

VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ
ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE

FACULTY OF CHEMISTRY
INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

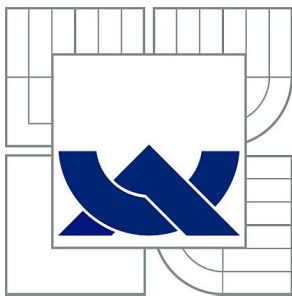
STANOVENÍ OBSAHU HUMINOVÝCH KYSELIN V ROZTOCÍCH
CHRONOPOTENCIOMETRICKY

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE
BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE
AUTHOR

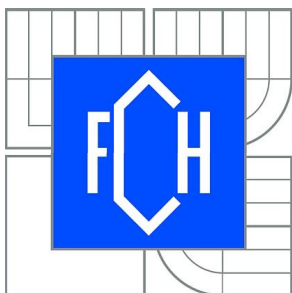
JANA VIKTORINOVÁ

BRNO 2011



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA CHEMICKÁ

ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE

FACULTY OF CHEMISTRY

INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

STANOVENÍ OBSAHU HUMINOVÝCH KYSELIN V ROZTOCÍCH CHRONOPOTENCIOMETRICKY

DETERMINATION OF CONTENT OF HUMIC ACIDS IN SOLUTIONS
CHRONOPOTENTIOMETRICALLY

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

JANA VIKTORINOVÁ

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

doc. Ing. MARTINA KLUČÁKOVÁ,
Ph.D.

BRNO 2011



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

Zadání bakalářské práce

Číslo bakalářské práce:	FCH-BAK0532/2010	Akademický rok: 2010/2011
Ústav:	Ústav fyzikální a spotřební chemie	
Student(ka):	Jana Viktorinová	
Studijní program:	Chemie a chemické technologie (B2801)	
Studijní obor:	Spotřební chemie (2806R002)	
Vedoucí práce	doc. Ing. Martina Klučáková, Ph.D.	
Konzultanti:		

Název bakalářské práce:

Stanovení obsahu huminových kyselin v roztocích chronopotenciometricky

Zadání bakalářské práce:

1. Shromáždit literární poznatky o struktuře huminových kyselin a jejich funkčních skupinách.
2. Seznámit se s metodou chronopotenciometrie.
3. Navrhnout a provést základní experimenty pro stanovení obsahu kyselých funkčních skupin v huminových kyselinách.
4. Zhodnotit výsledky.

Termín odevzdání bakalářské práce: 6.5.2011

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

Jana Viktorinová
Student(ka)

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

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
Ředitel ústavu

V Brně, dne 31.1.2011

prof. Ing. Jaromír Havlica, DrSc.
Děkan fakulty

ABSTRAKT

Huminové kyseliny patří do skupiny huminových látek, což jsou látky přírodního původu vyskytující se v půdách, rašelinách sedimentech a mladých uhlí. Tyto látky jsou směsí sloučenin různých molekulových hmotností a struktury. Huminové kyseliny jsou ve vodných roztocích pouze částečně rozpustné a jejich rozpustnost stoupá s rostoucí hodnotou pH.

Bakalářská práce využívá v huminovém výzkumu dosud nepoužívanou metodu chronopotenciometrické titrace a jejím cílem je ověřit možnosti uplatnění této metody pro stanovení koncentrace rozpuštěných huminových kyselin. Touto metodou se určují zejména stopové koncentrace analytu. Výsledky získané chronopotenciometrickou titrací jsou srovnány s výsledky běžně používaných metod jako UV/VIS spektrometrie a potenciometrie.

ABSTRACT

Humic acids are part of humic substances, which are substances of natural origin occurring in soil, peats, sediments and young coal. These substances are mixture of compounds with different molecular weight and structures. Humic acids are only partially soluble in aqueous solutions and their solubility is growing up with increasing pH value.

Bachelor thesis uses method of chronopotentiometric titration, which has not been used yet for humic research. This bachelor thesis is trying to check possibility of exercise this method for assessment concentration of soluble humic acid. Especially trace amounts of analyt are measured by this method. Results obtained by chronopotentiometric titration are compared with results in common used method as UV/VIS spetctromerty and potentiometry.

Klíčová slova

Huminové kyseliny, chronopotenciometrie, disociace, rozpustnost

Keywords

Humic acids, chronopotentiometry, dissociation, solubility

VIKTORINOVÁ, J. *Stanovení obsahu huminových kyselin v roztocích chronopotenciometricky*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2011. 40 s. Vedoucí bakalářské práce doc. Ing. Martina Klučáková, Ph.D..

PROHLÁŠENÍ

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

.....

Podpis autora

Poděkování:

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

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

OBSAH

1. ÚVOD.....	6
2. CÍL PRÁCE.....	7
3. TEORETICKÁ ČÁST.....	8
3.1 Huminové látky.....	8
3.2 Huminové kyseliny	8
3.2.1 Vznik a výskyt huminových kyselin	8
3.2.2 Vlastnosti a struktura huminových kyselin	8
3.2.3 Funkční skupiny huminových kyselin.....	10
3.3 Metody stanovení acido-bazických vlastností huminových kyselin	11
3.3.1 Obsah funkčních skupin	11
3.3.2 Stanovení disociačních konstant	13
3.4 Použité metody stanovení.....	14
3.4.1 UV/VIS spektroskopie	14
3.4.2 Chronopotenciometrická titrace.....	15
4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	16
4.1 Použité přístroje	16
4.2 Použité chemikálie	16
4.3 Izolace huminových kyselin	16
4.4 Stanovení obsahu kyselých funkčních skupin	16
4.5 Pracovní postup.....	17
4.5.1 Příprava roztoků organických kyselin.....	17
4.5.2 Příprava výluhů huminových kyselin.....	17
4.5.3 Měření na Istranu pomocí chronopotenciometrické titrace	19
5. VÝSLEDKY A DISKUZE.....	20
5.1 Jednoduché organické kyseliny	20
5.1.1 Stanovení pH jednoduchých organických kyselin	20
5.1.2 Stanovení koncentrace jednoduchých organických kyselin	21
5.2 Huminové kyseliny	27
5.2.1 Stanovení pH huminových kyselin	27
5.2.2 Měření absorpance huminových kyselin	28
5.2.3 Stanovení koncentrace huminových kyselin	30
6. ZÁVĚR.....	34
7. SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ.....	35
8. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ	38
9. PŘÍLOHY	39

1. ÚVOD

Huminové látky vznikají rozkladným procesem rostlin a tkáněmi živočichů, tento proces se nazývá humifikace. Tyto látky se nacházejí ve vodách, půdách, sedimentech, uhlí a rašelinách. Huminové látky se nejčastěji dělí podle své rozpustnosti na huminové kyseliny (rozpustné v alkalickém prostředí, ale nerozpustné v kyselém prostředí), fulvinové kyseliny (rozpustné v obou prostředích) a huminy (nerozpustné v obou prostředích).

Huminové kyseliny jsou vysokomolekulární organické sloučeniny, které ve své struktuře obsahují aromatické cykly a velké množství funkčních skupin, nejvíce však karboxylové a fenolické. Struktura huminových kyselin je velmi rozmanitá a liší se podle původu, naleziště, ale i doby odběru vzorku, neboť huminové látky se chovají jako živý organismus a za vhodných podmínek mohou měnit svou strukturu. Mají amfifilní charakter, který umožňuje huminovým kyselinám snadný transport v životním prostředí.

2. CÍL PRÁCE

Cílem této bakalářské práce bylo zavést do huminového výzkumu metodu chronopotenciometrická titrace pro stanovení obsahu karboxylových skupin frakcí humnových látek rozpuštěných ve vodných roztocích. Dílčím cílem bylo pomocí jednoduchých organických kyselin určit limity této metody z hlediska koncentrace a pK_a .

3. TEORETICKÁ ČÁST

3.1 Huminové látky

Huminové látky jsou produkty biochemického rozkladu organických rostlinných i živočišných látek, jejichž konečnou fází rozkladu je humus. [1]

Huminové látky se ve vodách tvoří humifikačními reakcemi odumřelých rostlin a živočichů. [2]

Huminové látky jsou složité vysokomolekulární polycyklické sloučeniny tmavohnědého zbarvení, které představují komplex organických látek, produktů kondenzace aromatických látek fenolového typu s aminokyselinami a bílkovinami. I přes rozsáhlé výzkumy není však jejich struktura dosud přesně známa. Názory jednotlivých autorů se dokonce značně rozcházejí. [3]

Huminové látky se podle fyzikálně-chemických a chemických vlastností dělí na:

1. Humusové kyseliny
 - a. Huminové kyseliny – jsou rozpustné v zásaditém prostředí, ale nerozpustné v prostředí kyselém
 - b. Fulvokyseliny – jsou rozpustné jak v zásaditém prostředí, tak v prostředí kyselém
 - c. Hymatomelanové kyseliny
2. Huminy
3. Humusové uhlí [2,3]

3.2 Huminové kyseliny

3.2.1 Vznik a výskyt huminových kyselin

Rozkladnými a syntetickými pochody se z odumřelé rostlinné a živočišné hmoty v půdě tvoří tzv. humus, tmavě zbarvená amorfni organická složka půdy. Humifikuje se zhruba polovina primární organické hmoty, zbytek se mineralizuje. Odlišuje se půdní a vodní humus, který se svým složením poněkud liší. Vodní humus vzniká rozkladem planktonu a vodních rostlin. Huminové kyseliny se z humusu získají extrakcí do vody a poté vysrážením v kyselém prostředí, kdy vznikají tak zvané agregáty. Huminové kyseliny v zásaditém prostředí tvoří převážně pravé roztoky. [4]

V dnešní době se huminové kyseliny připravují i synteticky (HULIS). HULIS připravené v rámci této práce [8] se nechovaly jako polyelektrolyty. Autoři uvádějí, že na každém z jejich řetězců byla přítomna pouze jedna disociovatelná karboxylová skupina.

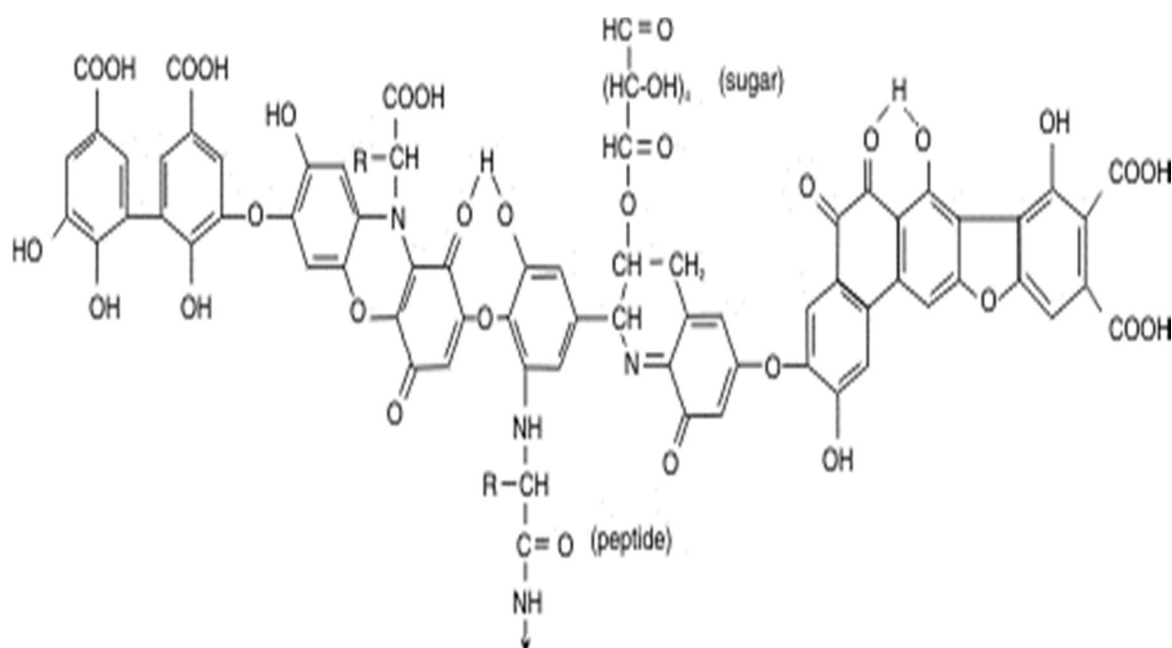
3.2.2 Vlastnosti a struktura huminových kyselin

Huminové kyseliny jsou slabě disociované, vícesytné organické kyseliny. Hodnoty disociačních konstant se pohybují obvykle v rozmezí 10^{-4} - 10^{-5} . Hodnoty pH jejich roztoků jsou přibližně 3,5 v závislosti na koncentraci. V roztocích se chovají jako micelární koloidy. Koloidní částice mají záporný náboj a jejich izoelektrický bod leží v kyselé oblasti. V silně alkalických roztocích tvoří převážně pravé roztoky. Můžeme je získat i vyluhováním zásaditými roztoky a vysrážením v kyselém prostředí.

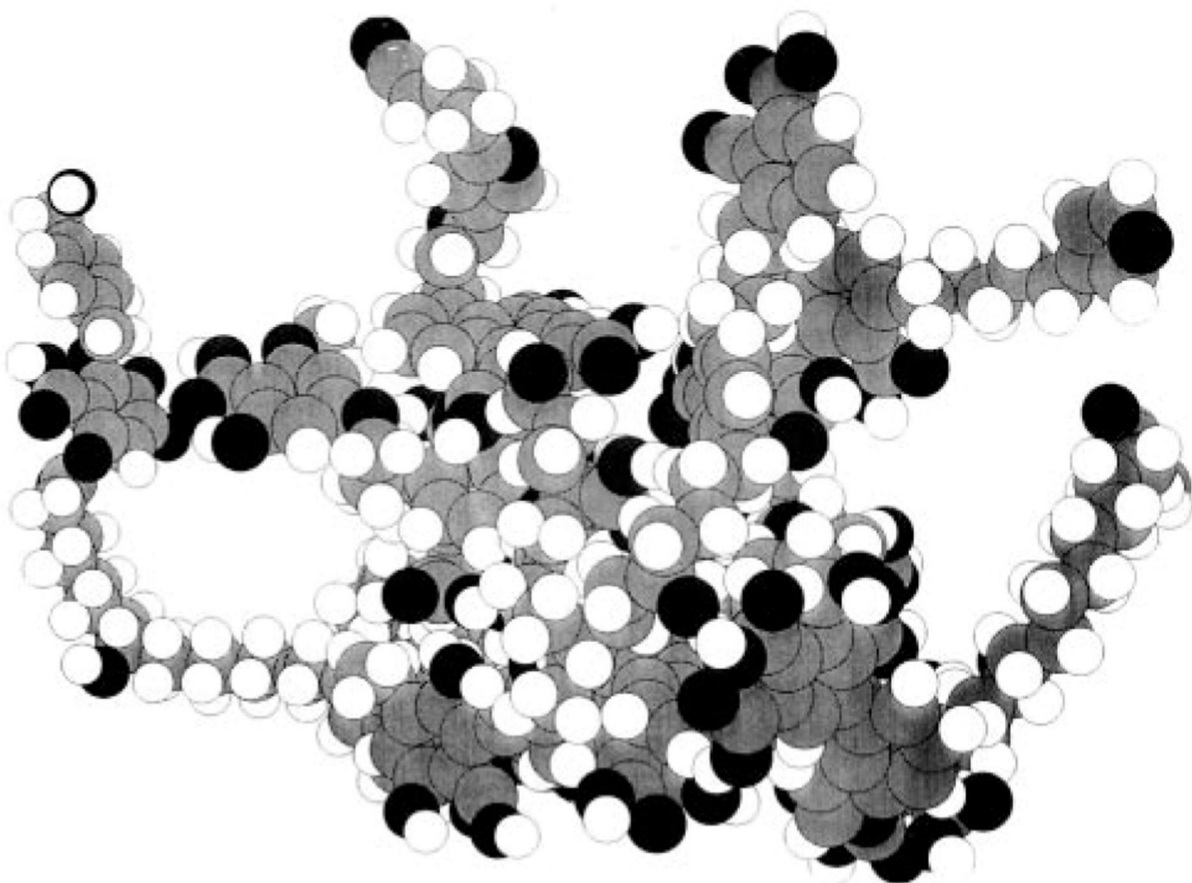
Struktura huminových kyselin je velmi rozmanitá a liší se podle původu, naleziště, ale i doby odběru vzorku, neboť huminové látky se chovají jako živý organismus a za vhodných podmínek mění svou strukturu. Tento cyklus přeměny struktury je důležitou součástí půdotvorných procesů.

Jeví se jako netavitelné amorfnní sloučeniny kyselého charakteru, které při karbonizaci neposkytují dehet, ale poskytují velké množství CO_2 . Jsou nehydrolyzovatelné, peptizovatelné za normálních teplot a mají velkou odolnost vůči rozkladu. V roztocích se chovají jako lyofobní koloidy se značnou sorpční schopností. Vyznačují se vysokým obsahem vody, kterou nelze mechanicky odstranit. [20]

Za základní strukturní jednotku huminových kyselin můžeme považovat cyklické sloučeniny, nejčastěji aromatické s bočními řetězci a hydrofilními skupinami vázanými na jádře i bočních řetězcích. Našli se i chinoidní struktury. Přítomné jsou i heterocyklické sloučeniny, jako derivátu furanu, pyridinu, indolu, purinu a pirimidinu. Jde o nakondenzované anebo můstkové systémy. [7]



Obr. 1 Modelová struktura huminových kyselin (Stevenson 1982)



Obr. 2 Počítačový model huminové kyseliny (Stevenson)

3.2.3 Funkční skupiny huminových kyselin

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

Elementární analýza huminových látek poskytuje informace o distribuci hlavních prvků (C, H, O, N, S). Proto původní struktury můžeme dedukovat jen po frakční analýze huminových kyselin. Analýza funkčních skupin osvětluje výskyt hlavních funkčních skupin (COOH, OH a C=O) v huminových materiálech a určují index jejich reaktivity. Tato analýza

je důležitá na určení struktury jednotlivých subjednotek a charakteru funkčních skupin v nich obsažených a taky na určení jejich vzájemné vazby v makromolekule. [3]

Obsah karboxylových skupin v molekule huminových látek je důležitý, protože ovlivňují rozpustnost sloučeniny ve vodě, která je součástí atmosférických a povětrnostních procesů i procesů týkajících se životního prostředí.[8]

Tabulka 1 *Obsah funkčních skupin v huminových kyselinách [3]*

Skupina	Huminové kyseliny [mmol/mol]*
-OCH ₃	0,2
-OH (celkové)	5,1
-OH (fenolové)	2,9
-OH (alkoholové)	2,2
>C=O	5,5
-COOH	8,6

*mmol funkční skupiny na mol huminové kyseliny

Tabulka 2 *Obsah hlavních prvků v huminových kyselinách [3]*

Prvek	Huminové kyseliny [% hm]
C	50-60
O	30-35
H	4-6
N	2-4
S	0-2

3.3 Metody stanovení acido-bazických vlastností huminových kyselin

3.3.1 Obsah funkčních skupin

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

- *Tradiční baryum-hydroxidová metoda* – je založena na reakci huminové kyseliny s hydroxidem barnatým, kdy reakcí vznikají barnaté soli huminové kyseliny a voda. Nadbytečný hydroxid barnatý je pak následně titrován standardní kyselinou. Výsledky však byly získány pouze v určitých substituentech fenolu a ve fenolformaldehydových pryskyřicích. Při této metodě byla pozorovaná špatná analytická přesnost, která byla přisuzována karbonaci. Výsledky byly nižší díky nevytvoření sraženiny solí barya při reakci slabě kyselé sloučeniny s hydroxidem barnatým. Velice rozšířená je nepřímá metoda, která byla používána na stanovení uhlí a poté byla přizpůsobena na huminové látky. Nejdříve byly slabé kyseliny disociovány a vysráženy. Nezreagované –OH⁻ byly odfiltrovány a poté titrovány standardní kyselinou až do pH 8,4. [9,10,11]

- *Potenciometrická titrace* – Při této metodě se nejprve huminové látky okyselí na pH 4 a poté se titrují do bodu ekvivalence. Tato metoda způsobuje hydrolýzu, oxidační reakci a elektrodovou interferenci v silně alkalických roztocích. Tato metoda je přesnější na stanovení celkové kyselosti huminových látek. Wright a Schnitzer titrovali huminové přípravky s bezvodým epoxidem sodným za použití pyridinu, dimethyl formamidu nebo etylen diaminu jako rozpouštědla. Většina křivek ukázala pouze jeden ohyb, který odpovídal celkové kyselosti. [5,9,10,12]
V práci [6] autoři používali nelineární metodu na stanovení koncentrace a na stanovení hodnoty pK_a . Získaná data byla také zpracována lineární metodou na základě Granovy funkce. V této práci bylo v obou případech přistupováno k huminovým kyselinám jako k jednosytným kyselinám. Výsledky titrací byly porovnány s výsledky různých metod a zjistilo se, že huminové kyseliny s 5–6 vazebnými místy byly nejlépe stanovitelné pomocí potenciometrické titrace.
- *Bezvodá titrační metoda* – Tato metoda zahrnuje konduktometrické titrace suspenzí huminových nebo fulminových kyselin v acetonu s roztokem hydroxidu draselného v izopropylalkoholu v dusíkaté atmosféře. Získané hodnoty jsou srovnatelné s již dříve zmíněnou baryovou metodou. [13]

Karboxylové skupiny – Stanovují se pomocí kalcium-acetátovou metodou, kdy při reakci s huminovými kyselinami vzniká kyselina octová. Vzniklá kyselina octová je potenciometricky titrována standardizovaným roztokem hydroxidu sodného (skleněná kalomelová elektroda). Další metodou je jodometrická titrace dávající vyšší hodnoty než kalcium-acetátová metoda, ale výsledky nejsou reprodukovatelné. [6,10]

Všechny hydroxylové skupiny – Acetylace s acetanhydridem v pyridinu se používá pro odhad celkových OH skupin. Přebytek anhydridu je hydrolyzován na kyselinu octovou, která je poté titrována standardizovanou zásadou. [10]

Fenolické hydroxylové skupiny – Pro odhad se používá upravený Ubaldiniho postup, který zahrnuje refluxování huminových látek s alkoholickým roztokem hydroxidu sodného. Přebytké alkálie jsou odděleny filtrací, zbytek byl promyt a suspendován v 85% alkoholu s nasyceným oxidem uhličitým. Suspenzní roztok se filtruje, promývá a kapalná fáze je titrována odměrným roztokem ke stanovení uhličitánu draselného. [6,10]

Alkoholické hydroxylové skupiny – Na stanovení těchto skupin máme několik metod. Tyto skupiny jsou méně reaktivní než fenolické. Obsah alkoholických hydroxylů se vypočítá tak, že se od celkového obsahu hydroxylových skupin odečte obsah fenolických hydroxylových skupin. [10]

Karbonylové skupiny – Postup podle Fritze je založen na reakci huminové kyseliny v metanol-2-propanolu s přebytkem hydroxylaminu. Nezreagovaný hydroxylamin je titrován standardizovaným roztokem kyseliny chloristé. Schnitzer a Skinner rozvíjí polarografickou

metodu. Humínové látky jsou rofluxovány s přebytkem 2,4-dinitrophenylhydrazinu v okyseleném etanolu. Následuje polarografické stanovení činidla v přebytku. Obsah se poté vypočte z množství spotřebovaného činidla. Metoda podle Browna pro odhad C=O na základě jejich redukce $-\text{CH}_2\text{OH}$ s boranem sodným (NaBH_4). Redukce je prováděna v alkalickém prostředí a vodík je uvolněný z nepoužitého NaBH_4 je odhadnut manometricky. [10]

Methoxylové skupiny – Upravená Zeiselova metoda. Methoxy skupina je oddělena vařícím jodovodíkem a vzniká methyljodid. Poté je oxidován bromem na kyselinu jodovou. Toto je zpracováno s přebytkem jodidu draselného v kyselém roztoku, kde je obsažený jod, který se určí titrací standardizovaným roztokem thiosíranu sodného. [10]

3.3.2 Stanovení disociačních konstant

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



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

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

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

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

Čím vyšší je hodnota $\text{p}K_a$, tím je nižší stupeň disociace. Silná kyselina se úplně disociuje ve vodných roztocích. Hodnota disociační konstanty se mění v závislosti na teplotě. [28]

Jelikož jsou humínové kyseliny polyelektrolyty, tak jednotlivé karboxylové i fenolické OH skupiny mají různě kyselé disociační konstanty. Tyto disociační konstanty se mění (kolísají), z tohoto důvodu se používají průměrné hodnoty disociačních konstant. Na zjištění jejich $\text{p}K$ hodnot se používají titrační metody [14]

Ve většině přírodních vod se při běžných hodnotách pH humínové látky vyskytují jako negativně nabitě, povrchově aktivní makromolekuly. Jejich záporný náboj je dán přítomností funkčních skupin, zejména karboxylových a hydroxylových. Přítomnost těchto skupin vázaných na humínovém skeletu je i jednou z příčin kyselosti vod s kyselou koncentrací humínových látek. Zejména karboxylové skupiny mají relativně silně kyselý charakter (disociační konstanty jsou řádu $10^{-2} - 10^{-5}$), zatímco hydroxylové skupiny jsou jen slabě kyselé (disociační konstanty řádu $10^{-9} - 10^{-11}$). [22]

Zdánlivá disociační konstanta bývá vypočítávána z potenciometrické titrace s upravenou Henderson-Hasselbachovou rovnicí. Tato rovnice se nejčastěji používá pro analýzu potenciometrických titračních křivek slabých polykarboxylových kyselin: [5,25]

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

V případě, že je stupeň disociace $\alpha = 0,5$, pak $pK_a = pH$

V práci [16] se disociační konstanta vypočítala pomocí automatické potenciometrické titrace z důvodu nízké koncentrace vzorku v roztoku. U této titrace se zaznamenává přesná spotřeba titračního roztoku a výsledné pH.

Existují i nepřímé techniky, které se používají na přibližné určení disociační konstanty. Tyto techniky využívají isosbestického bodu při spektrálních metodách, a to tak, že se připraví roztoky stejné látky, ale v jiném prostředí (kyselé, neutrální, alkalické), nebo se připraví více roztoků o jiném pH. Isosbestický bod je bod protnutí všech absorpčních spekter. Závislost absorbance kterékoliv formy kyseliny (disociované i nedisociované) na pH má tvar sigmoidální křivky symetrické podle bodu inflexe. V bodě inflexe platí: $pK_a = pH$ [15,23,24]

3.4 Použité metody stanovení

3.4.1 UV/VIS spektroskopie

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

Měření absorbance se hojně využívá k určení koncentrace sloučenin s chromofory. Pracuje se obvykle metodou kalibrační křivky. UV/VIS spektrometrie je využívána v průtočných celách detektorů různých separačních metod. Měření je prováděno buď při vhodné vlnové délce, nebo jsou snímána celá spektra v krátkých časových intervalech. [17]

Ve viditelné oblasti (400-800 nm) jsou adsorpční spektra neutrálního, alkalického a kyselého vodného roztoku huminových kyselin nevýrazné, neukazují žádné maxima ani minima.[10]

UV–VIS spektroskopie se nejčastěji využívá pro charakterizaci kvality humusových látek. HK mají vysokou schopnost světelné absorbance v UV–VIS oblasti, proto můžeme použít elektronová absorpční spektra pro charakteristiku těchto makromolekulárních látek a přibližně určit chemickou strukturu a typy vazeb v molekule.[26] Spektrální čáry představují závislost absorbance HK na vlnové délce a jejich tvar závisí na chemickém složení HK (tj. intenzitě zbarvení měřeného roztoku). Čím více klesá absorbance roztoku HK, tím strmější tvar křivka má a tím vyšší hodnoty má barevný index ($Q_{4/6}$).[26] Hodnota barevného indexu $Q_{4/6}$ je dána poměrem absorbance HK při vlnové délce 465 nm a 665 nm. Hodnota $E_{4/6}$ představuje poměr absorbance HK při vlnové délce 400 nm a 600 nm.

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

- Typ A představuje huminové kyseliny s vysokým stupněm humifikace (hodnoty $\Delta \log K$ do 0,60). Huminové kyseliny v této skupině jsou vysoce stabilní, mají vysokou molekulovou hmotnost a vysoký stupeň kondenzace aromatických skupin.

- Typ *B* je skupina huminových kyselin s hodnotou $\Delta \log K$ od 0,60 do 0,80. Tyto huminové kyseliny mají nižší molekulovou hmotnost a nižší stupeň humifikace.
- Typ *Rp* představuje huminové kyseliny s hodnotou $\Delta \log K$ od 0,80 do 1,10. Tato skupina obsahuje huminové kyseliny s ještě nižší molekulovou hmotností a s nižším stupněm humifikace a vysokým obsahem alifatických skupin.[27]

3.4.2 Chronopotenciometrická titrace

Pro účely stanovení obsahu H^+ iontů lze využít modifikované chronopotenciometrické metody, při nichž se v podstatě měří časová závislost potenciálu měrné elektrody. Tato elektrochemická metoda je založena na stanovení zejména stopových koncentrací látek, které se vylučují na pracovní elektrodě a zpětně jsou rozpustitelné konstantním proudem. Ze změny potenciálu pracovní elektrody se určí doba trvání rozpuštění vyloučené látky (chronopotenciometrický přechodový čas), která je úměrná koncentraci analytu v analyzovaném vzorku.

SCP – galvanostatická rozpouštěcí (stripping) chronopotenciometrie je dvojfázová analytická metoda, kde v první fázi se na povrchu pracovní elektrody z tekoucího roztoku vzorku vyloučí při konstantním potenciálu, nebo při konstantním proudu analyt, který se v druhé fázi konstantním proudem rozpustí, přičemž se registruje změna potenciálu pracovní elektrody v průběhu rozpouštění, $E=f(t)$. Změna potenciálu od času má tvar oxidačně-redukční titrační křivky, čímž ve skutečnosti je. Z této závislosti je možné zjistit hodnotu tzv. přechodového času. Naměřené hodnoty potenciálu se ukládají do paměti počítače systémem „memory mapping“, tj. načítané a digitalizované hodnoty potenciálu se pokládají za adresy paměťových jednotek, kterých nominální hodnota se inkrementuje, $dt/dE=f(t)$. Vlny v původním záznamu odpovídající rozpuštění určité látky se mění na píky, kterých plocha udává přechodový čas. [18,19]

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Použité přístroje

průtokový analyzátor EcaFlow model 150 GLP
UV/VIS spektrofotometr HITACHI U-3900H
pH metr METTLER TOLEDO, Seven Easy
konduktometr Hanna HI 8820 N
přístroj CHNSO Mikroanalyzátor Flash 1112, Carlo Erba

4.2 Použité chemikálie

Síran sodný dekahydrát (PENTA, spol. s.r.o.)
Kyselina chlorovodíková (Lach-Ner, s.r.o.)
Kyselina benzoová (LACHEMA, s.r.o.)
Kyselina citronová monohydrát (ONEX, spol. s.r.o.)
Kyselina octová (Lach-Ner, s.r.o.)
Kyselina šťavelová (LACHEMA, s.r.o.)
Kyselina ftalová (Fluka, s.r.o.)
Kyselina salicylová (LACHEMA, s.r.o.)
Huminové kyseliny

4.3 Izolace huminových kyselin

60 g lignitu (lokalita Mikulčice, ČR) bylo zalito 2 dm³ extrakčního roztoku o složení 0,1 M NaOH + 0,084 M · Na₄P₂O₇ · 10 H₂O. Extrakce probíhala přes noc v inertní dusíkové atmosféře za stálého protřepávání. Následující den byl roztok zfiltrován přes hustou tkaninu a tuhý zbytek po filtraci byl znovu extrahován, tentokrát pouze 60 min. Poté byla opět provedena filtrace. Oba filtráty byly spojeny a opatrně okyseleny 20% HCl do pH = 1. Roztok byl ponechán v lednici přes noc odstát. Druhého dne byla odsáta kapalina nad usazeninou, zbytek byl 10 minut odstředěn v centrifuze při 4000 otáčkách za minutu a termostatu nastaveném na 10°C. Usazenina byla třikrát promyta kyselinou chlorovodíkovou o koncentraci 0,1 – 0,2 M a pH ≤ 1 a jednou destilovanou vodou. Nakonec byly získané huminové kyseliny vysušeny při 50°C. Takto získaný vzorek byl následně přečištěn následujícím postupem. 1 g huminové kyseliny byl zalit 250 ml roztoku kyseliny chlorovodíkové a fluorovodíkové v poměru: 10 ml konc. HCl + 20 ml konc. HF + 1970 ml H₂O. Tento roztok byl ponechán 24 hodin třepat a následně byl odstředěn. Po dekantaci byla usazenina znovu zalita roztokem HCl + HF a 24 hodin protřepávána. Roztok byl znovu slit a usazenina promývána vodou, dokud nebyla zkouška AgNO₃ na Cl⁻ negativní. Poté byly získané huminové kyseliny vysušeny při 50°C.

4.4 Stanovení obsahu kyselých funkčních skupin

Pro stanovení celkové kyselosti byla použita metoda konduktometrické titrace. Byla připravena vodná suspenze huminových kyselin (20 g/dm³) a ponechána 24 hodin třepat. Titrace byla provedena celkem třikrát, vždy v objemu 25 ml standardizovaným roztokem 1M NaOH.

Obsah karboxylových skupin byl stanoven metodou octanu vápenatého. 50 mg huminové kyseliny bylo naváženo do kádinky o objemu 100 ml a zalito 25 ml vody a 25 ml 0,81 M roztoku octanu vápenatého. Kádinky byly uzavřeny parafilmem a ponechány 24 hodin třepat. Druhý den byl roztok zfiltrován a filtrát doplněn destilovanou vodou v odměrné baňce na objem 100 ml. Tento roztok byl titrován 0,1 M NaOH do pH 9,8, které je považováno za bod ekvivalence. Byl rovněž proveden tzv. slepý pokus (stejný postup ale bez huminových kyselin).

Tabulka 3 Charakterizace použitých huminových kyselin

celková kyselost (mmol/g)	COOH (mmol/g)	popel (hm. %)	vlhkost (hm. %)	prvkové složení (at. %)*				
				C	H	O	N	S
7,01	4,39	2,13	5,53	42,76	41,31	14,73	0,87	0,34

* přepočteno na suché bezpopelové HK

Elementární analýza (prvkové složení) byla provedena na přístroji CHNSO Mikroanalyzátor Flash 1112 (Carlo Erba), tato analýza byla spolu se stanovením obsahu popela a vlhkosti provedena v Ústavu struktury a mechaniky hornin AVČR v Praze

4.5 Pracovní postup

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

4.5.1 Příprava roztoků organických kyselin

Roztoky organických kyselin byly připraveny tak, že bylo naváženo potřebné množství organické kyseliny, která byla rozpuštěna v roztoku R-022. Výsledný objem roztoku byl 100 ml. U těchto roztoků bylo změřeno jejich pH.

Jednosytné kyseliny (salicylová, benzoová a octová) byly připraveny v koncentracích 5, 10 a 20 mM. Dvojsytné kyseliny (šťavelová a ftalová) byly připraveny v koncentracích 2,5; 5; 10 a 20 mM, tj. s obsahem COOH skupin v roztocích 5, 10, 20 a 40 mM. Trojsytná kyselina citronová byla připravena v koncentracích 1,66; 3,33; 5; 6,66; 10 a 20 mM, tj. s obsahem COOH skupin v roztocích 5, 10, 15, 20, 30 a 60 mM. U všech látek tak byly použity jednak stejné koncentrace kyselin a stejné koncentrace COOH skupin.

4.5.2 Příprava výluhů huminových kyselin

Suspenze huminových kyselin byly připravovány tak, že se navážilo určité, předem dané množství huminových kyselin, které byly extrahovány v daném množství roztoku R-022. Každé navážené množství huminových kyselin bylo extrahováno v roztoku po dobu jednoho týdne. Suspenze byla poté přefiltrována přes mikrofiltr 0,35 µm pomocí injekční stříkačky. Po přefiltrování bylo u každého roztoku změřeno pH a poté byla změřena UV/VIS spektra

v rozsahu 200 – 900 nm. Byly připraveny tři sady vzorků huminových kyselin. Zadané navážky, přesné navážky a množství roztoku R-022 jsou uvedeny v následujících tabulkách.

Tabulka 4 *První sada vzorků*

zadaná navážka [g]	přesná navážka [g]	množství R-022 [ml]	koncentrace [g/dm³]
0,001	0,0014	100	0,014
0,010	0,0100	100	0,100
0,050	0,0504	100	0,504
0,100	0,1050	100	1,050
0,500	0,5017	100	5,017
1,000	1,0012	100	10,012

V této tabulce se nachází základní koncentrační rozsah huminových kyselin. Tento rozsah koncentrací byl rozšířen o vyšší koncentrace, které se nacházejí v následující tabulce.

Tabulka 5 *Druhá sada vzorků*

zadaná navážka [g]	přesná navážka [g]	množství R-022 [ml]	koncentrace [g/dm³]
0,2	0,2013	10	20,13
0,3	0,3010	10	30,10
0,4	0,4005	10	40,05
0,5	0,5001	10	50,01
0,6	0,6003	10	60,03
0,7	0,7000	10	70,00
0,8	0,8000	10	80,00
0,9	0,9000	10	90,00
1,0	1,0010	10	100,10

Vyšší koncentrace byly používány pro stanovení limitu měření této metody.

Tabulka 6 *Třetí sada vzorků*

zadaná navážka [g]	přesná navážka [g]	množství R-022 [ml]	koncentrace [g/dm³]
0,005	0,0054	100	0,054
0,150	0,1503	50	3,006
0,400	0,3996	50	7,992
0,750	0,7494	50	14,988
0,250	0,2494	10	24,940
0,350	0,3496	10	34,960

Třetí sada vzorků slouží na doplnění koncentrací mezi první a druhou sadou vzorků.

4.5.3 Měření na Istranu pomocí chronopotenciometrické titrace

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

5. VÝSLEDKY A DISKUZE

5.1 Jednoduché organické kyseliny

5.1.1 Stanovení pH jednoduchých organických kyselin

Hodnoty pH jednotlivých roztoků použitých organických kyselin byly stanoveny pomocí pH metru. Z těchto hodnot byly vypočítány koncentrace vodíkových iontů.

Tabulka 7 Naměřené pH kyseliny salicylové – $pK_a=2,97$

c_{kys} [mM]	c_{COOH} [mM]	pH	c_{H^+} [mM]
5	5	3,17	0,68
10	10	2,97	1,07
20	20	2,92	1,20

Tabulka 8 Naměřené pH kyseliny benzoové – $pK_a=4,19$

c_{kys} [mM]	c_{COOH} [mM]	pH	c_{H^+} [mM]
5	5	3,35	0,45
10	10	3,17	0,68
20	20	3,04	0,91

Tabulka 9 Naměřené pH kyseliny octové – $pK_a=4,75$

c_{kys} [mM]	c_{COOH} [mM]	pH	c_{H^+} [mM]
5	5	3,60	0,25
10	10	3,20	0,63
20	20	2,97	1,07

Tabulka 10 Naměřené pH kyseliny šťávelové – $pK_a=1,23; 4,19$

c_{kys} [mM]	c_{COOH} [mM]	pH	c_{H^+} [mM]
2,5	5	3,08	0,83
5	10	2,93	1,17
10	20	2,73	1,86
20	40	2,36	4,37

Tabulka 11 Naměřené pH kyseliny ftalové – $pK_a=2,89; 5,41$

	$pK_a < 5$	Všechny COOH		
c_{kys} [mM]	c_{COOH} [mM]	c_{COOH} [mM]	pH	c_{H^+} [mM]
2,5	2,5	5	3,21	0,62
5	5	10	2,85	1,41
10	10	20	2,66	2,19
20	20	40	2,47	3,39

Tabulka 12 Naměřené pH kyseliny citrónové – $pK_a=3,06; 4,77; 6,39$

	$pK_a < 5$	Všechny COOH		
$c_{kys} [mM]$	$c_{COOH} [mM]$	$c_{COOH} [mM]$	pH	$c_{H^+} [mM]$
1,66	3,32	5	3,6	0,25
3,33	6,66	10	3,36	0,44
5	10	15	3,16	0,69
6,66	13,32	20	2,86	1,38
10	20	30	2,78	1,66
20	40	60	2,54	2,88

Změřené pH roztoků určuje množství disociovaných H^+ iontů. Naměřená koncentrace H^+ iontů je tedy vždy menší než je celkový obsah COOH skupin. Z tabulek je patrné, že se vzrůstající koncentrací kyselin klesá jejich hodnota pH, a tím roste i koncentrace disociovaných H^+ iontů.

5.1.2 Stanovení koncentrace jednoduchých organických kyselin

Každý roztok kyseliny byl na průtokovém analyzátoru EcaFlow proměřen 5×, poté byly jednotlivé křivky ohraničené červenými svislými čarami, které nám určují velikost píku. Tímto způsobem byly odečteny koncentrace jednotlivých měření v každém vzorku a výsledná koncentrace kyselin byla určena zprůměrováním jednotlivých měření pro jednotlivé připravené koncentrace.

Tabulka 13 Stanovení koncentrace kyseliny salicylové

$c_{kys} [mM]$	$c_{COOH} [mM]$	$c_{H^+} [mM]$	odchylka [mM]	%
5	5	5,01	0,15	100,16
10	10	9,93	0,12	99,28
20	20	18,98	0,97	94,915

Tabulka 14 Stanovení koncentrace kyseliny benzoové

$c_{kys} [mM]$	$c_{COOH} [mM]$	$c_{H^+} [mM]$	odchylka [mM]	%
5	5	4,75	0,30	95,00
10	10	9,90	0,11	98,98
20	20	19,23	1,04	96,15

Tabulka 15 Stanovení koncentrace kyseliny octové

$c_{kys} [mM]$	$c_{COOH} [mM]$	$c_{H^+} [mM]$	odchylka [mM]	%
5	5	4,80	0,17	95,92
10	10	9,66	0,28	96,62
20	20	19,80	0,87	98,99

Tabulka 16 Stanovení koncentrace kyseliny šťavelové

c_{kys} [mM]	c_{COOH} [mM]	c_{H^+} [mM]	odchylka [mM]	%
2,5	5	5,06	0,05	101,20
5	10	9,83	0,13	98,26
10	20	19,14	0,42	95,68
20	40	38,81	0,38	97,02

Tabulka 17 Stanovení koncentrace kyseliny fталové

	pKa < 5	Všechny COOH			pKa < 5	Všechny COOH
c_{kys} [mM]	c_{COOH} [mM]	c_{COOH} [mM]	c_{H^+} [mM]	odchylka [mM]	%	%
2,5	2,5	5	4,79	0,05	191,60	95,80
5	5	10	9,61	0,04	192,20	96,10
10	10	20	17,70	0,40	176,97	88,48
20	20	40	34,64	1,27	173,18	86,59

Tabulka 18 Stanovení koncentrace kyseliny citrónové

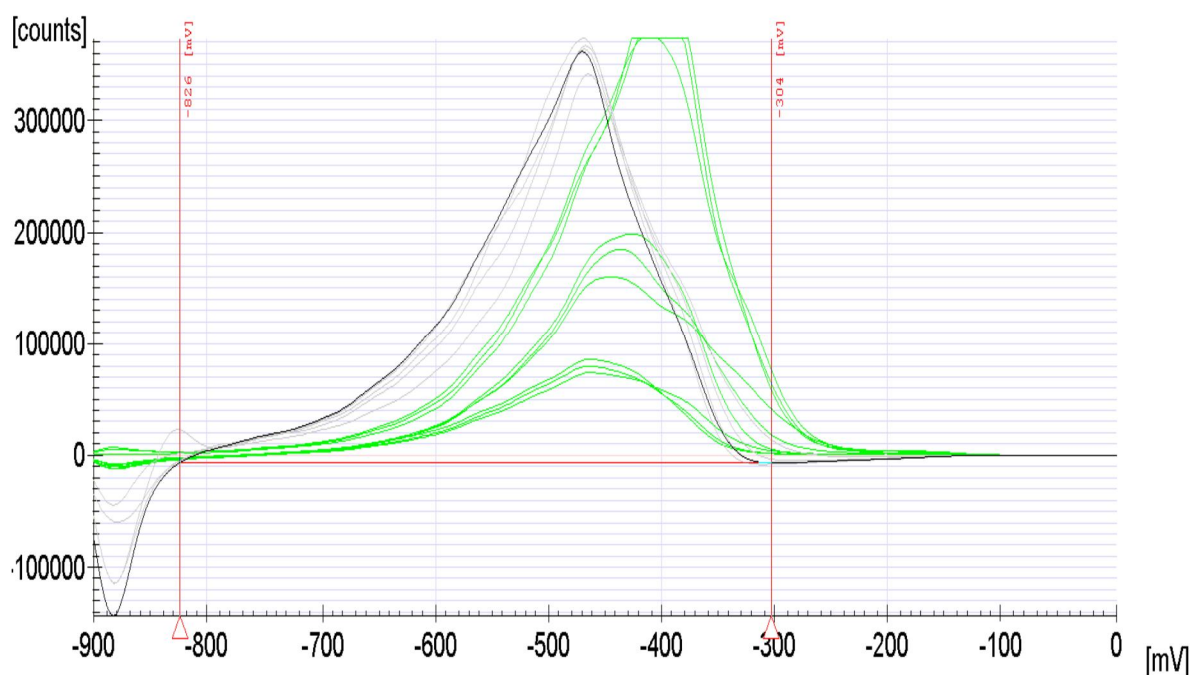
	pKa < 5	Všechny COOH			pKa < 5	Všechny COOH
c_{kys} [mM]	c_{COOH} [mM]	c_{COOH} [mM]	c_{H^+} [mM]	odchylka [mM]	%	%
1,66	3,32	5	3,76	0,16	113,37	75,28
3,33	6,66	10	7,48	0,18	112,31	74,80
5	10	15	12,39	0,21	123,90	82,60
6,66	13,32	20	18,32	0,70	137,52	91,59
10	20	30	28,30	0,72	141,48	94,32
20	40	60	40,87	0,09	102,18	68,12

Na toto měření byly použity jednosytné i vícesytné kyseliny s různými disociačními schopnostmi COOH (pK_a). Cílem bylo ověřit limity použité metody. Konkrétně byla použita aplikace vyvinuta výrobcem pro stanovení koncentrace silných a středně silných kyselin. Mezi kyselinami, které je tato aplikace schopna stanovit, výrobce uvádí i kyselinu octovou, jejíž pK_a je 4,75. Tuto kyselinu jsme považovali za předběžnou horní hranici pK_a . K této aplikaci jsou ovšem dva aplikační listy, které se liší v rozsahu stanovitelnosti z hlediska koncentrací. Proto bylo nutné tyto aplikace předem prověřit.

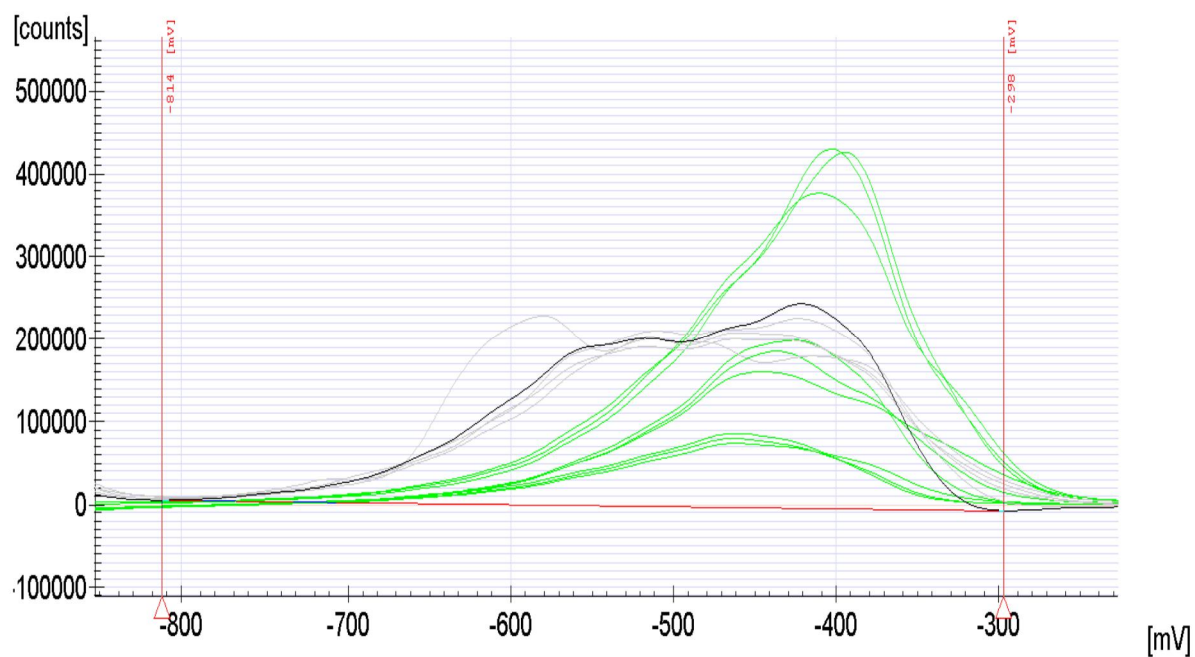
U jednosytných kyselin bylo stanoveno, že celková koncentrace se shoduje se zadanou koncentrací. U dvojsytných kyselin (šťavelové a fталové) se zadaná koncentrace musela zdvojnásobit, díky obsahu dvou karboxylových skupin. Tyto kyseliny byly ještě dobře změřitelné na přístroji EcaFlow. Na Obr. 4 je zobrazen záznam kyseliny fталové, na kterém je dobře vidět, že se jedná o dvojsytnou kyselinu (2 maxima). Takové píky se vyskytovaly

i u kyseliny šťavelové, která je též dvojsytná. Naměřené záznamy tedy navíc vypovídaly o sytnosti použitých kyselin.

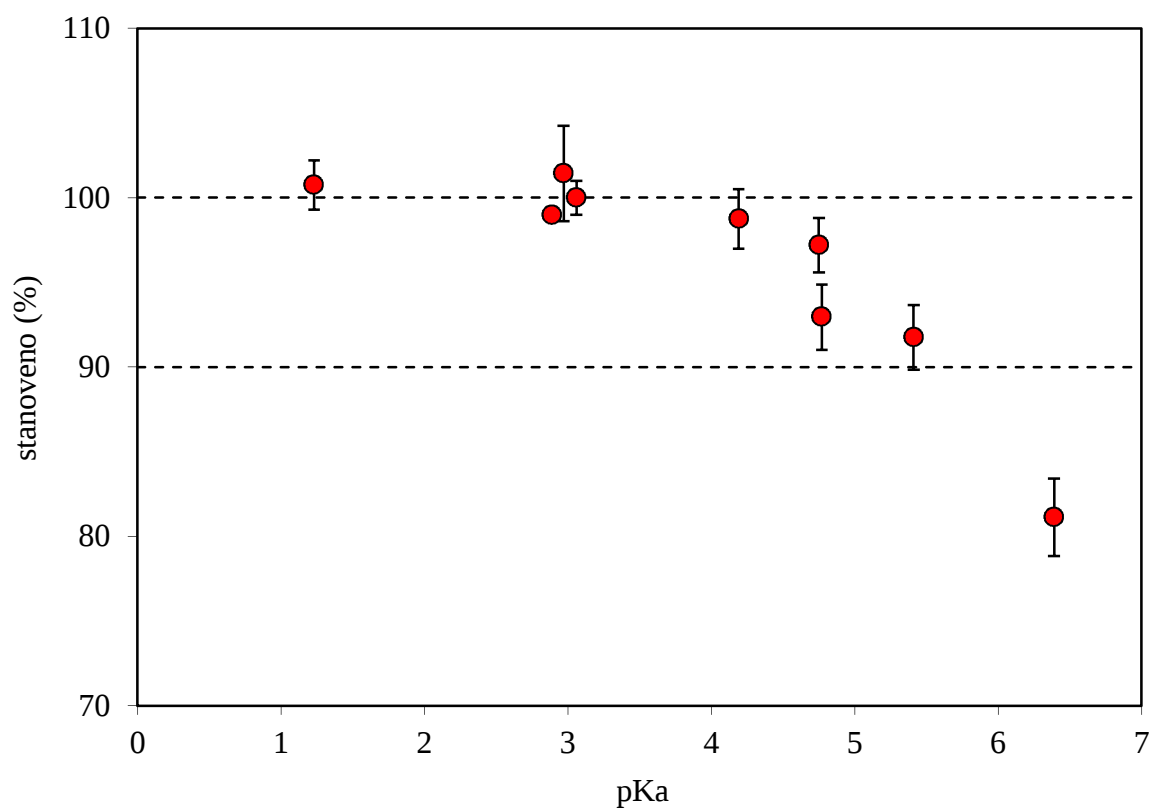
U kyseliny citronové byl limit měření stanoven do koncentrace 10 mM, je to díky většímu obsahu karboxylových skupin v její molekule. U původní koncentrace 20 mM by měla celková koncentrace být 60 mM, z důvodu obsahu tří karboxylových skupin, ale byla naměřena pouze koncentrace 40,87 mM. Hodnota pK_a třetí COOH skupiny u kyseliny citronové je příliš vysoké (6,39) na to, aby tyto skupiny mohly být použitou metodou spolehlivě detekovány. Přes tuto nepříznivou hodnotu pK_a se v naměřených hodnotách částečně projevila i přítomnost těchto skupin (viz Tabulka 18).



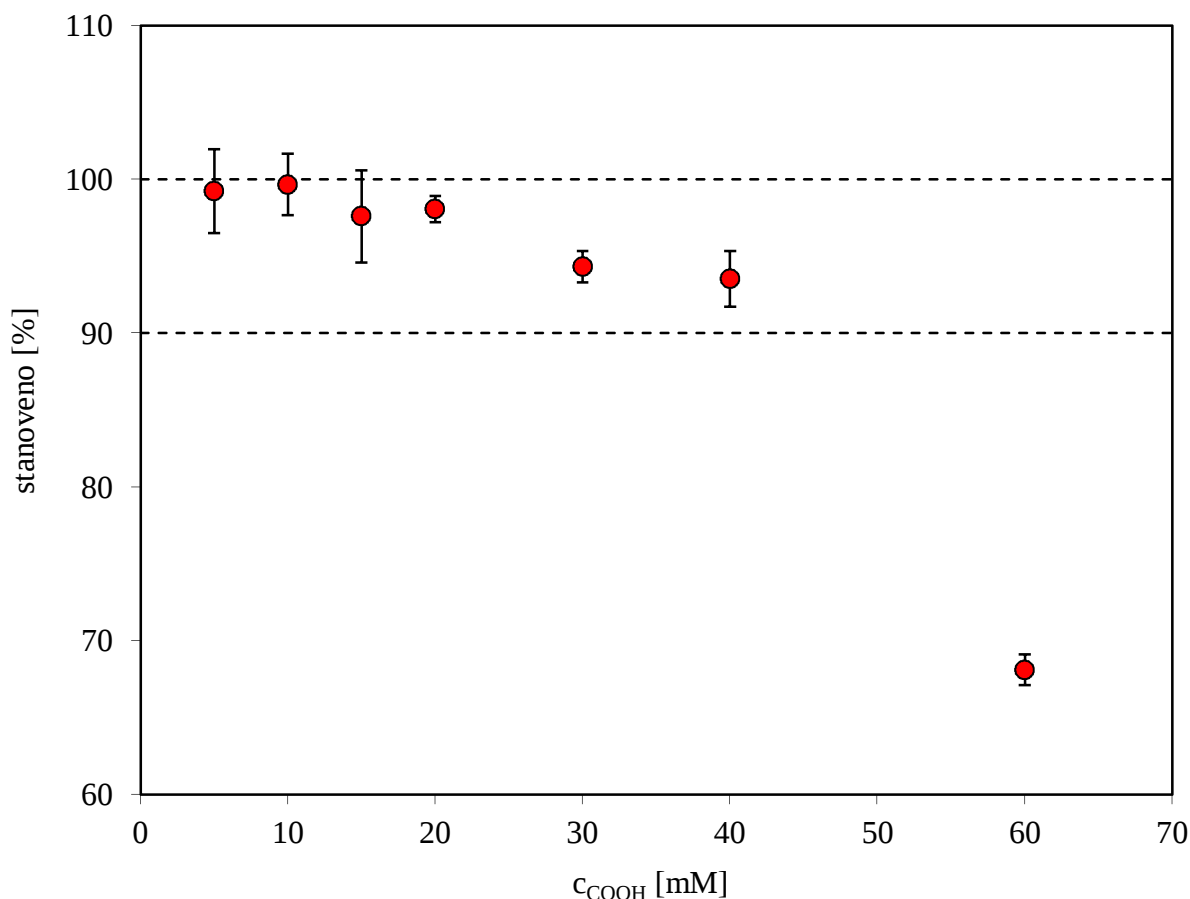
Obr. 3 Ukázka zobrazení píku pro kyselinu benzoovou 20 mM (jednosytná kyselina)



Obr. 4 Ukázka zobrazení píku pro kyselinu ftalovou 10 mM (dvojsytná kyselina)



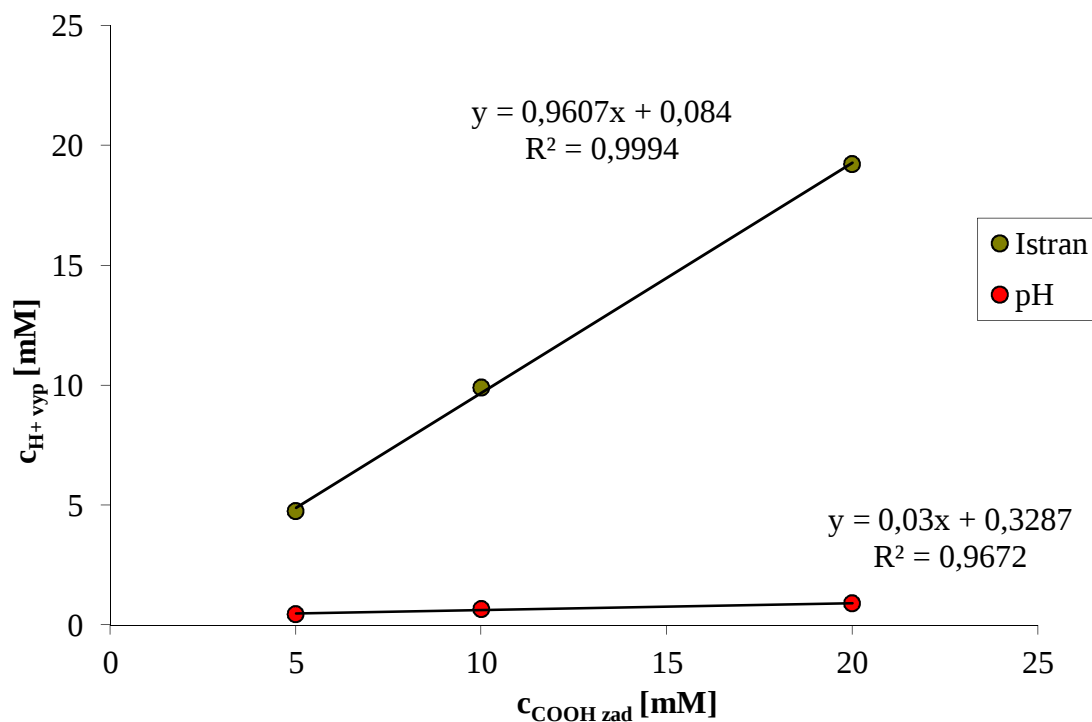
Obr. 5 Graf závislosti stanovených % na hodnotě pK_a



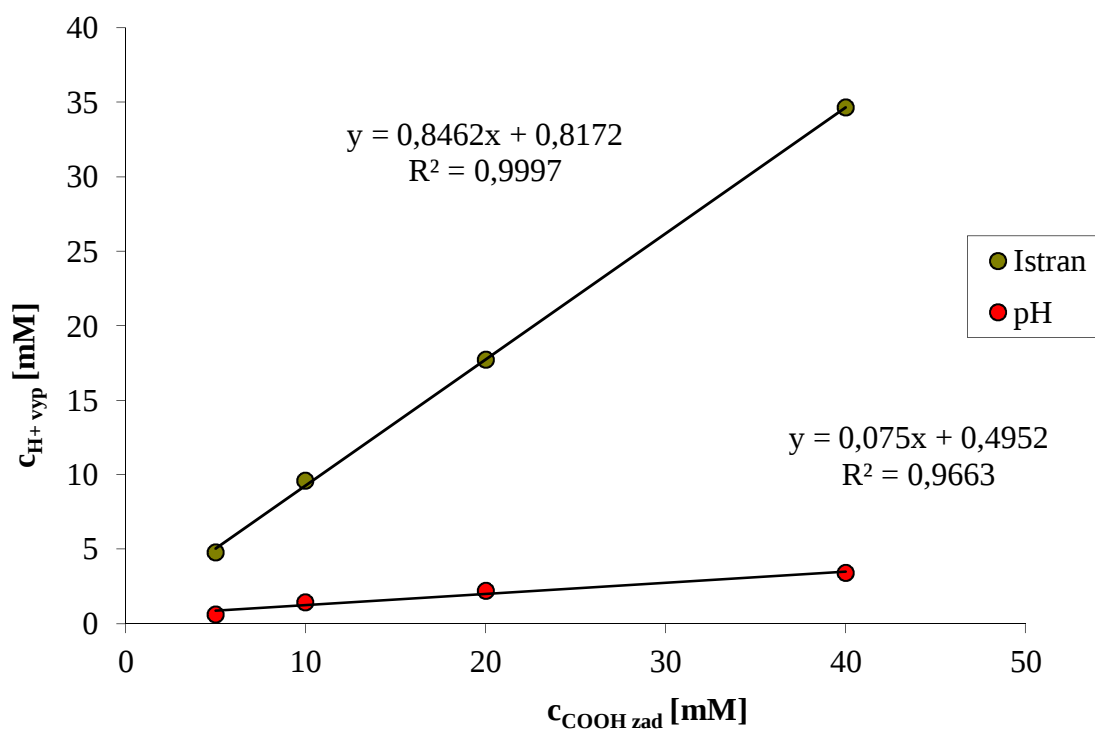
Obr. 6 Graf závislosti stanovených % na koncentraci všech COOH skupin

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

Na Obr. 6 je vidět, že při koncentracích 5–40 mM bylo stanoveno ještě nad 90 % COOH skupin, ale při koncentraci 60 mM byla koncentrace stanovena pod 70 %. Limit metody byl nakonec stanoven na 20 mM, neboť při této koncentraci bylo ještě stanoveno téměř 100 % přítomných COOH skupin.



Obr. 7 Graf závislosti vypočítané koncentrace, naměřené pH metrem a přístrojem EcaFow, na zadané koncentraci (Kyselina benzoová)



Obr. 8 Graf závislosti vypočítané koncentrace, naměřené pH metrem a přístrojem EcaFow, na zadané koncentraci (Kyselina fthalová)

Z Obr. 7 a 8 je patrné, že koncentrace H^+ iontů naměřené pH metrem je podstatně menší než koncentrace naměřená přístrojem EcaFlow. To je způsobeno tím, že pH metr měří pouze disociované H^+ ionty, kdežto přístroj EcaFlow měří i nedisociované H^+ ionty přítomné v roztoku. Jedním z možných využití kombinace dat získaných měřením pH a přístrojem EcaFlow je stanovení disociačních konstant bez nutnosti použití zdlouhavých a často ne příliš spolehlivých titračních metod.

5.2 Huminové kyseliny

5.2.1 Stanovení pH huminových kyselin

Hodnoty pH vzorků huminových kyselin byly stanoveny pomocí pH metru. Z těchto hodnot byly posléze vypočítány jednotlivé koncentrace H^+ iontů. Z Tabulky 19 vyplývá, že koncentrace disociovaných H^+ iontů v roztoku roste se zvyšujícím se obsahem huminových kyselin. Při přepočtu na jeden gram přidaných huminových kyselin ovšem nemá množství disociovaných H^+ iontů jednoznačný trend. Naměřená data ukazují maximum při koncentraci 3 g/dm^3 , pak hodnoty klesají až k minimu při 40 g/dm^3 , nad touto koncentrací opět stoupají. Důvodem je zřejmě sama podstata huminových látek. V rámci této práce byly pro měření pH i chronopotenciometrickou titraci použity výluhy huminových kyselin. Vždy se tedy v použitém roztoku nacházely jen určité rozpuštěné frakce. Složení těchto frakcí se zřejmě koncentrací od koncentrace liší, liší se i množství a pK_a COOH skupin, které tyto rozpuštěné frakce obsahují. Lze předpokládat, že při nízkých koncentracích se mohou rozpouštět i frakce, které obsahují méně karboxylových skupin s vyšším pK_a . Disociační stupeň těchto funkčních skupin je pravděpodobně vysoký, neboť vodný roztok, ve kterém se tyto frakce rozpouští, není nasycen. Do určitého obsahu huminových kyselin (v našem případě 3 g/dm^3) tedy může docházet ke zvýšení množství disociovaných H^+ iontů připadajících na hmotnostní jednotku přidaných huminových kyselin. Je to též úsek s největším poklesem pH. Další zvyšování koncentrace má ovšem za následek to, že frakce s menším obsahem COOH skupin a frakce se slabšími karboxylovými skupinami se rozpouští méně a méně, až je jejich rozpustnost úplně potlačena. To způsobilo nejprve pokles množství disociovaných H^+ iontů připadajících na jeden gram huminových kyselin a následně nárůst této hodnoty, když už se rozpouštěly pouze frakce bohaté na COOH skupiny s nízkým pK_a . Tato hypotéza bude dále ověřena v navazujícím výzkumu s jinými vzorky huminových kyselin včetně standardů International Humic Substances Society.

Tabulka 19 Naměřené hodnoty pH a vypočítaná koncentrace H^+

$c_{\text{zad}} [\text{g/dm}^3]$	$c [\text{g/dm}^3]$	pH	$c_{H^+} [\text{mM}]$	$c_{H^+} [\text{mmol/g}]$
0,01	0,014	5,75	0,0018	0,1270
0,05	0,054	5,12	0,0076	0,1405
0,1	0,100	4,75	0,0178	0,1778
0,5	0,504	3,99	0,1023	0,2030
1	1,051	3,66	0,2188	0,2082
3	3,012	3,19	0,6457	0,2144
5	5,034	3,05	0,8913	0,1771
8	8,035	2,88	1,3183	0,1641
10	10,00	2,79	1,6218	0,1622
15	15,14	2,76	1,7378	0,1148
20	20,13	2,76	1,7378	0,0863
25	24,94	2,71	1,9498	0,0782
30	30,10	2,68	2,0893	0,0694
35	34,96	2,66	2,1878	0,0626
40	40,05	2,63	2,3442	0,0585
50	50,01	2,47	3,3884	0,0678
60	60,03	2,35	4,4668	0,0744
70	70,00	2,03	9,3325	0,1333
80	80,00	1,96	10,9648	0,1371
90	90,00	1,81	15,4882	0,1721
100	100,01	1,70	19,9526	0,1995

5.2.2 Měření absorbance huminových kyselin

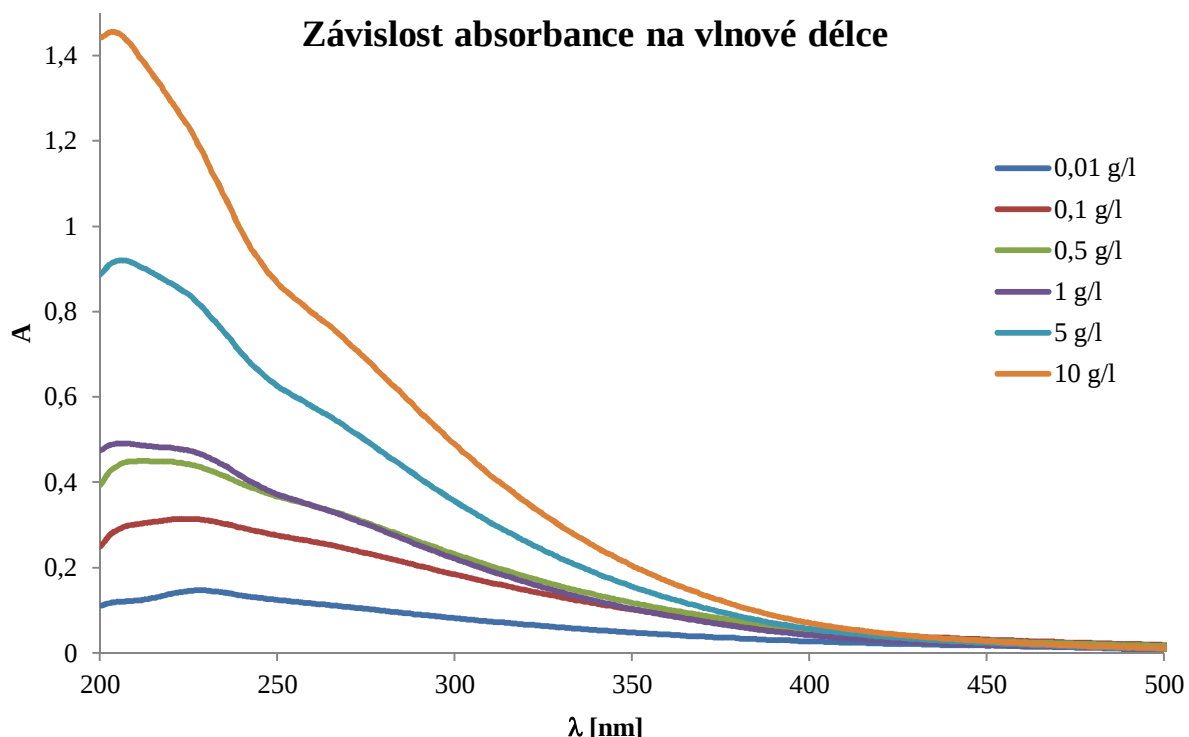
Vzorec pro výpočet $\Delta \log K$:

$$\Delta \log K = \log \frac{A(400 \text{ nm})}{m_{\text{HA}}} - \log \frac{A(600 \text{ nm})}{m_{\text{HA}}} \quad (4.1)$$

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

Tabulka 20 *Poměry absorbancí při daných vlnových délkách a $\Delta \log K$*

c [g/l]	265/465	265/665	465/665	400/600	$\Delta \log K$
0,01	7,47	28,00	3,75	4,67	0,67
0,05	7,73	24,29	3,14	4,88	0,69
0,1	9,41	50,80	5,40	6,75	0,83
0,5	13,88	66,60	4,80	9,17	0,96
1	22,20	166,50	7,50	21,00	1,32
3	18,60	176,67	9,50	18,63	1,27
5	29,16	277,00	9,50	19,00	1,28
8	26,29	447,00	17,00	30,80	1,49
10	36,48	383,00	10,50	23,67	1,37
15	32,47	573,67	17,67	34,00	1,53
20	36,66	916,50	25,00	42,25	1,63
25	37,08	482,00	13,00	34,80	1,54
30	43,25	951,50	22,00	39,00	1,59
35	41,67	510,50	12,25	28,00	1,45
40	48,88	684,33	14,00	31,40	1,50
50	54,72	2134,00	39,00	76,50	1,88
60	62,66	668,33	10,67	32,25	1,51
70	60,68	940,50	15,50	42,00	1,62
80	76,96	2001,00	26,00	58,00	1,76
90	72,63	490,25	6,75	28,00	1,44
100	77,55	749,67	9,67	42,33	1,63



Obr. 9 Ukázka spekter absorbancí (první sada vzorků)

Na Obr. 9 je patrné, že se stoupající koncentrací roztoků stoupá i jejich absorpance. Rozdíly absorbancí se zvyšují směrem k nižším vlnovým délkám. Absorbance u vlnových délek nad 500 nm se pohybovala kolem 0. Pro lepší zobrazení píků nebyly hodnoty absorbancí nad touto vlnovou délkou zobrazeny. Ze změn optických vlastností uvedených v Tabulce 20 je zřejmé, že se změnou koncentrace se mění složení rozpuštěných frakcí, což se pak projevilo jak na stanovených hodnotách pH, tak na výsledcích získaných chronopotenciometrickou titrací.

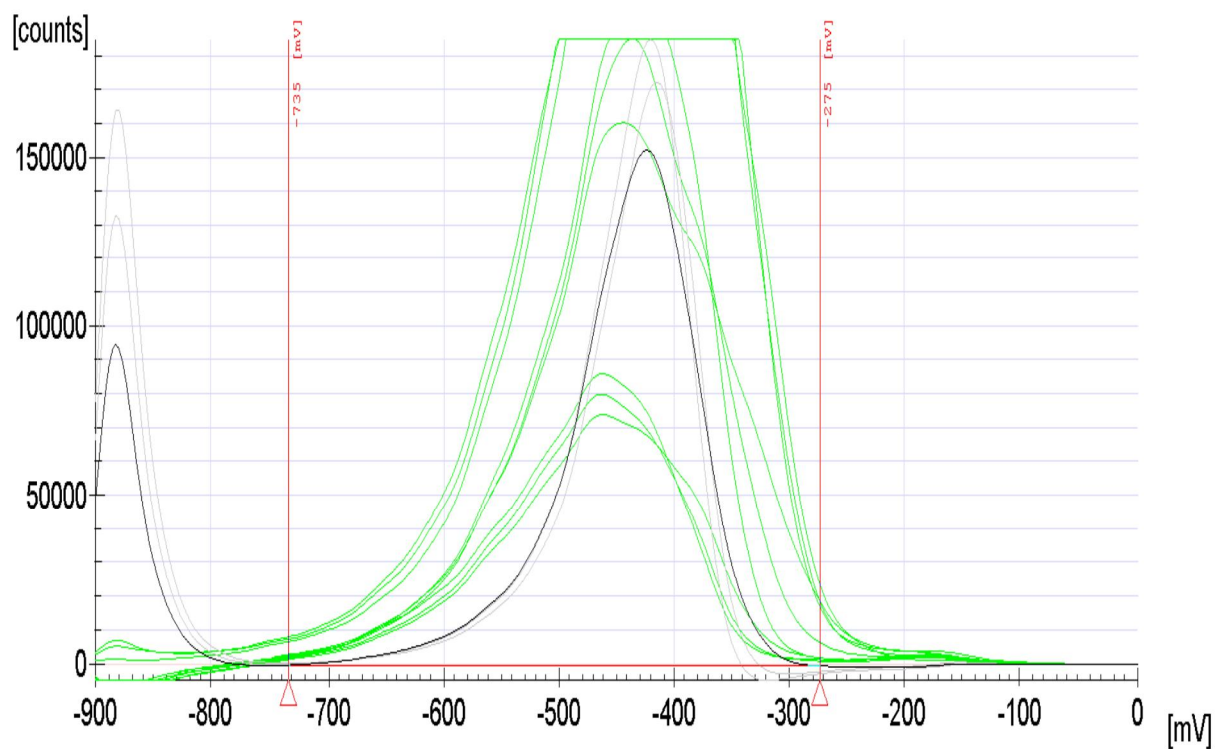
5.2.3 Stanovení koncentrace huminových kyselin

Každá sada kyselin byla změřena na průtokovém analyzátoru EcaFlow. Počet analýz byl přizpůsoben jednotlivým objemům. U některých koncentrací je chyba 0 % a to z důvodu malého množství vzorku. Proto byly tyto vzorky měřeny pouze jednou. U ostatních objemů byly vzorky analyzovány 3×. Jednotlivé křivky byly ohraničené červenými svislými čarami, které nám určují velikost píku. Tímto způsobem byly odečteny koncentrace jednotlivých měření v každém vzorku a výsledná koncentrace kyselin byla určena zprůměrováním jednotlivých měření pro jednotlivé připravené koncentrace.

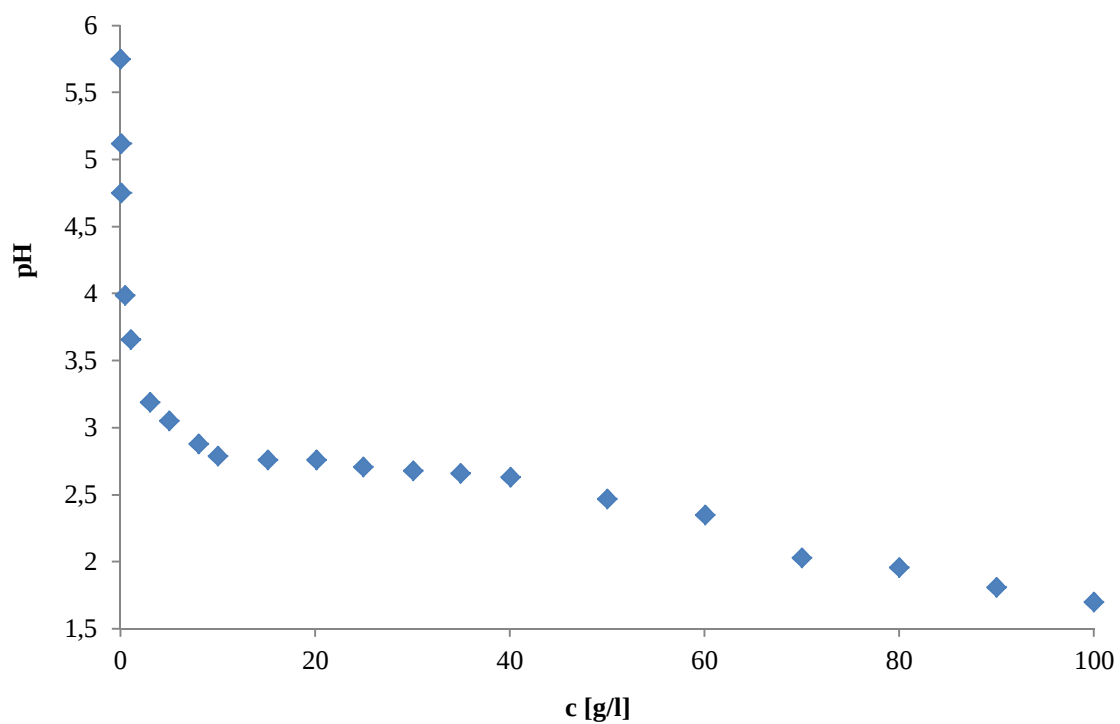
Tabulka 21 Naměřené hodnoty koncentrace a vypočítané hodnoty kyselosti

	pH	EcaFlow		
c [g/dm ³]	c _{H⁺} [mmol/g]	c _{H⁺} [mmol/g]	% stanovení z celkové kyselosti	% stanovení z kyselosti COOH skupin
0,01	0,1270	4,7619	67,95	108,45
0,05	0,1405	2,5926	36,99	59,04
0,1	0,1778	3,7997	54,22	86,53
0,5	0,2030	1,1570	16,51	26,35
1	0,2082	0,8565	12,22	19,51
3	0,2144	0,7393	10,55	16,84
5	0,1771	0,4728	6,75	10,77
8	0,1641	0,3941	5,62	8,98
10	0,1622	0,3373	4,81	7,68
15	0,1148	0,3763	5,37	8,57
20	0,0863	0,6473	9,24	14,74
25	0,0782	0,3007	4,29	6,85
30	0,0694	0,6977	9,96	15,89
35	0,0626	0,3252	4,64	7,41
40	0,0585	0,5845	8,34	13,31
50	0,0678	0,5411	7,72	12,32
60	0,0744	0,4531	6,47	10,32
70	0,1333	0,3871	5,52	8,82
80	0,1371	0,3399	4,85	7,74
90	0,1721	0,3018	4,31	6,87
100	0,1995	0,2730	3,90	6,22

Z Tabulky 21 je zřejmé, že koncentrace H⁺ iontů měřené přístrojem EcaFlow jsou mnohem vyšší než koncentrace H⁺ iontů měřené pomocí pH metru (viz Tabulka 19). To je způsobeno tím, že pH metr měří pouze disociované H⁺ ionty, ale přístroj EcaFlow by měl při vhodně zvolených koncentracích měřit všechny H⁺ ionty, tedy i ty nedisociované z COOH skupin s dostatečně nízkou hodnotou pK_a. Stanovené % z celkové kyselosti jsou výrazně nižší, než stanovené % pouze z kyselosti COOH skupin, neboť obsah COOH skupin (4,391 mmol/g) je nižší než celková kyselost použitého vzorku (7,008 mmol/g). Nepředpokládá se, že by použitá aplikace byla schopna detekovat fenolické OH skupiny v huminových kyselinách. To bylo též potvrzeno experimentálně při měření roztoků kyseliny salicylové, která ve své molekule fenolickou OH skupinu obsahuje.

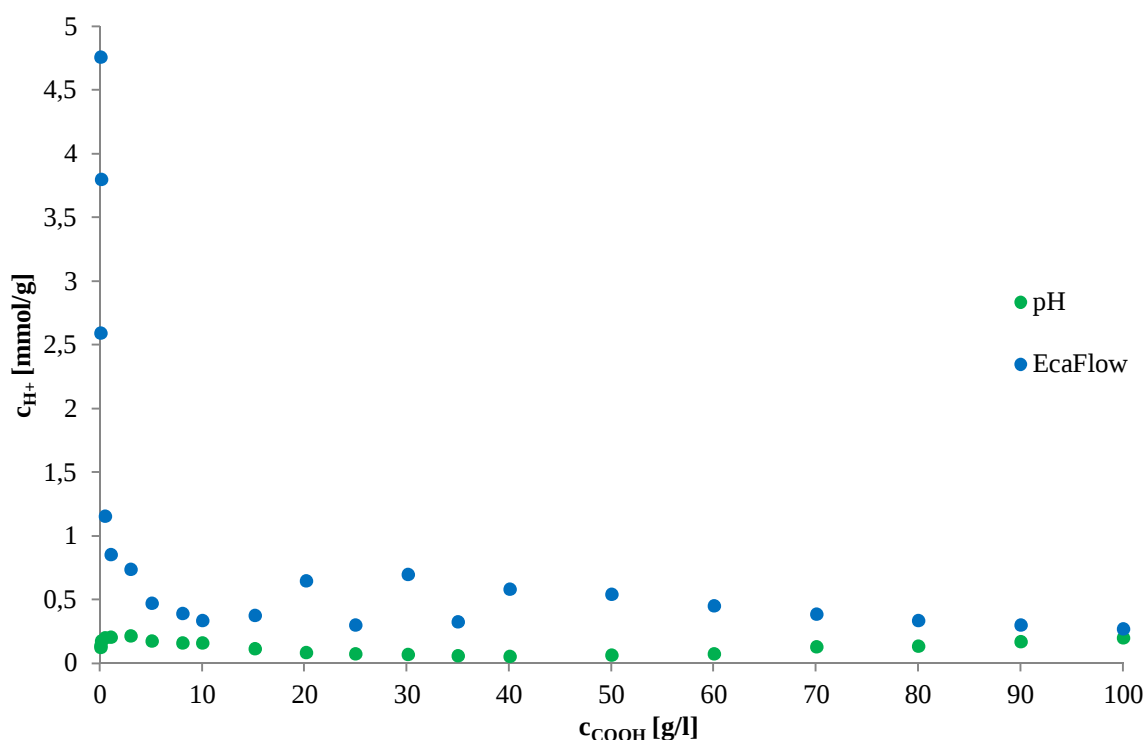


Obr. 10 Ukázka zobrazení píku pro koncentraci 15 g/l (0,75 g / 50 ml)



Obr. 11 Graf závislosti pH na Koncentraci huminových kyselin

Z Obr. 11 je patrné, že nejvyšší hodnoty pH se nacházejí při nižších koncentracích huminových kyselin. Čím je nižší pH, tím je roztok kyselejší – obsahuje více disociovaných H^+ iontů. Hodnoty pH prudce klesají až do koncentrace 10 g/dm^3 , dále pak pokles velmi pozvolný. Pokud tyto hodnoty pH přepočteme na koncentraci H^+ iontů a vztáhneme na jeden gram huminových kyselin, získáme data uvedená v grafu na Obr. 12, ve kterém jsou navíc uvedeny stejně přepočítané hodnoty získané chronopotenciometrickou titrací.



Obr. 12 Graf závislosti naměřené koncentrace na připravené koncentraci, hodnoty z měření pH (zelené) a z EcaFlow (modré)

Z Obr. 12 je patrné, že přístroj EcaFlow naměřil i v tomto případě větší hodnoty koncentrace H^+ iontů, než pH metr. Hodnoty získané chronopotenciometrickou titrací prudce klesají až do koncentrace 10 g/dm^3 a dále se prakticky nemění. Zde bylo již zřejmě dosaženo detekčního limitu přístroje. Pokles množství H^+ iontů připadajících na hmotnostní jednotku huminových kyselin je opět způsoben různým složením rozpuštěných frakcí huminových kyselin při daných koncentracích, jak potvrdily i další použité metody – měření pH a UV/VIS spekter připravených výluhů.

6. ZÁVĚR

Tato bakalářská práce se zabývá huminovými kyselinami a schopností měřit jejich koncentraci chronopotenciometrickou metodou. Zmíněná metoda dosud nebyla použita na stanovení huminových kyselin.

Prvním cílem bylo stanovit maximální hodnotu koncentrace, která se dá touto metodou ještě spolehlivě změřit. Ze získaných měření bylo zjištěno, že u jednoduchých organických kyselin přístroj EcaFlow byl schopen změřit koncentraci až 40 mM v závislosti na pK_a . Maximální koncentrace, kterou lze doporučit na základě výsledků této práce je 20 mM. Dále bylo zjištěno, že z hlediska disociačních schopností funkčních skupin je hranice stanovitelnosti u jednosytných i vícesytných kyselin kolem $pK_a = 4-5$.

Aplikací metody chronopotenciometrické titrace na huminové kyseliny bylo zjištěno, že přístroj od koncentrace huminových kyselin 10 g/dm³ dává přibližně stejné hodnoty. To je zřejmě hranice stanovitelnosti pro výluhy huminových kyselin ve vodných roztocích (konkrétně v roztoku R-022). V práci [21] byla střední hodnota pK_a stanovena na 3,86, což je možno, s přihlédnutím k výsledkům získaným z měření s jednoduchými organickými kyselinami, považovat za hodnotu odpovídající silným až středně silným kyselinám.

7. SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- [1] HARTMAN, Pavel; PŘIKRYL, Ivo; ŠTĚDRONSKÝ, Eduard. *Hydrobiologie*. Praha: Informatorium, 1998. Organické látky ve vodách, s. 39. ISBN 80-86073-27-0.]
- [2] KALAVSKÁ, Dagmar; HOLOUBEK, Ivan. *Analýza vôd*. 1. vydanie. Bratislava: Alfa, 1989. Stanovenie humínových zlúčenín, s. 174-182. ISBN 80-05-00065-0
- [3] ŽÁČEK, Ladislav. *Hydrochemie*. Brno: Nakladatelství VUTIUM, 1998. Huminové látky, s. 51-53. ISBN 80-214-1167-8
- [4] PITTER, Pavel. *Hydrochemie*. 3. - přepracované. Praha: Vydavatelství VŠCHT, 1999. Huminové látky, s. 24, 327-333. ISBN 80-7080-340-1.
- [5] ANDJELKOVIC, T., et al. A direct potentiometric titration study of the dissociation of humic acid with selectively blocked functional groups. *ECLÉTICA: Química*. 2006, 31, č. 3, s. 39-46. Dostupný také z WWW: <www.scielo.br/eq>.
- [6] MASINI, Jorge C., et al. Comparison of methodologies for determination of carboxylic and phenolic groups in humic acids. *Analytica Chimica Acta*. 1998, 364, s. 223-233.
- [7] TÖLGYESSY, Juraj, et al. *Chémia, biológia a toxikológia vody a ovzdušia*. Bratislava: VEDA, vydavateľství Slovenské akademie vied, 1984. Humínové látky, s. 99-104.
- [8] SALMA, I.; LÁNG, G. G. How many carboxyl groups does an average molecule of humic-like substances contain?. *Atmospheric Chemistry and Physics*. 2008, no. 8, s. 5997–6002. Dostupný také z WWW: <www.atmos-chem-phys.net/8/5997/2008/>.
- [9] PICCOLO, A.; CAMICI, L. A comparison of two methods for the determination of total acidity of humic substances. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*. 1990, Vol. 41, s. 65-69.
- [10] SCHNITZER, M.; KHAN, S. U. *Humic substances in the environment*. New York: Marcel Dekker, 1972. 327 s.
- [11] FERNANDES, Andreia N., et al. Potentiometric Acidity Determination in Humic Substances Influenced by Different Analytical Procedures. *Journal of the Brazilian Chemical Society: Sociedade Brasileira de Química*. 2009, Vol. 20, No. 9, s. 1715-1723.
- [12] FUKUSHIMA, Masami, et al. Acid-base characterization of molecular weight fractionated humic acid. *Talanta*. 1996, 43, s. 383-390
- [13] VARADACHARI, Chadrika; NAYAK, Dulal C.; GHOSH, Kunal. A novel method for the determination of total acidity of humic substances. *Journal of the Indian Society of Soil Science*. 1992, vol. 40, s. 682-687.

- [14] BORGGAARD, Ole K. Titrimetric determination of acidity and pK values of humic acid. *Acta Chemica Scandinavica*. 1974, vol. 28, no. 1, s. 121-122.
- [15] GOLDBERG, Marvin C.; CUNNINGHAM, Kirkwood M.; WEINER, Eugene R. The use of isosbestic points in the fluorescence excitation spectrum of humic acid to calculate the dissociation constant. *Anadian Journal of Soil Science*. 1987, 67, s. 715-717
- [16] CEPPI, Silvia B.; VELASCO, Manuel I.; DE PAULI, Carlos P. Differential scanning potentiometry: surface charge development and apparent dissociation constants of natural humic acid. *Talanta*. 1999, 50, s. 1057-1063. Dostupný také z WWW: <www.elsevier.com/locate/talanta>.
- [17] KLOUDA, Pavel. *Moderní analytické metody*. Ostrava: Pavel Klouda, 2003. 132 s. ISBN 80-86369-07-2.
- [18] Istran spol. s r.o.: *Stanovení stopových prvků prietokovou coulometriou*, aplikační listy. Bratislava (SK): Istran, 2003.
- [19] KALVODA, Robert. *Elektroanalytická chemie životního prostředí*. Praha: Nakladatelství SNTL, 1985. Jiné elektrochemické metody, s. 24-25
- [20] SD – Humatex, a.s [online]. 2005 [cit. 2011-04-27]. Huminové látky. Dostupné z WWW: <http://www.sdas.cz/showdoc.do?docid=244>
- [21] KOLAJOVÁ, R. *Rozpustnost a disociace huminových kyselin*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2010. 32 s.
- [22] PIVOKONSKÝ, Martin, et al. Úprava vody s obsahem huminových látek. *Chemické listy*. 2010, 104, s. 1015-1022.
- [23] LONDINOVÁ, M. *Fluorescence ve výzkumu hydrofilních oblastí asociativních koloidů*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2008. 68s.
- [24] Isosbestic point. In *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. St. Petersburg (Florida): Wikipedia Foundation, 2004, last modified on 2010 [cit. 2011-04-28]. Dostupné z WWW: <http://en.wikipedia.org/wiki/Isosbestic_point>
- [25] KURKOVÁ, Monika, et al. Humic acids from oxidize coals I. Elemental composition, titration curves, heavy metals in HA samples, nuclear magnetic resonance spectra of HAs and infrared spectroscopy. *Chemosphere*. 2004, 54, s. 1237-1245.
- [26] Stevenson, F. J. *Humus Chemistry – Genesis, Composition, Reaction*. 2. vyd., New York, Wiley Interscience, 1994. ISBN 0-471-59474-1.

- [27] Pospíšilová, L.; Tesařová, M. Organický uhlík obhospodařovaných půd. *Folia Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis*, 2009, č. 1, 17 s. ISSN 1211-8516.
- [28] Holbecher Z., Churáček J. a spol. *Analytická chemie*. Praha: SNTL, 1987. 663 s. ISBN 80-03-00569-8

8. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

K	disociační konstanta
pK	záporný dekadický logaritmus disociační konstanty
a	aktivita
c	molární koncentrace
γ	aktivitní koeficient
α	stupeň neutralizace
A	absorbance
m_{HA}	hmotnost huminové kyseliny vztažené na 100 ml
E	měrný potenciál
t	čas
$R-022$	1,5% roztok síranu sodného
c_{kys}	požadovaná koncentrace kyseliny
c_{COOH}	koncentrace karboxylových funkčních skupin
c_{H^+}	koncentrace vodíkových iontů
c_{zad}	zadaná koncentrace
m	hmotnost
V	objem
c	výsledná koncentrace
λ	vlnová délka

9. PŘÍLOHY

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

istran

Aplikační list č. 41

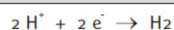
► Stanovenie silných a stredne silných kyselín

TYPY VZORIEK

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

PRINCÍP METÓDY

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



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

POUŽITÉ ROZTOKY

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

ŠTANDARDNÉ ROZTOKY PRE ZOSTROJENIE KALIBRAČNEJ KRIVKY

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

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

Poznámka Koncentráciu štandardov možno prispôsobiť predpokladanému koncentračnému rozsahu v analyzovaných vzorkách

ÚPRAVA VZORIEK

VZORKA

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

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

SLEPÁ VZORKA (BLANK)

Roztok R-022.

ELEKTRODA

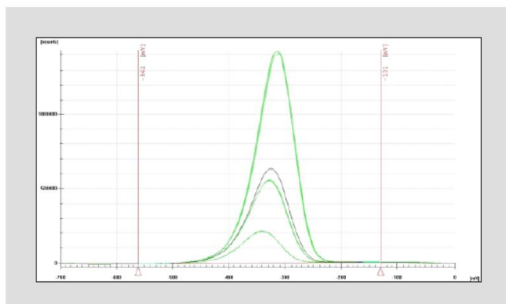
E-CAPt

EXPERIMENTÁLNE PARAMETRE

Potenciostatický mód

The screenshot displays the istran software interface with multiple tabs and input fields. The 'Kalibrácia' (Calibration) tab is active, showing options for 'Bezkalibračne' (No calibration), 'Kalibračná priamka' (Calibration line), and 'Pridávanie štandardu' (Adding standard). The 'Nahromadenie' (Accumulation) section has 'GST' and 'PST' options. The 'Meranie pozadia' (Background measurement) section includes 'Iba pred prvým meraním' (Only before first measurement) and 'Pred každým meraním' (Before each measurement). The 'Typ kalibračnej krivky' (Type of calibration curve) section has 'Vyp.' (Output) and 'Zap.' (On) options. The 'Autosampler' section has 'Vyp.' and 'Zap.' options. The 'Meranie' (Measurement) section has 'S každou novou vzorkou alebo štandardom' (With each new sample or standard) and 'S každou 0 vzorkou alebo štandardom' (With each 0 sample or standard). The 'Všeobecné' (General) tab is also visible, showing 'Nahromadenie' (Accumulation) with 'Edepos' (400 mV) and 'Idepos' (0 uA). 'Potenciál (mV)' (Potential) has 'Estart1' (400), 'Estart2' (0), 'Estop' (-700), 'Eregen' (400), and 'Estndby' (400). 'Pauza (s)' (Pause) has 'Quiesc1' (2), 'Quiesc2' (10), and 'Regen' (20). 'Rozpúšťanie' (Dissolving) has 'Istrip' (-10 uA), 'Max. čas' (600 s), and 'Pumpa' (Pump) with 'Vyp.' and 'Zap.' options. 'Segmentovať vzorku' (Segment sample) has 'Nie' (No) and 'Áno' (Yes) options. 'Merací mód' (Measurement mode) has 'Mod A' and 'Mod B' options. 'Prietok' (Flow) is set to 6 ml/min.

ZÁZNAM



VYHODNOTENIE VÝSLEDKOV

Technika kalibračnej krivky

METROLOGICKÉ PARAMETRE

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

RUŠIVÉ VPLYVY

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

POZNÁMKY

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