je třeba si uvědomit, že poznání těchto látek je spíše spojené s poznáním vlastností celku jako jednotlivých molekul [2].

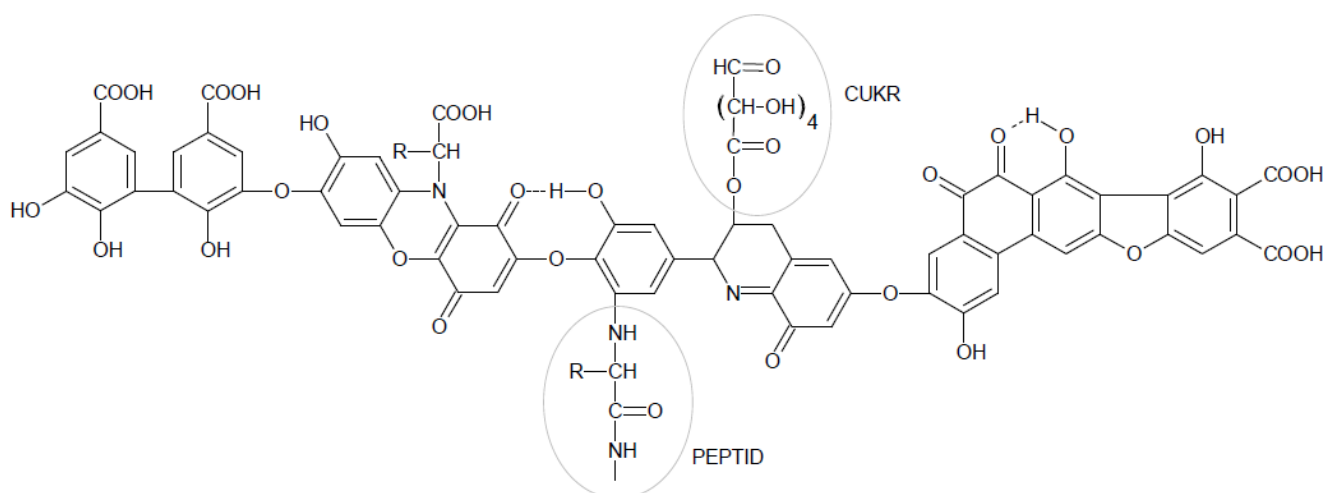
Na Obr. 3 a Obr. 4 můžeme vidět, že mají převážně aromatický charakter, kdy aromatická jádra bývají vzájemně spojena alifatickými, často cyklickými řetězci a svou povahou se řadí do skupiny polyfenolů a polykarboxylových kyselin. Typickými funkčními skupinami přítomnými ve struktuře huminových látek jsou především karboxylové a hydroxylové skupiny, dále také methoxylové a karbonylové skupiny. Tyto funkční skupiny mohou být vázány jak na aromatických jádrech, tak i v postranních řetězcích. Kromě aromatických jader byly v makromolekulách huminových látek nalezeny i chinoidní a olefinové struktury.

Huminové látky jsou tvořeny převážně uhlíkem, dále kyslíkem a vodíkem. V menší míře obsahují také dusík, síru nebo fosfor [4].

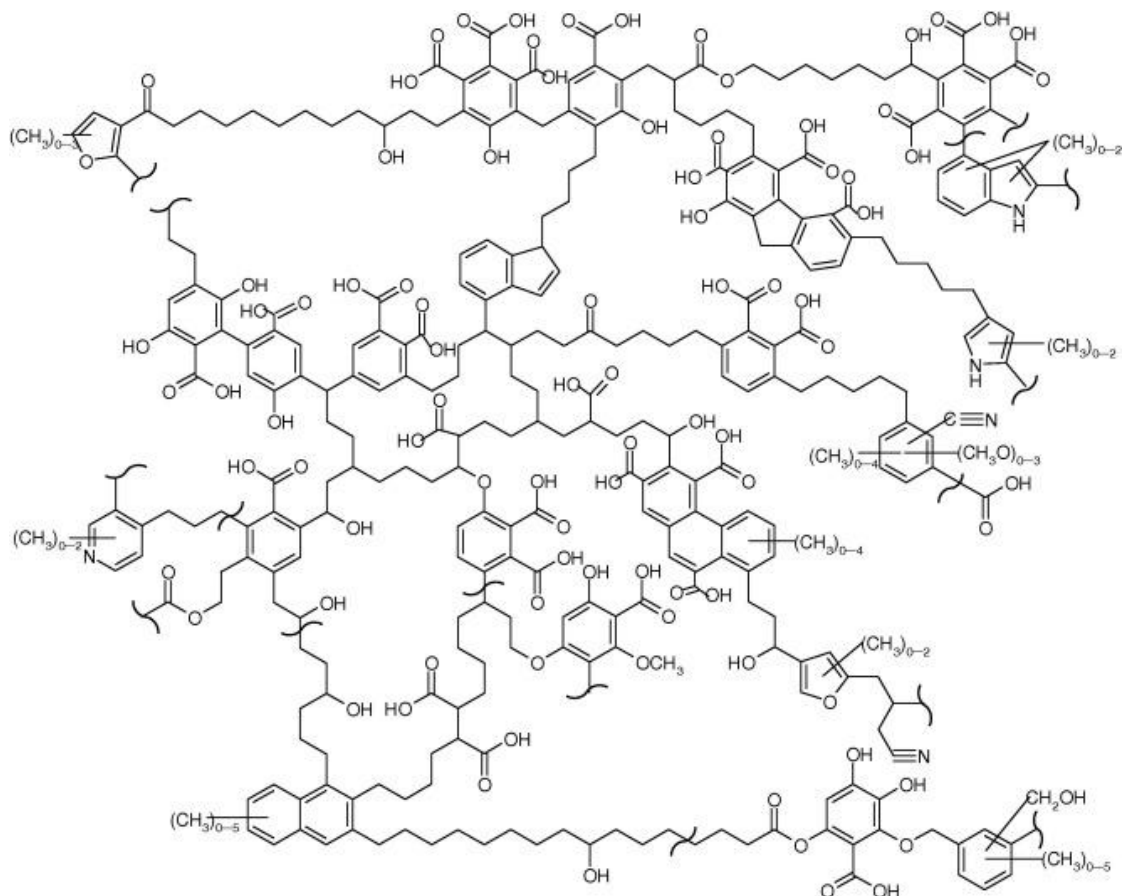
Existuje mnoho studií, které se zabývají huminovými látkami o velkých molekulových hmotnostech. Nicméně se nepodařilo identifikovat pravidelně se opakující strukturní jednotku nebo několik jednotek, které by mohly být považovány za charakteristické pro tyto látky. V roce 1989 Hayes prohlásil, že neexistuje žádný důkaz pro pravidelnost ve strukturách huminových makromolekul. Podle Stevenzona, na každou frakci (huminovou kyselinu, fulvinovou kyselinu) by se mělo nahlížet tak, jako by byla složena z řady molekul různých velikostí. Některé mají přesně stejnou strukturní konfiguraci nebo řadu reaktivních funkčních skupin. V roce 1963 Dubach a Mehta ve svém fascinujícím prohlášení uvažovali, že snad žádné dvě molekuly huminových látek nejsou přesně stejné. Bylo provedeno mnoho výzkumů týkajících se huminových látek. Tyto studie poskytly mnoho informací o složení huminových látek (především o obsahu funkčních skupin). Nicméně nebyly odhaleny žádné molekulární jednotky, které by mohly být považovány za základní stavební bloky, které by byly jedinečným rysem těchto látek [10].

Vlastnosti huminových látek, jako je rozpustnost ve vodě, schopnost agregace a disociace, nábojové poměry či schopnost vytvářet komplexy s kovovými ionty, úzce souvisejí s jejich složením, které je ovlivněno humifikačními procesy. Vedle těchto procesů jsou také významně ovlivněny velikostí jednotlivých molekul a částic, stupněm jejich dispergace (pravé nebo koloidní roztoky), polaritou, která je dána charakterem skeletu (aromatický nebo alifatický) a hlavně druhy, počty a disociačními schopnostmi funkčních skupin [4].

Jak již bylo zmíněno, tak mezi významné vlastnosti huminových látek patří schopnost tvorby nejrůznějších komplexů především s vícemocnými kationty. Tato vlastnost je ovlivněna přítomností karboxylových a fenolových skupin a také aromatickou molekulou. Schopnost tvorby se zvyšuje se vzrůstající hodnotou pH a jejich rozpustnost závisí na hmotnostním poměru obou složek. Čím je poměrné zastoupení kationtů větší, tím je rozpustnost komplexů menší [4].



Obr. 3: Struktura huminové kyseliny podle Stevenzona [6]



Obr. 4: 2D struktura huminové kyseliny podle Schnitzera a Schultena [6]

2.1.4 Využití huminových látek

Huminové látky jsou již po řadu desetiletí předmětem intenzivního vědeckého zájmu, který vychází zejména z jejich výhodně využitelných chemických a fyzikálních vlastností. Mají poměrně rozsáhlé využití v zemědělství, průmyslu, oblasti ochrany životního prostředí, farmakologii, biomedicíně a využívají se také jako palivo [9].

Zemědělství

Huminové látky jsou v zemědělství velmi prospěšné a hrají v něm velmi důležitou roli. Využívají se zejména jako hnojivo v podobě humátů. Zvyšují kvalitu a úrodnost půd, vážou železo za tvorby chelátů a tím ho činí dostupným pro rostliny, stimulují růst rostlin, poskytují energii pro prospěšné půdní organismy, ovlivňují kapacitu zadržování půdní vody, strukturu půdy, uvolňování rostlinných živin z půdních minerálů a zvyšují dostupnost stopových minerálů. Podle své struktury dále ovlivňují řadu fyzikálních a chemických vlastností půdy. Konkrétně ovlivňují stabilitu půdních agregátů, pufrací kapacitu, transport, sorpci hydrofobních organických sloučenin a tvoření komplexů s kovy přítomnými v prostředí. Nedávný výzkum ukázal, že huminové kyseliny mohou být použity jako krmivo hospodářských zvířat díky svému prorůstovému účinku [11, 12].

Průmysl

V průmyslu mají huminové látky také velmi široké uplatnění. Používají se např. jako aditiva pro řízení rychlosti tuhnutí betonu. V textilním průmyslu se používají k barvení kůže,

v dřevozpracujícím průmyslu mohou být huminové látky použity jako přírodní indigo k obarvení dřeva, v keramickém průmyslu se používají zejména jako přísady ke zlepšení mechanické pevnosti keramiky. Našly uplatnění i při výrobě plastických hmot, zejména jako barviva pro barvení Nylonu 6 nebo PVC plastů. Poslední z aplikací huminových látek v průmyslu, kterou zde zmíním, je aplikace v papírenském průmyslu např. pro výrobu elektricky vodivého papíru nebo pro výrobu papíru, který má vysokou pevnost v tahu [12].

Ochrana životního prostředí

Díky své struktuře jsou huminové látky schopny absorbovat a odstranit různé látky způsobující znečištění půdy a vody. Používají se k odstranění herbicidů, fungicidů, insekticidů, farmaceutických sloučenin, těžkých kovů, detergentů, barviv atd., jelikož tyto sloučeniny mají negativní vliv na kvalitu půdy, vody a ovzduší [12].

Farmacie a biomedicína

Huminové látky vyráběné v komerčním měřítku se používají ve veterinární a humánní medicíně. Hlavním důvodem proč je i v této oblasti huminovým látkám věnována velká pozornost, tak je to hlavně díky jejich antivirovým a protizánětlivým účinkům. Využívají se např. i v potravinových doplňcích nebo kosmetických přípravcích. Potenciál těchto látek tvořit chelatační komplexy s těžkými kovy (jako je kadmium) umožňuje jejich použití pro odstranění těžkých kovů z živých organismů. Bylo provedeno několik studií o léčivých vlastnostech huminových látek. Například bylo zjištěno, že huminové kyseliny podávané krysám výrazně snížily žaludeční poškození vyvolané alkoholem [12].

2.1.5 Huminové kyseliny

Jelikož se celá experimentální část týká studia disociačního chování u huminových a fulvinových kyselin, tak se v následujících dvou kapitolách budu věnovat právě popisu těchto látek.

Huminové kyseliny reprezentují spolu s fulvokyselinami a huminem tři základní frakce humusu, které tvoří jeho podstatnou část. Jak již bylo jednou zmíněno, tak huminové kyseliny jsou dobře rozpustné v zásadách, ale nerozpustné v kyselinách. Představují nejdůležitější a nejkvalitnější frakci humifikované půdní organické hmoty. Jsou to polymery tmavohnědé až černé barvy. Jejich základní jednotkou jsou aromatická jádra fenolického nebo chinoidního typu, na které se prostřednictvím můstků typu ($-O-$, $-NH-$, $-N-$, $-S-$, $-CH_2-$) napojují v bočních řetězcích funkční skupiny. V jádře se může nacházet benzen, furan, naftalen, anthracen, pyridin, aj. [2].

Huminové kyseliny jsou obecně považovány za komplexní aromatické makromolekuly, kde spojení mezi aromatickými skupinami zajišťují aminokyseliny, aminocukry, peptidy a alifatické sloučeniny. Vykazují polyaniontový charakter a mohou vázat ionty různými mechanismy (jak chemickými, tak fyzikálními). V důsledku jejich chemického složení mohou vázat jak polární, tak i nepolární sloučeniny. V půdním prostředí vytvářejí organominerální komplexy, přičemž sorpce huminových kyselin závisí jednak na typu jílového materiálu, ale také na chemické struktuře huminových kyselin (funkční skupiny, stupeň humifikace, stupeň polymerace, stupeň oxidace) [2, 9].

Základními stavebními prvky huminových kyselin jsou uhlík, vodík, kyslík, dusík a v menší míře také síra. Zastoupení těchto prvků uvedené v Tab. 2 však není vždy stejné. Mění se s procesem vzniku (humifikace) a původem huminových kyselin, proto je nelze popsat jedním vzorcem. Existují pouze hypotetické struktury například ty zobrazené na Obr. 3 a Obr. 4 [13].

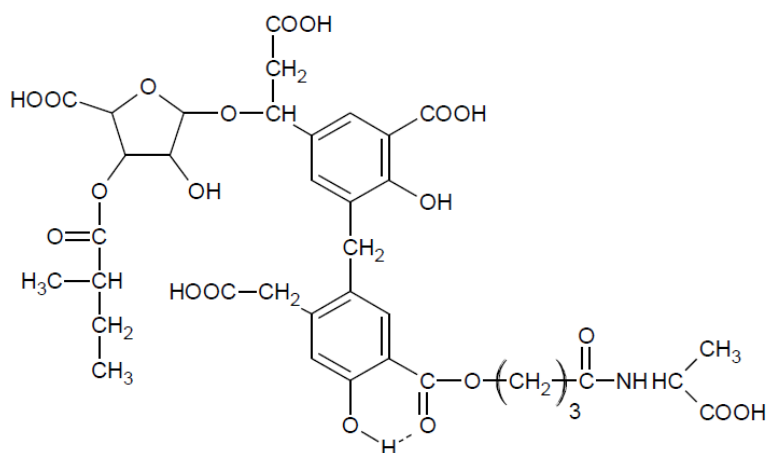
Tab. 2: Prvkové složení huminových kyselin [8]

Prvek	Obsah (hm. %)
C	55,1
H	5
O	35,6
N	3,5
S	0,8

2.1.6 Fulvinové kyseliny

Fulvinové kyseliny jsou další frakcí huminových látek. Jejich molekuly mají poměrně malou velikost, díky čemuž se dobře rozpouští ve všech vodných roztocích bez ohledu na pH. Právě díky této dobré rozpustnosti jsou v přírodních vodách v převaze. Fulvinové kyseliny jsou tedy ve srovnání s ostatními dvěma huminovými frakcemi vysoce mobilní a jako takové mohou být z půd snadno vyplaveny [8].

Fulvinové kyseliny mají ve srovnání s huminovými kyselinami nižší molekulovou hmotnost, obsahují méně aromatických struktur, více alifatických postranních řetězců a mají více homogenní strukturu, kterou můžeme vidět na Obr. 5. Obsahují asi až dvakrát více karboxylových skupin než huminové kyseliny díky čemuž jsou považovány za nejreaktivnější frakci huminových látek. [4].



Obr. 5: Struktura fulvinové kyseliny podle Buffa [9]

Fulvinové kyseliny, stejně jako jejich soli (fulváty), se v půdě nejčastěji vyskytují v adsorbované formě. S oxidy železa a hliníku vytvářejí organominerální sloučeniny. Zabarvení fulvinových kyselin se pohybuje v rozmezí od světle žlutého do žlutohnědého. Zůstávají v roztoku i po odstranění huminových kyselin okyselením a jsou tedy obtížně izolovatelné [2, 9].

Zastoupení huminových kyselin a fulvinových kyselin se v různých typech půd liší. Lesní půdy jsou charakteristické vysokým obsahem fulvinových kyselin, zatímco rašelina nebo půdy travnatých plání mají vysoký obsah huminových kyselin [5].

Elementární složení fulvinových kyselin je stejné jako prvkové složení huminových kyselin. Mezi hlavní prvky, které jsou přítomné v jejich struktuře, patří také uhlík, vodík, kyslík, dusík a síra. Ovšem jejich procentuální zastoupení se mírně liší. Fulvinové kyseliny mají vyšší procentuální obsah kyslíku a obvykle nižší procentuální obsah uhlíku než huminové kyseliny, jak můžeme vidět v Tab. 3 [4].

Tab. 3: Prvkové složení fulvinových kyselin [8]

Prvek	Obsah (hm. %)
C	46
H	4,9
O	45,6
N	2,3
S	1,2

2.1.7 Rozpustnost a kyselé funkční skupiny

Rozpustnost látek je v chemické praxi velmi významným jevem zejména u kapalných roztoků – omezená vzájemná rozpustnost složek. Rozpouští-li se například krystalický Na_2SO_4 ve vodě, vytváří se postupně vodný roztok o stále větší koncentraci Na_2SO_4 , až se posléze další rozpouštění zastaví. Rozpustnost látky je definována jako koncentrace nasyceného roztoku určité látky při určitých fyzikálních podmínkách (teplotě a tlaku) [14].

Huminové látky jsou komplexní heterogenní molekuly, které jsou nejčastěji rozdělovány podle jejich rozpustnosti. Jak již bylo několikrát zmíněno, tak fulvinové kyseliny jsou plně rozpustné ve vodných roztocích, zatímco huminové kyseliny jsou rozpustné v silně zásaditých roztocích, které se v přírodních systémech nevyskytují. V přírodě je tedy vždy část huminových kyselin rozpuštěná – aktivně se podílí na jejich fungování a interakcích a část nerozpuštěná. Jejich vzájemný poměr se mění se změnou podmínek jako je teplota, pH, obsah cizích iontů nebo poměr mezi kapalnou a tuhou fází [8, 15].

Rozpustnost huminových kyselin je velmi důležitým faktorem při studiu jejich interakcí s kovovými ionty a radionuklidy. Závisí na pH, iontové síle a mnoha dalších faktorech. V roztocích se chovají jako micelární koloidy. Koloidní částice mají záporný náboj a tento izoelektrický bod leží v kyselé oblasti [15].

Funkční skupiny jsou definovaná uskupení atomů v molekulách, která mají své specifické schopnosti projevující se ve fungování látek navenek. Jejich prostřednictvím se dějí interakce s dalšími látkami [8].

Základní strukturní jednotkou fulvinových kyselin a huminových kyselin jsou převážně polycyklické aromatické sloučeniny s bočními alifatickými řetězci a hydrofilními skupinami vázanými jak na jádru, tak i v postranním řetězci. Kromě aromatických jader byly zjištěny i chinoidní struktury, které jsou spolu s hydroxyskupinami příčinou jejich oxidačně-redukčních vlastností, dusíkaté heterocyklické sloučeniny aj.

Charakteristickými skupinami přítomnými ve struktuře huminových látek jsou zejména karboxylové a hydroxylové funkční skupiny, a to zejména fenolová, dále alkoholická, methoxylová a karbonylová skupina. Karboxylové a fenolové, popř. ještě alkoholické dominují a jsou příčinou kyselosti a komplexační a sorpční kapacity huminových látek. Obvykle se udává, že v molekule je 4–5 karboxylových skupin a 3–4 fenolové skupiny [16].

Zejména karboxylové skupiny mají relativně silně kyselý charakter (disociační konstanty jsou v řádu 10^{-2} – 10^{-5}), zatímco hydroxylové skupiny jsou jen slabě kyselé (disociační konstanty řádu 10^{-9} – 10^{-11}). Protože fulvinové kyseliny obsahují více karboxylových skupin než huminové kyseliny, jsou i výrazně kyselejší. Kyselost huminových látek je dále ovlivněna rozmístěním karboxylových skupin v molekule, ale také přítomností ostatních funkčních skupin, jako jsou např. polární skupiny v blízkosti skupin karboxylových, které snižují jejich kyselost. Zásadní vliv na pH mají zejména substituenty v poloze ortho vůči karboxylové skupině.

Kromě hodnot disociačních konstant přítomných karboxylových a hydroxylových skupin je kyselost huminových látek ovlivněna také polaritou (dipólovým momentem) molekul. Polarita molekul huminových látek vzniká na základě nerovnoměrného rozložení náboje na jejich povrchu daného přítomností polárních skupin (–OH, –COOH, –OCH₃). Obecně platí, že čím je polarita huminových látek vyšší, tím je vyšší i jejich kyselost [4].

Při vzniku huminových kyselin (v průběhu humifikace) se v nich zvyšuje obsah COOH a C=O skupin, přičemž obsah alkoholových a fenolických OH skupin a skupin OCH₃ se v průběhu tohoto procesu snižuje. Hlavní rozdíl v obsahu funkčních skupin huminových a fulvinových kyselin je ten, že ve fulvokyselinách je prakticky všude kyslík obsažený v COOH, OH a C=O skupinách, zatímco v huminových kyselinách větší část kyslíku tvoří strukturní složku, tzv. „jádro“, což jsou například etherové a esterové vazby. Dalším rozdílem může být fakt, že obsah ketonových C=O skupin je vyšší ve fulvokyselinách, zatímco v huminových kyselinách se nacházejí spíše chinonové C=O skupiny [2].

2.2 Disociace huminových a fulvinových kyselin

Huminové a fulvinové kyseliny obsahují ve své struktuře postranní skupiny schopné elektrolytické disociace. Chovají se tedy jako slabě kyselé polyelektrolyty. Disociací vzniká polyaniont o velkém počtu elementárních nábojů a příslušný počet malých protiontů opačného náboje (H₃O⁺). Je důležité, že silné kyseliny disociují úplně, zatímco slabé kyseliny disociují pouze do určitého stupně [17].

Disociační chování huminových a fulvinových kyselin však není jednoduché, jelikož obsahují velké množství různých funkčních skupin (viz kapitola 2.1.7 věnující se funkčním skupinám) a navíc i okolní struktura jednotlivých funkčních skupin se liší, což má za následek, že prakticky žádná z těchto funkčních skupin není úplně stejná. Každá trochu jinak disociuje a má trochu jinou afinitu k ostatním látkám [8].

Chování huminových a fulvinových kyselin ve vodných roztocích lze charakterizovat disociační konstantou, podobně jako u jednoduchých organických kyselin. Na rozdíl od běžných kyselin, které mohou mít disociačních konstant několik, pokud obsahují více než jednu funkční skupinu, tak u huminových a fulvinových kyselin existuje celé spektrum

kyselých funkčních skupin s disociačními konstantami velmi vysokými (srovnatelné se silnými organickými kyselinami) až po disociační konstanty velmi nízké (podobné alkoholům a fenolům). Máme dvě krajní možnosti, jak charakterizovat sílu huminových a fulvinových kyselin. První z nich je taková, že bychom každé funkční skupině přiřadili její vlastní disociační konstantu – tato možnost je však nereálná. Druhou možností je každému vzorku přiřadit jen jednu hodnotu disociační konstanty, která by souhrnně charakterizovala všechny přítomné kyselé funkční skupiny dohromady. To sebou ale nese zase ten problém, že v jediné hodnotě disociační konstanty není možné obsáhnout širokou škálu vlastností těchto látek [8,18].

Deprotonaci libovolných iontových skupin v huminových a fulvinových kyselinách lze zapsat jako disociaci jednosytné kyseliny HA.

2.2.1 Disociace slabé jednosytné kyseliny

Disociaci slabé jednosytné kyseliny HA můžeme zapsat podle rovnice (1)



Tato reakce je charakterizována rovnovážnou konstantou K_{HA} zvanou disociační konstanta kyseliny, pro kterou platí rovnice (2)

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

Jelikož disociační konstanta nabývá velmi nízkých hodnot, velmi často se používá hodnota $\text{p}K_{\text{a}}$, což je záporný dekadický logaritmus disociační konstanty, což znázorňuje rovnice (3)

$$\text{p}K_{\text{a}} = -\log K_{\text{a}} \quad (3)$$

čím vyšší je hodnota $\text{p}K_{\text{a}}$, tím je nižší stupeň disociace.

Jestliže v systému neuvažujeme žádnou další reakci (např. disociaci vody), tak můžeme složení rovnovážné směsi vyjádřit pomocí stupně disociace podle rovnic (4), (5), (6)

$$c_{\text{HA}} = (1 - \alpha) \cdot c \quad (4)$$

$$c_{\text{H}^+} = \alpha \cdot c \quad (5)$$

$$c_{\text{A}^-} = \alpha \cdot c \quad (6)$$

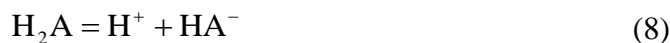
Rovnici (2) pak lze zapsat rovnicí (7) ve tvaru

$$K = \frac{\alpha^2 \cdot c \cdot \gamma_{\pm}^2}{(1 - \alpha) \cdot \gamma_{\text{HA}} \cdot c_{\text{st}}} \quad (7)$$

kde a je aktivita c_{H^+} , c_{A^-} , c_{HA} jsou molární koncentrace, γ je aktivitní koeficient, α je disociační stupeň a c je počáteční koncentrace kyseliny.

2.2.2 Disociace slabé vícesytné kyseliny

Slabá dvojsytná kyselina H_2A disociuje do prvního stupně podle rovnice (8)



a do druhého stupně podle rovnice (9)



Označíme-li rovnovážnou konstantu první reakce K_1 a druhé reakce K_2 , platí rovnice (10) a (11)

$$K_1 = \frac{c_{\text{H}^+} + c_{\text{HA}^-} \cdot \gamma_{\text{H}^+} + \gamma_{\text{HA}^-}}{c_{\text{H}_2\text{A}} \cdot \gamma_{\text{H}_2\text{A}} \cdot c_{\text{st}}}, \quad (10)$$

$$K_2 = \frac{c_{\text{H}^+} + c_{\text{A}^{2-}} \cdot \gamma_{\text{H}^+} + \gamma_{\text{A}^{2-}}}{c_{\text{HA}^-} \cdot \gamma_{\text{HA}^-} \cdot c_{\text{st}}}. \quad (11)$$

V oblasti koncentrací, kdy platí Debyeův-Hückelův limitní vztah je podle rovnic (12) a (13)

$$\gamma_{\text{H}^+} = \gamma_{\text{HA}^-}, \quad (12)$$

$$\gamma_{\text{A}^{2-}} = \gamma_{\text{H}^+}^4. \quad (13)$$

V případech, kde $K_1 \gg K_2$ (rozdíly v hodnotách disociačních konstant jsou tři a více řádů) není třeba disociaci do druhého a vyšších stupňů uvažovat.

2.2.3 Disociace silné vícesytné kyseliny

Silná dvojsytná kyselina H_2A disociuje do prvního stupně úplně podle rovnice (14)



a do druhého stupně do ustavení rovnováhy podle rovnice (15)



Pro disociační konstantu reakce platí rovnice (16)

$$K = \frac{c_{\text{H}^+} \cdot c_{\text{A}^{2-}} \cdot \gamma_{\pm}^4}{c_{\text{HA}^-} \cdot c_{\text{st}}}, \quad (16)$$

kde v souladu s Debyeovým-Hückelovým limitním vztahem, předpokládáme, že platí rovnice (17) a (18)

$$\gamma_{\text{H}^+} = \gamma_{\text{HA}^-}, \quad (17)$$

$$\gamma_{\text{A}^{2-}} = \gamma_{\text{H}^+}^4. \quad (18)$$

Neuvažujeme-li v roztoku žádné jiné ionty než ty, které vznikly reakcemi (14) a (15), můžeme rovnici (16) přepsat na rovnici (19)

$$K = \frac{c \cdot \alpha \cdot (1 + \alpha) \cdot \gamma_{\pm}^4}{1 - \alpha \cdot c_{\text{st}}}, \quad (19)$$

kde c je počáteční koncentrace kyseliny a α je stupeň disociace aniontu HA^- [19].

2.2.4 Metody používané ke studiu disociace a stanovení $\text{p}K_a$ huminových a fulvinových kyselin

Ke studiu disociačního chování huminových látek se používá celá řada metod. V následujících kapitolách se budu věnovat popisu alespoň některých z nich a dále také tím, co se v oblasti výzkumu stanovení $\text{p}K_a$ těmito metodami doposud udělalo.

2.2.4.1 Titrační metody

Titrační metody jsou často používaným způsobem pro stanovení disociačních konstant huminových a fulvinových kyselin. Jako titrační činidlo se nejčastěji používá standardizovaný roztok NaOH. Funkční skupiny, které podléhají disociaci, jsou především ty, které obsahují kyslík – v převážné většině karboxylové a fenolové skupiny, které přispívají k celkové kyselosti huminových látek [20]. Jelikož jsou huminové kyseliny polyelektrolyty, tak jednotlivé karboxylové a fenolové skupiny mají různé kyselé disociační konstanty [21]. Nejběžnějšími metodami pro stanovení zdánlivé disociační konstanty a celkové kyselosti jsou potenciometrické titrace.

Potenciometrická titrace

Potenciometrie je elektrochemická metoda založená na měření rovnovážného napětí galvanického článku. Článek je sestaven z měrné (indikační) a srovnávací (referenční) elektrody. Potenciál měrné elektrody závisí na koncentraci sledované látky, zatímco potenciál srovnávací elektrody je konstantní. Rovnovážné napětí, které je rozdílem těchto dvou potenciálů, je mírou koncentrace sledované látky. V potenciometrických titracích sledujeme závislost napětí vhodně sestaveného článku na objemu přidávaného titračního činidla a z titrační křivky pak vyhodnotíme bod ekvivalence. Titrační křivku můžeme teoreticky vypočítat, umíme-li vyjádřit potenciál měrné elektrody z Nernstovy nebo Nicolsky-Eisenmanovy rovnice. Granova metoda vyhodnocení potenciometrické titrační křivky vychází z linearizace Nernstovy rovnice [22].

Celková kyselost a průměrná zdánlivá disociační konstanta se nejčastěji vypočítává na základě upravené Henderson-Hasselbalchovy rovnice. Tato rovnice (20) vyjadřuje závislost zdánlivé disociační konstanty na stupni disociace.

$$\text{pH} = \text{p}K_{\text{app}} - \log \frac{\alpha}{1 - \alpha}, \quad (20)$$

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

Henderson-Hasselbalchova titrační křivka se vyjadřuje jako závislost pH na $-\log \left[\frac{\alpha}{1 - \alpha} \right]$.

Tato titrační křivka huminových a fulvinových kyselin není lineární. To svědčí o tom, že huminové kyseliny a fulvokyseliny obsahují ve své struktuře různé typy skupin, které jsou schopné disociace [23].

V práci [20] byl pomocí potenciometrické titrace s upravenou Henderson-Hasselbalchovou rovnicí zkoumán příspěvek karboxylových, fenolových a alkoholových hydroxylových funkčních skupin na celkovou kyselost huminových kyselin. Potenciometrická titrace byla provedena s huminovými kyselinami, které měly selektivně blokovány karboxylové a fenolové skupiny methylací pomocí $\text{CH}_3\text{I}/\text{Ag}_2\text{O}$ v dimethylformamidu. Selektivní blokace karboxylových a fenolových skupin kombinovaná s potenciometrií může poskytnout přesný odhad toho, jaký mají vliv blokováne a neblokované funkční skupiny právě na celkovou kyselost huminových kyselin. Na základě změřených FTIR spekter zjistili, že methylace způsobuje předpokládané strukturní změny. Hodnoty $\text{p}K_{\text{app}}$ se po methylaci zvyšují a počet volných ionizovatelných funkčních skupin se snižuje.

Autoři článku [23] použili acidobazickou potenciometrickou titraci ke stanovení acidobazických vlastností huminových kyselin IHSS (standards International Humic Substances Society), které rozdělili na frakce podle jejich molekulové hmotnosti. První frakce obsahovala huminové kyseliny o velké molekulové hmotnosti, následovala frakce o střední molekulové hmotnosti a jako poslední měli frakci o nízké molekulové hmotnosti. Pro kontrolní experiment používali huminovou kyselinu, která nebyla frakcionována. Obsah kyselých funkčních skupin a průměrné hodnoty zdánlivých $\text{p}K_{\text{app}}$ v těchto frakcích vyhodnocovali na základě upravené Henderson-Hasselbalchovy rovnice. Průměrné hodnoty $\text{p}K_{\text{app}}$ frakcionovaných a nefrakcionovaných huminových kyselin byly stanoveny v rozmezí 4,1–4,4. Zjistili, že obsah kyselých funkčních skupin a aromaticita roste se snižující se velikostí molekuly. To naznačuje, že obsah kyselých funkčních skupin je spojen s aromaticitou huminových kyselin.

V práci [24] byly acidobazické vlastnosti huminových látek (huminových kyselin HK a fulvinových kyselin FK) zkoumány potenciometrickou titrací roztokem NaClO_4 v koncentračním rozmezí $0,05\text{--}1 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$. Za účelem srovnání byly provedeny podobné titrace polyakrylové kyseliny. Titrace byly provedeny s roztoky HK a FK o koncentracích $0,500 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$ v rozmezí pH 3–11,2 v dusíkové atmosféře při teplotě 298 K. Z výsledků vyplývá, že celkové množství karboxylových skupin na gram huminových látek se snižuje v pořadí $7,2 \text{ meq}\cdot\text{g}^{-1}$ pro FK (izolovanou z uhlí) $> 5,1 \text{ meq}\cdot\text{g}^{-1}$ pro FK (z rašeliny) $> 4,4 \text{ meq}\cdot\text{g}^{-1}$ pro HK (z rašeliny) $> 3,4 \sim 4,5 \text{ meq}\cdot\text{g}^{-1}$ pro HK (z půdy). Hodnoty zdánlivých $\text{p}K_{\text{app}}$ se zvyšují v pořadí 3,1 \sim 3,3 pro FK (z uhlí) $< 3,5$ pro HK (z rašeliny) = 3,6 pro FK (z rašeliny) $< 3,7 \sim 4,0$ pro HK (z půdy).

V práci [25] byla acidobazická rovnováha huminových kyselin charakterizována jejich titrací v prostředí s různou iontovou silou ($I = 0,004-1$). Kyselé funkční skupiny rozdělili do dvou skupin (silné a slabé kyselé skupiny) a každé této skupině přiřadili určitou distribuci pK_a . Tyto skupiny jsou nepřetržitě deprotonovány podle jejich distribuce pK_a . Ze získaných dat vyhodnotili distribuci pK_a na těchto dvou centrech a také celkové množství funkčních skupin. Data vyhodnocují podle modelu vytvořeného na základě Debye-Hückelovy teorie a srovnávají je s modelovou kyselinou galovou. Hodnoty pK_a na těchto dvou centrech stanovili na 3,03 a 5,12. Tyto hodnoty odpovídají dvěma typům karboxylových kyselin, což potvrdili pomocí FTIR spekter.

Autoři článku [26] zkoumali disociační vlastnosti fulvinové kyseliny označované jako Laurentide, která byla izolována z rašeliny. Pro zjištění vlivu iontové síly prováděli potenciometrické titrace v prostředích o různých iontových silách. K tomu navíc prováděli titraci v nevodném prostředí. Na základě experimentu zjistili, že pozorované disociační vlastnosti této fulvokyseliny mohou být popsány s ohledem na pět převládajících kyselých skupin. Z informací získaných titrací v nevodném prostředí a titrací v přítomnosti přebytku kovových iontů (Cu^{2+} , Eu^{3+}) dále zjistili, že tři kyselé skupiny jsou karboxylové povahy, zatímco další dvě jsou alkoholové povahy. Přístup, který byl použit v této studii pro charakterizaci kyselých vlastností této fulvokyseliny, je doporučován jako určující krok k pochopení interakcí mezi přírodními organickými kyselinami a kovovými ionty.

Článek [27] se zabývá stanovením koncentrací karboxylových a fenolových skupin a zdánlivého pK_{app} půdních huminových kyselin pomocí metody přímé potenciometrické titrace. Acidobazické vlastnosti huminových kyselin jsou zkoumány pomocí selektivní blokace karboxylových a fenolových skupin metodou esterifikace nebo acetylace. Díky tomu, že karboxylové a fenolové skupiny mají vliv na celkovou kyselost huminových kyselin, tak acidobazické vlastnosti blokových a neblokových huminových kyselin se liší. Data obdržená potenciometrickou titrací byla vyhodnocena pomocí upravené Henderson-Hasselbalchovy rovnice. Po blokaci funkčních skupin se obsah kyselých skupin snížil, zatímco hodnota zdánlivého pK_{app} se zvýšila, protože se snížil počet volných karboxylových, fenolových a alkoholových skupin. Dále bylo zjištěno, že fenolové skupiny nelze metodou acetylace přesně identifikovat v důsledku nízké selektivity této metody.

Cílem autorů článku [28] bylo stanovit koncentraci a pK_a ionizovatelných funkčních skupin huminových kyselin acidobazickou potenciometrickou titrací. Získaná data byla vyhodnocena lineární metodou založenou na upravené Granově funkci. Výsledky byly srovnány s výsledky získanými konduktometrickou titrací NaOH a $Ba(OH)_2$, s infračervenými spektry huminových kyselin s různými stupni protonizace a s klasickou kalcium-acetátovou a baryum-hydroxidovou metodou.

V práci [29] byly stanovovány acidobazické vlastnosti tří fulvinových kyselin, které byly izolovány z odlišných půdních horizontů (z různých hloubek). Acidobazické vlastnosti stanovovali potenciometrickou titrací při různých koncentracích fulvokyselin (40, 80 a $120 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$) a v prostředí s různými iontovými silami (0,01, 0,1 a $1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3} \text{ KNO}_3$). Jako titrační činidlo používali $0,02 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3} \text{ KOH}$. Experimentální data vyhodnocovali na základě modelu elektrické dvojvrstvy. Analýza ve všech případech ukázala dva píky. První

při $\log K \sim 4$ a druhý při $\log K \sim 8-9$. Tyto píky jsou přisuzovány karboxylovým, respektive hydroxylovým skupinám. Z vypočítaných hodnot $\log K$ zjistili, že vzorky fulvinových kyselin izolované ze třech půdních horizontů vykazují téměř podobné chování.

Metoda potenciometrické titrace byla v práci [30] použita ke stanovení acidobazických vlastností 14 standardních a referenčních vzorků huminových kyselin (HK), fulvokyselin (FK) a přírodní organické hmoty (NOM), které byly zakoupeny od společnosti IHSS. Koncentrace karboxylových a fenolových skupin byly stanovovány přímo z titračních křivek. Experimentální data vyhodnocovali na základě upraveného Henderson-Hasselbalchového modelu. Obsah karboxylových skupin stanovili u IHSS vzorků v pořadí terestrické FK > vodní FK > Suwannee River NOM > vodní HK > terestrické HK. Celkově lze říci, že huminové kyseliny i fulvokyseliny mají podobný obsah fenolových skupin, nicméně všechny vzorky získané z vody mají vyšší obsah fenolových skupin než terestrické vzorky. Dále zjistili, že acidobazické vlastnosti referenčního vzorku Suwannee River NOM jsou překvapivě podobné vlastnostem standardního vzorku HK Suwannee River. Výsledky z titrací získané v této studii dále porovnávají s jinými publikovanými výsledky z přímých i nepřímých titrací.

Konduktometrická titrace

Autoři článku [31] prováděli konduktometrické titrace standardních huminových a fulvinových kyselin, které byly zakoupeny od společnosti IHSS. Titrace prováděli v mírném přebytku hydroxidu a jako titrační činidlo použili standardní kyselinu HCl. Tuto studii prováděli za účelem kvalitativního posouzení vztahu mezi velikostí molekuly (agregátu) ve vodném roztoku a sklonem titrační křivky. Sklon titrační křivky odpovídající protonaci humátu/fulvátu je spojen s elektroforetickou mobilitou polyaniontů nebo agregátů a tím i s jejich velikostí. Porovnávali sklony vodivostních křivek různých huminových a fulvinových kyselin. Zjistili, že frakce fulvinových kyselin díky tomu, že mají menší velikost molekul, mají i menší sklony. Nahrazení relativně mobilního aniontu fulvátu aniontem Cl^- způsobí pouze malé zvýšení vodivosti roztoku. Na rozdíl od toho huminové kyseliny izolované z rašeliny a z půdy obsahují velké polymerní látky, a když dojde k výměně aniontů, tak to má značný vliv na vodivost a to vede k velkému sklonu křivky. Ostatní humáty spadají mezi tyto dva extrémy.

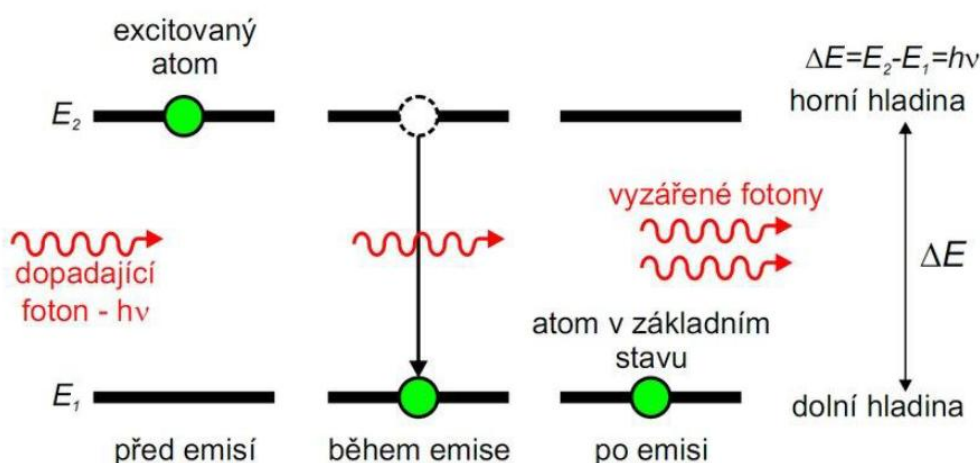
V článku [32] byly na základě konduktometrické titrace zkoumány metody frakcionace funkčních skupin huminových kyselin. Titrace opět probíhala v přebytku zásady a jako titrační činidlo opět použili standardní kyselinu. Funkční skupiny huminových kyselin rozdělili do tří skupin s odlišnými hodnotami disociačních konstant. Do první skupiny spadaly velmi slabé funkční skupiny jako např. část fenolových, karboxylových skupin a dusíkaté báze s velmi vysokými hodnotami $\text{p}K_a$. Druhá skupina zahrnovala slabé funkční skupiny – karboxylové skupiny na různých druzích alifatických a aromatických monomerních jednotkách se střední hodnotou $\text{p}K_a$. Poslední skupinu tvořily silné funkční skupiny – karboxylové skupiny s velmi nízkou hodnotou $\text{p}K_a$. Hodnoty $\text{p}K_a$ neustále rostou s neutralizací, protože karboxylové skupiny jsou zahrnuty ve všech třech skupinách.

2.2.4.2 Spektrofotometrické metody

UV–VIS spektrometrie je analytickou metodou, kterou řadíme mezi elektromagnetické spektrometrické metody. Podstatou UV–VIS spektrometrie je absorpce ultrafialového a viditelného záření (200–800 nm) zředěnými roztoky molekul. Při absorpci dochází k excitaci valenčních elektronů, které jsou součástí molekulových orbitalů. Proto molekulová absorpční spektra v ultrafialové a viditelné oblasti jsou svou podstatou elektronová spektra. Měření absorbance se hojně využívá k určení koncentrace sloučenin s chromofory. Pracuje se obvykle metodou kalibrační křivky. Ultrafialová a viditelná spektrometrie je využívána v průtočných celách detektorů různých separačních metod, např. kapalinové chromatografie a kapilární elektroforézy. Měření je prováděno buď při vhodné vlnové délce, nebo jsou snímána celá spektra v krátkých časových intervalech. [22, 33].

Interakce látky s elektromagnetickým zářením

Molekula se za běžných podmínek nachází na základní vibrační hladině a její elektrony nejsou excitovány. Absorpcí fotonu přijme energii, která vede k přechodu elektronu na excitovanou hladinu a molekula přejde na jednu z mnoha vibračních a rotačních hladin. Po excitaci přechází molekula zářivými či nezářivými přechody do základního stavu. Celý tento proces je znázorněn na Obr. 6 [22].



Obr. 6: Interakce látky s elektromagnetickým zářením [33]

Charakteristika absorpčního pásu

Jeden absorpční pás ve spektru odpovídá jednomu typu přechodu elektronů v molekule do excitovaného stavu. Polohu píku určuje λ_{\max} , což je vlnová délka maxima pásu. Při této vlnové délce je absorbance nejvyšší [22].

Základní vztahy

Transmittance – je podle rovnice (21) poměr zářivého toku prošlého k dopadajícímu. Často se udává v procentech. Je-li absorpce záření nulová, transmittance je jednotková (100 %).

$$T = \frac{I}{I_0} \quad (21)$$

Absorbance – je definována podle rovnice (22) jako záporný dekadický logaritmus transmitance. Je-li absorpce záření nulová, je nulová i absorbance. S rostoucí absorpcí záření roste i absorbance. Pro praktické měření zpravidla mívají význam hodnoty nepřekračující jednotku.

$$A = -\log T = \log \frac{I_0}{I} \quad (22)$$

Lambert-Beerův zákon – tento zákon znázorňuje rovnice (23) a říká nám, že absorbance je přímo úměrná koncentraci absorbující látky, molárnímu absorpčnímu koeficientu a tloušťce absorbující vrstvy. Lambert-Beerův zákon je splněn jen pro zředěné roztoky do koncentrací zhruba $10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$.

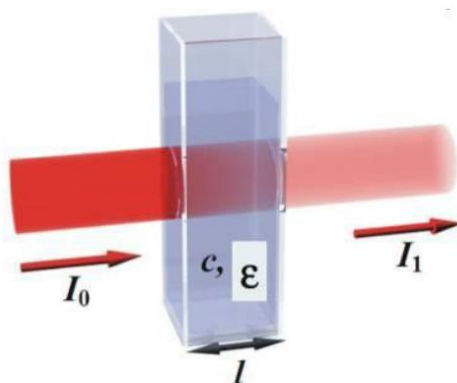
$$A = \varepsilon_{\lambda} \cdot c \cdot l, \quad (23)$$

kde ε_{λ} je molární absorpční koeficient při určité vlnové délce, c je koncentrace absorbující látky a l je tloušťka absorbující vrstvy.

Absorbance je aditivní veličinou. Absorbují-li záření dané vlnové délky dvě a více složek, je celková absorbance podle rovnice (24) součtem absorbancí jednotlivých složek [22].

$$A = \sum_{i=1}^n A_i = \sum_{i=1}^n \varepsilon_{\lambda,i} \cdot c_i \cdot l \quad (24)$$

Obr. 7 nám znázorňuje záření procházející kyvetou.



Obr. 7: Průchod záření kyvetou [33]

Práce [34] se zabývá stanovením disociační konstanty felodipinu pomocí UV–VIS spektrofotometrie. Felodipin je derivát 1,4-dihydropyridinu a používá se při léčbě angíny pectoris a hypertenze. Disociační konstanta je důležitou fyzikálně-chemickou vlastností léčiv. Spektrofotometrické stanovení pK_a poskytuje relativně přesné hodnoty. pK_a felodipinu bylo v této práci stanoveno na 5,07.

V publikaci [35] je použita metoda spektrofotometrického stanovení disociační konstanty u výluhů pykrátů alkalických kovů (lithium, sodík, draslík) a pykrátu tetrabutylamonného, které jsou rozpuštěny ve 4-methyl-2-pentanonu. Touto studií se zjistilo, že při nízké

koncentraci roztoku dochází téměř k úplné disociaci. Se zvyšující se koncentrací roztoku klesá schopnost disociovat. Disociace u pykrátů alkalických kovů si je téměř podobná a příliš se mezi sebou neliší. Pykrát tetrabutylamonný disociuje o něco více. V roztocích o nízké koncentraci souhlasí spektra pykrátů alkalických kovů se spektrem pykrátu tetrabutylamonného. Se vzrůstající koncentrací se pík posouvá k nižším vlnovým délkám.

Autoři článku [36] se zabývají stanovením acidobazických disociačních konstant metodou UV–VIS spektrofotometrie. Ke studiu použili roztoky methylovaného (MO) a bromthymolové modři (BTB) při dvanácti různých hodnotách pH. Pro MO bylo pH v rozmezí 2,21–5,96 a pro BTB v rozmezí 4,32–8,56. Průměrnou hodnotu pK_a vypočítali pomocí druhé derivace absorpčních spekter. Pro MO byla tato hodnota stanovena na 3,46 a pro BTB na 7,14. Tyto hodnoty pK_a se shodovaly s hodnotami uvedenými v literatuře. Na základě těchto výsledků usoudili, že tato metoda může být efektivně využita pro stanovení pK_a slabých organických kyselin a zásad.

Spektrofotometrická metoda byla v práci [37] použita za účelem stanovení disociační konstanty u nukleofilů obsahujících oximové skupiny (jako je např. pralidoxim nebo butan-2,3-dion monoxim). Analýza byla provedena v čisté vodě a v 50% směsi vody a acetonitrilu. Dále zkoumali vliv povrchové koncentrace na pK_a pralidoximu. Zjistili, že pK_a pralidoximu není ovlivněno jeho povrchovou koncentrací.

Autoři publikace [38] se zabývají studiem disociačních vlastností kyseliny šťavelové metodou UV–VIS spektrofotometrie. Roztoky kyseliny šťavelové byly připravovány za použití různých rozpouštědel s odlišnými dielektrickými konstantami (ethylalkohol, n-propylalkohol, isopropylalkohol a N-dimethylformamid). Zjistili, že absorbance kyseliny šťavelové se mění s teplotou a koncentrací roztoků, a tak byl pro každý roztok získán vztah mezi absorbancí a koncentrací při různých teplotách. Na základě Lambert-Beerova zákona spočítali molární absorpční koeficienty v různých rozpouštědlech a při různých teplotách. Výsledky naznačují nepřesnost Lambert-Beerova zákona při vysokých koncentracích roztoků.

Vědci v článku [39] zkoumali kyselou rovnováhu 5-(*p*-dimethylbenzyliden) rhodnaninu (PDR) ve vodném micelárním roztoku pomocí jednoduché spektrofotometrické metody. Byl studován účinek neiontových, kationových a anionových povrchově aktivních látek na absorpční spektra PDR při různých hodnotách pH a bylo stanoveno pK_a PDR při různých koncentracích každé povrchově aktivní látky. Zjistili, že PDR disociuje více v přítomnosti kationové povrchově aktivní látky, zatímco nejmenší disociace nastává v přítomnosti anionové povrchově aktivní látky.

2.2.4.3 Konduktometrické metody

Charakteristickou vlastností roztoků elektrolytů je jejich schopnost vést elektrický proud – vodivost. Vodivost (G) pevného vodiče s konstantním průřezem S a délkou l vyjadřuje rovnice (25)

$$G = \kappa \cdot \frac{S}{l}, \quad (25)$$

kde κ je konduktivita.

Vodivost roztoků elektrolytů měříme pomocí střídavého proudu s tak vysokou frekvencí, při které nedochází k elektrolýze. Vlastnosti měřicí nádobky charakterizujeme hodnotou její odporové kapacity C , kterou stanovujeme pomocí roztoku se známou konduktivitou podle rovnice (26)

$$C = \frac{\kappa}{G} = \kappa \cdot R \quad (26)$$

Molární vodivost i -tého elektrolytu vyjadřuje schopnost vést elektrický proud všemi ionty vzniklými rozpuštěním jednoho molu elektrolytu v daném objemu rozpouštědla. Vztah mezi molární vodivostí λ_i , konduktivitou κ_i a molární koncentrací c_i i -tého elektrolytu vyjadřuje rovnice (27)

$$\lambda_i = \frac{\kappa_i}{c_i}. \quad (27)$$

U molární vodivosti je třeba zvlášť specifikovat částice daného elektrolytu, kterých se uvažuje jeden mol. Uvažované částice mohou být molekuly, elektrony, ionty, atomy nebo stechiometricky zvolená skupina. Závislost molární vodivosti λ_i na složení roztoku udává empirický Kohlrauschův vztah, který je uveden v rovnici (28)

$$\lambda_i = \lambda_i^\infty - a\sqrt{c_i}, \quad (28)$$

kde a je empirická konstanta a λ_i^∞ je mezní molární vodivost (hypotetická molární vodivost pro $c_i \rightarrow 0$).

Pro nekonečně zředěný roztok platí Kohlrauschův zákon nezávislosti pohybu iontů dle rovnice (29)

$$\lambda_i^\infty = \lambda_+^\infty + \lambda_-^\infty, \quad (29)$$

kde λ_+^∞ a λ_-^∞ jsou mezní molární vodivosti kationtu a aniontu elektrolytu. Poměr $\lambda_i / \lambda_i^\infty$ je u slabých elektrolytů roven stupni elektrolytické disociace α_i , který představuje podíl disociovaných molekul dle rovnice (30) [40]

$$\alpha_i = \frac{\lambda_i}{\lambda_i^\infty}. \quad (30)$$

Práce [41] se zabývá konduktometrickým stanovením disociační konstanty u látek podobných huminovým látkám, které jsou obsaženy v atmosféře, v rozmezí molekulových hmotností 250–310 Da. Pracují se zředěnými roztoky, kde předpokládají přítomnost pouze jedné karboxylové skupiny schopné disociace. Došli k závěru, že tyto látky se chovají jako mírně silné/slabé kyseliny, stejně jako např. kyselina mravenčí ($pK_a = 3,74$) nebo kyselina mandlová ($pK_a = 3,41$), a jejich pK_a stanovili na 3,4. Toto pK_a velmi dobře koresponduje s intervalem představovaným fulvinovými ($pK_a = 3,4$) a huminovými kyselinami ($pK_a = 3,7$).

V publikaci [42] byly zkoumány spektrofotometrické vlastnosti, rozpustnost a vodivost u látek podobných huminovým látkám, které jsou obsaženy v atmosféře. Celková průměrná molekulová hmotnost byla stanovena na 556 Da a nadbytek aromatického uhlíku na 12 %. Oba výsledky jsou podstatně nižší, než pro standardní referenční fulvinové kyseliny, z čehož můžeme usuzovat, že tyto látky vznikají odlišným mechanismem. Bylo zjištěno, že rozpustnost roste lineárně od koncentrace 5 do 20 g·dm⁻³ těchto rozpuštěných látek. Dále bylo dokázáno rozpouštění iontů pomocí elektrochemické vodivosti. Limitní molární vodivost byla extrapolována a použita pro stanovení zdánlivého disociačního stupně pro různé koncentrace těchto látek. Disociační stupeň byl dále použit pro odvození koncentrační závislosti van't Hoffova faktoru. Van't Hoffův faktor se monotónně snižoval s koncentrací huminových látek. Pokles byl podstatný pro zředěné roztoky a slábl pro koncentrovanější roztoky.

2.2.4.4 Chronopotenciometrie

Tato elektrochemická metoda se používá jak pro účely stanovení stopových množství rozpuštěných látek, tak ke stanovení obsahu H⁺ iontů. K měření se využívá metoda galvanostatické rozpouštěcí chronopotenciometrie. Je založená na kvantitativní redoxní přeměně analytu konstantním proudem. V první části měření dochází k elektrochemickému nahromadění analytu na elektrodě. V dalším kroku se analyt rozpouští za konstantního proudu a sleduje se změna potenciálu elektrody v čase. Derivací naměřené závislosti dojde k transformaci původních naměřených vln na píky, ve kterých plocha píku udává přechodový čas. Při používání konstantního rozpouštěcího proudu je možné pomocí Faradayova zákona vypočítat množství vyloučeného analytu nebo rovněž přímo určit koncentraci analytu ve vzorku podle rovnice (31)

$$c = \frac{n}{V} = \frac{i \cdot \tau}{R \cdot z \cdot F \cdot V}, \quad (31)$$

kde n je látkové množství analytu, i je rozpouštěcí proud, R je elektrochemický výtěžek, z je náboj rozkládaného analytu a F je Faradayova konstanta.

Měřením se tedy určí doba rozpouštění (chronopotenciometrický přechodový čas), který je úměrný koncentraci analytu v analyzovaném vzorku. Poloha píku závisí na charakteru použitého elektrolytu a na rozpouštěcím proudem. Plocha píku představuje chronopotenciometrický přechodový čas, ze kterého se určuje koncentrace analytu [43, 44].

Autoři článku [45] používají jednoduchou a rychlou chronopotenciometrickou metodu ke stanovení koncentrace H⁺ iontů u roztoků o vysoké kyselosti a zásaditosti. Používali k tomu platinovou pracovní elektrodu a použití právě této elektrody umožňuje měření H⁺ iontů jak u silných kyselin (jako je např. kyselina sírová o koncentraci 2,5 mol·dm⁻³), tak u roztoků silných bází (jako je např. hydroxid sodný o koncentraci 1 mol·dm⁻³). Tuto metodu aplikovali na stanovení koncentrace H⁺ iontů u vzorků odpadních vod z papíren (stanovené pH = 9,5), odpadních vod ze zinkových pecí (pH = 2,2), říčních vod (pH = 6,5) a koloidního roztoku hydroxidu železa (pH = 5,4). Dále se zabývali výpočtem ionizační konstanty kyseliny

fluorovodíkové, kterou stanovili na $6,67 \cdot 10^{-4}$, což je v dobré shodě s teoretickou hodnotou $7,24 \cdot 10^{-4}$ uváděnou v literatuře.

2.2.4.5 Ostatní metody

Coulometrie

Pro kvantitativní a rovnovážnou analýzu roztoků huminových kyselin byla v práci [46] použita kombinace potenciometrie a coulometrie za konstantního proudu. Tato metoda je založena na potenciometrické titraci alkalických roztoků, které obsahují kromě huminových kyselin i $1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3} \text{ NaClO}_4$. Autoři používali ke stanovení celkové kyselosti a disociačních konstant dvě huminové kyseliny. První z nich byla huminová kyselina izolovaná z půdy z oblasti Monte Finestra v Itálii (HK₁), další byla huminová kyselina komerčně zakoupená od firmy Fluka. Zde stanovovali celkovou kyselost a disociační konstanty pro čerstvě připravený vzorek (HK₂) a pro vzorek starý 20 dní (HK₃). Celková kyselost může být určena pomocí upravených Granových diagramů nebo ze sumy nejmenších čtverců. Pro HK₁ stanovili celkovou kyselost na $3,9 \text{ mmol} \cdot \text{g}^{-1}$ a $\text{p}K_{\text{a}}$ na 4,04; 7,41 a 9,46, pro HK₂ byla celková kyselost $5,86 \text{ mmol} \cdot \text{g}^{-1}$ a $\text{p}K_{\text{a}}$ 3,9; 7,3 a 9,5 a pro HK₃ určili celkovou kyselost na $9,5 \text{ mmol} \cdot \text{g}^{-1}$ a $\text{p}K_{\text{a}}$ 3,9; 7,6 a 9,4. Celková kyselost HK₃ se téměř zdvojnásobila, což přisuzují hydrolyze esterových vazeb. Experimentální výsledky potvrzují, že coulometrie za konstantního proudu je velmi účinná a přesná metoda ke stanovení kyselosti roztoků huminových kyselin.

Diferenciální skenovací potenciometrie

V práci [47] byla použita metoda diferenciální potenciometrie k určení acidobazických vlastností huminových kyselin. Tato metoda se používá k titraci sloučenin o malém množství, které jsou málo rozpustné ve vodném prostředí. Autoři této práce stanovovali distribuci pufrační kapacity, hodnoty zdánlivých disociačních konstant a povrchového náboje huminových kyselin. K tomuto účelu byly použity huminové kyseliny, které byly extrahovány ze dvou různých půd s odlišnou vegetací. Stanovili 6 disociačních konstant pro 4 různé huminové kyseliny. Hodnota $\text{p}K_{\text{a}1}$ byla pro všechny 4 huminové kyseliny stanovena na 3,5, kdy tuto hodnotu přisoudili karboxylovým kyselinám o vysoké kyselosti. Hodnoty $\text{p}K_{\text{a}6}$ pro tyto huminové kyseliny ležely v rozmezí 10,4–10,6 a tyto hodnoty mohou být přisouzeny fenolickým skupinám.

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Použité přístroje

- pH metr METTLER TOLEDO, Seven Easy
- konduktometr METTLER TOLEDO, Seven Easy
- kombinovaný altimetr Mettler Toledo SevenMulti s pH elektrodou a vodivostní sondou
- UV–VIS spektrofotometr HITACHI U-3900H
- průtokový analyzátor EcaFlow model 150 GLP

3.2 Použité chemikálie

- síran sodný bezvodý p.a., Penta
- kyselina chlorovodíková 35% p.a., Penta
- destilovaná voda
- fulvinové kyseliny
 - IHSS Nordic Aquatic 1R105F
 - IHSS Elliott Soil 3S102F
 - IHSS Suwannee River 2S101F
 - IHSS Pahokee Peat 2S103F
- huminové kyseliny
 - IHSS Nordic Aquatic 1R105H
 - IHSS Elliott Soil 1S102H
 - IHSS Suwannee River 2S101H
 - IHSS Pahokee Peat 1S103H
 - IHSS Gascoyne Leonardite BS104L

3.3 Vzorky huminových a fulvinových kyselin

Ke studiu disociačního chování byly použity čtyři druhy fulvinových kyselin FK₁ (Nordic Aquatic), FK₂ (Elliott Soil), FK₃ (Suwannee River), FK₄ (Pahokee Peat) a pět druhů huminových kyselin HK₁ (Nordic Aquatic), HK₂ (Elliott Soil), HK₃ (Suwannee River), HK₄ (Pahokee Peat) a HK₅ (Leonardite), které se liší svým původem. Vzorky byly zakoupeny od společnosti IHSS a všechny, kromě FK₁ a HK₁, jsou označovány jako standardy a musí splňovat určitá kritéria, které jsou uvedeny na webových stránkách společnosti IHSS. Vzorky FK₁ a HK₁ jsou označovány jako referenční a nespĺňují nejméně jednu podmínku pro standardní huminové látky. Jednotlivé vzorky jsou izolovány z různých přírodních zdrojů, které zde ve zkratce charakterizují.

Suwannee River

Řeka Suwannee pramení v parku, který se nazývá Okefenokee Swamp v jižní Georgii a pokračuje na jihozápad do Mexického zálivu. V parku Okefenokee Swamp se nacházejí ložiska bohaté na rašelinu, nicméně se předpokládá, že většinu rozpuštěného organického uhlíku poskytuje jeho vodám rozkládající se vegetace. Na svém horním toku v Okefenokee Swamp má řeka Suwannee pH nižší než 4 a koncentrace rozpuštěného organického uhlíku je zde v rozmezí 25–75 mg·dm⁻³.

Elliott Soil

Půda Elliott je úrodná prérijní půda států Indiana, Illinois a Iowa v USA. Vzorek IHSS byl získán z nedotčené oblasti vojenského muničního závodu (Joliet Army Ammunition Plant) poblíž města Joliet ve státě Illinois. Vzorky Elliott se vyznačují tím, že se získávají z velmi hlubokých poněkud špatně odvodněných půd.

Pahokee Peat

Pahokee Peat je typická zemědělská rašelinná půda národního parku Everglades na Floridě. Vzorky řady Pahokee se získávají z mírně hlubokých a hlubokých velmi špatně odvodněných půd. Tato půda se tvoří v organických ložiscích sladkovodních bažin.

Leonardite

Leonardite je produkovan přirozenou oxidací hnědého uhlí těženého v povrchovém dolu Gascoyne, poblíž Bowman County v Severní Dakotě, USA.

Nordic Reservoir

Tento vzorek byl získán z vodního zdroje pitné vody Vallsjøen ve městě Skarnes, Norsko. Vodní nádrž je 225 m nad mořem a má maximální hloubku kolem 14 m [48].

3.4 Pracovní postup

Nejprve bylo připraveno extrakční činidlo pro huminové a fulvinové kyseliny, což je 1,5% roztok síranu sodného rozpuštěného v destilované vodě. Tento roztok byl dále použit jako nosný elektrolyt pro měření koncentrace H^+ iontů na přístroji EcaFlow.

3.4.1 Příprava roztoků pro studium disociačních konstant

Suspenze huminových kyselin byly připravovány tak, že se navázilo určité, předem dané množství huminových kyselin, které byly extrahovány v 10 ml extrakčního činidla. Tato extrakce probíhala po dobu 24 hodin. Suspenze byly poté přefiltrovány přes mikrofiltr o velikosti 0,45 μm pomocí injekční stříkačky. Po přefiltrování bylo u každého výluhu změřeno pH, vodivost, koncentrace H^+ iontů pomocí průtokového analyzátoru EcaFlow a UV–VIS spektra v rozsahu vlnových délek 200–900 nm.

Roztoky fulvinových kyselin byly připravovány tak, že nejdříve byly připraveny roztoky fulvokyselin v síranu sodném o koncentracích 10 $g \cdot dm^{-3}$ tak, že bylo naváženo určité předem vypočítané množství fulvokyselin a ty byly smíchány s extrakčním činidlem. Tyto roztoky byly ponechány míchat 24 hodin do rozpuštění. Roztoky fulvokyselin v síranu sodném o koncentracích 8; 5; 3; 1; 0,5; 0,1; 0,05 a 0,01 $g \cdot dm^{-3}$ byly připravovány ředěním roztoků o vyšších koncentracích podle předem vypočítaných objemů. U všech těchto roztoků bylo taktéž změřeno pH, vodivost, koncentrace H^+ iontů pomocí průtokového analyzátoru EcaFlow a UV–VIS spektra v rozsahu vlnových délek 200–900 nm.

3.4.2 Charakterizace huminových a fulvinových kyselin

Pro charakterizaci kvality výluhů huminových a roztoků fulvinových kyselin v Na₂SO₄ byla použita metoda UV–VIS spektrofotometrie.

Huminové a fulvinové kyseliny mají vysokou schopnost světelné absorpce v UV–VIS oblasti, proto můžeme použít elektronová absorpční spektra pro charakterizaci těchto vysokomolekulárních látek a přibližně určit chemickou strukturu a typy vazeb v molekule. Spektrální čáry představují závislost absorpce na vlnové délce a jejich tvar závisí na chemickém složení HK a FK (intenzitě zbarvení měřeného roztoku). Čím více klesá absorpce, tím strmější má křivka tvar a tím vyšší hodnoty má barevný index [6, 49]. Hodnota barevného indexu $E_{4/6}$ je dána poměrem absorpce HK a FK při vlnové délce 465 nm a 665 nm.

Zralost huminových látek byla stanovena z rozdílu logaritmických hodnot absorpce při vlnových délkách 400 nm a 600 nm podle vztahu (32).

$$\Delta \log K = \log \frac{A(400 \text{ nm})}{m} - \log \frac{A(600 \text{ nm})}{m}, \quad (32)$$

kde m je hmotnost HK nebo FK.

Podle hodnot koeficientu $\Delta \log K$ rozlišujeme typy A, B a Rp podle zralosti:

- Typ A představuje HK s vysokým stupněm humifikace (hodnoty $\Delta \log K$ do 0,60). HK v této skupině jsou vysoce stabilní, mají vysokou molekulovou hmotnost a vysoký stupeň kondenzace aromatických skupin.
- Typ B je skupina HK s $\Delta \log K$ v rozmezí 0,60–0,80. Tyto HK mají nižší molekulovou hmotnost a nižší stupeň humifikace.
- Typ Rp zahrnuje HK s hodnotou $\Delta \log K$ v rozmezí 0,80–1,10. Tato skupina obsahuje HK s ještě nižší molekulovou hmotností a s nižším stupněm humifikace a vysokým obsahem alifatických skupin [49, 50].

3.4.3 Stanovení pK_a huminových a fulvinových kyselin

3.4.3.1 Konduktometrická metoda

Pro konduktometrickou metodu stanovení pK_a byly použity výluhy huminových kyselin v Na₂SO₄ (stanovení disociační konstanty určité frakce huminové kyseliny) a roztoky fulvinových kyselin v Na₂SO₄ (stanovení disociační konstanty celého vzorku). Disociační konstanty byly stanoveny podle vztahu (33).

$$K_{\text{HA}} = c_0 \frac{\lambda^2}{\lambda^\infty (\lambda^\infty - \lambda)}, \quad (33)$$

kde c_0 je formální koncentrace látkového množství rozpuštěné kyseliny HA.

3.4.3.2 Kombinace měření pH a obsahu kyselých funkčních skupin v Na₂SO₄

Byl zapnut průtokový analyzátor EcaFlow a počítač. Poté byl spuštěn program EcaFlow, kde tlačítkem regenerace byla elektroda regenerována. Nejprve byly proměřeny standardy pro vytvoření kalibrační přímky. Jako standard byla použita kyselina chlorovodíková, jejíž koncentrace byly 5, 10 a 20 mmol·dm⁻³. Po změření kalibrace byly proměřeny výluhy huminových kyselin a roztoky fulvinových kyselin. Jako nosný elektrolyt byl použit 1,5% roztok Na₂SO₄, do kterého byly huminové a fulvinové kyseliny extrahovány. Dále bylo u výluhů huminových kyselin a roztoků fulvokyselin změřeno pH.

4 VÝSLEDKY A DISKUZE

4.1 Charakterizace huminových a fulvinových kyselin

4.1.1 Acidobazické vlastnosti

Použité vzorky huminových a fulvinových kyselin jsou standardy zakoupené od společnosti IHSS a jejich acidobazické vlastnosti, konkrétně obsah karboxylových skupin, hydroxylových skupin, průměrná hodnota pK_{a1} , která odpovídá disociaci silných skupin, hodnota pK_{a2} , která odpovídá disociaci slabých skupin a maximální hustoty náboje Q_1 a Q_2 , jsou znázorněny v Tab. 4 a Tab. 5.

Tab. 4: Acidobazické vlastnosti použitých fulvinových kyselin [48, 51, 52]

Vzorek	Obsah COOH skupin (mmol/g)	Obsah OH skupin (mmol/g)	Q_1 (mmol/g)	pK_{a1}	Q_2 (mmol/g)	pK_{a2}
Nordic Aquatic 1R105F	11,16	3,18	12,15	3,79	1,49	9,67
Elliot Soil 2S102F	13,24	2,27	14,12	3,67	0,74	9,53
Suwannee River 2S101F	11,17	2,84	11,16	3,76	2,05	9,84
Pahocee Peat 2S103F	13,34	2,32	14,22	3,99	0,76	9,57

Tab. 5: Acidobazické vlastnosti použitých huminových kyselin [48, 51, 52]

Vzorek	Obsah COOH skupin (mmol/g)	Obsah OH skupin (mmol/g)	Q_1 (mmol/g)	pK_{a1}	Q_2 (mmol/g)	pK_{a2}
Nordic Aquatic 1R105H	9,06	3,23	10,32	4,32	1,64	9,89
Elliot Soil 1S102H	8,28	1,87	8,9	4,36	0,85	9,8
Suwannee River 2S101H	9,13	3,72	9,74	4,35	4,48	10,44
Pahocee Peat 1S103H	9,01	1,91	9,64	4,22	0,94	9,86
Leonardite 1S104H	7,48	2,31	8,17	4,59	1,13	9,72

Z těchto výsledků vyplývá, že obecně fulvinové kyseliny mají větší zastoupení karboxylových skupin než huminové kyseliny, což se projevuje i v jejich nižších průměrných hodnotách pK_a . Můžeme také pozorovat, že vodní fulvinové kyseliny mají nižší obsah karboxylových skupin než terestrické fulvinové kyseliny, kdežto u huminových kyselin je to naopak. Dále můžeme vidět, že fulvinové i huminové kyseliny izolované z vody vykazují vyšší obsah hydroxylových skupin než terestrické vzorky.

4.1.2 Kvalitativní vlastnosti

Kvalita roztoků fulvinových kyselin a výluhů huminových kyselin v Na_2SO_4 byla stanovována na základě měření absorbance metodou UV–VIS spektrofotometrie. Byl vypočítán absorpční poměr při vlnové délce $A_{465/665}$.

Tento absorpční poměr je nejčastěji používaný a popisuje index humifikace. Hodnoty tohoto poměru jsou pro huminové kyseliny obvykle nižší než 5 a klesají s rostoucí molekulovou hmotností a stupněm kondenzace. Tento absorpční poměr je tedy ovlivněn velikostí částic, molekulovou hmotností, hodnotou pH, koncentrací volného radikálu a obsahem prvků C a O a skupin COOH. Nízký poměr značí vysoký stupeň kondenzace a vysoký podíl aromatických struktur, zatímco vysoké poměry znamenají přítomnost velkého množství alifatických struktur a malé množství aromatických kondenzovaných struktur. Tento poměr je typicky vyšší pro

materiály, které nejsou humifikovány díky přítomnosti bílkovin a sacharidů, které zvyšují absorpci v UV oblasti spektra [43,53].

Dále byly vypočítány $\Delta \log K$ z rozdílu logaritmických hodnot absorpance při vlnových délkách 400 nm a 600 nm k určení stupně humifikace.

Tab. 6: Absorpční poměr $E_{4/6}$ pro FK_1 a $\Delta \log K$

c (g·dm⁻³)	A_{465/665}	$\Delta \log K$
10	16,33	1,21
8	11,00	1,26
5	17,67	1,26
3	16,50	1,25
1	13,00	1,26
0,5	6,78	0,88
0,1	2,57	0,77
0,05	9,20	1,14
0,01	5,00	0,95

Tab. 7: Absorpční poměr $E_{4/6}$ pro FK_2 a $\Delta \log K$

c (g·dm⁻³)	A_{465/665}	$\Delta \log K$
10	7,00	0,97
5	10,80	1,11
1	13,00	1,16
0,5	5,90	1,00
0,1	4,33	0,86
0,05	13,00	1,16
0,01	4,20	0,79

Tab. 8: Absorpční poměr $E_{4/6}$ pro FK_3 a $\Delta \log K$

c (g·dm⁻³)	A_{465/665}	$\Delta \log K$
10	7,75	1,26
8	8,67	1,18
5	13,00	1,29
3	11,00	1,34
1	8,00	1,40
0,5	3,82	1,15
0,1	2,00	0,76
0,05	7,14	1,09
0,01	5,00	0,88

Tab. 9: Absorpční poměr $E_{4/6}$ pro FK_4 a $\Delta \log K$

c (g·dm⁻³)	A_{465/665}	$\Delta \log K$
10	11,00	1,07
8	11,60	1,11
5	9,78	1,06
3	10,40	1,11
1	3,40	0,89
0,5	10,75	1,06
0,1	5,25	0,86
0,05	8,60	0,97
0,01	11,00	1,12

Tab. 10: Absorpční poměr $E_{4/6}$ pro HK_1 a $\Delta \log K$

c (g·dm⁻³)	A_{465/665}	$\Delta \log K$
10	4,28	0,79
1	8,67	0,99
0,1	5,63	0,87
0,01	29,00	1,00

Tab. 11: Absorpční poměr $E_{4/6}$ pro HK_2 a $\Delta \log K$

c (g·dm⁻³)	A_{465/665}	$\Delta \log K$
10	4,70	0,74
1	6,07	0,79
0,1	6,57	0,81
0,01	5,05	0,81

Tab. 12: Absorpční poměr $E_{4/6}$ pro HK_3 a $\Delta \log K$

c (g·dm⁻³)	A_{465/665}	$\Delta \log K$
10	6,58	0,90
1	7,36	0,99
0,1	7,80	1,00
0,01	6,88	1,03

Tab. 13: Absorpční poměr $E_{4/6}$ pro HK_4 a $\Delta \log K$

c (g·dm⁻³)	A_{465/665}	$\Delta \log K$
10	5,75	0,79
1	5,38	0,78
0,1	5,65	0,75
0,01	7,40	0,94

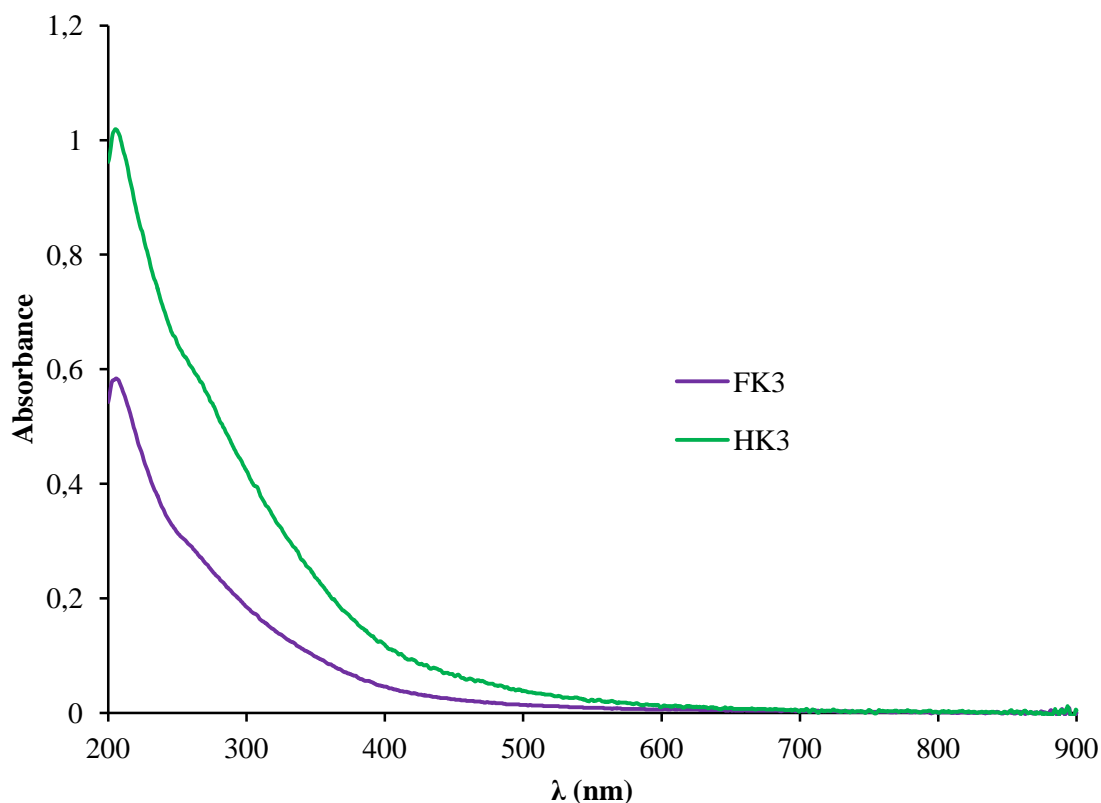
Tab. 14: Absorpční poměr $E_{4/6}$ pro HK₅ a $\Delta \log K$

c (g·dm⁻³)	A_{465/665}	$\Delta \log K$
10	2,68	0,50
5	2,72	0,50
1	2,44	0,42
0,5	8,20	1,04
0,1	7,50	1,01
0,05	7,00	0,93
0,01	6,33	0,87

V Tab. 6 až Tab. 14 jsou uvedeny hodnoty absorpčního poměru $E_{4/6}$ a $\Delta \log K$. Z tabulek vyplývá, že u FK i HK se indexy humifikace mění s koncentrací rozpuštěných FK a HK. U FK by se však dalo předpokládat, že se hodnoty indexu humifikace nebudou měnit s koncentrací díky tomu, že se v Na₂SO₄ rozpustí vždy celý vzorek. Avšak vzhledem k tomu, že se s koncentrací mění konformace FK a tím i jejich velikost, tak se hodnoty indexu humifikace zde uvedené s koncentrací mění. U HK se dá změna indexu humifikace s koncentrací předpokládat, jelikož se jedná o výluh, jehož kvalita závisí právě na koncentraci rozpuštěných HK ve výluhu.

Všechny FK mají vyšší index humifikace než HK. Je to díky tomu, že FK mají menší velikost, obsahují méně kondenzovaných aromatických struktur a více postranních alifatických řetězců. Pro HK jsou hodnoty $E_{4/6}$ nižší a pohybují se v rozmezí přibližně 2–8, což potvrzuje to, že HK jsou kondenzovanější než FK a ve své struktuře obsahují více aromatických skupin. Jelikož platí, že huminový materiál s nejvyšším koeficientem $E_{4/6}$ má nejnižší odolnost, tak můžeme říci, že HK jsou odolnější a díky tomu, že jsou kondenzovanější, tak jsou staršího původu.

Co se týče koeficientu $\Delta \log K$, který charakterizuje stupeň humifikace (zralost) FK a HK, tak můžeme vidět, že pro FK se jeho hodnoty pohybují v rozmezí 0,8–1,3. FK tedy spadají do skupiny Rp s nízkým stupněm humifikace. HK izolované z půdy (HK₂ a HK₄) by svými hodnotami $\Delta \log K$ mohly spadat do skupiny B se středním stupněm humifikace, zatímco vodní HK (HK₁ a HK₄) do skupiny Rp.



Obr. 8: Srovnání UV–VIS spektra FK₃ a HK₃ pro koncentraci 0,01 g·dm⁻³

Na Obr. 8 vidíme srovnání UV–VIS spekter pro FK a HK izolovaných ze stejného přírodního zdroje, konkrétně řeky Suwannee. Tyto dva vzorky se liší tím, že FK se v Na₂SO₄ rozpustí všechna, kdežto u HK se v Na₂SO₄ rozpustí vždy jen určitá frakce HK, která se koncentrací od koncentrace liší. Je patrné, že naměřená absorbance je vyšší pro HK než pro FK. Obecně platí, že chromofory přítomné v HL zodpovědné za absorpci v UV oblasti jsou aromatické kruhy, které jsou různě substituované různými typy funkčních skupin. UV–VIS absorpce je ovlivněna relativním množstvím aromatických struktur, ketonickými funkčními skupinami a autochromy jako C–OH a C–NH₂. Jelikož jsou HK více humifikovány, kondenzovány a obsahují více aromatických struktur než FK, tak tento fakt může mít za následek právě vyšší absorpci HK. Dalším možným důvodem, který může přispívat k vyšší absorpci HK je vyšší obsah ketonických funkčních skupin v FK, jelikož právě tyto skupiny snižují absorpci ve viditelné oblasti spektra.

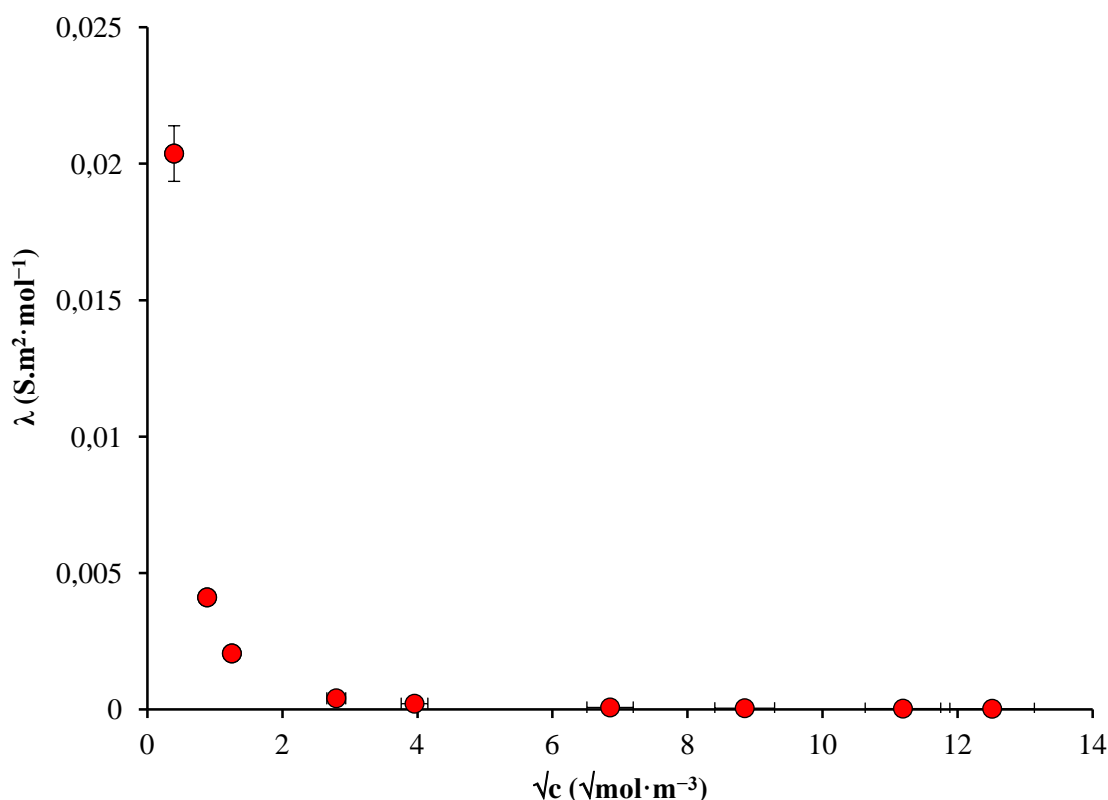
4.2 Stanovení pK_a huminových a fulvinových kyselin

4.2.1 Konduktometrická metoda

U roztoků fulvinových kyselin a výluhů huminových kyselin byly změřena jejich vodivost, která byla využita pro konduktometrické stanovení disociačních konstant. Hodnoty pK_a byly stanovovány ze závislosti $\log K_{\text{HA}} = f(c_0)$ pro FK a ze závislosti $\log K_{\text{HA}} = f(\sqrt{\alpha \cdot c_0})$ pro HK. Z těchto závislostí byly určeny vždy dvě hodnoty pK_a – pK_{a1} bez extrapolace na nekonečné zředění a pK_{a2} extrapolované na nekonečné zředění. Tyto hodnoty byly počítány dvěma způsoby. První způsob spočíval v tom, že se původní koncentrace FK a HK udávaná v g·dm⁻³ přepočítala na koncentraci v mol·dm⁻³ pomocí obsahu kyselých funkčních skupin.

Druhý způsob spočíval v přepočtu přes molární hmotnost vyhledanou pro každou FK a HK v literatuře (viz. Tab. 15 a Tab. 16).

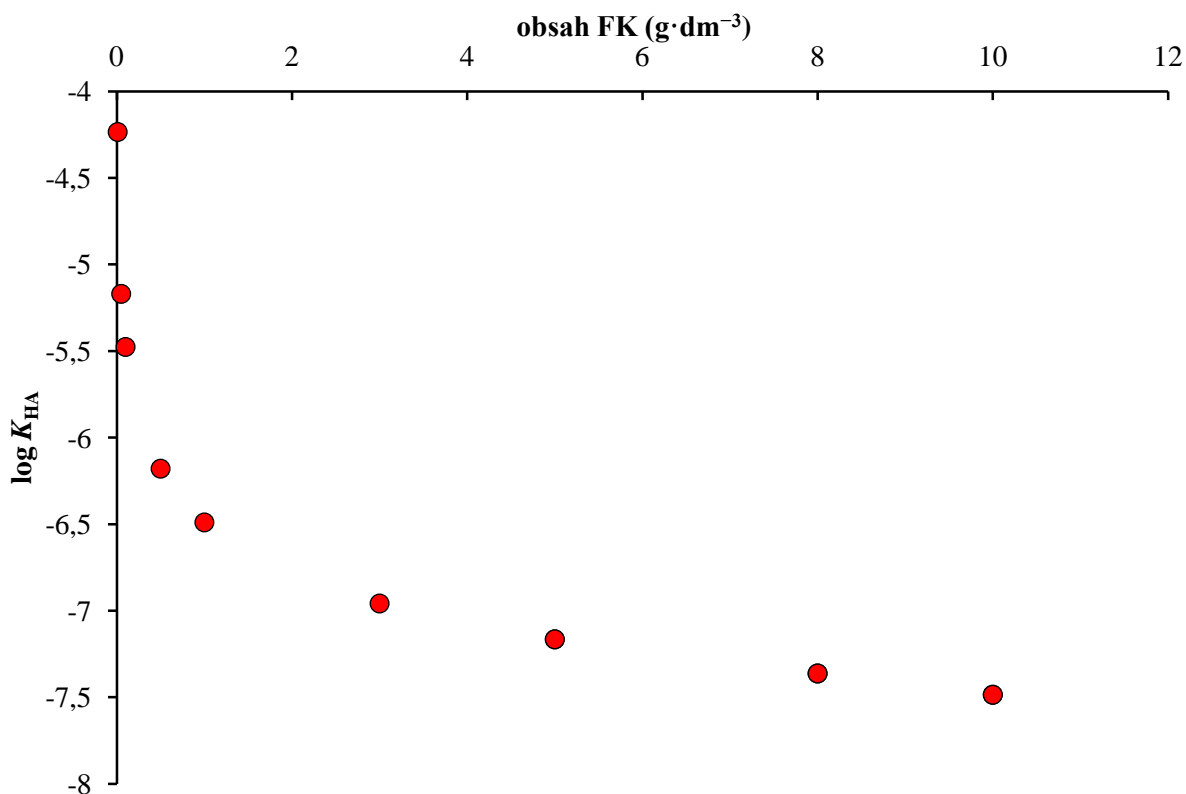
Je třeba poznamenat, že disociační konstanty stanovené pro roztoky FK v Na_2SO_4 jsou pro celý vzorek, jelikož se v Na_2SO_4 rozpustí všechny skupiny bez ohledu na jejich sílu. U HK je to trochu jinak. HK obsahují velké množství různých skupin, které se liší svou silou. V Na_2SO_4 se přednostně rozpustí ta frakce huminových kyselin, která obsahuje silnější skupiny. Zvyšování obsahu huminových kyselin v roztoku, má za následek to, že frakce s menším obsahem COOH skupin a frakce se slabšími karboxylovými skupinami se rozpouští méně a méně, až je jejich rozpustnost potlačena. Složení frakcí se zřejmě koncentrací od koncentrace liší. Lze předpokládat, že při nízkých koncentracích se mohou rozpouštět i frakce, které obsahují méně karboxylových skupin s vyšším $\text{p}K_a$. Na výsledné hodnoty disociačních konstant mají tedy vliv pouze určité skupiny, které se v dané frakci rozpustí.



Obr. 9: Závislost molární vodivosti na \sqrt{c} pro FK_4

Na Obr. 9 je zobrazena závislost molární vodivosti na \sqrt{c} pro FK_4 . Extrapolací této závislosti na nekonečné zředění, kdy se předpokládá, že jsou všechny molekuly disociované a ionty jsou od sebe vzdálené natolik, že se neovlivňují, byla získána hodnota mezní molární vodivosti, která je nezbytná k určení $\text{p}K_a$.

Z obrázku vyplývá, že nejvyšší molární vodivost má roztok FK v Na_2SO_4 o nejnižší koncentraci. Molární vodivost od této koncentrace začne prudce klesat, protože se zvyšující se koncentrací roztoku se jednotlivé ionty začnou navzájem ovlivňovat a dochází k brzdění jejich pohybu. Pro vyšší koncentrace FK v roztoku se molární vodivost ustálí na nulové hodnotě a jejich ionty se tedy prakticky nepohybují.



Obr. 10: Závislost $\log K_{HA}$ na c pro výpočet pK_a pro FK_1

Obr. 10 znázorňuje ukázkou grafu pro výpočet disociačních konstant u roztoku FK_1 v Na_2SO_4 . Data v tomto grafu byla proložena přímkami a z jejich regresních rovnic byly vždy stanoveny dvě hodnoty $pK_a - pK_{a1}$, které nebylo extrapolované na nekonečné zředění a pK_{a2} extrapolované na nekonečné zředění.

Tab. 15: Hodnoty pK_a a M pro FK stanovené konduktometricky [54, 55, 56, 57]

Vzorek	pomocí obsahu funkčních skupin		pomocí molární hmotnosti M		
	pK_{a1}	pK_{a2}	M (Da)	pK_{a1}	pK_{a2}
FK_1	3,9	6,85	3870	2,71	4,46
FK_2	3,91	6,87	9000	2,05	3,86
FK_3	3,91	6,89	1150	3,21	5,02
FK_4	3,63	6,58	6500	2,45	4,3

Tab. 16: Hodnoty pK_a a M pro HK stanovené konduktometricky [54, 55, 56, 57]

Vzorek	pomocí obsahu funkčních skupin		pomocí molární hmotnosti M		
	pK_{a1}	pK_{a2}	M (Da)	pK_{a1}	pK_{a2}
HK ₁	5,18	7,15	5060	4,09	7,16
HK ₂	4,22	7,11	19000	5,07	7,33
HK ₃	5,43	7,65	4390	4,95	7,07
HK ₄	4,85	7,29	7994	5,13	7,19
HK ₅	4,75	6,28	18700	5,21	8,02

Jednotlivé hodnoty pK_a stanovené konduktometrickou metodou jsou pro roztoky fulvinových kyselin v Na_2SO_4 zobrazeny v Tab. 15 a pro výluhy huminových kyselin v Na_2SO_4 v Tab. 16. Dále jsou zde zobrazeny molekulové hmotnosti příslušných FK a HK, které byly přejaty z literatury.

Jsou zde uvedeny stanovené hodnoty pK_a jak pomocí obsahu kyselých funkčních skupin, tak pomocí molekulových hmotností jednotlivých FK a HK. Vidíme, že jednotlivé pK_a stanovené dvěma různými způsoby se malinko liší. Co se týče FK, tak disociační konstanty stanovené pomocí obsahu funkčních skupin se u jednotlivých FK izolovaných z různých přírodních zdrojů liší jen nepatrně a pohybují se v rozmezí 3,6–3,9, resp. 6,6–6,9. Hodnoty pK_{a1} stanovené tímto způsobem velmi dobře odpovídají hodnotám uváděným na webových stránkách společnosti IHSS. Hodnoty pK_{a2} námi stanovené jsou nižší než ty, které jsou uváděny na stránkách společnosti IHSS (viz Tab. 4). Disociační konstanty stanovené pomocí molekulových hmotností se pohybují v rozmezí 2–3,2, resp. 3,9–5.

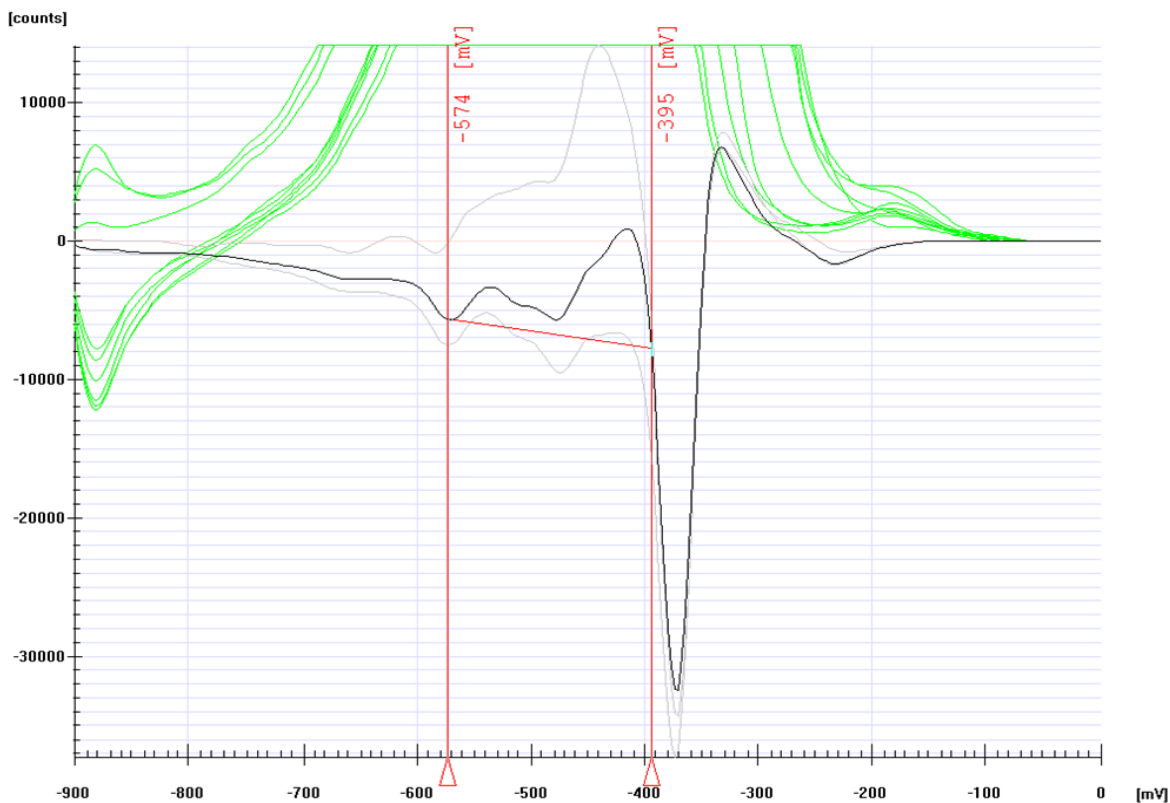
Disociační konstanty stanovené u výluhů HK v Na_2SO_4 jsou celkově vyšší než u roztoků FK v Na_2SO_4 , jelikož ve své struktuře obsahují méně karboxylových skupin schopných disociace. Jejich pK_a byly na základě výpočtů pomocí obsahu funkčních skupin stanoveny na 4,2–5,4, resp. 6,3–7,3 a pomocí molekulových hmotností na 4,1–5,2, resp. 7–8.

Hodnoty pK_a stanovené u výluhů HK₁–HK₄ v Na_2SO_4 jsou pouze orientační (zejména hodnota pK_{a2} extrapolovaná na nekonečné zředění), protože bylo k dispozici pouze omezené množství vzorků HK, jelikož společnost IHSS tyto vzorky prodává pouze v malých dávkách (po 100–200 mg). Z tohoto důvodu jsme mohli připravit pouze čtyři koncentrace výluhů HK. Pro správnější výsledek bychom potřebovali větší množství vzorků, abychom mohli připravit výluhy o více koncentracích.

Z tabulek také vyplývá, že FK a HK izolované z vod jsou menší než terestrické vzorky a dále také to, že FK a HK izolované z půdy jsou větší než FK a HK z rašeliny.

4.2.2 Kombinace měření pH a obsahu kyselých funkčních skupin v Na_2SO_4

Roztoky fulvinových kyselin a výluhy huminových kyselin v Na_2SO_4 byly proměřeny na průtokovém analyzátoru EcaFlow. Jednotlivé křivky byly ohraničeny červenými svislými čarami, které nám určují velikost píku. Tímto způsobem byly odečteny koncentrace H^+ iontů v každém vzorku.

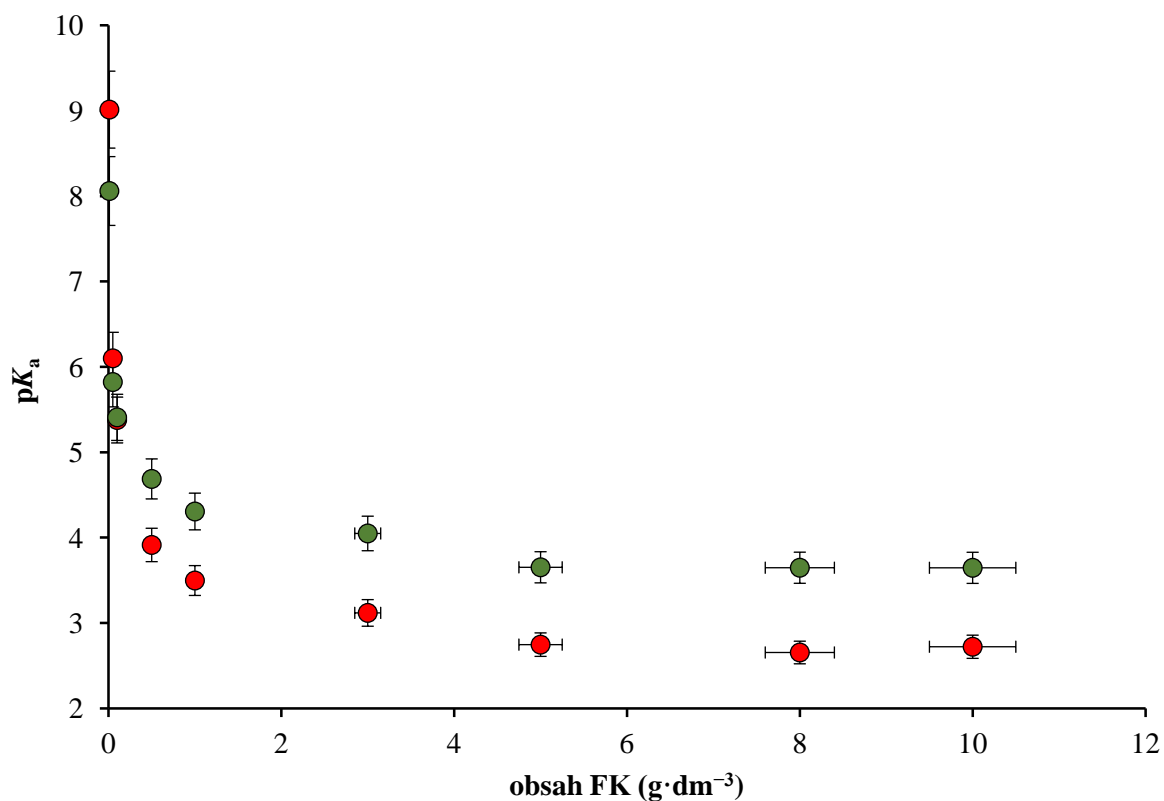


Obr. 11: Ukázka výstupu z přístroje EcaFlow pro HK_1 o koncentraci $0,01 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$

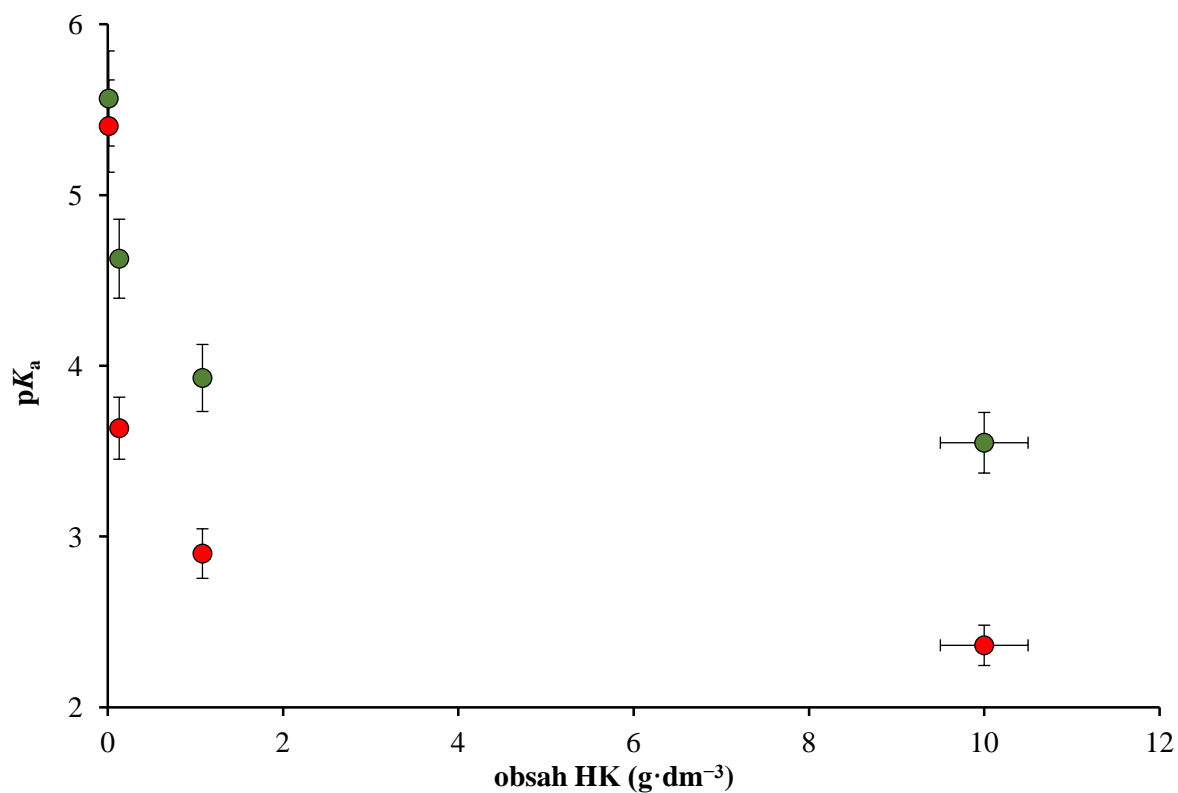
Na Obr. 11 je zobrazen záznam z měření huminové kyseliny pomocí přístroje EcaFlow. U nízkých koncentrací můžeme vidět, že se záznam skládá z více pásů, což značí, že huminová kyselina obsahuje více frakcí karboxylových skupin a patří proto mezi vícesytné kyseliny.

Jak již bylo zmíněno FK se v Na_2SO_4 rozpustí všechna, a proto jsou vypočítané pK_a pro celý vzorek, zatímco u výluhů HK se v Na_2SO_4 rozpustí vždy jen určitá frakce, a tudíž jsou hodnoty pK_a stanovené tímto způsobem jen pro určitou frakci HK.

U každého vzorku FK a HK byly vypočítány dvě hodnoty pK_a . První hodnota pK_{a1} byla počítána pro hodnoty, kdy je pK_a prakticky konstantní a druhá hodnota pK_{a2} byla extrapolována na nekonečné zředění. Tyto dvě hodnoty pK_a byly vztaženy jak na fulvinové kyseliny rozpuštěné v roztoku, resp. huminové kyseliny rozpuštěné ve výluhu – kombinací měření pH a obsahu kyselých funkčních skupin pomocí přístroje EcaFlow, tak na celý vzorek – kombinací měření pH a z údajů o obsahu kyselých funkčních skupin z webových stránek společnosti IHSS (viz. Tab. 4 a Tab. 5).



Obr. 12: Závislost pK_a na obsahu FK v roztoku u FK_1 – červené body značí pK_a pro FK rozpuštěnou v roztoku, zelené body značí pK_a pro celý vzorek

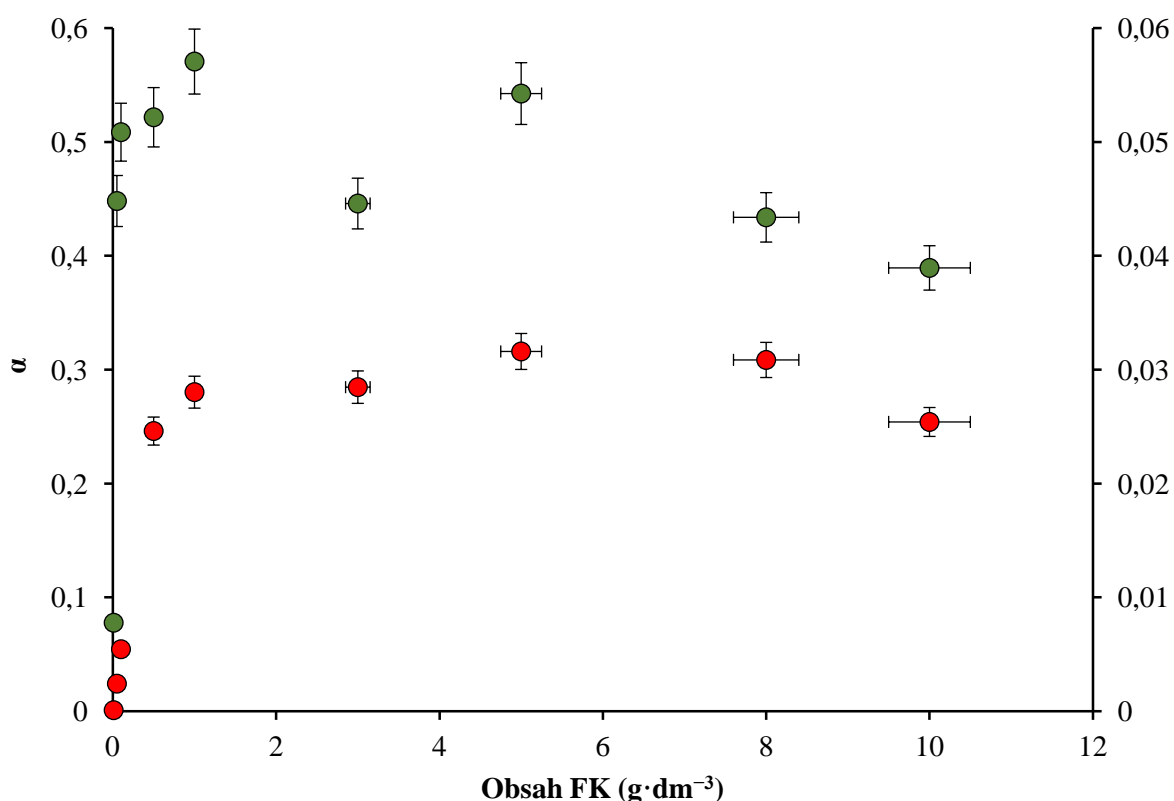


Obr. 13: Závislost pK_a na obsahu HK v suspenzi u HK_1 – červené body značí pK_a pro HK rozpuštěnou ve výluhu, zelené body značí pK_a pro celý vzorek

Na Obr. 12 a Obr. 13 jsou uvedeny příklady vypočítaných hodnot pK_a v závislosti na obsahu fulvinových, resp. huminových kyselin v Na_2SO_4 . Červené body značí pK_a , které je vztaženo na FK v roztoku, resp. HK ve výluhu. Zelené body představují pK_a vztažené na celý vzorek. Z těchto obrázků je patrné, že nejvyšší hodnoty pK_a se nacházejí při nižších koncentracích HK a FK.

U HK je to díky tomu, že se v suspenzi při těchto koncentracích rozpouštějí i méně rozpustné frakce s vyššími hodnotami pK_a . Hodnoty pK_a klesají až do určité koncentrace, od které už by měl být pokles pozvolný nebo dokonce konstantní. To je způsobeno tím, že od této koncentrace už jsou ve výluzích HK v Na_2SO_4 rozpuštěny frakce HK o podobném nebo stejném složení.

U FK by se dalo předpokládat, že vzhledem k tomu, že se v Na_2SO_4 rozpustí vždy všechna FK, tak by hodnoty pK_a měly být podobné, což se nám nepotvrdilo, jelikož chování takto složitých heterogenních látek je obtížně předvídatelné.

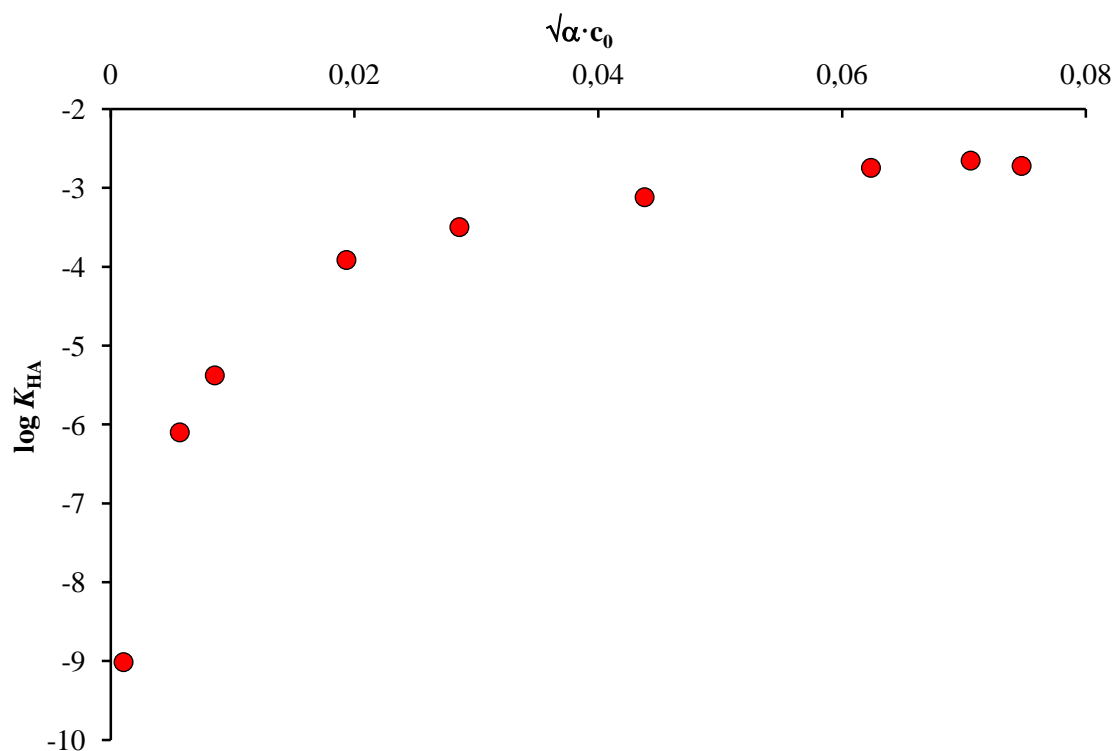


Obr. 14: Závislost disociačního stupně na obsahu FK v roztoku pro FK_1 – červené body značí α pro FK rozpuštěnou v roztoku, zelené body značí α pro celý vzorek

Na Obr. 14 můžeme vidět závislost disociačního stupně na obsahu FK v roztoku pro FK_1 . Disociační stupeň byl počítán dvěma způsoby. Nejprve jako poměr H^+ iontů disociovaných změřených pH metrem a celkových H^+ iontů změřených přístrojem EcaFlow (červené body) a dále jako poměr disociovaných H^+ iontů změřených pH metrem a celkového obsahu kyselých funkčních skupin, které jsou uvedeny na webových stránkách společnosti IHSS nebo i zde v Tab. 4. Vidíme, že pro nízké koncentrace je α velmi malý, jelikož se jedná o velmi zředěné roztoky, kde disociace prakticky nenastává. Od koncentrace $0,5 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ je už

disociační stupeň zhruba stejný a pohybuje se v rozmezí 25–30 %, což odpovídá disociaci slabého elektrolytu. (červené body).

Co se týče disociačního stupně stanoveného z poměru disociovaných H^+ iontů a celkového obsahu kyselých funkčních skupin (zelené body), tak zde se α pohybují v rozmezí 4–6 %, což jsou hodnoty velmi nízké a tendence disociovat je tedy také malá. Tyto rozdíly mohou být způsobeny tím, že α stanovený prvním způsobem odpovídá pouze FK, které jsou rozpuštěny v roztoku, kdežto disociační stupeň stanovený druhým způsobem je pro celý vzorek.



Obr. 15: Závislost $\log K_{HA}$ na $\sqrt{\alpha \cdot c_0}$ pro výpočet pK_a pro FK_1

Na Obr. 15 se nachází ukázka grafu pro výpočet pK_a . Jak můžeme vidět, tak hodnoty disociačních konstant byly stanovovány ze závislosti $\log K_{HA} = (\sqrt{\alpha \cdot c_0})$. Proložení tohoto grafu přímkami pak byly z regresních rovnic vždy vypočítány dvě hodnoty $pK_a - pK_{a2}$ extrapolované na nekonečné zředění a pK_{a1} , které extrapolované nebylo.

Tab. 17: Hodnoty pK_a pro FK stanovené kombinací měření pH a obsahu kyselých funkčních skupin

Vzorek	pH – EcaFlow		pH – IHSS	
	pK_{a1}	pK_{a2}	pK_{a1}	pK_{a2}
FK ₁	$3,95 \pm 0,05$	$9,98 \pm 0,12$	$4,71 \pm 0,003$	$8,84 \pm 0,006$
FK ₂	$4,04 \pm 0,10$	$10,83 \pm 0,26$	$4,74 \pm 0,19$	$9,86 \pm 0,39$
FK ₃	$3,41 \pm 0,25$	$9,21 \pm 0,67$	$4,53 \pm 0,18$	$7,88 \pm 0,32$
FK ₄	$3,36 \pm 0,30$	$9,21 \pm 0,82$	$4,58 \pm 0,18$	$7,93 \pm 0,32$

Tab. 18: Hodnoty pK_a pro HK stanovené kombinací měření pH a obsahu kyselých funkčních skupin

Vzorek	pH - EcaFlow		pH - IHSS	
	pK_{a1}	pK_{a2}	pK_{a1}	pK_{a2}
HK ₁	3,35 ± 0,38	6,18 ± 0,70	4,25 ± 0,27	5,98 ± 0,38
HK ₂	2,48 ± 0,29	3,47 ± 0,40	4,40 ± 0,26	5,24 ± 0,31
HK ₃	3,78 ± 0,45	4,32 ± 0,52	4,42 ± 0,30	5,26 ± 0,36
HK ₄	3,41 ± 0,48	4,53 ± 0,63	4,64 ± 0,31	5,22 ± 0,35
HK ₅	7,57 ± 0,18	11,66 ± 0,28	7,68 ± 0,03	10,64 ± 0,04

Jednotlivé hodnoty pK_a stanovené touto metodou jsou pro roztoky fulvinových kyselin v Na₂SO₄ zobrazeny v Tab. 17 a pro výluhy huminových kyselin v Na₂SO₄ v Tab. 18.

Vidíme, že hodnoty pK_a stanovené dvěma různými způsoby se opět liší, jelikož první způsob spočíval ve stanovení pK_a u FK rozpuštěných v roztoku, resp. HK rozpuštěných ve výluhu, kdežto u druhého způsobu se pK_a stanovovaly z celkových kyselostí uváděných na webových stránkách společnosti IHSS a určené pK_a jsou tudíž pro celý vzorek. Hodnoty pK_a u roztoků FK stanovené kombinací měření pH a obsahu kyselých funkčních skupin pomocí přístroje EcaFlow se pohybují v rozmezí 3,3–4, resp. 9,2–10,8. Hodnoty pK_{a1} jsou velice podobné hodnotám stanoveným konduktometricky nebo hodnotám uváděných na stránkách IHSS. Hodnoty pK_{a2} stanovené touto metodou se jen nepatrně liší od hodnot stanovených společností IHSS. Od hodnot určených konduktometricky se liší více. Co se týče pK_a vypočítaných na základě měření pH a obsahu kyselých funkčních skupin, jejichž hodnoty byly přejaty ze stránek IHSS, tak zde se disociační konstanty pohybují v rozmezí 4,5–4,7, resp. 7,9–9,8.

Disociační konstanty jsou u HK (kromě HK₅) nižší než u FK, což by mělo být naopak. Dále také hodnoty pK_{a2} extrapolované na nekonečné zředění by dle společnosti IHSS měly být daleko vyšší. Tuto nesrovnalost přisuzuji právě tomu, že bylo k dispozici pouze malé množství vzorku, jak již bylo popisováno u konduktometrické metody. Z tohoto důvodu jsou hodnoty pK_a stanovené u výluhů HK₁–HK₄ v Na₂SO₄ pouze orientační. Jelikož je huminová kyselina HK₅ Leonardite, který se dá běžně zakoupit ve větších množstvích, tak zde by se dala předpokládat menší odchylka ve stanoveném pK_a . Jeho hodnota je pro první způsob stanovení 7,6, resp. 11,7 a pro druhý způsob 7,7, resp. 10,6, což jsou hodnoty vyšší než ta, která byla určena společností IHSS. Disociační konstanty pro HK₁–HK₄ byly prvním způsobem určeny na 2,5–3,8, resp. 3,5–6,2 a druhým na 4,3–4,6, resp. 5,2–6. Zde se hodnoty pK_{a1} , které byly určovány pro celý vzorek, docela shodují s hodnotami uváděnými na stránkách IHSS i s konduktometrickou metodou.

5 ZÁVĚR

Tato diplomová práce se zabývá výzkumem fulvinových kyselin a huminových kyselin v oblasti jejich disociačního chování. Fulvinové i huminové kyseliny byly standardy zakoupené od společnosti IHSS a byly izolovány z různých přírodních zdrojů. Prvním cílem bylo stanovit kvalitu fulvinových kyselin a huminových kyselin pomocí metody UV–VIS spektrofotometrie. Byl stanovován index humifikace $E_{4/6}$ a zralost ($\Delta \log K$) použitých FK a HK. Hlavním cílem této diplomové práce bylo ovšem stanovení disociačních konstant u roztoků FK v Na_2SO_4 (disociační konstanty jsou stanoveny pro všechnu rozpuštěnou FK) a výluhů HK v Na_2SO_4 (disociační konstanty pouze pro určitou frakci HK). Ty byly stanovovány pomocí dvou různých metod, a sice konduktometricky a kombinací měření pH a obsahu kyselých funkčních skupin v Na_2SO_4 . Hodnoty disociačních konstant stanovené jednotlivými metodami byly srovnávány s hodnotami, které jsou pro tyto standardní FK a HK uváděné na webových stránkách společnosti IHSS.

Na základě spektrofotometrického měření a následného určení absorpčního poměru $E_{4/6}$ bylo prokázáno, že všechny FK jsou méně kondenzované a obsahují tedy méně aromatických struktur, jelikož jejich indexy humifikace byly vyšší než u HK. Dále bylo z výpočtu $\Delta \log K$ zjištěno, že všechny FK spadají do skupiny Rp s nízkým stupněm humifikace stejně jako HK izolované z vody (HK₁ a HK₃). HK izolované z půdy (HK₂ a HK₄) spadají do skupiny B se středním stupněm humifikace.

Stěžejním cílem této diplomové práce však bylo určení disociačních konstant. Ta byla u roztoků FK v Na_2SO_4 konduktometrickou metodou (pomocí obsahu funkčních skupin) stanovena na 3,6 až 3,9, resp. 6,6 až 6,9. Hodnota pK_{a1} stanovená touto metodou se od hodnoty stanovené kombinací měření pH a obsahu kyselých funkčních skupin (pH – EcaFlow) příliš neliší a má hodnoty 3,3 až 4. Hodnota pK_{a2} je touto metodou určena na 9,2 až 10,8. První hodnota pK_{a1} zřejmě odpovídá disociaci silných skupin (karboxylových), zatímco pK_{a2} disociaci slabých skupin (hydroxylových). Hodnoty pK_{a1} pro FK určené těmito metodami byly v dobré shodě s hodnotami uváděnými na webových stránkách společnosti IHSS, stejně jako hodnota pK_{a2} určená kombinací měření pH a obsahu kyselých funkčních skupin pomocí přístroje EcaFlow. Disociační konstanty u výluhů HK v Na_2SO_4 jsou pouze orientační a jsou uvedeny v tabulkách v diskuzi. Důvody proč tomu tak je, jsou popsány výše.

6 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- [1] NOVÁK, František a Richard HRABAL. Kvantitativní ^{13}C NMR spektroskopie huminových látek. *Chemické listy*. 2011, č. 105, s. 752-760.
- [2] SKOKANOVÁ, Marianna a Katarína DERCOVÁ. Humínové kyseliny. Pôvod a štruktúra. *Chemické listy*. 2008, č. 102, s. 262-268.
- [3] Oficiální stránky společnosti Humatex, a.s [online]. 2005-2015, [cit. 2017-02-08]. Dostupné z: <<http://www.humatex.cz/huminove-latky.html>>.
- [4] PIVOKONSKÝ, Martin, Lenka PIVOKONSKÁ, Petra BUBÁKOVÁ. Úprava vody s obsahem huminových látek. *Chemické listy*. 2010, č. 104, s. 1015-1022.
- [5] Weber, J.: Soil Humic Substances [online]. 1997, [cit. 2017-02-08]. Dostupné z: <http://www.ar.wroc.pl/~weber/humic.htm#start>.
- [6] STEVENSON, F. *Humus chemistry: genesis, composition, reactions*. 2nd Ed. New York: John Wiley and Sons, c1994, xiii, 496 s. ISBN 04-715-9474-1.
- [7] Oficiální stránky The University of British Columbia, Faculty of Land and Food Systems [online]. 1999, last revision 20th February 2010 [cit. 2017-02-09]. Dostupné z: <http://www.landfood.ubc.ca/soil200/components/organic_compunds.htm>.
- [8] KLUČÁKOVÁ, Martina. *Huminový svět pohledem fyzikální chemie*. Brno: Vutium, 2014. ISBN 978-80-214-4945-9.
- [9] VESELÁ, KUBAL, KOZLER a INNEMANOVÁ. Struktura a vlastnosti přírodních huminových látek typu oxihumolitu. *Chemické listy*. 2005, vol. 99, no. 10, p. 711-717.
- [10] GHABBOUR, Elham A. *Humic Substances: Structures, Models and Functions*. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 2001, 387 s. ISBN 08-540-4811-1.
- [11] OUNI, GHNAYA, MONTEMURRO, ABDELLY a LAKHDAR. The role of humic substances in mitigating the harmful effects of soil salinity and improve plant productivity. *International Journal Of Plant Production*. 2014, roč. 8, č. 3, s. 353-374.
- [12] PEÑA-MENDÉZ, Eladia M., Josef HAVEL a Jiří PATOČKA. Humic substances - compounds of still unknow structure: application in agriculture, industry, environment and biomedicine. *Journal of applied biomedicine*. 2005, č. 3, s. 13-24. ISSN 1214-0287.
- [13] LAŠTŮVKOVÁ, Marcela. *Studium transportu huminových látek skrz rostlinné kutikuly*. Brno, 2014. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická.
- [14] Klikorka, J.: *Obecná a anorganická chemie*. 2. vydání. Praha: SNTL, 1989. 592 s.
- [15] SHABAN, I. S. a V. MIKULAJ. Impact of an Anionic Surfactant Addition on Solubility of Humic Acid in Acid-Alkaline Solutions. *Chem. Papers*. 1998, vol. 52, no. 6, p. 753-755.
- [16] PITTER, Pavel. *Hydrochemie*. 4., aktualiz. vyd. Praha: Vydavatelství VŠCHT Praha, 2009. ISBN 978-80-7080-701-9.

- [17] POUCHLÝ, Julius. *Fyzikální chemie makromolekulárních a koloidních soustav*. Praha, 2008. ISBN 978-80-7080-674-6.
- [18] KOLAJOVÁ, Romana. *Stanovení pKa huminových kyselin pomocí UV/VIS spektrometrie*. Brno, 2012. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická.
- [19] Malijevský, A.: *Breviář z fyzikální chemie*. 1. vydání. Praha: VŠCHT, 2000. 280 s. ISBN 80-7080-403-3.
- [20] ANDJELKOVIC, T. Acidity of humic acid related to its oxygen-containing functional groups. *Bulletin of the Chemists and Technologists of Macedonia*. 2006, vol. 25, no. 2, p. 131-137.
- [21] BORGGAARD, Ole K. Titrimetric determination of acidity and pK values of humic acid. *Acta Chemica Scandinavica*. 1974, vol. 28, no. 1, p. 121-122.
- [22] KLOUDA, Pavel. *Moderní analytické metody*. 2., upr. a dopl. vyd. Ostrava: Pavel Klouda, 2003, 132 s. ISBN 80-863-6907-2.
- [23] FUKUSHIMA, M., S. TANAKA, H. NAKAMURA a S. ITO. Acid-base characterization of molecular weight fractionated humic acid. *Talanta*. 1996, vol. 43, no. 3, p. 383-390.
- [24] DU, Jinzhou, Nobuaki SATO a Osamu TOCHIYAMA. Potentiometric study on the proton binding of humic substances. *Journal of Nuclear and Radiochemical Sciences*. 2005, 6(1), 25-29.
- [25] FUKUSHIMA, M., S. TANAKA, K. HASEBE, M. TAGA a H. NAKAMURA. Interpretation of the acid-base equilibrium of humic acid by continuous pK distribution and electrostatic model. *Analytica Chimica Acta*. 1995, vol. 302, no. 2, p. 365-373.
- [26] MATHUTHU, Andrew S., Jacob A. MARINSKY a James H. EPHRAIM. Dissociation properties of Laurentide fulvic acid: Identifying the predominant acidic sites. *Talanta*. 1995, 42(3), 441-447.
- [27] ANDJELKOVIC, T., J. PEROVIC, M. PURENOVIC, S. BLAGOJEVIC, R. NIKOLIC, D. ANDJELKOVIC a A. BOJIC. A direct potentiometric titration study of the dissociation of humic acid with selectively blocked functional groups. *Eclética Química*. 2006, vol. 31, no 3, DOI: 10.1590/S0100-46702006000300005
- [28] MASINI, Jorge C., Gilberto ABATE, Elizabete C. LIMA, Lucas C. HAHN, Mary S. NAKAMURA, Jaim LICHTIG a Hélio R. NAGATOMY. Comparison of methodologies for determination of carboxylic and phenolic groups in humic acids. *Analytica Chimica Acta*. 1998, vol. 364, 1-3, p. 223-233. DOI: 10.1016/S0003-2670(98)00045-2.
- [29] FIOL, S, R LÓPEZ, A RAMOS, J. M ANTELO a F ARCE. Study of the acid-base properties of three fulvic acids extracted from different horizons of a soil. *Analytica Chimica Acta*. 1999, 385(1-3), 443-449. DOI: 10.1016/S0003-2670(98)00689-8. ISSN 00032670. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0003267098006898>

- [30] RITCHIE, Jason D. a E. Michael PERDUE. Proton-binding study of standard and reference fulvic acids, humic acids, and natural organic matter. *Geochimica et Cosmochimica Acta*. 2003, 67(1), 85-96. DOI: 10.1016/S0016-7037(02)01044-X. ISSN 00167037. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S001670370201044X>
- [31] RIGGLE, J. Conductometric characterization of dissolved humic materials. *Talanta*. 57(3), 519-526. DOI: 10.1016/S0039-9140(02)00052-8. ISSN 00399140. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0039914002000528>
- [32] ARAI, Shigemitsu a Kyoichi KUMADA. An interpretation of the conductometric titration curve of humic acid. *Geoderma*. 1977, 19(1), 21-35. DOI: 10.1016/0016-7061(77)90011-8. ISSN 00167061. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0016706177900118>
- [33] NOVOTNÁ, Radka, Tomáš ŠILHA a Zdeněk TRÁVNÍČEK. *Spektrální metody studia chemických látek*. Olomouc, 2011.
- [34] PANDEY, M.M., A. JAIPAL, A. KUMAR, R. MALIK a S.Y. CHARDE. Determination of pKa of felodipine using UV–Visible spectroscopy. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 2013, 115, 887-890. DOI: 10.1016/j.saa.2013.07.001. ISSN 13861425. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1386142513007385>
- [35] NAGANAWA, Hirochika a Tatsuya SEKINE. Spectrophotometric determination of dissociation constant of picrates in 4-methyl-2-pentanone. *Analytical Sciences*. 1987, vol. 3, no 5, p. 427-431. DOI: 10.2116/analsci.3.427.
- [36] KARA, Derya a Mahir ALKAN. Determination of acidity constants of acid-base indicators by second-derivative spectrophotometry. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 2000, 56(14), 2753-2761. DOI: 10.1016/S1386-1425(00)00319-X. ISSN 13861425. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S138614250000319X>
- [37] TIWARI, Shuchi, Kallol K. GHOSH, Jan MAREK a Kamil KUČA. Spectrophotometric Determination of the Acidity Constants of Some Oxime-Based α -Nucleophiles. *Journal of Chemical*. 2010-03-11, vol. 55, no 3, p. 1153-1157. DOI: 10.1021/jc9005773. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jc9005773>
- [38] TEKIN, Nalan a Mustafa CEBE. Investigation of dissociation properties of oxalic acid–solvent systems by UV-spectrophotometry. *Journal of Molecular Liquids*. 2005, 122(1-3), 65-68. DOI: 10.1016/j.molliq.2005.04.004. ISSN 01677322. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0167732205000760>
- [39] POURREZA, Nahid a Saadat RASTEGARZADEH. Spectrophotometric Determination of the Dissociation Constant of 5-(p-Dimethylaminobenzylidene)rhodanine in Micellar Media. *Journal of Chemical*. 2005, vol. 50, no 1, p. 206-210. DOI: 10.1021/jc049727j. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jc049727j>
- [40] *Fyzikální chemie II.: praktikum*. 2000. 2. vyd. Brno: VUT. ISBN 80-214-1550-9.

- [41] SALMA, I. a G. G. LÁNG. How many carboxyl groups does an average molecule of humic-like substances contain? *Atmospheric Chemistry and Physics*. 2008, 8(20), 5997-6002. DOI: 10.5194/acp-8-5997-2008. ISSN 1680-7324. Dostupné z: <http://www.atmos-chem-phys.net/8/5997/2008/>
- [42] SALMA, I., R. OCSKAY a G. G. LANG. Properties of atmospheric humic-like substances – water system. *Atmospheric Chemistry and Physics*. 2008, 8, 2243-2254.
- [43] VIKTORINOVÁ, Jana. *Využití chronopotenciometrické titrace v huminovém výzkumu*. Brno, 2013. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická.
- [44] KALINA, Michal. Elektroanalytické stanovení kovů a jiných látek rozpuštěných ve vodách. *Vědci pro průmysl a praxi* [online]. 2012 [cit. 2017-03-03]. Dostupné z: <http://www.chempoint.cz/elektroanalyticke-stanoveni-kovu-a-jinych-latek-rozpustenych-ve-vodach-1338212537>
- [45] LI, Jianping a Tuzhi PENG. Response to high acidity and basicity at a platinum electrode in chronopotentiometry. *Analytica Chimica Acta*. 2003, 478(2), 337-344. DOI: 10.1016/S0003-2670(02)01513-1. ISSN 00032670. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0003267002015131>
- [46] PALLADINO, Giuseppe, Diego FERRI, Carla MANFREDI a Ermanno VASCA. Potentiometric determination of the total acidity of humic acids by constant-current coulometry. *Analytica Chimica Acta*. 2007, vol. 582, no 1, p. 164-173. DOI: 10.1016/j.aca.2006.08.060.
- [47] CEPPI, Silvia B., Manuel I. VELASCO a Carlos P. DE PAULI. Differential scanning potentiometry: surface charge development and apparent dissociation constants of natural humic acid. *Talanta*. 1999, 50(5), 1057-1063.
- [48] Oficiální stránky společnosti IHSS [online]. 2017, [cit. 2017-03-29]. Dostupné z: <http://humic-substances.org/#products>
- [49] RUBÍNKOVÁ, Eva. *Vliv půdního hospodaření na vlastnosti huminových látek*. Brno, 2011. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická.
- [50] Pospíšilová, L.; Tesařová, M. Organický uhlík obhospodařovaných půd. *Folia Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis*, 2009, č. 1, 17 s. ISSN 1211-8516.
- [51] J. D. Ritchie and E. M. Perdue, *Geochim. Cosmochim. Acta*, 67, 85-96 (2003)
- [52] S. J. Driver and E. M. Perdue, Advances in the Physicochemical Characterization of Dissolved Organic Matter: Impact on Natural and Engineered Systems, *American Chemical Society*, 1160, 75-86 (2014)
- [53] PURMALIS, Oskars, KLAVINS, Maris. *Comparative study of peat humic acids by using UV spectroscopy*. In: *1st Annual International Interdisciplinary Conference, AIIC 2013, 24–26 April, Azores, Portugal*. Latvia: University of Latvia, 2013, 857-866.

- [54] PERMINOVA, Irina V., Fritz H. FRIMMEL, Alexey V. KUDRYAVTSEV, Natalia A. KULIKOVA, Gudrun ABBT-BRAUN, Sebastian HESSE a Valery S. PETROSYAN. Molecular Weight Characteristics of Humic Substances from Different Environments As Determined by Size Exclusion Chromatography and Their Statistical Evaluation. *Environmental Science*. 2003, 37(11), 2477-2485. DOI: 10.1021/es0258069. ISSN 0013-936x. Dostupné také z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/es0258069>
- [55] SHIZONUKA, T., M. SHIBATA, and A. YAMAGUCHI, Molecular weight characterization of humic substances by MALDI-TOF-MS. *Journal of the Mass Spectrometry Society of Japan*. 2004, 52(1), 29-32.
- [56] BECKETT, Ronald., Zhang. JUE a J. Calvin. GIDDINGS. Determination of molecular weight distributions of fulvic and humic acids using flow field-flow fractionation. *Environmental Science*. 1987, 21(3), 289-295. DOI: 10.1021/es00157a010. ISSN 0013-936x. Dostupné také z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/es00157a010>
- [57] SONG, J., et al., Humic Acid Molecular Weight Estimation by High-Performance Size-Exclusion Chromatography with Ultraviolet Absorbance Detection and Refractive Index Detection. *Soil Science Society of America Journal*. 2010, 74(6), 2013-2020.

7 SEZNAM ZKRATEK A SYMBOLŮ

7.1 Použité symboly

Symbol	Význam symbolu
pH	záporný dekadický logaritmus koncentrace H^+ iontů
K_{HA}	disociační konstanta slabé jednosytné kyseliny
pK_a	záporný dekadický logaritmus disociační konstanty
a	aktivita
c	molární koncentrace
γ	aktivitní koeficient
γ_{\pm}	střední aktivitní koeficient
α	stupeň disociace
pK_{app}	záporný dekadický logaritmus zdánlivé disociační konstanty
λ_{max}	vlnová délka maxima absorpčního pásu
T	transmitance
I	prošlý zářivý tok
I_0	dopadající zářivý tok
A	absorbance
ε	molární absorpční koeficient
l	tloušťka absorbující vrstvy / délka vodiče
G	vodivost
κ	konduktivita
S	průřez vodiče
C	odporová kapacita měřící nádoby
R	odpor / elektrochemický výtěžek
λ	molární vodivost
λ^{∞}	mezní molární vodivost
n	látkové množství
i	rozpuštěcí proud
z	náboj
F	Faradayova konstanta
τ	čas

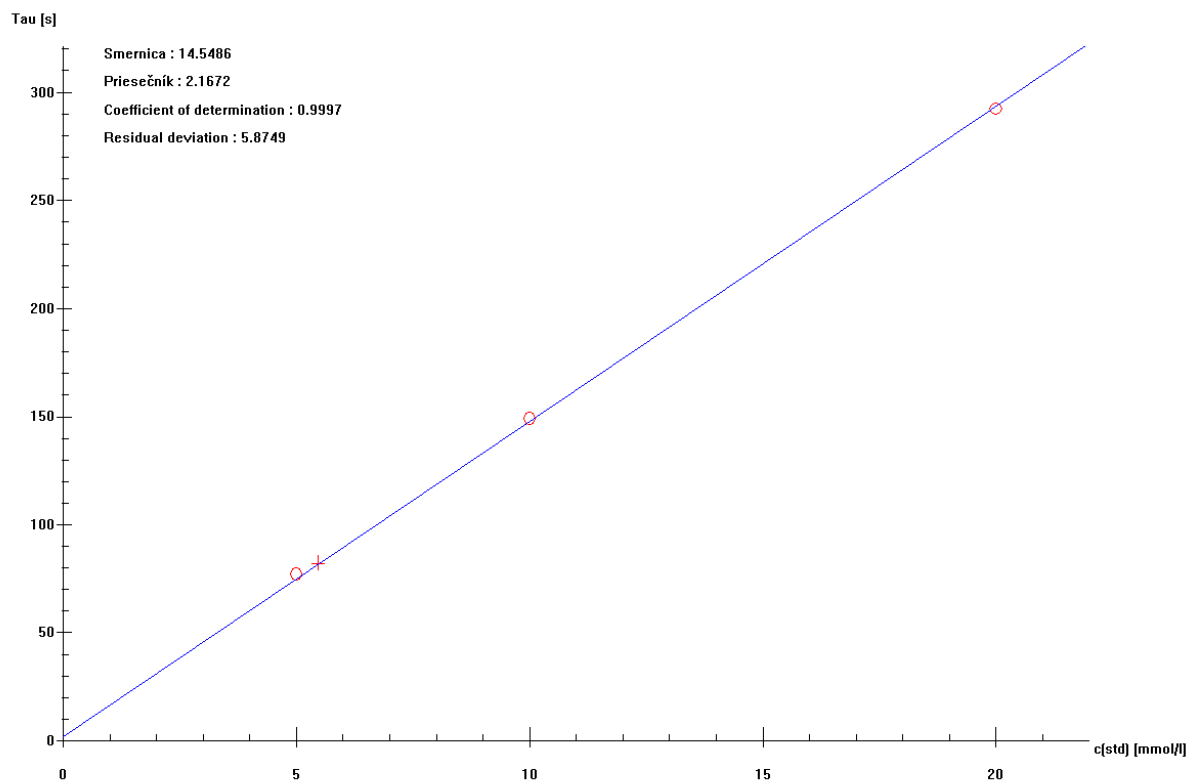
7.2 Použité zkratky

Zkratka	Význam zkratky
UV	oblast ultrafialového světla elektromagnetického záření
VIS	viditelná oblast elektromagnetického záření
IHSS	International Humic Substances Society
HL	humínové látky
HA	slabá jednosytná kyselina

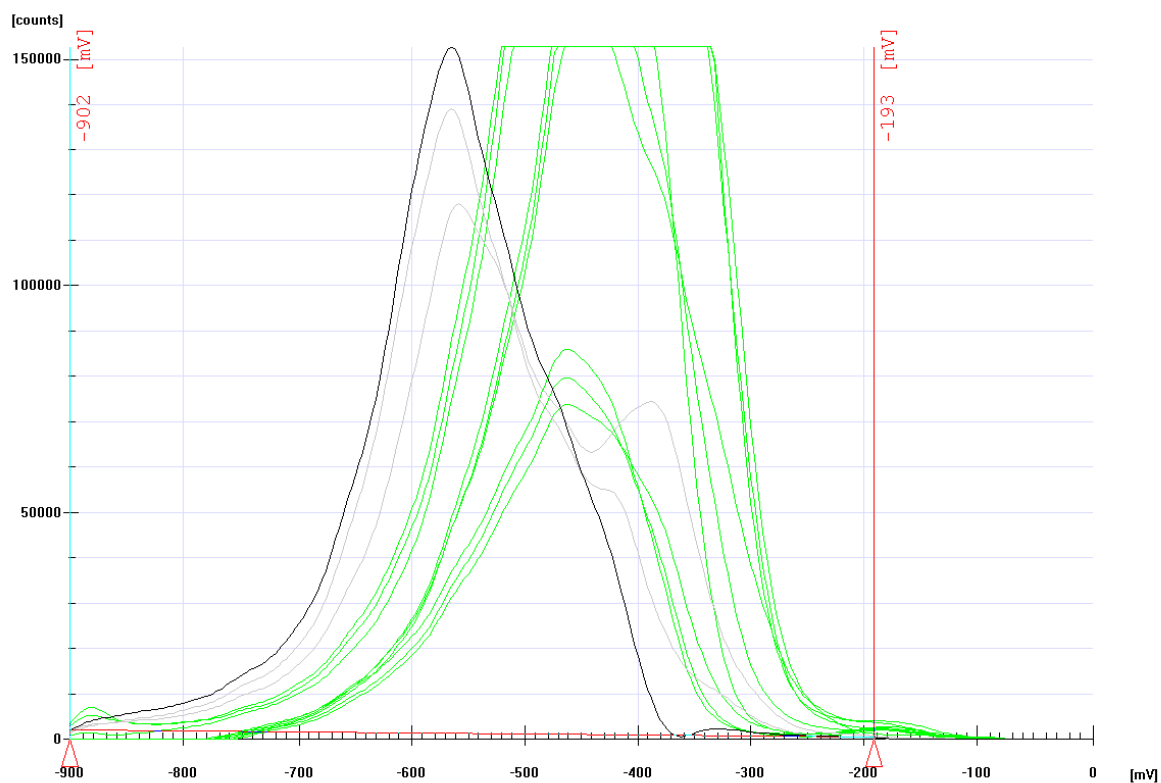
H ₂ A	slabá vícesytná kyselina
FTIR	infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací
HK	huminová kyselina
FK	fulvinová kyselina
NOM	natural organic matter
MO	methylovaný
BTB	bromthymolová modř

8 PŘÍLOHY

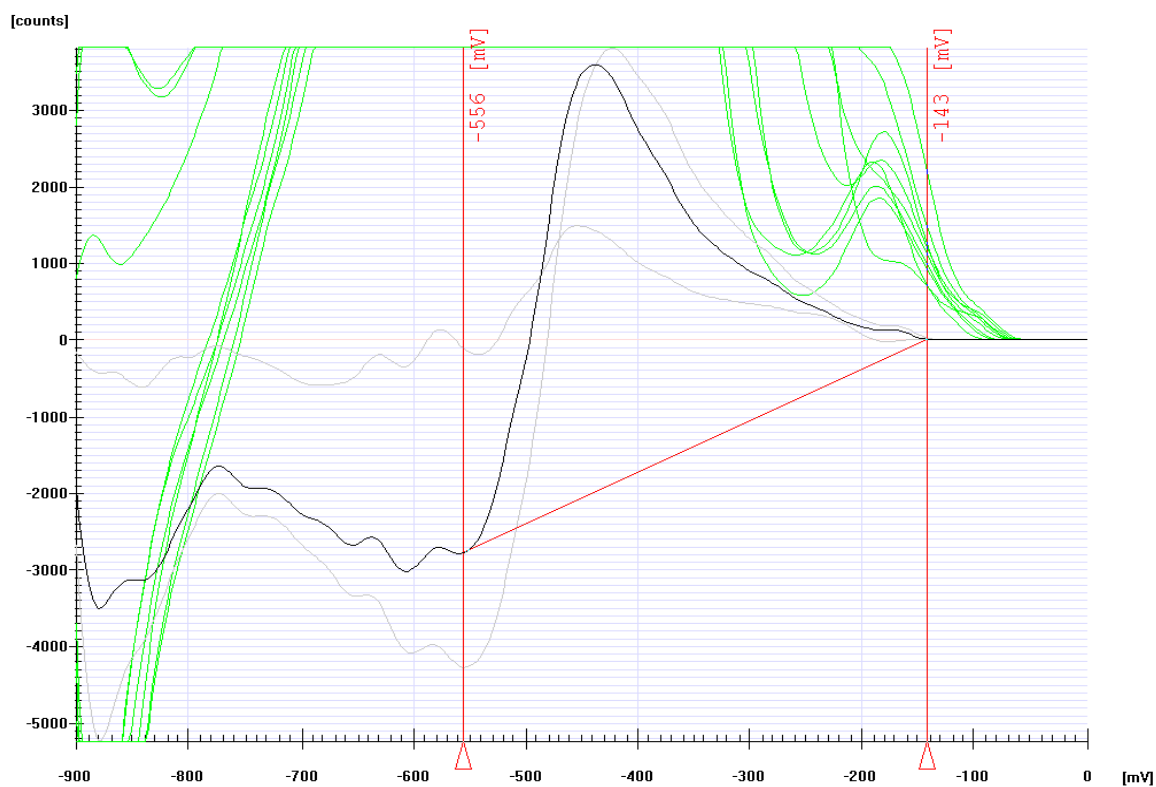
Příloha 1 *Kalibrační přímka průtokového analyzátoru EcaFlow*



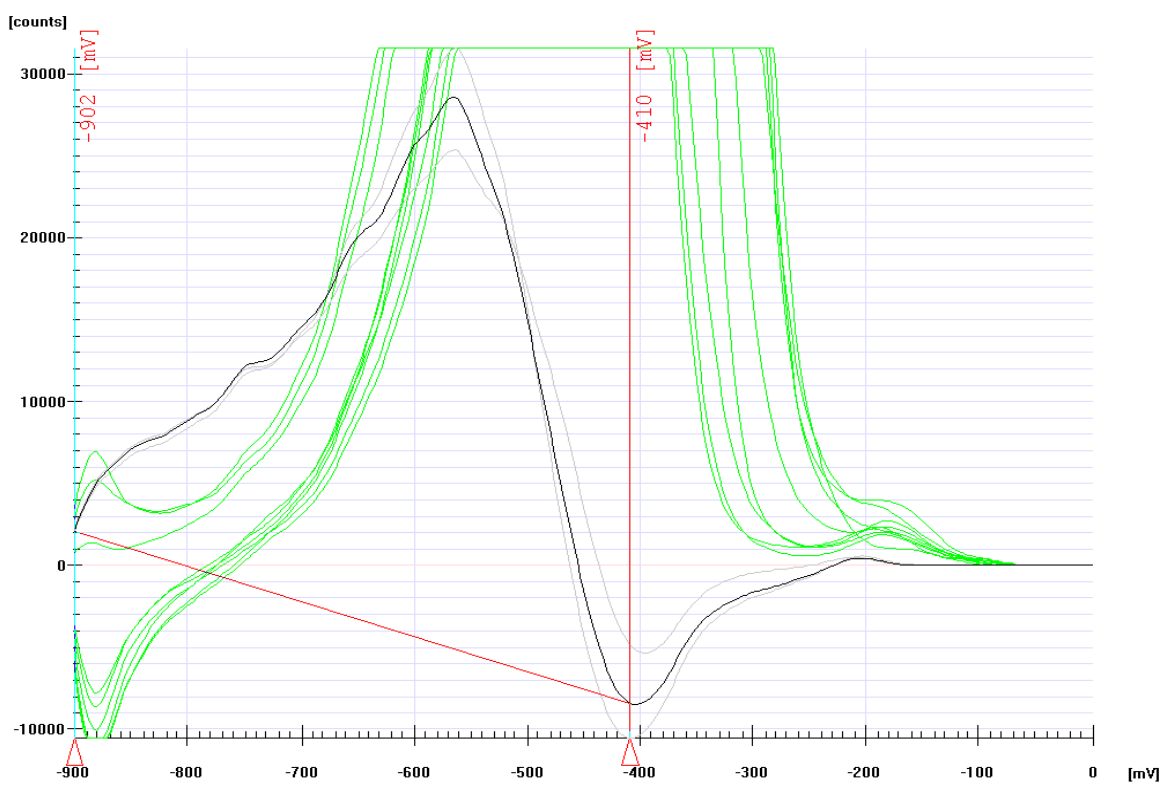
Příloha 2 *Ukázka záznamu pro ověření kalibrace HCl*



Příloha 3 Ukázka záznamu pro HK_2 o koncentraci $0,01 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ – na záznamu lze rozlišit jednotlivé frakce



Příloha 4 Ukázka záznamu pro HK_1 o koncentraci $1 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$



Příloha 5 Ukázka záznamu pro HK_3 o koncentraci $10 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ – jednotlivé frakce splývají do jednoho píku

