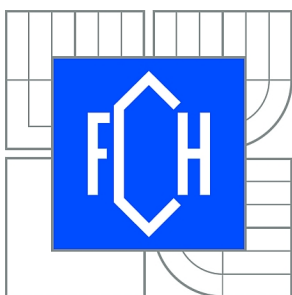




VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA CHEMICKÁ

CENTRUM MATERIÁLOVÉHO VÝZKUMU

FACULTY OF CHEMISTRY

MATERIALS RESEARCH CENTRE

VYUŽITÍ CHRONOPOTENCIOMETRICKÉ TITRACE V HUMINOVÉM VÝZKUMU

UTILIZATION OF CHRONOPOTENTIOMETRIC TITRATION IN HUMIC RESEARCH

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. JANA VIKTORINOVÁ

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

doc. Ing. MARTINA KLUČÁKOVÁ,
Ph.D.

BRNO 2013



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

Zadání diplomové práce

Číslo diplomové práce:	FCH-DIP0729/2012	Akademický rok: 2012/2013
Ústav:	Centrum materiálového výzkumu	
Student(ka):	Bc. Jana Viktorinová	
Studijní program:	Spotřební chemie (N2806)	
Studijní obor:	Spotřební chemie (2806T002)	
Vedoucí práce	doc. Ing. Martina Klučáková, Ph.D.	
Konzultanti:		

Název diplomové práce:

Využití chronopotenciometrické titrace v huminovém výzkumu

Zadání diplomové práce:

- 1) literární rešerše - chronopotenciometrické stanovení organických kyselin
- 2) plán experimentů
- 3) vlastní experimentální měření
- 4) zpracování výsledků a závěr

Termín odevzdání diplomové práce: 3.5.2013

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

Bc. Jana Viktorinová
Student(ka)

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

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
Ředitel ústavu

V Brně, dne 31.1.2013

prof. Ing. Jaromír Havlica, DrSc.
Děkan fakulty

ABSTRAKT

Huminové kyseliny jsou přírodní látky patřící do skupiny huminových látek. Vznikají převážně rozkladem rostlinných zbytků. Jsou obsažené v půdách, rašelinách, sedimentech, mladých uhlí, vodě a dokonce i ve vzduchu. Huminové kyseliny jsou jen částečně rozpustné ve vodě a s rostoucí hodnotou pH stoupá jejich rozpustnost.

Diplomová práce se zaměřuje na využití chronopotenciometrické titrace v huminovém výzkumu. Tato metoda se převážně používá pro stanovení stopové koncentrace analytu. Tato práce je zaměřena na stanovení kyselosti pomocí potenciometrické titrace a dále na stanovení disociační konstanty pomocí chronopotenciometrie společně s měřením pH připravených vzorků.

ABSTRACT

Humic acids are natural substances belonging to the group of humic substances. They arise mainly decomposition of plant residues. They are contained in soils, peat, sediments, young coal, water and even in the air. Humic acids are only partially soluble in water with increasing pH increases their solubility.

Diploma thesis focuses on the use of chronopotentiometric titration of humic research. This method is mainly used for the determination of trace concentrations of analytes. This work is focused on the determination of acidity by potentiometric titration and the determination of dissociation constants using chronopotentiometry with measurement of pH of prepared samples.

Klíčová slova

Huminové kyseliny, disociační konstanta, chronopotenciometrie

Keywords

Humic acids, dissociation constant, chronopotentiometry

VIKTORINOVÁ, J. Využití chronopotenciometrické titrace v huminovém výzkumu. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2013. 59 s. Vedoucí diplomové práce doc. Ing. Martina Klučáková, Ph.D..

PROHLÁŠENÍ

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

.....

Podpis autora

Poděkování:

Tímto bych ráda poděkovala vedoucí mé diplomové práce doc. Ing. Martině Klučákové, Ph.D. za vynikající vedení, trpělivost a poskytnuté rady které mi pomohly při vypracování mé diplomové práce.

Tato práce byla podpořena projektem "Centrum materiálového výzkumu na FCH VUT v Brně" č. CZ.1.05/2.1.00/01.0012 z ERDF.

OBSAH

1. ÚVOD	7
2. CÍL PRÁCE	8
3. TEORETICKÁ ČÁST	9
3.1 Huminové látky	9
3.2 Huminové kyseliny.....	10
3.2.1 Vznik a výskyt huminových kyselin.....	10
3.2.2 Vlastnosti a struktura huminových kyselin.....	10
3.2.3 Funkční skupiny huminových kyselin	12
3.3 Metody stanovení acido-bazických vlastností huminových kyselin	13
3.3.1 Obsah funkčních skupin.....	13
3.3.2 Stanovení disociačních konstant	15
3.4 Použité metody stanovení.....	16
3.4.1 UV/VIS spektroskopie	16
3.4.2 Chronopotenciometrická titrace.....	16
3.5 Metody používané pro stanovení pK _a	17
3.5.1 Potenciometrické titrace.....	17
3.5.2 Ostatní metody	19
4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	21
4.1 Použité přístroje.....	21
4.2 Použité chemikálie.....	21
4.3 Izolace huminových kyselin	21
4.3.1 Huminová kyselina HK ₁	21
4.3.2 Huminové kyseliny HK ₂	22
4.3.3 Huminové kyseliny HK ₃	22
4.3.4 Huminové kyseliny HK ₄	22
4.3.5 Huminové kyseliny HK ₅	23
4.3.6 Huminové kyseliny HK ₆	23
4.4 Pracovní postup	23
4.4.1 Příprava výluhů huminových kyselin	23
4.4.2 Stanovení obsahu kyselých funkčních skupin	26
4.4.3 Měření pomocí chronopotenciometrické titrace	27
5. VÝSLEDKY A DISKUZE	28
5.1 Charakterizace huminových kyselin.....	28
5.1.1 Elementární stanovení huminových kyselin	28
5.1.2 Infračervená spektroskopie	28
5.1.3 Stanovení obsahu kyselých funkčních skupin	29
5.1.4 Stanovení disociační konstanty přímou titrací	32
5.2 Měření absorbance huminových kyselin	33
5.3 Jednoduché organické kyseliny	37
5.4 Dosavadní zkušenosti s chronopotenciometrickou titrací u HK	38
5.5 Stanovení pH huminových kyselin.....	40
5.6 Stanovení celkové koncentrace H ⁺ iontů chronopotenciometrickou titrací	42
5.7 Stanovení disociační konstanty	48
6. ZÁVĚR	51
7. SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ	52

8. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ.....	56
9. PŘÍLOHY.....	57

1. ÚVOD

Huminové látky jsou přírodní látky (směs organické hmoty) obsažené v půdě a kaustobiolitech (rašelině, hnědém uhlí a lignitu). Jako důležitá složka půdy vznikají biochemickými přeměnami (tlením) organických (převážně rostlinných) zbytků a jsou součástí přírodního humusu. Struktura huminových kyselin je velmi rozmanitá a liší se podle původu, naleziště, ale i doby odběru vzorku, neboť huminové kyseliny se chovají jako živý organismus a za vhodných podmínek mění svou strukturu. Tento cyklus přeměny struktury je důležitou součástí půdotvorných procesů.

Huminové látky jsou složité vysokomolekulární polycyklické sloučeniny s relativní molekulovou hmotností v rozmezí několika stovek až desítek tisíců. Huminové látky se ve vodě vyskytují jako jednotlivé molekuly, nebo jsou vzájemně spojené slabými vazebnými interakcemi do supramolekulárních struktur a mohou se vyskytovat i jako micelární koloidy s hydrofobní částí molekuly umístěnou uvnitř a hydrofilní vně molekuly.

Tato práce je zaměřena na stanovení disociační konstanty huminových kyselin s využitím chronopotenciometrické titrace. Důležité bylo zjištění disociace H^+ iontů měřením pH, zjištění kyselosti potenciometrickou titrací a následně stanovení disociační konstanty chronopotenciometrickou titrací. Takto stanovená disociační konstanta charakterizuje disociační chování huminových kyselin ve výluhu, tj. pouze frakce rozpustné za daných podmínek, na rozdíl od hodnot získaných klasickými titračními metodami, které poskytují střední hodnotu disociační konstanty celého vzorku.

2. CÍL PRÁCE

Cílem této diplomové práce bylo zjistit, jestli je možné využít chronopotenciometrické titrace v huminovém výzkumu pro stanovení obsahu karboxylových skupin frakcí huminových látek rozpuštěných ve vodných roztocích. Dílčím cílem bylo stanovit hodnoty pK_a pro jednotlivé huminové kyseliny.

3. TEORETICKÁ ČÁST

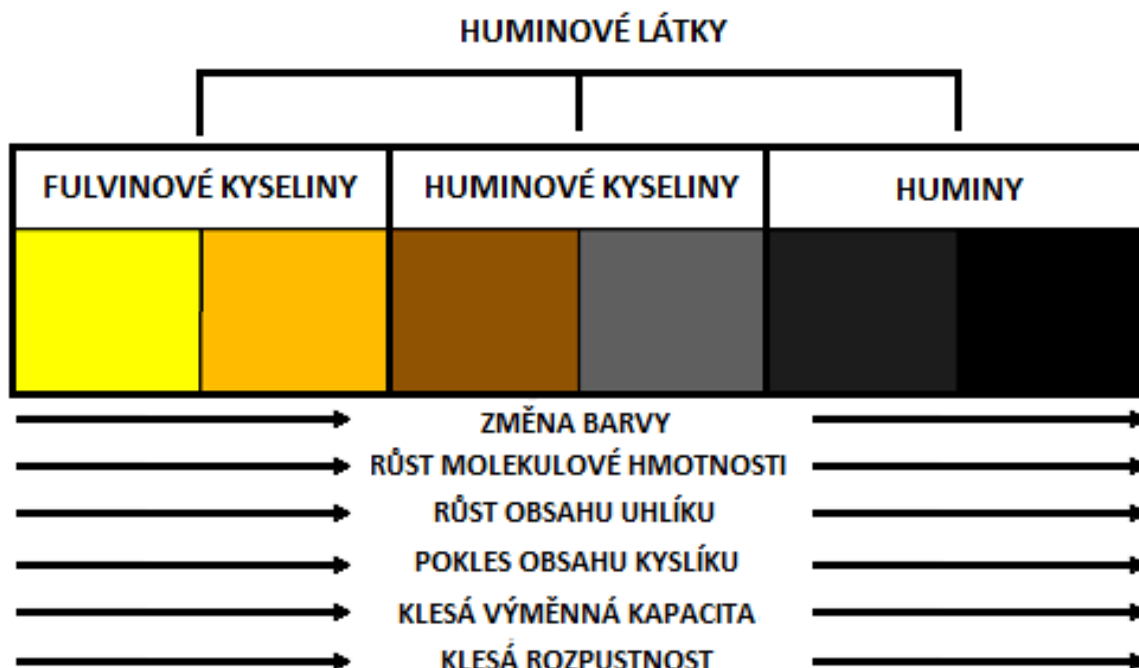
3.1 Huminové látky

Jedná se o přirozeně se vyskytující směs organických sloučenin, které hrají důležitou roli v chemii a biochemii přírodních vod a půdy. Jednou z unikátních vlastností je heterogenita z hlediska elementárního složení, chemické funkčnosti a distribuce molekulárních velikostí. Huminové látky lze odvodit z jakýchkoli organických materiálů, včetně rostlinných a živočišných zbytků, mikrofauny, bioodpadů, pesticidů a dalších materiálů.[1]

Huminové látky jsou složité vysokomolekulární látky, které vznikají v procesu humifikace. Během humifikace prodělává původní organická hmota řadu rozkladných procesů, ale především syntetické procesy, při kterých se spotřebovává energie. Tvorba jednotlivých komponentů je závislá na půdních podmínkách jednotlivých území. Huminové látky mají významné sorpční a iontovýměnné vlastnosti. Jsou schopné tvořit organominerální komplexy, které dávají předpoklad k tvorbě dobré a stabilní struktury půdy.[2]

Huminové látky se podle svých vlastností dělí na humusové kyseliny (rozpustné), huminy (nerozpustné ve vodě) a humusové uhlí. Nejvýznamnější skupinou jsou humusové kyseliny a ty se dělí na:

- huminové kyseliny (rozpustné v alkáliích, nerozpustné v kyselinách)
- fulvonové kyseliny (zůstávají rozpuštěné v kyselém prostředí)
- hymatomelanové kyseliny (rozpustné v alkoholu) [3]



Obr. 1 Změna vlastností jednotlivých frakcí huminových látek [4][1]

3.2 Huminové kyseliny

3.2.1 Vznik a výskyt huminových kyselin

Huminové kyseliny vznikají rozkladnými a syntetickými pochody z odumřelých rostlin a živočichů v půdě, kde tvoří tzv. humus, což je tmavě zbarvená amorfní organická složka půdy. Humifikuje se asi polovina primární organické hmoty, zbytek se mineralizuje. Rozlišuje se půdní a vodní humus, který se liší svým složením. Vodní humus vzniká rozkladem planktonu a vodních rostlin. Huminové kyseliny se z humusu získávají extrakcí do vody a poté vysrážením v kyselém prostředí, kdy vznikají tak zvané agregáty. Huminové kyseliny v zásaditém prostředí tvoří převážně pravé roztoky.[5]

Mezi základní hypotézy vzniku huminových látek patří tři teorie:

1. *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.
2. *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. Nejprve by tedy vznikaly fulvokyseliny, až pak huminové kyseliny a nakonec huminy.[6]
3. *Kondenzace cukrů s aminy* – tato teorie vychází z předpokladu, že humus vzniká z cukrů. Huminové látky vznikají kondenzací aminosloučenin s redukujícími cukry, kdy redukující cukry a aminy neenzymaticky polymerizují na dusíkaté polymery. Za normálních podmínek se jedná o pomalou reakci. V této teorii se mikroorganismy podílejí pouze při štěpení polysacharidů a proteinů na monosacharidy a aminokyseliny. Reakce monosacharidů a aminokyselin jsou na bázi chemických reakcí.[7]

Huminové kyseliny jsou všudypřítomné přirozeně se vyskytující polymery, které jsou důležitými prekurzory kerogenů, živců, ropy a uhlí. Vyskytují se v půdách, sedimentech, rašelině, uhlí, řekách, mořích, rostlinách a korálových skeletech. Zvyšují půdní úrodnost, urychlují fotodegradaci pesticidů a snižují toxicitu těžkých kovů. Snižují účinnost produkce oxidu hlinitku a produkci karcinogenů při rafinaci vody po těžbě rud.[8]

3.2.2 Vlastnosti a struktura huminových kyselin

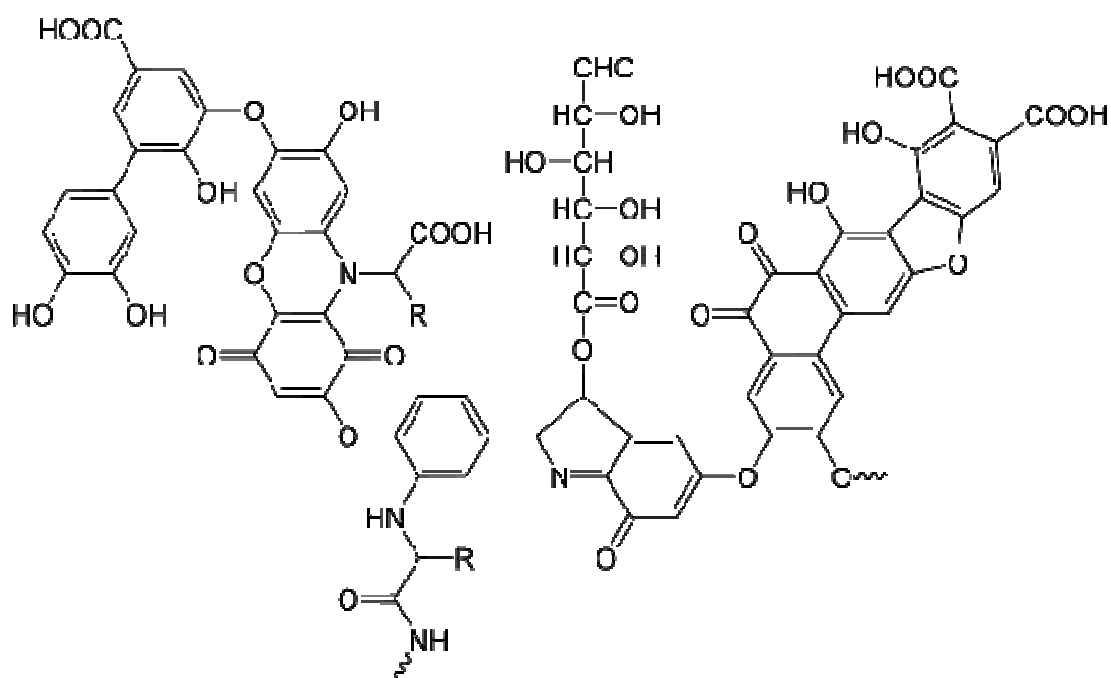
Huminové kyseliny jsou slabě disociované, vícesytné organické kyseliny. Hodnoty disociačních konstant se pohybují obvykle v rozmezí 10^{-4} – 10^{-5} . Hodnoty pH jejich roztoků

jsou přibližně 3,5 v závislosti na koncentraci. V roztocích se chovají jako micelární koloidy. Koloidní částice mají záporný náboj a jejich izoelektrický bod leží v kyselé oblasti. V silně alkalických roztocích tvoří převážně pravé roztoky. Můžeme je získat i vyluhováním zásaditými roztoky a vysrážením v kyselém prostředí.

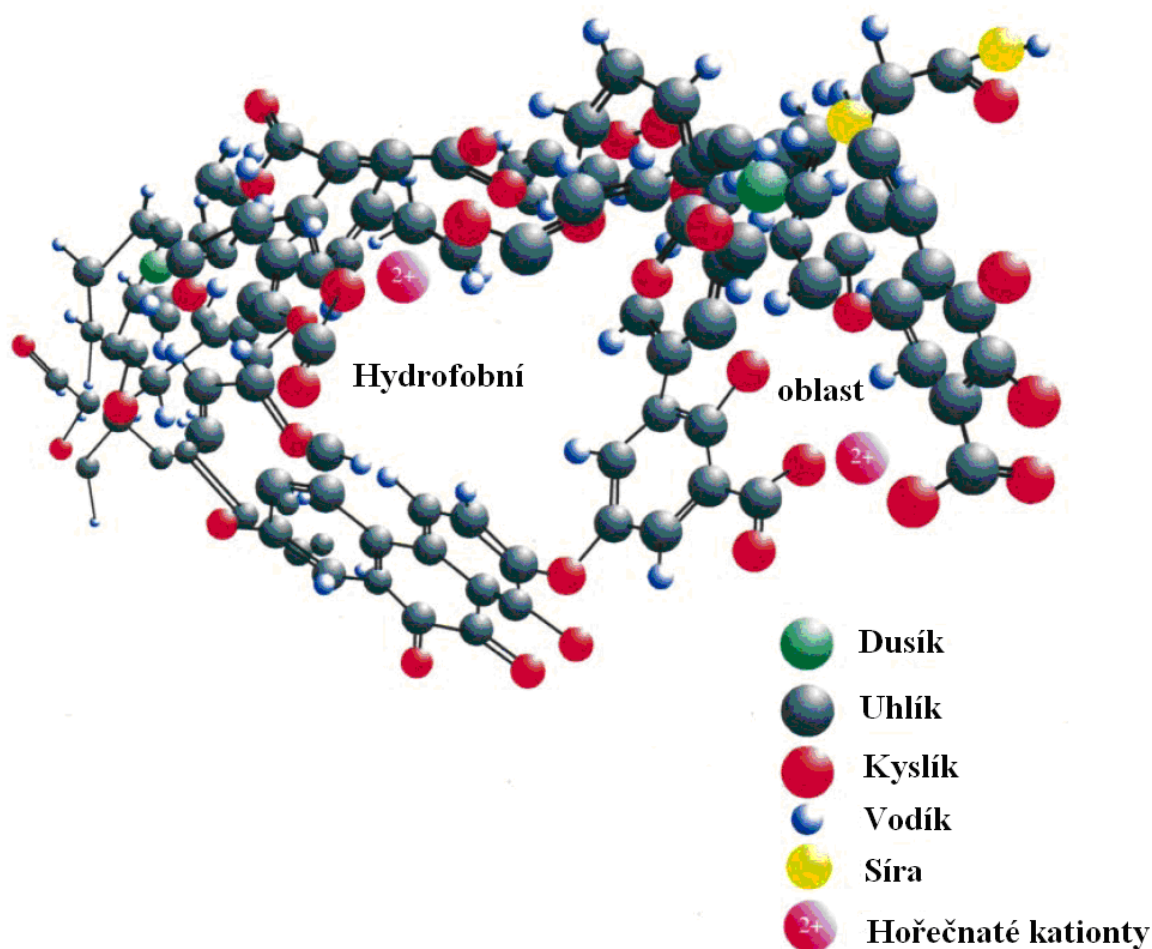
Struktura huminových kyselin je velmi rozmanitá a liší se podle původu, naleziště, ale i doby odběru vzorku, neboť huminové látky se chovají jako živý organismus a za vhodných podmínek mění svou strukturu. Tento cyklus přeměny struktury je důležitou součástí půdotvorných procesů.

Jeví se jako netavitelné amorfnní sloučeniny kyselého charakteru, které při karbonizaci neposkytují dehet, ale poskytují velké množství CO_2 . Jsou nehydrolyzovatelné, peptizovatelné za normálních teplot a mají velkou odolnost vůči rozkladu. V roztocích se chovají jako lyofobní koloidy se značnou sorpční schopností. Vyznačují se vysokým obsahem vody, kterou nelze mechanicky odstranit.[9]

Za základní strukturní jednotku huminových kyselin můžeme považovat cyklické sloučeniny, nejčastěji aromatické s bočními řetězci a hydrofilními skupinami vázanými na jádře i bočních řetězcích. Našli se i chinoidní struktury. Přítomné jsou i heterocyklické sloučeniny, jako derivát furanu, pyridinu, indolu, purinu a pirimidinu. Jde o sloučeniny vzniklé kondenzováním heterocyklů anebo spojením vodíkovými můstky.[10]



Obr. 2 Modelová struktura huminových kyselin [7]



Obr. 3 Navržená micelární struktura humiových kyselin - Von Wandruszka, 2000 [11]

3.2.3 Funkční skupiny huminových kyselin

Huminové kyseliny různého původu mají i různé zastoupení funkčních skupin a bočních řetězců. Z toho můžeme usuzovat, že prakticky jde o různá stádia mikrobiálního odbourávání, a tím o značnou komplikaci při určení struktury jednotlivých komponentů huminových kyselin. Všeobecným a charakteristickým znakem těchto látek zůstává i nadále přítomnost karboxylové a hydroxylové skupiny, dále fenolické, alkoholické a methylové skupiny. Karboxylové a hydroxylové skupiny jsou příčinou kyselosti, sorpční a výměnné kapacity huminových kyselin, které jsou různé v závislosti od typu kationtu. V jedné molekule huminové kyseliny se obvykle nacházejí 3–4 karboxylové skupiny a 3–7 hydroxylových (fenolových) skupin. V současnosti si názory a teorie struktury huminových kyselin často navzájem odporují, a to především z důvodu nejednotnosti názorů na původ huminových kyselin. Komplikace nastávají i z hlediska studování huminových kyselin na základě údajů elementární analýzy, protože je evidentní, že huminové kyseliny představují směs sloučenin s různou molekulovou strukturou. [10]

Elementární analýza huminových látek poskytuje informace o distribuci hlavních prvků (C, H, O, N, S). Proto původní struktury můžeme dedukovat jen po frakční analýze huminových kyselin. Huminové látky obsahují v průměru asi 50 až 60 hm. % organického uhlíku, 30 až 40 hm. % kyslíku, 3 až 6 hm. % vodíku, 2 až 5 hm. % dusíku a v některých případech až 2 hm. % síry. Analýza funkčních skupin osvětluje výskyt hlavních funkčních skupin (COOH, OH a C=O) v huminových materiálech a určují index jejich reaktivity. Tato analýza je důležitá na určení struktury jednotlivých subjednotek a charakteru funkčních skupin v nich obsažených a taky na určení jejich vzájemné vazby v makromolekule. Jeden mol huminové kyseliny průměrně obsahuje 8,6 mmol karboxylových skupin, 5,5 mmol karbonylových skupin, 5,1 mmol hydroxylových skupin (z toho je 2,9 mmol fenolických a 2,2 mmol alkoholických skupin) a 0,2 mmol methoxylových skupin.[12]

Obsah karboxylových skupin v huminových kyselinách je důležitý, protože to ovlivňuje rozpustnost ve vodě, která je jedním z hlavních médií v ovzduší, klimatických a ekologických procesech. To také ovlivňuje vodní aktivity a povrchové napětí kapének ve vzduchu, což jsou dvě klíčové vlastnosti oblačnosti, tvorby kapiček mlhy, růstu a aktivace hygroskopické vody. Kromě toho, karboxylová skupina obdařila tyto molekuly schopností tvořit cheláty s polyvalentními kationty, a tak ovlivňuje biologickou dostupnost a biogeochemický koloběh.[13]

3.3 Metody stanovení acido-bazických vlastností huminových kyselin

3.3.1 Obsah funkčních skupin

Celková kyselost – K určení celkové kyselosti huminových kyselin máme 3 základní metody:

- *Bezvodá titrační metoda* – Tato metoda zahrnuje konduktometrické titrace suspenzí huminových nebo fulvinových kyselin v acetonu s roztokem hydroxidu draselného v izopropylalkoholu v dusíkaté atmosféře. Získané hodnoty jsou srovnatelné s baryovou metodou. [14]
- *Tradiční baryum-hydroxidová metoda* – je založena na reakci huminové kyseliny s hydroxidem barnatým, kdy reakcí vznikají barnaté soli huminové kyseliny a voda. Nadbytečný hydroxid barnatý je pak následně titrován standardní kyselinou. Výsledky však byly získány pouze v určitých substituentech fenolu a ve fenolformaldehydových pryskyřicích. Při této metodě byla pozorovaná špatná analytická přesnost, která byla přisuzována karbonaci. Výsledky byly nižší díky nevytvoření sraženiny solí barya při reakci slabě kyselé sloučeniny s hydroxidem barnatým. Velice rozšířená je nepřímá metoda, která byla používána na stanovení uhlí a poté byla přizpůsobena na huminové látky. Nejdříve byly slabé kyseliny disociovány a vysráženy. Nezareagované OH skupiny byly odfiltrovány a poté titrovány standardní kyselinou až do pH 8,4. [15]

- *Potenciometrická titrace* – Při této metodě se nejprve huminové látky okyselí na pH 4 a poté se titrují do bodu ekvivalence. Tato metoda způsobuje hydrolýzu, oxidační reakci a elektrodovou interferenci v silně alkalických roztocích. Tato metoda je přesnější na stanovení celkové kyselosti huminových látek.[15]

Karboxylové skupiny – Stanovují se pomocí kalcium-acetátovou metodou, kdy při reakci s huminovými kyselinami vzniká kyselina octová. Vzniklá kyselina octová je potenciometricky titrována standardizovaným roztokem hydroxidu sodného (skleněná kalomelová elektroda). Další metodou je jodometrická titrace dávající vyšší hodnoty než kalcium-acetátová metoda, ale výsledky nejsou reprodukovatelné.[15]

Všechny hydroxylové skupiny – Acetylace s acetanhydridem v pyridinu se používá pro odhad celkových OH skupin. Přebytek anhydridu je hydrolyzován na kyselinu octovou, která je poté titrována standardizovanou zásadou.[15]

Fenolické hydroxylové skupiny – Pro odhad se používá upravený Ubaldiniho postup, který zahrnuje refluxování huminových látek s alkoholickým roztokem hydroxidu sodného. Přebytké alkálie jsou odděleny filtrací, zbytek byl promyt a suspendován v 85% alkoholu s nasyceným oxidem uhličitým. Suspenzní roztok se filtruje, promývá a kapalná fáze je titrována odměrným roztokem ke stanovení uhličitánu draselného.[15]

Alkoholické hydroxylové skupiny – Na stanovení těchto skupin máme několik metod. Tyto skupiny jsou méně reaktivní než fenolické. Obsah alkoholických hydroxylů se vypočítá tak, že se od celkového obsahu hydroxylových skupin odečte obsah fenolických hydroxylových skupin.[15]

Karboxylové skupiny – Postup podle Fritze je založen na reakci huminové kyseliny v metanol-2-propanolu s přebytkem hydroxylaminu. Nezreagonaný hydroxylamin je titrován standardizovaným roztokem kyseliny chloristé. Schnitzer a Skinner rozvíjí polarografickou metodu. Huminové látky jsou refluxovány s přebytkem 2,4-dinitrophenylhydrazinu v okyseleném etanolu. Následuje polarografické stanovení činidla v přebytku. Obsah se poté vypočte z množství spotřebovaného činidla. Metoda podle Browna pro odhad C=O na základě jejich redukce $-CH_2OH$ s boranem sodným ($NaBH_4$). Redukce je prováděna v alkalickém prostředí a vodík uvolněný z nepoužitého $NaBH_4$ je odhadnut manometricky.[15]

Methoxylové skupiny – Upravená Zeiselova metoda. Methoxy skupina je oddělena vařícím jodovodíkem a vzniká methyljodid. Poté je oxidován bromem na kyselinu jodovou. Toto je zpracováno s přebytkem jodidu draselného v kyselém roztoku, kde je obsažený jod, který se určí titrací standardizovaným roztokem thiosíranu sodného. [15]

3.3.2 Stanovení disociačních konstant

Disociační konstanta slouží ke kvantitativnímu určení síly kyseliny v roztoku. Jedná se o rovnovážnou konstantu chemických reakcí mezi kyselinou a zásadou. Rovnice disociace:



Kde HA je obecná kyselina, která disociuje na konjugovanou bázi kyseliny A^- a vodíkový ion H^+ . Chemická reakce říká, že rovnováha nastává, když se koncentrace jednotlivých složek nemění v čase. Disociační konstanta se vypočítá z rovnovážných koncentrací složek podle rovnice:

$$K_a = \frac{[\text{A}^-] \cdot [\text{H}^+]}{[\text{HA}]} = \frac{a_{\text{H}^+} \cdot a_{\text{A}^-}}{a_{\text{HA}}} = \frac{c_{\text{H}^+} \cdot c_{\text{A}^-} \cdot \gamma_{\pm}^2}{c_{\text{HA}} \cdot \gamma_{\text{HA}} \cdot c_{\text{st}}} \quad 3.2$$

Kde a je aktivita, c je molární koncentrace a γ je aktivní koeficient. Z důvodu velmi nízkých hodnot disociační konstanty K_a se používá hodnota $\text{p}K_a$, což je záporný dekadický logaritmus disociační konstanty:

$$\text{p}K_a = -\log_{10} K_a \quad 3.3$$

Čím vyšší je hodnota $\text{p}K_a$, tím je nižší stupeň disociace. Silná kyselina se úplně disociuje ve vodných roztocích. Hodnota disociační konstanty se mění v závislosti na teplotě.[16]

Jelikož jsou huminové kyseliny polyelektrolyty, tak jednotlivé karboxylové i fenolické OH skupiny mají různě kyselé disociační konstanty. Tyto disociační konstanty se mění (kolísají), z tohoto důvodu se používají průměrné hodnoty disociačních konstant. Na zjištění jejich $\text{p}K_a$ hodnot se používají titrační metody.[17]

Ve většině přírodních vod se při běžných hodnotách pH huminové látky vyskytují jako negativně nabitě, povrchově aktivní makromolekuly. Jejich záporný náboj je dán přítomností funkčních skupin, zejména karboxylových a hydroxylových. Přítomnost těchto skupin vázaných na huminovém skeletu je i jednou z příčin kyselosti vod s kyselou koncentrací huminových látek. Zejména karboxylové skupiny mají relativně silně kyselý charakter (disociační konstanty jsou řádu $10^{-2} - 10^{-5}$), zatímco hydroxylové skupiny jsou jen slabě kyselé (disociační konstanty řádu $10^{-9} - 10^{-11}$).[6]

Zdánlivá disociační konstanta bývá vypočítávána z potenciometrické titrace s upravenou Henderson-Hasselbachovou rovnicí. Tato rovnice se nejčastěji používá pro analýzu potenciometrických titračních křivek slabých polykarboxylových kyselin:[18]

$$\text{p}K_a = \text{pH} + \log\left(\frac{1-\alpha}{\alpha}\right) \quad 3.4$$

V případě, že je stupeň disociace $\alpha = 0,5$, pak $\text{p}K_a = \text{pH}$

Existují i nepřímé techniky, které se používají na přibližné určení disociační konstanty. Tyto techniky využívají isosbestického bodu při spektrálních metodách, a to tak, že se připraví roztoky stejné látky, ale v jiném prostředí (kyselé, neutrální, alkalické), nebo se

připraví více roztoků o jiném pH. Isobestický bod je bod protnutí všech absorpčních spekter. Závislost absorbance kterékoliv formy kyseliny (disociované i nedisociované) na pH má tvar sigmoidální křivky symetrické podle bodu inflexe. V bodě inflexe platí: $pK_a = pH$ [19][20]

3.4 Použité metody stanovení

3.4.1 UV/VIS spektroskopie

Podstatou ultrafialové (UV) a viditelné (Vis) spektroskopie je absorpce ultrafialového a viditelného záření (200 až 800 nm) zředěnými roztoky molekul. Při absorpci dochází k excitaci valenčních elektronů, které jsou součástí molekulových orbitalů. Proto molekulová absorpční spektra v UV/VIS oblasti jsou svou podstatou elektronová spektra.

Měření absorbance se hojně využívá k určení koncentrace sloučenin s chromofory. Pracuje se obvykle metodou kalibrační křivky. UV/Vis spektrometrie je využívána v průtočných celách detektorů různých separačních metod. Měření je prováděno buď při vhodné vlnové délce, nebo jsou snímána celá spektra v krátkých časových intervalech.[21]

UV/Vis spektroskopie se nejčastěji využívá pro charakterizaci kvality humusových látek. Huminové kyseliny mají vysokou schopnost světelné absorbance v UV/Vis oblasti, proto můžeme použít elektronová absorpční spektra pro charakteristiku těchto makromolekulárních látek a přibližně určit chemickou strukturu a typy vazeb v molekule. Spektrální čáry představují závislost absorbance huminových kyselin na vlnové délce a jejich tvar závisí na chemickém složení huminové kyseliny (tj. intenzitě zbarvení měřeného roztoku). Čím více klesá absorbance roztoku huminové kyseliny, tím strmější tvar křivka má a tím vyšší hodnoty má barevný index ($Q_{4/6}$).[7] Hodnota barevného indexu $Q_{4/6}$ je dána poměrem absorbance huminové kyseliny při vlnové délce 465 nm a 665 nm. Hodnota $E_{4/6}$ představuje poměr absorbance huminové kyseliny při vlnové délce 400 nm a 600 nm.

Zralost huminových látek byla stanovena na základě měření absorbance v UV-VIS oblasti spektra – z rozdílu logaritmických hodnot absorbance při 400 nm a při 600 nm. Podle hodnot koeficientu $\Delta \log K$ můžeme rozdělit na typy: „A“, „B“ a „Rp“ podle zralosti:

- Typ A představuje huminové kyseliny s vysokým stupněm humifikace (hodnoty $\Delta \log K$ do 0,60). Huminové kyseliny v této skupině jsou vysoce stabilní, mají vysokou molekulovou hmotnost a vysoký stupeň kondenzace aromatických skupin.
- Typ B je skupina huminových kyselin s hodnotou $\Delta \log K$ od 0,60 do 0,80. Tyto huminové kyseliny mají nižší molekulovou hmotnost a nižší stupeň humifikace.
- Typ Rp představuje huminové kyseliny s hodnotou $\Delta \log K$ od 0,80 do 1,10. Tato skupina obsahuje huminové kyseliny s ještě nižší molekulovou hmotností a s nižším stupněm humifikace a vysokým obsahem alifatických skupin.[22]

3.4.2 Chronopotenciometrická titrace

Pro účely stanovení obsahu H^+ iontů lze využít modifikované chronopotenciometrické metody, při nichž se v podstatě měří časová závislost potenciálu měrné elektrody. Tato

elektrochemická metoda je založena na stanovení zejména stopových koncentrací látek, které se vylučují na pracovní elektrodě a zpětně jsou rozpustitelné konstantním proudem. Ze změny potenciálu pracovní elektrody se určí doba trvání rozpuštění vyloučené látky (chronopotenciometrický přechodový čas), která je úměrná koncentraci analytu v analyzovaném vzorku.

SCP – galvanostatická rozpouštěcí (stripping) chronopotenciometrie je dvojfázová analytická metoda, kde v první fázi se na povrchu pracovní elektrody z tekoucího roztoku vzorku vyloučí při konstantním potenciálu, nebo při konstantním proudu analyt, který se v druhé fázi konstantním proudem rozpustí, přičemž se registruje změna potenciálu pracovní elektrody v průběhu rozpouštění, $E=f(t)$. Změna potenciálu od času má tvar oxidačně-redukční titrační křivky, čímž ve skutečnosti je. Z této závislosti je možné zjistit hodnotu tzv. přechodového času. Naměřené hodnoty potenciálu se ukládají do paměti počítače systémem „memory mapping“, tj. načítané a digitalizované hodnoty potenciálu se pokládají za adresy paměťových jednotek, kterých nominální hodnota se inkrementuje, $dt/dE=f(t)$. Vlny v původním záznamu odpovídající rozpuštění určité látky se mění na píky, kterých plocha udává přechodový čas.[23][24]

3.5 Metody používané pro stanovení pK_a

3.5.1 Potenciometrické titrace

V článku [25] se autoři zabývali stanovením celkové kyselosti a karboxylové kyselosti, kterou stanovovali nepřímou titrací. Fenolickou kyselost stanovili jako rozdíl celkové a karboxylové kyselosti. Autoři stanovovali kyselost u půdní huminové kyseliny a u Aldrich huminové kyseliny s výslednou koncentrací suspenze 500 mg/dm^3 . Kyselost byla stanovena i u esterifikovaných a acetylovaných huminových kyselin pomocí přímé potenciometrické metody.

Tabulka 1 Obsah karboxylových a fenolických skupin (mmol/g)[25]

Huminová kyselina	Skupina	Nepřímá titrace	Přímá titrace /esterifikace	Přímá titrace /acetylace
Aldrich	Karboxylová	3,94	3,82	2,05
	Fenolická	2,54	2,50	4,27
Půdní	Karboxylová	2,80	2,87	1,42
	Fenolická	1,88	1,76	3,21

V článku [26] se autoři zabývali stanovením pK_a přímou potenciometrickou titrací, kdy používali různé postupy vyhodnocení a výsledky porovnávali s nepřímou potenciometrickou titrací. Jako postupy pro vyhodnocení používaly BEST7 algoritmus a modifikovaný Henderson-Hasselbalchův model (MHHM). Autoři zjistili, že při použití BEST7 algoritmu je zjištěná karboxylová kyselost menší než fenolická a u MHHM je tomu naopak. Dále autoři zkoumali vliv rychlosti titrace na stanovenou kyselost, kdy u pomalé titrace byly hodnoty

kyselosti vyšší než při rychlé titraci. Při nepřímé titraci byla celková kyselost vyšší než u přímé, a zároveň fenolická kyselost byla vyšší než karboxylová.

V článku [27] se autoři zabývali stanovením pK_a u IHSS vzorků (standards International Humic Substances Society) potenciometrickou titrací, kdy průměrné hodnoty byly stanoveny na 4,0 až 4,4. Největší množství kyselých skupin bylo nalezeno ve frakci s nejnižší molekulovou hmotností. Pomocí UV-Vis spektroskopie byl stanoven barevný kvocient E_{400}/E_{600} (poměr absorbancí při daných vlnových délkách), kdy nejvyšší poměr byl u frakce s nejnižší molekulovou hmotností.

V článku [28] se autoři zabývali stanovením hodnot pK_a u huminových kyselin od firmy Fluka. Autoři prováděli potenciometrické titrace huminové kyseliny ($2,5 \cdot 10^{-3} \text{ mol/dm}^3$) v přítomnosti tří různých koncentrací dusičnanu draselného (koncentrace $0,1 \cdot 10^{-3}$; $10 \cdot 10^{-3}$ a $100 \cdot 10^{-3} \text{ mol/dm}^3$). Použili stejný objem kyseliny a dusičnanu. Hodnoty pK_a stanovili na 3,0 až 9,0.

V článku [29] se autoři zabývali zkoumáním huminových a fulvinových kyselin v závislosti na použitých iontových médiích. Autoři vypočítávali disociační konstantu několika modely (Höegfeldt, Lineární, Diprotický a Henderson-Hasselbalchův model). Jednotlivé disociační konstanty se pro jednotlivé modely lišily ($\log K$ 4,9 až 6,4). Pro jednotlivá prostředí s použitím stejného modelu na výpočet disociační konstanty se vypočtené hodnoty disociační konstanty shodovaly. Autoři došli k závěru, že u výsledných hodnot disociačních konstant nezáleží na použitém iontovém médiu.

V článku [30] se autoři zabývali srovnáním výsledků potenciometrické titrace s konduktometrickou titrací, infračervenou spektroskopií a metodou octanu vápenatého. Pro stanovení karboxylových skupin byla provedena potenciometrická titrace, jejíž výsledky byly zpracovány pomocí nelineární a lineární numerické metody. Bylo zjištěno, že k tomuto stanovení není vhodné používat konduktometrickou titraci, infračervenou spektroskopii a metodu octanu vápenatého. Porovnáním výsledků pro huminové kyseliny Vermicompost a Aldrich došli autoři k závěru, že výsledky pro vzorek Aldrich jsou silně závislé na iontové síle, kdy u ní dochází ke konformačním změnám.

V článku [31] autoři zkoumali vliv iontové síly na výsledky stanovení disociační konstanty. Došli k závěru, že při poklesu iontové síly, dochází k systematickému zvýšení disociační konstanty. Výsledky získané z potenciometrických titrací prokázaly přítomnost přibližně 3,5 mmol/g ionizovatelných míst v Aldrich huminové kyselině počítáno na molární hmotnost 286 relativní M. Stanovené hodnoty disociačních konstant pro karboxylové skupiny byly pK_a 4 až 6 a pro fenolické skupiny byly pK_a 8 až 10. Výsledky odpovídaly hypotetickým hodnotám uvedených v literatuře.

V článku [32] autoři porovnávali huminové kyseliny z uhlí nacházejících se v různých oblastech České republiky a připravených různými postupy oxidace. Do porovnání zahrnuli

i hnědé uhlí a oxyhumolit. Na základě výsledků potenciometrické titrace vypočítali disociační konstanty jednotlivých vzorků. Disociační konstanty se pohybovaly od pK_{app} 3,35 až po 4,61, kdy nejvíce kyselý byl vzorek připravený z hnědého uhlí a nejméně kyselý byl vzorek z neoxidovaného černého uhlí.

V článku [33] autoři analyzovali možnosti stanovení karboxylových a fenolických skupin různými metodami. Zjistili, že výsledky závisí na použité metodě stanovení. Prokázali, že potenciometrická titrace roztoku humátu sodného s kyselinou chlorovodíkovou je vhodnější na analýzu acidobazických vlastností huminových kyselin. Koncentrace karboxylových skupin určených octanovou metodou byly podstatně nižší než koncentrace určené barytovou metodou.

3.5.2 Ostatní metody

3.5.2.1 *Konduktometrická titrace*

V článku [34] se autoři zabývali konduktometrickou titrací huminových kyselin a výsledky porovnávali s modelovými sloučeninami. Autoři došli k závěru, že mohou odvodit chemické entity, které se nacházejí v huminových kyselinách. Titrační křivky dělily na tři části. Předpokládali, že velmi slabé části jsou fenolické hydroxylové skupiny a jen část karboxylových skupin ($pH = 10,0$ až $9,4$), slabé části jsou karboxylové skupiny na různých druzích alifatických a aromatických monomerních jednotkách ($pH = 9,4$ až $5,0$), silné části jsou karboxylové skupiny s nízkou hodnotou pK ($pH = 5,0$ až $3,8$). Hodnoty pK neustále rostou s neutralizací, protože karboxylové skupiny jsou zahrnuty jak ve slabé části, tak v silné.

3.5.2.2 *Spektrofotometrie*

V článku [35] se autoři zaměřují na metodu UV/Vis spektrofotometrie, kdy vypočítávají hodnoty pK pomocí druhé derivace absorpčních spekter. Pro studii použili methylooranž (MO) a bromthymolovou (BTB) modř. Jednotlivá barviva byla připravena s dvanácti hodnotami pH , pro MO bylo pH v rozmezí $2,21$ až $5,96$ a pro BTB v rozmezí pH $4,32$ až $8,56$. Vypočítané hodnoty pK_a byly pro MO $3,46$ a pro BTB $7,14$, což se shodovalo s hodnotami uvedenými v literatuře. Dokázalo se, že tato metoda může být použita pro stanovení pK_a slabých organických kyselin a zásad. Výhoda této metody spočívá v tom, že se používají pouze dvě kalibrační křivky.

3.5.2.3 *Diferenciální skenovací potenciometrie (DSP)*

V článku [36] autoři porovnávali disociační konstantu huminových kyselin z různých půd. Kyseliny byly připraveny stejným způsobem a za stejných podmínek. Disociační konstanta všech čtyř huminových kyselin byla $pK_a = 3,5$, kdy tato hodnota může být přiřazena nalezeným karboxylovým skupinám (COOH), které mají silně kyselé chování. Hodnota $pK_a = 10,5$ mohou být přiřazeny fenolickým skupinám. Vývoj zjištěného povrchového náboje rostl následovně: huminová kyselina Desmonte < Pastizal < Algarrobo < Grama. Hodnoty pozitivních oblastí byly pro huminovou kyselinu Algarrobo a Desmonte nulové, zatímco pro

Pastizal a Grama byly 0,18 a 0,15. DSP podle autorů nabízí snadný přístup k odhadu jak vývoje náboje, tak zdánlivé disociační konstanty.

3.5.2.4 *Coulometrie*

V článku [37] autoři ke stanovení disociační konstanty používali coulometrii při konstantním proudu. Jedná se o metodu založenou na potenciometrické titraci, kdy kromě huminové kyseliny vzorek obsahuje i chloristan sodný. Pro měření byly použity dvě huminové kyseliny a to z půdy Monte Finestra, kdy disociační konstanty byly stanovené na 4,04; 7,41 a 9,46. Jako další byla použita huminová kyselina od firmy Fluka, kdy disociační konstanty byly stanovené na 3,9; 7,3 a 9,5 pro čerstvě připravený vzorek a 3,9; 7,6 a 9,4 pro vzorek starý 20 dní. Z toho vyplývá, že na stanovení disociační konstanty nezáleží na stáří vzorku.

3.5.2.5 *Chronopotenciometrie*

V článku [38] se autoři zabývali aplikací této metody. Touto metodou se stanovují odpadní vody z papírny, odpadní vody ze zinkových pecí, říční vody a koloidní roztok hydroxidu železa. Zkoumali vliv vzniku bublinek na platinové elektrodě na naměřenou koncentraci roztoku, kdy zjistili odchylky hodnot při vzniku těchto bublinek. Autoři se dále zabývali stanovením ionizační konstanty kyseliny fluorovodíkové. Výsledkem byla hodnota $6,67 \cdot 10^{-4}$, která se málo lišila od hodnoty uvedené v literatuře $7,24 \cdot 10^{-4}$.

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Použité přístroje

CHNSO Mikroanalyzátor Flash 1112 od firmy Carlo Erba.
FT-IR Spetrometr Nicolet Impact 400
automatický titrátor Titroline Alpha plus Schott
kombinovaný altimetr Mettler Toledo SevenMulti s pH elektrodou a vodivostní sondou
pH metr METTLER TOLEDO, Seven Easy
UV/VIS spektrofotometr HITACHI U-3900H
průtokový analyzátor EcaFlow model 150 GLP

4.2 Použité chemikálie

Bromid draselný (Sigma-Aldrich)
Dihydrát octanu vápenatého (Riedel-de Häen)
Hydroxid sodný 1N (Carlo Erba)
Kyselina chlorovodíková 1 N (PENTA)
Síran sodný dekahydrát (Lach:Ner s.r.o.)
Huminové kyseliny

4.3 Izolace huminových kyselin

Všechny vzorky huminových kyselin, kromě IHSS, byly izolovány z lignitu těženého v Mikulčicích u Hodonína, což byl donedávna poslední lignitový důl v České republice. Dnes se tam už netěží. Pro tuto práci byla používána huminová kyselina HK₁, HK₂, HK₃, HK₄, HK₅ a HK₆.

4.3.1 Huminová kyselina HK₁

60 g lignitu bylo zalito 2 dm³ extrakčního roztoku o složení 0,1 M NaOH + 0,084 M Na₄P₂O₇ · 10 H₂O. Extrakce probíhala přes noc v inertní dusíkové atmosféře za stálého protřepávání. Následující den byl roztok zfiltrován přes hustou tkaninu a tuhý zbytek po filtraci byl znovu extrahován, tentokrát pouze 60 min. Poté byla opět provedena filtrace. Oba filtráty byly spojeny a opatrně okyseleny 20% HCl do pH = 1. Roztok byl ponechán v lednici přes noc odstát. Druhého dne byla odsáta kapalina nad usazeninou, zbytek byl 10 minut odstředován v centrifuze při 4000 otáčkách za minutu a termostatu nastaveném na 10°C. Usazenina byla třikrát promyta kyselinou chlorovodíkovou o koncentraci 0,1 – 0,2 M a pH ≤ 1 a jednou destilovanou vodou. Nakonec byly získané huminové kyseliny vysušeny při 50°C. Takto získaný vzorek byl následně přečištěn následujícím postupem. 1 g huminové kyseliny byl zalit 250 ml roztoku kyseliny chlorovodíkové a fluorovodíkové v poměru: 10 ml konc. HCl + 20 ml konc. HF + 1970 ml H₂O. Tento roztok byl ponechán 24 hodin třepat a následně byl odstředěn. Po dekantaci byla usazenina znovu zalita roztokem HCl + HF a 24 hodin

protřepávána. Roztok byl znovu slit a usazenina promývána vodou, dokud nebyla zkouška AgNO_3 na Cl^- negativní. Poté byly získané huminové kyseliny vysušeny při 50°C . [39]

4.3.2 Huminové kyseliny HK₂

Huminové kyseliny byly připraveny alkalickou extrakcí jihomoravského lignitu. Ten byl extrahován směsí 0,5 M NaOH a 0,1 M $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ v poměru 20 g lignitu na litr roztoku. Vzniklá suspenze byla ponechána přes noc v lednici. Následující den byl slit roztok nad pevnou fází do nádoby a okyselen 20% HCl na $\text{pH} \sim 1$. Pevná fáze byla opět extrahována 1 dm^3 extrakčního roztoku. Po hodině míchání bylo provedeno slití a okyselení roztoku 20% HCl na $\text{pH} \sim 1$. Takto okyselené roztoky byly ponechány přes noc v lednici. Následně byly vysrážené huminové kyseliny od roztoku odděleny odstředěním a promývány destilovanou vodou do vymytí chloridových iontů. Huminové kyseliny byly vysušeny v sušárně při 50°C . [40][41]

4.3.3 Huminové kyseliny HK₃

120 g jihomoravského lignitu bylo smícháno s 2 litry extrakčního roztoku (0,5 M NaOH s 0,1 M $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$). Směs byla ponechána třepat přes noc a poté byl pevný podíl oddělen filtrací přes hustou tkaninu na sítu. Tuhý zbytek byl znovu extrahován po dobu jedné hodiny a poté oddělen filtrací. Oba filtráty byly spojeny, postupným přidáváním 20% HCl okyseleny na $\text{pH} \sim 1$ a ponechány přes noc v ledničce. Po odsátí roztoku nad sraženinou byla tato znovu rozpuštěna v 900 ml 1 M NaOH. Po 60 minutách byly huminové kyseliny znovu vysráženy pomocí 20% HCl ($\text{pH} \sim 1$) a ponechány přes noc v ledničce. Po odsátí roztoku nad sraženinou byly huminové kyseliny odstředěny, opakovaně promyty vodou a vysušeny v sušárně při 50°C . Suché huminové kyseliny byly zality 2 litry směsi HCl a HF (10 ml koncentrované HCl, 20 ml koncentrované HF, zbytek voda). Směs byla pravidelně promíchávána po dobu 48 hodin s tím, že po 12 hodinách byl roztok HCl s HF vyměněn za čerstvý. Huminové kyseliny byly potom opět odstředěny, opakovaně promyty vodou a vysušeny v sušárně při 50°C .

4.3.4 Huminové kyseliny HK₄

50 g lignitu bylo zalito 1 dm^3 extrakčního roztoku (0,5 M NaOH a 0,1 M $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$). Extrakce probíhala přes noc za stálého protřepávání suspenze. Následující den byl roztok zfiltrován přes hustou tkaninu a tuhý zbytek po filtraci byl znovu extrahován stejným činidlem (60 minut). Poté byla opět provedena filtrace. Oba filtráty byly spojeny a okyseleny 20% HCl do $\text{pH} \sim 1$. Okyselený filtrát byl ponechán v lednici přes noc. Druhého dne byla odsáta kapalina nad usazeninou. Sraženina byla od zbytku roztoku oddělena odstředěním a zalita 2 litry směsi HCl a HF (10 ml koncentrované HCl, 20 ml koncentrované HF, zbytek voda). Tato směs byla ponechána 24 hodin třepat a následně odstředěna. Po dekantaci byla usazenina znovu zalita roztokem HCl s HF a 24 hodin protřepávána. Roztok byl znovu slit

a usazenina promývána vodou s následným odstředěním. Poté byly získané huminové kyseliny vysušeny při 50 °C. [42]

4.3.5 Huminové kyseliny HK₅

50 g lignitu bylo zalito 1 dm³ extrakčního roztoku (0,5 M NaOH a 0,1 M Na₄P₂O₇). Extrakce probíhala přes noc za stálého protřepávání suspenze. Následující den byl roztok zfiltrován přes hustou tkaninu a tuhý zbytek po filtraci byl znovu extrahován stejným činidlem, tentokrát pouze 60 minut. Poté byla opět provedena filtrace. Oba filtráty byly spojeny a okyseleny 20% HCl do pH ~ 1. Okyselený filtrát byl ponechán v lednici přes noc. Druhého dne byla odsáta kapalina nad usazeninou, sraženina byla od zbytku roztoku oddělena odstředováním a zalita 2 litry směsi HCl s HF (10 ml koncentrované HCl, 20 ml koncentrované HF, zbytek voda). Směs byla ponechána na míchačce přes noc. Následující den byla odstředěna a vysrážené huminové kyseliny byly promyty destilovanou vodou. Po opětovném odstředění byly huminové kyseliny dialyzovány v membránách (3500 Da) proti destilované vodě po dobu jednoho týdne (voda byla měněna každý den za čerstvou). Sušení bylo provedeno v lyofilizátoru (-15 °C). [42]

4.3.6 Huminové kyseliny HK₆

Použitý vzorek je izolován z leonarditu, je to přírodně oxidovaný lignit (tzv. oxyhumolit) těžný v Gascoyne Mine, Bowman County, North Dakota, U.S.A. Je to standard označený jako 1S104H.

Huminové kyseliny byly izolovány členy organizace IHSS (International Humic Substances Society) jejich postupem. Postup izolace je poměrně komplikovaný a je uveden na internetové stránce IHSS. [43]

4.4 Pracovní postup

Nejprve byl připraven roztok R-022, což je 1,5% roztok síranu sodného rozpuštěného v destilované vodě. Tento roztok byl použit jako extrakční činidlo pro huminové kyseliny. Dále byl použit jako nosný elektrolyt a standardní roztok pro měření koncentrace na přístroji EcaFlow.

4.4.1 Příprava výluhů huminových kyselin

Suspenze huminových kyselin byly připravovány tak, že se navázilo určité, předem dané množství huminových kyselin, které byly extrahovány v daném množství roztoku R-022. Každé navážené množství huminových kyselin bylo extrahováno v roztoku po dobu jednoho týdne. Suspenze byla poté přefiltrována přes mikrofiltr 0,45 µm pomocí injekční stříkačky. Po přefiltrování bylo u každého roztoku změřeno pH a poté byla změřena UV/VIS spektra

v rozsahu 200 – 900 nm. Na měření byly použity různé huminové kyseliny. Zadané navážky, přesné navážky a množství roztoku R-022 jsou uvedeny v následujících tabulkách.

Tabulka 2 *Navážky a přesná koncentrace HK₁*

$c_{\text{zad}} \text{ (g/dm}^3\text{)}$	$m_{\text{HA}} \text{ (g)}$	$V \text{ (ml)}$	$c \text{ (g/dm}^3\text{)}$
0,01	0,0014	100	0,014
0,05	0,0054	100	0,054
0,10	0,0100	100	0,100
0,50	0,0504	100	0,504
1,00	0,1050	100	1,050
3,00	0,1503	50	3,006
5,00	0,5017	100	5,017
8,00	0,3996	50	7,992
10,00	1,0012	100	10,012
15,00	0,7494	50	14,988
20,00	0,2013	10	20,130

Tabulka 3 *Navážky a přesné koncentrace HK₂*

$c_{\text{zad}} \text{ (g/dm}^3\text{)}$	$m_{\text{HA}} \text{ (g)}$	$V \text{ (ml)}$	$c \text{ (g/dm}^3\text{)}$
0,01	0,0013	100	0,013
0,05	0,0049	100	0,049
0,10	0,0098	100	0,098
0,50	0,0512	100	0,512
1,00	0,1000	100	1,000
3,00	0,3002	100	3,002
5,00	0,4999	100	4,999
8,00	0,3994	50	7,988
10,00	0,5016	50	10,032
15,00	0,7507	50	15,014
20,00	1,0000	50	20,000

Tabulka 4 *Navážky a přesné koncentrace HK₃*

$c_{\text{zad}} \text{ (g/dm}^3\text{)}$	$m_{\text{HA}} \text{ (g)}$	$V \text{ (ml)}$	$c \text{ (g/dm}^3\text{)}$
0,01	0,0013	100	0,013
0,05	0,0048	100	0,049
0,10	0,0104	100	0,098
0,50	0,0506	100	0,512
1,00	0,1000	100	1,000
3,00	0,3010	100	3,002
5,00	0,5000	100	4,999
8,00	0,8004	100	8,004
10,00	0,9996	100	9,996
15,00	1,5010	100	15,010
20,00	2,0003	100	20,003

Tabulka 5 *Navážky a přesné koncentrace HK₄*

$c_{\text{zad}} \text{ (g/dm}^3\text{)}$	$m_{\text{HA}} \text{ (g)}$	$V \text{ (ml)}$	$c \text{ (g/dm}^3\text{)}$
0,01	0,0013	100	0,013
0,05	0,0053	100	0,053
0,10	0,0106	100	0,106
0,50	0,0499	100	0,499
1,00	0,1000	100	1,000
3,00	0,3006	100	3,006
5,00	0,4999	100	4,999
8,00	0,8004	100	8,004
10,00	1,0005	100	10,005
15,00	1,5003	100	15,003
20,00	2,0004	100	20,004

Tabulka 6 *Navážky a přesné koncentrace HK₅*

$c_{\text{zad}} \text{ (g/dm}^3\text{)}$	$m_{\text{HA}} \text{ (g)}$	$V \text{ (ml)}$	$c \text{ (g/dm}^3\text{)}$
0,01	0,0012	100	0,012
0,05	0,0052	100	0,052
0,10	0,0105	100	0,105
0,50	0,0500	100	0,500
1,00	0,1000	100	1,000
3,00	0,3001	100	3,001
5,00	0,5000	100	5,000
8,00	0,8001	100	8,001
10,00	1,0000	100	10,000
15,00	1,5006	100	15,006
20,00	2,0008	100	20,008

Tabulka 7 Navážky a přesné koncentrace HK₆

$c_{\text{zad}} \text{ (g/dm}^3\text{)}$	$m_{\text{HA}} \text{ (g)}$	$V \text{ (ml)}$	$c \text{ (g/dm}^3\text{)}$
0,01	0,0010	100	0,010
0,05	0,0050	100	0,050
0,10	0,0100	100	0,100
0,50	0,0500	100	0,500
1,00	0,0200	20	1,000
3,00	0,0601	20	3,005
5,00	0,1000	20	5,000
8,00	0,1600	20	8,000
10,00	0,2000	20	10,000
15,00	0,3000	20	15,000
20,00	0,4000	20	20,000

4.4.2 Stanovení obsahu kyselých funkčních skupin

Celková kyselost byla určena jako průměr výsledků dvou různých metod:

1. Bylo naváženo 100 mg HK. Navážka byla rozpuštěna ve 100 ml 0,01 M hydroxidu sodného a roztok byl míchán minimálně 1 hodinu. Roztok se titroval 0,05 M kyselinou chlorovodíkovou automatickým titrátorem s konstantním přídávkem 0,05 ml v intervalu 30 s. Každých 5 s se automaticky zaznamenávaly naměřené hodnoty pH a vodivosti (celkový přidaný objem činil 30 ml)
2. Bylo naváženo 100 mg HK, která se suspendovala do 100 ml destilované vody a míchala se minimálně 24 hodin. Suspenze se titrovala 0,05 M hydroxidem sodným automatickým titrátorem s konstantním přídávkem 0,05 ml v intervalu 5 minut. Každých 30 s se automaticky zaznamenávaly naměřené hodnoty pH a vodivosti (celkový přidaný objem činil 30 ml)

Karboxylová kyselost byla určena metodou octanu vápenatého:

- Bylo naváženo 100 mg HK, bylo přidáno 10 ml 0,5 M octanu vápenatého a 40 ml destilované vody. Suspenze byly přefiltrovány přes filtrační papír a promyty destilovanou vodou. Roztok byl míchán minimálně 24 hodin. Uvolněná kyselina octová se stanovila titrací 0,1 M hydroxidem sodným automatickým titrátorem s konstantním přídávkem 0,05 ml v intervalu 30 s. Každých 5 s se automaticky zaznamenávaly naměřené hodnoty pH a vodivosti (celkový přidaný objem činil 10 ml)
- Zároveň byl připraven slepý vzorek smícháním 10 ml 0,5 M octanu vápenatého a 40 ml destilované vody. Roztok byl míchán minimálně 24 hodin. Roztok byl titrován stejným způsobem jako roztok s HK.

4.4.3 Měření pomocí chronopotenciometrické titrace

Byl zapnut průtokový analyzátor EcaFlow a počítač. Poté byl spuštěn program EcaFlow, kde tlačítkem regenerace byla elektroda regenerována. Nejprve byly proměřeny standardní roztoky pro vytvoření kalibrační přímky. Jako standardní roztok byla použita kyselina chlorovodíková, jejíž koncentrace byly 5, 10 a 20 mM. Po změření kalibrace byly proměřeny výluhy huminových kyselin. Jako nosný elektrolyt byl použit roztok R-022, do kterého byly huminové kyseliny extrahovány.

5. VÝSLEDKY A DISKUZE

5.1 Charakterizace huminových kyselin

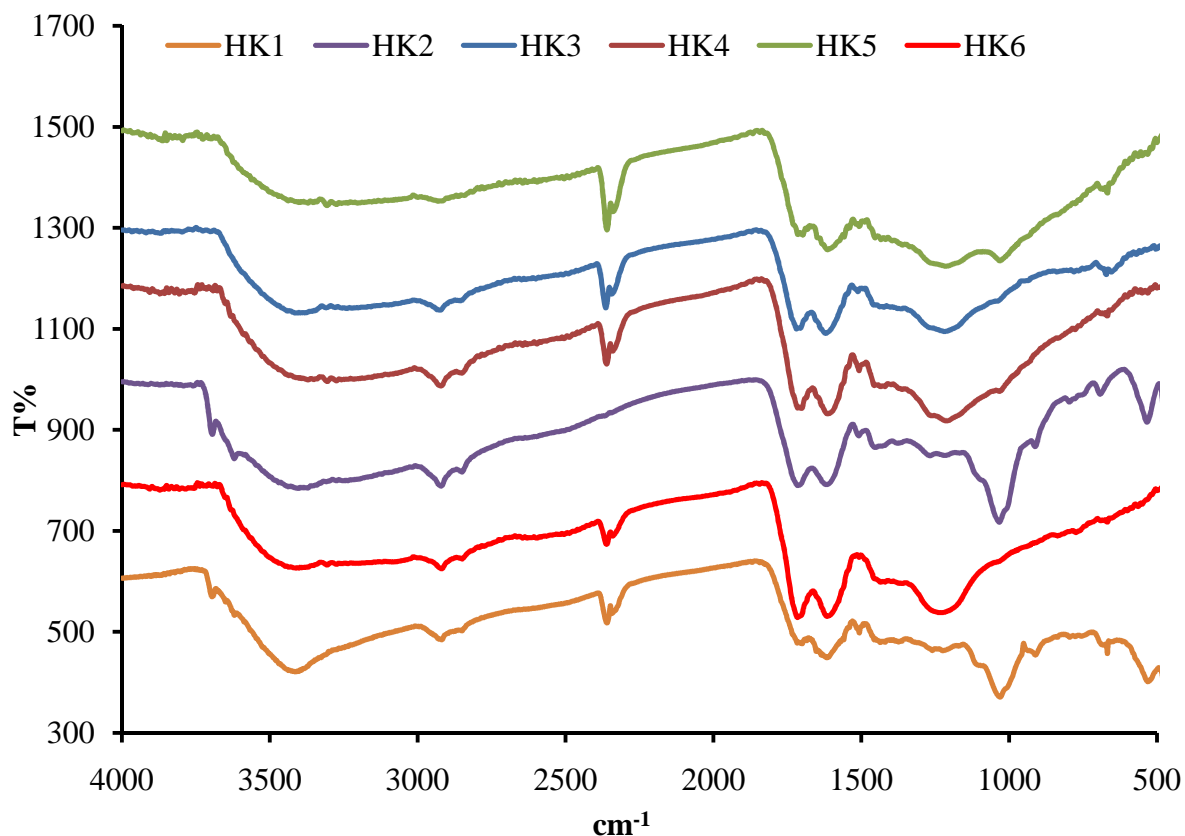
5.1.1 Elementární stanovení huminových kyselin

Huminové kyseliny byly poslány na ÚSMH AV ČR v Praze, kde elementární složení bylo stanoveno pomocí frakční analýzy na přístroji CHNSO Mikroanalyzátor Flash 1112 od firmy Carlo Erba.

Tabulka 8 *Elementární složení huminových kyselin*

Vzorek HK	at. %				
	C	H	O	N	S
HK ₁	42,8	41,3	14,7	0,9	0,3
HK ₂	41,1	45,1	12,9	0,8	0,1
HK ₃	39,1	39,0	20,5	0,3	0,3
HK ₄	43,9	40,2	15,0	0,7	0,2
HK ₅	47,7	33,9	16,7	1,0	0,7
HK ₆	48,1	33,2	17,7	0,8	0,2

5.1.2 Infračervená spektroskopie



Obr. 4 *Infračervená spektra huminových kyselin*

Na Obr. 4 se nacházejí typické široké absorpční pásy při vlnové délce 3 600 – 3 000 cm^{-1} , které přísluší valenčním vibracím $-\text{OH}^-$ skupin vázaných vodíkovými vazbami na molekuly huminových kyselin. Tento difuzní pás je natolik výrazný, že překrývá některé diagnosticky významné prvky spektra. Díky vzniklým vodíkovým můstkům mají makromolekuly huminových kyselin složitou polymerní strukturu. Pro volné $-\text{OH}^-$ skupiny, které nejsou spojeny vodíkovou vazbou, se přisuzuje ostrý pík při 3 629 cm^{-1} . Jestliže se ve spektru vyskytuje pík při vlnové délce přibližně 3 702 cm^{-1} , tak je přisuzován volným $-\text{NH}_2$ skupinám.

Absorpční pásy v oblasti při 3 000 – 2 800 cm^{-1} připadají symetrickým a antisymetrickým valenčním vibracím $-\text{CH}_3$ a $-\text{CH}_2-$ skupin. Tyto jednotlivé pásy však nelze přesně určit, protože dochází k částečnému překrytí širokým pásem $-\text{OH}^-$ vibrací a jednak důsledkem polymorfního zastoupení uvedených skupin v různých molekulárních formách.

Soubor pásů mezi 1 800 – 1 600 cm^{-1} je přiřazován valenčním vibracím karboxylové skupiny (1 720 cm^{-1}), karboxylu a deformačním vibracím $-\text{NH}_3^+$ skupin ve strukturách aminokyselin. Jejich valenční vibrace v oblasti 3 130 – 3 030 cm^{-1} jsou opět překryty širokým pásem hydroxyly. Spřažené valenční vibrace C-O s rovinnými deformačními vibracemi O-H karboxylu jsou ukryty ve složité oblasti 1 450 – 1 350 cm^{-1} . Zde se projevují též kruhové a polokruhové mody aromatických struktur a deštníková vibrace koncových $-\text{CH}_3$ skupin. Okolo 1 200 cm^{-1} se projevuje deformační vibrace fenolických $-\text{OH}^-$ skupin. Výrazný pás při 1 030 cm^{-1} indikuje přítomnost C-O-C vazeb v anhydridech a esterech.

5.1.3 Stanovení obsahu kyselých funkčních skupin

Celková kyselost se určila průměrem disociačních konstant ze dvou měření:

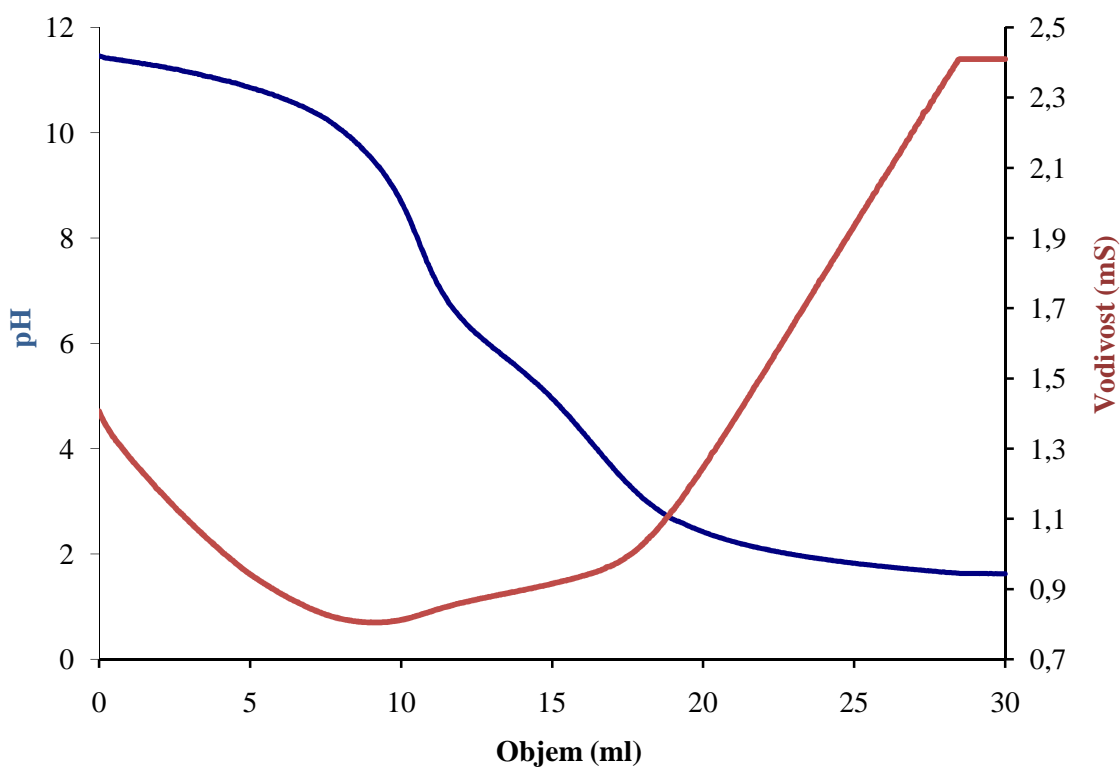
1. Určila se z rozdílu spotřeby titračního činidla pro titraci přebytku hydroxidu sodného (1. zlom na vodivostní křivce, 1. inflexní bod na křivce pH) a celkové spotřeby při vytitrování kyselých skupin (2. zlom na vodivostní křivce, 2. inflexní bod na křivce pH)
2. Určila se ze spotřeby titračního činidla, odpovídající hodnotě inflexního bodu na křivce pH, nebo zlomu na vodivostní křivce.

Karboxylová kyselost:

- Určila se z rozdílu uvolněného množství kyseliny octové ve vzorku huminové kyseliny a ve slepém vzorku (množství kyseliny v obou vzorcích se určil ze spotřeby odpovídající inflexnímu bodu na křivce pH, nebo ze spotřeby odpovídající hodnotě $pH = 9,8$)

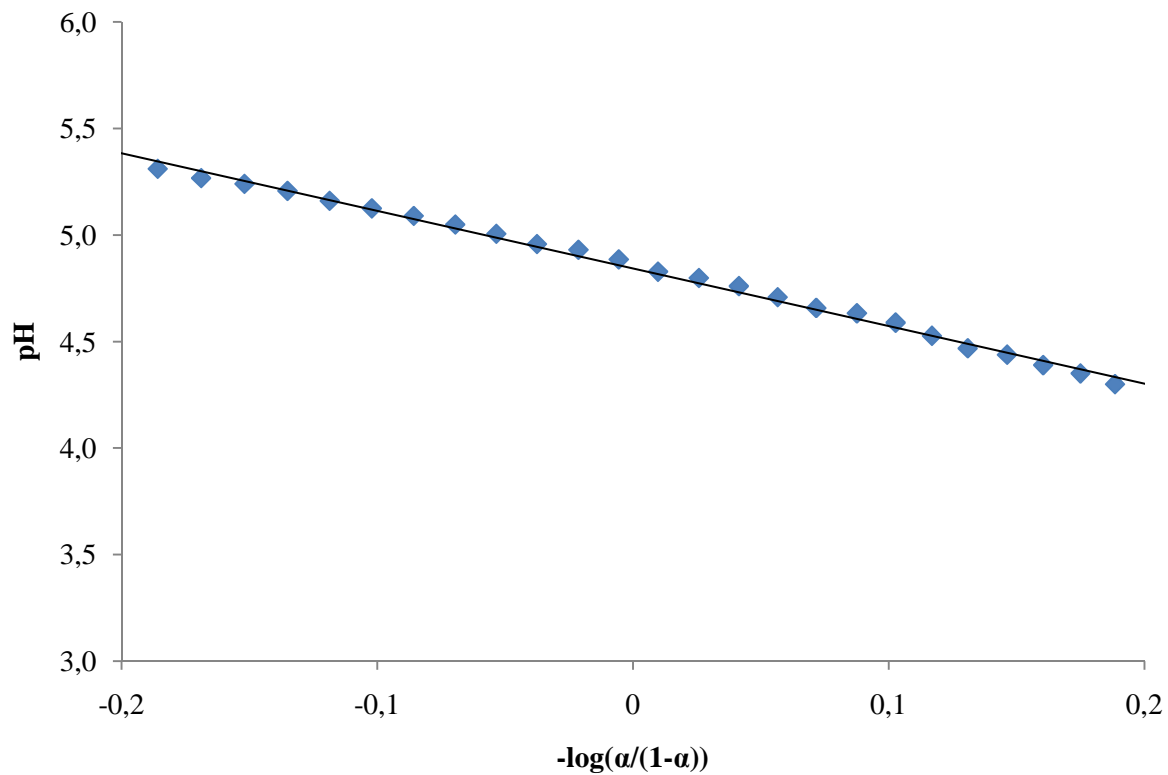
Tabulka 9 Vypočítané hodnoty kyselostí huminových kyselin

Kyselost (mmol/g)	HK ₁	HK ₂	HK ₃	HK ₄	HK ₅	HK ₆
Celková	7,01	4,12	4,88	4,58	6,34	6,63
Karboxylová	3,95	2,22	3,74	2,74	2,57	6,46



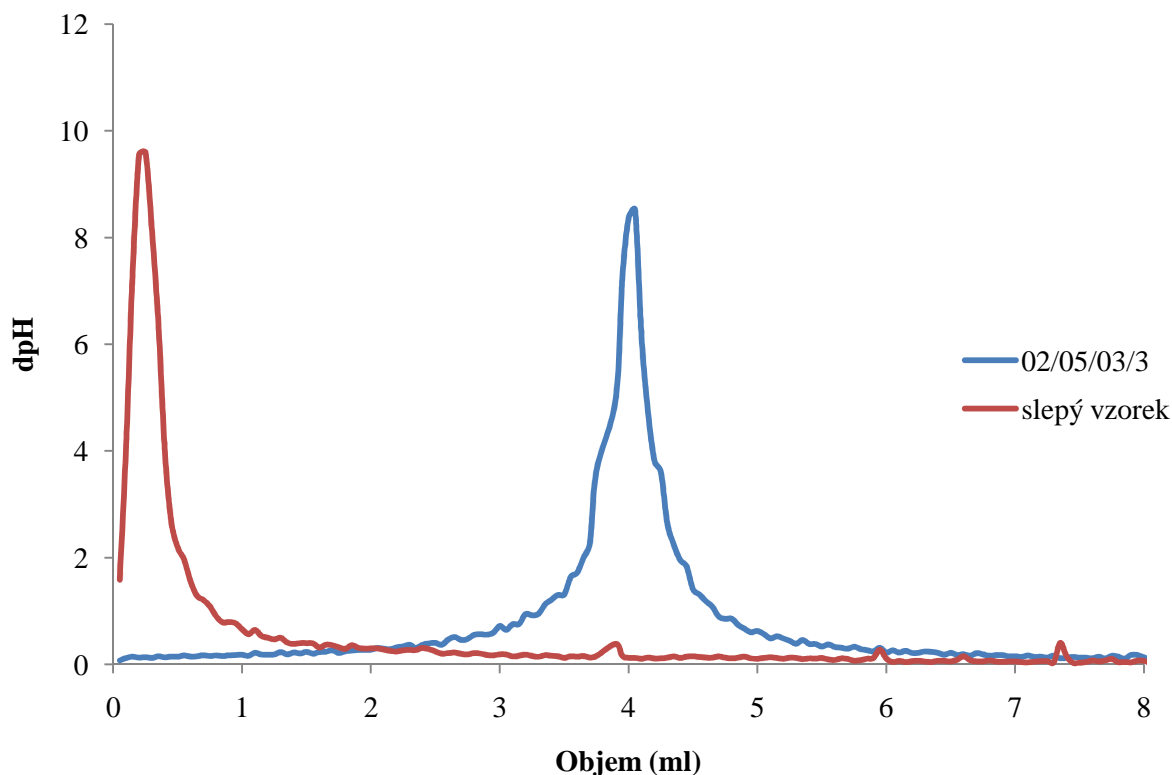
Obr. 5 Ukázka grafu zpětné titrace pro určení celkové kyselosti (HK₅)

Na Obr. 5 se nachází ukázka grafu zpětné titrace, kdy v jednom jsou dvě závislosti. První je závislost naměřeného pH na objemu přidaného titračního činidla a druhá je závislost naměřené vodivosti na objemu přidaného titračního činidla. Ze zlomů na křivce, pomocí lineárních regresí a jejich rovnic, byla vypočítána celková kyselost.



Obr. 6 Ukázka grafu přímé titrace pro určení disociační konstanty (HK_6)

Na Obr. 6 se nachází graf přímé titrace, podle kterého se dá vypočítat disociační konstanta huminové kyseliny a to tak, že do přímky lineární regrese se dosadí $x = 0$



Obr. 7 Octanová metoda pro určení karboxylové kyselosti (HK_3)

Na Obr. 7 je ukázka octanové metody používané pro určení karboxylové kyselosti. Tato kyselost se určí derivací pH a určí se nejvyšší hodnota dpH, ke které se přiřadí objem titračního činidla. Stejný postup se použil i u stanovení slepého vzorku a poté se z rozdílu těchto hodnot vypočítala karboxylová kyselost huminových kyselin.

5.1.4 Stanovení disociační konstanty přímou titrací

Zdánlivou hodnotu pK_a vzorku HK se určila z Henderson-Hasselbachovy rovnice:

$$pK_a = pH + \log\left(\frac{1-\alpha}{\alpha}\right) \quad 5.1$$

Kde stupeň disociace α byl vypočten podle vztahu

$$\alpha = \frac{c_{NaOH} \cdot V_{NaOH} + [H^+] \cdot (V_{susp} + V_{NaOH})}{b_c \cdot m_{HA}} \quad 5.2$$

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

Toto určení disociační konstanty je klasický běžně používaný způsob.

Tabulka 10 Hodnoty pK_a stanovené titrací

	HK ₁	HK ₂	HK ₃	HK ₄	HK ₅	HK ₆
pK_a	6,63	5,88	6,87	9,33	7,89	6,19

5.2 Měření absorbance huminových kyselin

Vzorec pro výpočet $\Delta \log K$:

$$\Delta \log K = \log \frac{A(400 \text{ nm})}{m_{HA}} - \log \frac{A(600 \text{ nm})}{m_{HA}} \quad 5.3$$

Byly vypočítány poměry absorbancí při jednotlivých vlnových délkách a $\Delta \log K$

Absorpční poměr $A_{265/465}$ značí proporci mezi lignitovými strukturami odolnými vůči humifikaci a množstvím lignitu. Poměr $A_{265/665}$ značí poměr mezi lignitovými strukturami odolnými vůči humifikaci a strukturami, které silně podléhají humifikaci.

Poměr $A_{465/665}$ je nejčastěji používán jako tzv. humifikační index. Tento poměr $E_{4/6}$ pro huminové kyseliny je obvykle menší než 5,0 a snižuje se s rostoucí molekulovou vahou a stupněm disperzity. Nízký poměr může značit relativně vysoký podíl aromatických skupin a naopak vysoký poměr ukazuje na nízký obsah aromatických částic a relativně vyšší obsah alifatických struktur. Zároveň byl pozorován inverzní vztah mezi tímto poměrem a odolností huminového materiálu. Z toho vyplývá, že huminový materiál s nejvyšším koeficientem $E_{4/6}$ má nejnižší odolnost, a zároveň že více humifikované a více kondenzované (aromatické) substance jsou staršího původu.

$\Delta \log K$ byly vypočítány z rozdílu logaritmů absorbancí huminových kyselin při vlnových délkách 400 nm a 600 nm. Podle hodnoty $\Delta \log K$ rozdělujeme huminové kyseliny do 3 skupin, které souvisejí se stupněm humifikace:

- A typ $\Delta \log K$ je menší než 0,6 – nejvyšší stupeň humifikace
- B typ leží v intervalu 0,6-0,8
- Rp typ, který leží v intervalu 0,8-1,1

Tabulka 11 HK_1 – Poměry absorbancí při daných vlnových délkách a $\Delta \log K$

c (g/dm ³)	$A_{265/465}$	$A_{265/665}$	$A_{465/665}$	$A_{400/600}$	$\Delta \log K$
0,01	7,47	28,00	3,75	4,67	0,67
0,05	7,73	24,29	3,14	4,88	0,69
0,10	9,41	50,80	5,40	6,75	0,83
0,50	13,88	66,60	4,80	9,17	0,96
1,00	22,20	166,50	7,50	21,00	1,32
3,00	18,60	176,67	9,50	18,63	1,27
5,00	29,16	277,00	9,50	19,00	1,28
8,00	26,29	447,00	17,00	30,80	1,49
10,00	36,48	383,00	10,50	23,67	1,37
15,00	32,47	573,67	17,67	34,00	1,53
20,00	36,66	916,50	25,00	42,25	1,63

Tabulka 12 HK_2 – Poměry absorbancí při daných vlnových délkách a $\Delta \log K$

c_{zad} (g/dm ³)	$A_{265/465}$	$A_{265/665}$	$A_{465/665}$	$A_{400/600}$	$\Delta \log K$
0,01	1,29	1,31	1,02	1,04	0,02
0,05	1,30	1,31	1,01	1,04	0,02
0,10	1,36	1,38	1,01	1,05	0,02
0,50	1,95	2,02	1,03	1,11	0,04
1,00	2,46	2,58	1,05	1,16	0,06
3,00	3,84	4,19	1,09	1,31	0,12
5,00	4,86	5,39	1,11	1,39	0,14
8,00	5,51	6,19	1,12	1,44	0,16
10,00	6,28	7,26	1,16	1,53	0,19
15,00	7,19	8,45	1,18	1,60	0,20
20,00	7,93	9,44	1,19	1,69	0,23

Tabulka 13 HK_3 – Poměry absorbancí při daných vlnových délkách a $\Delta \log K$

c_{zad} (g/dm ³)	$A_{265/465}$	$A_{265/665}$	$A_{465/665}$	$A_{400/600}$	$\Delta \log K$
0,01	2,04	2,38	1,17	1,28	0,11
0,05	2,77	2,90	1,05	1,30	0,11
0,10	3,71	5,04	1,36	1,69	0,23
0,50	6,93	9,24	1,33	2,05	0,31
1,00	8,12	13,32	1,64	2,44	0,39
3,00	15,11	27,33	1,81	3,50	0,54
5,00	15,55	31,72	2,04	4,12	0,61
8,00	20,65	45,24	2,19	4,77	0,68
10,00	20,49	45,25	2,21	4,58	0,66
15,00	26,17	59,81	2,29	5,41	0,73
20,00	25,48	55,21	2,17	4,73	0,67

Tabulka 14 *HK₄ – Poměry absorbancí při daných vlnových délkách a $\Delta \log K$*

$c_{\text{zad}} \text{ (g/dm}^3\text{)}$	$A_{265/465}$	$A_{265/665}$	$A_{465/665}$	$A_{400/600}$	$\Delta \log K$
0,01	3,82	6,00	1,57	1,88	0,27
0,05	6,78	17,33	2,56	3,64	0,56
0,10	7,93	21,40	2,70	4,08	0,61
0,50	10,88	30,83	2,83	4,93	0,69
1,00	14,21	66,33	4,67	8,08	0,91
3,00	20,28	81,13	4,00	9,11	0,96
5,00	22,42	106,50	4,75	10,20	1,01
8,00	26,40	148,50	5,63	11,73	1,07
10,00	28,42	174,57	6,14	12,60	1,10
15,00	29,35	130,44	4,44	10,82	1,03
20,00	35,67	142,67	4,00	10,90	1,04

Tabulka 15 *HK₅ – Poměry absorbancí při daných vlnových délkách a $\Delta \log K$*

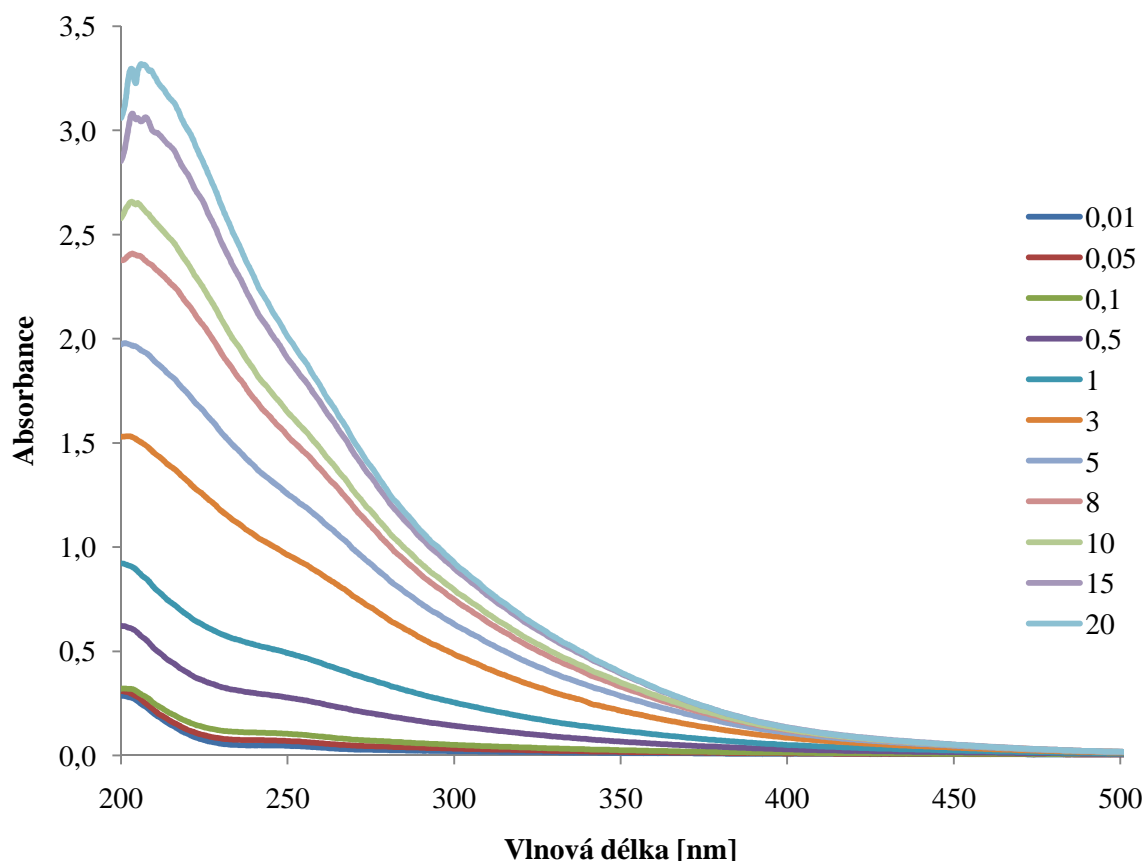
$c_{\text{zad}} \text{ (g/dm}^3\text{)}$	$A_{265/465}$	$A_{265/665}$	$A_{465/665}$	$A_{400/600}$	$\Delta \log K$
0,01	1,23	1,27	1,03	1,05	0,02
0,05	1,54	1,59	1,03	1,08	0,04
0,10	2,05	2,16	1,05	1,16	0,06
0,50	4,57	6,17	1,35	1,75	0,24
1,00	4,92	6,08	1,24	1,62	0,21
3,00	7,35	20,19	2,75	3,77	0,58
5,00	9,01	12,92	1,43	2,17	0,34
8,00	7,82	25,38	3,24	4,24	0,63
10,00	10,73	21,94	2,04	3,37	0,53
15,00	10,34	28,34	2,74	4,06	0,61
20,00	13,89	29,71	2,14	3,74	0,57

Tabulka 16 *HK₆ – Poměry absorbancí při daných vlnových délkách a $\Delta \log K$*

$c_{\text{zad}} \text{ (g/dm}^3\text{)}$	$A_{265/465}$	$A_{265/665}$	$A_{465/665}$	$A_{400/600}$	$\Delta \log K$
0,01	5,33	6,40	1,20	1,60	0,20
0,05	8,67	10,40	1,20	1,80	0,26
0,10	11,71	16,40	1,40	2,60	0,41
0,50	17,85	46,40	2,60	6,00	0,78
1,00	20,80	83,20	4,00	10,20	1,01
3,00	28,24	163,80	5,80	17,20	1,24
5,00	30,34	212,40	7,00	18,17	1,26
8,00	33,84	257,20	7,60	20,17	1,30
10,00	35,13	274,00	7,80	21,00	1,32
15,00	39,30	314,40	8,00	22,67	1,36
20,00	43,13	327,80	7,60	22,17	1,35

V 0 až Tabulka 16 jsou uvedeny jednotlivé poměry absorbancí a $\Delta \log K$. Všechny poměry absorbancí byly nejvyšší u HK_1 , nejspíš je to zapříčiněno odlišnými podmínkami měření. Tato huminová kyselina byla měřena o 2 roky dříve než ostatní a to v rámci bakalářské práce.

Z huminových kyselin měřených v rámci diplomové práce měla nejvyšší poměry a $\Delta \log K$ HK_6 , což je standard huminových kyselin IHSS. Z huminových kyselin připravených v našich laboratořích měla nejvyšší hodnoty poměrů a $\Delta \log K$ HK_4 .

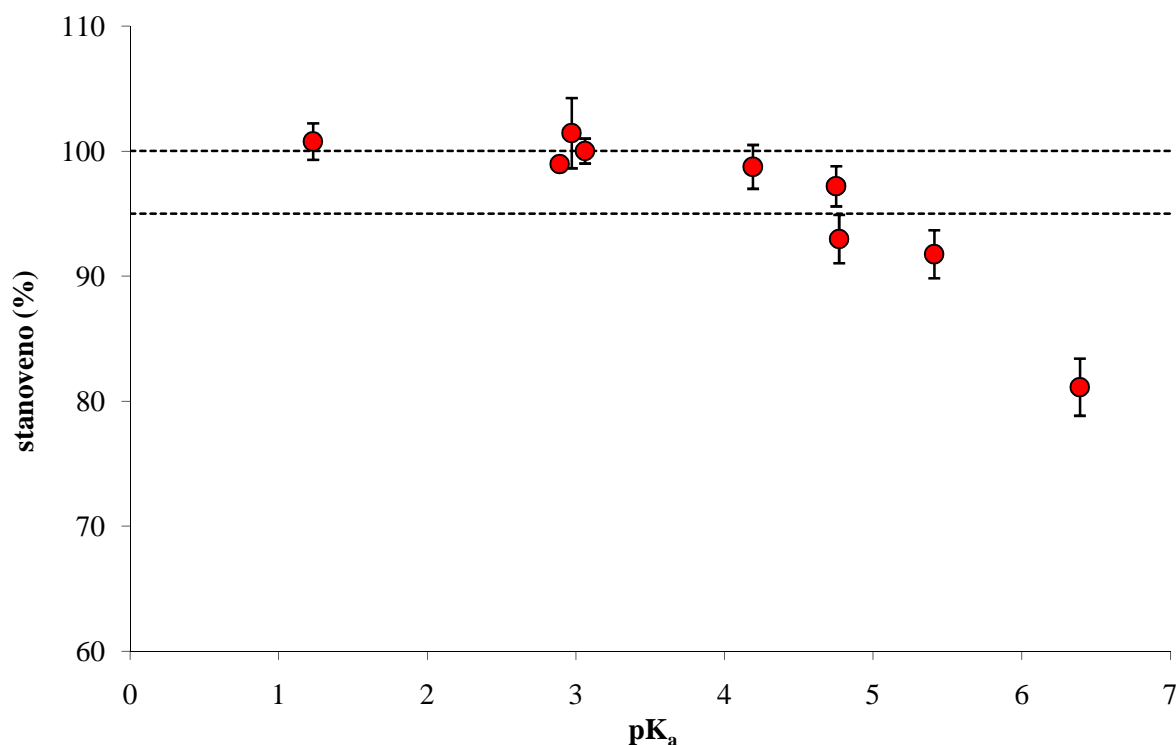


Obr. 8 Ukázka absorpčního spektra HK_6

Na Obr. 8 jsou znázorněna absorpční spektra HK_6 . U spekter jsou vidět dva pásy u nižších koncentrací, které značí více frakcí obsahujících karboxylové skupiny. Z absorpčních spekter je patrné, že se stoupající koncentrací roztoků, stoupá i jejich absorbance. Rozdíly absorbancí se zvyšují směrem k nižším vlnovým délkám. Absorbance u vlnových délek nad 500 nm se pohybovala kolem 0. Pro lepší zobrazení spekter nebyly hodnoty absorbancí nad touto vlnovou délkou zobrazeny. Ze změn optických vlastností uvedených v Tabulka 11 až Tabulka 16 je zřejmé, že se změnou koncentrace se mění složení rozpuštěných frakcí, což se pak projevilo jak na stanovených hodnotách pH, tak na výsledcích získaných chronopotenciometrickou titrací.

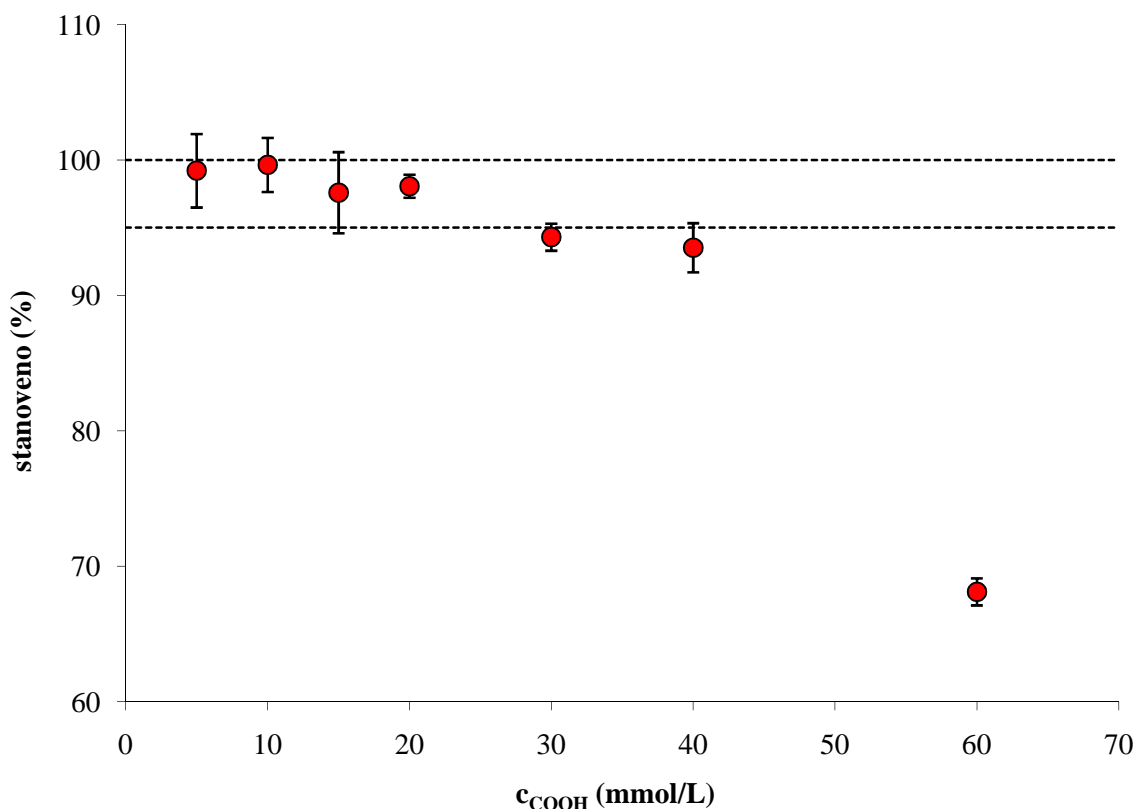
5.3 Jednoduché organické kyseliny

V bakalářské práci se řešila problematika stanovení limitu měření pro průtokový analyzátor EcaFlow model 150 GLP. Pro určení limitu byla použita kyselina benzoová, citrónová, octová, šťavelová, ftalová a salicylová. Tyto organické kyseliny se lišily různými hodnotami pK_a a různým počtem funkčních skupin. [39]



Obr. 9 Graf závislosti stanovených % na disociační konstantě

Na Obr. 9 je vidět, že mezi hodnotami pK_a 4–5 začíná prudce klesat schopnost metody spolehlivě detekovat COOH skupiny. Pod hodnotou $pK_a = 5$ bylo stanovené ještě nad 90 % COOH, což odpovídá avizované kyselině octové, kdy koncentrace 40 mM je stále ještě nad 90 % COOH. Při pK_a větším než 6 bylo stanovené pouze 80 % z přítomných COOH skupin.



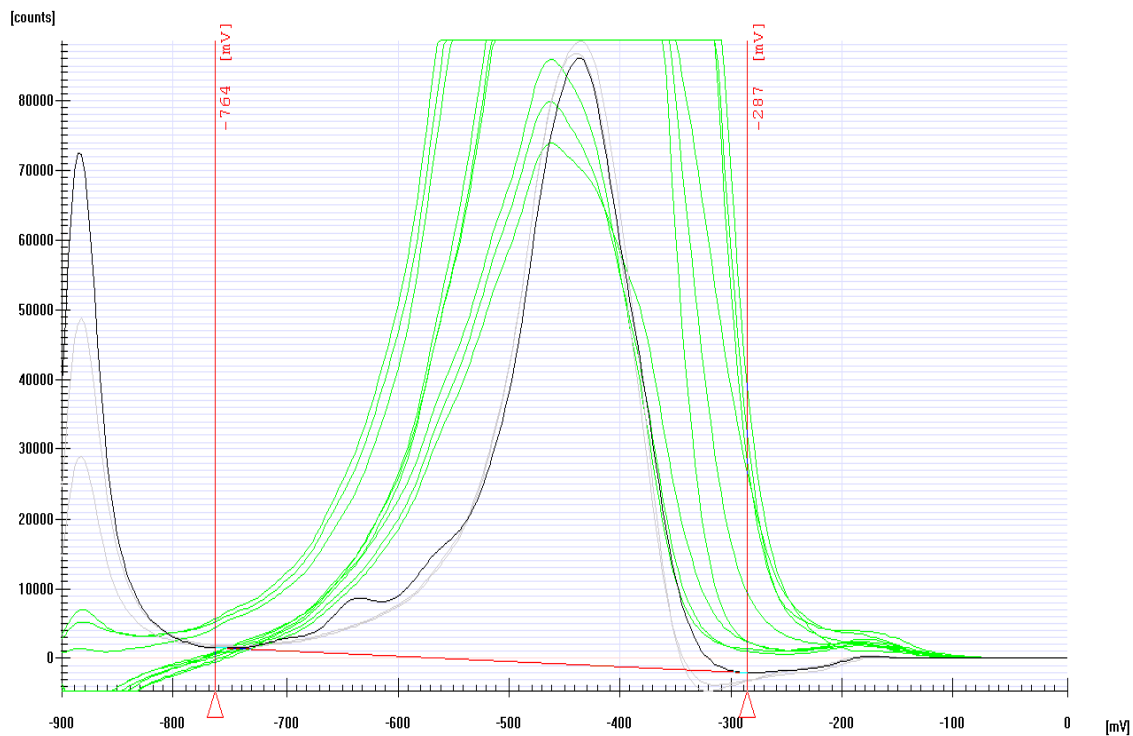
Obr. 10 Graf závislosti stanovených % na koncentraci COOH skupin

Na Obr. 10 je vidět optimální stanovení do 90 % COOH skupin pro koncentrace 5-40 mM. Při vyšších koncentracích (60 mM) bylo stanoveno pouze 70 % COOH skupin. Limit stanovení chronopotenciometrií byl nakonec stanoven na 20 mM, neboť při této koncentraci bylo ještě stanoven téměř 100 % přítomných COOH skupin.

Výrobce přístroje dříve udával horní limit měření 50 mM, později tuto hodnotu upravil na 20 mM.

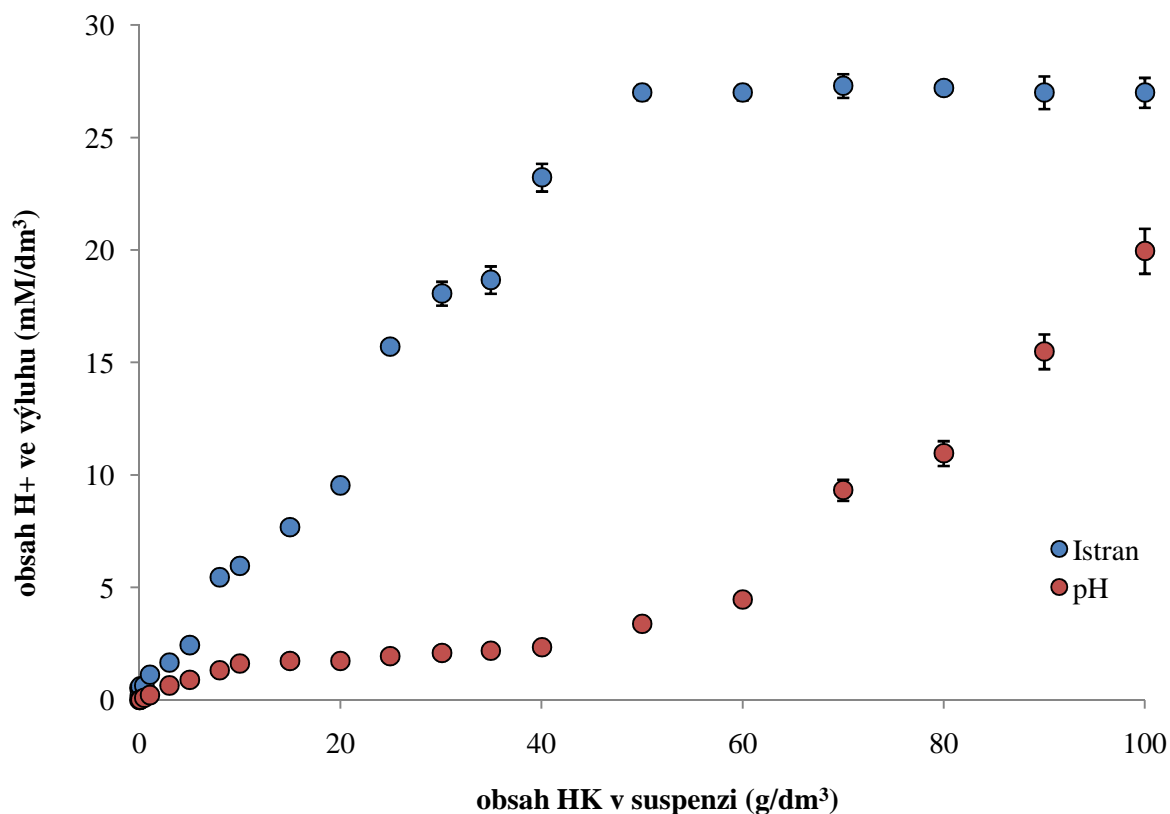
5.4 Dosavadní zkušenosti s chronopotenciometrickou titrací u HK

V rámci bakalářské práce [39] se testovala možnost využít tuto metodu pro stanovení obsahu kyselých funkčních skupin ve vodných roztocích huminových kyselin. Měřilo se v širokém rozmezí koncentrací. Zjistilo se, že původní limit stanovený výrobcem byl širší, ale později jej upravil na rozmezí 2 mM až 20 mM, čemuž odpovídají i naše zkušenosti.



Obr. 11 Ukázka zobrazení píku HK_1 pro koncentraci 20 g/dm^3

Na Obr. 11 je vidět zobrazení píku pro koncentraci 20 g/dm^3 , kdy pík má několik pásů, což značí, že huminová kyselina má více frakcí karboxylových skupin i při vysokých koncentracích.



Obr. 12 Porovnání výsledků naměřených pomocí pH a chronopotenciometrickou titrací

Na Obr. 12 jsou vidět naměřené výsledky HK_1 , kdy se porovnávají hodnoty naměřené chronopotenciometrickou titrací s hodnotami pH. Výsledkem bylo stanovení limitů metody na huminové kyseliny v suspenzi při přípravě výluhů 20-40 g/dm³, kdy přístroj po této koncentraci měří neustále stejnou hodnotu. Z důvodu vzniku odchylek při jednotlivých měřeních, byla stanovena maximální koncentrace huminových kyselin na 20 g/dm³.

5.5 Stanovení pH huminových kyselin

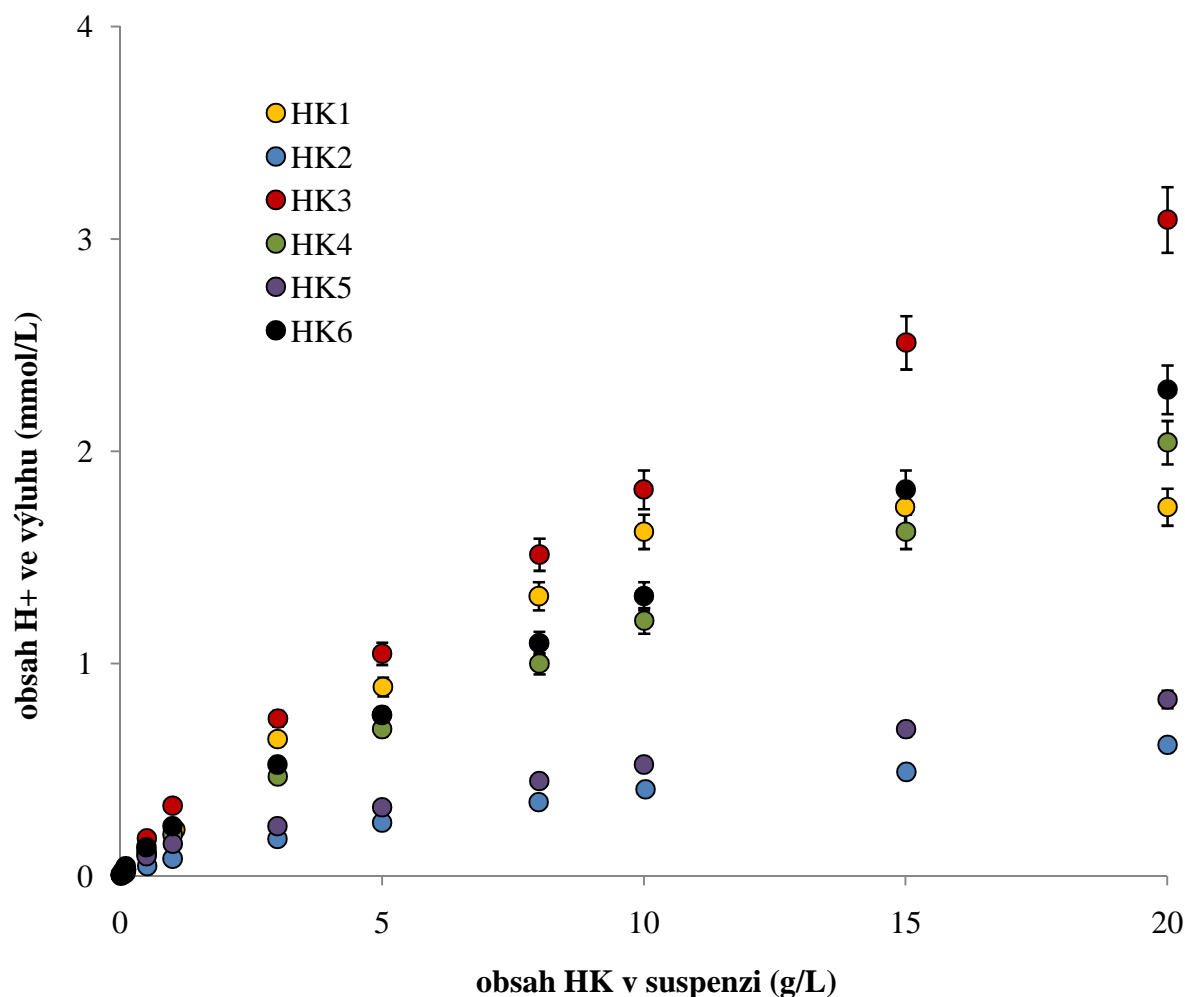
Hodnoty pH vzorků huminových kyselin byly stanoveny pomocí pH metru. Z těchto hodnot byly následně vypočítány jednotlivé koncentrace H^+ iontů.

Tabulka 17 *Naměřené hodnoty pH huminových kyselin*

c_{zad} (g/dm ³)	HK ₁	HK ₂	HK ₃	HK ₄	HK ₅	HK ₆
0,01	5,75	5,40	5,22	5,28	5,29	5,15
0,05	5,12	5,18	4,64	4,83	4,82	4,72
0,10	4,75	4,88	4,33	4,49	4,57	4,42
0,50	3,99	4,33	3,75	3,94	4,03	3,87
1,00	3,66	4,09	3,48	3,71	3,82	3,63
3,00	3,19	3,76	3,13	3,33	3,63	3,28
5,00	3,05	3,60	2,98	3,16	3,49	3,12
8,00	2,88	3,46	2,82	3,00	3,35	2,96
10,00	2,79	3,39	2,74	2,92	3,28	2,88
15,00	2,76	3,31	2,6	2,79	3,16	2,74
20,00	2,76	3,21	2,51	2,69	3,08	2,64

Tabulka 18 *Vypočítané koncentrace H⁺ iontů v mmol/g*

c_{zad} (g/dm ³)	HK ₁	HK ₂	HK ₃	HK ₄	HK ₅	HK ₆
0,01	0,1270	0,3062	0,4635	0,4037	0,4274	0,7079
0,05	0,1405	0,1348	0,4773	0,2791	0,2911	0,3811
0,10	0,1778	0,1345	0,4497	0,3053	0,2563	0,3802
0,50	0,2030	0,0914	0,3514	0,2301	0,1867	0,2698
1,00	0,2084	0,0813	0,3311	0,1950	0,1514	0,2344
3,00	0,2148	0,0579	0,2463	0,1556	0,0781	0,1746
5,00	0,1776	0,0502	0,2094	0,1384	0,0647	0,1517
8,00	0,1649	0,0434	0,1891	0,1249	0,0558	0,1371
10,00	0,1622	0,0406	0,1820	0,1202	0,0525	0,1318
15,00	0,1159	0,0326	0,1673	0,1081	0,0461	0,1213
20,00	0,0869	0,0308	0,1545	0,1021	0,0416	0,1145



Obr. 13 Porovnání obsahu H^+ iontů vypočítaných z hodnot pH

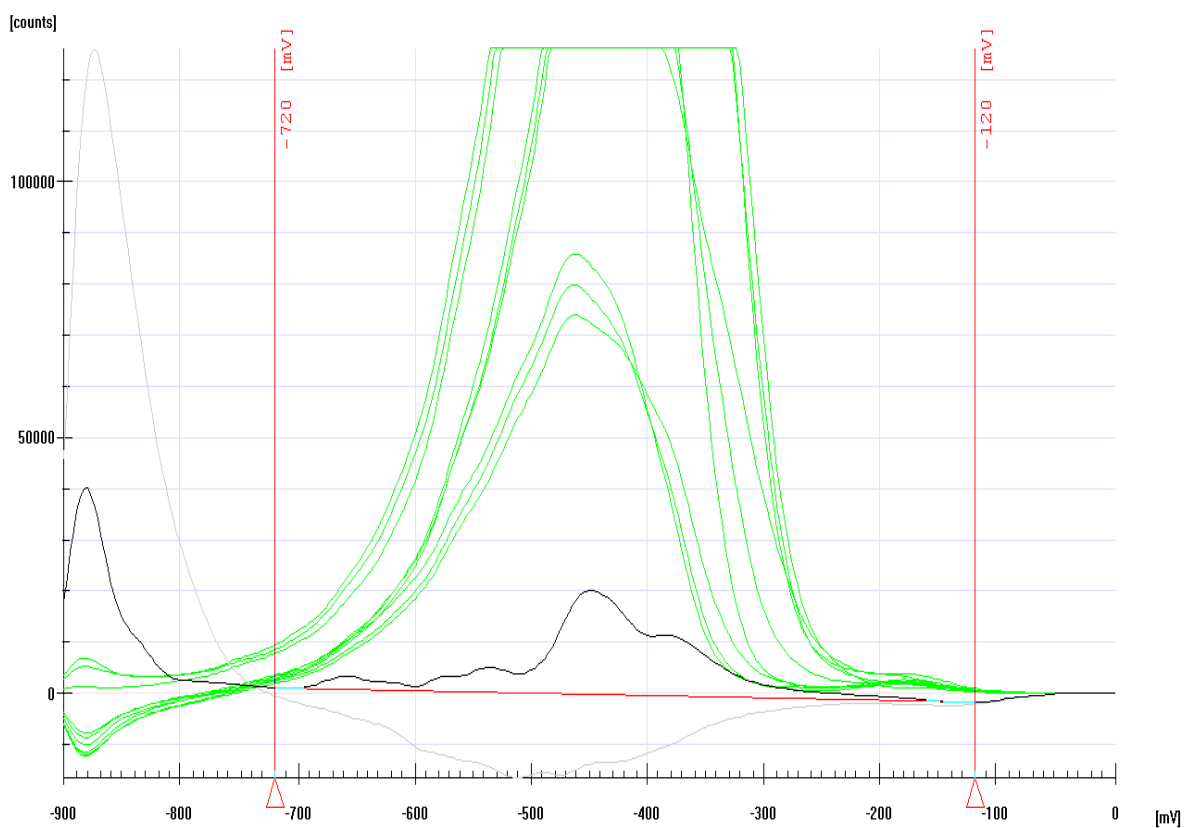
Na Obr. 13 je graf znázorňující závislost koncentrace H^+ iontů vypočítaných z hodnot pH. Z hodnot pH se dají vypočítat pouze H^+ ionty disociované v roztoku. To znamená, že čím je větší pH, tím je nižší disociace H^+ iontů.

Obsah H^+ iontů se liší jak podle koncentrace huminové kyseliny v suspenzi, tak podle dané huminové kyseliny. Z grafu lze vyčíst, že nejnižší disociaci H^+ iontů má $HK_2 < HK_5 < HK_4 < HK_6 < HK_3$. U HK_1 je výsledná disociace rozdílná, protože huminová kyselina v suspenzi do koncentrace 10 g/dm^3 stoupá a poté zůstává konstantní.

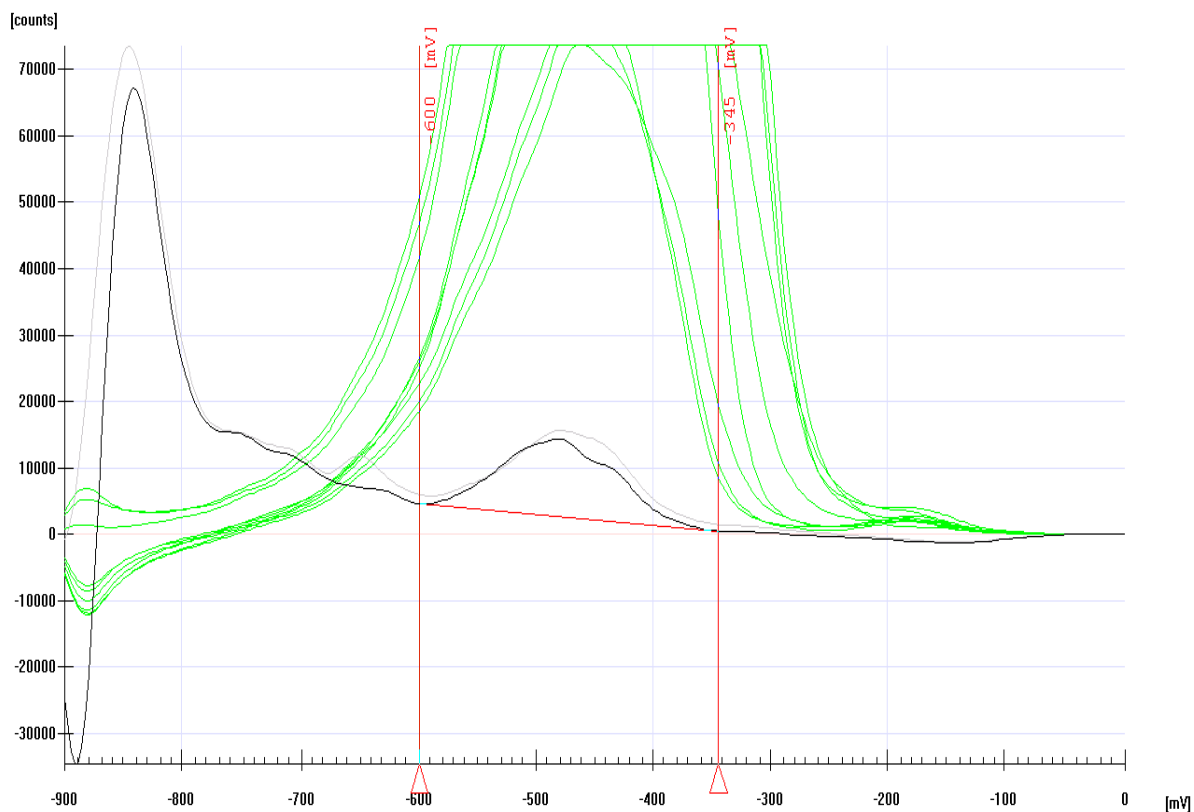
5.6 Stanovení celkové koncentrace H^+ iontů chronopotenciometrickou titrací

Každá kyselina byla změřena na průtokovém analyzátoru EcaFlow. Počet analýz byl přizpůsoben jednotlivým objemům. Některé vzorky byly proměřeny pouze 2×, z důvodu malého objemu vzorků. Ostatní vzorky byly analyzovány 3×. Jednotlivé křivky byly ohraničené červenými svislými čarami, které nám určují velikost píku. Tímto způsobem byly

odečteny koncentrace jednotlivých měření v každém vzorku a výsledná koncentrace kyselin byla určena zprůměrováním jednotlivých měření pro jednotlivé připravené koncentrace.

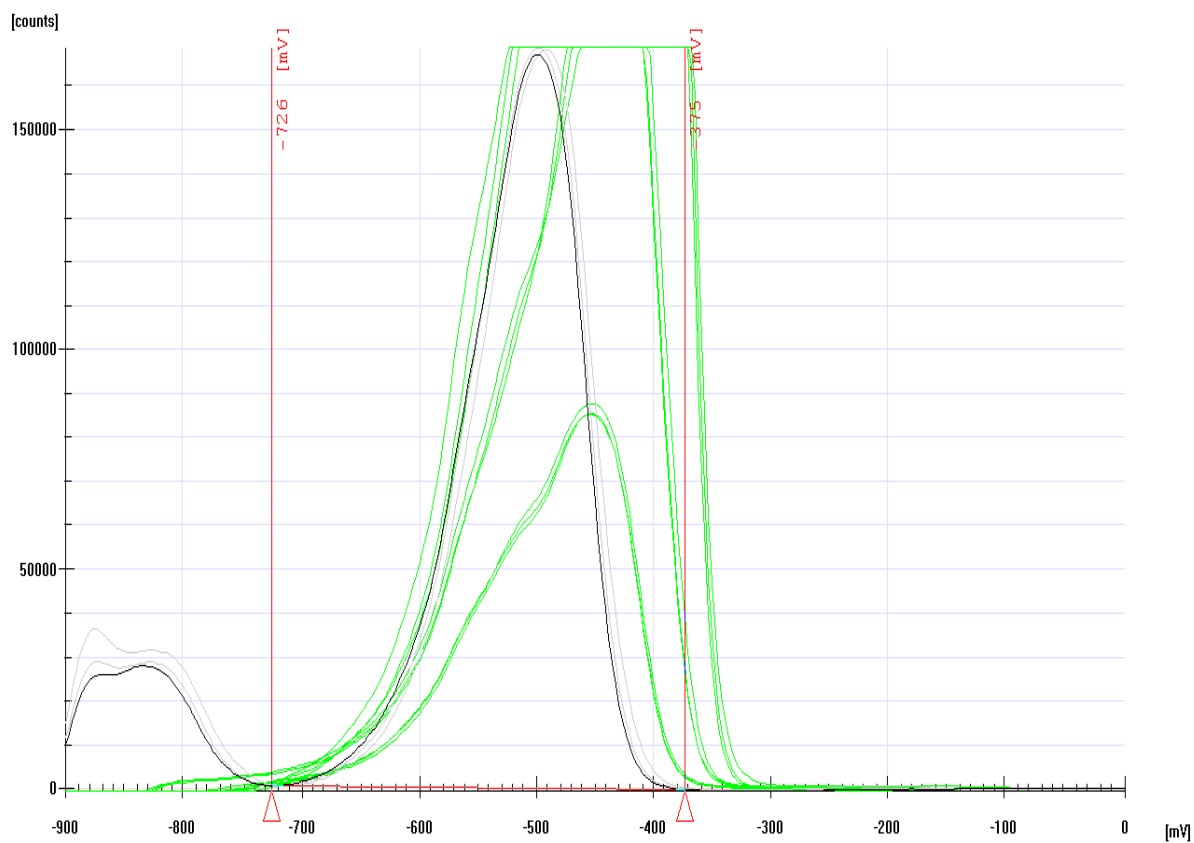


Obr. 14 Ukázka výstupu z přístroje EcaFlow HK₂ koncentrace 1 g/dm³



Obr. 15 Ukázka výstupu z přístroje *EcaFlow HK₃* koncentrace 1 g/dm³

Na Obr. 14 a Obr. 15 jsou zobrazeny příklady měření huminových kyselin pomocí chronopotenciometrické titrace, kdy u nízkých koncentrací je vidět, že se záznam skládá z více pásů, což značí, že huminová kyselina obsahuje více frakcí karboxylových skupin. To znamená, že huminové kyseliny patří mezi vícesytné.

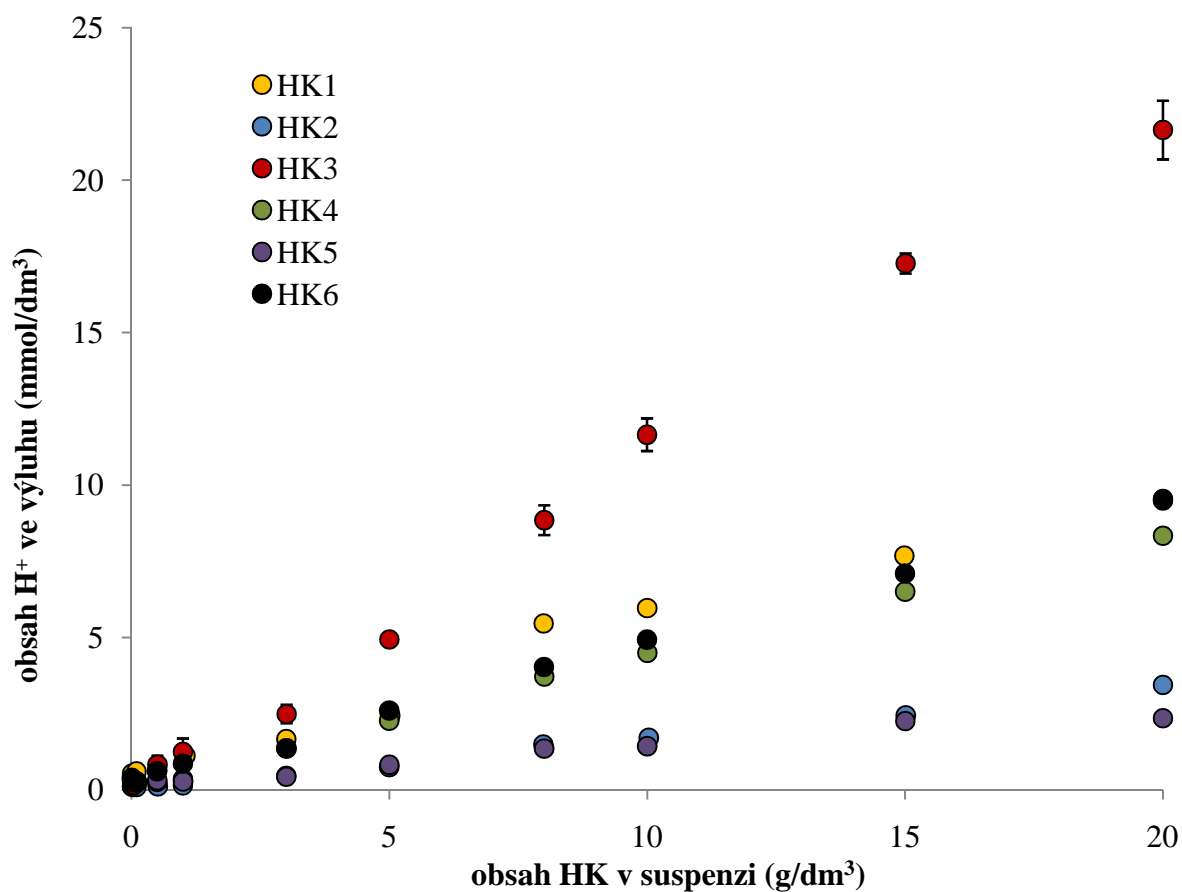


Obr. 16 Ukázka výstupu z přístroje EcaFlow HK₄ koncentrace 15 g/dm³

Na Obr. 16 je zobrazen příklad měření huminových kyselin na přístroji EcaFlow pro vyšší koncentrace, kdy je záznam většinou jen jeden široký pás. Další frakce nejsou u vyšších koncentrací vidět.

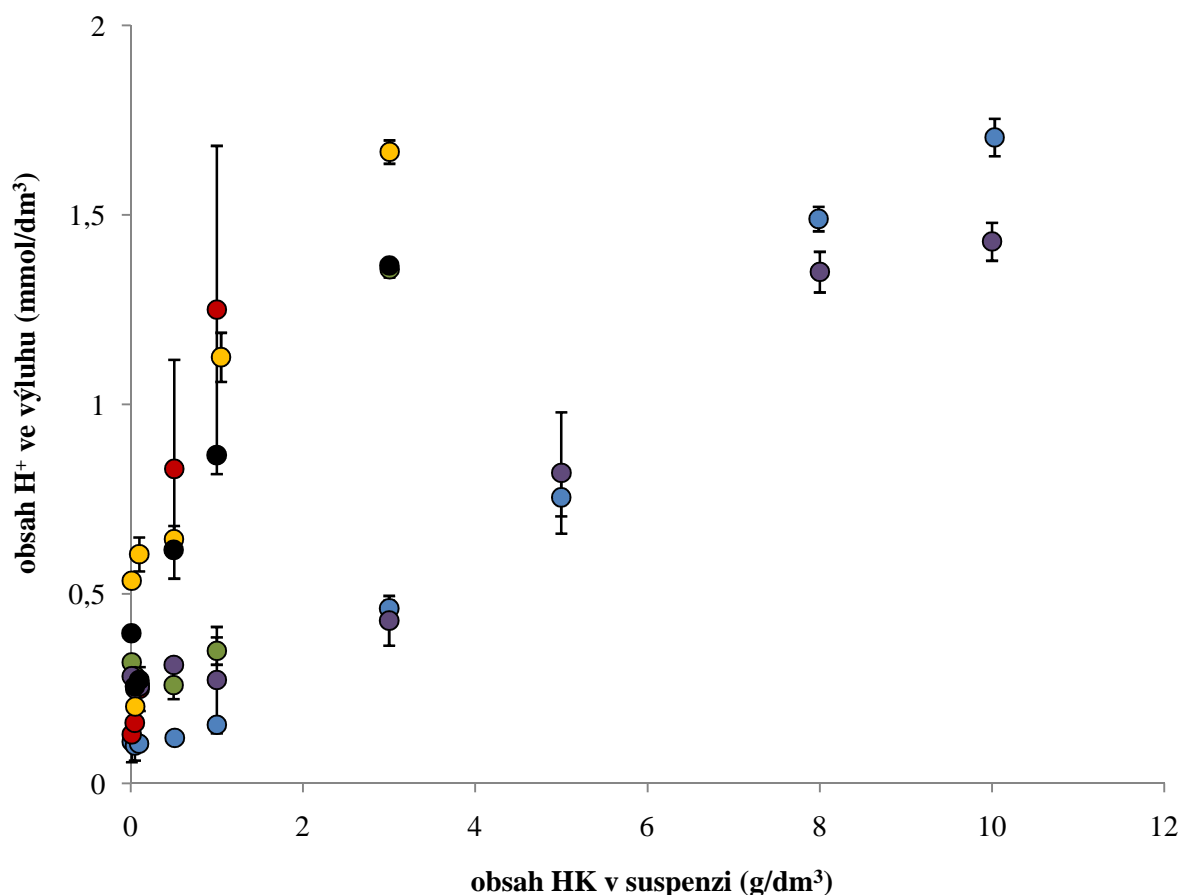
Tabulka 19 Koncentrace H^+ iontů naměřených chronopotenciometrickou titrací

	HK ₁	HK ₂	HK ₃	HK ₄	HK ₅	HK ₆
g/dm ³	[H ⁺] (mM)	[H ⁺] (mM)	[H ⁺] (mM)	[H ⁺] (mM)	[H ⁺] (mM)	[H ⁺] (mM)
0,01	0,54	0,11	0,13	0,32	0,28	0,40
0,05	0,20	0,10	0,16	0,28	0,25	0,26
0,10	0,61	0,11	0,25	0,26	0,26	0,27
0,50	0,65	0,12	0,83	0,26	0,31	0,62
1,00	1,13	0,16	1,25	0,35	0,27	0,87
3,00	1,67	0,46	2,49	1,36	0,43	1,37
5,00	2,44	0,76	4,94	2,27	0,82	2,61
8,00	5,46	1,49	8,85	3,71	1,35	4,04
10,00	5,96	1,71	11,65	4,49	1,43	4,93
15,00	7,68	2,44	17,27	6,51	2,25	7,10
20,00	9,54	3,44	21,65	8,34	2,35	9,49



Obr. 17 Porovnání obsahu H^+ iontů vypočítaných z hodnot naměřených na přístroji EcaFlow

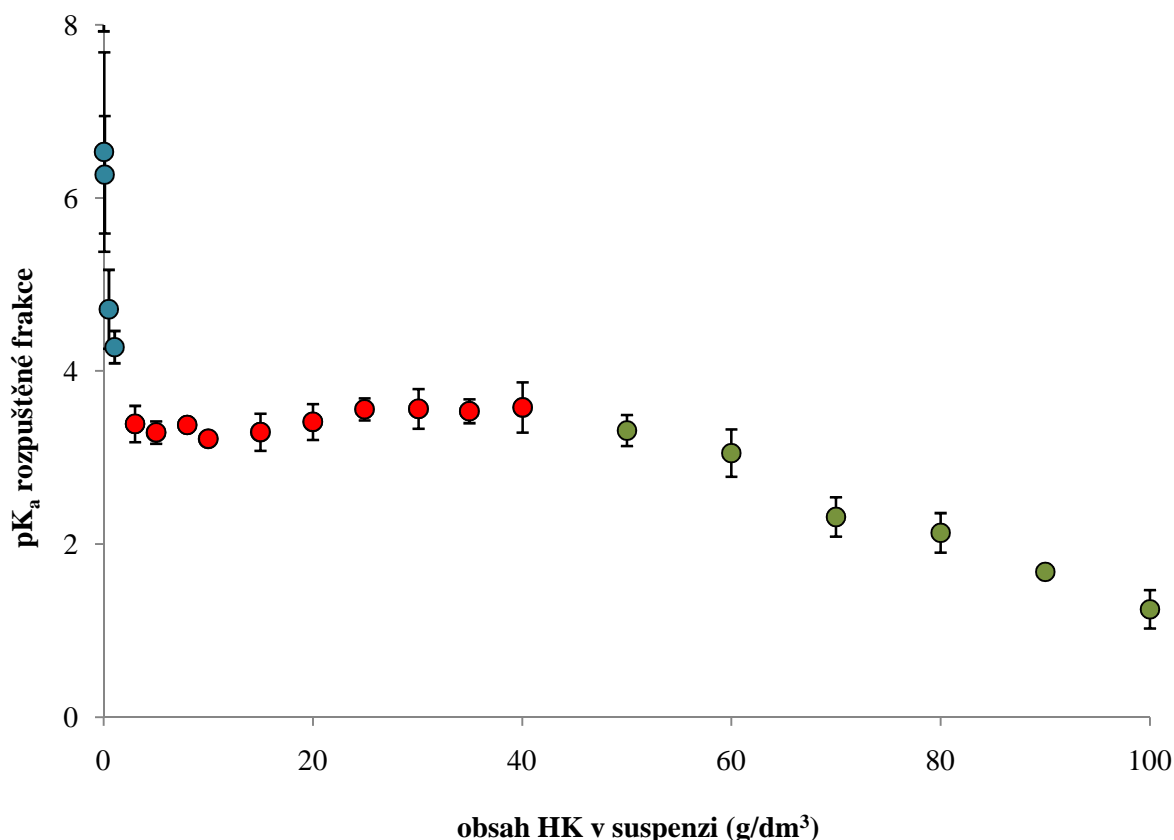
Na Obr. 17 je graf znázorňující závislost koncentrace H^+ iontů vypočítaných z hodnot naměřených na Istranu. Koncentrace H^+ iontů naměřených na přístroji EcaFlow zahrnuje jak disociované, tak nedisociované H^+ ionty obsažené v roztoku. V grafu jsou zobrazeny všechny měřené huminové kyseliny a HK Kotková naměřená v bakalářské práci. Všechny naměřené hodnoty, až na nejvyšší koncentraci u HK 02/05/03/3, byly do limitu 20 mM. Nejvyšší koncentrace HK 02/05/03/3 vykazovala nejvyšší odchylky v měření, nejspíš proto, že hodnota přesahovala limit stanovený výrobcem.



Obr. 18 Porovnání nízkých koncentrací měřených na Istranu

Obr. 18 je zaměřen na nízké koncentrace H^+ iontů naměřených pomocí přístroje EcaFlow. Při měření v oblasti menší než 2 mM se chyba měření zvyšuje. Výrobce přístroje nejprve udával dolní limit měření 1 mM a později jej upravil na 2 mM.

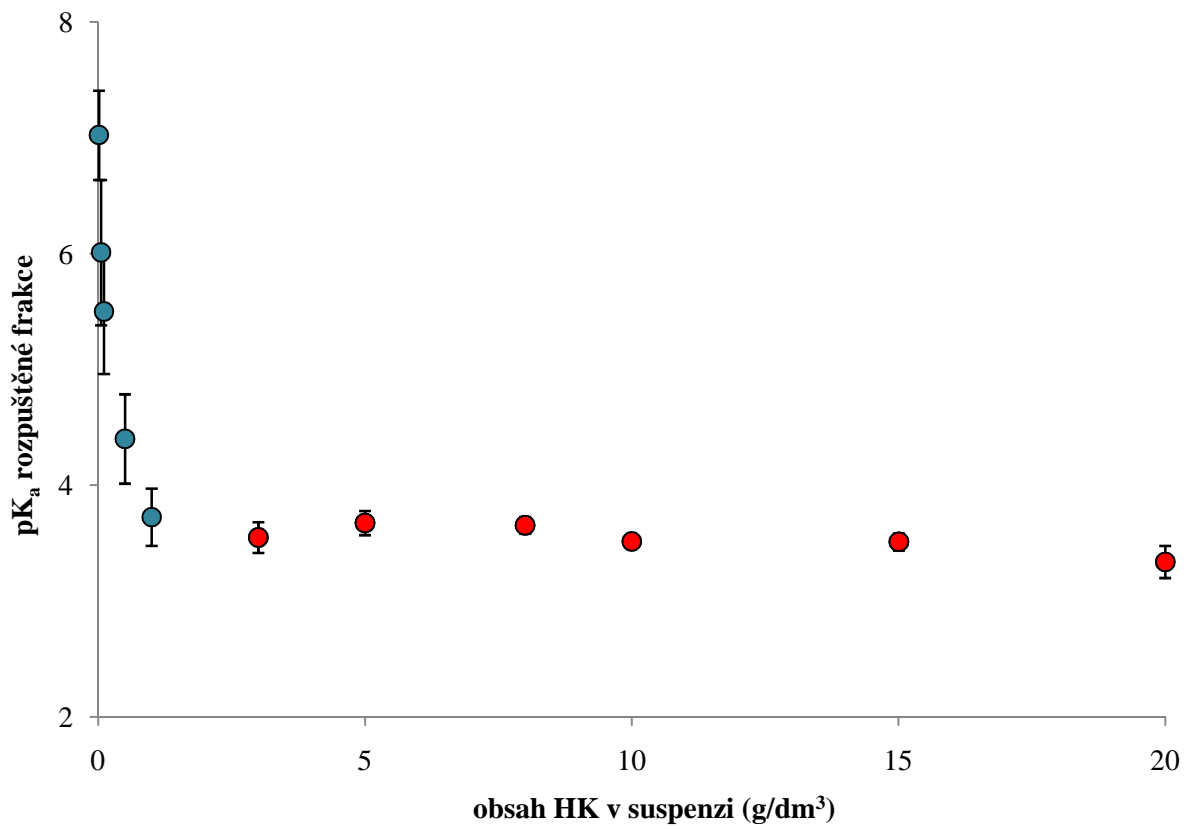
5.7 Stanovení disociační konstanty



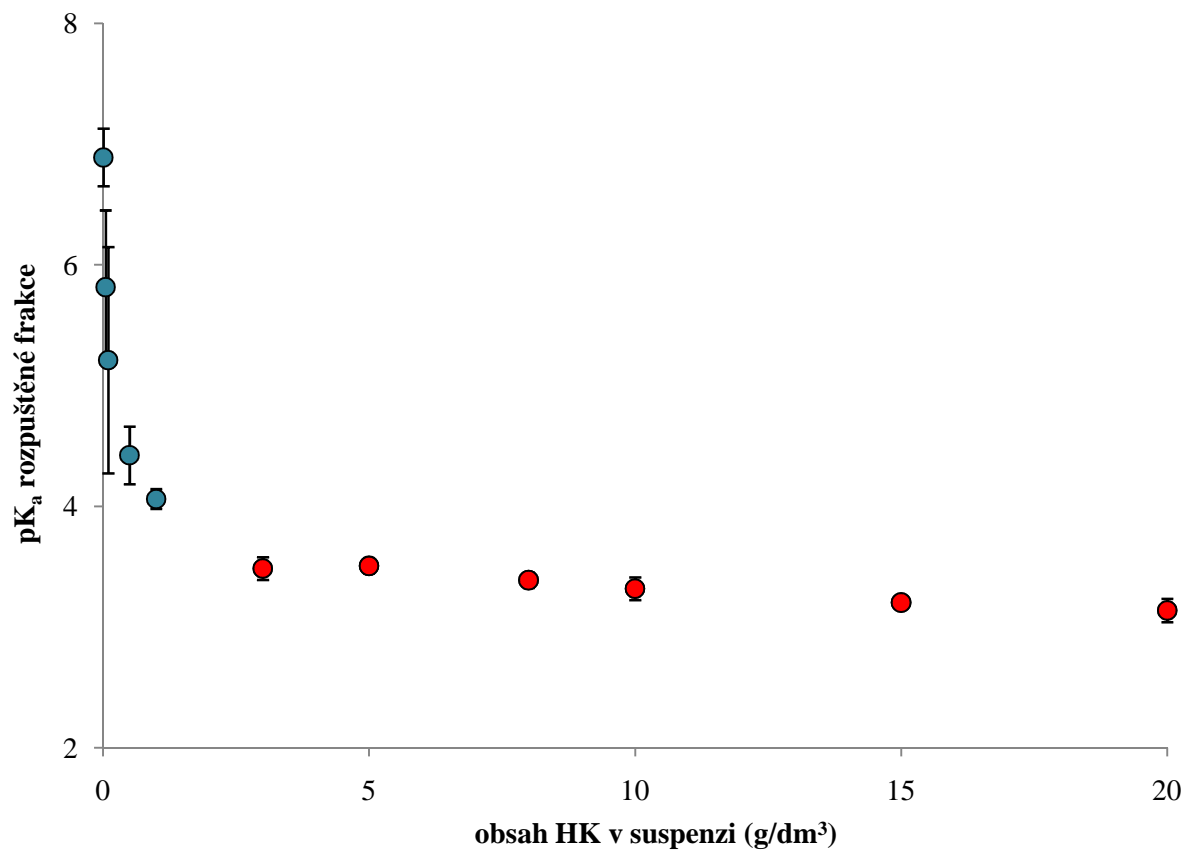
Obr. 19 Závislost disociačních konstant na obsahu huminových kyselin HK_1

Pro Obr. 19 jsou využité data z bakalářské práce a pokus o stanovení pK_a , tím se zjistila tato závislost. S rostoucí koncentrací huminových kyselin logicky hodnoty pK_a klesají, protože při nízkém obsahu huminových kyselin v suspenzi se rozpouštějí i méně rozpustné frakce s vyššími hodnotami pK_a . V oblastech nízkých koncentrací je měření zatíženo poměrně velkou chybou (modré body).

U vyšších koncentrací přístroj měřil neustále stejnou hodnotu H^+ iontů ve vyluzích, protože měřené hodnoty byly nad limitem měření. Pokud se tyto stejné hodnoty spojí s výsledky pH měření, tak se dá vypočítat hodnota pK_a . Tato hodnota klesá v důsledku omezení tohoto přístroje. Díky tomu se zdá, že hodnota pK_a klesá a to neodpovídá realitě (zelené body).



Obr. 20 Závislost pK_a na obsahu HK v suspenzi u HK_5



Obr. 21 Závislost pK_a na obsahu HK v suspenzi u HK_6

Na Obr. 20 a Obr. 21 jsou uvedeny příklady vypočítaných hodnot pK_a z kombinace měření pH a Istranu. *Modré body* značí nízké koncentrace naměřené přístrojem EcaFlow, kdy chyba měření je vysoká. *Červené body* mají přijatelnou chybu měření, kdy hodnoty pK_a jsou prakticky konstantní (HK_5), nebo se mírně snižují s rostoucím obsahem huminové kyseliny (HK_6).

Tabulka 20 Průměrné hodnoty pK_a

	HK_1	HK_2	HK_3	HK_4	HK_5	HK_6
pK_a	3,31	3,89	3,48	3,35	3,43	3,31
smodch	0,08	0,03	0,07	0,13	0,12	0,15

V Tabulka 20 jsou průměrné disociační konstanty vypočítány jako průměr hodnot disociačních konstant, které byly stanovené chronopotenciometrickou titrací v rozmezí koncentrací 2 až 20 mM. Tyto koncentrace jsou stanovené jako doporučený rozsah měření. Hodnoty pK_a vypočítané z hodnot stanovených chronopotenciometrickou titrací jsou nižší než hodnoty stanovené pomocí potenciometrických titrací. Důvodem rozdílu hodnot v těchto dvou metodách je ten, že u chronopotenciometrické titrace se měřily pouze rozpuštěné frakce, zatímco u titrací se pK_a stanovilo z celého obsahu huminových kyselin.

6. ZÁVĚR

Tato diplomová práce se zabývá použitím chromopotenciometrické titrace v huminovém výzkumu. U této metody se nejprve musely určit limity měření pro organické kyseliny a v závislosti na tomto měření byla metoda vyzkoušena na měření koncentrace huminové kyseliny Kotková v bakalářské práci [39]. Pomocí této huminové kyseliny byl stanoven limit hmotnostní koncentrace pro huminové kyseliny na maximální koncentraci 20 g/dm^3 .

Prvním cílem bylo stanovit kyselosti huminových kyselin pomocí potenciometrických titrací na automatickém titrátoru, které se dále používaly na výpočet hodnot pK_a tradičním způsobem. Důležitým stanovením bylo měření pH jednotlivých roztoků, kdy hodnoty pH klesaly s přidavkem huminové kyseliny, to značí, že čím je nižší pH, tím je větší disociace H^+ iontů.

Stěžejním měřením této práce bylo měření chromopotenciometrické titrace, kdy přístroj měřil závislost elektrického potenciálu na čase. Jako výstup z měření byl graf, kdy určením mezi počítač přímo vypočítal koncentraci H^+ iontů v roztoku a to jak disociovaných tak nedisociovaných. Průměrná hodnota disociační konstanty byla vypočítána z hodnot disociačních konstant, kdy koncentrace H^+ iontů ležela mezi 2 mM až 20 mM, což je limit stanovený výrobcem. Disociační konstanty byly určeny na 3,31 až 3,89. Tyto nově stanovené konstanty jsou pro rozpuštěnou frakci a to je důvod, proč jsou tyto hodnoty nižší než hodnoty stanovené titračně.

Po důkladném prostudování této metody a vyzkoušení na huminových kyselinách připravených rozdílnými postupy, si myslím, že tato metoda je vhodná pro výzkum huminových kyselin. Podmínkou však je, aby rozpuštěné frakce měli koncentraci v rozmezí stanovené výrobcem a to je 2 mM až 20 mM.

7. SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- [1] KANG, Ki-Hoon, et al. Characterization of humic substances present in landfill leachates with different landfill ages and its implications. *Water research*. Oxford: Pergamon Press, 2002, č. 36, s. 4023-4032. ISSN 0043-1354.
- [2] VANĚK, Václav. Úloha organické hmoty v půdě. *Biom.cz* [online]. 2010 [cit. 2013-04-15]. Dostupné z: <http://biom.cz/cz/odborne-clanky/uloha-organicke-hmoty-v-pude>
- [3] Huminové látky. *Humatex* [online]. 2005-2009 [cit. 2013-04-13]. Dostupné z: <http://www.humatex.cz/huminove-latky.html>
- [4] KALINA, M. Využití průtokové coulometrie ve studiu transportu kovových iontů v huminových gelech. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2010. 69 s. Vedoucí diplomové práce doc. Ing. Martina Klučáková, Ph.D.
- [5] PITTER, Pavel. *Hydrochemie*. 3. - přepracované. Praha: Vydavatelství VŠCHT, 1999. Huminové látky, s. 24, 327-333. ISBN 80-7080-340-1.
- [6] PIVOKONSKÝ, Martin, et al. Úprava vody s obsahem huminových látek. *Chemické listy*. Praha: Česká společnost chemická, 2010, č. 104, s. 1015-1022. ISSN 0009-2770. Dostupné z: http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2010_11_1015-1022.pdf
- [7] STEVENSON, F. *Humus chemistry: genesis, composition, reactions*. 2nd Ed. New York: John Wiley and Sons, c1994, xiii, 496 s. ISBN 04-715-9474-1.
- [8] SKYBOVÁ, Mária. Humínové kyseliny - prínos pre environmentálny výskum. *Acta montanistica Slovaca*. Košice: Technická univerzita [Košice]., 2006, roč. 11, č. 2, s. 362-366. ISSN 1335-1788. Dostupné z: <http://actamont.tuke.sk/pdf/2006/s2/25skybova.pdf>
- [9] Huminové látky. *SD - Humatex a.s.* [online]. 2005 [cit. 2013-04-14]. Dostupné z: <http://www.sdas.cz/showdoc.do?docid=244>
- [10] TÖLGYESSY, Juraj, et al. *Chémia, biológia a toxikológia vody a ovzdušia*. Bratislava: VEDA, vydavateľství Slovenské akademie vied, 1984. Humínové látky, s. 99-104.
- [11] CIHLÁŘ, Zdeněk. Modifikované huminové kyseliny. *Chempoint* [online]. 2011 [cit. 2013-03-18]. Dostupné z: <http://www.chempoint.cz/modifikovane-huminove-kyseliny>.
- [12] ŽÁČEK, Ladislav. *Hydrochemie*. Brno: Nakladatelství VUTIUM, 1998. Huminové látky, s. 51-53. ISBN 80-214-1167-8
- [13] SALMA, I, et al. How many carboxyl groups does an average molecule of humic-like substances contain. *Atmospheric Chemistry and Physics*. 2008, č. 8, s. 5997-6002. Dostupné z: <http://www.atmos-chem-phys.net/8/5997/2008/acp-8-5997-2008.html008/>

- [14] VARADACHARI, Chadrika; NAYAK, Dulal C.; GHOSH, Kunal. A novel method for the determination of total acidity of humic substances. *Journal of the Indian Society of Soil Science*. 1992, vol. 40, s. 682-687.
- [15] SCHNITZER, M.; KHAN, S. U. *Humic substances in the environment*. New York: Marcel Dekker, 1972. 327 s.
- [16] Holbecher Z., Churáček J. a spol. *Analytická chemie*. Praha: SNTL, 1987. 663 s. ISBN 80-03-00569-8
- [17] BORGGAARD, Ole K. Titrimetric determination of acidity and pK values of humic acid. *Acta Chemica Scandinavica*. 1974, vol. 28, no. 1, s. 121-122.
- [18] KURKOVÁ, Monika, et al. Humic acids from oxidize coals I. Elemental composition, titration curves, heavy metals in HA samples, nuclear magnetic resonance spectra of HAs and infrared spectroscopy. *Chemosphere*. 2004, 54, s. 1237-1245.
- [19] GOLDBERG, Marvin C; et al. The use of isosbestic points in the fluorescence excitation spectrum of humic acid to calculate the dissociation constant. *Anadian Journal of Soil Science*. 1987, 67, s. 715-717
- [20] LONDINOVÁ, M. *Fluorescence ve výzkumu hydrofilních oblastí asociativních koloidů*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2008. 68s.
- [21] KLOUDA, Pavel. *Moderní analytické metody*. Ostrava: Pavel Klouda, 2003. 132 s. ISBN 80-86369-07-2.
- [22] Pospíšilová, L., et al. Organický uhlík obhospodařovaných půd. *Folia Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis*, 2009, č. 1, 17 s. ISSN 1211-8516.
- [23] Istran spol. s r.o.: *Stanovení stopových prvků prietokovou coulometriou*, aplikační listy. Bratislava (SK): Istran, 2003.
- [24] KALVODA, Robert. *Elektroanalytická chemie životního prostředí*. Praha: Nakladatelství SNTL, 1985. Jiné elektrochemické metody, s. 24-25
- [25] ANDJELKOVIC, T., et al. A direct potentiometric titration study of the dissociation of humic acid with selectively blocked functional groups. *ECLÉTICA : Quimica*. 2006, 31, č. 3, s. 39-46. Dostupný také z WWW: www.scielo.br/eq
- [26] FERNANDES, Andreia N., et al. Potentiometric Acidity Determination in Humic Substances Influenced by Different Analytical Procedures. *Journal of the Brazilian Chemical Society : Sociedade Brasileira de Química*. 2009, Vol. 20, No. 9, s. 1715-1723.
- [27] FUKUSHIMA, Masami, et al. Acid-base characterization of molecular weight fractionated humic acid. *Talanta*. 1996, č. 43, s. 383-390. ISSN 0039-9140.

- [28] PORASSO, Rodolfo D., et al. Analysis of potentiometric titrations of heterogeneous natural polyelectrolytes in terms of counterion condensation theory: application to humic acid. *Biophysical Chemistry*. 2000, č. 86, s. 59-69.
- [29] CREA, Francesco, et al. Acid-Base Properties of Synthetic and Natural Polyelectrolytes: Experimental Results and Models for the Dependence on Different Aqueous Media. *Journal of Chemical*. 2009-02-12, roč. 54, č. 2, s. 589-605. ISSN 0021-9568. DOI: 10.1021/je800518j. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/je800518j>
- [30] MASINI, Jorge C., et al. Comparison of methodologies for determination of carboxylic and phenolic groups in humic acids. *Analytica chimica acta*. 1998, č. 364, s. 223-233. ISSN 0003-2670.
- [31] MASINI, Jorge C. Evaluation of neglecting electrostatic interactions on the determination and characterization of the ionizable sites in humic substances. *Analytica chimica acta*. 1993, č. 283, s. 803-810. ISSN 0003-2670.
- [32] KURKOVA, Monika, et al. Humic acids from oxidized coals: Elemental composition, titration curves, heavy metals in HA samples, nuclear magnetic resonance spectra of HAs and infrared spectroscopy. *Chemosphere*. 2004, roč. 54, č. 8, s. 1237-1245. ISSN 00456535. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2003.10.020. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0045653503010348>
- [33] KHILKO, S. L., et al. Potentiometric titration of humic acids. *Solid Fuel Chemistry*. 2011, roč. 45, č. 5, s. 337-348. ISSN 0361-5219. DOI: 10.3103/S0361521911050028. Dostupné z: <http://www.springerlink.com/index/10.3103/S0361521911050028>
- [34] ARAI, Shigemitsu, et al. An interpretation of the conductometric titration curve of humic acid. *Geoderma*. 1997, č. 19, s. 21-35.
- [35] KARA, Derya, et al. Determination of acidity constants of acid-base indicators by second-derivative spectrophotometry. *Spectrochimica acta: part A*. London: Pergamon Press, 2000, č. 56. ISSN 1386-1425.
- [36] CEPPI, Silvia B., et al. Differential scanning potentiometry: surface charge development and apparent dissociation constants of natural humic acids. *Talanta*. 1999, č. 50, s. 1057-1063. ISSN 0039-9140.
- [37] PALLADINO, Giuseppe, et al. Potentiometric determination of the total acidity of humic acids by constant-current coulometry. *Analytica Chimica Acta*. 2007, roč. 582, č. 1, s. 164-173. ISSN 00032670. DOI: 10.1016/j.aca.2006.08.060. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S000326700601837X>
- [38] LI, Jianping a Tuzhi PENG. Response to high acidity and basicity at a platinum electrode in chronopotentiometry. *Analytica chimica acta*. 2003, č. 478, s. 337-344. ISSN 0003-2670.

- [39]VIKTORINOVÁ, J. *Stanovení obsahu huminových kyselin v roztocích chronopotenciometricky*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2011. 40 s. Vedoucí bakalářské práce doc. Ing. Martina Klučáková, Ph.D..
- [40]SMITALOVÁ, M. Vliv obsahu funkčních skupin na difúzi kovových iontů v huminových gelech. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2011. 40 s. Vedoucí bakalářské práce doc. Ing. Martina Klučáková, Ph.D..
- [41]POTOČKOVÁ, J. Síla vazby kovových iontů v huminových gelech. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2011. 35 s. Vedoucí bakalářské práce doc. Ing. Martina Klučáková, Ph.D..
- [42]KOLAJOVÁ, R. Rozpustnost a disociace huminových kyselin. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2010. 32 s. Vedoucí bakalářské práce doc. Ing. Martina Klučáková, Ph.D.
- [43]DR. E. MICHAEL PERDUE. *International Humic Substances Society* [online]. 2012, [cit. 2012-12-21]. Dostupné z: <http://www.humicsubstances.org/soilhafa.html>.

8. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

K	Disociační konstanta
pK	Záporný dekadický logaritmus disociační konstanty
a	Aktivita
c	Molární koncentrace
γ	Aktivitní koeficient
α	Stupeň neutralizace
A	Absorbance
m_{HA}	Hmotnost huminové kyseliny
E	Měrný potenciál
t	Čas
R-022	1,5% roztok síranu sodného
c_{kys}	Požadovaná koncentrace kyseliny
c_{COOH}	Koncentrace karboxylových funkčních skupin
c_{H^+}	Koncentrace vodíkových iontů
c_{zad}	Zadaná koncentrace huminových kyselin
c	Přená koncentrace huminových kyselin
m	Hmotnost
V	Objem R-022
λ	Vlnová délka
HK	Huminová kyselina
pH	Záporný dekadický logaritmus koncentrace H^+ iontů
dpH	Derivované pH

9. PŘÍLOHY

Příloha 1 Aplikační list č. 41 – Stanovení silných a středně silných kyselin

istran

Aplikační list č. 41

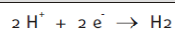
► Stanovenie silných a stredne silných kyselín

TYPY VZORIEK

Roztoky silných a stredne silných kyselín (kyselina chlorovodíková, sírová, dusičná, octová, atď.)

PRINCÍP METÓDY

Na stanovenie sa používa tzv. vnútroelektródová coulometrická titrácia: Pracovná elektróda sa pri vhodnom potenciáli naplní upraveným roztokom vzorky a H^+ ióny sa galvanostaticky zredukujú na vodík a tým sa zneutralizujú:



Pri tomto kroku sa zaregistruje signál - chronopotenciogram, z ktorého sa vypočíta množstvo a koncentrácia kyseliny vo vzorke.

POUŽITÉ ROZTOKY

- Nosný (základný) elektrolyt: demí voda alebo R-022
- Roztok R-022c
- Certifikovaný referenčný materiál HCl: 1,000 mol/dm³

ŠTANDARDNÉ ROZTOKY PRE ZOSTROJENIE KALIBRAČNEJ KRIVKY

Štandardné roztoky sú pripravené v roztoku R-022 z certifikovaného referenčného materiálu HCl:

(mol/dm ³)	Štandard č.1	Štandard č.2	Štandard č.3
► HCl	0,005	0,010	0,020

Poznámka: Koncentráciu štandardov možno prispôsobiť predpokladanému koncentračnému rozsahu v analyzovaných vzorkách

ÚPRAVA VZORIEK

VZORKA

Do suchej 50 ml odmernej banky sa pridá 5 ml roztoku R-022c, roztok vzorky (množstvo treba prispôsobiť predpokladanej koncentrácii kyseliny vo vzorke), objem roztoku sa doplní na 50 ml vodou a výsledný roztok sa po premiešaní analyzuje.

Zriedenie vzorky: x ml vzorky na výsledných 50 ml analyzovaného roztoku.

SLEPÁ VZORKA (BLANK)

Roztok R-022.

ELEKTRODA

E-CA Pt

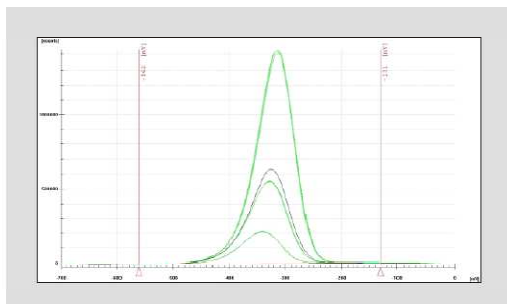
EXPERIMENTÁLNE PARAMETRE

Potenciostatický mód

The screenshot shows the software interface for the potentiostatic mode. It includes several sections for parameter configuration:

- Kalibrácia:** Bezkalibračné, Kalibračná prienka, Pridavok štandardu.
- Nahrómadenie:** GST, POT.
- Meranie pozado:** Iba pred prvým meraním, Pred každým meraním.
- Typ kalibračnej krivky:** Priemerná, Polynóm 2. stupňa.
- Autosampler:** Vyp, Zap.
- Merací mód:** S každou novou vzorkou alebo štandardom, S každou vzorkou alebo štandardom.
- Všeobecné:** Edepos: 400 mV, Idepos: 0 uA, Potenciál (mV): Estart1: 400, Estart2: 0, Estup: -700, Einyer: 400, Estidby: 400.
- Preparácia:** Pauza (s): Quiesc1: 2, Quiesc2: 10, Regen: 20.
- Regenerácia:** Rozpúšťanie: Istrip: -10 uA, Max. čas: 600 s, Pumpa: Vyp, Zap, Prietok: 5 ml/min.
- Kalibrácia:** Objem (ml): Vzorka: 4, Pczadie: 4, Hreplach: 0.
- Výpočet:** Segmentovať vzorku: Nie, Áno.
- Vzorky:** Merací mód: Mod A, Mod B.

ZÁZNAM



VYHODNOTENIE VÝSLEDKOV

Technika kalibračnej krivky

METROLOGICKÉ PARAMETRE

► Koncentračný rozsah	0,002 - 0,02 mol/dm ³ H ⁺ (v meranom roztoku)
► Reprodukovateľnosť	1,5 % pri 0,01 mol/dm ³ H ⁺ iónov (v meranom roztoku)

RUŠIVÉ VPLYVY

- Tuhé častice vo vzorkách môžu upchať elektródu. Takéto vzorky treba pred meraním prefiltrovať vhodný je nylónový filter s veľkosťou pórov 0,45 μm

POZNÁMKY

- Trvanie merania možno skrátiť zvýšením rýchlosti prietoku analyzátora z 3 ml/min na 6 ml/min výmenou hadičky peristaltického čerpadla - treba primerane pozmeniť aj prietokovú rýchlosť v parametroch
- Technika prídavkov štandardu je použiteľná len externým pridávaním štandardov. V takom prípade sa pracuje v bezkalibračnom móde, a výsledky sa vyhodnocujú samostatne

Příloha 2 Průtokový analyzátor EcaFlow model 150 GLP

