	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	1
	Jednotné pracovní postupy – zkoušení hnojiv	Vydání	1
	20302.1 – Stanovení obsahu huminových kyselin a fulvokyselin gravimetricky	Revize	0

STANOVENÍ OBSAHU HUMINOVÝCH KYSELIN A FULVOKYSELIN GRAVIMETRICKY

1 Rozsah a účel

Metoda je určena pro stanovení obsahu huminových kyselin a fulvokyselin v humátových výrobcích, v minerálních hnojivech obohacených huminovými preparáty, organických hnojivech přírodního původu a půdách.

2 Princip

Huminové kyseliny (HA) a fulvokyseliny (HFA) se extrahují do alkalického prostředí. Na základě jejich různé rozpustnosti v kyselém prostředí se huminové kyseliny vysrážejí a fulvokyseliny jsou separovány pomocí hydrofobní pryskyřice DAX-8. Obsah obou složek se stanoví gravimetricky.

3 Chemikálie

Používají se chemikálie analytické čistoty, pokud není uvedeno jinak.

- 1 Voda (deionizovaná, demineralizovaná nebo destilovaná).
- 2 Kyselina chlorovodíková, HCl, koncentrovaná, $\rho(\text{HCl}) = 1,19 \text{ g/ml}$.
- 3 Kyselina chlorovodíková, zředěná $c(\text{HCl}) \approx 6 \text{ mol/l}$.


Příprava: Do 1000ml odměrné baňky, ve které je asi 400 ml vody (1), se postupně přidá 500 ml kyseliny chlorovodíkové (2). Obsah baňky se vytemperuje na laboratorní teplotu, doplní vodou (1) po značku a promíchá.

- 4 Kyselina chlorovodíková, zředěná $c(\text{HCl}) \approx 0,1 \text{ mol/l}$.

Příprava: Do 1000ml odměrné baňky, ve které je asi 400 ml vody (1), se přidá 8,5 ml kyseliny chlorovodíkové (2). Obsah baňky se vytemperuje na laboratorní teplotu, doplní vodou (1) po značku a promíchá.

- 5 Kyselina chlorovodíková, zředěná $c(\text{HCl}) \approx 1 \text{ mol/l}$.

Příprava: Do 1000ml odměrné baňky, ve které je asi 400 ml vody (1), se přidá 84 ml kyseliny chlorovodíkové (2). Obsah baňky se vytemperuje na laboratorní teplotu, doplní vodou (1) po značku a promíchá.

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	2
	Jednotné pracovní postupy – zkoušení hnojiv	Vydání	1
	20302.1 – Stanovení obsahu huminových kyselin a fulvokyselin gravimetricky	Revize	0

6 Hydroxid sodný, NaOH, pevný.

7 Hydroxid sodný, roztok, $c(\text{NaOH}) = 0,1 \text{ mol/l}$.

Příprava: Do 1000ml odměrné baňky se naváží 4 g hydroxidu sodného (4) a rozpustí se za stálého míchání v asi 100 ml vody (1). Po ochlazení se doplní vodou (1) po značku a promíchá.

8 Hydrofobní pryskyřice DAX-8, např. SUPELCO, USA.

9 Katex AMBERLITE IR 120, H^+ forma, např. SUPELCO, USA.

4 Přístroje a pomůcky

1 Analytické váhy s přesností 0,0001 g.

2 Sušárna s regulovatelnou teplotou, přesnost $\pm 3^\circ\text{C}$.

3 pH metr s kombinovanou skleněnou elektrodou a teplotním čidlem.

4 Konduktometr s Pt-elektrodou.

5 UV VIS spektrofotometr.

6 Peristaltické čerpadlo.

7 Muflová pec s teplotní regulací.

8 Vakuová rotační odparka.

9 Centrifuga, minimální relativní centrifugační síla $r_{cf} = 3900 \times g$ včetně centrifugačních kyvet.

10 Elektromagnetická míchačka, magnetické míchadlo o délce (5 – 8) cm.

11 Exsikátor se silikagelem.

12 Skleněné chromatografické kolony:


průměr 40 mm a délka 250 mm pro pryskyřici DAX-8;

průměr 50 mm a délka 600 mm pro katex AMBERLITE IR 120.

13 Erlenmayerovy baňky, 1000 ml, 2000 ml.

14 Keramické spalovací kelímky.

15 Parafilm.

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	3
	Jednotné pracovní postupy – zkoušení hnojiv	Vydání	1
	20302.1 – Stanovení obsahu huminových kyselin a fulvokyselin gravimetricky	Revize	0

5 Pracovní postup

5.1 Stanovení vlhkosti pevného vzorku (wv)

Do vysoušecí misky, zvážené s přesností na 0,0001 g, se naváží 5 g pevného zkušebního vzorku (m_v) s přesností 0,0001g a suší 24 h při $(65 \pm 3) ^\circ\text{C}$. Po uplynutí předepsané doby se vysoušecí miska se vzorkem vyjme ze sušárny, vloží se do exsikátoru a po ochlazení se hmotnost vysušeného vzorku (m_s) zváží s přesností na 0,0001 g.

U pevných vzorků se obsah vlhkosti použije pro vyjádření obsahu HA a HFA v sušině vzorku.

5.2 Příprava extraktu

5.2.1 Příprava extraktu z pevného vzorku

Reprezentativní část vzorku se upraví v třecí misce nebo ve vhodném laboratorním mlýnku a prosévá se přes síto na požadovanou velikost částic $\leq 74 \mu\text{m}$. Promícháním se zhomogenizuje. Do 1000ml Erlenmayerovy baňky se s přesností 0,0001 g naváží $\sim 2,5$ g původního vzorku (m_{pv}) a za stálého promíchávání se přidá roztok NaOH (7) na konečný objem 1000 ml. Do baňky se vloží magnetické míchadlo, hrdlo baňky se uzavře parafilmem a baňka se umístí na plochu elektromagnetické míchačky. Směs se (16 – 18) h důkladně míchá při (300 – 400) ot/min.

5.2.2 Příprava extraktu z kapalného vzorku


Kapalný vzorek se homogenizuje promícháním po dobu jedné minuty. Do 1000ml Erlenmayerovy baňky se naváží zpravidla 2,5 g kapalného vzorku (m_L) s přesností na 0,0001 g a doplní se do celkového objemu 1000 ml roztokem NaOH (7). Do baňky se vloží magnetické míchadlo, hrdlo baňky se uzavře parafilmem a baňka se umístí na plochu elektromagnetické míchačky. Směs se po 1 h důkladně míchá při (300 – 400) ot/min.

5.2.3 Odstranění nerozpustného podílu z extraktu

Celý objem suspenze (5.2.1 a 5.2.2) se odstředí (5 – 10) min při relativní centrifugační síle $rcf = 3900 \times g$, aby se z extraktu oddělil veškerý nerozpustný podíl. Extrakt obsahující HA a HFA se přelije do čisté 1000ml Erlenmayerovy baňky. Nerozpustný podíl se odstraní.

Poznámka

- 1 Pokud se pevné vzorky připraví k extrakci odpoledne, je možné extrakci nechat proběhnout přes noc.*
- 2 Navážka kapalného vzorku se většinou pohybuje od 2 g do 5 g. Pokud je ve vzorku očekávaný obsah HFA menší než 1%, použije se navážka vzorku 10 g.*

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	4
	Jednotné pracovní postupy – zkoušení hnojiv	Vydání	1
	20302.1 – Stanovení obsahu huminových kyselin a fulvokyselin gravimetricky	Revize	0

5.3 Separace HA

Do 1000ml baněk s extrakty vzorků, získanými postupem (5.2.3) se vloží pH-elektroda a magnetické míchadlo, baňka se umístí na magnetickou míchačku a za stálého míchání se přidává kyselina chlorovodíková (3) až do dosažení hodnoty $\text{pH} = 1,0 \pm 0,1$. Baňka se zakryje parafilmem a roztok se dál promíchává 1 h při (300 – 400) ot/min. Poté se změří pH a pokud je třeba, upraví se pomocí roztoku kyseliny chlorovodíkové (3) nebo hydroxidem sodným (7) na hodnotu $\text{pH} 1,0 \pm 0,05$. Pokud pH roztoku zůstane stabilní po dobu 5 min, vyjme se míchadlo z baňky, hrdlo baňky se zakryje parafilmem a směs se ponechá v klidu stát ($4 \pm \frac{1}{4}$) h, dokud vysrážené HA neklesnou na dno baňky. Čirý roztok nad usazenou sraženinou se dekantuje do čisté 1000ml Erlenmayerovy baňky. Zbytek sraženiny HA se oddělí od kyselého roztoku HFA odstředěním 30 min při $\text{rcf} = 1500 \times \text{g}$. Odstředěný roztok s obsahem HFA se přidá k dekantovanému podílu a následuje postup podle bodu 5.4. Sraženina HA v centrifugačních kyvetách se použije ke stanovení obsahu HA gravimetricky podle bodu 5.5.

Poznámka

- 3 *Používají se zvážené centrifugační kyvety, vysušené při $(65 \pm 3) ^\circ\text{C}$.*
- 4 *V některých případech daných povahou vzorku je vhodné dobu koagulace prodloužit až na 12 h (nechat stát přes noc).*
- 5 *Opatrnou dekantací lze získat přibližně (500 – 900) ml roztoku bez sraženiny HA.*
- 6 *V některých vzorcích zůstávají vysrážené HA v suspenzi v podobě koloidních částic. V takovém případě je nutné odstředit celý objem pro oddělení sraženiny HA od rozpuštěných HFA.*


5.4 Separace, protonizace a zakoncentrování HFA

5.4.1 Separace HFA

Fulvokyseliny obsažené v roztoku se od ostatních kyselin a rozpustných sloučenin oddělí selektivní adsorpcí na hydrofobní pryskyřici DAX-8 (8). Skleněná chromatografická kolona o průměru 40 mm a délce 250 mm se naplní pryskyřicí DAX-8 (8) podle pokynů výrobce. Veškerý roztok HFA se nadávkuje na kolonu pomocí peristaltického čerpadla. Jakmile celý objem roztoku HFA protekl kolonou, sloupec pryskyřice se promyje vodou (1). Promývání se ukončí, když hodnota absorbance vody na výstupu z kolony, měřená UV-VIS spektrofotometrem při vlnové délce $\lambda=350 \text{ nm}$, odpovídá blanku $A < 0,015$. Přístrojová nula (blank) se měří ve vodě (1). Fulvokyseliny jsou z pryskyřice desorbovány roztokem hydroxidu sodného (7). Desorbce HFA je ukončena, když hodnota absorbance desorbčního roztoku NaOH na výstupu z kolony, měřená UV-VIS spektrometrem při vlnové délce $\lambda = 350 \text{ nm}$ odpovídá blanku $A < 0,03$. Přístrojová nula (blank) se měří v hydroxidu sodném (7).

Poznámka

- 7 *Přibližný objem desorbovaných HFA je (1000 – 1200) ml.*

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	5
	Jednotné pracovní postupy – zkoušení hnojiv	Vydání	1
	20302.1 – Stanovení obsahu huminových kyselin a fulvokyselin gravimetricky	Revize	0

5.4.2 Protonizace HFA

Z alkalického roztoku HFA se kationty Na^+ odstraní pomocí katexu AMBERLITE IR 120 (9) výměnou za ionty H^+ . Katex tvoří náplň skleněné chromatografické kolony o průměru 50 mm a délce 600 mm. Roztok HFA se nechává opakovaně protékat katexem vlivem gravitační síly, dokud hodnota elektrické vodivosti vytékajícího roztoku neklesne pod $120 \mu\text{S}/\text{cm}$. Následně se kolona promyje vodou (1). Promývání se ukončí, když hodnota absorpance vody na výstupu z kolony, měřená UV-VIS spektrofotometrem při vlnové délce $\lambda=350 \text{ nm}$, odpovídá blanku $A < 0,015$. Přístrojová nula (blank) se měří ve vodě (1). Voda, kterou se kolona promývá, se přidá k protonovanému roztoku HFA.

Poznámka

8 *Přibližný objem protonovaného roztoku HFA je (1500–2000) ml.*

5.4.3 Zakoncentrování HFA

Roztok HFA se zakoncentruje pomocí vakuové rotační odparky při teplotě $55 \text{ }^\circ\text{C}$ na objem asi $(15 \pm 2) \text{ ml}$ a kvantitativně se převede do předem zváženého a při teplotě $(500 \pm 5) \text{ }^\circ\text{C}$ přežíhaného keramického spalovacího kelímku. Dále se postupuje podle bodu 5.5.

Poznámky

9 *Aktivované pryskyřice DAX-8 a AMBERLITE IR 120 musejí být uchovávány v kolonách pod vodou (1).*

10 *HFA lze zakoncentrovat lyofilizací.*


11 *Hodnota vodivosti HFA protonizovaných pomocí katexu AMBERLITE se pohybuje mezi (50–80) $\mu\text{S}/\text{cm}$.*

5.5 Stanovení obsahu HA a HFA gravimetricky (HAp , HFAP , HAL , HFAL)

Sraženina HA v centrifugačních zkumavkách a zakoncentrovaný objem HFA v keramickém kelímku se umístí do sušárny, kde se při $(65 \pm 3)^\circ\text{C}$ vysuší do konstantní hmotnosti. Vysušené HA a HFA se ochladí v exikátoru a stanoví se celková hmotnost extrahované frakce HA nebo HFA ($m_{(\text{HA}, \text{HFA})}$).

HA se pomocí špachtle vyjmou z centrifugačních kyvet a vloží do předem zváženého keramického spalovacího kelímku přežíhaného při teplotě $(500 \pm 5) \text{ }^\circ\text{C}$.

Keramické kelímky se vzorky HA a HFA se použijí pro stanovení obsahu popela v jednotlivých frakcích podle bodu 5.6.

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	6
	Jednotné pracovní postupy – zkoušení hnojiv	Vydání	1
	20302.1 – Stanovení obsahu huminových kyselin a fulvokyselin gravimetricky	Revize	0

Poznámka

- 12 *Obvykle se konstantní hmotnosti HA docílí po 24 h sušení.*
- 13 *Termín konstantní hmotnost vyjadřuje stav, kdy se hmotnost kelímku při posledním opakovaném vysušení neliší od předcházející hodnoty hmotnosti kelímku o více než 0,01 g.*
- 14 *HA a HFA jsou sloučeniny silně hygroskopické, proto je třeba je uchovávat v exsikátoru.*

5.6 Stanovení popela ve vysušené sraženině HA a HFA (P)

Zvážená a vysušená sraženina HA nebo HFA (m_a) se ve spalovacích kelímcích umístí do muflové pece, kde se spaluje 2 h při $(500 \pm 5) ^\circ\text{C}$. Po ukončení spalovacího procesu se kelímky ochladí v exsikátoru po dobu 1 h. Pak se popel zváží (m_p) a stanoví se obsah popela, obsažený v HA a HFA.

6 Regenerace pryskyřic

6.1 Regenerace DAX-8


DAX-8 (8) se regeneruje promýváním pryskyřice roztokem kyseliny chlorovodíkové (4). Peristaltické čerpadlo dávkuje kyselinu do spodní části kolony. Když hodnota pH vytékajícího roztoku z kolony bude shodná s hodnotou pH roztoku HCl (4), proces regenerace se ukončí. Následuje promývání pryskyřice DAX-8 (8) vodou (1). Promývání vodou (1) se ukončí, když se hodnota pH vody (1) měřená při vstupu do kolony a na jejím výstupu shoduje.

Poznámka

- 15 *Alternativně je možné konec promývání pryskyřice DAX-8 vodou (1) indikovat měřením absorpance přitékající a odtékající vody (1) při vlnové délce $\lambda=350 \text{ nm}$.*
- 16 *Je výhodné měřit pH při regeneraci pomocí lakmusového papírku, ale může se použít i pH metr.*

6.2 Regenerace AMBERLITE IR 120

Spodní odtoková část kolony se uzavře, kolona se naplní až po okraj vodou (1) a utěsní se zátkou. Kypření pryskyřice se provede opakovaným otočením kolony o 180° . Následně se katex promyje asi 2000 ml kyseliny chlorovodíkové (5). Pak se katex promyje vodou (1) do neutrální reakce pH.

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	7
	Jednotné pracovní postupy – zkoušení hnojiv	Vydání	1
	20302.1 – Stanovení obsahu huminových kyselin a fulvokyselin gravimetricky	Revize	0

7 Výpočet a vyjádření výsledků

7.1 Stanovení vlhkosti pevného vzorku

Obsah vlhkosti v hnojivu vyjádřený hmotnostním zlomkem v procentech w_v se vypočte podle vztahu

$$w_v = (m_v - m_s) / m_v \times 100 \quad (\%)$$

w_v vlhkost vzorku (%)

m_v hmotnost vlhkého vzorku (g)

m_s hmotnost vysušeného vzorku (g)

7.2 Vyjádření hmotnosti původního vzorku korigované na sušinu

Navážka pevného vzorku v sušině m_k se vypočte podle vztahu

$$m_k = m_{pv} \times (1 - w_v / 100) \quad (\text{g})$$

m_k hmotnost vzorku korigovaná na sušinu (g),

m_{pv} hmotnost původního vzorku (g),

w_v vlhkost vzorku (%).

7.3 Stanovení obsahu popela ve vysušené sraženině HA nebo HFA

Obsah popela vyjádřený hmotnostním zlomkem v % ve vysušené sraženině (HA nebo HFA) se vypočte podle vztahu

$$P = m_p / m_a \times 100 \quad (\%),$$

P obsah popela ve vysušené sraženině (HA nebo HFA) (%),

m_p hmotnost popela (g),

m_a hmotnost vysušené HA nebo HFA před spálením (g).

7.4 Stanovení výsledné hmotnosti HA nebo HFA

Obsah čisté HA nebo HFA ($m_{C(HA, HFA)}$) v g v navážce původního vzorku (m_{pv}) se vypočítá podle vztahu

$$m_{C(HA, HFA)} = m_{(HA, HFA)} \times (1 - P/100) \quad (\text{g})$$


$m_{C(HA, HFA)}$ výsledná hmotnost HA nebo HFA (g),

$m_{(HA, HFA)}$ celková hmotnost extrahované frakce HA nebo HFA (g),

P obsah popela v analytu HA nebo HFA (%).

Schválil: RNDr. Jiří Zbírál, PhD., ředitel NRL

Platné od: 30. 5. 2016

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	8
	Jednotné pracovní postupy – zkoušení hnojiv	Vydání	1
	20302.1 – Stanovení obsahu huminových kyselin a fulvokyselin gravimetricky	Revize	0

7.5 Stanovení obsahu HA a HFA v pevném vzorku

Obsah HAp nebo HFAP v pevném vzorku vyjádřený hmotnostním zlomkem v % se vypočítá podle vztahu

$$\text{HAp(HFAP)} = m_{C(\text{HA}, \text{HFA})} / m_k \times 100 \quad (\%)$$

HAp (HFAP) obsah HA nebo HFA v pevném vzorku (%),

$m_{C(\text{HA}, \text{HFA})}$ výsledná hmotnost HA nebo HFA (g),

m_k hmotnost vzorku korigovaná na sušinu (g),

7.6 Stanovení obsahu HA a HFA v kapalném vzorku

Obsah HA_L nebo HFA_L v kapalném vzorku vyjádřený hmotnostním zlomkem v % se vypočítá podle vztahu

$$\text{HA}_L(\text{HFA}_L) = m_{C(\text{HA}, \text{HFA})} / m_L \times 100 \quad (\%)$$

HA_L(HFA_L) obsah HA nebo HFA v kapalném vzorku (%),

$m_{C(\text{HA}, \text{HFA})}$ výsledná hmotnost HA nebo HFA (g),

m_L hmotnost navážky kapalného vzorku (g).

7.7 Stanovení sumy HA a HFA ve vzorku

Celkový obsah HA a HFA ve vzorku vyjádřený hmotnostním zlomkem v % se vypočítá jako součet obou složek a udává obsah huminových látek ve vzorku.

Poznámka

17 *Vzhledem k výrazně vyšší koncentraci HA než HFA ve vzorcích obvykle stačí pro stanovení obsahu huminových látek ve vzorku pouze stanovení HA.*

8 Literatura

- 1 ISO/CD 19822 Fertilizers and soil conditioners – Determination of Humic and Hydrophobic Fulvic Acid Concentrations in Fertilizer Materials. 2015.