

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

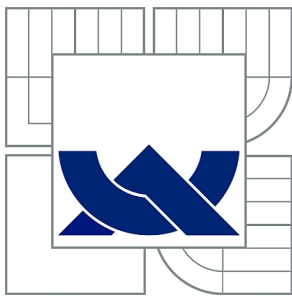
DISOCIAČNÍ CHOVÁNÍ HUMINOVÝCH KYSELIN

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE
BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE
AUTHOR

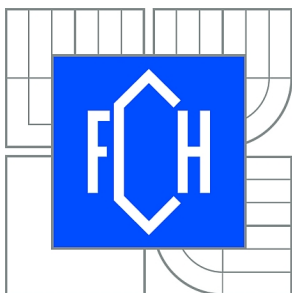
KATEŘINA KARBANOVÁ

BRNO 2015



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

DISOCIAČNÍ CHOVÁNÍ HUMINOVÝCH KYSELIN

DISSOCIATION BEHAVIOUR OF HUMIC ACIDS

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

KATEŘINA KARBANOVÁ

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

doc. Ing. MARTINA KLUČÁKOVÁ,
Ph.D.

BRNO 2015



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

Zadání bakalářské práce

Číslo bakalářské práce:	FCH-BAK0813/2014	Akademický rok: 2014/2015
Ústav:	Ústav fyzikální a spotřební chemie	
Student(ka):	Kateřina Karbanová	
Studijní program:	Chemie a chemické technologie (B2801)	
Studijní obor:	Spotřební chemie (2806R002)	
Vedoucí práce	doc. Ing. Martina Klučáková, Ph.D.	
Konzultanti:		

Název bakalářské práce:

Disociační chování huminových kyselin

Zadání bakalářské práce:

1. Rešerše na téma disociační chování huminových kyselin.
2. Výběr metod pro studium disociačního chování huminových kyselin.
3. Vlastní experimenty.
4. Zhodnocení výsledků a závěr.

Termín odevzdání bakalářské práce: 22.5.2015

Bakalářská práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu a v elektronické formě vedoucímu bakalářské práce. Toto zadání je přílohou bakalářské práce.

Kateřina Karbanová
Student(ka)

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

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
Ředitel ústavu

V Brně, dne 30.1.2015

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
Děkan fakulty

ABSTRAKT

Huminové kyseliny jsou látky přírodního původu a tvoří nejvyšší složku huminových látek. Vznikají biochemickými přeměnami organických zbytků (převážně rostlinných). Chovají se jako slabě kyselé polyelektrolyty s doposud ne zcela přesně popsanou strukturou. Jejich rozpustnost je značně ovlivněna hodnotou pH, čím vyšší je hodnota pH, tím vyšší je i jejich rozpustnost. V kyselinách jsou prakticky nerozpustné.

Bakalářská práce se zabývá studiem disociačního chování huminových kyselin. Disociační konstanta huminových kyselin je stanovována třemi různými metodami – konduktometrickou, spektrofotometrickou a kombinací měření pH a obsahu kyselých funkčních skupin v Na_2SO_4 . Na základě získaných výsledků jsou jednotlivé metody porovnávány.

ABSTRACT

Humic acids are substances of natural origin and form the finest part of humic substances. They are formed by biochemical transformations of organic residues (mainly plants). They act as a weakly acidic polyelectrolytes with not exactly described structure. Their solubility is affected by pH value. The higher the pH value is the higher the solubility is. They are almost insoluble in acids.

Bachelor thesis deals with the study of the dissociation behaviour of humic acids. Dissociation constant of humic acids is determined by three different methods – conductometric, spectrophotometric and combination of measurement pH and the content of acidic functional groups in Na_2SO_4 . On the basis of results the methods are compared.

KLÍČOVÁ SLOVA

Huminové látky, disociace, rozpustnost, disociační konstanta

KEYWORDS

Humic substances, dissociation, solubility, dissociation constant

KARBANOVÁ, K. *Disociační chování huminových kyselin*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2015. 35 s. Vedoucí bakalářské práce doc. Ing. Martina Klučáková, Ph.D..

PROHLÁŠENÍ

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

.....
podpis studenta

Poděkování:

Na tomto místě bych velice ráda poděkovala vedoucí mé bakalářské práce doc. Ing. Martině Klučákové Ph.D. za odborné vedení, cenné rady a především čas, který mi věnovala.

OBSAH

1	ÚVOD	7
2	TEORETICKÁ ČÁST	8
2.1	Huminové látky.....	8
2.1.1	Vznik huminových látek	8
2.1.1.1	Ligninová teorie	8
2.1.1.2	Polyfenolová teorie	9
2.1.1.3	Kondenzace cukrů s aminy	9
2.1.2	Dělení huminových látek.....	9
2.1.3	Struktura a vlastnosti huminových látek	10
2.1.4	Využití huminových látek	11
2.1.5	Huminové kyseliny.....	11
2.1.6	Rozpustnost a kyselé funkční skupiny	11
2.2	Disociace huminových kyselin	12
2.2.1	Disociace slabé jednosytné kyseliny	12
2.2.2	Disociace slabé vícesytné kyseliny	13
2.2.3	Disociace silné vícesytné kyseliny	13
2.2.4	Metody studia disociace a stanovení pK_a huminových kyselin	14
2.2.4.1	Titrační metody.....	14
2.2.4.2	Spektrofotometrické metody.....	15
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	17
3.1	Použité chemikálie.....	17
3.2	Použité přístroje	17
3.3	Pracovní postup	17
3.3.1	Extrakce huminových kyselin	17
3.3.2	Příprava roztoků pro studium disociačních konstant.....	17
3.3.3	Stanovení obsahu kyselých funkčních skupin	19
3.3.3.1	Celková kyselost.....	19
3.3.3.2	Karboxylová kyselost	19
3.3.4	Stanovení pK_a huminových kyselin.....	19
3.3.4.1	Konduktometrická metoda.....	19
3.3.4.2	Spektrofotometrická metoda	20
3.3.4.3	Kombinace měření pH a obsahu kyselých funkčních skupin v Na_2SO_4	20
4	VÝSLEDKY A DISKUZE	21
4.1	Stanovení obsahu kyselých funkčních skupin.....	21
4.2	Stanovení pK_a huminových kyselin.....	22
4.2.1	Konduktometrická metoda	22
4.2.2	Spektrofotometrická metoda	24

4.2.3	Kombinace měření pH a obsahu kyselých funkčních skupin v Na ₂ SO ₄	27
4.3	Srovnání pK _a huminových kyselin stanovených jednotlivými metodami	29
5	ZÁVĚR	31
6	POUŽITÁ LITERATURA	32
7	SEZNAM ZKRATEK A SYMBOLŮ	35

1 ÚVOD

Huminové látky vznikají nejčastěji rozkladem organické hmoty nebo syntetickou činností mikroorganismů a tvoří neoddělitelnou součást vodní a půdní organické hmoty. Jsou to vysokomolekulární organické látky a mají složitou, doposud ne zcela přesně popsanou strukturu. Liší se podle původu, naleziště a doby odběru vzorku. Je to dáno tím, že huminové látky se chovají jako živý organismus a za vhodných podmínek mění svou strukturu. Dělí se podle chování v kyselinách a zásadách na huminy (nerozpustné ve vodě při kyselé i alkalické hodnotě pH), fulvinové kyseliny (rozpustné ve vodě a zředěných kyselinách) a huminové kyseliny (rozpustné v alkáliích a nerozpustné v kyselinách). Ze všech funkčních skupin přítomných v jejich struktuře je nejvíce obsaženo karboxylových a fenolických skupin. Tyto skupiny přispívají k celkové kyselosti huminových látek. Využívají se například v zemědělství (zejména jako hnojivo v podobě humátů a ke stimulaci růstu rostlin), ve farmakologii a v průmyslu.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Huminové látky

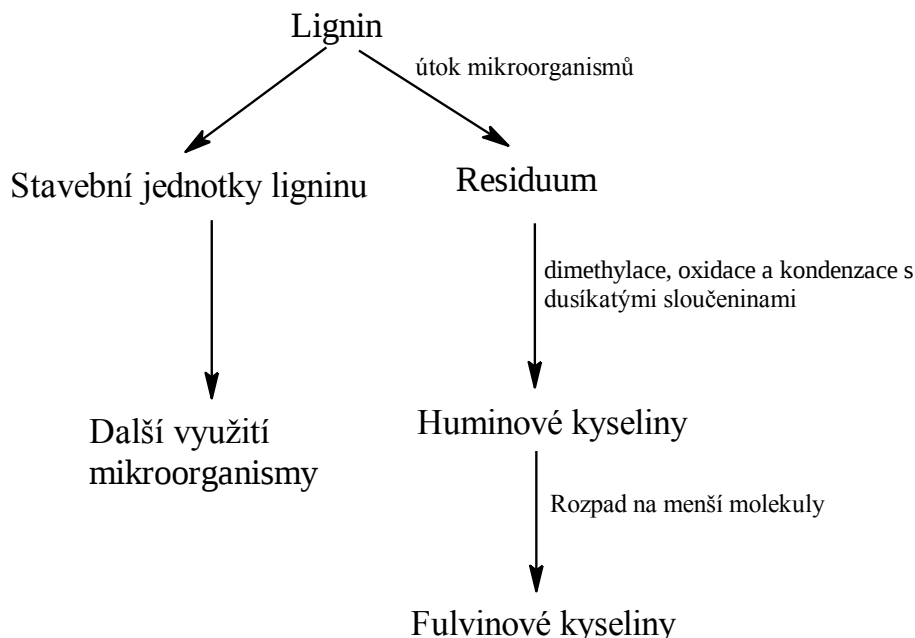
Huminové látky jsou přírodní organické sloučeniny vzniklé chemickým a biologickým rozkladem organické hmoty (např. zbytků rostlin, živočichů) a syntetickou činností mikroorganismů. [1] Jsou to složité vysokomolekulární polycyklické sloučeniny s relativní molekulovou hmotností v rozmezí několika stovek až desítek tisíců. [2] Struktura huminových kyselin je velmi rozmanitá a dosud není přesně známa. Liší se podle původu, naleziště a doby odběru vzorku. Je to dáno tím, že huminové kyseliny se chovají jako živý organismus a za vhodných podmínek mění svou strukturu. [3]

2.1.1 Vznik huminových látek

Vznik huminových látek není zcela objasněn a existuje několik teorií jejich vzniku. Jedná se např. o degradační (ligninovou) a syntetickou (polyfenolovou) teorii. Je pravděpodobné, že oba mechanismy existují vedle sebe a mohou se i různě prolínat. Ve vodních ekosystémech zřejmě dominuje degradační mechanismus, zatímco v terestrických ekosystémech převažuje syntéza. [2]

2.1.1.1 Ligninová teorie

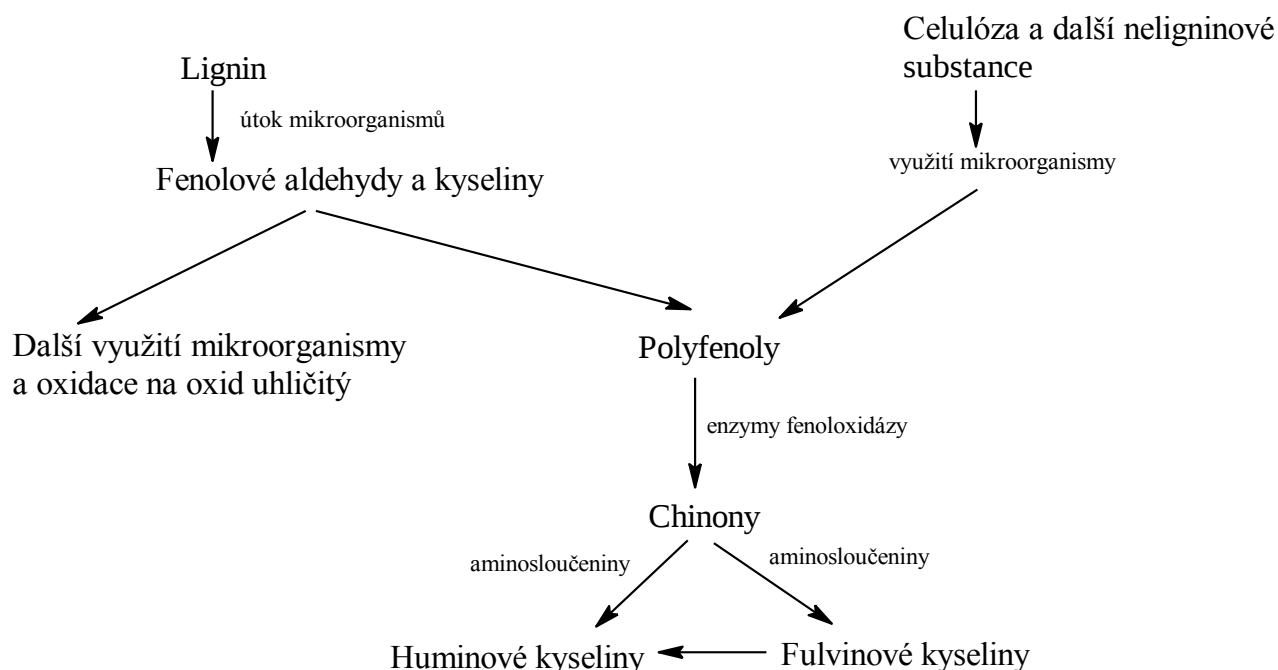
Ligninová teorie popisuje vznik huminových látek mikrobiálním rozkladem odumřelého rostlinného materiálu, kdy z těžko rozložitelných látek jako je lignin, kutin nebo melanin vznikají vysokomolekulární huminy. Ty jsou pak oxidací postupně transformovány přes huminové kyseliny na fulvokyseliny a dále na ještě menší molekuly. Pokud degradační mechanismus pokračuje, jsou huminové látky postupně a velmi pomalu rozloženy až na oxid uhličitý a vodu. [2]



Obrázek 1 Ligninová teorie [4]

2.1.1.2 Polyfenolová teorie

Polyfenolová teorie vychází z předpokladu, že rostlinné tkáně jsou nejprve degradovány na malé molekuly (karboxylové kyseliny, fenoly, atd.) a z nich se pak syntézou tvoří huminové látky. Nejprve by tedy vznikaly fulvokyseliny, až pak huminové kyseliny a nakonec huminy. [2]



Obrázek 2 Polyfenolová teorie [5]

2.1.1.3 Kondenzace cukrů s aminy

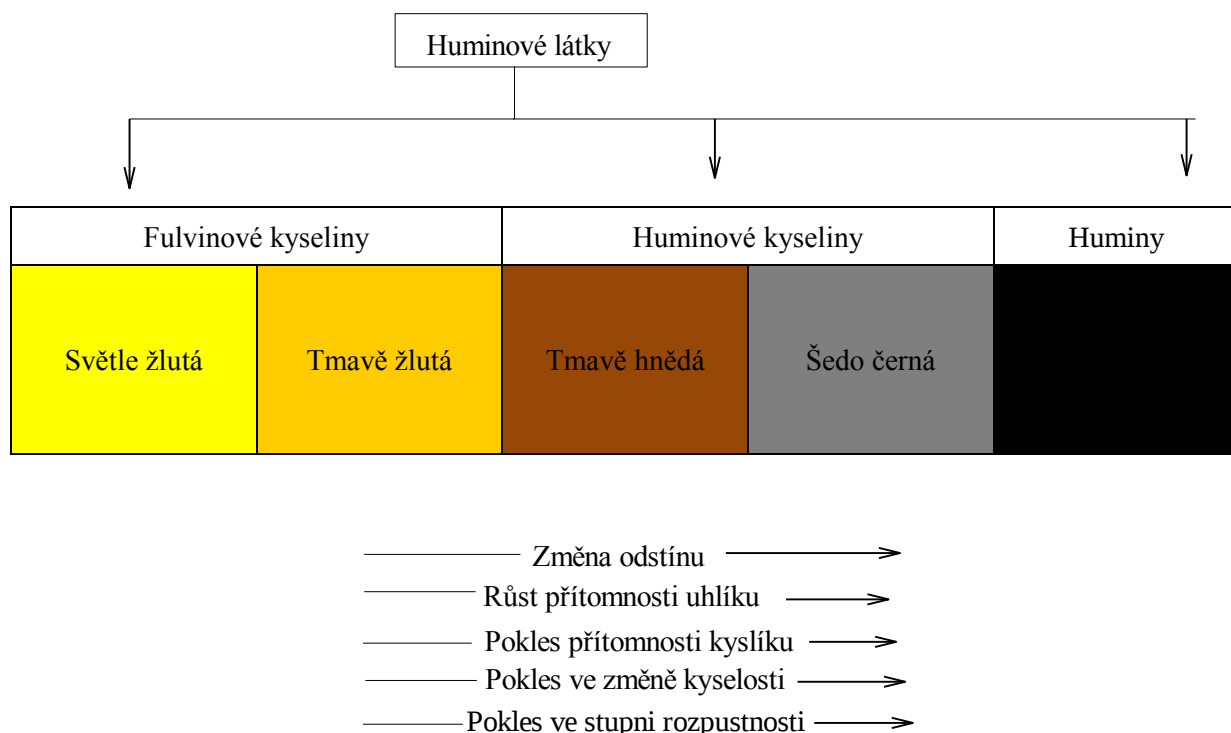
Tato teorie je založena na kondenzaci redukujících cukrů s aminy za vzniku hnědých dusíkatých polymerů. Reaktanty (cukry, aminokyseliny) vznikají ve velkém množství v půdě díky činnosti mikroorganismů. Počátek reakce vyžaduje přidavek aminu na aldehydovou skupinu cukru za vzniku Schiffovy báze a N-substituovaného glykosylaminu. Glykosylamin podléhá Amadoriho přesmyku. Výsledkem přesmyku je vznik aldehydů a ketonů. Ty jsou dehydratovány na reduktony a ty jsou dále dehydratovány na hydroxymethylfurfuraly. Nevýhodou je, že reakce při teplotách vyskytujících se v půdách za normálních podmínek probíhají relativně pomalu. Nicméně výrazné a časté změny v půdním prostředí (mrznutí, tání, zvlhčování, schnutí) společně se smícháním reaktantů s minerály mají katalytický účinek, urychlují kondenzaci. [5]

2.1.2 Dělení huminových látek

Huminové látky se mohou dělit podle jejich chování v kyselinách a zásadách. [6] Za hlavní složky huminových látek jsou obvykle považovány huminové kyseliny, fulvokyseliny a humin. [1]

- Huminy jsou částice s velkou molekulovou hmotností a relativně malým specifickým povrchem. Obsahují poměrně nízký obsah karboxylových skupin, jsou nerozpustné ve vodě při kyselé i alkalické hodnotě pH a jsou nereaktivní.
- Huminové kyseliny mají menší velikost než huminy (přibližně koloidní velikost) a obsahují více karboxylových skupin než huminy. Jsou rozpustné v alkáliích a nerozpustné v kyselinách. Tvoří nejkvalitnější složku huminových látek. Jsou to polymery tmavohnědé až černé barvy. Fulvinové kyseliny jsou složkami huminových látek s nejmenší velikostí. Jsou rozpustné ve vodě a zředěných kyselinách. Mají vysoký obsah karboxylových skupin na jednotku hmotnosti. Díky tomu jsou nejreaktivnějšími složkami huminových látek. V půdě se nejčastěji

vyskytují v adsorbované formě. S oxidy železa a hliníku vytvářejí organominerální sloučeniny. Mají charakteristické žluté zbarvení (fulvus = žlutý). [1, 3, 6]

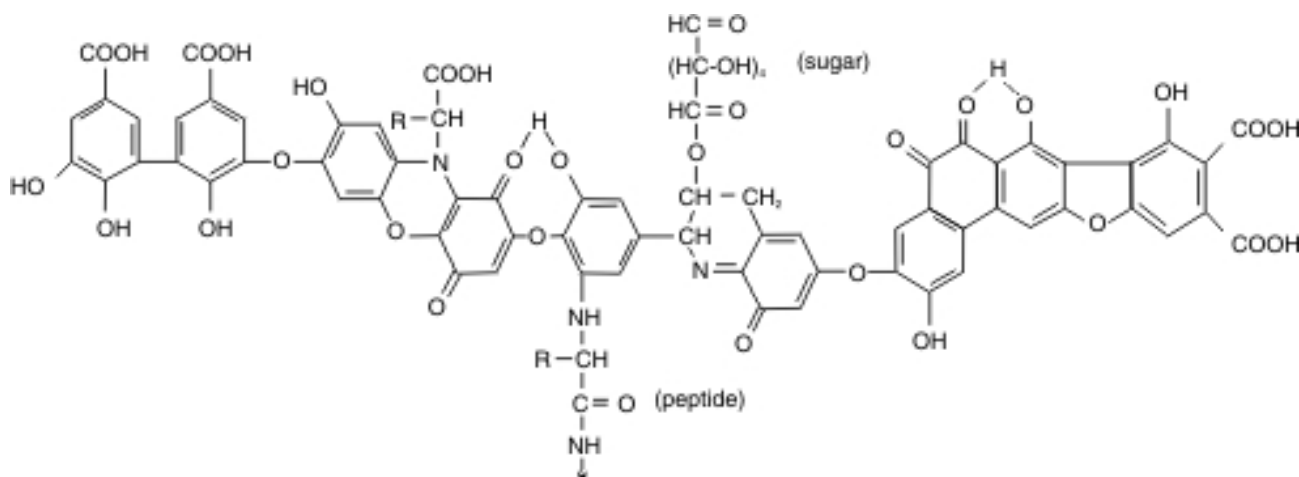


Obrázek 3 Klasifikace huminových kyselin [7]

2.1.3 Struktura a vlastnosti huminových látek

Huminové látky definujeme jako směs amorfních, polydisperzních sloučenin žluté až hnědočerné barvy. Jsou heterogenní skupinou přírodních organických molekul s komplikovanou polymerní strukturou a tvoří neoddělitelnou součást půdní a vodní organické hmoty. [8] Doposud nejsou zcela přesně popsány, přestože jsou předmětem studia více než 100 let. [1] Mají převážně aromatický charakter, kdy aromatická jádra bývají vzájemně spojena alifatickými, často cyklickými řetězci a svou povahou se řadí do skupiny polyfenolů a polykarboxylových kyselin. Typickými funkčními skupinami přítomnými ve struktuře huminových látek jsou především karboxylové a hydroxylové skupiny, ale i methoxylové a karbonylové skupiny. Tyto funkční skupiny mohou být vázány jak na aromatických jádrech, tak i v postranních řetězcích. Kromě aromatických jader byly v makromolekulách huminových látek nalezeny i chinoidní a olefinové struktury. Huminové látky jsou tvořeny převážně uhlíkem, dále kyslíkem, vodíkem, dusíkem a také sírou. [2] Existuje mnoho studií, které se zabývají huminovými látkami o velkých molekulových hmotnostech. Nicméně se nepodařilo identifikovat pravidelně se opakující strukturní jednotku nebo několik jednotek, které by mohly být považovány za charakteristické pro tyto látky. V roce 1989 Hayes prohlásil, že neexistuje žádný důkaz pro pravidelnost ve strukturách huminových makromolekul. Podle Stevenson, na každou frakci (huminovou kyselinu, fulvinovou kyselinu) by se mělo nahlížet tak, jako by byla složena z řady molekul různých velikostí. Některé mají přesně stejnou strukturní konfiguraci nebo řadu reaktivních funkčních skupin. V roce 1963 Dubach a Mehta ve svém fascinujícím prohlášení uvažovali, že snad žádné dvě molekuly huminových látek nejsou přesně stejné. Bylo provedeno mnoho výzkumů týkajících se huminových látek. Studie poskytly mnoho informací o složení huminových látek (především o obsahu funkčních skupin). Nicméně nebyly odhaleny žádné molekulární jednotky, které by mohly být považovány za základní stavební bloky, které by byly jedinečným rysem těchto

látek.[9]. Vlastnosti huminových látek, jako je rozpustnost ve vodě, schopnost agregace a disociace, nábojové poměry či schopnost vytvářet komplexy s kovovými ionty, úzce souvisí s jejich složením, které je ovlivněno humifikačními procesy. Vedle těchto procesů jsou také významně ovlivněny velikostí jednotlivých molekul a částic, stupněm jejich dispergace (pravé nebo koloidní roztoky), polaritou, která je dána charakterem skeletu (aromatický nebo alifatický) a hlavně druhy, počty a disociačními schopnostmi funkčních skupin. [2]



Obrázek 4 Struktura huminových kyselin podle Stevensona [5]

2.1.4 Využití huminových látek

Huminové látky jsou již po řadu desetiletí předmětem intenzivního vědeckého zájmu, který vychází zejména z jejich výhodně využitelných chemických a fyzikálních vlastností. Mají poměrně rozsáhlé využití v zemědělství, průmyslu, oblasti ochrany životního prostředí, farmakologii a využívají se také jako palivo. V zemědělství jsou tyto látky využívány zejména jako hnojivo v podobě humátů. [1] V mnoha studiích byly popsány účinky huminových látek na stimulaci růstu rostlin. Podle své struktury huminové látky ovlivňují řadu fyzikálních a chemických vlastností půdy. Konkrétně ovlivňují stabilitu půdních agregátů, kapacitu pufrů, transport, sorpci hydrofobních organických sloučenin a tvoření komplexů s kovy přítomnými v prostředí. Huminové látky poskytují energii pro prospěšné půdní organismy, ovlivňují kapacitu zadržování půdní vody, strukturu půdy, uvolňování rostlinných živin z půdních minerálů, zvyšují dostupnost stopových minerálů a zkvalitňují úrodnost půdy kontaminované solí. [10]

2.1.5 Huminové kyseliny

Huminové kyseliny reprezentují spolu s fulvokyselinami a huminem tři základní frakce humusu, které tvoří jeho podstatnou část. Huminové kyseliny však patří mezi nejdůležitější frakci humifikované půdní organické hmoty, protože na rozdíl od fulvokyselin a huminu, které se podílejí asi 8 % na celkovém koloběhu uhlíku, podíl huminových kyselin je až 16 %. Tvoří nejvyšší složku humusových látek. Jsou to polymery tmavohnědé až černé barvy. Jejich základní jednotkou jsou aromatická mikrojádra fenolického nebo chinoidního typu, na které se prostřednictvím můstků typu ($-\text{O}-$, $-\text{NH}-$, $-\text{N}-$, $-\text{S}-$, $-\text{CH}_2-$) napojují v bočních řetězcích funkční skupiny. [8]

2.1.6 Rozpustnost a kyselé funkční skupiny

Rozpustnost látek je v chemické praxi velmi významným jevem zejména u kapalných roztoků – omezená vzájemná rozpustnost složek. Rozpouští-li se například krystalický Na_2SO_4 ve vodě, vytváří se postupně vodný roztok o stále větší koncentraci Na_2SO_4 , až se posléze další rozpouštění zastaví. Rozpustnost látky je definována jako koncentrace nasyceného roztoku určité látky při určitých fyzikálních podmínkách (teplotě a tlaku). [11]

Humínové kyseliny jsou definovány jako frakce huminových látek, které se nerozpouští za kyselých podmínek. Izolace huminových kyselin z přírodních zdrojů (půdy, rašeliny, uhlí) je založena na okyselení alkalického extraktu na pH 1-2, což má za následek vysrážení huminové kyseliny. [12, 13] Rozpustnost huminových kyselin je velmi důležitým faktorem při studiu jejich interakce s ionty kovů a radionuklidy. Chemické chování huminových kyselin je podobné jako chování ostatních polyelektrolytů. V roztocích se huminové kyseliny chovají jako micelární koloidy. Koloidní částice mají záporný náboj a tento izoelektrický bod leží v kyselé oblasti. Rozpustnost huminových kyselin závisí na pH, iontové síle a mnoha dalších faktorech. [14]

Humínové kyseliny jsou soustava polyfunkčních molekul, jako jsou lipidy, uhlovodíky, aromatické sloučeniny a další. Jejich interakce s různými kontaminanty závisí na typu a množství těchto funkčních skupin. Ionizačními místy ve struktuře huminových kyselin jsou atomy kyslíku, dusíku nebo síry formující karboxylové, fenolové, hydroxylové, aminové a thiolové funkční skupiny. Ze všech funkčních skupin přítomných v huminových kyselinách se jako nejvíce reaktivní jeví skupiny obsahující kyslík (karboxylové, fenolové), které přispívají k celkové kyselosti huminových látek. V průběhu procesu tvorby huminových kyselin (humifikace) se v nich zvyšuje obsah COOH a C=O skupin, přičemž obsah alkoholových a fenolických OH skupin a skupin OCH₃ se v průběhu tohoto procesu snižuje. Hlavní rozdíl v obsahu funkčních skupin huminových a fulvinových kyselin je, že ve fulvokyselinách je prakticky všude kyslík obsažený v COOH, OH a C=O skupinách, zatímco v huminových kyselinách větší část kyslíku tvoří strukturní složku, tzv. „jádro“, což jsou například etherové a esterové vazby. Dalším rozdílem může být fakt, že obsah ketonových C=O skupin je vyšší ve fulvokyselinách, zatímco v huminových kyselinách se nacházejí spíše chinonové C=O skupiny. [8,15]

2.2 Disociace huminových kyselin

Humínové kyseliny se chovají jako slabě kyselé polyelektrolyty, jelikož obsahují postranní skupiny schopné elektrolytické disociace. Disociací vzniká makroion s velkým počtem elementárních nábojů a příslušný počet malých iontů opačného náboje (protiiontů). Silné kyseliny disociují úplně, slabé kyseliny pouze do určitého stupně. [16]

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

2.2.1 Disociace slabé jednosytné kyseliny

Disociaci slabé jednosytné kyseliny HA můžeme zapsat podle rovnice:



Tato reakce je charakterizována rovnovážnou konstantou K_{HA} zvanou disociační konstanta kyseliny, pro kterou platí:

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

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

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

Jestliže v systému neuvažujeme žádnou další reakci (např. disociaci vody), tak můžeme složení rovnovážné směsi vyjádřit pomocí stupně disociace:

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

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

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

Rovnici (2) pak lze zapsat ve tvaru:

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

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

2.2.2 Disociace slabé vícesytné kyseliny

Slabá dvojsytná kyselina H_2A disociuje do prvního stupně podle rovnice



a do druhého stupně podle rovnice



Označíme-li rovnovážnou konstantu první reakce K_1 a druhé K_2 , platí

$$K_1 = \frac{c_{H^+} + c_{HA^-} \cdot \gamma_{H^+} + \gamma_{HA^-}}{c_{H_2A} \cdot \gamma_{H_2A} \cdot c_{st}}, \quad (10)$$

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

V oblasti koncentrací, kdy platí Debyeův-Hückelův limitní vztah je

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

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

V případech, kde $K_1 \gg K_2$ (rozdíly v hodnotách disociačních konstant jsou 3 a více řádů) není třeba disociaci do druhého a vyšších stupňů uvažovat.

2.2.3 Disociace silné vícesytné kyseliny

Silná dvojsytná kyselina H_2A disociuje do prvního stupně úplně



a do druhého stupně do ustavení rovnováhy



Pro disociační konstantu reakce platí

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

kde, v souladu s Debyeovým-Hückelovým limitním vztahem, předpokládáme že

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

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

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

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

kde c je počáteční koncentrace kyseliny a α stupeň disociace aniontu HA^- . [17]

2.2.4 Metody studia disociace a stanovení pK_a huminových kyselin

2.2.4.1 Titrační metody

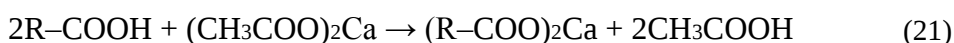
Titrační metody jsou často používaným způsobem pro stanovení disociačních konstant huminových kyselin. Jako titrační činidlo se nejčastěji používá standardizovaný roztok NaOH. Funkční skupiny, které podléhají disociaci, jsou především ty, které obsahují kyslík – v převážné většině karboxylové a fenolové skupiny, které přispívají k celkové kyselosti huminových látek. [18] Jelikož jsou huminové kyseliny polyelektrolyty, tak jednotlivé karboxylové a fenolové skupiny mají různě kyselé disociační konstanty. [19] Nejběžnějšími metodami pro stanovení celkové kyselosti jsou potenciometrické titrace a tradiční baryum-hydroxidová metoda.

- Potenciometrická titrace – Potenciometrie je elektrochemická metoda založená na měření rovnovážného napětí galvanického článku. Článek je sestaven z měrné (indikační) a srovnávací (referentní) elektrody. Potenciál měrné elektrody závisí na koncentraci sledované látky, zatímco potenciál srovnávací elektrody je konstantní. Rovnovážné napětí, které je rozdílem těchto dvou potenciálů, je mírou koncentrace sledované látky. V potenciometrických titracích sledujeme závislost napětí vhodně sestaveného článku na objemu přidávaného titračního činidla a z titrační křivky pak vyhodnotíme bod ekvivalence. Titrační křivku můžeme teoreticky vypočítat, umíme-li vyjádřit potenciál měrné elektrody z Nernstovy nebo Nicolsky-Eisenmanovy rovnice. Granova metoda vyhodnocení potenciometrické titrační křivky vychází z linearizace Nernstovy rovnice. [20]
- Baryum-hydroxidová metoda – je založena na reakci huminové kyseliny s hydroxidem barnatým. Reakcí vznikají barnaté soli huminové kyseliny a voda. Nadbytečný hydroxid barnatý je pak titrován standardní kyselinou. [21]



Karboxylové skupiny jsou nejčastěji stanovovány kalcium-acetátovou metodou nebo dekarboxylací. [19]

- Kalcium-acetátová metoda – tato nepřímá titrační metoda je založena na vzájemné interakci mezi stanovovanou huminovou kyselinou a octanem vápenatým. Nahradí se vápenaté ionty octanu vápenatého vodíky z karboxylových kyselin a tím dochází k tvorbě kyseliny octové. Kyselina octová je titrována roztokem hydroxidu sodného o známé koncentraci. [22]



Fenolové OH skupiny jsou stanovovány jako rozdíl mezi celkovou kyselostí a obsahem karboxylových skupin. [19]

Experimentální data získaná titrací jsou nejčastěji vyhodnocována pomocí upravené Henderson-Hasselbalchovy rovnice, která vyjadřuje závislost zdánlivé disociační konstanty na stupni disociace.

$$pH = pK_{app} - \log \frac{\alpha}{1-\alpha}, \quad (22)$$

kde pK_{app} je zdánlivá disociační konstanta a α je stupeň disociace.

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

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

V práci [24] byla použita jednoduchá metoda diferenciální potenciometrie k určení distribuce pufrační kapacity, hodnoty zdánlivých disociačních konstant a povrchového náboje huminových kyselin.

K tomuto účelu byly použity huminové kyseliny, které byly extrahovány ze dvou různých půd s odlišnou vegetací.

V práci [25] byla acidobazická rovnováha huminových kyselin charakterizována jejich titrací v prostředí s různou iontovou silou. Kyselé funkční skupiny rozdělili do dvou skupin (silné a slabé kyselé skupiny) a každé této skupině přisoudili určitou distribuci pK_a . Tyto skupiny jsou nepřetržitě deprotonovány podle jejich distribuce pK_a . Získaná data vyhodnocují podle modelu vytvořeného na základě Debye-Hückelovy teorie a srovnávají s modelovou kyselinou galovou.

Autoři článku [23] používali acidobazickou potenciometrickou titraci pro stanovení acidobazických vlastností huminových kyselin. Pro vyhodnocení obsahu kyselých funkčních skupin a průměrných hodnot zdánlivých pK_a použili upravenou Henderson-Hasselbalchovu rovnici. Zjistili, že obsah kyselých funkčních skupin a aromaticita roste se snižující se velikostí molekuly.

V práci [18] byla opět použita metoda potenciometrické titrace ke stanovení kyselých vlastností huminových kyselin. Skupiny, které obsahují kyslík jako karboxylové, fenolové a alkoholové byly izolovány a selektivně blokovány metylací pomocí CH_3I/Ag_2O v dimethylformamidu. Experimentální data byla vyhodnocena opět pomocí upravené Henderson-Hasselbalchové rovnice.

Cílem autorů článku [26] bylo stanovit koncentraci a pK_a ionizovatelných funkčních skupin huminových kyselin acidobazickou potenciometrickou titrací. Získaná data byla vyhodnocena lineární metodou založenou na upravené Granově funkci. Výsledky byly srovnány s výsledky získanými konduktometrickou titrací $NaOH$ a $Ba(OH)_2$, s infračervenými spektry huminových kyselin s různými stupni protonizace a s klasickou kalcium-acetátovou a baryum-hydroxidovou metodou.

Autoři článku [27] použili metodu přímé potenciometrické titrace pro stanovení koncentrací karboxylových a fenolových skupin a zdánlivého pK_a . Byly zkoumány acidobazické vlastnosti huminových kyselin pomocí selektivní blokace karboxylových a fenolových skupin metodou esterifikace nebo acetylace. Rozdíly mezi nederivatizovanými a derivatizovanými acidobazickými vlastnostmi jsou připisovány vlivu karboxylových a fenolových skupin na celkovou kyselost huminových kyselin. Data získaná potenciometrickou titrací byla vyhodnocena pomocí upravené Henderson-Hasselbalchové rovnice. Po blokaci funkčních skupin se obsah kyselých skupin snížil, zatímco hodnota zdánlivého pK_a se po derivatizaci zvýšila. Fenolové skupiny nelze metodou acetylace přesně identifikovat v důsledku nízké selektivity této metody.

Pro kvantitativní a rovnovážnou analýzu roztoků huminových kyselin byla v práci [28] použita kombinace potenciometrie a coulometrie. Tato metoda je založena na potenciometrické titraci alkalických roztoků, které obsahují kromě huminových kyselin i $1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1} \text{ NaClO}_4$. Pomocí coulometrie za konstantního proudu se kyselost v roztocích zvyšuje do té doby, než se začne vyskytovat pevná fáze. Celková kyselost může být stanovena pomocí upravených Granových diagramů nebo ze sumy nejmenších čtverců. Stanovení acidobazické rovnováhy roztoků huminových kyselin bylo také provedeno na základě změny kapacity pufru, která nastává při každé titraci. Za předpokladu směsi tří jednosytných kyselin o přibližně stejné koncentraci byla obdržena experimentální data, která mají nejmenší standardní odchylku.

V práci [29] se používá metoda spektrofotometrické titrace jako alternativa místo obvyklé potenciometrické titrace. Spektrofotometrické titrace a UV/VIS spektra zředěných roztoků huminových kyselin se používají k odhadu změn, které nastávají v částech tvořících vazbu s protonem v závislosti na pH a iontové síle roztoku.

2.2.4.2 Spektrofotometrické metody

Podstatou ultrafialové a viditelné spektrometrie je absorpce ultrafialového a viditelného záření (200 – 800 nm) zředěnými roztoky molekul. Při absorpci dochází k excitaci valenčních elektronů, které jsou součástí molekulových orbitalů. Proto molekulová absorpční spektra v ultrafialové

a viditelné oblasti jsou svou podstatou elektronová spektra. Jeden pás ve spektru odpovídá jednomu typu přechodu elektronů v molekule do excitovaného stavu. Polohu píku určuje $\lambda_{\max}$, což je vlnová délka maxima pásu. Měření absorpance se hojně využívá k určení koncentrace sloučenin s chromofory. Pracuje se obvykle metodou kalibrační křivky. Ultrafialová a viditelná spektrometrie je využívána v průtočných celách detektorů různých separačních metod, např. kapalinové chromatografie a kapilární elektroforézy. Měření je prováděno buď při vhodné vlnové délce, nebo jsou snímána celá spektra v krátkých časových intervalech. [20] Absorpční spektra huminových kyselin všeobecně závisejí na pH prostředí. Spektroskopická metoda stanovení pK_a je založena na změně tvaru a intenzity absorpčních spekter při změně pH prostředí. [30, 31]

V publikaci [32] je použita metoda spektrofotometrického stanovení disociační konstanty u výluhů pykrátů alkalických kovů a pykrátů tetrabutylamonného, které jsou rozpuštěny ve 4-methyl-2-pentanonu. Touto studií se zjistilo, že při nízké koncentraci roztoku dochází téměř k úplné disociaci. Se zvyšující se koncentrací roztoku klesá schopnost disociovat. Disociace u pykrátů alkalických kovů si je téměř podobná a příliš se mezi sebou neliší. Pykrát tetrabutylamonný disociuje o něco více. V roztocích o nízké koncentraci souhlasí spektra pykrátů alkalických kovů se spektrem pykrátů tetrabutylamonného. Se vzrůstající koncentrací se pík posouvá k nižším vlnovým délkám.

Publikace [33] se věnuje elektrochemickému rozkladu huminových kyselin za účelem úpravy přírodní vody pro výrobu pitné vody. Jako pracovní elektrody byly použity rozměrově stabilní anody (DSA) s následujícím složením: $\text{Ti}/\text{Ir}_{0,3}\text{Ti}_{0,7}\text{O}_2$; $\text{Ti}/\text{Ru}_{0,3}\text{Ti}_{0,7}\text{O}_2$; $\text{Ti}/\text{Ir}_{0,2}\text{Ru}_{0,2}\text{Ti}_{0,6}\text{O}_2$. Elektrolýza byla provedena s použitím roztoku složeného z $0,1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ KCl a huminových kyselin o koncentraci $30 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$. V průběhu elektrolýzy byly odebírány vzorky, u kterých bylo měřeno pH, transmitance, UV/VIS spektra a chromatogramy. Výsledky ukázaly, že po 2 hodinách elektrolýzy při $40 \text{ mA} \cdot \text{cm}^{-2}$, $\text{Ti}/\text{Ru}_{0,3}\text{Ti}_{0,7}\text{O}_2$ elektroda odstraní většinu elektrooxidačních produktů.

V publikaci [34] byly zkoumány spektrofotometrické vlastnosti, rozpustnost a vodivost huminových látek. Celková průměrná molekulová hmotnost byla stanovena na 556 Da a nadbytek aromatického uhlíku na 12 %. Oba výsledky jsou podstatně nižší, než pro standardní referentní fulvinové kyseliny. Bylo zjištěno, že rozpustnost roste lineárně od koncentrace 5 do $20 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ rozpuštěné huminové látky. Dále bylo dokázáno rozpouštění iontů pomocí elektrochemické vodivosti. Limitní molární vodivost byla extrapolována a to bylo použito pro stanovení zdánlivého disociačního stupně huminových látek pro různé koncentrace. Disociační stupeň byl dále použit pro odvození koncentrační závislosti van't Hoffova faktoru. Van't Hoffův faktor se monotónně snižoval s koncentrací huminových látek. Pokles byl podstatný pro zředěné roztoky a vztah slábl pro koncentrovanější roztoky.

Autoři článku [35] zkoumali vliv disociační konstanty na povrchovou koncentraci u nukleofilů obsahujících oximové skupiny (např. u pralidoximu). Analýza byla provedena spektrofotometricky v čisté vodě a v 50% roztoku acetonitrilu. Bylo zjištěno, že disociační konstanta pralidoximu není ovlivněna jeho povrchovou koncentrací.

Vědci v článku [36] zkoumali kyselou rovnováhu 5-(*p*-dimethylbenzyliden) rhodnaninu (PDR) ve vodném micelárním roztoku pomocí jednoduché spektrofotometrické metody. Byl studován účinek neiontových, kationových a anionových povrchově aktivních látek na absorpční spektra PDR při různých hodnotách pH a bylo stanoveno pK_a PDR při různých koncentracích každé povrchově aktivní látky. Zjistili, že PDR disociuje více v přítomnosti kationové povrchově aktivní látky, zatímco nejmenší disociace nastává v přítomnosti anionové povrchově aktivní látky.

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Použité chemikálie

- huminové kyseliny
- kyselina chlorovodíková 35%
- hydroxid sodný
- difosforečnan sodný
- lignit
- dusičnan stříbrný
- kyselina fluorovodíková
- destilovaná voda
- síran sodný
- kyselina octová
- octan sodný
- octan vápenatý

3.2 Použité přístroje

- pH metr METTLER TOLEDO, Seven Easy
- konduktometr METTLER TOLEDO
- UV/VIS spektrofotometr HITACHI U-3900H
- automatický titrátor Titroline Alpha plus Schott
- průtokový analyzátor EcaFlow model 150 GLP

3.3 Pracovní postup

3.3.1 Extrakce huminových kyselin

Huminové kyseliny byly připraveny alkalickou extrakcí z namletého lignitu. Nejprve bylo 30 g lignitu smícháno s 1 dm^3 $0,1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ roztokem kyseliny chlorovodíkové, tato suspenze byla dekalcinována 1 hodinu na třepačce. Poté byl lignit promyt dostatečným množstvím destilované vody do odstranění chloridových iontů (zkouška pomocí dusičnanu stříbrného). Takto předupravený lignit byl převeden do plastové nádoby s extrakčním činidlem (2 dm^3 $0,1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ NaOH a $0,1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$), láhev byla ponechána na třepačce přes noc. Získaná suspenze byla odstředěna 20 minut (4000 RPM) při 15°C . Kapalný podíl (roztok huminových a fulvinových kyselin) byl přefiltrován přes filtr a okyselen koncentrovaným roztokem HCl na hodnotu pH menší než 2. Po dvou hodinách došlo k vysrážení huminových kyselin, které byly odděleny od roztoku fulvinových kyselin odstředěním při stejných parametrech centrifugy. Pevný podíl získaný po prvním odstředění byl znovu podroben extrakci stejným způsobem, jak je popsáno výše. Získané huminové kyseliny (po první a druhé extrakci) byly převedeny do plastové nádoby s 1 dm^3 0,5 % obj. roztoku směsi HCl a HF, nádoba byla umístěna na třepačku po dobu 2 dní. Suspenze byla odstředěna 20 minut (4000 RPM) při 15°C a pevný podíl huminových kyselin byl převeden do dialyzačních membrán a dialyzován proti destilované vodě po dobu 3 týdnů do vymytí chloridových iontů (zkouška pomocí dusičnanu stříbrného). Po dialýze byl vzorek lignitické huminové kyseliny lyofilizován.

3.3.2 Příprava roztoků pro studium disociačních konstant

Nejprve bylo připraveno extrakční činidlo pro huminové kyseliny, což je 1% roztok síranu sodného rozpuštěného v destilované vodě. Suspenze huminových kyselin byly připravovány tak, že se navázilo určité, předem dané množství huminových kyselin, které byly extrahovány v 25 ml extrakčního činidla. Tato extrakce probíhala po dobu 5 dní. Suspenze byly poté přefiltrovány přes mikrofiltr $0,45 \mu\text{m}$ pomocí injekční stříkačky. Po přefiltrování bylo u každého roztoku změřeno pH, vodivost

a UV/VIS spektra v rozsahu 200 – 900 nm. Podobným způsobem byly připravovány roztoky huminových kyselin v NaOH s tím rozdílem, že jako extrakční činidlo byl použit 0,1 mol·dm⁻³ roztok NaOH. U těchto roztoků byla změřena vodivost. Zadané navážky, přesné navážky a množství extrakčního činidla jsou uvedeny v následujících tabulkách.

Tabulka 1 Suspenze huminových kyselin pro přípravu výluhů v Na₂SO₄

zadaná koncentrace [g/L]	zadaná navážka [g]	přesná koncentrace [g/L]	přesná navážka [g]	množství roztoku Na ₂ SO ₄ [ml]
0,01	0,00025	0,0116	0,00029	25
0,05	0,00125	0,0484	0,00121	25
0,1	0,0025	0,096	0,0024	25
0,5	0,0125	0,496	0,0124	25
1	0,025	1,104	0,0276	25
3	0,075	2,972	0,0743	25
5	0,125	4,924	0,1231	25
8	0,2	8,36	0,209	25
10	0,25	9,636	0,2409	25
15	0,375	15,204	0,3801	25
20	0,5	20,384	0,5096	25
40	1	40,688	1,0172	25

Výluhy huminových kyselin v Na₂SO₄ o koncentracích 20 g·dm⁻³ a 40 g·dm⁻³ byly použity k přípravě roztoků vzniklých smícháním 0,1 mol·dm⁻³ HCl, 0,1 mol·dm⁻³ NaOH a octanovým puforem o pH 4,16. Výsledné roztoky byly připravovány tak, že byl vždy smíchán 1 ml výluhu huminové kyseliny a 9 ml každého roztoku. U všech těchto roztoků byly změřeny UV/VIS spektra v rozsahu vlnových délek 200 – 900 nm. U roztoků vzniklých smícháním výluhů huminových kyselin a octanového pufru bylo navíc měřeno pH.

Tabulka 2 Roztoky huminových kyselin v NaOH

zadaná koncentrace [g·dm ⁻³]	zadaná navážka [g]	přesná koncentrace [g·dm ⁻³]	přesná navážka [g]	Množství roztoku NaOH [ml]
0,01	0,0001	0,03	0,0003	10
0,05	0,0005	0,07	0,0007	10
0,1	0,001	0,12	0,0012	10
0,5	0,005	0,49	0,0049	10
1	0,01	0,98	0,0098	10
3	0,03	2,7	0,027	10
5	0,05	4,71	0,0471	10
8	0,08	7,95	0,0795	10
10	0,1	10,63	0,1063	10
15	0,15	15,18	0,1518	10
20	0,2	20,94	0,2094	10
40	0,4	39,82	0,3982	10

3.3.3 Stanovení obsahu kyselých funkčních skupin

3.3.3.1 Celková kyselost

Celková kyselost byla stanovována přímou a zpětnou titrací. Pro přímou titraci bylo naváženo cca 100 mg huminových kyselin, které byly suspendovány ve 100 ml destilované vody a ponechány míchat 24 hodin. Tato suspenze byla následně titrována $0,1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ NaOH automatickým titrátorem s konstantním přídávkem 0,05 ml v intervalu 5 min. Každých 30 s se automaticky zaznamenávaly naměřené hodnoty pH a vodivosti (celkový přidaný objem činil 20 ml).

Pro zpětnou titraci bylo naváženo cca 100 mg huminových kyselin, které byly rozpuštěny v $0,1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ NaOH a ponechány míchat opět 24 hodin. Suspenze byla titrována $0,1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ HCl automatickým titrátorem s konstantním přídávkem 0,05 ml v intervalu 30 s. Každých 5 s se automaticky zaznamenávaly naměřené hodnoty pH a vodivosti (celkový přidaný objem činil 60 ml).

3.3.3.2 Karboxylová kyselost

Pro stanovení karboxylové kyselosti byla navážka přibližně 50 mg vzorku huminových kyselin smíchána se 40 ml $0,5 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ $\text{Ca}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ a 10 ml destilované vody. Slepý vzorek byl připraven smícháním 40 ml $0,5 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ $\text{Ca}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ a 10 ml destilované vody. Tyto vzorky byly ponechány míchat 24 hodin. Po 24 hodinách byl vzorek přefiltrován přes filtrační papír do 100 ml odměrné baňky, filtr byl promýván destilovanou vodou. Odměrná baňka byla doplněna destilovanou vodou po rysku. Uvolněná kyselina octová byla titrována $0,1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ NaOH automatickým titrátorem s konstantním přídávkem 0,05 ml v intervalu 30 s. Každých 5 s se automaticky zaznamenávaly naměřené hodnoty pH a vodivosti (celkový přidaný objem činil 10 ml). Stejným způsobem byl titrován i slepý pokus, ve kterém chyběla navážka huminové kyseliny.

3.3.4 Stanovení pK_a huminových kyselin

3.3.4.1 Konduktometrická metoda

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

$$G = \kappa \cdot \frac{S}{l}, \quad (23)$$

kde κ je konduktivita.

Vodivost roztoků elektrolytů měříme pomocí střídavého proudu s tak vysokou frekvencí, při které nedochází k elektrolyze. Vlastnosti měřicí nádoby charakterizujeme hodnotou její odporové kapacity C, kterou stanovujeme pomocí roztoku se známou konduktivitou:

$$C = \frac{\kappa}{G} = \kappa \cdot R. \quad (24)$$

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

$$\lambda_i = \frac{\kappa_i}{c_i}. \quad (25)$$

U molární vodivosti je třeba zvlášť specifikovat částice daného elektrolytu, kterých se uvažuje jeden mol. Uvažované částice mohou být molekuly, elektrony, ionty, atomy nebo stechiometricky zvolená skupina. Závislost molární vodivosti λ_i na složení roztoku udává empirický Kohlrauschův vztah kde a je empirická konstanta a λ_i^∞ je mezní molární vodivost (hypotetická molární vodivost pro $c_i \rightarrow 0$).

$$\lambda_i = \lambda_i^\infty - a\sqrt{c_i}, \quad (26)$$

Pro nekonečně zředěný roztok platí Kohlrauschův zákon nezávislosti pohybu iontů

$$\lambda_i^\infty = \lambda_+^\infty + \lambda_-^\infty, \quad (27)$$

kde λ_+^∞ a λ_-^∞ jsou mezní molární vodivosti kationtu a aniontu elektrolytu. Poměr $\lambda_i / \lambda_i^\infty$ je u slabých elektrolytů rovný stupni elektrolytické disociace α_i , který představuje podíl disociovaných molekul:

$$\alpha_i = \frac{\lambda_i}{\lambda_i^\infty}. \quad (28)$$

Pro konduktrometrickou metodu stanovení pK_a byly použity výluhy huminových kyselin v Na_2SO_4 (stanovení disociační konstanty určité frakce huminové kyseliny) a roztoky huminových kyselin v NaOH (stanovení disociační konstanty celého vzorku). Disociační konstanta byla stanovena podle následujícího vztahu:

$$K_{\text{HA}} = c_0 \frac{\lambda^2}{\lambda^\infty (\lambda^\infty - \lambda)}, \quad (29)$$

kde c_0 je formální koncentrace látkového množství rozpuštěné kyseliny HA. [37]

3.3.4.2 Spektrofotometrická metoda

Pro spektrofotometrické stanovení pK_a byly použity výluhy huminových kyselin v Na_2SO_4 o koncentracích 20 a 40 $\text{g} \cdot \text{dm}^{-3}$, u kterých bylo změřeno pH, vodivost a UV/VIS spektrum. Poté byly výluhy zředěny v poměru 1:9 s octanovým pufrům (bylo změřeno pH), HCl a NaOH o koncentracích 0,1 $\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Byla proměřena UV/VIS spektra v rozsahu vlnových délek $\lambda \in \langle 200 - 900 \text{ nm} \rangle$.

Disociační konstanta byla stanovena podle následujícího vztahu:

$$pK_a = \text{pH} + \log \frac{A_{\text{v pufru}} - A_{\text{v NaOH}}}{A_{\text{v HCl}} - A_{\text{v pufru}}}. \quad (30)$$

Absorbance A byly dosazovány vždy pro stejnou vlnovou délku $\lambda \in \langle 300 - 350 \text{ nm} \rangle$. Za pH bylo dosazováno pH výluhů huminových kyselin zředěných pufrům.

3.3.4.3 Kombinace měření pH a obsahu kyselých funkčních skupin v Na_2SO_4

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 výluhy huminových kyselin. Jako nosný elektrolyt byl použit roztok 1% Na_2SO_4 , do kterého byly huminové kyseliny extrahovány.

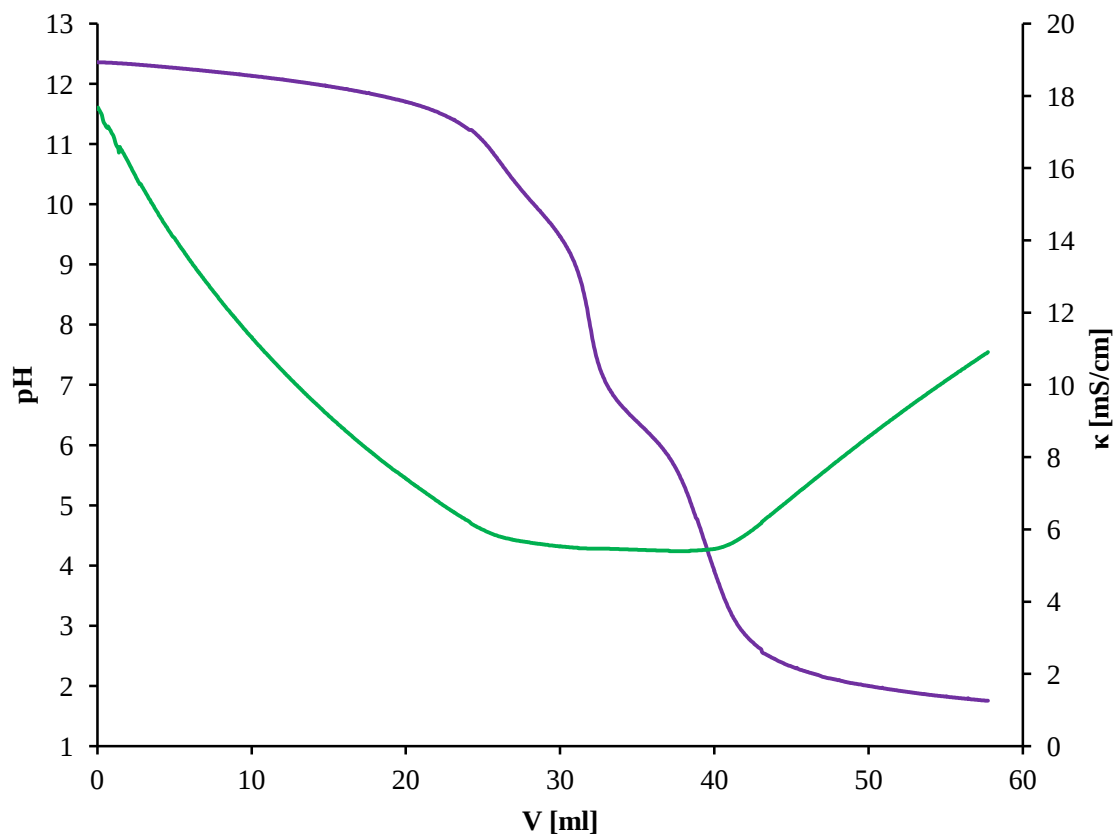
4 VÝSLEDKY A DISKUZE

4.1 Stanovení obsahu kyselých funkčních skupin

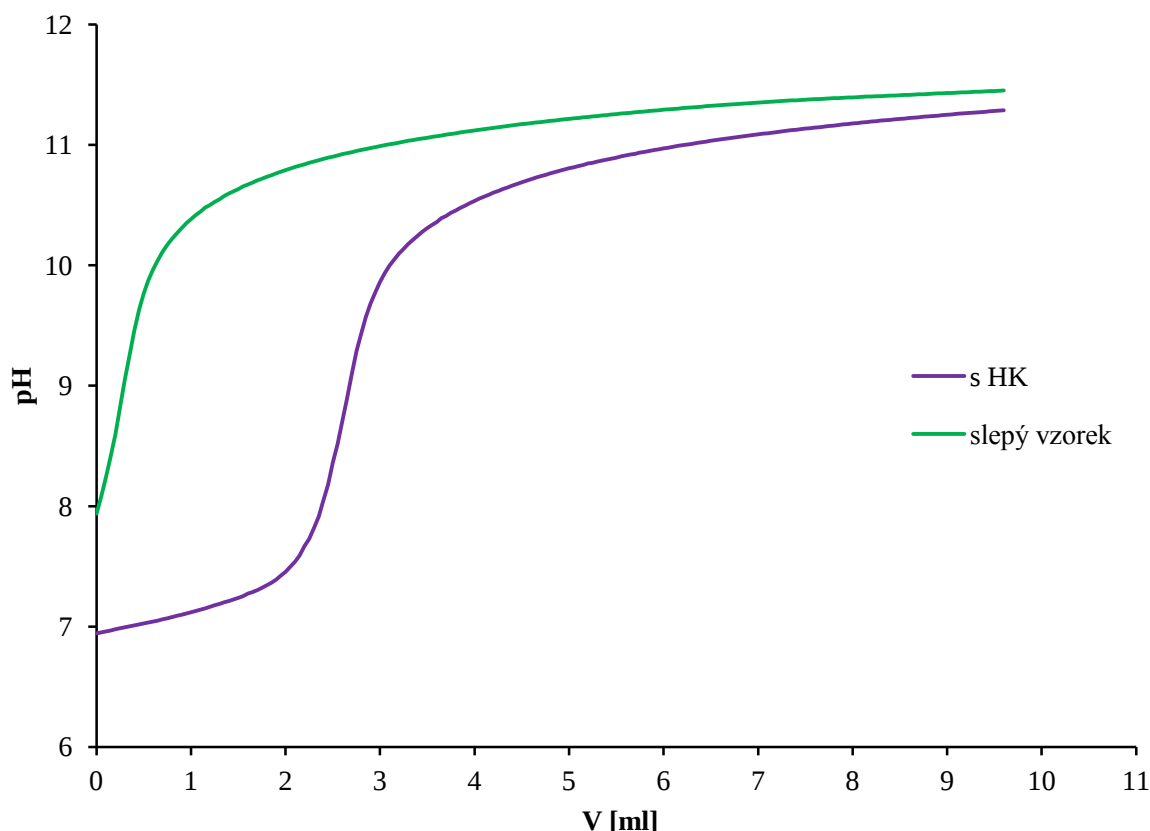
Ze získaných dat vodivosti a pH v závislosti na přidavku odměrného činidla, byly sestaveny titrační křivky, ze kterých byla vypočítána celková a karboxylová kyselost huminových kyselin. Hodnota celkové kyselosti byla vypočítána zprůměrováním hodnot celkové kyselosti získané přímou a zpětnou titrací. Celková kyselost byla stanovena na 7,24 mmol/g. Karboxylová kyselost byla počítána podobným způsobem a rovná se 5,23 mmol/g.

Tabulka 3 Celková a karboxylová kyselost

	mmol/g	±
celková kyselost	7,24	0,19
karboxylová kyselost	5,23	0,17



Obrázek 5 Závislost měrné vodivosti a pH na přidavku HCl při zpětné titraci HK



Obrázek 6 Závislost pH na přídavku NaOH při karboxylové titraci HK

4.2 Stanovení pK_a huminových kyselin

4.2.1 Konduktometrická metoda

Disociační konstanty byly stanoveny metodou nejmenších čtverců ze závislosti $\log K_{HA} = f(\sqrt{\alpha \cdot c_0})$ a byly extrapolovány na nekonečné zředění.

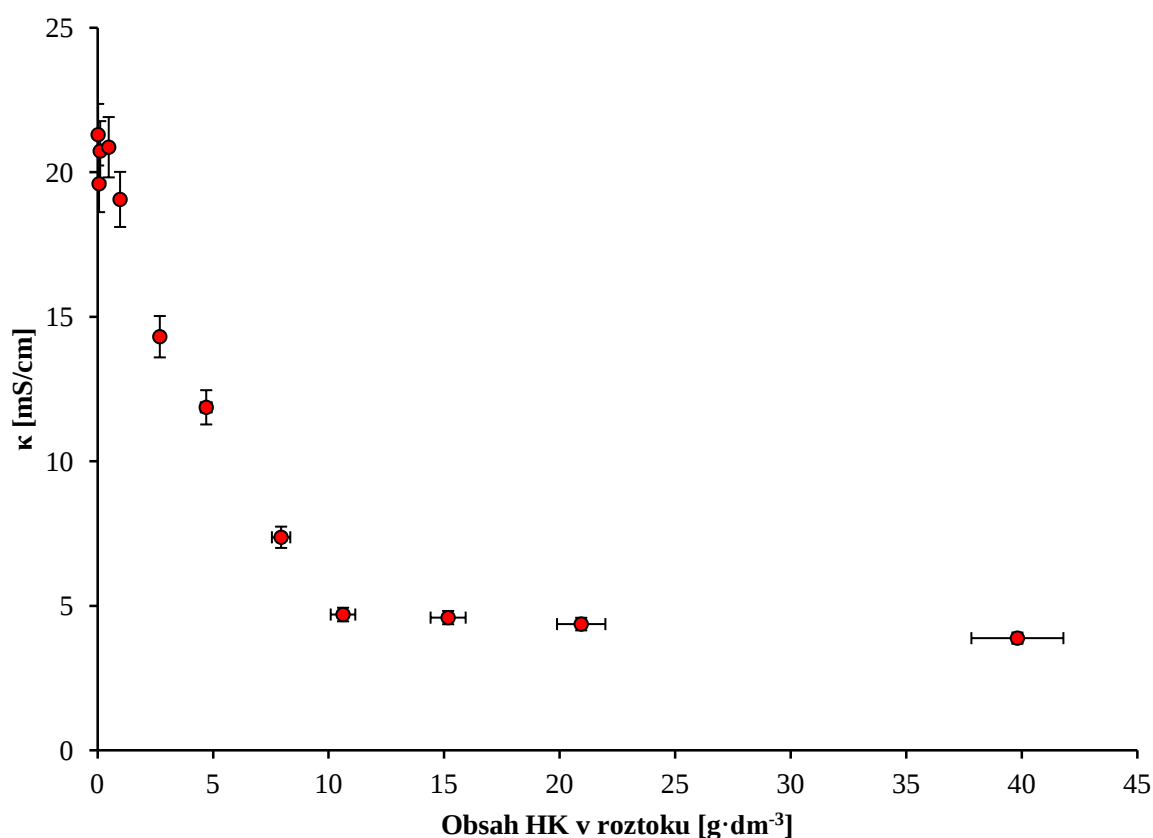
Konduktometrickou metodou byly stanovovány disociační konstanty u výluhů huminových kyselin v Na_2SO_4 a u roztoků huminových kyselin v NaOH. U výluhů HK se v Na_2SO_4 rozpustí vždy jen určitá frakce HK, tudíž pK_a stanovené tímto způsobem je jen pro určitou frakci HK. V NaOH se rozpustí všechna HK, a tak vypočítané pK_a je pro celý vzorek.

Huminové kyseliny obsahují velké množství různých skupin, které se liší svou silou. V Na_2SO_4 se přednostně rozpustí ta frakce huminových kyselin, která obsahuje silnější skupiny. Zvyšování obsahu huminových kyselin v roztoku, má za následek to, že frakce s menším obsahem COOH skupin a frakce se slabšími karboxylovými skupinami se rozpouští méně a méně, až je jejich rozpustnost potlačena. Složení frací se zřejmě koncentraci od koncentrace liší. Lze předpokládat, že při nízkých koncentracích se mohou rozpouštět i frakce, které obsahují méně karboxylových skupin s vyšším pK_a . Na výslednou hodnotu disociační konstanty mají tedy vliv pouze určité skupiny, které se v dané frakci rozpustí. Jelikož jsou huminové kyseliny dobře rozpustné v alkáliích, tak na rozdíl od Na_2SO_4 se v NaOH vždy rozpustí všechny skupiny. Výsledná disociační konstanta je asi o polovinu vyšší než u huminových kyselin rozpuštěných v NaOH.

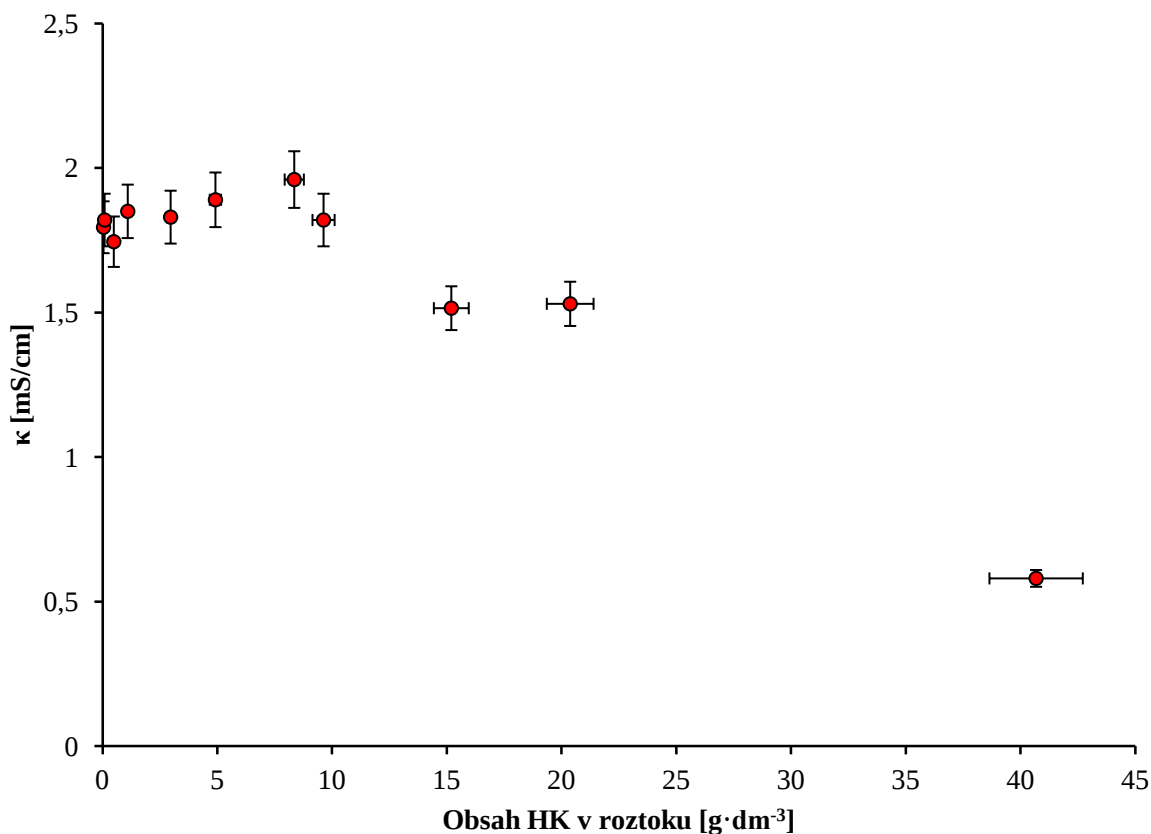
Tabulka 4 Disociační konstanty stanovené konduktometricky

	Na ₂ SO ₄	NaOH
pK _a	9,93	4,99
±	0,25	0,13

Na Obr. 8 můžeme pozorovat, že vodivost je při velmi nízkých koncentracích HK nejdříve přibližně stejná a poté začne prudce klesat až do koncentrace 10 g·dm⁻³. Od této koncentrace už je víceméně konstantní. To je způsobeno tím, že obsah HK v roztoku je už tak velký, že další zvýšení koncentrace HK už výslednou vodivost nijak neovlivní. U roztoků HK v NaOH (viz Obr. 7) dochází k rozpuštění celého vzorku HK a silně alkalické prostředí podporuje disociaci kyselých funkčních skupin. Dochází tak tedy k částečné neutralizaci OH⁻ iontů z hydroxidu, což se projevuje ve snížení výsledné konduktivity. Vliv neutralizace na výsledné hodnoty měrné vodivosti narůstá úměrně se zvyšující se koncentrací HK v NaOH.



Obrázek 7 Graf závislosti vodivosti na obsahu HK u roztoků HK v NaOH

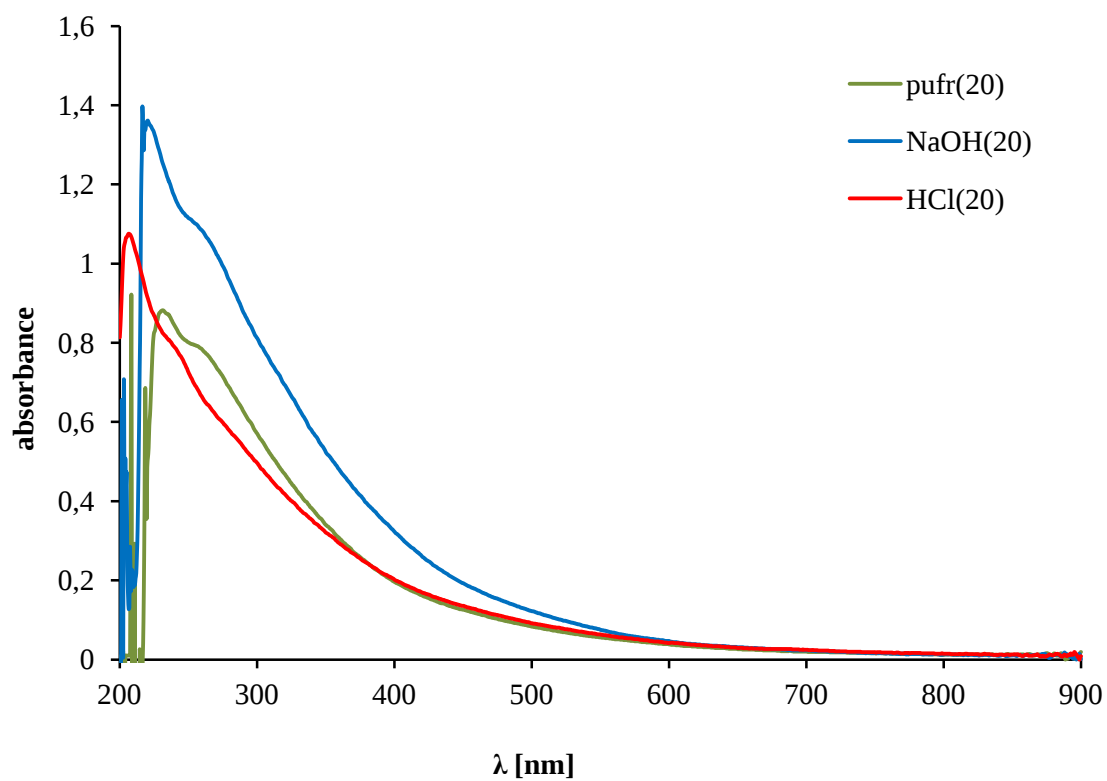


Obrázek 8 Graf závislosti vodivosti na obsahu HK u výluhů HK v Na_2SO_4

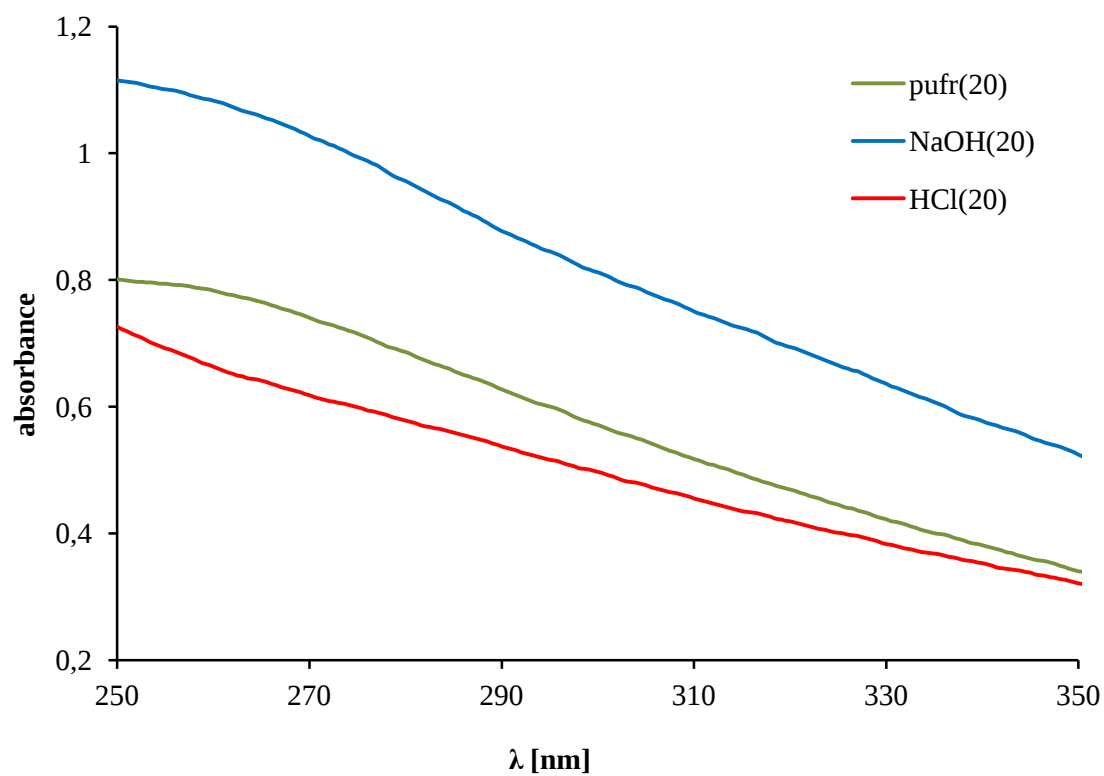
4.2.2 Spektrofotometrická metoda

Pro stanovení hodnoty pK_a byly používány pouze hodnoty absorbancí v rozsahu vlnových délek 300 – 350 nm a to z důvodu, aby absorbance nebyly moc nízké ani moc vysoké a spektra jednotlivých vzorků huminových kyselin se nekřížila. Na Obr. 9 je vidět, že hodnoty absorbancí pod hranicí vlnové délky 300 nm dosahují absorpčního maxima a dochází zde i ke křížení jednotlivých spekter. Na stejném obrázku je patrné, že hodnoty absorbancí nad hranicí vlnové délky 350 nm jsou příliš nízké.

Na Obr. 10 je znázorněno UV/VIS spektrum HK v pufru, v HCl a v NaOH o koncentraci HK $20 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ v rozsahu vlnových délek 300 – 350 nm, který byl použit pro stanovení hodnoty pK_a . Z toho obrázku je patrné, že nejnížší hodnoty absorbancí má výluh HK rozpuštěný v HCl a nejvyšší výluh rozpuštěný v NaOH.



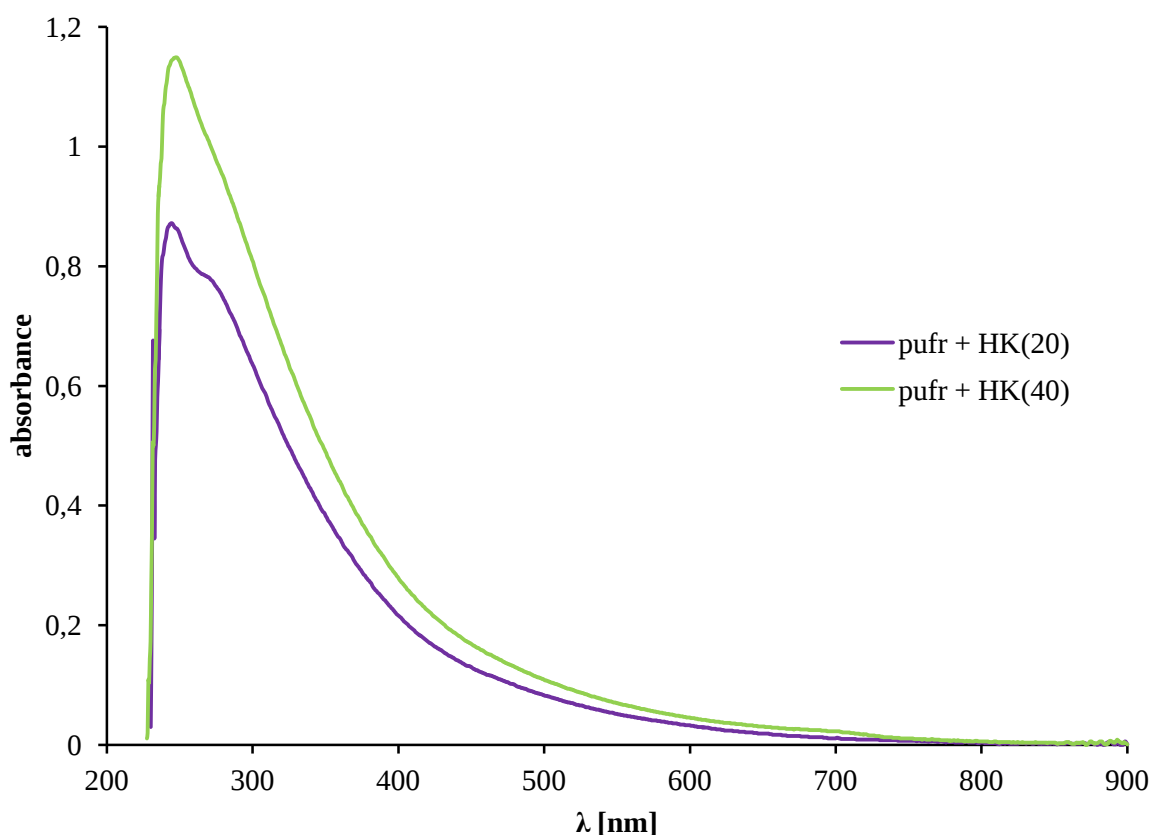
Obrázek 9 UV/VIS spektrum v pufru, v HCl a v NaOH pro HK o koncentraci $20 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ v rozsahu vlnových délek 200 – 900 nm



Obrázek 10 UV/VIS spektrum v pufru, v HCl a v NaOH pro HK o koncentraci $20 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ v rozsahu vlnových délek 300 – 350 nm

Pro spektrofotometrické stanovení disociační konstanty huminových kyselin byly vybrány pouze výluhy HK v Na_2SO_4 o koncentracích $20 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ a $40 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ a to z toho důvodu, abychom tam měli měřitelné absorbance. Při nízkých koncentracích HK jsou absorbance příliš nízké a pro stanovení disociační konstanty by neměly význam.

Na Obr. 11 vidíme, že HK o koncentraci $40 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ vykazují vyšší absorbanci než HK o koncentraci $20 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ a absorpčního maxima dosahují při stejné hodnotě vlnové délky. Tento fakt má však význam pouze kvalitativní. Na výslednou hodnotu $\text{p}K_a$ to nemá vliv, jak můžeme vidět v Tab. 6, tak hodnoty $\text{p}K_a$ pro koncentrace HK $20 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ a $40 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ vychází podobně. Je to z toho důvodu, že obsah HK v roztocích je už tak vysoký, že se v Na_2SO_4 rozpouští frakce huminových kyselin, které obsahují skoro stejné skupiny se stejnou nebo podobnou silou.



Obrázek 11 UV/VIS spektrum výluhů HK o koncentraci $20 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ a $40 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ zředěných pufrem

Tabulka 5 Hodnoty pH výluhů HK po ředění pufrem

HK	pH	
	$20 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$	$40 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$
	3,96	3,95

Tabulka 6 Disociační konstanty stanovené spektrofotometrickou metodou

HK	$20 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$		$40 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$		průměr	
	$\text{p}K_a$	$\pm$	$\text{p}K_a$	$\pm$	$\text{p}K_a$	$\pm$
	4,67	0,14	4,63	0,12	4,65	0,03

4.2.3 Kombinace měření pH a obsahu kyselých funkčních skupin v Na₂SO₄

Výluhy huminových kyselin v Na₂SO₄ byly proměřeny na průtokovém analyzátoru EcaFlow. Jednotlivé křivky byly ohraničeny červenými svislými čarami, které nám určují velikost píku. Hodnota pK_a stanovená touto metodou je podobná hodnotě stanovené konduktometrickou metodou u výluhů HK v Na₂SO₄ a to z toho důvodu, že se opět měřila pouze rozpuštěná HK a hodnota pK_a byla také extrapolována na nekonečné zředění.

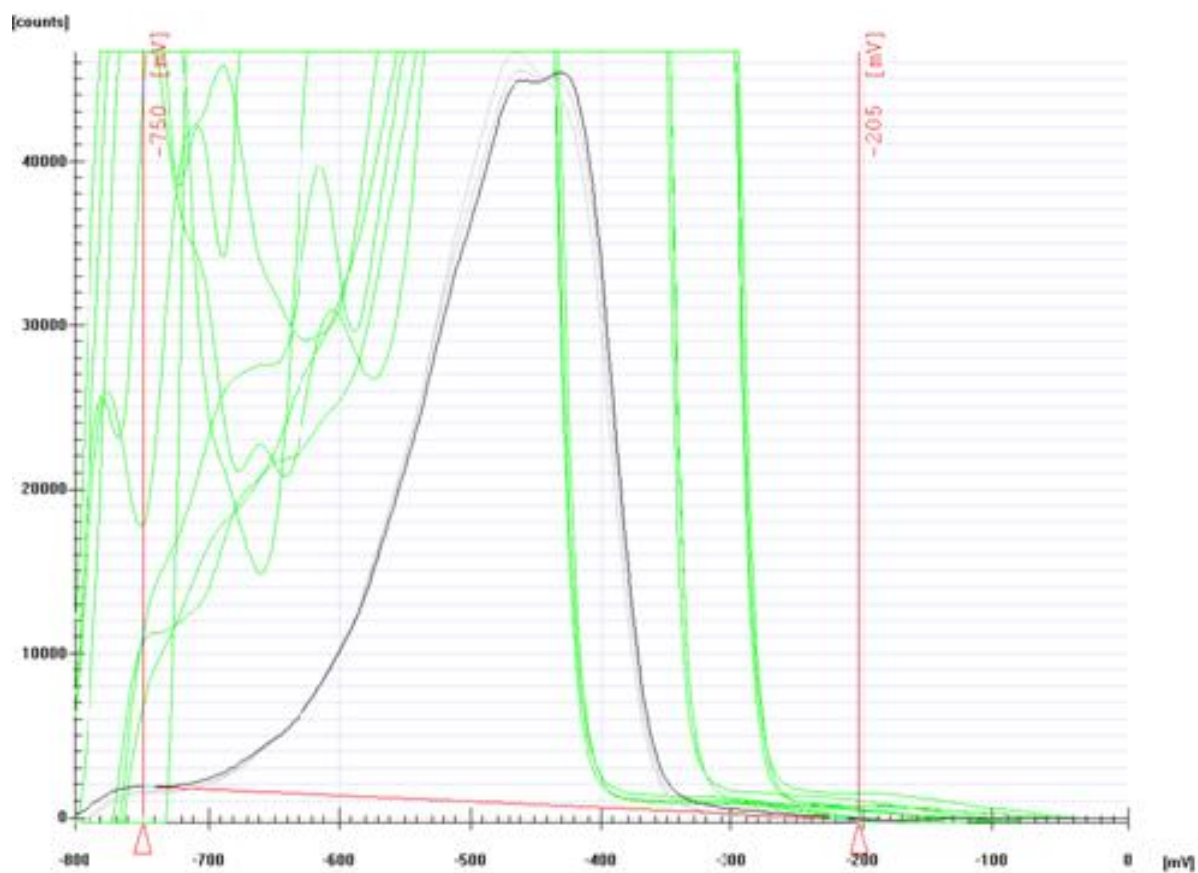
Tabulka 7 Hodnota pK_a stanovená měřením pH a obsahu kyselých funkčních skupin

pK _a	±
10,04	0,26

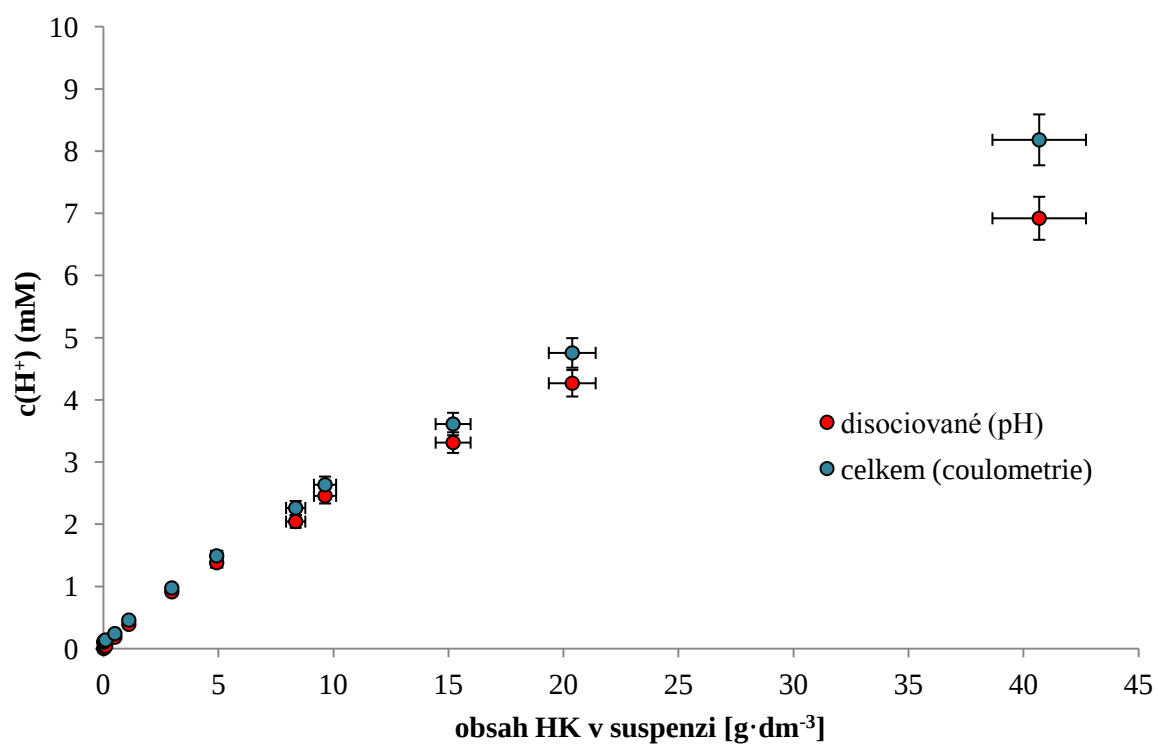
Tabulka 8 Obsah H⁺ iontů získaných měřením pH a pomocí přístroje EcaFlow

	pH	EcaFlow
c [g·dm ⁻³]	c _{H⁺} [mmol/g]	c _{H⁺} [mmol/g]
0,01	0,0003	0,1033
0,05	0,017	0,1267
0,1	0,0372	0,1367
0,5	0,182	0,24
1	0,389	0,4567
3	0,912	0,9733
5	1,3804	1,49
8	2,0417	2,26
10	2,4547	2,6333
15	3,3113	3,61
20	4,2658	4,7533
40	6,9183	8,18

Z Tab. 8 je zřejmé, že koncentrace H⁺ iontů měřené přístrojem EcaFlow jsou vyšší, než koncentrace H⁺ iontů měřené pomocí pH metru. To je díky tomu, 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.

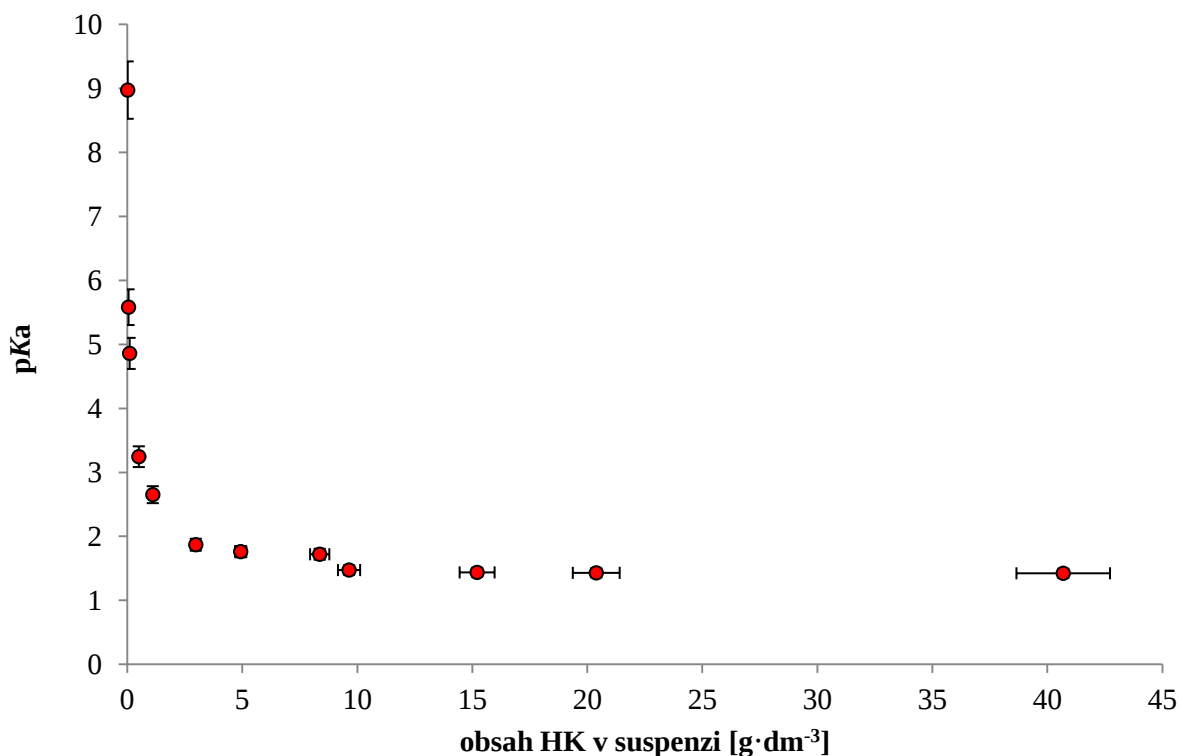


Obrázek 12 Ukázka zobrazení píku pro koncentraci $8 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$



Obrázek 13 Graf závislosti naměřené koncentrace na připravené koncentraci

Pokud hodnoty pH změřené pomocí pH metru přepočteme na koncentraci H^+ iontů a vztáhneme na jeden gram huminových kyselin, získáme data uvedená v grafu na Obr. 13, ve kterém jsou navíc uvedeny stejně přepočítané hodnoty získané pomocí měření na přístroji EcaFlow. Z toho obrázku je také patrné, že přístroj EcaFlow naměřil i v tomto případě větší hodnoty koncentrace H^+ iontů, než pH metr, což je lépe pozorovatelné až při vyšších koncentracích huminových kyselin v suspenzi.



Obrázek 14 Graf závislosti disociační konstanty na obsahu HK v suspenzi

Z Obr. 14 je patrné, že nejvyšší hodnoty pK_a se nacházejí při nižších koncentracích huminových kyselin, protože při těchto koncentracích se v suspenzi rozpouštějí i méně rozpustné frakce s vyššími hodnotami pK_a . Hodnoty pK_a prudce klesají až do koncentrace $3 g \cdot dm^{-3}$, dál je pak pokles velmi pozvolný nebo dokonce konstantní. To je způsobeno tím, že od této koncentrace už jsou ve výlužích HK v Na_2SO_4 rozpuštěny frakce huminových kyselin o podobném nebo stejném složení.

4.3 Srovnání pK_a huminových kyselin stanovených jednotlivými metodami

Tabulka 9 Srovnání pK_a u jednotlivých metod

	konduktometrická m. u roztoků v NaOH	konduktometrická m. u výluhů v Na_2SO_4	UV/VIS	pH/EcaFlow
pK_a	$4,99 \pm 0,13$	$9,93 \pm 0,25$	$4,65 \pm 0,03$	$10,04 \pm 0,26$

Jak vyplývá z Tab. 9, tak hodnota disociační konstanty stanovená konduktometrickou metodou u roztoků v Na_2SO_4 se od disociační konstanty stanovené kombinací měření pH a obsahu kyselých funkčních skupin v Na_2SO_4 příliš neliší. Je to z toho důvodu, že u obou metod byly použity výluhy huminových kyselin v Na_2SO_4 , a proto je výsledné pK_a jen pro určitou rozpuštěnou frakci huminových kyselin. Při výpočtu byla u obou metod provedena extrapolace na nekonečné zředění. V této tabulce

dále vidíme, že hodnota disociační konstanty stanovené spektrofotometricky je podobná hodnotě stanovené konduktometrickou metodou u roztoků v NaOH. Výsledek je vzhledem k tomu, že v NaOH jsou rozpuštěny všechny funkční skupiny a v Na₂SO₄ vždy pouze určitá frakce, která se koncentrací od koncentrace huminových kyselin liší, neočekávaný a je potřeba to dále zkoumat. Možným důvodem může být to, že spektrofotometrická metoda je založená na měření UV/VIS spekter jejichž tvar závisí na struktuře těchto organických molekul. Vzhledem k tomu, že se jedná o složitou směs různých molekul, je odezva výsledků této metody na změnu pH při ředění výluhů kvalitativně odlišná od chování jednoduchých kyselin, např. benzoové nebo salicylové. Další komplikací je, že do výpočtu je pak zahrnuto pH roztoku huminové kyseliny v pufru, přičemž pH samotného pufru je nutno volit blízko hodnotě očekávaného pK_a . V této práci bylo pH pufru zvoleno na základě dosavadních zkušeností s huminovými kyselinami, ale je možné, že podrobnější studie s pufrů o různém pH nám dá relevantnější výsledky. Tuto hypotézu plánuju prozkoumat v navazující diplomové práci.

5 ZÁVĚR

Tato bakalářská práce se zabývá výzkumem huminových kyselin v oblasti jejich disociačního chování. Prvním cílem bylo stanovit celkovou a karboxylovou kyselost pomocí potenciometrických titrací na automatickém titrátoru, které se dále používaly pro výpočet hodnot disociačních konstant. Ty byly stanovovány na základě měření pomocí třech různých metod (konduktometricky, spektrofotometricky a kombinací měření pH a kyselých funkčních skupin v Na_2SO_4). Hodnoty disociačních konstant stanovených těmito metodami byly srovnávány.

Bylo zjištěno, že disociační konstanty získané konduktometrickým měřením a měřením na přístroji EcaFlow u výluhů huminových kyselin v Na_2SO_4 se jen nepatrně liší. Podobnost disociačních konstant si vysvětluju tím, že ve výluzích byla u každé koncentrace měřena vždy ta stejná rozpuštěná frakce. Neočekávaný výsledek byl získán spektrofotometrickým měřením, kdy hodnota disociační konstanty je podobná hodnotě získané konduktometricky u roztoků v NaOH. Hodnota získaná spektrofotometricky by měla být podobná spíše hodnotě, která byla stanovena konduktometricky a pomocí přístroje EcaFlow u výluhů huminových kyselin v Na_2SO_4 . Možné důvody odlišných hodnot jsou popsány výše a je potřeba to dále zkoumat.

6 POUŽITÁ LITERATURA

- [1] VESELÁ, KUBAL, KOZLER a INNEMANOVÁ. Struktura a vlastnosti přírodních huminových látek typu oxihumolitu. *Chemické listy*. 2005, vol. 99, no. 10, p. 711-717.
- [2] PIVOKONSKÝ, Martin, Lenka PIVOKONSKÁ, Petra BUBÁKOVÁ. Úprava vody s obsahem huminových látek. *Chemické listy*. 2010, no. 104, p. 1015-1022.
- [3] Oficiální stránky společnosti Humatex, a.s [online]. 1999, poslední revize 20.3.2010 [cit. 30. 12. 2014]. Dostupné z: <<http://www.humatex.cz/huminove-latky.html>>.
- [4] BURSÁKOVÁ, Petra. *Hydratace huminových látek*. Brno, 2011. Dizertační práce. FCH VUT.
- [5] STEVENSON, F. *Humus chemistry: genesis, composition, reactions*. 2nd Ed. New York: John Wiley and Sons, c1994, xiii, 496 s. ISBN 04-715-9474-1.
- [6] Oficiální stránky The University of British Columbia, Faculty of Land and Food Systems [online]. 1999, last revision 20th February 2010 [cit. 30. 12. 2014]. Dostupné z: <http://www.landfood.ubc.ca/soil200/components/organic_compunds.htm>.
- [7] Weber, J.: Soil Humic Substances [online]. 1997, last modified 1997 [cited 2014-12-30]. Accessible from: <http://www.ar.wroc.pl/~weber/humic.htm#start>.
- [8] SKOKANOVÁ, Marianna a Katarína DERCOVÁ. Huminové kyseliny. Povod a štruktúra. *Chemické listy*. 2008, no. 102, p. 262-268.
- [9] GHABBOUR, Elham A. *Humic Substances: Structures, Models and Functions*. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 2001, 387 s. ISBN 08-540-4811-1.
- [10] OUNI, GHNAYA, MONTEMURRO, ABDELLY a LAKHDAR. The role of humic substances in mitigating the harmful effects of soil salinity and improve plant productivity. *International Journal Of Plant Production*. 2014, vol. 8, no. 3, p. 353-374.
- [11] Klikorka, J.: *Obecná a anorganická chemie*. 2. vydání. Praha: SNTL, 1989. 592 s.
- [12] KLUČÁKOVÁ, Martina a Miloslav PEKAŘ. Solubility and dissociation of lignitic humic acids in water suspension. *Colloids and Surfaces, A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 2005, no. 252, p. 157-164.
- [13] KLUČÁKOVÁ, M. a M. PEKAŘ. Behaviour of Partially Soluble Humic Acids in Aqueous Suspension. *Colloids and Surfaces, A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 2008, vol. 318, no. 1, p. 106-110.
- [14] SHABAN, I. S. a V. MIKULAJ. Impact of an Anionic Surfactant Addition on Solubility of Humic Acid in Acid-Alkaline Solutions. *Chem. Papers*. 1998, vol. 52, no. 6, p. 753-755.
- [15] Acidity of humic acid related to its oxygen-containing functional groups. *Bull. of the chem. and tech. of Mac.* 2006, vol. 25, no. 2, p. 131-137.

- [16] POUCHLÝ, Julius. *Fyzikální chemie makromolekulárních a koloidních soustav*. Praha, 2008. ISBN 978-80-7080-674-6.
- [17] Malijevský, A.: *Breviář z fyzikální chemie*. 1. vydání. Praha: VŠCHT, 2000. 280 s. ISBN 80-7080-403-3.
- [18] ANDJELKOVIC, T. Acidity of humic acid related to its oxygen-containing functional groups. *Bulletin of the Chemists and Technologists of Macedonia*. 2006, vol. 25, no. 2, p. 131-137.
- [19] BORGGAARD, Ole K. Titrimetric determination of acidity and pK values of humic acid. *Acta Chemica Scandinavica*. 1974, vol. 28, no. 1, p. 121-122.
- [20] KLOUDA, Pavel. *Moderní analytické metody*. 2., upr. a dopl. vyd. Ostrava: Pavel Klouda, 2003, 132 s. ISBN 80-863-6907-2.
- [21] VIKTORINOVÁ, Jana. *Stanovení obsahu huminových kyselin v roztocích chronopotenciometricky*. Brno, 2011. Bakalářská práce. FCH VUT Brno. Vedoucí práce doc. Ing. Martina Klučáková, Ph.D.
- [22] TURKEOVÁ, Irena. *Charakterizace methylovaných huminových kyselin*. Brno, 2011. Bakalářská práce. FCH VUT Brno. Vedoucí práce doc. Ing. Martina Klučáková, Ph.D.
- [23] FUKUSHIMA, M., S. TANAKA, H. NAKAMURA a S. ITO. Acid-base characterization of molecular weight fractionated humic acid. *Talanta*. 1996, vol. 43, no. 3, p. 383-390.
- [24] CEPPI, Silvia B., Manuel I. VELASCO a Carlos P. DE PAULI. Differential scanning potentiometry: surface charge development and apparent dissociation constants of natural humic acid. *Talanta*. 1999, vol. 50, no. 5, p. 1057-1063.
- [25] FUKUSHIMA, M., S. TANAKA, K. HASEBE, M. TAGA a H. NAKAMURA. Interpretation of the acid-base equilibrium of humic acid by continuous pK distribution and electrostatic model. *Analytica Chimica Acta*. 1995, vol. 302, no. 2, p. 365-373.
- [26] MASINI, Jorge C., Gilberto ABATE, Elizabete C. LIMA, Lucas C. HAHN, Mary S. NAKAMURA, Jaim LICHITIG a Hélio R. NAGATOMY. Comparison of methodologies for determination of carboxylic and phenolic groups in humic acids. *Analytica Chimica Acta*. 1998, vol. 364, 1-3, p. 223-233. DOI: 10.1016/S0003-2670(98)00045-2. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0003267098000452>
- [27] ANDJELKOVIC, T., J. PEROVIC, M. PURENOVIC, S. BLAGOJEVIC, R. NIKOLIC, D. ANDJELKOVIC a A. BOJIC. A direct potentiometric titration study of the dissociation of humic acid with selectively blocked functional groups. *Eclética Química*. 2006, vol. 31, no 3, p. -. DOI: 10.1590/S0100-46702006000300005. Dostupné z: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext
- [28] PALLADINO, Giuseppe, Diego FERRI, Carla MANFREDI a Ermanno VASCA. Potentiometric determination of the total acidity of humic acids by constant-current coulometry. *Analytica Chimica Acta*. 2007, vol. 582, no 1, p. 164-173. DOI: 10.1016/j.aca.2006.08.060. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S000326700601837X>

- [29] JANOT, Noémie, Pascal E. REILLER, Gregory V. KORSHIN a Marc F. BENEDETTI. Using Spectrophotometric Titrations To Characterize Humic Acid Reactivity at Environmental Concentrations. *Environmental Science*. 2010, vol. 44, no 17, p. 6782-6788. DOI: 10.1021/es1012142. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/es1012142>
- [30] KOLAJOVÁ, Romana. *Rozpustnost a disociace huminových kyselin*. Brno, 2010. Bakalářská práce. FCH VUT Brno. Vedoucí práce doc. Ing. Martina Klučáková, Ph.D.
- [31] KLUČÁKOVÁ, M. a R. KOLAJOVÁ. Dissociation Ability of Humic Acids: Spectroscopic Determination of pK_a and Comparison with Multi-step Mechanism. *Reactive and Functional Polymers*. 2014, vol. 78, no. 1, p. 1-6.
- [32] NAGANAWA, Hirochika a Tatsuya SEKINE. Spectrophotometric determination of dissociation constant of picrates in 4-methyl-2-pentanone. *Analytical Sciences*. 1987, vol. 3, no 5, p. 427-431. DOI: 10.2116/analsci.3.427.
- [33] MOTHEO, Artur J a Laerte PINHEDO. Electrochemical degradation of humic acid. *Science of The Total Environment*. 2000, vol. 256, no 1, p. 67-76. DOI: 10.1016/S0048-9697(00)00469-1. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0048969700004691>
- [34] SALMA, I., R. OCSKAY a G. G. LANG. Properties of atmospheric humic-like substances - water system. *Atmospheric Chemistry and Physics*. 2008, vol. 8, no. 8, p. 2243-2254.
- [35] TIWARI, Shuchi, Kallol K. GHOSH, Jan MAREK a Kamil KUČA. Spectrophotometric Determination of the Acidity Constants of Some Oxime-Based α -Nucleophiles. *Journal of Chemical*. 2010-03-11, vol. 55, no 3, p. 1153-1157. DOI: 10.1021/jc9005773. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jc9005773>
- [36] POURREZA, Nahid a Saadat RASTEGARZADEH. Spectrophotometric Determination of the Dissociation Constant of 5-(p-Dimethylaminobenzylidene)rhodanine in Micellar Media. *Journal of Chemical*. 2005, vol. 50, no 1, p. 206-210. DOI: 10.1021/jc049727j. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jc049727j>
- [37] *Fyzikální chemie II.: praktikum*. 2000. 2. vyd. Brno: VUT. ISBN 80-214-1550-9.

7 SEZNAM ZKRATEK A SYMBOLŮ

pH	hodnota pH
HA	slabá jednosytná kyselina
K	rovnovážná konstanta
a	aktivita
c	molární koncentrace
γ	aktivitní koeficient
$\gamma_{\pm}$	střední aktivitní koeficient
pK _a	disociační konstanta
α	stupeň disociace
H ₂ A	vícesytná kyselina
pK _{app}	zdánlivá disociační konstanta
UV	oblast ultrafialového světla elektromagnetického záření
VIS	viditelná oblast elektromagnetického záření
G	vodivost
κ	konduktivita
S	průřez vodiče
l	délka vodiče
C	odporová kapacita měřicí nádoby
R	odpor
λ	molární vodivost
λ^{∞}	mezní molární vodivost
a	empirická konstanta
A	absorbance