

# VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ  
ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE

FACULTY OF CHEMISTRY  
INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

FRAKCIONACE HUMINOVÝCH KYSELIN IZOLOVANÝCH Z LIGNITU

DIPLOMOVÁ PRÁCE  
DIPLOMA THESIS

AUTOR PRÁCE  
AUTHOR

PAVEL MOŽKA

BRNO 2008



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA CHEMICKÁ

ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE

FACULTY OF CHEMISTRY

INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

## FRAKCIONACE HUMINOVÝCH KYSELIN IZOLOVANÝCH Z LIGNITU

FRACTIONATION OF HUMIC ACIDS ISOLATED FROM LIGNITE

DIPLOMOVÁ PRÁCE

DIPLOMA THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

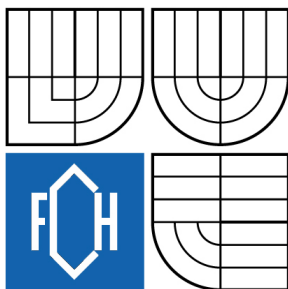
PAVEL MOŽKA

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

doc. Ing. MARTINA KLUČÁKOVÁ,  
Ph.D.

BRNO 2008



## Zadání diplomové práce

Číslo diplomové práce	<b>FCH-DIP0138/2007</b>	Akademický rok: <b>2007/2008</b>
Ústav	Ústav fyzikální a spotřební chemie	
Student(ka)	<b>Mořka Pavel</b>	
Studijní program	Spotřební chemie (M2806)	
Studijní obor	Spotřební chemie (2806T002)	
Vedoucí diplomové práce	<b>doc. Ing. Martina Klučáková, Ph.D.</b>	
Konzultanti diplomové práce		

### Název diplomové práce:

Frakcionace huminových kyselin izolovaných z lignitu

### Zadání diplomové práce:

1. Literární rešerše - frakcionace huminových kyselin a jejich rozpustnost.
2. Příprava huminových frakcí rozpouštěním při různých pH.
3. Charakterizace získaných frakcí, jejich rozpustnost ve vodě.
4. Zpracování experimentálních dat.
5. Results discussion and conclusion.

### Termín odevzdání diplomové práce: 16.5.2008

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

---

Pavel Mořka  
student(ka)

---

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

---

Ředitel ústavu

V Brně, dne 1.9.2007

---

doc. Ing. Jaromír Havlica, CSc.  
Děkan fakulty

## **ABSTRAKT**

Diplomová práce je věnována studiu lignitických huminových kyselin.

Literární rešerši lze rozdělit do tří částí. První odpovídá obecné charakterizaci huminových látek s užším zaměřením na huminové kyseliny. Shrnuje jejich výskyt, složení, strukturu a využití. Druhou část tvoří kompilace doposud publikovaných monografií a vědeckých článků, které se zabývají rozdělením heterogenních huminových kyselin na užší frakce se specifitějšími vlastnostmi. Poslední část se zaměřuje na rozpustnost huminových kyselin.

Podobné je i dělení experimentální části práce. K frakcionaci huminových kyselin byla použita metoda postupné frakcionace podle pH. Získané frakce byly charakterizovány zejména pomocí UV/VIS a FT-IR spektroskopie. Byl u nich stanoven obsah popela a obsah karboxylových skupin. Všechny frakce získané postupnou frakcionací a navíc některé rozpustné frakce získané přímou frakcionací byly následně zkoumány z pohledu rozpustnosti a jejich chování ve vodném prostředí.

Rámcem celé diplomové práce je porovnání obou metod, tedy metody přímé frakcionace s metodou postupné frakcionace.

## **ABSTRACT**

The diploma thesis deals with lignitic humic acids.

Bibliographic search can be divided into three parts. The aim of the first part is characterization of humic substances, presence, composition, structure and exploitation especially of humic acids. The second part describes a division of heterogeneous mixture of humic acids into closed fractions with more specific properties. The final part is a study of solubility of humic acids.

The experimental part of the diploma thesis is structured similarly. In this work, a gradual fractionation with pH is used. Obtained fractions were characterized by UV/VIS and FT-IR spectroscopy. We assessed the portion of ash and carboxyl groups have been identified.

Subsequently, all fractions extracted by gradual fractionation as well as some soluble fractions obtained by direct fractionation have been analyzed in view of solubility and their behaviour in water environment.

Both used methods were compared.

## **KLÍČOVÁ SLOVA**

huminová kyselina, frakcionace, pH, rozpustnost

## **KEYWORDS**

humic acid, fractionation, pH, solubility

MOŤKA, P. *Frakcionace huminových kyselin izolovaných z lignitu*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2008. 53 s. Vedoucí diplomové práce doc. Ing. Martina Klučáková, Ph.D.

## PROHLÁŠENÍ

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

.....  
Pavel Mořka

*Na tomto místě bych velmi rád poděkoval vedoucí diplomové práce doc. Ing. Martině Klučákové, Ph.D. za mnoho cenných rad, připomínek a především čas, který mi při psaní této práce věnovala. Také děkuji své rodině za podporu a zázemí, které mi poskytovala po celou dobu studia.*

## OBSAH

<b>1 ÚVOD .....</b>	<b>7</b>
<b>2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY .....</b>	<b>8</b>
2.1 Huminové látky.....	8
2.1.1 Úvod.....	8
2.1.2 Výskyt huminových látek.....	8
2.1.3 Dělení huminových látek.....	8
2.1.4 Struktura a složení huminových látek.....	9
2.2 Huminové kyseliny .....	12
2.2.1 Vlastnosti huminových kyselin.....	12
2.2.2 Struktura a složení huminových kyselin.....	12
2.2.3 Aplikace.....	13
2.2.3.1 Zemědělství.....	13
2.2.3.2 Průmysl.....	14
2.2.3.3 Ochrana životního prostředí .....	14
2.2.3.4 Farmakologie.....	14
2.2.3.5 Shrnutí aplikací.....	14
2.2.4 Frakcionace huminových kyselin .....	15
2.2.4.1 „Salting-out“.....	15
2.2.4.2 Použití kovů.....	15
2.2.4.3 Extrakční frakcionace.....	15
2.2.4.4 Membránové separační procesy (MSP).....	16
2.2.4.5 Rozměrově vylučovací chromatografie.....	19
2.2.4.6 Elektroforéza... ..	20
2.2.4.7 Adsorpce.....	20
2.2.4.8 Frakcionace podle pH.....	21
2.2.5 Rozpustnost huminových kyselin.....	22
2.3 Metody charakterizace huminových kyselin.....	25
2.3.1 UV/VIS spektrometrie.....	25
2.3.2 IR spektrometrie .....	26
<b>3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....</b>	<b>27</b>
3.1 Použité přístroje a chemikálie.....	27
3.2 Příprava huminových kyselin .....	27
3.3 Frakcionace huminových kyselin.....	28
3.4 Použitá instrumentální metodika.....	28
3.4.1 Ultrafialová a viditelná spektroskopie .....	28
3.4.2 Infračervená spektroskopie.....	29
3.4.3 Titrace ke stanovení karboxylové kyselosti.....	29
<b>4 VÝSLEDKY A DISKUSE .....</b>	<b>30</b>
4.1 Charakterizace původních huminových kyselin.....	30

4.2	Postupná frakcionace huminových kyselin.....	31
4.3	Obsah karboxylových skupin v získaných frakcích .....	32
4.4	Optické charakteristiky získaných frakcí huminových kyselin.....	34
4.4.1	Charakterizace UV/VIS spektroskopií .....	34
4.4.2	Charakterizace FT-IR spektroskopií.....	36
4.4.3	Obsah popela rozpuštěných frakcí.....	40
4.5	Rozpustnost frakcí huminových kyselin.....	40
4.5.1	UV/VIS spektra .....	40
4.5.2	pH a vodivost.....	41
4.5.3	Disociační a rozpouštěcí rovnováha .....	43
<b>5</b>	<b>ZÁVĚR.....</b>	<b>47</b>
<b>6</b>	<b>SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ .....</b>	<b>48</b>
<b>7</b>	<b>SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....</b>	<b>51</b>
<b>8</b>	<b>SEZNAM PŘÍLOH .....</b>	<b>52</b>
<b>9</b>	<b>PŘÍLOHY .....</b>	<b>53</b>

# 1 ÚVOD

Huminové látky představují širokou skupinu organických sloučenin, které vznikají postupným rozkladem živých organismů. Přestože obsahují mnohonásobně více organického uhlíku než nalézáme v živých organizmech, naše informace o nich nejsou zdaleka tak rozsáhlé. Jsou to sloučeniny s doposud nedoceneným významem, které si zasluhují mnohem podrobnější zkoumání, jež by mohlo napomoci ozřejmit spoustu důležitých mechanismů, kterých se tyto látky účastní. Kvůli jejich širokému spektru vlastností, vyplývajících ze složité struktury, se ukazuje jako velmi výhodná jejich frakcionace na jednotlivé frakce se specifitějšími vlastnostmi. Právě možnostmi takového dělení se zabývá předkládaná práce.

Huminové kyseliny jsou vzhledem ke svým unikátním vlastnostem neustále předmětem výzkumu mnoha pracovišť. Pro jejich studium se používají různé metody. Těmi nejrozšířenějšími jsou kapalinová chromatografie, hmotnostní chromatografie, EPR, UV/VIS, FT-IR, CP-MAS, <sup>13</sup>C-NMR a fluorescenční spektroskopie. Každá z těchto technik poskytuje jiný úhel pohledu na problematiku huminových látek. Celkový obraz jejich fyzikálně-chemických vlastností pak lze vytvořit na základě kombinace těchto technik.

V této práci byly použity huminové kyseliny izolované z jihomoravského lignitu (lokalita Mikulčice) metodou alkalické extrakce. Postupnou frakcionací byly získány frakce, které byly následně charakterizovány pomocí FT-IR a UV/VIS spektroskopie. Taktéž byla sledována jejich rozpustnost ve vodném prostředí.

## 2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

### 2.1 Huminové látky

#### 2.1.1 Úvod

Studium huminových látek se v poslední době stává velmi žádaným tématem řady probíhajících výzkumů. Huminové látky jsou velice aktivní v různých procesech spojených s ochranou životního prostředí, podílí se na obnově zemědělské půdy, zapojují se také do procesu samočištění vod, posilují životaschopnost organismů, odzbrojují a ničí infekční patogeny.

Roku 1981 byla založena mezinárodní asociace pro huminové látky (IHSS), aby sjednotila vědce mnoha oborů se zájmem o huminové látky. Mezi hlavní cíle IHSS patří sbírání standardizovaných vzorků huminových a fulvinových kyselin z lignitu, sladkých vod a půdy, a poskytování referenčních vzorků pro účely výzkumu.

#### 2.1.2 Výskyt huminových látek

Huminové látky (HL) jsou pravděpodobně nejrozšířenější přírodní organické sloučeniny na zemském povrchu [1]. Přítomnost těchto látek v půdě byla dokázána dokonce i na Antarktidě, kde probíhá proces humifikace vinou extrémních klimatických podmínek zcela odlišně ve srovnání s ostatními kontinenty [2].

Huminové látky jsou látky přírodního charakteru stále patřící mezi nepřilíš prostudovaná chemická individua. Jako důležitá složka půdy vznikají tyto látky chemickým a biologickým rozkladem organických, převážně rostlinných, ale také živočišných zbytků. Nemalou roli v procesu vzniku hraje následná syntetická činnost mikroorganismů [8], [52]. HL jsou důležitým zdrojem organického uhlíku v půdním i vodním prostředí [53]. Celkový obsah uhlíku ve formě huminových látek na Zemi je  $60 \cdot 10^{11}$  t, což více jak 8krát převyšuje obsah uhlíku v živých organismech [3].

Huminové látky hrají klíčovou úlohu v přírodě, protože přispívají k růstu rostlin, jsou zodpovědné za strukturu a fyzikálně-chemické vlastnosti půdy a také jsou spojeny s většinou povrchových jevů, které nastávají v půdě.[4]

Obsah huminových látek v přírodě je kolísavý. Vyskytují se především v sedimentech, zeminách, rašelině, splaškových vodách, hnědém i černém uhlí či lignitu. Jsou součástí všech typů půd. Jejich koncentrace závisí především na klimatických podmínkách, ale také na způsobu obdělávání a přítomných rostlinných společenstvech. V jílovitých půdách je obsah nepatrný, v běžných půdách v řádu jednotek procent, zatímco v matricích tvořených hnědým uhlím či lignitem jde až do desítek procent. Vysoký obsah (často 80 % a více) je zaznamenán např. v rašelině. [5]

#### 2.1.3 Dělení huminových látek

Při klasifikaci huminových látek vycházíme velmi často z různé rozpustnosti huminových látek ve vodném prostředí o různé hodnotě pH. Huminové látky pak dělíme do tří frakcí:

- *fulvinové kyseliny* (FK), frakce rozpustná ve vodném prostředí při jakékoliv hodnotě pH, rozpustná v zásadách i kyselinách. Zůstávají v roztoku po oddělení huminové kyseliny okyselením. Fulvinové kyseliny jsou světle žluté až žlutohnědé barvy,

- *humínové kyseliny* (HK), frakce rozpustná ve zředěných alkalických roztocích, po okyselení zásaditého extraktu se vysráží. Jsou hlavní extrahovatelnou složkou huminových látek. Jsou tmavohnědé až šedé barvy,
- *huminy* (HU), nerozpustné při žádné hodnotě pH, jsou černé barvy.

Podle tohoto rozdělení mohou být odlišnosti mezi huminovými a fulvinovými kyselinami vysvětleny na základě jiných molekulárních hmotností, stupni polymerizace a také počtu funkčních skupin zabudovaných v molekule.

Jednotlivé frakce se liší barvou, přesto je jejich chemická struktura velmi podobná. Změna některých vlastností v závislosti na změně barvy, tedy i druhu huminové látky je patrná z obrázku (Obrázek 1).

Analýza fulvinových a huminových kyselin ukazuje následující rozdíly mezi těmito látkami:

- huminové kyseliny mají větší molekulovou hmotnost než fulvinové kyseliny,
- huminové kyseliny obsahují méně COOH skupin, jsou tedy méně kyselé než fulvinové kyseliny,
- huminové kyseliny obsahují více C, ale méně O než fulvinové kyseliny,
- huminové kyseliny obsahují více H, N a S než fulvinové kyseliny,
- huminové kyseliny mají vyšší obsah chinoidní C=O skupiny,
- fulvinové kyseliny jsou bohatší na fenolickou OH skupinu a C=O vázanou v ketonu.

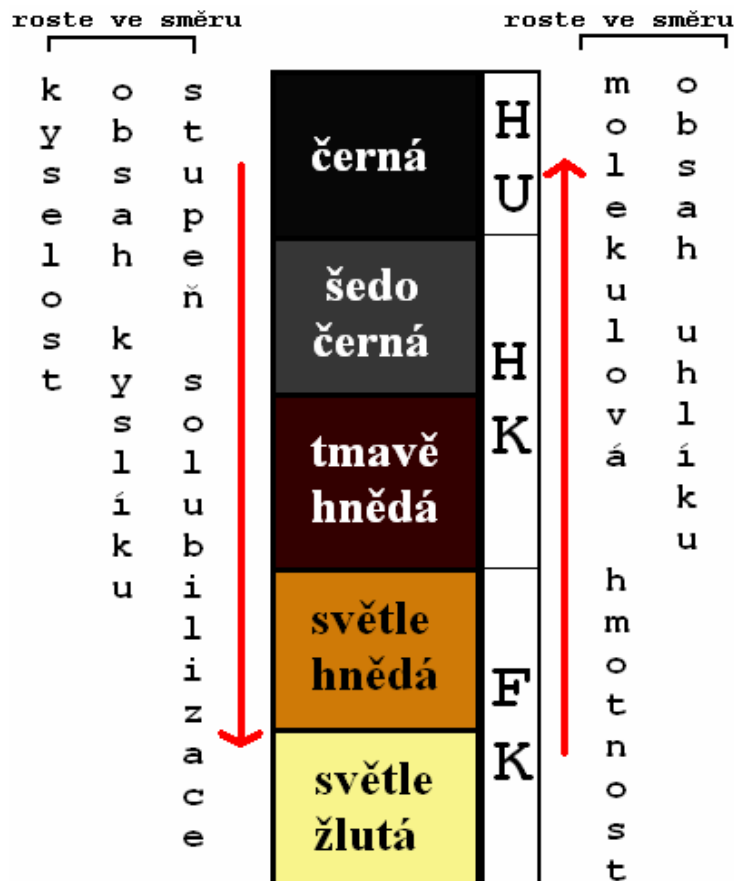
Dalším významným rozdílem je to, že u FK se prakticky všechny vázaný kyslík vyskytuje ve funkčních skupinách, zatímco u HK je výrazný podíl kyslíku součástí hlavního jádra molekuly (součást hlavního řetězce v podobě esterových nebo etherových vazeb) [6]. Ostrá hranice mezi stanovením huminových kyselin a fulvokyselin z důvodů různého stupně disperzity těchto látek, která se projevuje různou rozpustností ve vodě a hodnotou disociační konstanty však neexistuje.[7]

#### 2.1.4 Struktura a složení huminových látek

Existence huminových látek je známa již po několik století, avšak znalosti o jejich struktuře patří stále do oblasti ne příliš probádané. Huminové látky jakožto heterogenní směs látek není možné popsat jedním strukturním vzorcem. Zřejmě první návrhy struktury huminových kyselin byly předloženy téměř současně Stevensonem v roce 1972 a Harworthem v roce 1973 [5]. Na obrázku (Obrázek 3) je znázorněna pozdější hypotetická struktura huminové kyseliny podle Stevensona.[5]

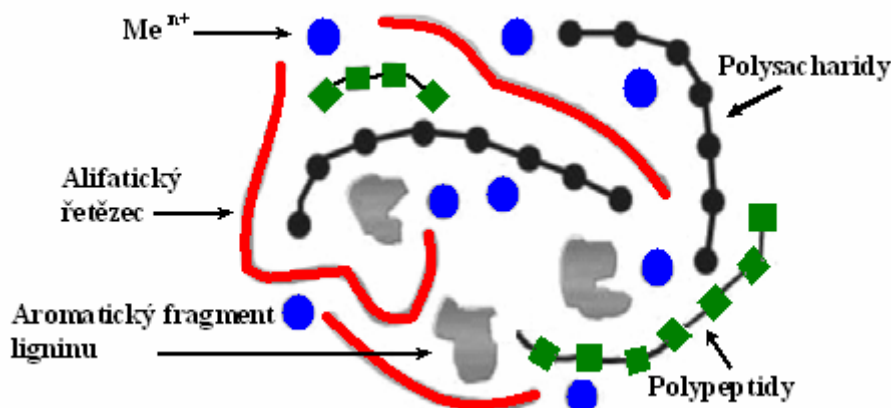
Informace o strukturním složení huminových látek je nezbytná pro pochopení jejich možných fyzikálně-chemických interakcí s látkami přítomnými v životním prostředí.

V literatuře je popsáno několik teorií struktury huminových látek. Podle té doposud nejrozšířenější byly huminové látky považovány za vysoce polydisperzní heterogenní molekuly o vysoké molekulové hmotnosti. Polydisperzita huminových látek znamená, že jsou huminové látky tvořeny směsí polymerů o odlišné molekulové hmotnosti. Tyto polymery mohou být různě zatočené (globulární či lineární konformace). Nejdůležitějším faktorem ovlivňujícím prostorovou konformaci jsou koncentrace huminových látek, iontová síla a pH prostředí rozpouštědla. Při nižších koncentracích, slabých iontových silách a neutrálním pH se chovají jako lineární koloidy, zatímco při vysokých koncentracích, vyšších iontových silách a nízkých hodnotách pH zaujmou globulární konformaci. [8] [9]



Obrázek 1: Huminové látky a jejich vlastnosti

Pozdější výsledky založené na gelové chromatografii (SEC) vedly Piccola k zavedení nového modelu, který problematiku struktury těchto látek popisuje zcela novým způsobem. Podle něj je velká molekulová hmotnost pouze zdánlivá. Huminové látky vytváří asociáty relativně malých heterogenních molekul, stabilizovaných v systému především slabými chemickými interakcemi. Tyto vazby mohou být reversibilně narušeny např. působením minerální nebo monokarboxylové kyseliny (kyselina mravenčí, octová, propionová a máselná). Molekulová hmotnost huminových látek v těchto útvarech se pohybuje jen do 1000 Da. [3] [10] [11] [22]



Obrázek 2: Koncepte struktury huminových látek navrhnutá Simpsonem (2002). Jednotlivé nízkomolekulární komponenty asociují v přítomnosti kovů za vzniku agregátů

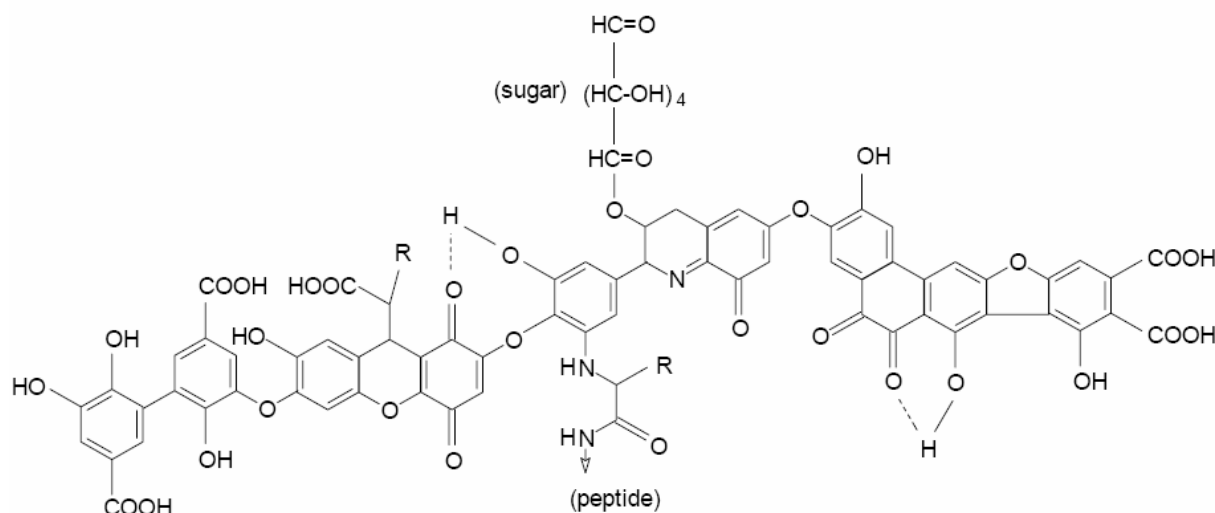
Studie huminových látek pomocí NMR potvrzuje existenci makromolekulárních agregátů složených z velkého množství nízkomolekulárních organických komponentů (<2000 Da) jako jsou alifatické kyseliny, ethery, estery, alkoholy, aromatické fragmenty ligninu, polysacharidy, polypeptidy. Tyto jsou k sobě poutány celou řadou interakcí. Navrhnuté schéma supramolekulární struktury je předloženo na obrázku (Obrázek 2). [3] [11]

Struktura HL je nicméně natolik unikátní a nejednotná, že podle mnohých autorů pravděpodobně neexistují dvě molekuly huminových látek, které by byly totožné a pokud existují tak jich je velmi málo [4]. Jelikož je poměrně snadné identifikovat aromatické struktury, alifatické řetězce, uhlovodíky, volné radikály, peptidické vazby či chinoidní struktury, bývají proto huminové látky velmi často charakterizovány statisticky přes procentuelní zastoupení jednotlivých entit. V tabulce (Tabulka I) je srovnáno zastoupení některých funkčních skupin v huminových a fulvinových kyselinách podle Schnitzera [11].

Tabulka I: *Obsah funkčních skupin (meq·g<sup>-1</sup>) v huminových a fulvinových kyselinách* [11]

funkční skupina	HK	FK
kyselé skupiny, celkově	5,6–8,9	6,4–14,2
karboxylová	1,5–5,7	5,2–11,2
fenolová OH	2,1–5,7	0,3–5,7
alkoholová OH	0,2–4,9	2,6–9,5
chinoidní/keto C=O	0,1–5,6	0,3–3,1
metoxy OCH <sub>3</sub>	0,3–0,8	0,3–1,2

Huminové kyseliny a fulvokyseliny jsou látky o velkém rozsahu molekulových hmotností (2000–200 000 g·mol<sup>-1</sup>). Základní strukturální jednotkou je aromatické jádro, které může obsahovat kyslíkaté a dusíkaté heterocykly. Na toto jádro navazují řetězce alifatického charakteru s bohatým obsahem různých funkčních skupin. Tvarová složitost je dána tím, že mezi molekulami dochází k trojrozměrnému zesíťování. [12]



Obrázek 3: Předpokládaná struktura huminové kyseliny podle Stevenson (1982); R může být alkyl, aryl nebo aralkyl [8]

## 2.2 Huminové kyseliny

### 2.2.1 Vlastnosti huminových kyselin

Huminové kyseliny reprezentují společně s fulvinovými kyselinami a huminy tři základní frakce humusu. Huminové kyseliny však patří mezi nejdůležitější frakce humifikované půdní organické hmoty, protože na rozdíl od fulvinových kyselin a huminů, které se podílí asi 8 % na celkovém koloběhu uhlíku, podíl huminových kyselin je až 16 %. [13]

Rozmanitá struktura huminových kyselin, lišících se v závislosti na místě původu, nalezišti, ale i způsobu izolace a době odběru vzorku a obsah velmi různorodých funkčních skupin činí tyto látky velmi vděčným studijním materiálem pro celou řadu vědeckých pracovišť, ale také zapříčiňuje celou řadu jejich velmi zajímavých vlastností.[12]

Huminové kyseliny jsou nejúčinnější složkou humusu, mají vysokou sorpční schopnost, hydrofilní charakter a proto jsou schopné vázat a zadržovat velké množství H<sub>2</sub>O.[11]

Huminové kyseliny mají schopnost sorbovat těžké kovy vytvářením komplexů s funkčními skupinami (–COOH, C=O, –OH) vázanými na povrchu huminových kyselin. Huminové kyseliny se chovají jako živý organismus a za vhodných podmínek mění svou strukturu. Tento cyklus přeměny struktury je důležitou součástí půdotvorných procesů. [7]

Velké množství přítomných funkčních skupin spolu s polymerní povahou a relativně vysokou chemickou stabilitou vytvářejí značný potenciál k jejich praktickému využití. Prvkové složení huminových kyselin je proměnlivé, což je patrné z tabulky (Tabulka II), kde je uvedeno procentuelní zastoupení některých prvků, udávané různými autory.[4]

Hlavním zdrojem huminových kyselin je uhlí, dominantní produkt zuhelnování rostlinných zbytků. Nicméně lignit představuje vhodnější formu. Bylo potvrzeno, že lignitické huminové kyseliny si svými vlastnostmi nic nezadají s huminovými kyselinami obsaženými v nejkvalitnějších typech půd jako je černozem. Jeho další nespornou výhodou je vysoký obsah ve srovnání s půdními huminovými kyselinami. Podíl organického uhlíku v lignitu je až 25krát vyšší než v černozemích, což výrazným způsobem zefektivňuje izolaci těchto látek. Koncentrace huminových kyselin v lignitu se pohybuje v rozmezí 30–90 % v závislosti na místě původu.[15] [21]

Tabulka II: *Obsah biogenních prvků v huminových kyselinách v hmotnostních procentech* [4]

autor	hmot. [%]			
	uhlík	vodík	kyslík	dusík
Alexandrova	52–62	2,8–5,8	31–39	1,7–4,9
Feldbeck	54	5	37	4
Konovova	52–65	2,0–5,5	30–33	3,5–5,5
Steelink	53,8–58,7	3,2–6,2	32,8–38,2	0,8–4,3

### 2.2.2 Struktura a složení huminových kyselin

Chemická podstata huminových kyselin není doposud zcela objasněna. Jedná se o složitou směs molekul s různými funkčními skupinami, které se liší svou strukturou a molekulovou hmotností. Vzhledem ke koloidní povaze se nedaří zjistit jejich přesnou konstituci. Předpokládá se, že molekuly huminových kyselin vznikly polymerací nebo kondenzací základních aromatických jednotek, tvořených pětičlennými nebo šestičlennými kruhy,

spojenými můstkovými vazbami nejčastěji přes kyslík, ale mohou být tvořeny i skupinami –S–, –NH–, –CH<sub>2</sub>.

K jádrům jsou připojeny různé funkční skupiny, podle jejichž chemické povahy se od sebe odlišují jednotlivé typy huminových kyselin. Mezi zastoupené funkční skupiny patří: –OH, –COOH, –CH<sub>3</sub>, –OCH<sub>3</sub>, –SO<sub>3</sub>H, –PO<sub>3</sub>H<sub>2</sub>, –NH–, –NH<sub>3</sub>, a –N=.

K nejznámějším modelům stavby jádra huminových kyselin patří kromě jiných Dragunův, Rakovského, Flaigův a Felbeckův model.[11]

Kyselý charakter huminových kyselin a tím i schopnost výměny kationů závisí od přítomnosti –COOH skupin a v menší míře i od alkoholových a fenolových –OH skupin. Koncentrace –COOH skupin v huminových kyselinách není oproti fulvinovým kyselinám až tak vysoká a klesá s rostoucí molekulovou hmotností s výjimkou –COOH skupin v *ortho* poloze k fenolické skupině, jejíž obsah s rostoucí velikostí molekuly vzrůstá. Velikost makromolekul HK je proměnlivá a do jisté míry závislá na pH a iontové síle roztoku, ve kterém se nachází. Karboxylové a hydroxylové funkční skupiny jsou příčinou záporného náboje huminových kyselin. V roztoku o vysoké hodnotě pH nebo naopak nízké iontové síle se natahují v důsledku tzv. intramolekulárních repulzí mezi jednotlivými zápornými skupinami molekuly a současně zde působí i intramolekulární repulze mezi zápornými skupinami sousedních molekul. Pokud je iontová síla roztoků vysoká nebo pH menší než sedm, stáčí se makromolekuly huminových kyselin do klubek a vytváří shluky. To vysvětluje proč se huminové kyseliny na rozdíl od kyselějších a tedy i zápornějších fulvinových kyselin v kyselém prostředí vysráží. [4]

Obsah huminových kyselin bývá největší v přírodně oxidovaných derivátech lignitu (např. leonardite) vzniklých zvětráváním. A právě kvůli zvýšení obsahu kyslíkatých funkčních skupin jsou prováděny procesy směřující k syntetickému okysličování dalších běžných typů geologicky mladšího uhlí. Tyto jsou rozpustnější ve vodných roztocích. [45]

### 2.2.3 Aplikace

Humus představuje jeden z největších rezervoárů uhlíku na Zemi. Industriální aplikace humusu a produktů z humusu odvozených byla doposud spíše výjimečná. Rozmanitá struktura huminových kyselin a také obsah různorodých funkčních skupin však zcela nepochybně řadí tyto sloučeniny k látkám s vysokým potenciálem využitelným v budoucnu. Huminové kyseliny oplývají celou řadou velmi zajímavých vlastností, které jsou zkoumány mnoha vědeckými pracovišti. Jedná se zejména o vlastnosti koloidní, spektrální, elektrochemické, iontově výměnné a sorpční. [2] [12]

Nyní lze aplikaci huminových kyselin rozdělit do čtyř hlavních kategorií, kterými jsou zemědělství, průmysl, ochrana životního prostředí a farmakologie.

#### 2.2.3.1 Zemědělství

Již brzy po jejich objevení bylo známo, že jsou huminové kyseliny základním a esenciálním prvkem půd využitelným pro zemědělství. I dnes jsou stále huminové kyseliny předmětem zájmu mnoha výzkumů spjatých se zemědělstvím, kde nachází uplatnění například jako přísada hnojiv (pozitivní vliv huminových sloučenin na strukturu půdy, obsah živin a zadržování vody v půdě) nebo jako krmivo pro hospodářská zvířata. Zde se využívá jejich baktericidní schopnosti a příznivého účinku na optimalizaci pH v trávicím traktu zvířat. [54]

### 2.2.3.2 Průmysl

Stále častěji však HK nachází uplatnění i v různých odvětvích průmyslu. Například ve stavebnictví lze vlastností huminových kyselin s úspěchem využít při výrobě cementových aditiv, kde nacházejí uplatnění při regulaci rychlosti tvrdnutí betonu.

Můžeme se s nimi setkat taktéž v kožedělném průmyslu. Původně se zde používaly pouze jako barvivo, postupem času jako činidlo pro moření kůže, aby našly vzápětí své místo i v roztocích pro dokončovací úpravy. V dřevařském odvětví se používají jako složky ve vodě rozpustných mořidlech na ochranu nátěrů. [2]

Používají se také jako reologická aditiva v silikátovém, dále pak v metalurgickém nebo keramickém průmyslu za účelem zvýšení mechanické pevnosti. I v papírenském průmyslu našly celou řadu uplatnění. Ve výrobě elektricky vodivých a vysoce pevnostních papírů, jako barviva a také v procesech recyklace papíru. [2]

Sorpční vlastnosti HK mají mimořádný význam. V půdě vytvářejí huminové kyseliny komplexy s jíly za vzniku tzv. „jílových koloidů“. Těto vlastnosti se často využívá při těžbě nerostných surovin, kdy přídavek sloučenin na bázi huminových kyselin zvyšuje disperzibilitu vrtné kapaliny a zpevňuje stěny vrtného otvoru, což je významné zvláště v jílovitých horninách. [17]

### 2.2.3.3 Ochrana životního prostředí

Schopnost HK vázat kovy a další toxické látky jako jsou pesticidy, kyanidy, polycyklické sloučeniny, barviva a detergenty hraje významnou roli v oblasti ochrany životního prostředí.

Vysoká afinita huminových kyselin (HK) k těžkým kovům je jednou z nejvýznamnějších vlastností těchto látek. Díky ní v přírodních vodách a půdách přirozeným způsobem regulují transport těchto kovů a tím snižují jejich toxicitu. [16]

### 2.2.3.4 Farmakologie

Ve farmacii lze využít huminových kyselin v souvislosti s izolací sloučenin pro výrobu léčiv, ale také s přípravou kosmetických krémů a terapeutických lázní. Byly dokázány aktivity HK podobné heparinu a estrogeneru (účinnost HK na léčení rakoviny dělohy laboratorních zvířat). Využití HK ve farmaceutickém průmyslu omezuje skutečnost, že ještě není zcela potvrzeno, zda nemůže způsobovat mutagenezi DNA. [6]

Další uplatnění HK se nabízí v oblasti balneologie, kde lze předpokládat příznivé účinky HK, jako terapeutické látky obsažené v léčivých vodách, na lidský organismus.

HK mají virostatické účinky, takže jsou vyhledávaným objektem v oblasti virologie. [19]

### 2.2.3.5 Shrnutí aplikací

Využití huminových kyselin v širokém oborovém spektru je předmětem dalšího výzkumu a vývoje. Atraktivita je dána zejména tím, že se jedná o látky s dostatečnými zásobami a potenciálně vhodnými vlastnostmi. Pro aplikaci huminových substancí je důležitá především ta skutečnost, že jsou to přírodní látky a tedy mají minimální škodlivý dopad na životní prostředí.

## 2.2.4 Frakcionace huminových kyselin

V makromolekulární chemii chápeme pod pojmem frakcionace proces, kterým se od sebe oddělují druhy makromolekul lišící se nějakou charakteristikou (chemickým složením, relativní molekulovou hmotností, větvením, stereoregularitou, atd.).

Huminové kyseliny se vyznačují vysokou heterogenitou složení a ukazuje se tak jako výhodné rozdělit je do frakcí, které mají podobné vlastnosti a jsou tak v další výzkumné fázi lépe charakterizovatelné. Toto rozdělení lze provést různými metodami. Přehled nejpoužívanějších je uveden v této kapitole.

### 2.2.4.1 „Salting-out“

Za nejobecnější způsob frakcionace huminových kyselin lze považovat rozdělení na šedé huminové kyseliny (GHA) a hnědé huminové kyseliny (BHA) vysolováním přidávkou elektrolytu. Takovéto rozdělení bylo provedeno již v roce 1938. Zatímco Springer použil KCl, Theng získal frakce pomocí síranu amonného při pH 7. Kromě vizuální odlišnosti se tyto frakce liší rozdílnou rozpustností. GHA vyznačující se koloidní povahou mají menší obsah funkčních skupin obsahujících kyslík, vyšší molekulovou hmotnost a jsou méně rozpustné než hnědé huminové kyseliny. Vyšší obsah hnědých huminových kyselin je typický pro Histosoly a Alfisoly, zatímco šedé huminové kyseliny převažují v Altoll a Rendoll půdách. [19] [20]

### 2.2.4.2 Použití kovů

V literatuře [19] najdeme také zmínku o možnosti využití iontů kovů pro účely frakcionace. Huminové látky vytváří nerozpustné soli s celou řadou iontů kovů. Huminové látky tak jsou v menší či větší míře vysráženy z roztoku. Tuto techniku prezentovali například Sowden a Deuel nebo Dubach. Zmíněná metoda se příliš neujala a to především proto, že srážení huminových kyselin lze poměrně jednoduše a účinně dosáhnout i změnou hodnoty pH.

### 2.2.4.3 Extrakční frakcionace

Extrakce je proces, jímž se polymer obsahující makromolekuly, které se liší nějakou charakteristikou ovlivňující jejich rozpustnost, odděluje z fáze bohaté polymerem ve frakcích postupným zvyšováním rozpouštěcí schopnosti rozpouštědla. To opakovaně vede ke vzniku dvoufázového systému, v němž se rozpustnější složky koncentrují ve fázi chudé polymerem.

Trendem v posledních letech je snaha rozdělit huminové kyseliny do několika užších frakcí různými extrakčními metodami. Jednou z nich je extrakce organickými rozpouštědly v Soxhletově přístroji. Pro extrakci jsou používána různá polární i nepolární rozpouštědla, resp. jejich směsi. Příspěvek [23] je zaměřen na frakcionaci huminových kyselin izolovaných z jihomoravského lignitu. Jako extrakční činidla byly použity dva typy rozpouštědel: alkoholy a acetáty. Extrahované frakce i zbytky po extrakci byly charakterizovány pomocí UV/VIS a FT-IR spektroskopie. Frakcionace byla prováděna jednak v Soxhletově přístroji, jednak rozpouštěním HK za konstantního míchání při laboratorní teplotě. Jednoznačně byla potvrzena mnohem vyšší efektivita druhého způsobu extrakce. Příspěvek také zmiňuje zajímavé rozdíly ve struktuře a vlastnostech jednotlivých frakcí a srovnává účinnosti extrakce různými typy rozpouštědel. Výtěžky HK získané extrakcí organického rozpouštědla v Soxhletově přístroji vykazují nejvyšší hodnotu pro polární extračistý ethanol, nejnižší výtěžek byl zaznamenán pro amylacetát. Ani v případě acetátů ani v případě alkoholů nelze vysledovat jednoznačnou závislost výtěžku HK na počtu uhlíků v molekule. Lze jen

konstatovat, že acetáty jeví tendenci pro pokles výtěžku HK s rostoucím počtem uhlíků v acetátu.

Autoři [24] chtěli získat postupnou sekvenční extrakcí huminových kyselin, vyextrahovaných z jihomoravského a severočeského lignitu biologicky lépe a hůře odbouratelné složky a zaměřit se na studium jejich funkcí v sekundární struktuře huminových kyselin s ohledem na stabilitu a kinetiku termooxidační degradace. Postupně byly vyextrahovány frakce typu aminokyselin a sacharidů (extrakce horkou vodou), volných lipidů (extrakce dichlormethanem a methanolem) a vázaných lipidů (transesterifikace s  $\text{BF}_3$  v methanolu).

#### 2.2.4.4 Membránové separační procesy (MSP)

Membránové separační procesy zahrnují velice širokou skupinu procesů, které mají jeden společný rys a to je použití membrány jako semipermeabilního separačního rozhraní. Obliba MSP je založena na tom, že mají vysokou separační účinnost a poskytují tedy brilantní permeát o vysoké čistotě, zařízení kladou malé nároky na obsluhu a procesy jsou šetrné k separovaným tekutinám.

Separální procesy jsou takové operace, při kterých ze zařízení vystupují minimálně dva kvalitativně odlišné proudy. U membránových separací se získává jednak proud, který prochází membránou – permeát, a jednak proud látek, které jsou membránou zadržovány a zůstávají tak na nástřikové straně membrány, tzv. retentát. V některých membránových aplikacích se hovoří o diluátu či koncentrátu. Pro vstupující proud se používá označení nástřik neboli „feed“.

Hnací silou membránových filtračních technik je transmembránový tlak, zatímco procesy jako jsou osmóza a dialýza probíhají v koncentračním gradientu.

Existují tři základní mechanismy oddělení látek ze směsi membránou:

- rozdílná velikost částic ve směsi (sítový efekt); membrána zadrží částice větší, než jsou její póry,
- rozdílná rozpustnost složek ze směsi v membráně (např. olejové membrány),
- rozdílný náboj jednotlivých složek směsi.

Dělicí vlastnosti membrán jsou dány jejich selektivitou a propustností. Selektivita ovlivňuje účinnost dělení a čistotu permeátu a je nepřímo úměrná potřebné velikosti plochy membrány. Membrány jsou kategorizovány podle molekulové hmotnosti molekul, které již neprojdou membránou. Taková molekulová hmotnost vyjádřená v Daltonech se označuje jako dělicí rozsah, tzv. *cut-off*. Dělicí rozsah vyjadřuje relativní molekulovou hmotnost částice, která je danou membránou z 90 % zadržována. K udržení dané selektivity je nutná odpovídající uniformita pórů, tj. úzká distribuce jejich velikostí. Propustnost (permeabilita) má vliv na rychlost (kinetiku) procesu. Kinetika procesu se vyjadřuje objemovým tokem permeátu vztaženým na plochu membrány ( $\text{l h}^{-1} \cdot \text{m}^{-2}$ ) a je ovlivňována střední velikostí pórů a hustotou pórů (porozitou). Nedostatečnou propustnost lze vyvážit větší plochou membrány. Výkon separace kromě již zmíněných faktorů také významně ovlivňuje velikost částic a distribuce velikostí částic obsažených v surovině a také elektrostatické interakce filtrovaného média s membránou. [26] [56]

### *Charakteristika toků*

Pro většinu membránových procesů je typické uspořádání s tzv. příčným tokem („crossflow“), díky kterému nedochází k akumulaci zadržovaných částic (molekul, iontů) před membránou. Na rozdíl od „tradiční“ filtrace, která je označována jako filtrace do mrtvého bodu („dead-end“ filtrace), při membránové filtraci se silným tangenciálním tokem nad membránou je možné proces výrazně prodloužit a získat vyšší množství permeátu. [56]

### *Zanášení membrán a jejich regenerace*

S charakterem toků v těsné blízkosti membrány souvisí i některé negativní jevy. Největším problémem je postupné snižování toku permeátu s časem. Je způsobeno koncentrační polarizací a hlavně zanášením pórů v membráně, tzv. *fouling efekt*. Pro jeho popis byla vytvořena celá řada matematických modelů výkonu (tj. průtoku permeátu). [55]

Koncentrační polarizace vzniká nahromaděním zadržovaných částic před membránou. Není-li dodržen tangenciální tok, mohou zde tyto částice vytvářet tzv. sekundární membránu (vrstva gelu, sraženiny). Proto se do prostoru nad membránou ještě vkládají různé vestavby – turbulizátory, které narušují laminární proudění. Efekt koncentrační polarizace se projevuje zejména u membránových procesů s vysokými rychlostmi toku permeátu. [56]

Zanášení membrány může být vratné nebo nevratné. V případě nevratného děje hovoříme o otravě membrány, ta bývá způsobena ionty těžkých kovů, látkami reagujícími s membránou – chlor, oxidovadla atd. U vratných dějů se membrána regeneruje za pomoci chemických činidel nebo fyzikálními metodami. Regulace toku filtrátu a koncentrace rozpuštěné látky napomáhá při použití membrán z dutých vláken omezit zanášení membrány. Pro plošné membrány se stejného efektu dosáhne diafiltrací, kdy je přiváděn další proud rozpouštědla, který vymývá z retentátu látky, které mohou procházet membránou. Objem použitého rozpouštědla odpovídá objemu získaného permeátu. Koncentrace zadržovaných látek se tak během diafiltrace nemění. [25] [26] [56]

### *Ultrafiltrace*

Ultrafiltrace patří mezi metody frakcionace založené na principu různé velikosti molekul. Je to separační metoda sloužící k oddělování makromolekulárních látek a koloidů z roztoků. Metoda objevená již na počátku dvacátého století však získala význam pro separační účely až v několika posledních desetiletích. Teprve aplikace nových typů membrán otevřela zcela nové perspektivy. Jedná se o jednoduchou metodu, kdy lze výběrem vhodné řady membrán dosáhnout rychlé frakcionace poměrně velkého množství materiálu. Ve smyslu dělicího řezu membrány ji lze provádět vzestupně i sestupně. [19]

Molekuly rozpouštědla jsou působením zvýšeného tlaku tlačeny přes membránu s přesně definovanými póry. Makromolekuly a koloidy větší než otvory v membráně neprocházejí. Využívají se speciální membrány s definovanou velikostí pórů – tzv. „cut-off“. [27]

Nejčastěji používané membránové materiály pro ultrafiltraci jsou polysulfon, polyethersulfon, polyvinylidenfluorid, polyakrylonitril, acetát celulosy, polyimid, polyetherimid, alifatický polyamid, Al a Zr keramika. [26]

V publikacích [25], [28] je zmíněno využití ultrafiltrace pro určování vazebných konstant komplexu huminová kyselina – kov.

Autoři [29] se zabývali spektroskopickou charakterizací velikostně frakcionovaných huminových kyselin izolovaných z jihomoravského lignitu (Dolnomoravský úval, důl Mír Mikulčice). Jako separační metoda byla vybrána membránová ultrafiltrace. Jako membránu

zvolili modifikovaný polyethersulfon. Nejvhodnějším prostředím pro filtraci HK přes tuto membránu bylo prostředí alkalické. V rozpouštědlech o jiném pH docházelo k vysoké adsorpci HK na membránu.

Při zkoumání vlivu pH a iontové síly na zadržení byla použita plochá membrána Amicon YM2 (dělicí rozsah 1 kDa). Zadržování huminových kyselin na membráně je téměř neměnné ve slabě kyselém či zásaditém prostředí. V prostředí silně kyselém ( $\text{pH} < 3$ ) se mohou huminové kyseliny srážet a adsorbovat na membránu. Stejně chování bylo pozorováno i při vysokých hodnotách iontové síly. [25]

Ačkoliv jsou membrány klasifikovány výrobcem podle  $M_r$ , molekuly jsou ve skutečnosti ultrafiltrací separované na základě molekulových velikostí. Vztah mezi  $M_r$  a molekulovou velikostí není jednoduchý, obzvláště v případě makromolekul, kde svou roli hraje tvar molekul a jejich ohebnost. Iontová síla a pH mohou vést ke změnám ve tvaru a tak mohou molekuly s nominálně stejnými hodnotami  $M_r$  vykazovat odchylky v chování. [28]

Záměrem práce [28] bylo mimo jiné získání  $M_r$  distribuční funkce několika vzorků komerčně připravených (Fluka) a přírodních (Montseny, Prades, Bragin, Hatton) huminových kyselin. Pro tyto účely byla vybrána metoda ultrafiltrace v kombinaci s kapilární zónovou elektroforézou (CZE). Sledovanými parametry byl tlak plynu, koncentrace vstupujícího proudu a časová závislost koncentrace HK v ultrafiltrátu. Výsledky pozorování byly následující. Tlak plynu značně ovlivňuje frakcionaci. Je třeba pracovat za optimálního tlaku pro každou membránu. Optimální tlak roste spolu s klesajícím dělicím rozsahem ( $M_r$  cut-off) membrány. Koncentrace vstupujícího roztoku by neměla být příliš vysoká.

Pro dané vzorky při konstantních hodnotách iontové síly a pH,  $M_r$  vykazovaly distribuční funkce závislost na původu huminové kyseliny. Komerčně připravený vzorek obsahoval vyšší poměr molekul o nízké relativní molekulové hmotnosti, zatímco přírodní huminové kyseliny měly vyšší zastoupení frakcí s  $M_r > 300\,000$ .

Autoři [30] rozdělili huminovou kyselinu (extrahovanou z Pahokee rašeliny) do 8 různých frakcí, které se od sebe lišily různou molekulární velikostí (<1, 1–3, 3–5, 5–10, 10–30, 30–100, 100–300 a > 300 kDa). K tomuto účelu použili hydrofilní celulózu membránu. Výsledky ukázaly, že tato metoda frakcionace je vhodná pro vysoce heterogenní směs makromolekul huminových látek, jelikož touto frakcionací získáme relativně homogenní frakce.

V práci [31] byl vzorek komerčně připravené, nepročištěné huminové kyseliny (Aldrich) frakcionován pomocí ultrafiltrace do pěti frakcí různých molekulárních velikostí (> 300 kDa, 300–100 kDa, 100–50 kDa, 50–10 kDa, 10–1 kDa). Nejprve byl nástřík veden přes membránu s největší velikostí pórů, permeát byl použit pro filtraci na následující membráně s menší velikostí pórů, zatímco retentát usušen, zvážen a uchován pro následnou IČ a NMR charakterizaci. Důraz byl kladen na posouzení odlišností v chemické struktuře a funkčních skupinách. Bylo potvrzeno, že frakce s velikostí > 100 kDa obsahují mnohem více alifatických skupin, zatímco frakce s molekulami menších rozměrů (<10 kDa) byly převážně aromatické povahy. Všechny frakce byly charakterizovány potenciometrickou titrací. Huminové kyseliny tvořené z molekul menších rozměrů mají vyšší obsah karboxylových skupin a nižší hodnoty  $\text{pK}_a$ , takže jsou silnější kyseliny. Následně byla tato nefrakcionovaná huminová kyselina podrobena purifikaci acidobazickým srážením a promýváním destilovanou vodou se snahou o odstranění iontů kovů. Bylo pozorováno, že huminové kyseliny prodělaly během purifikace acidobazickým srážením jisté chemické změny spojené převážně s úbytkem uhlíku karboxylových skupin. Tyto výsledky tak potvrzují, že je při izolaci huminových

kyselin zapotřebí aplikovat mírnější metody, aby docházelo jen k minimálním, popřípadě žádným změnám ve struktuře.

#### 2.2.4.5 Rozměrově vylučovací chromatografie

Huminové kyseliny prokazují značnou heterogenitu ve svých molekulových hmotnostech. Proto se jako další varianta frakcionace (založená stejně jako předchozí metoda ultrafiltrace na bázi různých molekulových velikostí) nabízí chromatografie.

Rozměrově vylučovací chromatografie (Size Exclusion Chromatography, zkráceně SEC) je termín zavedený pro metodu, která byla více než 30 let používána pod názvem gelová permeační chromatografie (GPC). Název „gelová permeační chromatografie“ by se měl užívat pouze pokud je porézním neadsorbujícím materiálem gel.

Tato metoda dnes velmi výrazně dominuje mezi postupy používanými ke stanovení distribucí molárních hmotností. Vzorek polydisperzního polymeru je promýván kolonou naplněnou porézními kuličkami a dělí se na složky podle velikosti molekul. Stěny pórů musí být inertní tak, aby se na nich makromolekuly neadsorbovaly. Jde tedy o rozdělovací, nikoli adsorpční chromatografii. [32]

Princip dělení spočívá v tom, že polymerhomology jsou podle svých rozměrů různou měrou schopny vstupovat do pórů, kde mohou být na krátký časový okamžik pozdrženy. Pro daný homolog definujeme rozdělovací koeficient  $K_d$  jako poměr jeho rovnovážných koncentrací v pórech a v objemové fázi (tj. v prostorech mezi zrny). Předpokládáme, že lokální rovnováha mezi oběma „fázemi“ se ustaví prakticky okamžitě. Je-li  $V_o$  celkový objem prostorů mezi kuličkami a  $V_i$  celkový objem pórů uvnitř kuliček pak eluční objem  $V_e$  (objem rozpouštědla, který musí protéci od okamžiku nástřiku kolonou, aby se frakce objevila na výstupu z kolony) je dán vztahem:

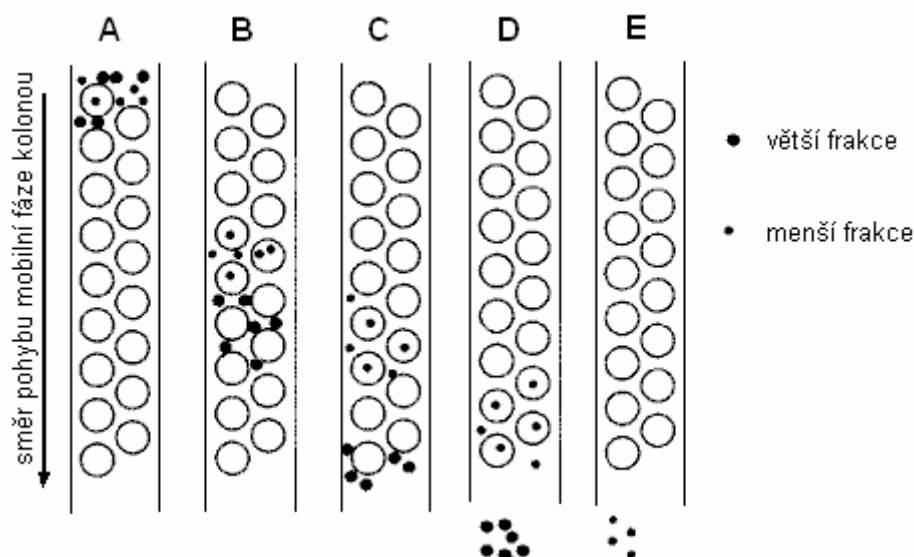
$$V_e = V_o + K_d \cdot V_i. \quad (1)$$

Nejtěžší frakce tedy vycházejí z kolony nejdříve, protože vůbec nevstupují do pórů a pouze protékají mezi zrny. Střední a menší frakce se dočasným vstupem do pórů méně nebo více zdrží a vycházejí z kolony v pořadí klesajícího rozměru částic. Situaci ilustruje obrázek (Obrázek 4) a tabulka (Tabulka III). [32]

Tabulka III: *Rozměrové vlastnosti zrn*

pro největší makromolekuly	$K_d = 0$	$V_e = V_o$
pro středně velké makromolekuly	$0 < K_d < 1$	$V_e < V_o < V_o + V_i$
pro nejmenší makromolekuly	$K_d = 1$	$V_e = V_o + V_i$

Kolony se plní porézními kuličkami z různých materiálů jako je sklo, polystyrenové gely (neboťnavé, silně zesíťované), povrchově modifikované silikagely. Pro dělení ve vodném prostředí jsou vhodné dextranové a polyakrylamidové gely. Kuličky mají průměr 5  $\mu\text{m}$  až 1 mm; průměr pórů je 5 až 500 nm.



Obrázek 4: Schéma průběhu SEC separace: A začátek separace; B malé fragmenty difundují do pórů; C separace podle velikosti hotova; D větší frakce vystupují z kolony první; E pozdržené malé frakce vystupují později

#### 2.2.4.6 Elektroforéza

Elektroforéza je metoda, která využívá schopnosti nabitých částic v elektrickém poli. Vzhledem k tomu, že rychlost pohybu částic závisí na velikosti náboje a velikosti molekuly, různě velké a různě nabitě molekuly se budou pohybovat odlišnou rychlostí. Proto můžeme elektroforézu využívat k separaci látek za účelem frakcionace huminových kyselin.[46]

Literatura také obsahuje informaci o tom, že bylo frakcionace huminových kyselin docíleno použitím elektroforézy v polyakrylamidovém gelu (PAGE). Autoři srovnávali metodu ultrafiltrace s metodou vylučovací chromatografie (SEC) a také posuzovali vhodnost kombinace uvedených technik s metodou PAGE. Jako vhodný eluent pro metodu vylučovací chromatografie se jeví Tris-HCl nebo močovina, tedy pufrů obsahující velké organické kationty. Tyto látky zabráňují adsorpci HK na Sephadex. Výsledky napověděly, že frakcionací pomocí SEC lze provést lepší separaci huminových kyselin lišících se elektroforetickou mobilitou i molekulární velikostí. Kombinace SEC-PAGE vykazuje poměrně slušný soulad mezi oběma frakcionačními systémy. Ultrafiltrace, jako metoda použitá k získání frakcí o různých molekulových velikostech může selhávat a to především kvůli interakcím rozpuštěných látek s povrchem membrány. [33]

#### 2.2.4.7 Adsorpce

Někteří autoři využili k frakcionaci adsorpčních vlastností huminových kyselin na hydrofobní pryskyřici a následně získali jednotlivé frakce pomocí pufrů o různých hodnotách pH. Jak se zvyšovala hodnota pH, jednotlivé komponenty s odpovídající vyšší hodnotou  $pK_a$  byly ionizovány a následně se desorbowały z pryskyřice. Mantoura a Riley [34] použili nepolární adsorpční pryskyřici XAD-2 v kombinaci se 4 roztoky pufru o postupně narůstajícím pH a získali tak 4 odlišné frakce. Malcolm a kolektiv [34] demonstroval lepší vlastnosti XAD-8, methyl-methakrylátové pryskyřice. MacCarthy a kolektiv resp. Thurman a Malcolm [34] generovali povolna se měnící pH gradient titrací kyseliny fosforečné hydroxidem sodným a

separovali tak huminovou kyselinu do dvou frakcí. Ve všech těchto pracích měl pH gradient minimálně jeden ostrý inflekční bod. [34]

Téměř lineární pH gradient bez inflekčních bodů se podařilo získat autorům, kteří použili univerzální pufr. Titrovaný silnou bází dal téměř lineární titrační křivku bez ostré inflektce. V tomto experimentu byly použity dvě komerčně dostupné HK (Tridom HK a Aldrich HK) a vzorek syntetické HK, připravený z hydrochinonu. Nevýhodou použitého pufru bylo, že obsahoval kyselinu octovou. Ta mohla komplikovat stanovení rozpuštěného organického uhlíku (DOC) v jednotlivých frakcích. Tato frakcionace vykazuje kontinuální průběh eluovaného materiálu bez větších výkyvů. Výhodou je, že lze libovolně volit rozsah pH, při kterém budou jednotlivé frakce sbírány.[34]

#### 2.2.4.8 Frakcionace podle pH

Základní dělení huminových látek vzniklo na bázi různé rozpustnosti. I tak jsou jednotlivé skupiny stále polydisperzními směsmi látek s odlišnými vlastnostmi, proto se nelze divit snahám o rozdělení huminových kyselin na užší frakce podle rozpustnosti při různém pH.

Autor [35] studoval termickou stabilitu a chování různých vzorků huminových kyselin extrahovaných z jihomoravského lignitu. Pro přípravu vzorků postupnou frakcionací při různých hodnotách pH byl jako pufr použit  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O} + \text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ . Navážka vzorku huminové kyseliny (HA1) byla rozpuštěna v roztoku o pH 7. Frakcionace probíhala v digestoři za laboratorní teploty a neustálého míchání po dobu 2 hodin. Následnou centrifugací došlo k oddělení nerozpuštěného zbytku vzorku HA1 od rozpuštěných huminových kyselin. Okyselením nerozpuštěného zbytku koncentrovanou HCl na pH 1–2 došlo ke koagulaci huminových kyselin. Takto připravené huminové kyseliny byly kvantitativně převedeny do směsi obsahující HCl – HF a intenzivně třepány po dobu 24 hodin, což mělo vést ke snížení anorganického podílu v huminových kyselinách. Přečištěné vzorky byly opět centrifugovány a několikrát promyty destilovanou vodou. Další použitou operací byla dialýza, která probíhala proti destilované vodě po dobu 10 dnů. Nakonec byla provedena lyofilizace vzorku. Takto vzniklá frakce působením roztoku fosforečnanů o pH 7 byla v této práci označena jako HA2. Nerozpuštěný zbytek huminových kyselin z přípravy vzorku HA2 byl rozpuštěn v roztoku o pH = 8. Další postup je shodný jako při přípravě předchozí frakce. K získání poslední frakce označené jako HA5 se použil poslední nerozpuštěný zbytek z předchozí frakce, který byl rozpuštěn v  $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$  o pH = 10. Bylo tedy připraveno 5 vzorků (pH 7, 8, 9 a 10). Termoanalytická studie těchto frakcí huminových kyselin, separovaných při různém pH potvrdila, že postupnou frakcionací původního vzorku došlo k separaci užších spekter molekul huminových kyselin. Tento fakt se na DSC křivkách projevil větším počtem a užšími tvary exotermických píků v porovnání s původním vzorkem. Rovněž termogravimetrie odhalila rozdíly ve změně hmotnostních úbytků souvisejících s jednotlivými degradačními kroky.

V referencích [3] [36] byla k frakcionaci heterogenní huminové kyseliny využita technika sekvenční pH extrakce. Byly získány čtyři odlišné frakce. Fosforečnanové pufrы se použijí pro vzorky s nižší aromaticitou, zatímco pyrofosfát nejlépe extrahuje méně kyselé molekuly s vyšším obsahem aromatických jader. Charakteristika frakcí byla provedena pomocí HPSEC (High Pressure Size Exclusion Chromatography) a prokázala, že polymerní teorie, uplatňující kovalentní vazby mezi molekulami huminových látek je jen málo pravděpodobnou. Naopak podpořila domněnku, že dochází k náhodnému samosdružování relativně malých molekul,

kteří jsou vzájemně vázány především slabými disperzními silami (van der Waalsovy,  $\pi$ - $\pi$  a CH- $\pi$  interakce) a vodíkovými vazbami.

### 2.2.5 Rozpustnost huminových kyselin

Rozpustnost je obecně schopnost látek rozpouštět se v rozpouštědle, nebo-li přecházet s rozpouštědlem v roztok.

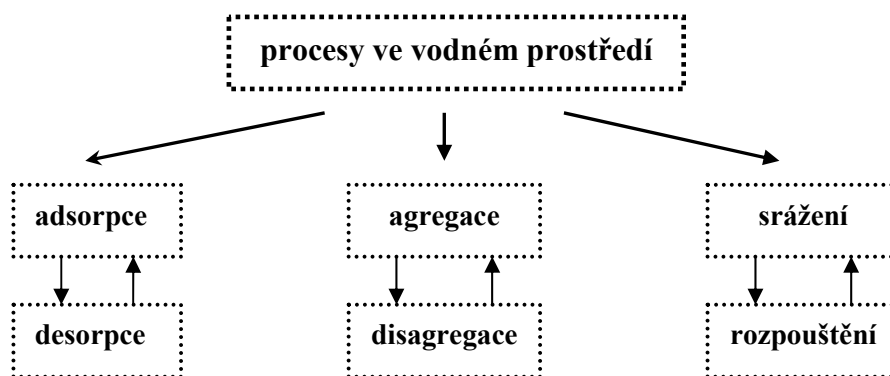
Látku můžeme z hlediska rozpustnosti charakterizovat rozpouštědly, ve kterých se látka rozpouští nebo mírou rozpustnosti látky v daném rozpouštědle. Rozpustnost látky v daném rozpouštědle je dána především polaritou rozpouštědla a rozpouštěné látky. Obecně platí, že polární látky se rozpouštějí v polárních rozpouštědlech (např. NaCl ve vodě), nepolární látky se naopak rozpouštějí v nepolárních rozpouštědlech (např. olej v benzínu).

Rozpustnost probíhá za dynamické rovnováhy. Je výsledkem dvou současně probíhajících protichůdných procesů: rozpouštění a srážení.

Huminové látky se v půdách a usazeninách vyskytují v několika formách [37]:

- jako adsorbované molekuly či shluky molekul na povrchu nerostů,
- v podobě pevných částic HL a jejich agregátů,
- jako rozpuštěné molekuly ve vodní fázi.

Rozpuštěné molekuly jsou pohyblivé a tudíž jsou celkem snadno přenášeny proudem vody, zatímco adsorbované molekuly a pevné prachové částice jsou méně pohyblivé a mají tendenci udržet se na půdní či sedimentární matici. Rozpustnost huminových látek tedy hraje značnou roli pro distribuci a přenos polutantů. Huminové látky rozpuštěné ve vodě budou zvyšovat pohyblivost polutantů na sebe vázaných, zatímco pevné půdní huminové látky budou jejich pohyblivost snižovat. Diagram (Obrázek 5) zobrazuje tři dvojice protichůdných procesů, které vedou k mobilizaci těchto látek ve vodním prostředí. Podrobnější studium adsorpce-desorpce; agregace-disagregace; srážení-rozpouštění je nezbytně nutné pro pochopení mechanismů sloužících k distribuci polutantů. [37]



Obrázek 5: Procesy probíhající ve vodním prostředí

Huminové látky jsou obecně definovány a rozděleny do podskupin na základě rozpustnosti ve vodním prostředí. Huminové kyseliny jsou podle této definice za acidických podmínek frakcí nerozpustnou.

Izolace huminových kyselin z přírodních zdrojů je založena na okyselení alkalického extraktu až do pH 1–2, kdy dojde k jejich vysrážení. Izolovaný preparát je pak složen z molekul s různou molekulovou hmotností, které se zcela nepochybně budou lišit i ve své rozpustnosti ve vodném prostředí.

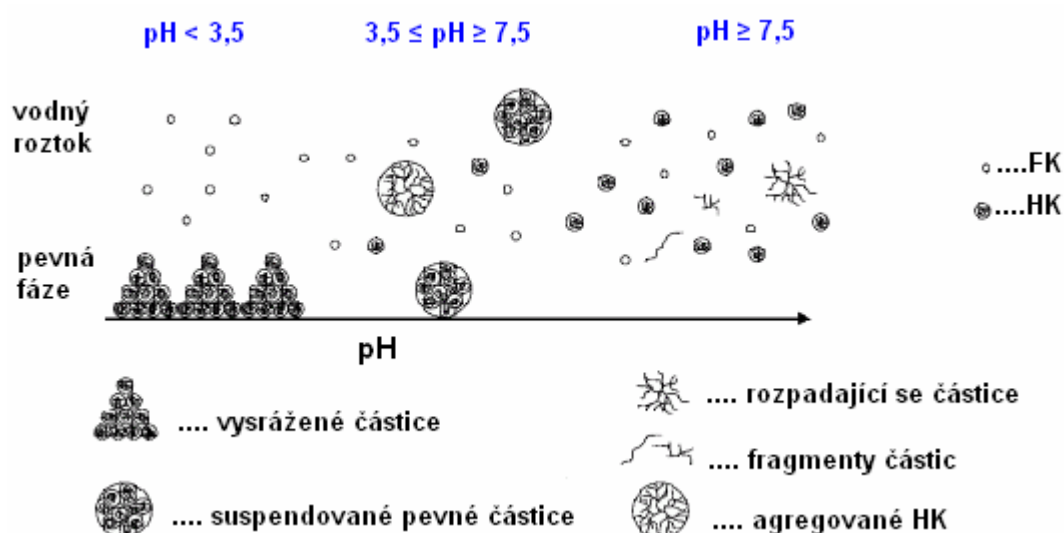
Přestože se huminové kyseliny sráží z vodného roztoku při takto nízkých hodnotách pH, neznamená to, že jsou jednoduše rozpustné ve vodě při neutrálním pH. Huminové kyseliny jsou součástí přírodních celků, které odolávají atakům vody po celá geologická období, aniž by docházelo k jejich rozpuštění. Rozpustnost silně závisí od zdroje huminových kyselin. Obzvláště ty huminové kyseliny, které se získávají z uhlí jsou ve vodě jen velmi těžko rozpustné. [38]

Na druhé straně jsou huminové kyseliny v přírodě nacházeny také rozpuštěné ve vodě. Chceme-li proto porozumět funkci huminových kyselin v přírodě, musíme se obeznámit i s rozpustností huminových kyselin ve vodném prostředí.

Bohužel, kromě samotné definice huminových kyselin, založené na rozpustnosti, nebylo chování izolovaných pevných vzorků ve vztahu k rozpustnosti doposud plnohodnotně prošetřeno. [38]

V práci [44] byly huminové kyseliny rozděleny na užší frakce rozpouštěním v pufrech o různém počátečním pH. Výsledky byly překvapující a do jisté míry v rozporu s původním předpokladem, podle kterého měla rozpustnost růst se zvyšujícím se pH. Jenže výsledky ukázaly, že rozpustnost při počátečním pH = 4 je vyšší než při pH 6–8 a i při pH 2 se rozpustí jisté množství vzorku. Při studiu rozpustnosti huminových kyselin ve vodě bylo zjištěno, že za daných podmínek existuje určitá rozpustná frakce huminových kyselin. Zajímavé je, že jakmile je tato frakce vymyta, vzorek se již dále nerozpouští. [1]

Sekundární a terciární struktura HL ovlivňuje biogeochemické procesy. Huminové látky se mohou vyskytovat jak v rozpuštěné, tak v koloidní a vysrážené podobě (Obrázek 6). Hlavní vliv na stav HL má pH, koncentrace HL a koncentrace iontů. Reaktivita huminových kyselin, resp. tendence jejich částic rozpouštět se závisí na typu, počtu a pevnosti vazeb, které drží molekuly huminových kyselin v pevné fázi a také na schopnosti rozpuštěných iontů a molekul oslabovat či zesilovat tyto vazby.



Obrázek 6: Podoba huminových látek ve vodném prostředí, upraveno podle Bergelin (2007) [57]

Když jsou pevné částice vnořeny do vodného roztoku, jejich nejbližší molekuly jsou snadněji přístupné vodě, rozpuštěným iontům a molekulám a tak může uvolňováním molekul do roztoku začít proces rozpouštění. Rozpouštění tedy probíhá od povrchu částic, ze kterého se postupně uvolňují rozpuštěné molekuly, povrch se posunuje směrem ke středu částice.

Rozpustností huminových kyselin v pevném stavu ve vodě se zabývá reference [38]. Mechanismus rozpustnosti HK ve vodném prostředí není zdaleka tak jednoduchý v porovnání s tím, jak snadno dochází k peptizaci čerstvé sraženiny HK při promývání vodou. Rozpustnost pevných huminových částic ve vodě je mnohem komplikovanější než rozpustnost jiných těžko rozpustných pevných látek. Proto byl autory navržen vícestupňový mechanismus, definující vzájemné působení pevných HK s vodou. Teorie se opírá o skutečnost, že pouze určitá část pevné HK je rozpustná ve vodě v daných podmínkách a pokud je odstraněna, zbylá HK zůstává prakticky nerozpustnou. Pevné, nedisociované HK se mohou ve vodném roztoku částečně rozpouštět a jejich disociace je předmětem teprve dalšího kroku mechanismu. Tato teorie byla potvrzena v další práci [1], kde bylo vyšetřováno chování 4 vzorků (2 různě připravené vzorky z jihomoravského lignitu, vzorek IHSS Fluka a vzorek IHSS Leonardite).

Kinetika rozpouštění huminových kyselin, extrahovaných a čištěných dle procedur IHSS byla studována v sérii experimentů pomocí UV/VIS spektrometrie. Byly zkoumány účinky pH, teploty, rychlosti míchání a koncentrace kationtů kovů alkalických zemin na změnu rychlosti kinetiky. Výsledky naznačují, že míra rozpustnosti studované huminové kyseliny závisí především na pH. Při nízkém pH je mnoho fenolických a karboxylových skupin ve své protonované formě. Mezi molekulami proto vzniká velké množství vodíkových můstků. Navíc protonace oslabuje elektostatické repulse mezi molekulami. Zmiňované efekty jsou příčinou slabé rozpustnosti při nízké hodnotě pH. S rostoucí hodnotou pH však rozpustnost roste. Mechanismus rozpouštění úzce souvisí s deprotonací karboxylových a fenolických funkčních skupin. Výsledkem deprotonace je rozštěpení některých vodíkových vazeb, které v pevném stavu drží molekuly huminových kyselin pohromadě. Naopak dochází k růstu elektostatických repulsních sil mezi molekulami vyskytujícími se na povrchu. Takové molekuly jsou pak mnohem náchylnější k odtržení. [37]

Rozpustnost taktéž stoupá, je-li zvýšena teplota a rychlost míchání. Zdánlivá aktivační energie reakce a účinek míchání spolu s vlivem teploty naznačují, že se jedná o proces řízený jednak rychlostí míchání, jednak transportem rozpuštěné látky od částice do roztoku. Míra rozpustnosti při konstantním pH silně závisí na koncentraci dvojmocných kationtů jako je  $\text{Ca}^{2+}$ . Se zvyšující se koncentrací těchto kationtů se rychlost rozpouštění snižuje.  $\text{Ca}^{2+}$  se dokáže velmi rychle adsorbovat na povrch částic, čímž snižují elektostatickou repulsi mezi jednotlivými molekulami huminových kyselin. Kationy  $\text{Ca}^{2+}$  také mohou působit jako můstky mezi dvěma sousedními molekulami, čímž zvyšují přitažlivé síly. Tímto přispívají ke snižování rozpustnosti. [37]

Vliv dvojmocných kationtů na rozpustnost huminových kyselin zkoumal i Kipton. Nejdříve rozpustil vzorek huminových kyselin v synteticky připravené mořské vodě bez obsahu  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ . Když přidal tyto kationy ve formě chloridů, zjistil, že rozpustnost takto obohacených huminových kyselin dosahovala asi jen 60 % původní rozpustnosti. Stejný autor studoval rozpustnost huminových kyselin v  $\text{KNO}_3$  jako funkci iontové síly a pH a došel k závěru, že relativní účinek iontové síly se projevuje spíše při nižších hodnotách pH. Při pH 3 dosahovala rozpustnost v 0,6 M  $\text{KNO}_3$  60% rozpustnosti v 0,1 M  $\text{KNO}_3$ , zatímco při pH 10,8 již vzrostla na 92 %. [58]

Další z nemnoha příspěvků na téma rozpustnosti se zabývá tím, jaký vliv mají na kinetiku rozpustnosti HK organické monokarboxylové kyseliny. Nízkomolekulární organické kyseliny jsou všudypřítomnou složkou životního prostředí. Organické kyseliny, vyskytující se v půdách jsou především rostlinného a mikrobiálního původu, ovšem do půd a přírodních vod se mohou dostávat i kontaminací z průmyslových odpadů (potravinářský průmysl). Běžně nacházená koncentrace alifatických monokarboxylových kyselin (kyselina mravenčí, octová, propionová, máselná, valerová, mléčná) se v půdě pohybuje v rozmezí 0–1 mM. Koncentrace dikarboxylových a trikarboxylových kyselin jako jsou šťavelová, citronová, jablečná, jantarová, vinná je obvykle 0–50  $\mu\text{M}$ . [39]

Míra rozpustnosti pevných částic huminových kyselin je značně ovlivněna přítomností monokarboxylových kyselin v poměrně širokém rozsahu pH (4–10). Například při pH 7, lze zvýšit rozpustnost přítomností propionové kyseliny až na třicetnásobek rozpustnosti čisté huminové kyseliny bez jakéhokoliv přídavku. Schopnost monokarboxylových kyselin zvýšit rozpustnost huminových kyselin je v pořadí kyselina mravenčí < kyselina octová < kyselina propionová. Rozpouštění lze považovat za proces řízený sorpcí. Je iniciován navázáním karboxylových skupin na povrch částic. Touto sorpcí vznikají na povrchu jisté meziproducty, které oslabují interakce mezi molekulami huminových kyselin na povrchu částic. Po úvodním rychlém kroku následuje druhý o poznání pomalejší – transfer molekul huminových kyselin do objemu roztoku. Tento krok je limitujícím pro rychlost celého procesu. [39]

Prezentované výsledky mohou mít značný význam pro environmentální procesy. Za jistých podmínek jako je nízké pH, nízká koncentrace karboxylových kyselin, vysoká koncentrace iontů kovů mohou molekuly huminových kyselin, vytvářející pevné agregáty v půdě nebo shlukující se na povrchu mineralů, prokazovat velmi nízkou rozpustnost, přestože by po termodynamické stránce mohly být rozpustné. Takto nízká rozpustnost omezuje mobilitu molekul huminových kyselin a tím pádem i navázaných polutantů. Naopak podmínky zvyšující míru rozpustnosti (vysoké pH, vysoká koncentrace karboxylových kyselin, nízká koncentrace iontů kovů) rychle zvyšují mobilitu. [39]

Účinek monokarboxylových kyselin na strukturu a vlastnosti huminových látek byl zkoumán také na jiném pracovišti. Piccolo použil výše zmiňovanou vysokotlakou rozměrově vylučovací chromatografii (HPSEC). Podle něj jsou zdánlivé vysokomolekulární huminové látky v roztoku pouhými agregáty či shluky malých molekul, které jsou drženy pohromadě hydrofobními silami. A právě přídavek jednoduché organické kyseliny způsobí přerušení těchto vazeb vedoucích k disagregaci a vzniku relativně malých částic. [39]

## **2.3 Metody charakterizace huminových kyselin**

### **2.3.1 UV/VIS spektrometrie**

Ultrafialová a viditelná spektroskopie je klasická metoda analytické chemie patřící mezi elektromagnetické spektroskopické metody.

Podstatou ultrafialové a viditelné spektroskopie je absorpce ultrafialového a viditelného záření v oblasti od 200 do 800 nm zředěnými roztoky molekul. Při absorpci dochází k excitaci valenčních elektronů, které jsou součástí molekulových orbitalů. Molekula se za běžných podmínek nachází na základní hladině a její elektrony nejsou excitovány. Přijme-li molekula energii ve formě fotonů, která odpovídá rozdílu mezi jejím základním a excitovaným stavem, projeví se tato skutečnost přechodem elektronu z některého obsazeného orbitalu v základním

stavu na některý neobsazený orbital. Excitace různých typů elektronů vyžaduje rozdílná energetická kvanta. Jednoduše řečeno, ne všechny typy elektronových přechodů jsou možné. [40]

Ultrafialová a viditelná spektra se doplňkově využívají k identifikaci neznámé organické látky a řešení strukturních otázek porovnáním změřeného průběhu spektra se známými spektry. Spektra jsou jednoduchá a poskytují pro identifikaci látky omezené množství informací. Aplikace této metody však vhodně doplňuje informace z měření infračervených spekter, NMR a hmotnostních spekter. [41]

### 2.3.2 IR spektrometrie

Infračervená spektroskopie je analytická technika určená především pro identifikaci a strukturní charakterizaci organických sloučenin a také pro stanovení anorganických látek.

Podstatou metody je absorpce infračerveného záření při průchodu vzorkem, při níž dochází ke změnám rotačně vibračních energetických stavů molekuly v závislosti na změnách dipólového momentu molekuly. Infračervené záření je elektromagnetické záření v rozsahu vlnových délek 0,78–1000 mm, odpovídajících rozsahu vlnočtů 12800–10 cm<sup>-1</sup>. Celou oblast ještě rozdělujeme na blízkou (13000–4000 cm<sup>-1</sup>), střední (4000–200 cm<sup>-1</sup>) a vzdálenou infračervenou oblast (200–10 cm<sup>-1</sup>). Nejpoužívanější je střední oblast. [42]

Analytickým výstupem je infračervené spektrum, které je grafickým zobrazením funkční závislosti energie, většinou vyjádřené v procentech transmitance (T) nebo jednotkách absorbance (A) na vlnové délce dopadajícího záření. Závislost energie na vlnové délce je logaritmická, proto se používá vlnočtet, který je definován jako převrácená hodnota vlnové délky a tedy uvedená závislost energie na vlnočtu bude funkcí lineární. Absorpční pásy mající vrcholy v intervalu 4000–1500 cm<sup>-1</sup> jsou vhodné pro identifikaci funkčních skupin (např. –OH, C=O, N–H, CH<sub>3</sub> aj.). Pásy v oblasti 1500–400 cm<sup>-1</sup> jsou nazývané oblastí „otisku palce“ (fingerprint region). Pomocí „search programů“ a digitalizovaných knihoven infračervených spekter je možno identifikovat neznámou analyzovanou látku. V současné době se objevují software, které umožňují simulovat infračervené spektrum organických molekul. [42]

Důležitou skutečností je relativní nezávislost vibrací jednotlivých funkčních skupin na ostatních molekulových vibracích. V důsledku toho mají různé funkční skupiny relativně stálé vibrační frekvence, a to bez ohledu na to, v jakých látkách jsou přítomny. [40]

Fourierova transformace přinesla i v oblasti IR spektroskopie zjednodušení a zkvalitnění měření. FTIR spektrometry jsou přístroje pracující na principu interference spektra, které měří na rozdíl od disperzních přístrojů interferogram modulovaného svazku záření po průchodu vzorkem. Při měření dopadá na detektor vždy celý svazek záření. Takové uspořádání umožňuje i experimenty, při nichž dochází k velkým energetickým ztrátám. FTIR spektrum nabízí mnohem vyšší rozlišení než klasické IR spektrum. [42]

Popsaná metoda nese cenné informace o přítomných funkčních skupinách a molekulové struktuře a je tedy využívána i pro charakterizaci huminových látek. IR spektroskopie je jako jiné optické spektroskopie kvantitativní technika, která se řídí Lambert-Beerovým zákonem a dovoluje kvantitativní srovnání specifických vazeb absorbujících v IR oblasti mezi rozdílnými huminovými látkami. FT-IR technika poskytuje informace podobné jako NMR spektroskopie, avšak FT-IR vyžaduje daleko menší množství vzorku a kratší měřicí čas a proto je tato technika velmi vhodná pro zjišťování vlastností a struktury huminových látek. [43]

### 3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

#### 3.1 Použité přístroje a chemikálie

K experimentům byly použity následující chemikálie:

humínové kyseliny,  
kyselina chlorovodíková 35%,  
hydroxid sodný,  
kyselina fosforečná 85%,  
kyselina octová 99,8%,  
kyselina boritá,  
hydrát octanu vápenatého,  
bromid draselný,  
mili-Q voda,  
deionizovaná voda,

a přístroje:

spektrofotometr UV/VIS (Hitachi U 3300),  
spektrofotometr FT-IR (Nicolet impact 400),  
pH metr (Mettler Toledo),  
automatická byreta,  
ultracentrifuga (Rotina 46 R),  
CHNSO Microanalyser Flash 1112 (ÚSMH AVČR Praha),  
TG analyzátor Q500.

Tabulka IV: *Elementární složení jihomoravského lignitu [62]*

složka	hmotnostní %
voda	48–50
popel	11,6–13,2
hořlavina	39,1–40,3
vodík	2,15
uhlík	25,91
kyslík	10,92
síra (celková)	0,81
síra (organická)	0,48
síra (pyritová)	0,27
dusík	0,32
halogenidy	<0,01

#### 3.2 Příprava huminových kyselin

Pro experimentální část této práce byly využity huminové kyseliny extrahované z jihomoravského lignitu. Tabulka (Tabulka IV) uvádí elementární složení jihomoravského lignitu.

Lignit byl po dobu 12 hodin míchán s 0,5 M NaOH v poměru 20 g na 1 dm<sup>3</sup>. Vzniklá suspenze byla ponechána v klidu přes noc a druhý den byl slit roztok nad pevnou fází a následně okyselen 20% HCl až do pH 1. Pevný podíl byl zalit opět 1 dm<sup>3</sup> extrakčního roztoku, který byl po 1 hodině míchání slit a okyselen stejným způsobem. Z obou takto

získaných roztoků, nechaných přes noc v lednici se vysrážely huminové kyseliny. K jejich separaci od roztoku bylo použito odstřeďování ( $4000 \text{ min}^{-1}$ ), poté byly huminové kyseliny několikrát promyty vodou a centrifugovány do vymytí  $\text{Cl}^-$  iontů a vysušeny v sušárně při  $50 \text{ }^\circ\text{C}$ .

### 3.3 Frakcionace huminových kyselin

Frakcionace huminových kyselin byla provedena metodou postupné frakcionace podle pH. Ta spočívá v tom, že se huminové kyseliny rozpouští v pufru o daném pH (v určitém poměru). Nerozpuštěná frakce HK se použije v dalším kroku pro rozpouštění v pufru o nejbližším vyšším pH. V každém dalším roztoku je tedy rozpouštěno menší množství HK než v roztoku předcházejícím.

K frakcionaci byl použit univerzální pufr, skládající se z kyseliny fosforečné, kyseliny octové, kyseliny borité a hydroxidu sodného.

Do  $2 \text{ dm}^3$  roztoku o  $\text{pH} = 2$  bylo přidáno  $40 \text{ g}$  huminové kyseliny. Takto vytvořený roztok o koncentraci  $20 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$  byl po dobu 48 hodin protřepáván v uzavřené nádobě. Po usazení nerozpuštěné části byl roztok nad ní opatrně slit. Tento roztok obsahující rozpuštěnou huminovou kyselinu byl analyzován UV/VIS spektroskopií a následně z něj byly okyselením pomocí 35% HCl vysráženy huminové kyseliny. Vysrážené huminové kyseliny byly zfiltrvány, promyty, vysušeny při  $50 \text{ }^\circ\text{C}$ , zváženy a použity pro další měření.

Nerozpuštěný podíl byl vysušen při  $50 \text{ }^\circ\text{C}$ , zvážen a použit jako výchozí množství pro rozpouštění v roztoku o nejbližším vyšším pH. Tímto způsobem byla postupně vytvořena série roztoků o  $\text{pH} 2, 4, 6, 8, 10$  a  $12$ .

### 3.4 Použitá instrumentální metodika

#### 3.4.1 Ultrafialová a viditelná spektroskopie

Vzorky byly do přístroje vkládány v křemenných kyvetách o tloušťce  $10 \text{ mm}$ , propustných pro ultrafialovou i viditelnou oblast elektromagnetického záření v rozmezí vlnových délek  $200\text{--}800 \text{ nm}$ .

Byly měřeny:

- frakce huminových kyselin frakcionovaných postupnou frakcionací v pufrech při  $\text{pH} 4, 6, 8, 10, 12$ ,
- vodné roztoky, získané 24h vytřepáváním vzorku frakcí huminových kyselin získaných *postupnou frakcionací* (rozpuštěné při  $\text{pH} 6, 8, 10, 12$ ; nerozpuštěný zbytek při  $\text{pH} 12$  a vzorek původní huminové kyseliny), pro každou takovou frakci byly připraveny vodné suspenze o koncentracích  $4, 12, 20, 28$  a  $40 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$ ,
- vodné roztoky, získané 24h vytřepáváním vzorku frakcí huminových kyselin získaných *přímou frakcionací* (rozpuštěné při  $\text{pH} 8, 10, 12$ ), pro každou takovou frakci byly připraveny vodné suspenze o koncentracích  $4, 12, 20, 28$  a  $40 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$ ,
- frakce huminových kyselin v  $0,1 \text{ M NaOH}$ , získané *postupnou frakcionací* (rozpuštěné při  $\text{pH} 6, 8, 10, 12$ ; nerozpuštěný zbytek při  $\text{pH} 12$  a vzorek původní huminové kyseliny).

Všechny vzorky byly do kyvet protlačeny přes 20 µm membrány tak, aby se zabránilo při měření přítomnosti nerozpuštěných částic, které by mohly absorpční zkreslit.

Vzorky byly měřeny v celém rozsahu vlnových délek přístroje, a to 200–800 nm. Z naměřených spekter byly odečítány absorbance odpovídající vlnovým délkám 280, 400, 465, 600, 665 nm.

### 3.4.2 Infračervená spektroskopie

Spektra byla měřena v pevné fázi s využitím KBr, jehož výhodou oproti Nujolu při měření pevných vzorků je fakt, že je pro IR záření zcela transparentní. Nevýhodou spekter měřených v tabletě KBr, je že KBr je silně hygroskopický, takže bez ohledu na strukturu studované látky nacházíme ve spektrech pásy odpovídající O–H absorpcím. Pro minimalizaci tohoto efektu, byl KBr vždy žíhán.

Při přípravě tablet se v achátové misce smíchaly a důkladně zhomogenizovaly asi 2 mg huminové kyseliny s 200 až 300 mg KBr a ve speciálním lisu byly vytvořeny tablety, které se vkládaly přímo do spektrometru.

Bylo proměřeno pozadí vzorku, tzn. tableta z čistého KBr bez huminové kyseliny a získána spektra frakcí rozpuštěných při pH 4, 6, 8, 10, 12, původní huminové kyseliny (P) a frakce huminové kyseliny nerozpuštěné při pH 12 (N).

### 3.4.3 Titrace ke stanovení karboxylové kyselosti

V této práci použitá metoda octanu vápenatého patří mezi nejběžnější metody stanovení obsahu karboxylových skupin v huminových kyselinách. [47]

Cílem této techniky je převést komplexní směs kyselin v huminových látkách na ekvivalentní množství kyseliny octové podle rovnice:



Principem metody je tedy to, že vodíky karboxylových skupin nahradí vápenaté ionty octanu a vzniklá kyselina octová se pak titruje roztokem hydroxidu sodného o známé koncentraci. [8]

Byl připraven 2 M roztok monohydrátu octanu vápenatého. Do 100 ml Erlenmayerovy baňky bylo naváženo 50 mg všech získaných frakcí huminových kyselin (rozpuštěných při pH 4, 6, 8, 10, 12, nerozpuštěné frakce při pH 12 a původní huminové kyseliny), nepipetováno 50 ml roztoku octanu vápenatého. Parafilmem uzavřené baňky byly poté 24 hodin protřepávány.

Po 24 hodinách byl obsah Erlenmayerových baňek přefiltrován přes skládaný filtr do 100 ml odměrných baňek při kvantitativním vypláchnutí destilovanou vodou a následném promývání na filtru. Nakonec byly odměrné baňky doplněny deionizovanou vodou po značku.

Na titraci bylo vždy odpipetováno 25 ml z odměrné baňky a pomocí automatické byrety byl vzorek titrován 0,1 M NaOH. Pro každou frakci byly provedeny tři titrace. Titrován byl i slepý pokus, který byl připraven stejně jak je popsáno, pouze bez navážky huminových kyselin.

Spotřeba titračního činidla byla poté odečítána při pH 9,8.

Obsah karboxylů byl vypočten z rozdílu mezi spotřebou standardního roztoku při titraci vzorku huminové kyseliny a slepého vzorku.

## 4 VÝSLEDKY A DISKUSE

### 4.1 Charakterizace původních huminových kyselin

Původní huminové kyseliny z jihomoravského lignitu použité pro frakcionaci byly charakterizovány pomocí elementární analýzy (CHNSO Microanalyser Flash 1112) (Tabulka V). Zastoupení jednotlivých prvků odpovídá údajům publikovaným pro lignitické huminové kyseliny. [60] Protože po izolaci huminových kyselin nebyl zařazen žádný purifikační proces, byl obsah popela ve vzorku poměrně vysoký (Tabulka VI). Součástí práce je mimo jiné ověřit, jaký má použitý postup frakcionace vliv na čistotu získaných vzorků.

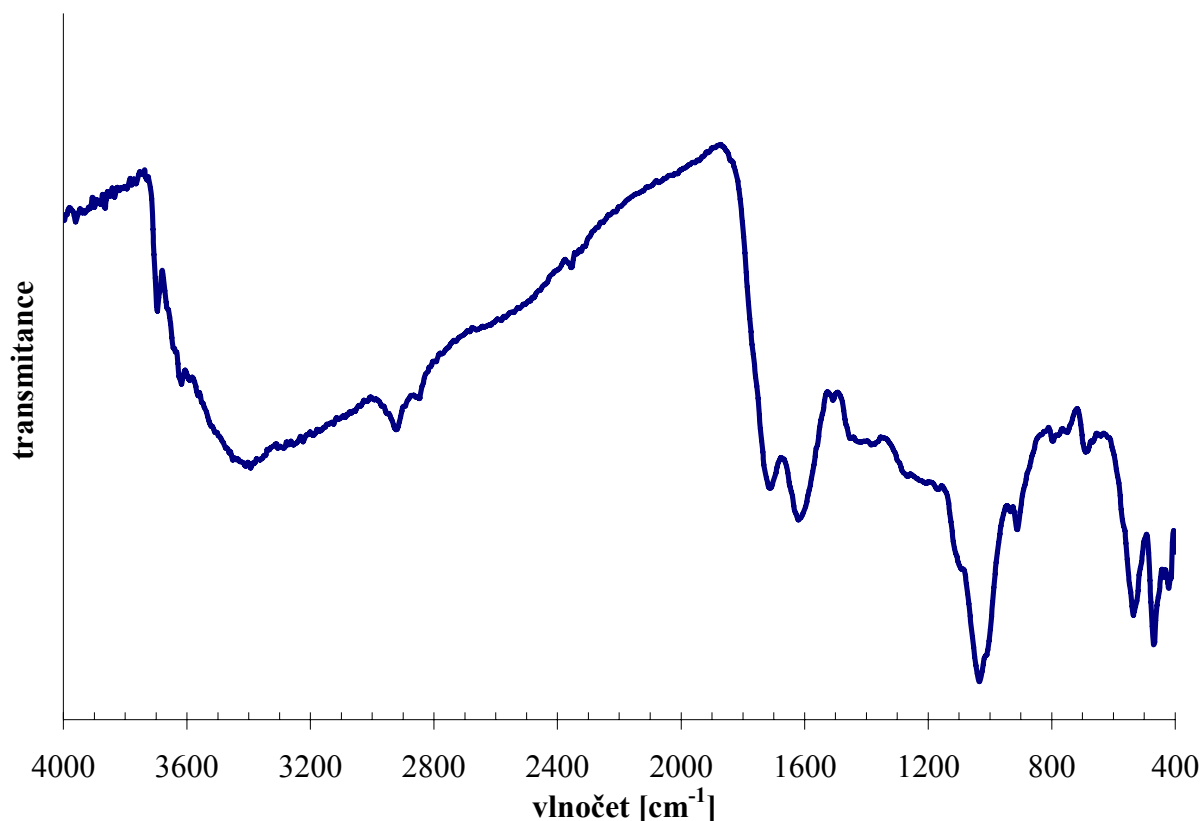
Tabulka V: *Elementární složení původní huminové kyseliny (at. % vztažena na suchý vzorek bez popela)*

	C	H	O	N	S	H/C	O/C
at. %	40,09	41,22	16,77	1,53	0,39	1,03	0,42

Tabulka VI: *Obsah vlhkosti a popela původní huminové kyseliny*

	vlhkost	popel
hm. %	4,79	30,20

FT-IR spektrum původní HK je znázorněno na obrázku (Obrázek 7). V rozmezí  $3600\text{--}3000\text{ cm}^{-1}$  se nachází široký pás, který přísluší valenčním vibracím  $\text{--OH}$  skupin spojených vodíkovými můstky. Tento pás je natolik široký, že překrývá některé další důležité prvky spektra. Pozorovaná oblast pásů  $3000\text{--}2800\text{ cm}^{-1}$  přísluší symetrickým a antisymetrickým valenčním vibracím skupin  $\text{--CH}_2\text{--}$  a  $\text{--CH}_3\text{--}$ . Intenzita těchto pásů je však nízká, zřejmě kvůli částečnému překryvu pásem  $\text{--OH}$  vibrací. Nelze je přesněji přiřadit také v důsledku polymorfního zastoupení uvedených skupin v různých molekulárních formách. Soubor absorpčních pásů mezi  $1800\text{--}1700\text{ cm}^{-1}$  patří valenčním vibracím karboxylové funkční skupiny karboxylů a esterů, pás mezi  $1700\text{--}1600\text{ cm}^{-1}$  může patřit zmíněným skupinám  $\text{C=O}$ , ale také může patřit deformačním vibracím  $\text{--NH}_2$  skupin ve struktuře aminokyselin. Valenční vibrace  $\text{--NH}_2$  skupin, běžně se vyskytující v oblasti  $3450\text{--}3250\text{ cm}^{-1}$  jsou v analyzovaném vzorku opět překryty významným pásem hydroxylových skupin. Dále můžeme v oblasti  $1500\text{--}1350\text{ cm}^{-1}$  vidět deformační vibrace  $\text{--CH}_2$  skupin a spřažené valenční vibrace  $\text{C--O}$  vazeb s rovinnými deformačními vibracemi  $\text{O--H}$  vazeb patřící karboxylovým skupinám. Absorpce v rozmezí  $1350\text{--}1200\text{ cm}^{-1}$  indikuje přítomnost ketonických a esterových struktur a při  $1200\text{ cm}^{-1}$  se projevuje deformační vibrace fenolových skupin. Ostrý pík, který lze charakterizovat vlnočtem  $1020\text{ cm}^{-1}$  náleží  $\text{C--O--C}$  vazbám v anhydridech a esterech nebo bývá připisován vazbě  $\text{Si--O}$  a jeho přítomnost napovídá nečistotám ve vzorku.



Obrázek 7: FT-IR spektrum původního vzorku huminových kyselin (P)

## 4.2 Postupná frakcionace huminových kyselin

Metoda postupné frakcionace huminových kyselin prokázala, že rozpustnost těchto látek při nízkém pH je velmi nízká (Tabulka VII). Při pH 2 (frakce 1) se nerozpustilo žádné množství huminové kyseliny, při pH 4 (frakce 2) bylo toto množství tak malé, že se po vysrážení pomocí HCl do pH 1 nepodařilo huminovou kyselinu kvantitativně získat. První hmatatelný výtěžek rozpuštěné frakce postupnou frakcionací byl získán až při rozpouštění při pH 6 (frakce 3) a dosahoval pouze 1 %. Proto byl frakcionovaný nerozpouštěný podíl opětovně rozpouštěn v pufru o stejném pH (pH 6) a získaný podíl rozpuštěné frakce (frakce 3<sup>\*</sup>) byl tentokrát zhruba desetinásobně vyšší (dosahoval více než 10 % z rozpouštěného množství). Zde se pravděpodobně projevil efekt pozorovaný již při přímém rozpouštění původní HK v pufrách o různém pH, kde byly při použití kyselých pufrů získány velmi malé výtěžky a nerozpouštěné zbytky byly k dalšímu rozpouštění ve vodě mnohem rezistentnější. S postupným zvyšováním pH použitého pufru tato rezistence postupně klesala, až při pH 12 bylo dosaženo extrémně vysoké rozpustnosti zbytku. Vyšší účinnost opětovného rozpouštění při pH 6 odpovídá tedy dřívějším výsledkům získaným pro stejné HK [59]. Téměř 36,5% rozpustnost byla zaznamenána při rozpouštění v pufru o pH 8 (frakce 4). Překvapivě nižší procentuelní výtěžek (cca 28 %) byl získán frakcionací při další postupné hodnotě pH 10 (frakce 5). Spíše než nízké rozpustnosti při pH 10, lze tento fenomén přisoudit vyšší rozpustnosti v pufru o pH 8, což by mohlo být způsobeno dvakrát prováděnou frakcionací huminové kyseliny v pufru o pH 6, čímž mohlo dojít k nepřímému narušení struktury huminové kyseliny, která se projevila zdatelně vyšší tendencí rozpouštět až v pufru o dalším postupném pH, tedy pH 8.

Nejvíce alkalické prostředí pH 12 (frakce 6) prokázalo jednoznačně nejvyšší schopnost rozpouštět huminové kyseliny. Výtěžek rozpuštěné frakce v pufru o pH 12 dosáhl téměř 47 %.

U všech rozpuštěných frakcí došlo po 48 hodinách protřepávání a následném odstání k poklesu pH. Jednotlivé výtěžky a hodnoty pH před a po frakcionaci jsou vyneseny v tabulce (Tabulka VII).

Nerozpuštěný zbytek po frakcionaci při pH 12 vykazoval před vysušením gelovité chování. Po vysušení při 50 °C v sušárně byly pozorovány lesklé částice s bílým povlakem. (Příloha 2)

Tabulka VII: *Výtěžky frakcionace a závislost pH na rozpustnosti*

označení frakce	pH pufru před frakcionací	pH pufru po frakcionaci	podíl rozpuštěné HK (hm. %)
1	2,09	2,03	–
2	4,17	4,01	–
3	5,88	5,86	0,98
3*	5,97	5,61	10,73
4	7,96	7,46	36,37
5	9,99	9,38	28,27
6	11,95	11,78	46,65

Interesantní je porovnání s metodou přímé frakcionace. Součtem všech dílčích výtěžků (frakce 3, frakce 3\*, frakce 4, frakce 5, frakce 6), které byly získány postupně až do pH 12 získáváme téměř 88,5% výtěžnost z původního množství. Metodou přímé frakcionace v práci [59] bylo při pH 12 rozpuštěno jen 56,6 % původních 40 g HK. Součtem výtěžků všech frakcí postupně rozpuštěných při pH ≤ odpovídajícímu pH frakce připravené přímou frakcionací byla ve všech případech, kdy byl evidován hmatatelný výtěžek, získána vyšší výtěžnost. Takovéto porovnání je patrné z tabulky (Tabulka VIII).

Tabulka VIII: *Srovnání výtěžků diskutovaných metod frakcionace (uvedené hodnoty postupné frakcionace byly vypočteny ze součtu všech výtěžků získaných při odpovídající nebo nižší počáteční hodnotě pH použitého pufru)*

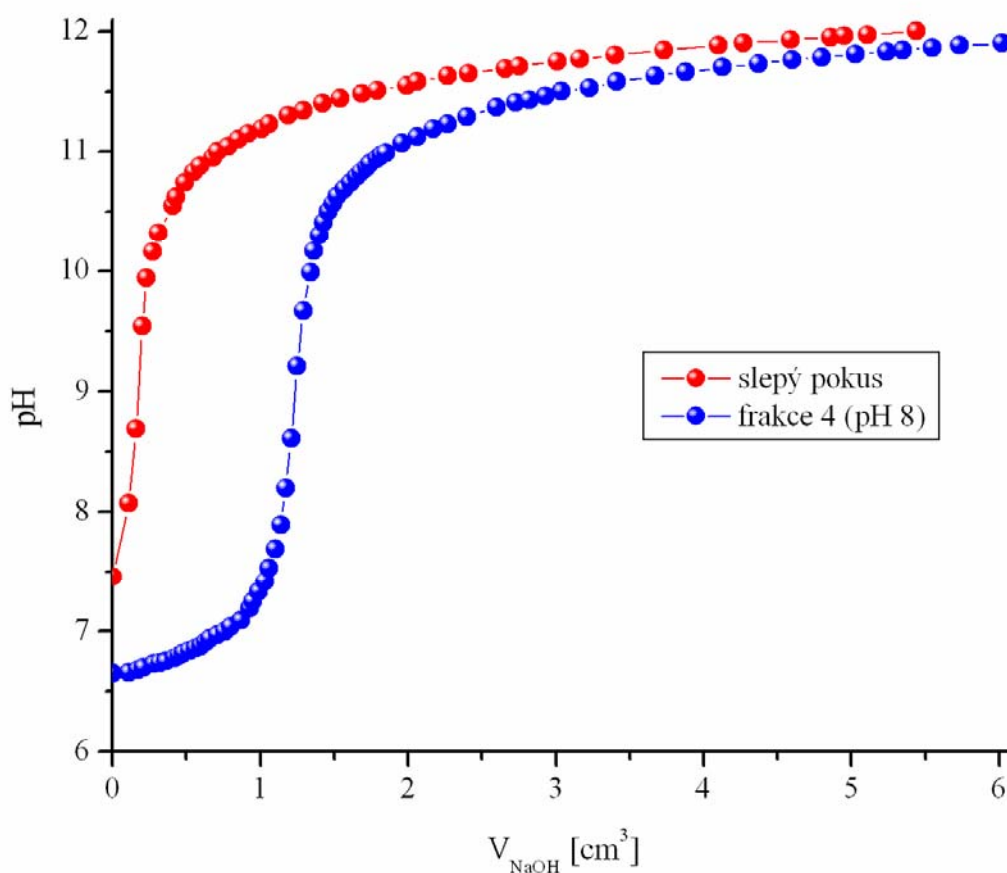
pH	výtěžek z původního množství (hm. %)	
	přímá frakcionace [59]	postupná frakcionace
4	2,4	–
6	3,9	11,0
8	7,6	43,0
10	20,4	64,8
12	56,6	88,5

### 4.3 Obsah karboxylových skupin v získaných frakcích

U všech získaných frakcí byla stanovena karboxylová kyselost titrační metodou popsanou v kapitole 3.4.3.

V tabulce (Tabulka IX) je souhrn vypočítaných hodnot karboxylové kyselosti. Nejvyšší obsah karboxylových skupin ze všech rozpuštěných frakcí byl zjištěn ve frakci rozpuštěné při pH 6

(frakce 3). Jako jediná ze všech frakcí také utvořila s roztokem octanu vápenatého znatelně hnědé zabarvení. Obsah karboxylových skupin v této frakci byl o několik jednotek vyšší než u druhé frakce, opětovně rozpuštěné při pH 6. Obecně lze konstatovat, že obsah karboxylových skupin s rostoucím pH frakce klesal, přesto byl ve všech rozpuštěných frakcích vyšší než v původním vzorku huminové kyseliny. U nerozpuštěného zbytku N (frakcionace při pH 12) byl obsah karboxylových skupin zdaleka nejnižší, více než 15násobně nižší než ve vzorku původním.



Obrázek 8: Příklad titrační křivky

Na obrázku (Obrázek 8) je uveden příklad titračních křivek frakce rozpuštěné při pH 8 a slepého vzorku.

Nejnižší množství karboxylových skupin ze všech frakcí, získaných metodou přímé frakcionace obsahoval vzorek frakce nerozpustné při pH 12. [59]

Ze srovnání obou metod tak vyplývá, že nejnižší obsah karboxylových skupin je nezávisle na použité metodě frakcionace vždy ve frakci nerozpuštěné při nejvyšším pH, tedy pH 12. Avšak podíváme-li se blíže na tuto problematiku, je zřetelné, že u přímé frakcionace se kyselost i pro frakci získanou při pH 12 (2,0 mmol COOH na gram HK) pohybuje ve stejném řádu jako u ostatních frakcí (obsah COOH v původní HK byl 3,3 mmol na gram HK), zatímco obsah COOH v nerozpuštěné frakci (N) získané postupnou frakcionací se o řád liší.

Tabulka IX: Obsah COOH skupin zjištěný titrací (mmol COOH na gram huminové kyseliny)

označení frakce	popis frakce	obsah COOH [mmol·g <sup>-1</sup> ]
3	pH 6	13,20
3*	pH 6 opětovně rozpuštěná	8,69
4	pH 8	8,43
5	pH 10	7,91
6	pH 12	7,70
N	nerozpuštěný zbytek (pH 12)	0,22
P	původní HK	3,51

#### 4.4 Optické charakteristiky získaných frakcí huminových kyselin

Získané frakce i vzorek původní huminové kyseliny byli charakterizováni spektroskopickými metodami.

##### 4.4.1 Charakterizace UV/VIS spektroskopii

Jednotlivé rozpuštěné frakce huminových kyselin byly postupně charakterizovány UV/VIS spektroskopii. Z komplexních spekter v rozmezí 200–800 nm byly zaznamenány především hodnoty absorpčních význačných vlnových délek 280, 400, 465 a 665 nm. Byly vypočteny poměry absorpčních, které slouží k charakterizaci huminových kyselin v mnoha publikacích.

Poměr  $A(465 \text{ nm})/A(665 \text{ nm})$ , označovaný jako  $E_{4/6}$  je nejčastěji používaný jako tzv. humifikační index. Obvykle je pro huminové kyseliny  $< 5,0$  a snižuje se s rostoucí molekulární vahou a stupněm disperzity. Vysoký poměr ukazuje na nízký obsah aromatických částic a relativně větší obsah alifatických struktur, zatímco nízký poměr může značit relativně vysoký podíl aromatických částic. Huminové kyseliny s nejvyšším koeficientem  $E_{4/6}$  by měly mít nejnižší odolnost. Více humifikované a více kondenzované (aromatické) substance jsou staršího původu. [48] [49]

Absorpční poměr  $A(280 \text{ nm})/A(465 \text{ nm})$  odráží poměr mezi lignitovými strukturami odolnými vůči humifikaci a množstvím lignitu. Poměr  $A(280 \text{ nm})/A(665 \text{ nm})$  reflektuje poměr mezi lignitovými strukturami, které odolávají humifikaci a strukturami, které mají tendenci jí podléhat. [50]

Také hodnota  $\Delta \log K$  je spjata se stupněm humifikace HK. Tvoří ji rozdíl logaritmu absorpčních huminových kyselin při vlnových délkách 400 a 600 nm. Kumada [51] pak podle této hodnoty dělí HK na tři kategorie:

- typ A, jehož hodnota  $\Delta \log K$  je vyšší než 0,6;
- typ B, kde hodnota  $\Delta \log K$  leží v intervalu od 0,6 do 0,8;
- typ R<sub>p</sub>, s hodnotou  $\Delta \log K$  ležící v intervalu od 0,8–1,1.

Nejvyšší stupeň humifikace má typ A, kdežto nejnižší pak typ R<sub>p</sub>.

Absorbance rozpuštěných frakcí při hodnotách pH 8 a výš, byly především v ultrafialové oblasti tak vysoké, že je nepokryl měřicí rozsah přístroje. Uvedené hodnoty tedy odpovídají desetinásobnému, popřípadě stonásobnému ředění. Z tabulky (Tabulka X), kde jsou uvedeny absorpční poměry získané měřením po frakcionaci, je patrný velký rozdíl v  $E_{4/6}$  poměrech mezi frakcemi 2, 3 a ostatními frakcemi, rozpustnými při vyšší hodnotě pH.  $E_{4/6}$  poměr ostatních frakcí dosahuje hodnoty vyšší než 5. Nejvyšší je pro frakci 4 (pH 8), tedy frakci,

kteřá vykazuje skokový nárůst rozpustnosti při frakcionaci. Opomeneme-li tuto frakci, můžeme konstatovat, že poměr  $E_{4/6}$  roste se stoupající hodnotou pH.

Hodnoty koeficientu  $\Delta \log K$  u rozpuštěných frakcí 4, 5 a 6 (tedy pH 8, 10, 12) kolísají v rozmezí 0,6–0,8, což zařazuje huminovou kyselinu do kategorie B.  $\Delta \log K$  frakce 3 (pH 6) je na pomezí dělicí hranice mezi typem A a typem B. Hodnota  $\Delta \log K$  frakce 2 je ze všech nejnižší.

Srovnání s prací [59] potvrzuje nejvyšší hodnotu  $E_{4/6}$  poměru pro frakci rozpuštěnou při pH 8. Tento poměr je pro frakce přímo rozpuštěné při pH 8, 10, 12 vždy vyšší než pět, pouze při pH 6 nedosahuje této hodnoty. Přijatelné shody je dosaženo i pro hodnoty  $\Delta \log K$ . Všechny rozpuštěné i nerozpuštěné frakce získané přímou frakcionací spadají taktéž do kategorie „B“.

Tabulka X: *Absorpční poměry rozpuštěných frakcí postupnou frakcionací*

označení frakce	popis frakce	$A_{280/465}$	$A_{280/665}$	$E_{4/6}$ poměr	$\Delta \log K$
1	pH 2	–	–	–	–
2	pH 4	10,71	23,47	2,19	0,49
3	pH 6	4,52	25,98	2,88	0,59
4	pH 8 (10 × zředěno)	–	–	5,53	0,73
5	pH 10 (100 × zředěno)	4,87	25,35	5,21	0,69
6	pH 12 (100 × zředěno)	4,50	24,36	5,42	0,70

Tabulka (Tabulka XI) obsahuje optické charakteristiky rozpuštěných frakcí, nerozpuštěného zbytku a původní HK měřené v 0,1 M roztoku NaOH. Vypočtené hodnoty  $\Delta \log K$  všech vzorků ukazují, že se jedná o huminové kyseliny typu B, jelikož se pohybují v rozmezí 0,6 až 0,8.

$E_{4/6}$  poměry všech rozpuštěných frakcí včetně původní HK zřetelně překračují hodnotu 5. Tento poměr je pod touto hranicí pouze u nerozpuštěné frakce „N“.

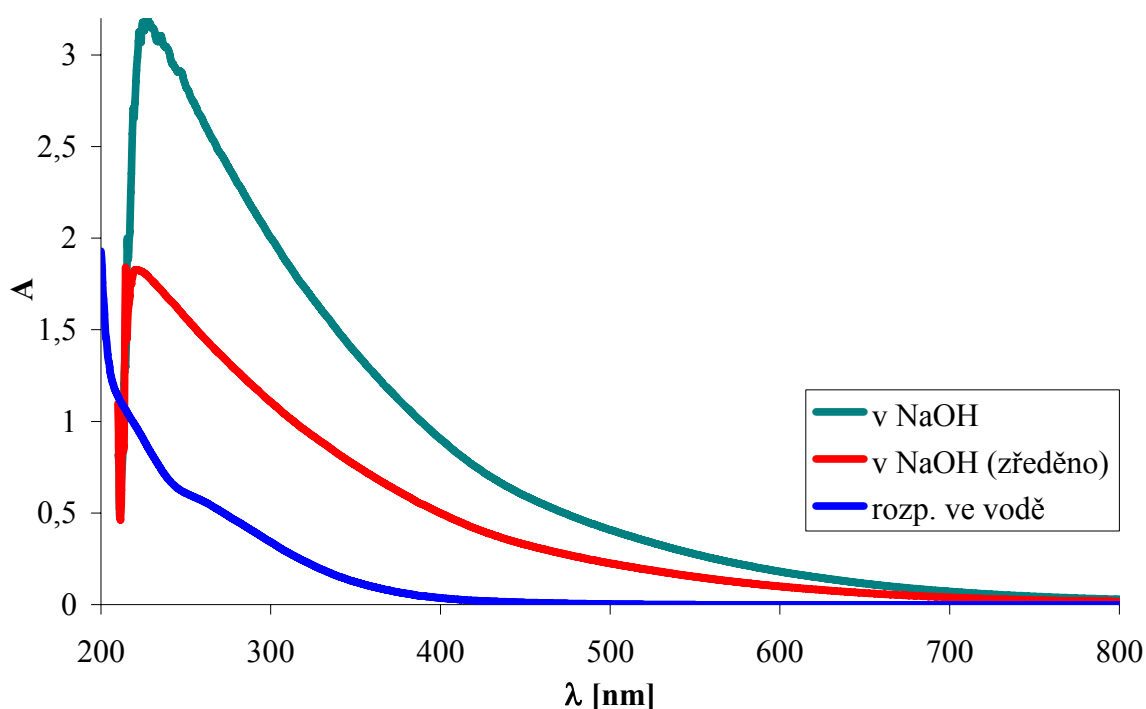
Tabulka XI: *Absorpční poměry rozpuštěných frakcí, nerozpuštěného zbytku a původní HK měřené v NaOH*

označení frakce	popis frakce	$A_{280/465}$	$A_{280/665}$	$E_{4/6}$ poměr	$\Delta \log K$
3	pH 6	4,94	30,19	6,11	0,76
3*	pH 6 opětovně	4,75	28,87	6,08	0,75
4	pH 8	4,25	22,08	5,19	0,69
5	pH 10	4,35	23,11	5,31	0,70
6	pH 12	4,36	23,26	5,33	0,70
N	nerozpuštěný zbytek	4,37	21,1	4,83	0,67
P	původní HK	4,61	25,69	5,57	0,72

UV/VIS spektra všech frakcí rozpouštěných v NaOH vykazují maximum v oblasti kolem 220 nm a to i po dalším zředění 0,1 M NaOH v poměru 1:1. Maximum v takto zředěném vzorku se posune nepatrně ke kratším vlnovým délkám. Srovnání takovýchto spekter se spektrem frakce rozpouštěné ve vodě přináší zjištění, že v tomto případě žádné maximum při

220 nm pozorováno není. Naopak je pozorováno lokální maximum, nebo-li náznak pásu s maximem kolem 250 nm, příslušející substituovanému aromatickému jádru (Obrázek 9). [61]

UV/VIS spektra postupně získaných frakcí měřená v NaOH dobře korelují se spektry získanými přímou frakcionací [59]. I zde byla pozorována maxima odpovídající vlnové délce 220 nm. Stejně tak byly pozorovány náznaky maxim pásů při 250 nm a to jak v rozpuštěných tak i nerozpuštěných frakcích protřepávaných ve vodě.



Obrázek 9: UV/VIS spektra frakce 5 rozpuštěné v NaOH, resp. ve vodě

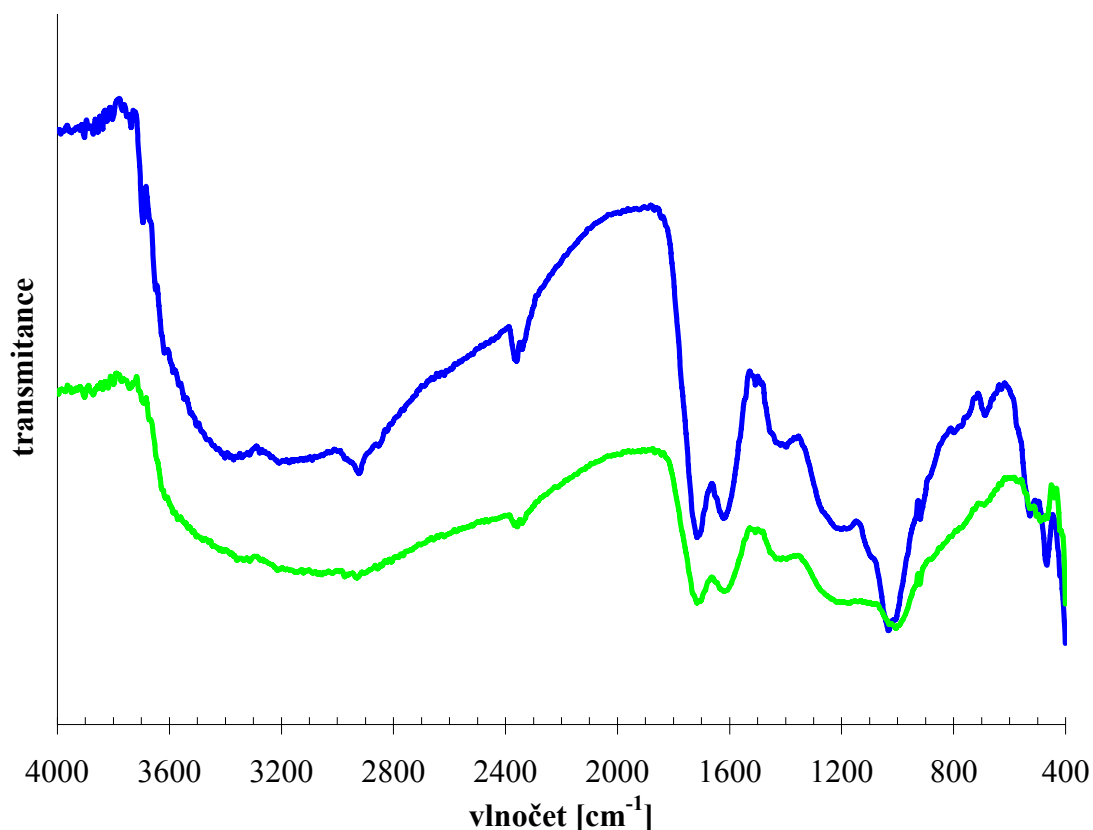
#### 4.4.2 Charakterizace FT-IR spektroskopii

Význačné charakteristické pásy jednotlivých funkčních skupin vzorku původní huminové kyseliny použité k experimentům byly identifikovány a popsány v kapitole 4.1. Získaná FT-IR spektra jednotlivých frakcí jsou porovnána s původním vzorkem a mezi sebou navzájem v této kapitole.

Stejně jako v případě původní huminové kyseliny, také frakce získané postupnou frakcionací vykazují stejné základní pásy, se kterými se můžeme setkat v publikacích, které se zabývají charakterizací huminových kyselin různého původu. Pozorovány byly pouze drobné nuance a to především v intenzitě jednotlivých pásů.

Na obrázku (Obrázek 10) jsou spektra dvou frakcí rozpuštěných při pH 6 (frakce 3, resp. frakce 3<sup>\*</sup>). Opětovně rozpouštěná frakce (zelená křivka) se svým spektrem liší v oblasti kolem 2900 cm<sup>-1</sup>, kde není pozorován tak výrazný pík. Oblast 3000–2800 cm<sup>-1</sup> přísluší symetrickým i antisymetrickým valenčním vibračním skupin –CH<sub>2</sub>– a –CH<sub>3</sub>. Frakce 3 (modrá křivka) má znatelně vyšší intenzitu píku s maximem 1033 cm<sup>-1</sup>. Tento pík by mohl odpovídat Si–O vazbám, což by napovídalo, že při opětovném rozpouštění při tomto pH, již nebylo přítomno tolik nečistot.

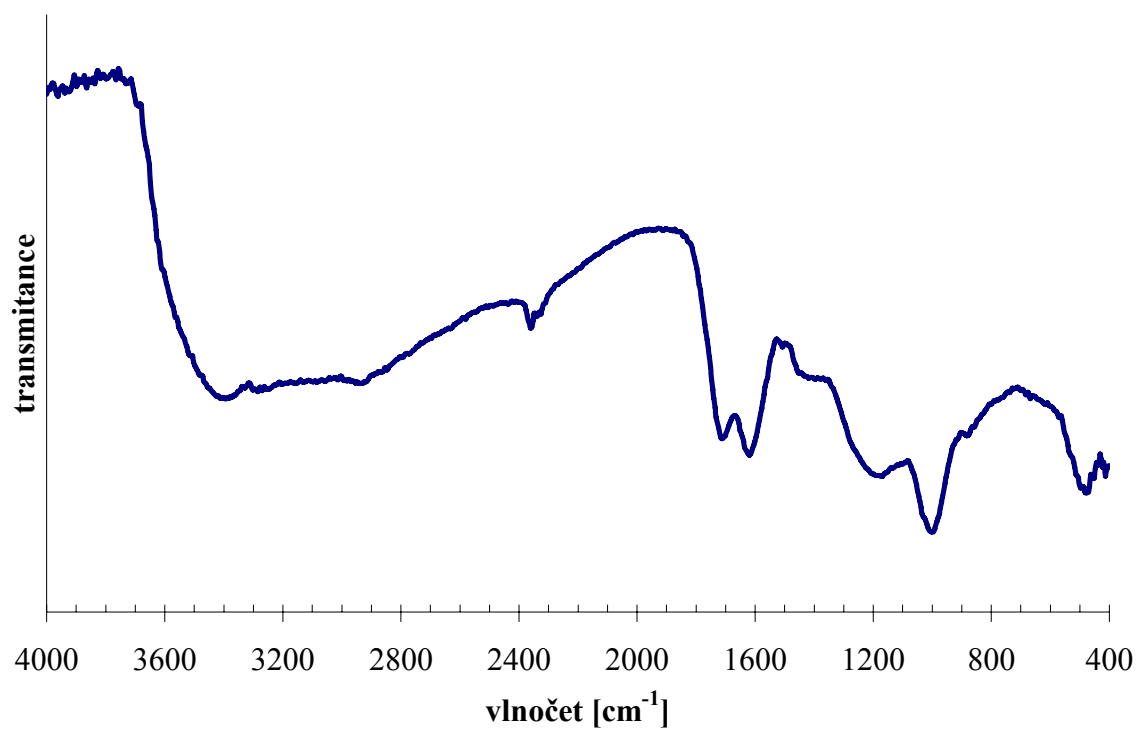
Spektra všech rozpuštěných frakcí si jsou vcelku podobná (Obrázek 10, Obrázek 11, Obrázek 12, Obrázek 13). Největší rozdíl je na první pohled patrný u spektra vzorku, který zbyl nerozpuštěný po frakcionaci při pH 12. (Obrázek 14).



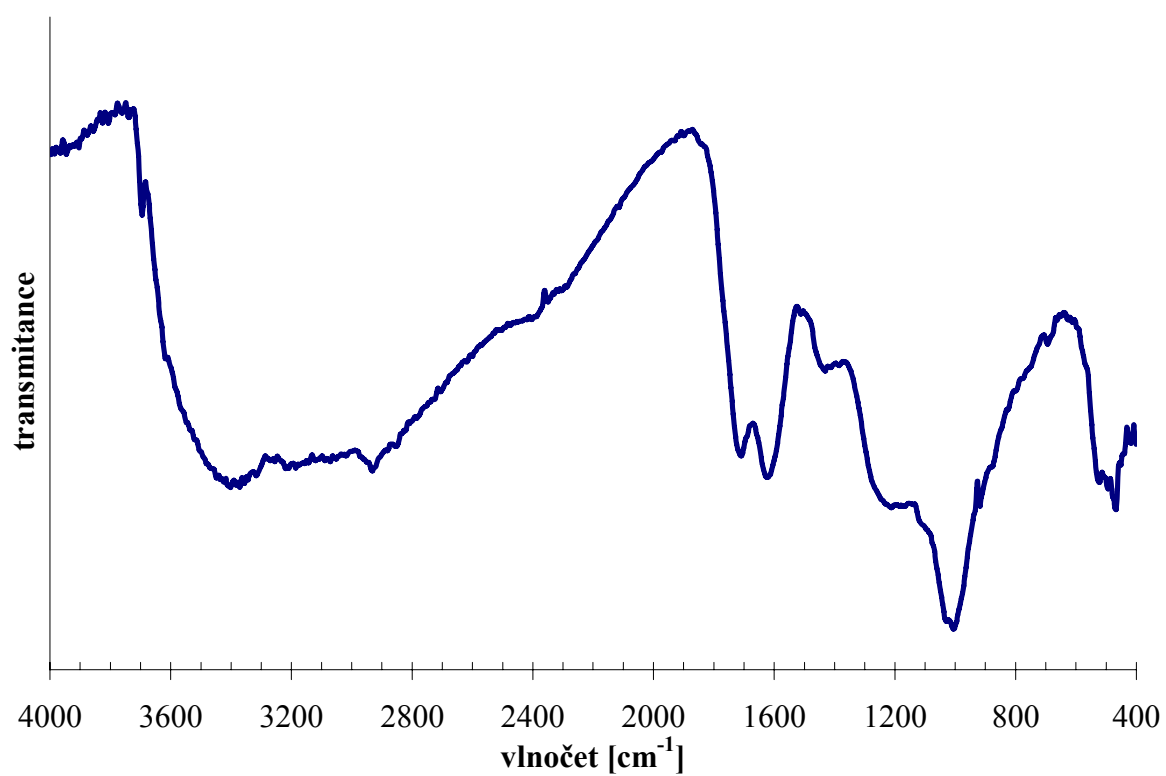
Obrázek 10: FT-IR spektra rozpuštěných frakcí při pH 6 (modře je značena frakce 3; zeleně opětovně rozpouštěná frakce 3<sup>\*</sup>)

Zajímavé je srovnání relativní intenzity pásu vibrací karboxylových skupin při  $1720\text{ cm}^{-1}$ . Rozpuštěná frakce 3 (pH 6) prokazuje vyšší intenzitu tohoto pásu v porovnání s frakcí 3<sup>\*</sup>, tedy opětovně rozpouštěnou frakcí při stejné hodnotě pH (Obrázek 10). Při prvním rozpouštění se tedy do roztoku uvolnilo více karboxylových skupin než při opětovném rozpouštění. Toto zjištění koreluje s výsledky obsahu karboxylových skupin uváděnými v kapitole 4.3.

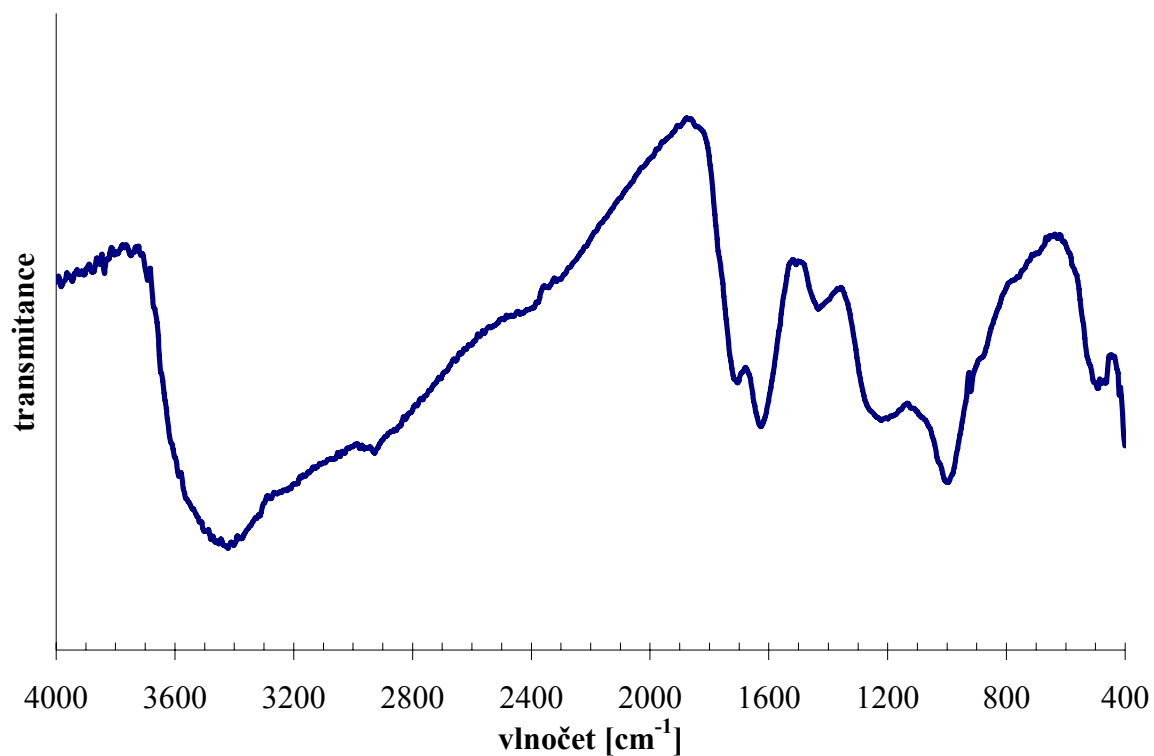
Intenzita tohoto pásu v nejvíce alkalické a jediné nerozpuštěné frakci (nerozpuštěný podíl při pH12) se jeví zdaleka nejnižší ze všech měřených spekter (Obrázek 14).



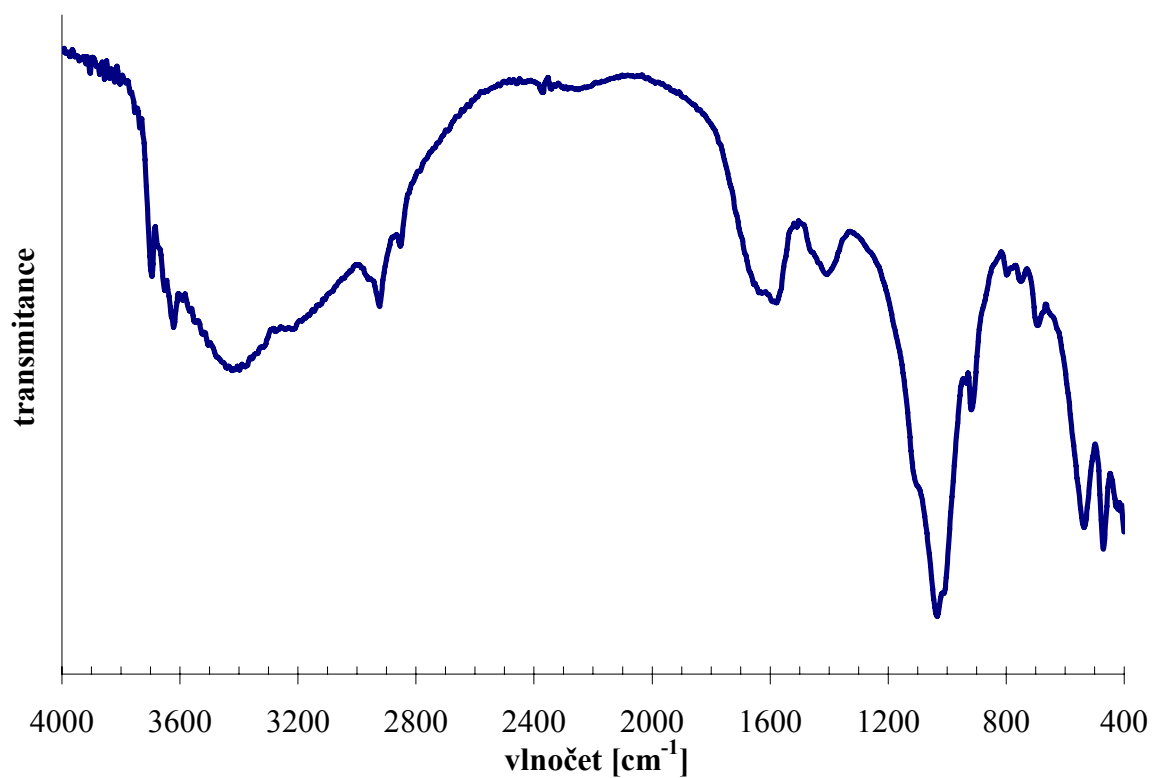
Obrázek 11: *FT-IR* spektrum rozpuštěné frakce 4 (pH 8)



Obrázek 12: *FT-IR* spektrum rozpuštěné frakce 5 (pH 10)



Obrázek 13: *FT-IR* spektrum rozpuštěné frakce 6 (pH 12)



Obrázek 14: *FT-IR* spektrum nerozpuštěné frakce N (pH 12)

### 4.4.3 Obsah popela rozpuštěných frakcí

Ve všech rozpuštěných frakcích získaných postupnou frakcionací, vyjma frakce 3, která již nebyla k dispozici v dostatečném množství, byl zjišťován obsah popela (TG analyzátor Q500). Získané hodnoty jsou uvedeny v tabulce (Tabulka XII).

Tabulka XII: *Obsah popela (hmotnostní %) rozpuštěných frakcí*

	frakce 3*	frakce 4	frakce 5	frakce 6
popel [hm. %]	25,0	36,8	37,3	34,2

### 4.5 Rozpustnost frakcí huminových kyselin

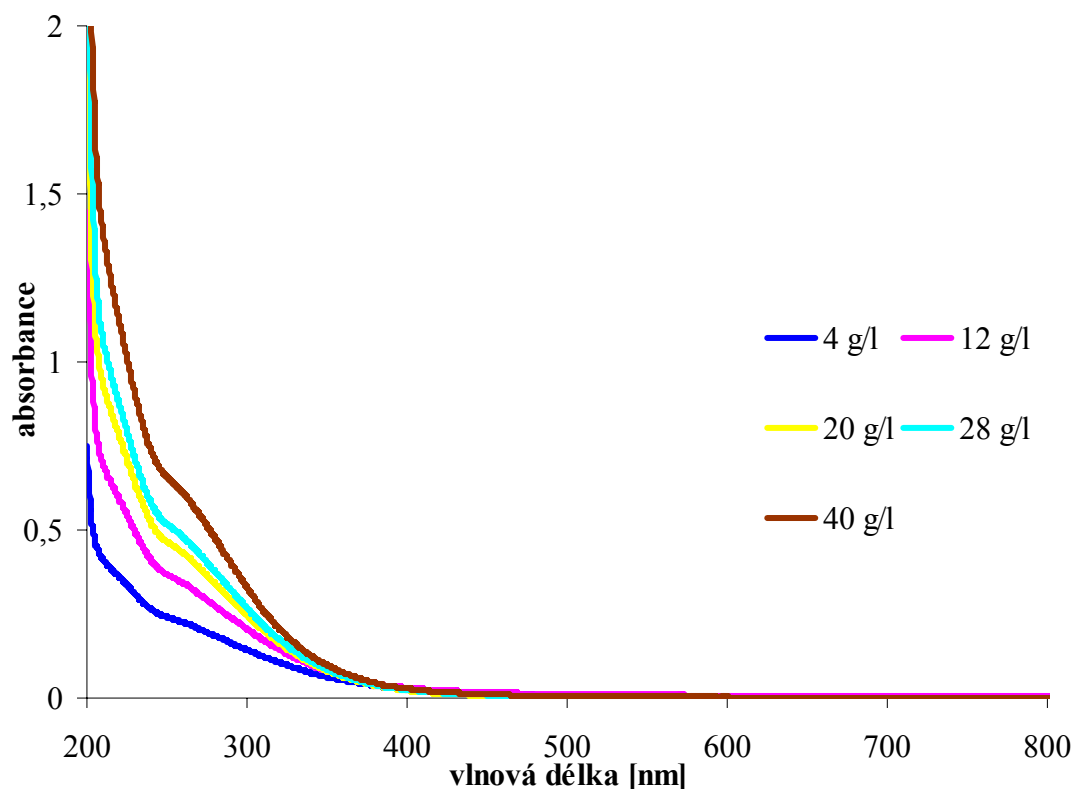
Původní huminová kyselina (P), rozpuštěné frakce při pH 6, 8, 10, 12 a frakce při pH 12 nerozpuštěná (N) byly dále studovány ve vztahu k rozpustnosti ve vodě. Výsledky byly srovnány s výsledky studia rozpustnosti vzorků frakcí získaných přímou frakcionací při pH 8, 10, 12. Množství frakce 3, bylo již tak malé, že byly připraveny pouze koncentrace 4, 20, a 40 g·dm<sup>-3</sup>.

#### 4.5.1 UV/VIS spektra

Spektra frakcí vytřepávaných do vody po dobu 24 hodin v pěti koncentracích (4, 12, 20, 28 a 40 g·dm<sup>-3</sup>) prokazují jasnou tendenci snižovat absorbanci s rostoucí hodnotou pH, při kterém byly frakcionovány. Nejvyšší hodnoty absorbance jsou pozorovány u frakce 3, naopak nejnižší u frakce 6. Stejná posloupnost funguje i pro rozpuštěné frakce získané přímou frakcionací. Absorbance vzorku frakce získané při pH 12 je nejnižší, naopak absorbance vzorku frakce získané při pH 8 je nejvyšší. Stejný vývoj nebyl pozorován v práci [59], kde autor sledoval optické charakteristiky nerozpuštěných frakcí (přímá frakcionace), taktéž následně rozpouštěných ve vodě. Mezi spektry jednotlivých frakcí (pH 4, pH 6, pH 8, pH 10) nebyl pozorován velký rozdíl. Některá spektra se dokonce protínala, přesto autor konstatoval mírný nárůst absorbance od pH 4 k pH 10 a to hlavně v ultrafialové oblasti mezi 200–400 nm. Frakce (pH 12) se zcela vymykala, absorbance zde byla srovnatelná s ostatními frakcemi až po 30násobném zředění.

Pokud se jedná o stejnou frakci našeho měření, roste absorbance s rostoucí koncentrací, tak jak je patrné z obrázku (Obrázek 15), na kterém jsou znázorněna spektra frakce 6 (pH 12) o různých koncentracích. I zde jsou patrné náznaky pásu s maximem kolem 250 nm, což je vlnová délka, která přísluší substituovanému aromatickému jádru.

Studium nerozpuštěných frakcí přímou metodou [59] potvrzuje, že s rostoucí koncentrací vzorků ve vodě se hodnoty absorbance taktéž zvyšují. To je způsobeno větším množstvím rozpuštěné HK ve vodě. Stejně jako v našem případě, bylo autorem pozorováno znatelnější zbarvení měřeného roztoku s rostoucí koncentrací.



Obrázek 15: UV/VIS spektra vzorku frakce 6 rozpouštěného ve vodě při různých koncentracích

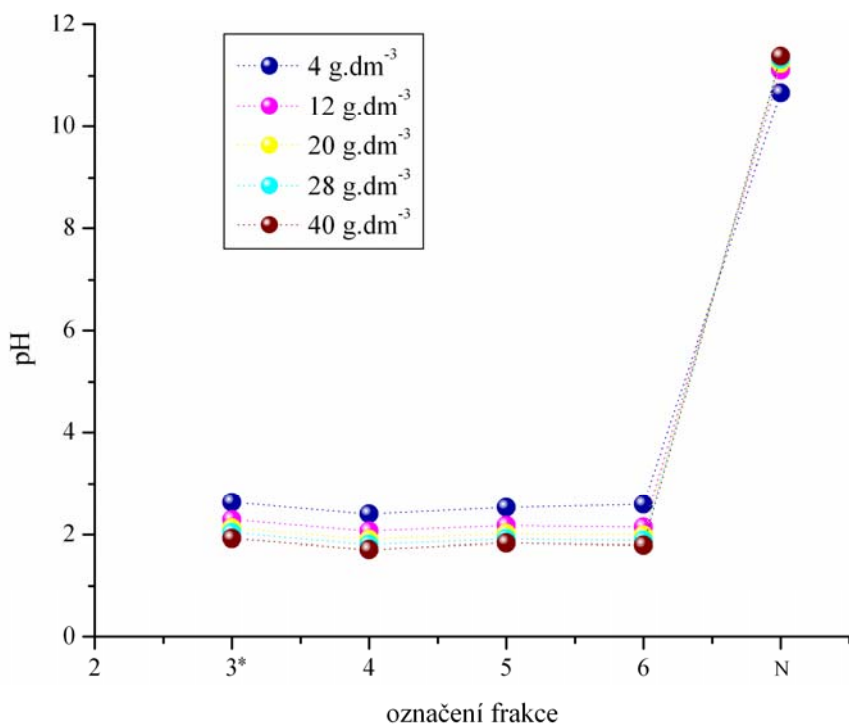
#### 4.5.2 pH a vodivost

Po 24 hodinovém protřepávání vodné suspenze bylo měřeno pH a vodivost všech rozpuštěných frakcí (3<sup>\*</sup>, 4, 5, 6), nerozpuštěného zbytku (N) i původní huminové kyseliny (P), připravených o různých koncentracích.

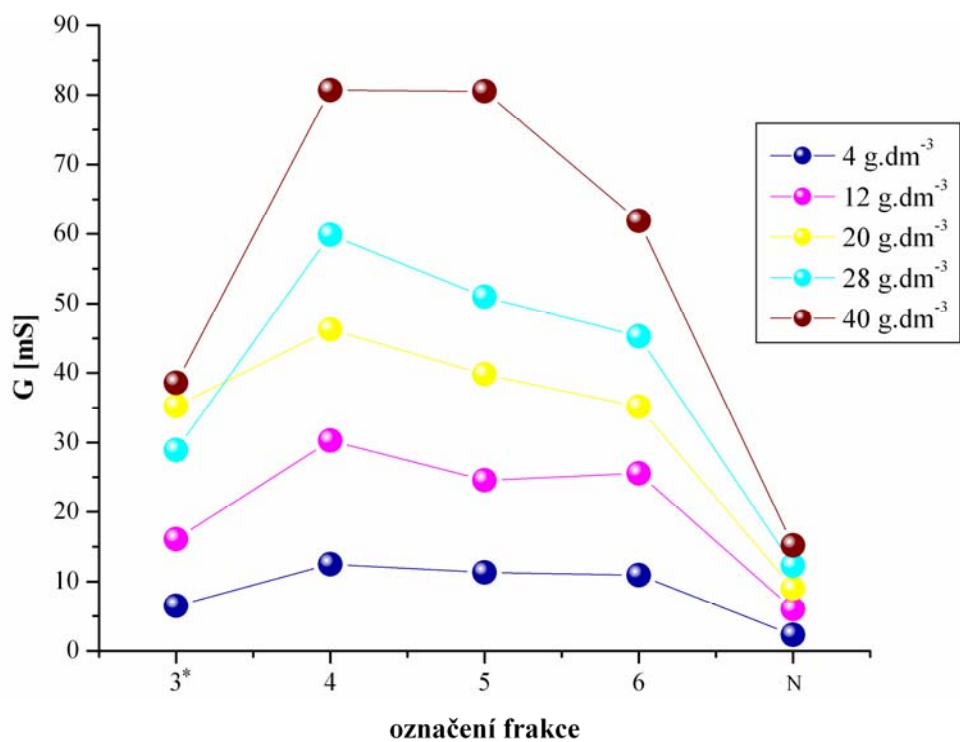
Při srovnání pH jednotlivých frakcí po protřepávání je z grafu (Obrázek 16) patrný mírný pokles hodnoty pH od frakce 3<sup>\*</sup> k frakci 4. Mezi frakcemi 4 a frakcemi 5 dochází k růstu pH u všech koncentrací a k frakci 6 roste ztelněji pH pouze s koncentrací 4 g·dm<sup>-3</sup>. Hodnota pH nerozpuštěného zbytku (N) zůstává v alkalické oblasti, což svědčí o tom, že jednotky do kterých se frakce rozpadla obsahují jen velmi málo kyselých skupin, což potvrzují i výsledky měření obsahu karboxylových skupin v tomto nerozpuštěném zbytku (kapitola 4.3). Relativně nízké hodnoty vodivosti nerozpuštěné frakce (Obrázek 17) napovídají menšímu počtu karboxylových skupin a tedy menšímu počtu disociovaných iontů schopných vést elektrický proud.

Uvedené výsledky jsou zdánlivě v rozporu s očekáváním. Z měření karboxylové kyselosti by byl předpokládán spíše nárůst pH od frakce 3<sup>\*</sup> po frakci 6. Ovšem podobné závislosti byly získány i v předchozí práci [59].

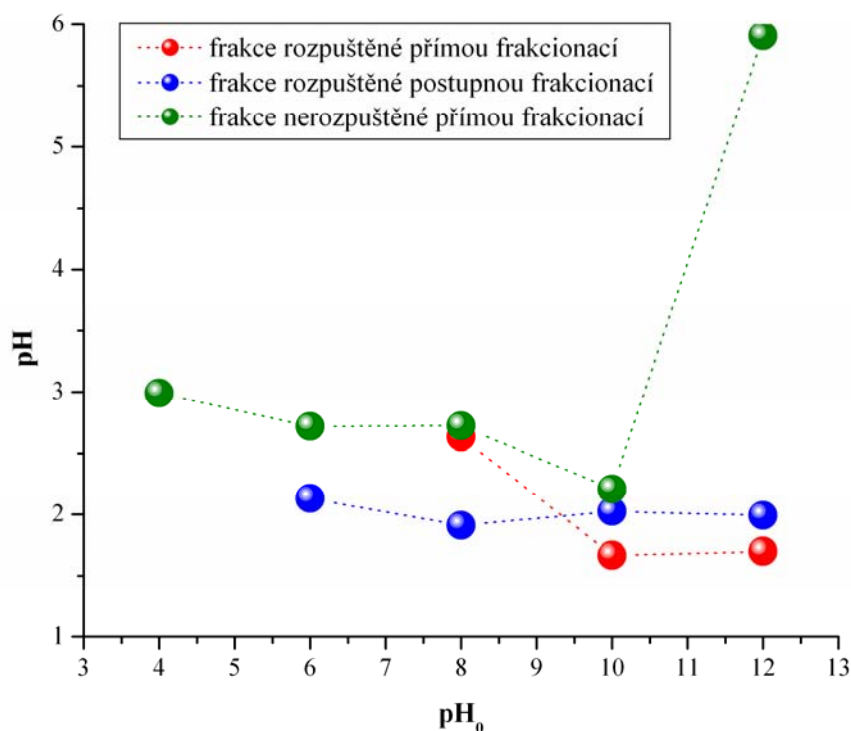
V práci [59] byl u nerozpuštěných frakcí pozorován téměř pravidelný mírný pokles pH od frakce pH<sub>0</sub> 4 k frakci o pH<sub>0</sub> 10, zatímco pro nerozpuštěnou frakci o pH<sub>0</sub> 12 se objevil skokový nárůst a pH po protřepávání vystoupilo až k hodnotě 7. Stejně jako v našem případě, tak i v případě přímé frakcionace, vykazovala nerozpuštěná frakce (pH<sub>0</sub> 12) nejnižší hodnoty vodivosti ze všech frakcí.



Obrázek 16: Závislost pH na druhu frakce a její koncentraci



Obrázek 17: Závislost vodivosti na druhu frakce

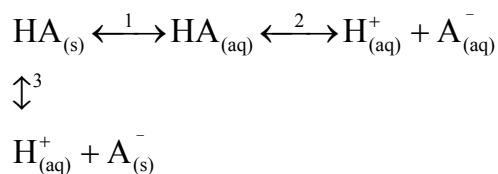


Obrázek 18: Závislost  $pH$  po rozpouštění ve vodě na  $pH$  při frakcionaci a použité metodě, koncentrace  $20 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$

Na obrázku (Obrázek 18) je srovnání různých metod frakcionace podle  $pH$ . Autor [59] použil metodu přímé frakcionace a stejný vzorek huminové kyseliny rozpouštěl při stejných počátečních hodnotách  $pH$ . Zelená kolečka značí nerozpuštěné frakce při daném  $pH$ , červená kolečka rozpuštěné frakce. Modrá kolečka symbolizují postupnou frakcionaci – konkrétně frakce 3\* ( $pH_0$  6), 4 ( $pH_0$  8), 5 ( $pH_0$  10), 6 ( $pH_0$  12).

#### 4.5.3 Disociační a rozpouštěcí rovnováha

Frakce huminových kyselin jsou částečně rozpustné ve vodě. Na základě experimentálních dat byl předložen vícestupňový mechanismus interakce huminové kyseliny s vodou obsahující přímou rovnováhu mezi disociovanou huminovou kyselinou z pevného stavu a rozpuštěnou huminovou kyselinou s její následnou disociací. Tento mechanismus byl popsán a experimentálně ověřen na vzorku huminových kyselin izolovaných ze stejného lignitu v práci [1] [38]. Schéma mechanismu je na obrázku (Obrázek 19).



Obrázek 19: Schéma vícestupňového mechanismu disociace HK [1]

Pro materiálovou bilanci systému HK – voda (HK – H<sub>2</sub>O) je vhodné zavést následující značení:  $x$  je koncentrace H<sup>+</sup> z HA<sub>(aq)</sub> (rovnice 2),  $y$  je koncentrace H<sup>+</sup> z HA<sub>(s)</sub> (rovnice 3),  $w$  je koncentrace H<sup>+</sup> z vody a  $t$  je čas.

V tabulce je uvedena materiálová bilance systému (Tabulka XIII).

Tabulka XIII: Materiálová bilance systému HK – H<sub>2</sub>O

	[HA <sub>(aq)</sub> ]	[H <sup>+</sup> <sub>(aq)</sub> ]	[A <sup>-</sup> <sub>(aq)</sub> ]
$t = 0$	0	$w_0$	0
$t > 0$	$k \cdot m - x$	$x + y + w$	$x$

Rovnovážná konstanta reakce 2 na obrázku (Obrázek 19) pak je definována:

$$K = \frac{[H^+] \cdot [A^-]}{[HA]} = \frac{[(x + y + w) \cdot x]}{k \cdot m - x}, \quad (3)$$

kde  $k$  je konstanta úměrnosti,  $m$  je celková hmotnost huminových kyselin v 1000 cm<sup>-3</sup> disperze.

Předpokládejme, že  $y + w \ll x$  a proto můžeme provést následující zjednodušení:

$$K = \frac{x^2}{(k \cdot m - x)}, \quad (4)$$

po linearizaci dostaneme:

$$x = \frac{s \cdot m}{x - K}, \quad (5)$$

kde  $s = k \cdot K$  je směrnice přímky  $x = f\left(\frac{m}{x}\right)$ . [38]

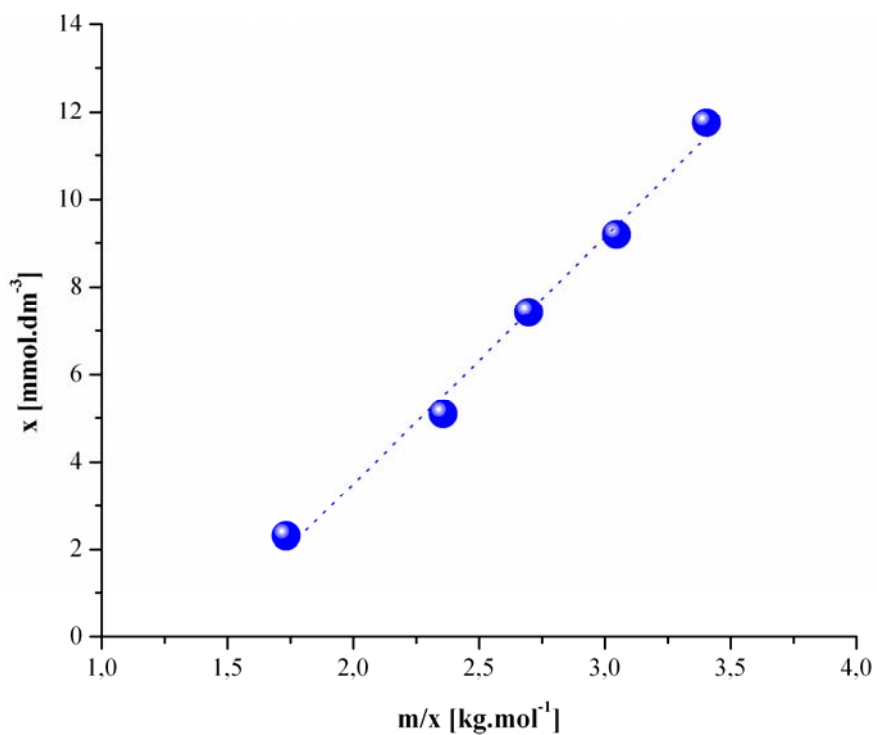
U rozpuštěných frakcí získaných metodou postupné frakcionace byla tato závislost zkoumána a vypočtené hodnoty rovnovážné konstanty, resp. konstanty úměrnosti získané pro standardní koncentraci  $c_{st} = 1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  jsou uvedeny v tabulce (Tabulka XIV).

Tabulka XIV: Zdánlivé rovnovážné konstanty a konstanty úměrnosti frakcí

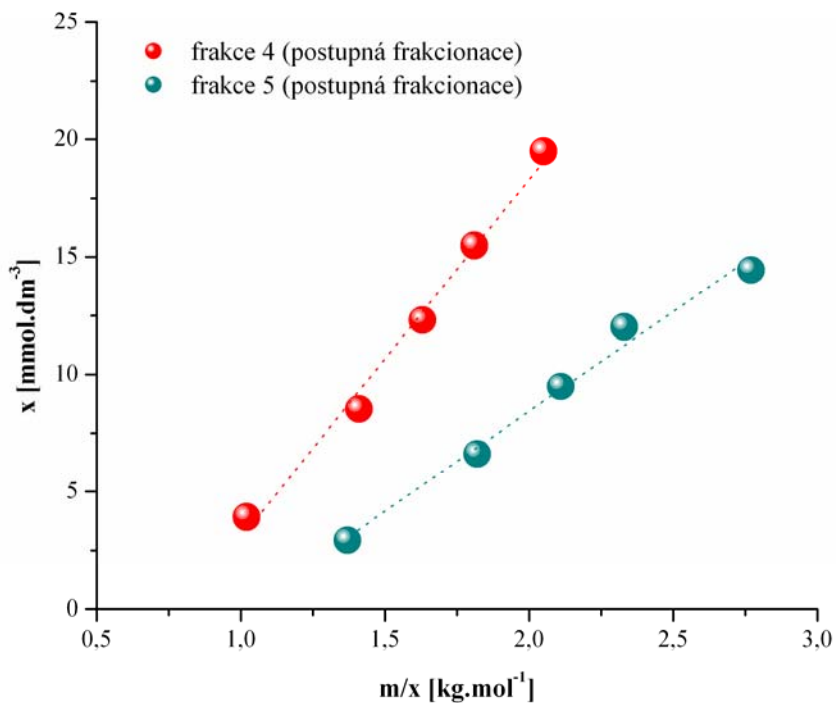
frakce	$K$	$k [\text{dm}^3 \cdot \text{g}^{-1}]$
3	$3,09 \cdot 10^{-3}$	$1,03 \cdot 10^{-3}$
3*	$7,78 \cdot 10^{-3}$	$7,25 \cdot 10^{-4}$
4	$1,23 \cdot 10^{-2}$	$1,25 \cdot 10^{-3}$
5	$8,58 \cdot 10^{-3}$	$9,92 \cdot 10^{-4}$
6	$1,70 \cdot 10^{-2}$	$7,97 \cdot 10^{-4}$

Na obrázku (Obrázek 20) je rozpouštěcí a disociační rovnováha systému frakce 3\* – voda, získaného postupnou frakcionací. Závislost vykazuje lineární průběh.

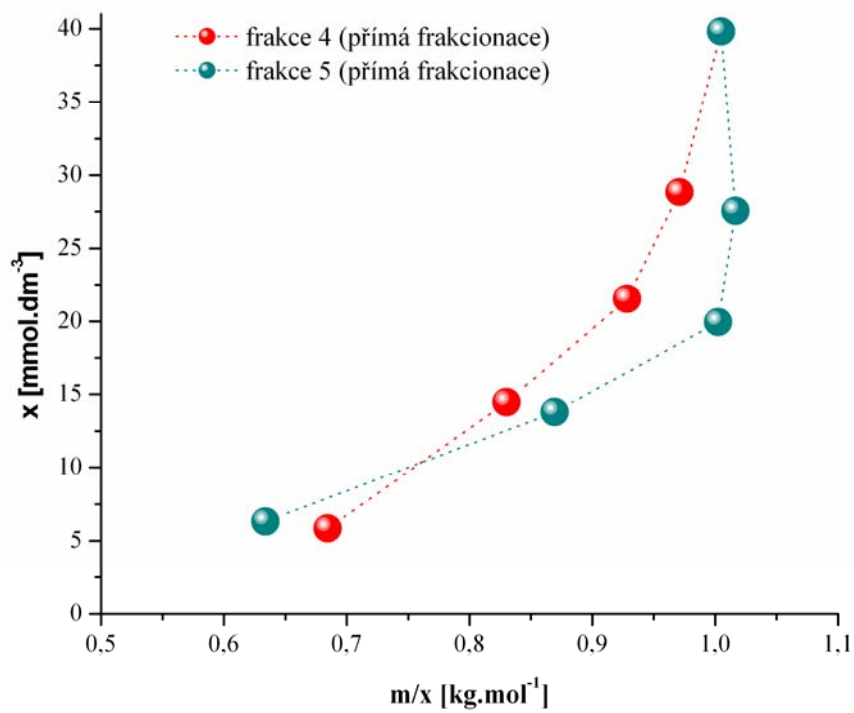
Na obrázcích (Obrázek 21, Obrázek 22) lze srovnat průběh závislosti pro frakce rozpuštěné při stejném pH (pH 8, resp. 10), avšak odlišnou metodou. Zatímco na obrázku (Obrázek 21) je znovu systém získaný postupnou frakcionací vykazující opět vcelku lineární průběh závislosti, obrázek (Obrázek 22) zobrazuje rozpuštěné frakce, získané metodou přímé frakcionace. Zde si můžeme povšimnout značného zakřivení.



Obrázek 20: Rozpouštěcí a disociační rovnováha v systému rozpuštěná frakce 3\* – voda



Obrázek 21: Rozpouštěcí a disociační rovnováha v systémech: rozpuštěná frakce 4 – voda, rozpuštěná frakce 5 – voda (postupná frakcionace)



Obrázek 22: Rozpouštěcí a disociační rovnováha v systémech: rozpuštěná frakce 4 – voda, rozpuštěná frakce 5 – voda (přímá frakcionace)

## 5 ZÁVĚR

Diplomová práce byla zaměřena na studium frakcionace huminových kyselin podle pH použitého pufru. Byla zvolena metoda postupné frakcionace, kdy se vzorek huminových kyselin izolovaný z jihomoravského lignitu rozpouštěl v pufru o počáteční hodnotě pH 2. Nerozpuštěný zbytek se použil jako výchozí pro frakcionaci při nejbližší vyšší počáteční hodnotě pH pufru. Takto byla připravena řada rozpustných frakcí.

Metoda postupné frakcionace potvrdila, že rozpustnost huminových látek je v pufrech o nízkém pH velmi nízká. Při počáteční hodnotě pH pufru 2, resp. 4 nebyl rozpuštěn žádný zřetelnější podíl. Více jak 10% podíl rozpuštěné části byl pozorován až při další postupné hodnotě pH (pH 6) a to teprve opětovným rozpouštěním při této hodnotě. S rostoucí hodnotou pH rozpustnost rostla. Nejvyšší rozpustnost byla pozorována pro nejméně alkalický pufr (pH 12) a dosahovala bezmála 47 % rozpouštěného množství.

Srovnáním použité metody s metodou přímé frakcionace plyne zjištění, že účinnost rozpustnosti pro metodu postupné frakcionace převyšuje účinnost přímé frakcionace, avšak na úkor čistoty získaných frakcí.

Z výsledků měření karboxylové kyselosti je zřejmé, že obsah karboxylových skupin klesá od frakce 3 k frakci 6. Kyselost nerozpuštěného zbytku (pH 12) je řádově nižší než u všech rozpustných frakcí. Při použití postupné frakcionace byl obsah karboxylových skupin v nerozpuštěném zbytku (pH 12) asi devětkrát nižší než při frakcionaci přímé.

Spektroskopické charakteristiky podle Kumady [51] zařazují získané frakce vesměs do kategorie B. Poměry  $E_{4/6}$  vypovídají o vyšším obsahu alifatických skupin a nižší aromaticitě (u frakcí 2, 3 se tento poměr značně liší).

FT-IR spektra rozpouštěných frakcí i původního vzorku si byla značně podobná. Rozdíly byly shledány pouze v intenzitě některých píků, především vibrací karboxylových skupin při vlnové délce  $1720\text{ cm}^{-1}$ . Rozdíly těchto intenzit korelují s výsledky obsahu karboxylových skupin v jednotlivých frakcích.

Při studiu rozpustnosti získaných frakcí bylo potvrzeno, že rozpuštěné množství frakce ve vodě roste s koncentrací rozpouštěného vzorku. Absorbance se snižuje s rostoucí hodnotou pH použitého pufru, při které byl vzorek frakcionován. Po 24 hodinovém protřepávání frakcí ve vodě se ustálí pH všech rozpustných frakcí na hodnotách v rozmezí 1,8–2,6 v závislosti na koncentraci frakce. Nejnižších pH je vždy dosaženo pro nejvyšší koncentraci  $40\text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$ . Skutečnost, že pH nerozpuštěné frakce je vysoké (zůstává nad hranicí 10,6) společně s nízkými hodnotami vodivosti naznačují, že je v této frakci obsaženo velmi malé množství karboxylových skupin.

Součástí práce je i studium disociační a rozpouštěcí rovnováhy systému HK – voda. Pro všechny rozpuštěné frakce byly vypočteny hodnoty zdánlivé rovnovážné konstanty disociace kyselých skupin HK rozpuštěných ve vodě a konstanty úměrnosti mezi množstvím HK rozpuštěným ve vodě a množstvím za daných podmínek nerozpuštěným. Hodnota konstanty úměrnosti  $k$  je nejvyšší u frakce 4, což značí, že v této frakci je nejvyšší podíl rozpustných HK. Hodnota zdánlivé rovnovážné konstanty  $K$  je naopak nejvyšší pro frakci 6, nejnižší pro frakci 3, přičemž poměrně vysoké hodnoty dosahuje i u frakce 4. Rozpustné podíly frakcí 4 a 6 jsou tedy nejvíce disociovány.

## 6 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- [1] Klučáková, M.; Pekař, M.: Behaviour of partially soluble humic acids in aqueous suspension. *Colloids and surfaces*, 2008, vol. 318, s. 106–110.
- [2] Peña-Méndez, E.M.; Havel, J.; Patočka J.: Humic substances – compounds of still unknown structure: applications in agriculture, industry, environment, and biomedicine. *Journal of Applied Biomedicine*, 2005, vol. 3, s. 13–24, ISSN 1214-0287.
- [3] Kučerík, J.: *Study on lignite humic acids*. Ph.D. thesis. Brno: VUT, FCH, 2003.
- [4] Skybová, M., *Humínové kyseliny – přínos pre environmentálny výskum*, Acta Montanistica Slovaca, 2006, vol. 11, s. 362–366.
- [5] Veselá, L.; Kubal, M.; Kolzer, J.; Innemanová, P.: Struktura a vlastnosti přírodních huminových látek typu oxihumolitu. *Chemické listy*, 2005, vol. 99, s. 711–717.
- [6] Sedláček, P., *Difúze kovových iontů v huminových gelech*, Diplomová práce FCH VUT Brno, 2005.
- [7] SD – Humatex a.s., Huminové látky, [cit. 2007-12-24].  
Dostupné z: <<http://www.sdas.cz/showdoc.do?docid=244>>
- [8] Stevenson, F.J.: *Humus Chemistry: Genesis, composition, reactions*, 2nd ed. New York, Brisbane, Toronto, Singapore, 1994. ISBN 0-471-59474-1.
- [9] Shaban, I.S.; Mikula, V.: Impact of an Anion Surfactant Addition on Solubility of Humic Acid in Acid-Alkaline Solutions. *Chem. Papers*, 1998, vol. 52, no. 6, s. 753–755.
- [10] Piccolo, A.: The Supramolecular structure of humic substances, *Soil science*, 2001, vol. 166, no. 11, s. 810–832.
- [11] Bittner, M.: *Ecotoxicological Aspects of Humic Substance*. Ph.D. thesis, Faculty of Science MU Brno, 2007.
- [12] SD – Humatex a.s., Huminové látky, [cit. 2008-02-13].  
Dostupné z: <<http://www.humatex.cz/informace-o-huminovych-latkach.html>>
- [13] Dercová, K.; Sejáková, Z.; Barančíková, G.; Makovníková, J.; Růžička J.: Využitie organo-minerálneho komplexu pri bioremedácii kontaminovaných pôd. *Chemické listy*, 2007, vol. 101, s. 799–806.
- [14] Novák, J.; Kozler, J.; Janoš, P.; Šeříková, J.; Tokarová, V.; Madronová, L.: Humic acids from coals of the North-Bohemian coal field I. Preparation and characterisation. *Reactive & Functional polymers*, 2001, vol. 47, s. 101–109.
- [15] Sanjay, H.G.: *Development of HUMASORB<sup>TM</sup>, a Lignite Derived Humic Acid for Removal of Metals and Organic Contaminants from Groundwater*; Morgantown, 1996, online [cit. 2008-03-29] dostupné z:  
<<http://www.osti.gov/bridge/servlets/purl/492083-ibcDCo/webviewable/492083.pdf>>
- [16] Klučáková, M.: Interakce huminových kyselin s kovovými ionty v suspenzích. *Chemické listy*, 2003, vol. 97, no. 8, s. 687.
- [17] Výzkumná zpráva mezi konsorciem HUMING a Doly Biliny, 1991.
- [18] Heise, K.H.; Brendler, V.: Humic acids as object of environmental research, online [cit. 2008-01-12], dostupné z:  
<[http://www.humintech.com/001/articles/article\\_humic\\_acids\\_as\\_object\\_of\\_environmental\\_research.html](http://www.humintech.com/001/articles/article_humic_acids_as_object_of_environmental_research.html)>
- [19] Aiken, G.R., McKnight D.M., Wershaw R.L., Maccarthy, P.: Humic Substances in soil, sediment, and water. New York: J. Wiley, 1985. ISBN 0-471-88274-7.

- [20] Alvarez-Puebla, R.A.; Garrido, J.J.: Effect of pH on the aggregation of gray humic acid in colloidal and solid states. *Chemosphere*, 2005, vol. 59, s. 659–667.
- [21] Klučáková, M.; Pekař, M.: Uhlí a půdní remediace – netradiční spojení? *Chemické listy*, 2004, vol. 98, no. 8, s. 487 (Proc. 56. sjezdu chemických společností, Ostrava 2004). ISSN 0009-2770.
- [22] Sutton, R.; Sposito, G.: Molecular structure in soil humic substances: The new view. *Environmental science & technology*, 2005, vol. 39, no. 23, s. 9009–9015.
- [23] Klučáková, M.; Superatová, R.: Frakcionace huminových kyselin. *Chemické listy*, 2004, vol. 98, no. 8, s. 728 (Proc. 56. sjezdu chemických společností, Ostrava 2004).
- [24] Čechlovská, H.; Kislínger, J.; Pekař, M.; Kučerík, J.: Kinetika degradace frakcí huminových kyselin ve vztahu k jejich biologické dostupnosti. VII. Pracovní setkání fyzikálních chemiků a elektrochemiků, Přírodovědecká fakulta Masarykovy univerzity v Brně, 2007.
- [25] Kűchler, I. L.; Miekeley, N.: Ultrafiltration of humic compounds through low molecular mass cut-off level membranes, *The science of the total environment*, 1994, vol. 154, s. 23–28.
- [26] Přidal, J.; Separáční membrány a jejich průmyslové použití - dnešní trendy a vybrané moderní aplikace, *Chemické listy* 1999, s. 432–440
- [27] Sklenák, L.; *Preparativní a separáční metody*, Studijní text KFY PůF OU Ostrava, 2005.
- [28] Rigol, A.; Vidal, M.; Rauret, G.: Ultrafiltration–capillary zone electrophoresis for the determination of humic acid fractions. *Journal of Chromatography*, 1998, vol. 807, s. 275–284
- [29] Šmejkalová, D.; Kučerík, J.; Pekař, M.; Frakcionace lignitických huminových látek membránovou ultrafiltrací. In 56. sjezd chemických společností. *Sborník. Chemické listy*, 2004, vol. 98, no. 8, s. 601
- [30] Li, L.; Zhao, Z.; Huang, W.; Peng, P.; Sheng, G.; Fu, J.; Characterization of humic acids fractionated by ultrafiltration. *Organic Geochemistry*, 2004, vol. 35, s. 1025–1037.
- [31] Shin, H.S.; Monsallier, J.M.; Choppin, G.R.: Spectroscopic and chemical characterizations of molecular size fractionated humic acid. *Talanta*, 1999, vol. 50, s. 641–647.
- [32] Pouchlý, J.: *Fyzikální chemie makromolekulárních a koloidních soustav*, VŠCHT v Praze, 2001, ISBN 80-7080-422-X, 2. vydání.
- [33] Trubetskoj, O.A.; Trubetskaya, O.E.; Afanas'eva, G.V.; Rezníkova, O.I.; Saiz-Jimenez, C.: Polyacrylamide gel electrophoresis of soil humic acid fractionated by size-exclusion chromatography and ultrafiltration, *Journal of Chromatography*, 1997, vol. 767, s. 285–292.
- [34] Curtis, M.A.; Witt, A.F.; Schram, S.B.; Rogers, L.B.: Humic acid fractionation using a nearly linear pH gradient, *Anal. Chem.*, 1981, vol. 53, s. 1195–1199.
- [35] Kovář, J.; *Využití termoanalytických metod při studiu lignitických huminových látek* Diplomová práce FCH VUT Brno, 2003.
- [36] Kučerík, J.; Conte, P.; Pekař, M.; Piccolo A.: Conformational behaviour of lignite humic fractions separated by sequential pH-extractions. *Fresenius Environmental Bulletin*, 2003, vol. 12, no. 7, 683–688.

- [37] Brigante, M.; Zanini, G.; Avena, M.: On the dissolution kinetics of humic acid particles. Effect of pH, temperature and Ca<sup>2+</sup> concentration. *Colloids and Surfaces, A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 2007, vol. 294, s. 64–70.
- [38] Klučáková, M.; Pekař, M.; Solubility and dissociation of lignitic humic acids in water suspension. *Colloids and surfaces*, 2005, vol. 252, no. 2–3, p. 157–164. ISSN 0927-7757.
- [39] Brigante, M.; Zanini, G.; Avena, M.: On the dissolution kinetics of humic acid particles. Effect of monocarboxylic acids. *Chemosphere*, 2008, vol. 71, s. 2076–2081.
- [40] Böhm, A.; Smrčková-Voltrová, S.: *Strukturní analýza organických sloučenin*. 1. vydání, Praha: VŠCHT, 1995, ISBN 80-7080-235-9.
- [41] Klouda, P.; *Moderní analytické metody*, Ostrava, nakladatelství Pavel Klouda, 2003, ISBN 80-86369-07-2.
- [42] VŠCHT Praha, *Infračervená spektroskopie*, online [cit. 2007-12-28]., dostupné z: <<http://lms.vscht.cz/>>
- [43] Davis, W.M.; Erickson, C.L.; Johnston, C.T.; Delfino, J.J.; Porter, J.E.: Quantitative Fourier Transform Infrared spectroscopic investigation of humic substance functional group composition. *Chemosphere*, 1999, vol. 38, no.12, s. 2913–2928.
- [44] Klučáková, M.; *Rozpuštěnost huminových kyselin - teorie a praxe*, VI. Pracovní setkání fyzikálních chemiků a elektrochemiků, Přírodovědecká fakulta Masarykovy univerzity v Brně, 7. 2. 2006.
- [45] Peuravuori, J.; Žbáňková, P.; Pihlajam K.: Aspects of structural features in lignite and lignite humic acids, *Fuel Processing Technology*, 2006, vol. 87, s. 829–839.
- [46] Rowan, J.: *Elektroforéza*, online, poslední revize 29. 4. 2004, [cit. 2008-03-25] dostupné z: <<http://sweb.cz/biochemie/x/metody/elektroforeza.htm#gel>>
- [47] Martin, F.: Humic acid from lignite. 1. Analytical characteristics and thermal degradation. *Fuel Science and Technology*, 1975, vol. 54, s. 236–240.
- [48] Popl, M., a kol.: *Instrumentální analýza*. Praha: SNTL 1986.
- [49] Simpson, A.J.; Watt, B.E.; Graham, C.L.; Hayes, M.H.B.; Humic substances from Podzols under Oak forest and a cleared forest site 1. Isolation and characterisation. in *Humic Substances, Peats and Sludges Health and Environmental Aspects*. Ed. T. M. Hayes and W. S. Wilson. The Royal Society of Chemistry, 1997.
- [50] Zaujec, A., Gonet, S. S., Bielek, P.: *Humic Substances in Ecosystems*. 1. vydání. Výzkumný ústav půdoznalectva a ochrany půdy v Bratislave a Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre, 1998.
- [51] Kumada, K.: *Chemistry of soil organic matter*, Japan Scientific Societies Press, Tokyo, 1987.
- [52] Senesi, M.; Miano, T.D.: Humic Substances in the Global Environment and Implications on Human Health. *Elsevier*, 1994, vol.6, 201–202.
- [53] Senesi, N., Loffredo, E.: *The Chemistry of Soil Organic Matter*. Sparks, Soil Physical Chemistry. *CRC Press, Boca Raton*, 1999, s. 242–345.
- [54] Pekař, M., Klučáková, M.: Alternativní neenergetické aplikace lignitu, *CHEMagazín*, 2003, roč. XIII, č. 1, s. 8–10.
- [55] Šárka, E.: *Membránové separace*, online [cit. 2008-02-15], dostupné z: <<http://www.vscht.cz/sch/www321/membrany.html>>
- [56] VŠCHT Praha: *Separace v biotechnologiích*, online [cit. 2007-12-20], dostupné z <<http://www.vscht.cz/kch/kestazeni/sylaby/separ.pdf>>

- [57] Vlachová, K.: *Vliv huminových látek na toxicitu komplexních vzorků ze životního prostředí*, Bakalářská práce, MU Brno, Přírodovědecká Fakulta, 2007.
- [58] Kipton, H.; Powell, J.; Town, R.M.: Solubility and fractionation of humic acid; effect of pH and ionic medium, *Analytical Chimica. Acta*, 1992, vol. 267, s. 47–54.
- [59] Pilný, O.: *Rozpuštěnost lignitických huminových kyselin*. Diplomová práce, VUT FCH, 2006.
- [60] International Humic Substances Society, *IHSS Bulk Source Materials*, [cit. 2008-03-06]. Dostupné z <<http://www.ihss.gatech.edu>>
- [61] Böhm, S.; Smrčková-Voltrová, S.: *Structure analysis of organic compounds*. Institute of Chemical Technology, Praha: s. 145–152, 1995.
- [62] Mikulášková, B.: *Studium zpracování jihomoravského lignitu fyzikálními a chemickými procesy*, Disertační práce na VUT FCH, Brno, 1997.

## 7 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

BHA	hnědé huminové kyseliny
CZE	kapilární elektroforéza
DOC	rozpuštěný organický uhlík
DSC	diferenční skenovací kalorimetrie
EPR	elektronová paramagnetická rezonance
FK	fulvinové kyseliny
FT	Fourierova transformace
GHA	šedé huminové kyseliny
GPC	gelová permeační chromatografie
HL, HS	huminové látky
HK	huminové kyseliny
HPSEC	vysokotlaká rozměrově vylučovací chromatografie
HU	huminy
IČ, IR	infračervená oblast spektra elektromagnetického záření
IHSS	Mezinárodní asociace pro huminové látky
MSP	membránově separační procesy
NMR	nukleární magnetická rezonance
PAGE	elektroforéza v polyakrylamidovém gelu
SEC	rozměrově vylučovací chromatografie
SDS	dodecylsulfát sodný
UF	ultrafiltrace
UV	ultrafialová oblast spektra elektromagnetického záření
VIS	viditelná oblast spektra elektromagnetického záření

## **8 SEZNAM PŘÍLOH**

- Příloha 1: fotografie původního vzorku lignitických huminových kyselin
- Příloha 2: fotografie zvětšených částic nerozpuštěného zbytku HK

## 9 PŘÍLOHY

Příloha 1: *Původní vzorek lignitických huminových kyselin (zvětšeno 5×)*



Příloha 2: *12× zvětšené částice nerozpuštěného zbytku (N)*

