



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE

INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

VYUŽITÍ VIBRAČNÍ SPEKTROSKOPIE PŘI STUDIU INTERAKCE HUMINOVÝCH LÁTEK S ORGANICKÝMI IONTY.

UTILIZATION OF VIBRATIONAL SPECTROSCOPY IN STUDY ON INTERACTIONS BETWEEN HUMIC SUBSTANCES AND ORGANIC IONS.

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Kristína Stehlíková

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. Petr Sedláček, Ph.D.

BRNO 2021

Zadání bakalářské práce

Číslo práce: FCH-BAK1669/2020 Akademický rok: 2020/21
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie
Studentka: **Kristína Stehlíková**
Studijní program: Chemie a chemické technologie
Studijní obor: Chemie pro medicínské aplikace
Vedoucí práce: **Ing. Petr Sedláček, Ph.D.**

Název bakalářské práce:

Využití vibrační spektroskopie při studiu interakce huminových látek s organickými ionty.

Zadání bakalářské práce:

- 1) Vypracovat aktuální literární rešerši na téma metod studia strukturních aspektů interakce huminových látek s nabitými organickými sloučeninami.
- 2) Na základě literární rešerše zvolit modelové huminové látky a modelový organický iont (ionty) a připravit vzorkovou sadu komplexů obou složek.
- 3) Analyzovat vzorkovou sadu vhodnou technikou vibrační spektroskopie a na základě analýzy spekter zhodnotit využitelnost metody za účelem hlubší strukturní analýzy interakce mezi huminovými látkami a organickými ionty.

Termín odevzdání bakalářské práce: 30.7.2021:

Bakalářská práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu. Toto zadání je součástí bakalářské práce.

Kristína Stehlíková
student(ka)

Ing. Petr Sedláček, Ph.D.
vedoucí práce

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 1.2.2021

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

ABSTRAKT

Hlavným cieľom tejto bakalárskej práce bolo overiť potenciál využitia vibračnej spektroskopie pri štúdiu interakcií humínových látok s organickými iónmi. Za modelové humínové látky boli zvolené nemodifikované (HK) a metylované humínové kyseliny (mHK) a zástupcov organických iónov tvorili metylénová modrá, rhodamin 6G a Septonex. V prvom rade bola zvolená vhodná technika infračervenej spektroskopie. Výsledky optimalizačných meraní ukázali, že najrozlíšenejšie spektrá je možné získať pomocou DRIFTS techniky. V ďalšej časti práce bol pomocou tejto techniky sledovaný vplyv metylácie na štruktúru humínových kyselín, pričom v spektrách mHK boli oproti nemodifikovaným humínovým kyselinám zaznamenané podstatné rozdiely. Nakoniec boli sledované zmeny v spektrách komplexov humínových kyselín s organickými iónmi oproti spektrám pripravených slepých vzoriek. Bolo zistené, že spektrá komplexov nie sú len obyčajným súčtom spektier jednotlivých čistých látok, ale boli v nich zaznamenané aj posuny a zmeny intenzity rôznych absorpčných pásov, čo značí, že v komplexoch hrali dôležitú rolu aj nekovalentné interakcie. Ukázalo sa, že infračervená spektroskopia je využiteľná pre skúmanie týchto interakcií.

ABSTRACT

The main objective of this bachelor thesis was to validate the potential of the utilization of vibrational spectroscopy in the study on interactions between humic substances and organic ions. Unmodified (HA) and methylated humic acids (mHA) were chosen as model humic substances and organic ions were represented by methylene blue, rhodamine 6G and Septonex. Firstly, a suitable infrared spectroscopy technique was chosen. The results of optimization measurements showed that spectra with the best resolution can be obtained using the DRIFTS technique. The next part of the thesis discusses the effect of methylation in the structure of humic acids. Significant differences were recorded in mHA compared to the unmodified humic acids. Finally, the spectra of humic acid – organic ion complexes were compared to the spectra of prepared blank samples. It was noted that the spectra of complexes are not only a simple sum of the pure individual substances' spectra, but also shifts and changes in the intensity of different absorption bands were recorded there. It suggests that non-covalent interactions played an important role in the complexes. Infrared spectroscopy was proved to be a useful method for investigating these interactions.

KĽÚČOVÉ SLOVÁ

humínové látky, humínové kyseliny, infračervená spektroskopia, FTIR spektroskopia, organické ióny

KEYWORDS

humic substances, humic acids, infrared spectroscopy, FTIR spectroscopy, organic ions

STEHLÍKOVÁ, Kristína. *Využití vibrační spektroskopie při studiu interakce huminových látek s organickými ionty..* Brno, 2021. Dostupné také z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/131153>. Bakalářská práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav fyzikální a spotřební chemie. Vedoucí práce Petr Sedláček.

PREHLÁSENIE

Prehlasujem, že som bakalársku prácu vypracovala samostatne a že všetky použité literárne zdroje som správne a úplne citovala. Bakalárska práca je z hľadiska obsahu majetkom Fakulty chemickej VUT v Brne a môže byť využitá ku komerčným účelom len so súhlasom vedúceho bakalárskej práce a dekana FCH VUT.

.....
Kristína Stehlíková

POĎAKOVANIE

Na tomto mieste by som rada poďakovala vedúcemu mojej bakalárskej práce Ing. Petrovi Sedláčkovi, Ph.D. za jeho čas a cenné rady poskytnuté pri spracovávaní tejto práce. Ďalej patrí veľká vďaka mojej rodine a priateľom za ich podporu počas celého štúdia.

OBSAH

1 Úvod	6
2 Teoretická časť	7
2.1 Nekovalentné interakcie	7
2.1.1 Coulombické a Van der Waalsove sily	7
2.1.2 Vodíkové mostíky	8
2.1.3 Hydrofóbne interakcie	8
2.1.4 π - π interakcie	8
2.2 Charakteristika humínových látok	9
2.3 Štruktúra a zloženie humínových látok	10
2.3.1 Molekulová hmotnosť a prvkové zastúpenie	11
2.3.2 Funkčné skupiny	11
2.4 Väzbové možnosti humínových látok	11
2.4.1 Iónová väzba	12
2.4.2 Koordinačná väzba	12
2.4.3 Kovalentná väzba	13
2.4.4 Vodíkové mostíky	13
2.4.5 Hydrofóbne interakcie	14
2.5 Infračervená spektroskopia	14
2.5.1 Techniky skúmania vzoriek pomocou IČ spektroskopie	15
3 Súčasný stav riešenej problematiky	17
3.1 Interakcie humínových látok s xenobiotikami a rôzne metódy ich skúmania	17
3.1.1 Interakcie humínových látok s kovmi	17
3.1.2 Interakcie humínových látok s organickými zlúčeninami	19
3.2 Využitie infračervenej spektroskopie pri štúdiu interakcií humínových látok	21
4 Experimentálna časť	23
4.1 Použité pomôcky a prístroje	23
4.2 Použité chemikálie	23
4.3 Príprava vzoriek	23
4.3.1 Zásobné roztoky	23
4.3.2 Dialýza	24
4.4 FTIR analýza	25
5 Výsledky a diskusia	26
5.1 Výber vhodnej FTIR techniky	26
5.2 Vplyv metylácie na štruktúru humínových kyselín	26
5.3 Porovnanie spektier čistých HK a HK rozpustených v 0,01M NaOH	28
5.4 FTIR analýza komplexov humínových kyselín s organickými iónmi	31
5.4.1 Spektrá aktívnych látok	31
5.4.2 Spektrá komplexov	34
5.5 Pokročilá analýza FTIR spektier pomocou dekonvolúcie	38
6 Záver	41
7 Zoznam použitých zdrojov	42
8 Zoznam použitých skratiek a symbolov	47
9 Prílohy	48

1 ÚVOD

Humínové látky sú dôležitou súčasťou prírodnej organickej hmoty. Vďaka ich rôznorodej štruktúre a obsahu mnohých funkčných skupín predstavujú ideálne médium pre viazanie rôznych cudzorodých látok v ich prirodzenom prostredí, ktorým je najmä pôda alebo povrchové a podzemné vody. Jedným z najčastejších polutantov sú organické ióny, ktoré sa práve v pôde často vyskytujú vo forme pesticídov, herbicídov alebo odpadov či metabolitov farmaceutických výrob. Tieto látky sú pre živé organizmy často toxické a optimalizácia metód ich odstraňovania zo životného prostredia a detoxifikácie je pre udržanie kvality ekosystému nevyhnutná. Možnosti interakcií humínových látok s polutantmi sú rôzne, medzi najpravdepodobnejšie patria napríklad iónová či kovalentná väzba, tvorba vodíkových mostíkov alebo iných nekovalentných interakcií. Objasnenie ich presného mechanizmu je prvým dôležitým krokom, a preto je mu v súčasnej dobe stále venovaných mnoho štúdií.

Existuje nemálo metód, pomocou ktorých je možné študovať spomenuté interakcie. Po preskúmaní súčasného stavu riešenej problematiky bola pre túto prácu zvolená metóda infračervenej spektroskopie, ktorá umožňuje odhaliť konkrétne väzby a funkčné skupiny zapojené v interakciách, no nebolo nájdených veľa prác, v ktorých by bola využitá pre sledovanie interakcie medzi humínovými látkami a organickými iónmi. Ako modelové ióny boli zvolené farbivá metylénová modrá, rhodamin 6G a dezinfekčná látka Septonex. Za zástupcu humínových látok bola zvolená frakcia humínových kyselín, konkrétne štandardizované humínové kyseliny izolované z Leonarditu, pričom boli taktiež sledované rozdiely v interakciách ich nemodifikovanej a metylovanej formy.

2 TEORETICKÁ ČASŤ

2.1 NEKOVALENTNÉ INTERAKCIE

Úvahy o chemickej reaktivite sú väčšinou sústredované na kovalentné interakcie medzi atómami v molekule. So zväčšujúcou sa veľkosťou molekúl však naberajú na dôležitosť interakcie medzi molekulami, teda medzimolekulové sily alebo nekovalentné interakcie [1]. Kovalentná väzba je síce najväčšia sila, ktorá drží molekuly pohromade, no napriek ich menšej veľkosti, nekovalentné sily značne prispievajú k štruktúre, stabilite a funkčnej schopnosti makromolekúl. Tieto sily zahŕňajú interakcie vnútri molekúl, ale aj interakcie medzi jednotlivými molekulami a môžu byť buď príťažlivé, alebo odpudivé [2]. Intenzita medzimolekulových síl klesá s rastúcou teplotou, čo sa môže makroskopicky prejavovať zmenou skupenstva látok. Nekovalentné interakcie umožňujú samovoľný vznik organizovaných štruktúr z jednotlivých molekúl a majú kľúčovú úlohu v molekulovom rozpoznaní [3]. Existuje niekoľko typov nekovalentných interakcií, ako napríklad Van der Waalove sily či vodíkové mostíky.

2.1.1 COULOMBICKÉ A VAN DER WAALSOVE SILY

Pojem van der Waalove sily je používaný pre slabé medzimolekulové interakcie, vrátane elektrostatických a disperzných interakcií. Princípom elektrostatických síl sú coulombické príťažlivé sily medzi pozitívnymi a negatívnymi nábojmi. Elektrický náboj môže byť buď úplný, vo forme iónov, alebo čiastočný, vo forme dipólov [4].

2.1.1.1 INTERAKCIE IÓN-IÓN

Je potrebné rozlišovať tieto interakcie od iónových väzieb v kryštálových mriežkach iónových zlúčenín. Interakcie ión-ión zahrňujú tvorbu iónových párov v roztokoch, tiež nazývaných aj soľné mostíky. Iónové páry sú vytvorené napríklad interakciou bočných reťazcov aminokyselín v proteínoch (typ $-\text{COO}^- \dots ^+\text{NH}_3$). Táto interakcia je dôležitá najmä pri spájaní podjednotiek proteínov v ich kvartérnej štruktúre [4].

2.1.1.2 INTERAKCIE DIPÓL-DIPÓL

Sú slabšie ako predchádzajúce interakcie. Vyskytujú sa v polárnych molekulách ako dôsledok existencie elektrostatických interakcií medzi dipólmi. V závislosti od vzájomnej orientácie molekúl môžu byť buď príťažlivé, alebo odpudivé. Rovnako nabité časti molekúl sa odpudzujú, zatiaľ čo opačne nabité sa príťahujú. Štruktúry s príťažlivými interakciami majú nižšiu energiu, a preto prevažujú [1]. V polárnych látkach sú tieto interakcie zodpovedné za nižšiu prchavosť v porovnaní s analogickými nepolárnymi látkami. Taktiež stabilizujú terciárnu štruktúru bielkovín a prispievajú k rozpustnosti polárnych látok v polárnych rozpúšťadlách [4].

2.1.1.3 INTERAKCIE DIPÓL-INDUKOVANÝ DIPÓL

V nepolárnych molekulách, najmä ak obsahujú ľahko polarizovateľné skupiny, je v blízkosti permanentných dipólov alebo v elektrickom poli iónov indukovaný slabý dipólový moment. Vznik tohto dipólového momentu má za následok vznik zodpovedajúcich elektrostatických príťažlivých síl [4].

2.1.1.4 DISPERZNÉ SILY (LONDONOVE SILY)

Disperzné sily sú jediné medzimolekulové sily pôsobiace medzi molekulami nepolárnych látok a voľnými atómami. Sú dôsledkom toho, že rozloženie elektrónov a atómov v molekulách nie je konštantné [3]. Vo veľkom množstve molekúl v každom okamihu prebiehajú zrážky atómov, čoho

výsledkom je polarizácia molekuly. Na jednom konci molekuly je vytvorený čiastočne pozitívny náboj, ktorý následne indukuje vznik čiastočne negatívneho náboja na konci susediacej molekuly – indukovaný (okamžitý) dipól. Disperzné sily sú príťažlivé sily medzi oscilujúcimi dipólmi v atónoch a molekulách, ktoré sú vo vzájomnej blízkosti. Pôsobia len na veľmi krátke vzdialenosti. Okamžité dipóly existujú len veľmi krátko a stále sa menia, ale kumulatívny efekt veľkého množstva týchto interakcií vytvára dostatočne silné príťažlivé sily na to, aby udržali molekuly v tuhom alebo kvapalnom stave. Sú zodpovedné napríklad za kondenzáciu plynov pri nízkych teplotách [1, 4].

2.1.2 VODÍKOVÉ MOSTÍKY

Interakcie, ktoré boli doteraz spomenuté, sa týkajú všetkých molekúl, bez ohľadu na ich chemickú identitu (iba s ohľadom na rozloženie náboja v nich). Vodíkové väzby, alebo tiež vodíkové mostíky sú najsilnejšími medzimolekulovými interakciami v nenabitých molekulách. Je však možné ich nájsť iba v látkach, v ktorých je vodíkový atóm viazaný k výrazne elektronegatívnemu atómu – zvyčajne k dusíku, kyslíku alebo fluóru. Vo svojej podstate sú to veľmi silné dipól-dipólové interakcie medzi polarizovanými väzbami O–H, N–H alebo F–H. Elektronegatívny atóm silno priťahuje zdieľaný elektrónový pár a tým pádom má vodík okolo seba len minimálnu elektrónovú hustotu. Za týchto podmienok je vodíkový atóm nositeľom čiastočne pozitívneho náboja a je schopný vytvoriť slabú väzbu s voľným elektrónovým párom elektronegatívneho atómu druhej molekuly. Vodíkové mostíky majú niekoľko dôležitých úloh. Sú napríklad zodpovedné za tvorbu sekundárnych štruktúr biopolymérov (napr. α -helix, β -skladaný list v proteínoch) alebo za niektoré vlastnosti vody (napr. jej kvapalné skupenstvo pri bežných teplotách či vyššia hustota ľadu ako kvapalnej vody). Tvorba vodíkových mostíkov medzi purínovými a pyrimidínovými bázami v nukleových kyselinách je podstatou replikácie, transkripcie a translácie genetického kódu [1, 4].

2.1.3 HYDROFÓBNE INTERAKCIE

Hydrofóbne interakcie sú tendencie nepolárnych zlúčenín k samoasociácii vo vodnom prostredí. Samoasociácia minimalizuje energeticky nevýhodné interakcie medzi nepolárnymi skupinami a vodou [2].

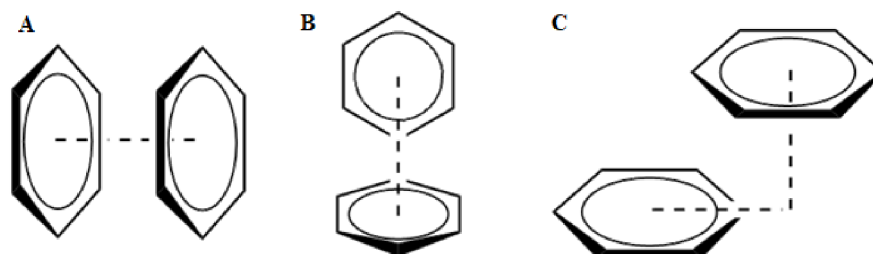
Pokiaľ vodíky nepolárnych skupín netvorí vodíkové väzby, musia ovplyvňovať štruktúru rozpúšťadla, ktoré ich obklopuje. Medzi molekulami rozpúšťadla a nepolárnej rozpustenej látky nepôsobia také veľké príťažlivé sily, ako medzi molekulami rozpúšťadla navzájom, a preto je každá molekula nepolárnej látky obklopená solvatačným obalom z molekúl rozpúšťadla. Tento proces znižuje entropiu systému, pretože hydrofóbne skupiny zabraňujú vode vytvoriť maximálny počet vodíkových väzieb (energeticky najvýhodnejších) a molekuly vody musia zmeniť svoju orientáciu, aby mali všetky vodíkové väzby nasýtené. Nepolárne molekuly majú teda tendenciu tvoriť kvapôčky (klastre), aby minimalizovali plochu odkrytého povrchu a aby zmenšili počet energeticky negatívne ovplyvnených molekúl vody – k ich obaleniu stačí menší solvatačný obal a viac molekúl rozpúšťadla sa môže voľne pohybovať. Týmto sa entropia systému opäť zvyšuje, pretože zisk entropie z voľného pohybu molekúl rozpúšťadla prevažuje nad znížením pohyblivosti nepolárnych molekúl v klastri. Toto zvýšenie entropie je dostatočne veľké pre iniciáciu spontánnej asociácie hydrofóbnych molekúl v polárnom rozpúšťadle [2, 5].

2.1.4 π - π INTERAKCIE

π - π interakcie, alebo tiež π - π *stacking*, sú nekovalentné príťažlivé sily medzi dvomi aromatickými kruhmi obsahujúcimi π -orbitály. Sú to ľahké, nedeštruktívne a reverzibilné interakcie založené na kvadrupólových interakciách medzi delokalizovanými elektrónmi v π -orbitáloch. Existujú tri geometrické konfigurácie týchto interakcií. Dve najstabilnejšie konformácie sú rovnobežná posunutá

konfigurácia (Obr. 1C) a konformácia tvaru T (Obr. 1B). Na druhej strane, pri sendvičovej konfigurácii (Obr. 1A) je maximalizované prekryvanie π -orbitálov a interakcia je destabilizovaná [6, 7].

Za π - π interakcie sú zodpovedné kvadrupólové a disperzné sily. Lokálny C–H dipól aromatického kruhu predstavuje pozitívny náboj, zatiaľ čo elektrónový oblak nad a pod kruhom predstavuje negatívny náboj (napríklad pri hexafluorobenzéne je kvadrupólový moment obrátený vďaka vysokej elektronegativite fluóru). V sendvičovej konfigurácii je benzénový dimér stabilizovaný pomocou disperzných Londonových síl, ale aj destabilizovaný odpudivými kvadrupól-kvadrupól interakciami. Posunutím jedného z benzénových kruhov sú tieto odpudivé interakcie stlmené a konfigurácia je stabilizovaná. Pri konfigurácii tvaru T sa uplatňujú výhodné kvadrupól-kvadrupól interakcie, pričom pozitívny kvadrupól benzénového kruhu interaguje s negatívnym kvadrupólom druhého kruhu. Tieto kruhy sú od seba vzdialenejšie ako pri sendvičovej konfigurácii, takže disperzné sily už na stabilitu nemajú veľký vplyv. π - π interakcie sú dôležité pri zoskupovaní nukleových kyselín v DNA či RNA, no dôležitú úlohu hrajú napríklad aj v termálnej stabilite alebo skladaní proteínov [6, 7].



Obr. 1 Tri geometrické konfigurácie π - π interakcií; A: sendvičová, B: T-tvar, C: rovnobežná posunutá [8]

2.2 CHARAKTERISTIKA HUMÍNOVÝCH LÁTOK

Humínové látky (HL) sú hlavnými zložkami prírodnej organickej hmoty v pôde a vo vode. Sú to komplexné heterogénne zmesi polydisperzných materiálov (materiály obsahujúce častice rôznych veľkostí), ktoré sú vytvorené pomocou biochemických a chemických reakcií počas procesu rozkladu rastlinných a mikrobiálnych zvyškov – tzv. humifikácie. Dôležitou súčasťou tohto procesu sú rastlinný lignín a produkty jeho transformácie, polysacharidy, melanín, proteíny, tuky, nukleové kyseliny a iné. Humínové látky majú žltu-hnedú až čiernu farbu, ktorá závisí od ich koncentrácie alebo od stupňa rozkladu [9].

Humínové látky sú veľmi dôležitou súčasťou pôdy. Ovplyvňujú jej fyzikálne a chemické vlastnosti a zvyšujú jej úrodnosť. Vo vodných systémoch, napríklad v riekach, približne 50 % rozpusteného organického materiálu tvoria humínové látky, ktoré ovplyvňujú pH vody a jej zásaditosť. V pôde sú zodpovedné napríklad za biologickú dostupnosť chemických prvkov, ako aj za transport a rozklad xenobiotik a prirodzene sa vyskytujúcich chemikálií [9].

Môžu byť rozdelené do troch hlavných skupín: humínové kyseliny (HK), fulvokyseliny (FK) a humín. Humínové kyseliny a fulvokyseliny môžu byť z pôdy a iných pevných fáz extrahované za použitia silnej zásady, akou je napríklad hydroxid sodný alebo hydroxid draselný. HK sú však za nízkeho pH nerozpustné a môžu byť vyražané pomocou silnej kyseliny. Fulvokyseliny sú rozpustné za akýchkoľvek pH podmienok a zostávajú v roztoku po odstránení humínových kyselín okyslením. Humín nie je možné extrahovať ani silnou zásadou, ani silnou kyselinou [9, 10].

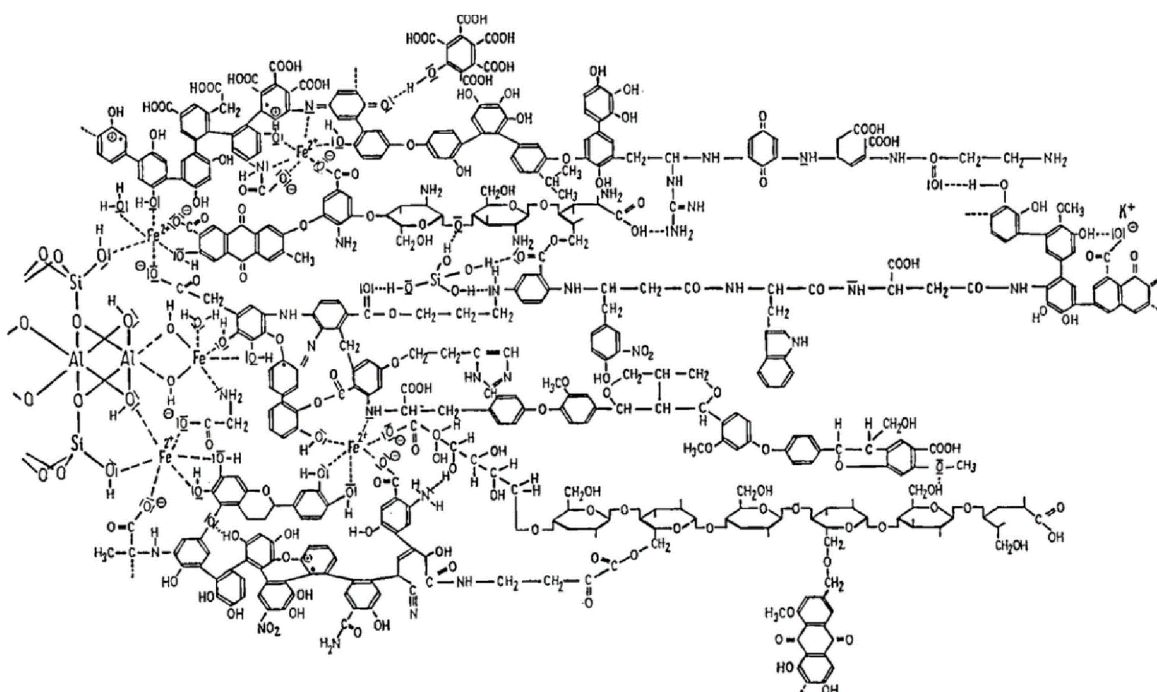
Humínové látky sú vysoko chemicky reaktívne, no zároveň sú veľmi odolné voči biologickému rozkladu. Väčšina údajov o HK, FK a humíne odkazuje na priemerné vlastnosti veľkého súboru zložiek s rôznou štruktúrou a molekulovou hmotnosťou. Konkrétne vlastnosti a štruktúra danej humínovej látky závisia od jej zdroja (voda, pôda) a presných podmienok jej extrakcie. Napriek tomu sú však priemerné vlastnosti HK, FK a humínu z rôznych zdrojov mimoriadne podobné [9].

2.3 ŠTRUKTÚRA A ZLOŽENIE HUMÍNOVÝCH LÁTOK

Dostupné údaje nasvedčujú, že humínové kyseliny, fulvokyseliny a humíny sú si štruktúrne podobné, ale líšia sa najmä v molekulových hmotnostiach a tiež majú rozdielne zastúpenie jednotlivých funkčných skupín. Štruktúra humínových látok však bola predmetom už mnohých štúdií a doposiaľ nebola presne popísaná [11].

Humínové látky sú supramolekulárne látky skladajúce sa z mnohých pomerne malých, heterogénnych podjednotiek, ktoré sú stabilizované najmä pomocou slabých nekovalentných interakcií. Hydrofóbne interakcie (van der Waalsove sily; π - π , CH- π interakcie) a vodíkové mostíky sú zodpovedné za značnú zdanlivú molekulovú veľkosť humínových látok. Hydrofóbne interakcie sa stávajú ešte dôležitejšími so zvyšujúcim sa pH. Vzniknuté supramolekuly majú vďaka veľkému počtu rôznych funkčných skupín univerzálne väzbové schopnosti [12, 13].

Podľa Stevenzona [14], humínové látky pozostávajú z heterogénnej zmesi zlúčenín, ktorej nezodpovedá žiadny všeobecný štruktúrny vzorec. Každá podjednotka obsahuje niekoľko molekúl rôznych veľkostí, z ktorých len veľmi málo zdieľa rovnakú štruktúrnu konfiguráciu a usporiadanie reakčných skupín. Základnou štruktúrou však je hydrofóbne aromatické jadro s alifatickými bočnými reťazcami viazanými -O-, -CH₂-NH-, -N=, -S- mostíkmi, obsahujúce rôzne funkčné skupiny. Môže obsahovať aj pripojené bielkovinové alebo polysacharidové zvyšky [10, 14, 15]. Na Obr. 2 je zobrazená hypotetická štruktúra fragmentu humínovej látky.



Obr. 2 Hypotetická štruktúra fragmentu pôdnej humínovej látky podľa Kleinhepela [16]

2.3.1 MOLEKULOVÁ HMOTNOSŤ A PRVKOVÉ ZASTÚPENIE

Efektívne molekulové hmotnosti humínových látok sú v rozsahu od niekoľkých stoviek po niekoľko miliónov jednotiek. Hlavné prvky vyskytujúce sa v týchto látkach sú uhlík, vodík, dusík, síra a kyslík, v najväčšom množstve sú zastúpené práve uhlík s kyslíkom. Tab. 1 zobrazuje percentuálne zastúpenie jednotlivých prvkov v humínových kyselinách a vo fulvokyselinách. Je možné vidieť, že HK obsahujú priemerne o 10 % viac uhlíka, ale o 10 % menej kyslíka ako fulvokyseliny [11].

Tab. 1 Percentuálne zastúpenie (v hmotnostných percentách) jednotlivých prvkov v HK a FK [11]

	Humínové kyseliny	Fulvokyseliny
C (%)	53,8 – 58,7	40,7 – 50,6
O (%)	32,8 – 38,3	39,7 – 49,8
H (%)	3,2 – 6,2	3,8 – 7,0
N (%)	0,8 – 4,3	0,9 – 3,3
S (%)	0,1 – 1,5	0,1 – 3,6

2.3.2 FUNKČNÉ SKUPINY

Hlavnými funkčnými skupinami obsahujúcimi kyslík v humínových látkach sú karboxyly, hydroxyly a karbonyly. Celková acidita je rovná súčtu $-COOH$ a fenolických $-OH$ skupín a bolo dokázané, že fulvokyseliny majú výrazne vyššiu celkovú aciditu, najmä vďaka vyššiemu obsahu $-COOH$ skupín, ako humínové kyseliny. Taktiež bolo zistené, že HK aj FK majú väčší obsah karboxylových skupín ako fenolických $-OH$ skupín. Obe zložky obsahujú približne rovnaké koncentrácie fenolických $-OH$, $-C=O$ a $-O-CH_3$ skupín na jednotku hmotnosti, ale fulvokyseliny sú bohatšie na alkoholové $-OH$ skupiny [11]. Zatiaľ čo FK obsahujú väčšinou ketónové $-C=O$ skupiny, v humínových kyselinách je väčší podiel chinónových $-C=O$ skupín [15].

Za najreaktívnejšie skupiny humínových látok sú považované práve karboxylové a fenolické skupiny. Okrem nich je možné v štruktúre humínových látok nájsť aj enolové, chinónové, hydrochinónové, laktónové, éterové a alkoholové skupiny. V malých množstvách sa v HL nachádzajú aj dusíkové, fosforové alebo sírové funkčné skupiny [15]. Humínové látky majú polyaniónový charakter a sú schopné viazať ióny rôznymi chemickými a fyzikálnymi mechanizmami [17].

2.4 VÄZBOVÉ MOŽNOSTI HUMÍNOVÝCH LÁTOK

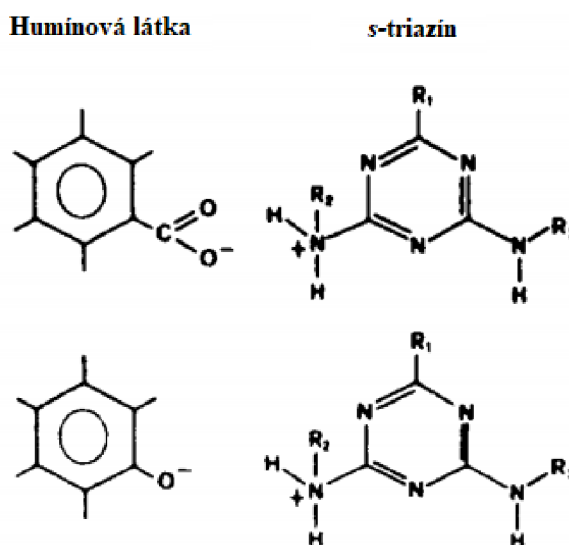
Ako už bolo popísané v predchádzajúcich kapitolách, humínové látky disponujú veľkým množstvom rôznych funkčných skupín, vďaka čomu majú aj široké, takmer univerzálne väzobné možnosti. Ako veľmi vhodné pre interakcie s pesticidmi a inými xenobiotikami sú humínové látky označované aj vďaka ich polydisperznej a polyelektrolytickej povahe, vďaka ich povrchovej aktivite, obsahu voľných radikálov či hydrofilných a hydrofóbnych častí v ich molekulovej štruktúre [18]. Pomocou rôznych typov väzieb sú schopné viazať rozličné typy látok, medzi ktorými je možné nájsť polárne aj nepolárne, anorganické aj organické zlúčeniny, xenobiotiká či environmentálne polutanty.

Humínové látky môžu s cudzorodými látkami interagovať v rôznych režimoch vrátane adsorpcie, rozkladania a rozpúšťania, katalýzy pri hydrolytických procesoch a dealkylácie. Tieto procesy majú potom dôležitú úlohu v správaní xenobiotík v pôde, pretože ovplyvňujú napríklad aj ich degradáciu a detoxifikáciu. Humínové látky môžu byť silnými oxidačnými činidlami oxidované, môžu sa správať ako redukčné činidlá a ich väzba na iné látky a interakcie s nimi môžu byť rôznej povahy: iónová a kovalentná väzba, vodíkové mostíky, mechanizmy založené na výmene náboja alebo

donorovo-akceptorové interakcie, protolytické a komplexačné reakcie alebo van der Waalsove a hydrofóbne interakcie [18, 19].

2.4.1 IÓNOVÁ VÄZBA

Iónová väzba vzniká pôsobením elektrostatických síl medzi nábojmi funkčných skupín humínových látok a iónmi nachádzajúcimi sa v roztoku [17]. Medzi humínovou látkou a xenobiotikom môže vzniknúť v prípade, že cudzorodá látka je v kationovej forme alebo je schopná akceptovať protóny (alkalické kovy, amoniak, rôzne organické pesticídy). HL sú schopné tvoriť iónové väzby vďaka ionizovaným, alebo ľahko ionizovateľným, karboxylovým a fenolickým –OH skupinám. Na Obr. 3 je znázornená iónová väzba medzi humínovou látkou a *s*-triazinom, ktorý je využívaný ako pesticíd. Väzba môže vzniknúť medzi protónovanou sekundárnou amino-skupinou *s*-triazínu a karboxylátovým iónom alebo fenolátovou skupinou humínovej látky [18].



Obr. 3 Iónová väzba medzi humínovou látkou a *s*-triazinom [18]

2.4.2 KOORDINAČNÁ VÄZBA

Pri vyššom pH sa zvyšuje dôležitosť komplexačných a chelačných reakcií. Komplexačné reakcie sú považované za mechanizmus, ktorý tvorí slabšie väzby ako chelácia, pretože sa tvorí koordinačná väzba s jedinou donorovou skupinou. Pri chelácii sa naopak tvorí štruktúra chelátového kruhu. Schopnosť humínových látok tvoriť koordinačné väzby je z hľadiska riešenia environmentálnych problémov považovaná za veľmi dôležitú. V závislosti od niekoľkých faktorov (pH, saturácia reťazcov, koncentrácia elektrolytu) môžu HL tvoriť rozpustné aj nerozpustné komplexy s kovmi. Predpokladá sa, že fulvokyseliny tvoria rozpustnejšie kovové cheláty ako humínové kyseliny, pretože sami sú rozpustné vo vode, majú menšiu molekulovú hmotnosť a vyšší obsah funkčných skupín. Na druhej strane, pomerne nerozpustné cheláty humínových kyselín môžu výborne slúžiť na odstraňovanie toxických kovov. HK teda môžu byť využité ako tlmivé nepriaznivých účinkov ťažkých kovov a toxických látok ako pesticídov a iných xenobiotík [20].

Dôležitými skupinami pri tvorbe koordinačných väzieb sú najmä karboxylové skupiny. Humínové látky s vysokým obsahom aromatických –COOH skupín sú náchylné na tvorbu komplexov s Cu^{2+} iónmi, –COOH skupiny na alifatických reťazcoch sú dôležité pre komplexačné reakcie hlavne s Ca^{2+} iónmi [20]. So zvyšujúcim sa pH (nad 7) sa po disociácii protónu z fenolického hydroxyly značne zvyšuje dôležitosť fenolických skupín pri tvorbe komplexov a tiež obvykle aj stúpa stabilita komplexov [17].

2.4.3 KOVALENTNÁ VÄZBA

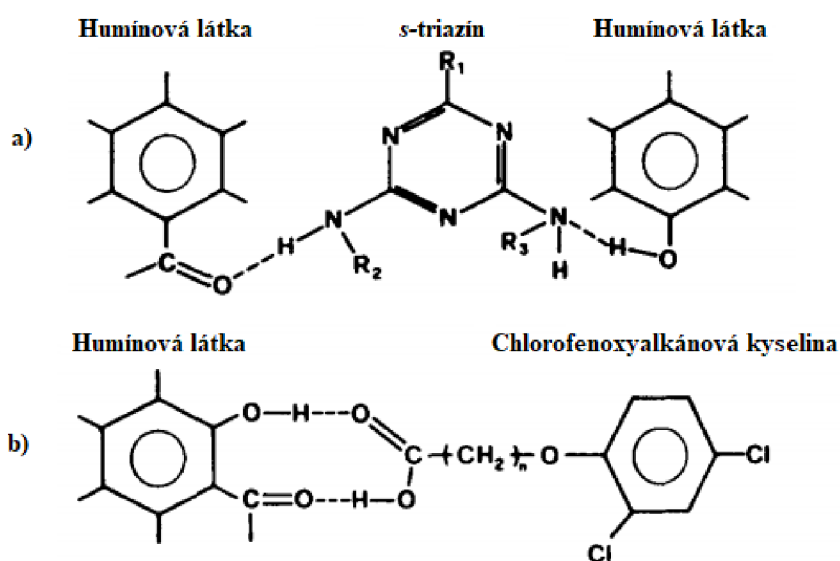
Je dokázané, že kovalentné väzby môžu byť vytvorené medzi humínovými látkami a pesticídmi, alebo pravdepodobnejšie, ich medziproduktami a produktami ich degradácie (napr. anilíny, fenoly). Tvorba tejto väzby býva sprostredkovaná chemickými, fotochemickými alebo enzymatickými katalyzátormi a vzniknutá väzba je veľmi stabilná a zvyčajne ireverzibilná [18]. Možnosť vzniku tejto väzby je predpokladom k imobilizácii kontaminantov v pôde. Napríklad kovalentná väzba je obzvlášť dôležitá pri sanácii pôd kontaminovaných polyaromatickými uhl'ovodíkmi, pretože táto stabilná väzba na polymernú štruktúru je nemutagénna a v jej prítomnosti svoju mutagenitu znižujú aj niektoré mutagénne látky [17].

Kovalentne bývajú väčšinou viazané pesticídy, ktoré majú podobné chemické vlastnosti ako humínové látky. Keďže HL sú polymérne molekuly s aromatickým jadrom a mono-, di- alebo polyfenolickými podjednotkami, môžu k nim byť kovalentne viazané pesticídy, ktoré štruktúrne pripomínajú fenolické zlúčeniny. Kovalentne viazané pozostatky sú extrémne stabilné a sú charakteristické ich rezistenciou voči kyslej alebo zásaditej hydrolyze, tepelnému spracovaniu a mikrobiálnej degradácii [21].

2.4.4 VODÍKOVÉ MOSTÍKY

Prítomnosť mnohých funkčných skupín obsahujúcich kyslík a hydroxyl predstavuje vysokú pravdepodobnosť tvorenia vodíkových mostíkov medzi humínovými látkami a inými látkami (napr. pesticídmi), ktoré obsahujú vhodné komplementárne skupiny. Problémom však môže byť vysoká konkurencia tvorenia vodíkových väzieb medzi týmito skupinami a vodou [18].

Výskumy zlučovacieho tepla komplexu humínová látka–atrazín [22, 23] (atrazín je herbicíd patriaci do skupiny substituovaných triazínov) poukazujú na prítomnosť jedného alebo viacerých vodíkových mostíkov, pravdepodobne zahŕňujúcich $-C=O$ skupiny humínových látok a sekundárne amino-skupiny *s*-triazínu. Ďalej aj kyslé a anionické pesticídy, ako napríklad chlorofenoxyalkánové kyseliny a estery môžu byť pomocou vodíkových mostíkov adsorbované na humínové látky pri hodnotách pH nižších ako ich pK_a , v neionizovaných formách, cez $-COOH$, $-COOR$ a iné podobné skupiny [18, 24]. Na Obr. 4 je zobrazená štruktúra vodíkových mostíkov medzi humínovou látkou a *s*-triazínom alebo chlorofenoxyalkánovou kyselinou.



Obr. 4 Vodíkové mostíky medzi humínovou látkou a *s*-triazínom (a) alebo chlorofenoxyalkánovou kyselinou (b) [18]

2.4.5 HYDROFÓBNE INTERAKCIE

Hydrofóbne interakcie predstavujú mechanizmus nezávislý na pH, ktorý zahŕňa hydrofóbne aktívne reťazce huminových látok a nepolárne pesticídy, ktoré s vodou reagujú iba slabo a pre ktoré nie sú vodné molekuly dobrou konkurenciou. Medzi tieto hydrofóbne reťazce HL patria napríklad alifatické bočné reťazce, tukové zvyšky alebo časti s vysokým obsahom uhlíka a nízkym počtom polárnych skupín [18]. Najčastejšou predpokladanou interakciou huminových látok s hydrofóbnymi a alifatickými kontaminantmi sú práve hydrofóbne interakcie [17].

2.5 INFRAČERVENÁ SPEKTROSKOPIA

Vibračná spektroskopia je založená na absorpcii a emisii fotónov s energiou zodpovedajúcou prechodom medzi vibračnými (väčšinou v kombinácii s rotačnými) stavmi molekúl, častíc alebo iných supramolekulárných útvarov. Výstupom vibračnej spektroskopie môžu byť buď infračervené alebo Ramanove spektra, pričom táto práca je zameraná najmä na infračervenú spektroskopiu [25].

Infračervená spektroskopia je analytická metóda využívaná v priemysle a akademických laboratóriách pre objasnenie štruktúry individuálnych molekúl a zloženia molekulárných zmesí. Princípom tejto metódy je absorpcia infračerveného žiarenia pri prechode vzorkou, pričom dochádza k zmenám rotačne vibračných energetických stavov molekuly v závislosti na zmenách dipólového momentu molekuly. Analytickým výstupom je infračervené spektrum, ktoré je grafickým znázornením funkčnej závislosti energie (vyjadrenej v percentách transmitancie T alebo jednotkách absorpcie A) na vlnovej dĺžke dopadajúceho žiarenia. Absorbancia je definovaná ako dekadický logaritmus $1/T$. Energia je nepriamo úmerná vlnovej dĺžke, preto sa používa tzv. vlnové číslo (vlnočet), ktoré je definované ako prevrátená hodnota vlnovej dĺžky a z toho vyplýva, že závislosť energie na vlnochte je lineárnou funkciou [26, 27].

Charakteristickou vlastnosťou FTIR spektier je prítomnosť absorpčných pásov definovaných ich spektrálnou polohou, tvarom a intenzitou. Vďaka tomu môžu byť hodnoty vibračných frekvencií zbierané v databáze a na základe toho môžu byť určené a interpretované aj funkčné skupiny v študijných materiáloch. Na základe vrcholu absorpčných pásov v určitých intervaloch vlnočtu môžu byť identifikované rôzne väzby medzi atómami a funkčné skupiny analyzovanej látky [28, 29].

Infračervené spektra organických látok sú rozčlenené do dvoch základných skupín:

- 4000–1500 cm^{-1} : oblasť funkčných skupín (oblasť valenčných vibrácií); „píky“ v tejto oblasti sú charakteristické pre špecifický typ väzieb a tým pádom môžu byť využité pre určenie prítomnej funkčnej skupiny;
- 1500–400 cm^{-1} : oblasť odtlačku prstu („fingerprint region“, oblasť deformačných vibrácií); píky v tejto oblasti vznikajú z komplexných deformácií molekuly. Súbor frekvencií v tejto oblasti je pre každú zlúčeninu charakteristický a je možné ho využiť pre identifikáciu neznámej látky na základe porovnania s katalogizovanými spektrami [28, 29].

Prehľad intervalov vlnočtu pre vybrané väzby je uvedený v Tab. 2.

Tab. 2 Prehľad hlavných oblastí FTIR spektier a ich charakteristických väzieb [30]

Vlnové číslo (cm^{-1})	Charakteristické väzby
4000–2500	O-H, N-H, C-H, S-H
2500–2000	C=C=C, C≡C, C≡N
2000–1500	C=C, C=O, C=N, N=N deformačné vibrácie väzieb N-H a O-H z vody
1500–650	oblasť odtlaku prstov náročná na interpretáciu, valenčné vibrácie väzieb C-C, C-O, C-N, deformačné vibrácie C-H

2.5.1 TECHNIKY SKÚMANIA VZORIEK POMOCOU IČ SPEKTROSKOPIE

Na skúmanie vzoriek pomocou infračervenej spektroskopie môže byť využitých niekoľko techník. Delia sa na dve základné skupiny – transmisné a reflexné techniky. Medzi reflexné techniky patrí napríklad technika úplného zoslabeného odrazu (ATR), DRIFTS technika, alebo meranie zrkadlového odrazu a predmetom ich záujmu je lúč, ktorý je odrazený od vzorky. Iným typom sú transmisné techniky, pri ktorých je merané žiarenie prechádzajúce vzorkou. Asi najčastejšie využívanou transmisnou technikou je technika lisovania KBr tabliet, ktorá je využiteľná pre širokú škálu pevných látok a poskytuje spektrá s vysokou kvalitou, no jej najväčšou nevýhodou je práca príprava vzorky.

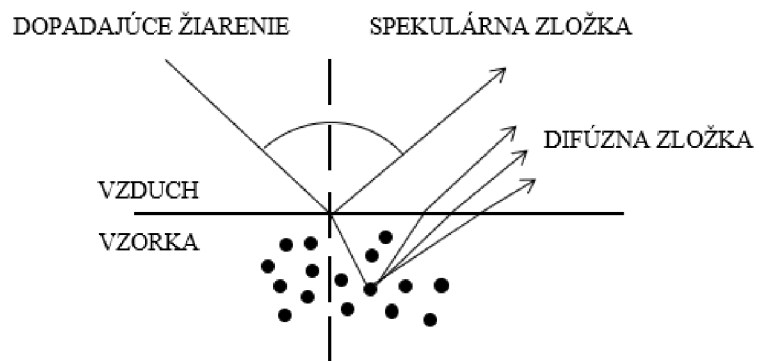
2.5.1.1 MERANIE ÚPLNÉHO ZOSLABENÉHO ODRAZU (ATR)

ATR technika (z angličtiny *Attenuated Total Reflection*) je v súčasnosti pravdepodobne najčastejšie využívanou FTIR technikou. Je založená na meraní zmien, ku ktorým dochádza v odrazenom infračervenom lúči po kontakte tohto lúča so vzorkou. Analyzovaná vzorka je v dokonalom kontakte s kryštálom s vysokým indexom lomu, na ktorý je pod určitým uhlom nasmerovaný infračervený lúč. Najčastejšie používanými kryštálmi sú diamant, germánium alebo selenid zinočnatý. Vnútny odraz lúču vytvára evanescentnú vlnu, ktorá prechádza cez povrch kryštálu do analyzovanej vzorky. V oblastiach IČ spektra, kde vzorka absorbuje energiu je evanescentná vlna zoslabená. Zoslabený lúč sa potom vracia do kryštálu a opustí ho opačným koncom, kde je nasmerovaný do detektoru. Táto technika je vhodná pre širokú škálu pevných látok a tiež pre niektoré kvapaliny [31].

2.5.1.2 DRIFTS TECHNIKA

Difúzna reflektancia (DRIFTS – *Diffuse Reflectance Infrared Fourier Transform Spectroscopy*) je výsledkom prieniku dopadajúceho žiarenia do častíc vzorky a následného rozptylu z matrice vzorky. Po privedení infračerveného žiarenia na vzorku je teda časť žiarenia absorbovaná, časť je odrazená vo forme spekulárnej zložky a časť žiarenia je rozptýlená, pričom práve posledný efekt je označovaný ako difúzna reflektancia (Obr. 5) [32, 33].

Táto technika spočíva v smerovaní infračerveného lúča do vzorkovacieho tégliku, ktorý je naplnený zmesou vzorky a substrátu (napríklad KBr). Infračervené žiarenie interaguje s časticami vzorky a odráža sa od ich povrchu, čo spôsobuje, že svetlo je pri prechode vzorkou rozptýlené alebo difunduje. Výstupné zrkadlo následne smeruje túto rozptýlenú energiu na detektor v spektrometri. Spekulárna a reflektančná zložka žiarenia sú závislé na veľkosti častíc a distribúcii ich veľkosti, preto je pre reprodukovateľné výsledky potrebné používať vzorky s približne rovnako veľkými časticami [32, 33].



Obr. 5 Schematické znázornenie interakcie infračerveného žiarenia so vzorkou v DRIFTS technike [33]

3 SÚČASNÝ STAV RIEŠENEJ PROBLEMATIKY

3.1 INTERAKCIE HUMÍNOVÝCH LÁTOK S XENOBIOTIKAMI A RÔZNE METÓDY ICH SKÚMANIA

Zatiaľ čo predchádzajúce kapitoly boli venované charakteristike humínových látok a ich väzobných možností, táto časť je venovaná interakcii konkrétnych xenobiotík v pôde s humínovými látkami. Zaoberá sa štruktúrnymi aspektmi tejto interakcie, typom väzieb medzi HL a jednotlivými cudzorodými látkami a metódami ich skúmania. Základnými metódami, ktoré nám umožňujú skúmať spôsoby interakcie HL s inými látkami sú napríklad UV-VIS spektroskopia, jadrová magnetická rezonančná spektroskopia (NMR), infračervená alebo FTIR spektroskopia, fluorescenčná spektrometria alebo elektrónová spinová rezonancia (ESR) [18, 34]. Niektoré z týchto metód sú bližšie rozobraté v nasledujúcej časti práce.

3.1.1 INTERAKCIE HUMÍNOVÝCH LÁTOK S KOVMÍ

Existuje mnoho nezhodných názorov ohľadom interakcií kov–humínová látka, o vplyve vlastností humínových látok na túto interakciu alebo o spôsobe ich viazania. Niektorí autori navrhujú, že za komplexačné reakcie medzi humínovými látkami a kovmi sú zodpovedné karboxylové skupiny [35], niektorí naznačujú komplexnú povahu karboxylových aj fenolických skupín [36], iní dokonca tvrdia, že kovové ióny sa na častice humínových látok môžu viazať aj cez dusíkové atómy [37]. Ďalšími skupinami, ktoré môžu byť zodpovedné za viazanie kovov humínovými látkami môžu byť hydroxylové, enolové, karbonylové, fosfátové skupiny, alebo skupiny obsahujúce síru [18, 38]. Problémom pri jednoznačnej charakteristike interakcií medzi týmito látkami je aj fakt, že rôzne kovové ióny majú rôzne vlastnosti – valenčný a iónový polomer, elektronegativita – a taktiež aj jednotlivé humínové látky sa vo svojich vlastnostiach veľmi líšia (rôzne molekulové hmotnosti, počet aromatických kruhov a alifatických reťazcov, obsah funkčných skupín a iné). Mobilita a reaktivita kovov je tiež ovplyvňovaná koncentráciou jednotlivých látok, ich iónovou silou alebo pH prostredia [30].

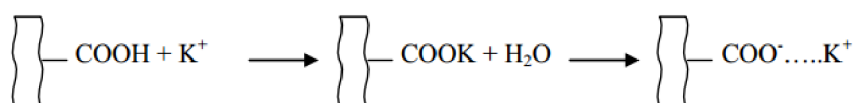
3.1.1.1 KOMPLEXAČNÉ REAKCIE

Hlavným typom interakcií medzi ťažkými kovmi a humínovými látkami sa javí byť tvorba koordinačných zlúčenín. Komplexačné procesy môžu byť od iónovej výmeny odlišené na základe pozorovania zmien pH (pokles pH môže byť indikátorom komplexácie), rozpustnosti, oxidačného potenciálu, elektrickej vodivosti alebo chemického správania analyzovaného systému. Komplexačná reakcia ťažkých kovov je postupná. Ligandy sú viazané na centrálny atóm a tvoria sériu medziproduktov, ktoré vedú k tvorbe koordinačne nasýteného komplexu. Komplexačné reakcie s kovovými iónmi, ktoré tvoria jednoduché komplexy a cheláty, sú založené na vytesnení iónov vodíka z funkčných skupín humínových kyselín [30]. Existujú dva typy mechanizmov koordinačného viazania ťažkých kovov k humínovým kyselinám:

- a) vznik komplexov, v ktorých je voľný radikál humínovej látky pripojený jednou koordinačnou väzbou k centrálnemu iónu (kov),
- b) komplexačné reakcie s tvorbou chelátových spojení. Voľný radikál humínovej látky je spojený s centrálnym iónom niekoľkými koordinačnými väzbami. Kovové ióny sú v tomto prípade viazané k dvom funkčným skupinám humínovej látky, ktoré sa nachádzajú blízko pri sebe [30].

3.1.1.2 TVORBA IÓNOVEJ VÄZBY

Interakcie ľahkých kovov s humínovými látkami sú zvyčajne založené na jednoduchých reakciách vedúcich k vzniku iónovej väzby. V dôsledku toho sú vytvorené soli nazývané humáty. Výmena atómu vodíka za kovový ión je rýchla. Tohto procesu sa zúčastňujú najmä karboxylové skupiny a hydroxylové skupiny fenolov. Preto stupeň iónovej výmeny závisí na disociácii jednotlivých skupín a tým pádom aj na hodnote pH. Vo všeobecnosti, potenciometrické merania odhalili, že nastáva nárast stupňa iónovej výmeny pri pH od 10 – 12, kedy sú všetky –COOH a –OH skupiny disociované. Pri neutrálnom pH sú vymieňané hlavne protóny z karboxylových skupín humínových látok. Ľahké kovy, ktoré sa tejto iónovej výmeny s radikálmi humínových skupín zúčastňujú sú vo forme kationov a bežne sa vyskytujú v prírode: Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^+ alebo K^+ . Humáty monovalentných kovov ako sodík alebo draslík sú dobre rozpustné. Rozpustné soli spôsobujú, že kov je v pôdnom prostredí mobilnejší a tým pádom ľahšie odstrániteľný [30]. Iónová výmena medzi humínovou látkou a kovom je schematicky zobrazená na Obr. 6.



Obr. 6 Schematické znázornenie iónovej väzby medzi humínovou látkou a ľahkým kovom [30]

3.1.1.3 VYBRANÉ METÓDY ŠTÚDIA INTERAKCIE HUMÍNOVÝCH LÁTKOK S KOVMÍ

Interakcie medzi kovmi a humínovými látkami sú stále predmetom mnohých štúdií. Existuje niekoľko metód, ktoré nám pomáhajú tieto interakcie skúmať. Vďaka moderným metódam sme schopní analyzovať väzby, ich stabilitu, priestorovú štruktúru, ale aj rôzne elektrochemické, optické a iné vlastnosti skúmaných systémov. V tejto podkapitole je preto rozobratých niekoľko metód, ktoré sa pre túto analýzu využívajú.

Potenciometrické titrácie

Potenciometrická titrácia je jednou z najdôležitejších metód pre štúdium interakcií humínových látok s kovovými iónmi a inými látkami nachádzajúcimi sa v pôde. Je cenným nástrojom pre získanie mnohých informácií o povrchových a sorpčných vlastnostiach humínových látok. Za rozsiahle možnosti potenciometrických titrácií môže fakt, že molekuly HL obsahujú vysoký počet funkčných skupín, ktoré preukazujú rôznu aciditu [30]. Metódu potenciometrickej titrácie pri štúdiu interakcií kovov s humínovými látkami využilo mnoho autorov [39, 40].

Fluorescenčná spektrometria

Špecifická štruktúra humínových kyselín je zodpovedná za prejavovanie fluorescenčných vlastností. Konkrétne sú to skupiny nazývané fluorofóry, napríklad chinoické, ftalické, fenolické, amino alebo salicylové skupiny. Častice látok, ktoré vykazujú fluorescenčnú aktivitu môžu byť excitované absorpciou žiarenia s krátkymi vlnovými dĺžkami (napr. UV žiarenie) a následne môžu emitovať absorbovanú energiu vo forme fluorescencie. Intenzita fluorescencie je priamo úmerná koncentrácii celej fluoreskujúcej látky [30].

Metóda fluorescenčnej spektrometrie je veľmi citlivá na rôzne environmentálne faktory, ako napríklad pH, iónová sila, typ roztoku, teplota alebo interakcie s kovmi. Možnosť aplikovania fluorescenčnej spektrometrie na skúmanie interakcií s kovmi vyplýva z faktu, že funkčné skupiny, ktoré sú potenciálne zodpovedné za viazanie kovov sú tiež zodpovedné za fluorescenčné vlastnosti humínových látok [41]. V prípade viazania kovových iónov na častice humínových látok, fluorescenčný signál môže byť uhasený alebo zintenzívnený. Závisí to od typu viazaného kovu a od

mechanizmu tohto viazania [42]. Pri štúdiách interakcií humínových kyselín s kovovými iónmi bolo zistené, že fluorescencia nameraná pri vyšších vlnových dĺžkach znamenala prítomnosť kondenzovaných štruktúr s vysokou konjugáciou nenasýtených väzieb, veľkú molekulovú hmotnosť a vysoký stupeň humifikácie. Konkrétne, excitačne–emisné páry hlavných maxim môžu indikovať štruktúru konjugovaných fenolov, chinónov alebo flavónov. Naopak fluorescencia prítomná pri krátkych vlnových dĺžkach by mohla súvisieť s jednoduchými, nízkomolekulárnymi štruktúrami s nízkym stupňom aromaticity [30, 43, 44].

Infračervená spektroskopia

Interakcie kovov s humínovými látkami môžu byť študované pomocou FTIR spektroskopie (z angl. *Fourier-transform infrared spectroscopy*). Vďaka tejto metóde je možné identifikovať absorbujúce funkčné skupiny zúčastňujúce sa komplexácie a poskytnúť informácie o tomto type reakcie. Je možné skúmať správanie skupín ako sú karboxylové, fenolické, alkoholové, –N a –S ligandy pod vplyvom kovov [30].

Pomocou FTIR spektroskopie bolo napríklad zistené, že zmena pH neovplyvňuje mechanizmus viazania Cu^{2+} iónov k humínovým látkam, ale zvyšuje množstvo naviazanej medi [45]. Iní autori zas dokázali, že napríklad zníženie intenzity absorpčného pásu pri vlnovke $3\,440\text{ cm}^{-1}$ môže znamenať účasť kyslíkových atómov fenolických skupín v komplexačných procesoch kovov [46]. Princíp tejto metódy je bližšie popísaný v kapitole 2.5.

3.1.2 INTERAKCIE HUMÍNOVÝCH LÁTOK S ORGANICKÝMI ZLÚČENINAMI

Približne polovica priemyselne vyprodukovaných organických látok sa dostane do životného prostredia priamymi alebo nepriamymi cestami, ako sú napríklad poľnohospodárske praktiky alebo cez komunálny a priemyselný odpad. Tieto produkty zahrňujú rôzne pesticídy a ich metabolity, alifatické a aromatické deriváty benzínu a plastov, organické rozpúšťadlá, surfaktanty alebo detergenty. Keď sa tieto látky dostanú do prírodného prostredia, sú iniciované rôzne degradačné a transferové procesy. Chemické vlastnosti jednotlivých látok (napr. molekulová štruktúra, prchavosť, náboj, polarizovateľnosť, rozpustnosť) rozhodnú o tom, ktorý proces bude dominovať. Najdôležitejšími procesmi sú interakcie, ktoré vedú k ich deaktivácii, sorpcii alebo chemickej väzbe k iným látkam (napríklad humínovým látkam, ktorým sa bude táto kapitola venovať), vďaka čomu môžu byť z prostredia ľahšie odstránené [47]. Presný mechanizmus interakcie organických látok s humínovými látkami stále nebol presne odhalený a aj v dnešnej dobe je predmetom mnohých štúdií.

3.1.2.1 PESTICÍDY

Organické pesticídy, ktoré sa v dnešnej dobe používajú, patria do niekoľkých rôznych skupín organických chemikálií. V tejto kapitole budú rozdelené na základe ich interaktívnych vlastností s humínovými látkami na kationové, zásadité, kyslé a aniónové a neiónové zlúčeniny.

Do skupiny *kationových pesticídov* patria napríklad bipyridiliové herbicídy ako dikvat a parakvat. Bolo dokázané, že tieto látky sú pre ľudí toxické [48]. Rozpustnosť kationových pesticídov je zvyčajne vo vodných roztokoch vysoká a tieto látky v nich disociujú za vzniku divalentných kationov. Dikvat a parakvat sú neprchavé zlúčeniny a z pôdných alebo vodných systémov nie sú vylučované vo forme pary. Je známe, že po vystavení slnku alebo UV žiareniu podliehajú fotodekompozícii. Tieto zlúčeniny sú schopné tvoriť komplexy s prenosom náboja s fenolmi a inými donorovými molekulami [47, 49].

Najdôležitejšími pesticídmi v skupine *zásaditých pesticídov* sú *s*-triazíny. Prítomnosť dusíkových atómov bohatých na elektróny spôsobuje významnú elektrón-donorovú schopnosť *s*-triazínov, ako napríklad spôsobilosť interagovať s elektrón-akceptorovými molekulami, čo dáva možnosť vzniku donor-akceptorových komplexov [47].

Kyslé a aniónové pesticídy zahŕňajú rôzne skupiny chemikálií s herbicídnyimi účinkami, vrátane substituovaných fenolov, chlórovaných alifatických kyselín, chlorofenoxyalkánových kyselín a substituovaných benzoových kyselín, ktoré obsahujú karboxylové alebo fenolické funkčné skupiny schopné ionizácie vo vodnom prostredí, ktoré produkujú aniónové zlúčeniny [47].

Neiónové pesticídy nie sú vo vodnom prostredí významne ionizované a veľmi sa líšia svojím chemickým zložením a vlastnosťami, akými sú rozpustnosť vo vode, polarita, prchavosť alebo molekulový objem [47].

3.1.2.2 POLYAROMATICKE UHĽOVODÍKY

Polyaromatické uhľovodíky (PAH) sú vo všeobecnosti nebezpečnou skupinou rozšírených kontaminantov, ktoré sú vo veľkých množstvách produkované zo spaľovania fosílnych palív, v chemických výrobách, pri rafinácii ropy, v hutníctve, alebo v niektorých systémoch premeny uhlia a dechtu. PAH sú prítomné v odpadových tokoch týchto procesov a cez rôzne environmentálne cesty sa môžu nahromadiť v potravinových reťazcoch vedúcich k ľuďom. PAH sú neutrálne, nepolárne organické molekuly pozostávajúce z dvoch alebo viacerých benzénových jadier usporiadaných v rôznych konfiguráciách. Hydrofóbia týchto látok sa zvyšuje s molekulovou hmotnosťou. Veľa členov tejto skupiny chemikálií bolo identifikovaných ako toxické látky s nebezpečnými vlastnosťami [47].

3.1.2.3 MECHANIZMUS INTERAKCIE HUMÍNOVÝCH LÁTOK S ORGANICKÝMI ZLÚČENINAMI

Hlavnými interakciami medzi humínovými látkami a organickými zlúčeninami sú adsorpčné mechanizmy. Je dôležité poznamenať, že chemické vlastnosti a správanie rozpustenej a pevnej frakcie humínových látok môže byť výrazne odlišné a tieto frakcie budú s organickými polutantmi interagovať rozdielne [47].

Sorpcia predstavuje pravdepodobne súbor najdôležitejších interakcií medzi humínovými látkami a toxickými organickými látkami. Adsorpcia je zodpovedná za kontrolu množstva voľných organických látok v roztoku a tým pádom rozhoduje o ich stálosti, mobilite a biodostupnosti. Miera adsorpcie závisí od množstva a vlastností humínových aj organických látok. Po adsorpcii na HL môžu byť organické látky ľahko desorbované, ťažko desorbované alebo ich desorpcia vôbec nie je možná. Sorpcia teda môže byť reverzibilná aj ireverzibilná. Najdôležitejšie vlastnosti organických látok, ktoré rozhodujú o type ich interakcie s HL sú chemický charakter molekuly, tvar a konfigurácia, kyslosť (pK_a), zásaditosť (pK_b), rozpustnosť vo vode, polarita, molekulová veľkosť a rozloženie náboja molekuly [47]. Existuje niekoľko adsorpčných mechanizmov, ktoré môžu prebiehať aj simultánne. Medzi najdôležitejšie patrí iónová väzba, vodíkové mostíky, koordinačná väzba, kovalentná väzba a hydrofóbne interakcie.

3.1.2.4 VYBRANÉ METÓDY ŠTÚDIA INTERAKCIÍ HUMÍNOVÝCH LÁTOK S ORGANICKÝMI ZLÚČENINAMI

Interakcie humínových látok s organickými chemikáliami môžu byť študované rôznymi metódami. Často využívanými metódami sú napríklad infračervená spektroskopia [50, 51, 52] alebo potenciometrické merania [51], ktorých princípy už boli popísané vyššie. Táto podkapitola sa venuje ďalším vybraným metódam charakterizácie týchto interakcií.

Elektrónová spinová rezonancia

Vo všeobecnosti je elektrónová spinová rezonančná spektroskopia (ESR) absorpčnou spektroskopiou, ktorá zahŕňa absorpciu žiarenia v mikrovlnnej oblasti ($10^4 - 10^6$ MHz) látkami, ktoré obsahujú minimálne jeden nespárovaný elektrón (takéto látky sú paramagnetické, preto sa tento typ spektroskopie nazýva aj elektrónová paramagnetická rezonancia). Táto absorpcia prebieha pod vplyvom aplikovaného magnetického poľa. Absorbované žiarenie spôsobuje prechody medzi energetickými stavmi, teda rôznymi orientáciami spinu nepárových elektrónov, ktoré vznikli rozštiepením jednoduchých stavov s nenulovým spinom v magnetickom poli [53].

Štúdiom interakcií organických herbicídov s humínovými látkami pomocou ESR sa zaoberal napríklad Senesi [52]. Parametre elektrónovej spinovej rezonancie a zvýšenie koncentrácií paramagnetických centier v produktoch tejto interakcie dokázali, že medzi najdôležitejšie mechanizmy väzby herbicídov na HL patria elektrónové donor-akceptorové procesy, ktoré zahŕňajú medziprodukty voľných radikálov.

Difúzne experimenty

Pre štúdium interakcie humínových látok s xenobiotikami v roztokoch je možné využiť difúzne experimenty. Môžu byť realizované napríklad v tzv. difúzných celách, ktoré sa skladajú z dvoch komôr oddelených semipermeabilnou membránou. Komory pozostávajú z dvoch plášťov – vnútorného, v ktorom prebieha vlastný experiment a vonkajšieho, ktorý slúži k udržaniu izotermických podmienok. Po naliatí roztokov do priestoru vymedzeného vnútorným plášťom začne vplyvom koncentračného gradientu prebiehať difúzia. Proces je ukončený po vyrovnaní koncentrácií sledovanej látky v oboch komorách a je pomerne časovo náročný. Priebeh tohto procesu je sledovaný spektroskopickými metódami [54].

Napríklad Smilek a spol. [13] sledovali pomocou difúzných experimentov vplyv karboxylových skupín na interakciu humínových látok s nabitými organickými iónmi. Bolo dokázané, že na tieto interakcie majú karboxylové skupiny menší vplyv ako bolo očakávané, čo znamená, že sa ich musia zúčastňovať aj iné funkčné skupiny. Teda interakcie medzi aromatickými časťami v molekulárnej štruktúre rozpustenej látky sú dôležitejšie ako obyčajné elektrostatické interakcie medzi opačne nabitými látkami.

3.2 VYUŽITIE INFRAČERVENEJ SPEKTROSKOPIE PRI ŠTÚDIU INTERAKCIÍ HUMÍNOVÝCH LÁTOK

Ako už bolo bližšie opísané v kapitole 2.5, infračervená spektroskopia je metóda slúžiaca k objasneniu štruktúry individuálnych molekúl a zloženia molekulárnych zmesí. Vďaka charakteristickým infračerveným spektrám môžu byť identifikované funkčné skupiny analyzovanej látky a taktiež väzby medzi jednotlivými atómami. Preto je infračervená spektroskopia často využívaná ako metóda skúmania interakcií medzi dvomi látkami a slúži k objasneniu ich mechanizmu. Táto kapitola uvádza príklady experimentov, v ktorých bola IČ spektroskopia využitá k identifikácii mechanizmu interakcií medzi humínovými látkami a rôznymi xenobiotikami.

Bolo zistené, že humínové kyseliny by mohli byť potenciálne využité pre odstránenie chrómu z odpadových vôd, a preto boli pomocou infračervenej spektroskopie študované interakcie medzi HK a chromitými iónmi. Cieľom štúdie bolo zistiť funkčné skupiny zapojené v tvorbe komplexov medzi uvedenými látkami. Oproti IČ spektrám čistých humínových kyselín boli po interakcii s chromitými iónmi zaznamenané posuny karboxylátových absorpčných pásov, čo značí, že chróm sa na HK viaže práve cez karboxylové skupiny [55].

Piccolo a spol. pomocou infračervenej spektroskopie skúmali interakciu medzi často používaným herbicídrom glyfosátom a humínovými kyselinami rozpustnými vo vode. Zaznamenané zmeny v IČ spektrách indikujú viacnásobné vodíkové mostíky medzi fosfonovou skupinou glyfosátu a komplementárnymi skupinami humínových kyselín [56].

V ďalšej štúdií využili vedci FTIR spektroskopiu pre objasnenie viazania a komplexácie humínových látok s hematitom. Bolo zistené, že komplexačný mechanizmus bol riadený ligandovou výmenou zahrňujúcou karboxylové funkčné skupiny humínových látok a povrchové miesta oxidu. Žiadne iné funkčné skupiny, ako napríklad fenolické –OH skupiny, sa na komplexácii nepodieľali [57].

Vedci z kalifornskej univerzity študovali sorpciu atrazínu na humínové kyseliny metódami UV-VIS, FTIR a ESR spektroskopie pri rôznom pH. Výsledky štúdie ukázali, že v interakcii atrazín – humínová látka sa neobjavuje mechanizmus prenosu náboja. FTIR spektrá naopak poskytli dôkazy, že táto interakcia využíva mechanizmy vodíkových mostíkov a prenosu protónov, a to najmä pri $\text{pH} < 4$ [58].

Už v 20. storočí bola infračervená spektroskopia využívaná pre hľadanie mechanizmu interakcií medzi HK a herbicídmi. Napríklad Burns a spol. sledovali zmeny v relatívnych veľkostiach karboxylových absorpčných pásov (blízke 1730 a 1610 cm^{-1}) v infračervených spektrách adsorbentov pred a po interakcii s parakvatom. Bolo zistené, že hlavným mechanizmom adsorpcie parakvatu na H^+ -saturované HK je iónová výmena [50].

Adsorpcia parakvatu a dikvatu na humínové kyseliny saturované rôznymi kationmi bola ďalej študovaná aj Khanom. S využitím IČ spektroskopie a potenciometrických techník bolo dokázané zapojenie iónovej výmeny a mechanizmu prenosu náboja v adsorpcii uvedených herbicídov humínovými kyselinami. HL môžu vykazovať iónovo-výmenné reakcie vďaka prítomnosti ionizovateľných H^+ v –COOH a fenolických –OH skupinách. IČ spektroskopia dokázala, že na rozdiel od spektra HK, ktoré obsahuje intenzívnejší absorpčný pás pri 1720 cm^{-1} (karbonyl karboxylovej skupiny) ako pri 1610 cm^{-1} (karboxylát), je po pridaní herbicídu intenzita 1720 cm^{-1} pásu znížená, zatiaľ čo intenzita pásu pri 1610 cm^{-1} je zvýšená. To indikuje konverziu –COOH na $-\text{COO}^-$, ktoré reagujú s bipyridiliovými kationmi za vzniku karboxylátových väzieb. Ako dôkaz tvorby komplexov s prenosom náboja slúži posun absorpčných pásov pri 792 cm^{-1} u dikvatu a pri 815 cm^{-1} u parakvatu k 765 cm^{-1} (dikvat) a 825 cm^{-1} (parakvat) po interakcii s humínovou látkou. Tieto absorpčné pásy sú charakteristické pre mimorovinné vibrácie C–H väzieb [51].

Senesi a spol. študovali produkty reakcie humínových kyselín zo štyroch rôznych zdrojov a štyroch s-triazínov. Výsledky infračervenej analýzy ukázali tvorbu iónových a vodíkových väzieb medzi reagujúcimi molekulami a naznačili tiež možný výskyt komplexov s prenosom náboja [52].

4 EXPERIMENTÁLNA ČASŤ

4.1 POUŽITÉ POMÔCKY A PRÍSTROJE

- Spektrometer FT-IR Nicolet iS50, ThermoFisher Scientific
- Lyofilizátor VirTis BenchTop K, Bio Trade s. r. o
- Dialyzačná membrána Spectra/Por®, Spectrum Laboratories, Inc.
 - MWCO: 1 kDa
 - Plošná šírka: 45 mm
 - Priemer: 29 mm
 - Objem/dĺžka: 6,4 ml/cm
 - Dĺžka: 10 m
- Dialyzačná membrána Spectra/Por®, Spectrum Laboratories, Inc.
 - MWCO: 500 Da
 - Plošná šírka: 31 mm
 - Priemer: 20 mm
 - Objem/dĺžka: 3,1 ml/cm
 - Dĺžka: 10 m
- Magnetická miešačka, ThermoFisher Scientific
- Analytické váhy, Denver Instrument
- Bežné laboratórne sklo a pomôcky

4.2 POUŽITÉ CHEMIKÁLIE

- Humínové kyseliny a metylované humínové kyseliny izolované z černoze
- Humínové kyseliny a metylované humínové kyseliny izolované z lignitu
- Štandard humínových kyselín IHSS Leonardite
- Metylovaný štandard humínových kyselín IHSS Leonardite
- Hydroxid sodný 0,1M (N/10), Lach:ner
- Metylénová modrá, Penta
- Rhodamin 6G, Sigma Aldrich
- Septonex, GNB chem, a.s.
- Bromid draselný, SpectroGrade™, ICL
- Deionizovaná voda (Milli-Q, MQ)

4.3 PRÍPRAVA VZORIEK

Boli pripravené zásobné roztoky HK a mHK s koncentráciou 0,1 g/l v 0,01M hydroxide sodnom v objeme 50 ml, roztoky metylenovej modrej a Rhodaminu 6G s koncentráciou 0,025 g/l v deionizovanej vode a roztok Septonexu s koncentráciou 0,2 g/l v deionizovanej vode v objeme 100 ml. Následne boli z pripravených zásobných roztokov vytvorené komplexačné roztoky a bola prevedená dialýza. Vzorky boli nakoniec vysušené lyofilizáciou.

4.3.1 ZÁSObNÉ ROZTOKY

4.3.1.1 HUMÍNOVÉ A METYLOVANÉ HUMÍNOVÉ KYSELINY

Pre prípravu roztokov HK a mHK (metylácia HK bola realizovaná Bc. Annou Bělušovou v rámci spracovania jej diplomovej práce, a to selektívnou esterifikačnou metódou pre metyláciu karboxylových skupín pomocou TMS-diazometánu [59]) bol v prvom rade pripravený roztok hydroxidu sodného s koncentráciou 0,01 mol/dm³. Pre jeho prípravu bol použitý normalal hydroxidu sodného (N/10) určený pre prípravu roztoku s koncentráciou 0,1 M, ktorý bol kvantitatívne

prevedený do 1000ml odmernej banky a doplnený potrebným množstvom destilovanej vody. Z takto pripraveného roztoku bolo do 100ml odmernej banky odpipetovaných 10 ml a roztok bol zriedený na potrebnú koncentráciu 0,01 mol/dm³.

Boli navážené potrebné navážky štandardu a metylovaného štandardu humínových kyselín IHSS Leonardite pre prípravu roztokov s koncentráciou 0,1 g/l. Navážka bola kvantitatívne prevedená do 50ml odmernej banky a rozpustená v potrebnom množstve 0,01M NaOH. Roztoky boli potom približne 24 hodín miešané na magnetickej miešačke pre úplné rozpustenie humínových kyselín.

4.3.1.2 METYLÉNOVÁ MODRÁ A RHODAMIN 6G

Boli pripravené zásobné roztoky MB a R6G v objeme 100 ml s koncentráciou 0,025 g/l. 0,0025 g farbiva bolo kvantitatívne prevedených do 100ml odmernej banky a banka bola po rysku doplnená deionizovanou vodou. Takto pripravené roztoky boli ďalej použité pre prípravu komplexačných roztokov.

4.3.1.3 SEPTONEX

Bol pripravený zásobný roztok Septonexu v objeme 100 ml s koncentráciou 0,2 g/l. 0,02 g Septonexu bolo kvantitatívne prevedených do 100ml odmernej banky a banka bola po rysku doplnená deionizovanou vodou. Takto pripravený roztok bol ďalej použitý pre prípravu komplexačných roztokov.

4.3.1.4 KOMPLEXAČNÉ ROZTOKY

Komplexačné roztoky v objeme 20 ml boli vytvorené zmiešaním zásobných roztokov HK/mHK s roztokmi MB/R6G/Septonexu alebo s destilovanou vodou v objemovom pomere 1 : 1. Celkovo bolo takto prichystaných 12 roztokov, z čoho dva slúžia ako slepé vzorky (HK/mHK + destilovaná voda) a roztoky s rhodaminom 6G a metylénovou modrou boli pripravené dvakrát pre možnosť dialýzy cez dve membrány s rozdielnou hodnotou cut-off.

4.3.2 DIALÝZA

Pripravené komplexačné roztoky boli následne dialyzované proti destilovanej vode. Keďže nebolo možné zaistiť, aby sa všetky molekuly použitých organických iónov na humínové kyseliny naviazali, pre odstránenie voľných molekúl z komplexačných roztokov bola využitá rovnovážna dialýza. Pri dialýze je využívaná polopriepustná membrána, ktorá je schopná prepustiť len molekuly menšie ako jej hodnota *cut-off* (z angl. *molecular weight cut-off*, MWCO). Molekuly schopné prejsť membránou sú poháňané koncentračným gradientom a po určitom čase sa vyrovná ich koncentrácia v okolitom roztoku a vnútri membrány. Pretože dialýza prebieha vždy len do stavu rovnováhy, pre odstránenie väčšiny nenaiviazaných molekúl je potrebné meniť vodu, v ktorej sa vzorka dialyzuje.

Z dialyzačnej membrány bolo odstrihnutých približne 23 cm a táto časť membrány bola na jednom konci zviazaná pre vytvorenie dialyzačného črievka. Do takto pripraveného črievka bol prevedený komplexačný roztok, boli z neho odstránené vzduchové bubliny a črievko bolo na hornom konci uzavreté klipsom. Črievko s roztokom bolo potom vložené do nádoby s destilovanou vodou, kde prebiehala dialýza. Postup bol opakovaný so všetkými pripravenými komplexačnými roztokmi. Roztoky s každým typom organického iónu boli dialyzované cez dialyzačnú membránu s cut-off hodnotou 500 Da. Okrem toho, komplexačné roztoky s MB a R6G boli dialyzované aj cez membránu s cut-off 1 kDa. Dialýza prebiehala približne 4 dni a počas toho bola v nádobách dvakrát vymenená destilovaná voda. Po skončení dialýzy boli vzorky v plastových nádobkách uložené v laboratórnej mrazničke a následne boli kompletne zmrazené vzorky lyofilizované pre získanie suchej vzorky bez obsahu vody.

4.4 FTIR ANALÝZA

Analýza vzoriek pomocou FTIR spektroskopie predstavuje hlavnú experimentálnu náplň tejto bakalárskej práce. Jej hlavným cieľom bolo zistiť, či je pomocou tejto metódy možné skúmať interakcie humínových kyselín s organickými iónmi. Najskôr však bolo potrebné metódu optimalizovať. Na všetky merania bol použitý prístroj FT-IR Nicolet iS50 od firmy ThermoFisher Scientific a vzorky boli analyzované v rozmedzí vlnočtu 4 000 – 400 cm^{-1} .

V prvom rade boli prevedené merania pre výber vhodnej FTIR techniky. Vzorky HK a mHK izolovaných z černoze boli analyzované pomocou ATR techniky s využitím diamantového a germániového kryštálu a pre porovnanie boli zanalyzované aj technikou DRIFTS. Pri využití ATR techniky bol kryštál v prvom rade očistený destilovanou vodou a etanolom a bolo zmerané pozadie (vzduch). Následne bolo na kryštál nanesené malé množstvo vzorky a vzorka bola po pritlačení na povrch kryštálu vstavaným momentovým prítlakom odmeraná s rozlíšením 4 cm^{-1} s celkovým počtom akumulovaných skenov 64. Rovnaký postup aj rovnaké nastavenie prístroja bolo použité pri kryštáli z technického diamantu ako aj pri kryštáli z germánia. Meranie technikou DRIFTS prebehlo pri rozlíšení 4 cm^{-1} s celkovým počtom akumulovaných skenov 256. Najskôr bolo zmerané pozadie, ktoré predstavoval KBr, v trecej miske rozotretý na drobné čiastočky, a následne bola odmeraná vzorka. Vzorka bola pripravená rozotrením malého množstva humínovej kyseliny v KBr v trecej miske tak, aby bol dosiahnutý riediaci pomer približne 1 : 70.

Po vyhodnotení prvých meraní bolo zistené, že optimálny počet akumulovaných skenov je pri ATR technike 32 a pri meraní pomocou DRIFTS techniky je to 512 skenov, pri oboch technikách sú vzorky analyzované s rozlíšením 4 cm^{-1} . Takéto nastavenie bolo použité pri všetkých ďalších meraniach.

Následne boli pomocou DRIFTS techniky a ATR techniky s jednodrazovým kryštálom z technického diamantu zmerané vzorky humínových a metylovaných humínových kyselín izolovaných z lignitu, štandardu a metylovaného štandardu humínových kyselín IHSS Leonardite, všetkých pripravených komplexačných vzoriek po lyofilizácii a takisto aj čistých sledovaných organických látok, teda MB, R6G a Septonexu. Postup analýzy jednotlivých vzoriek bol rovnaký ako pri výbere vhodnej techniky a je opísaný vyššie. Získané spektrá boli neskôr spracované a vyhodnotené v programe OMNIC.

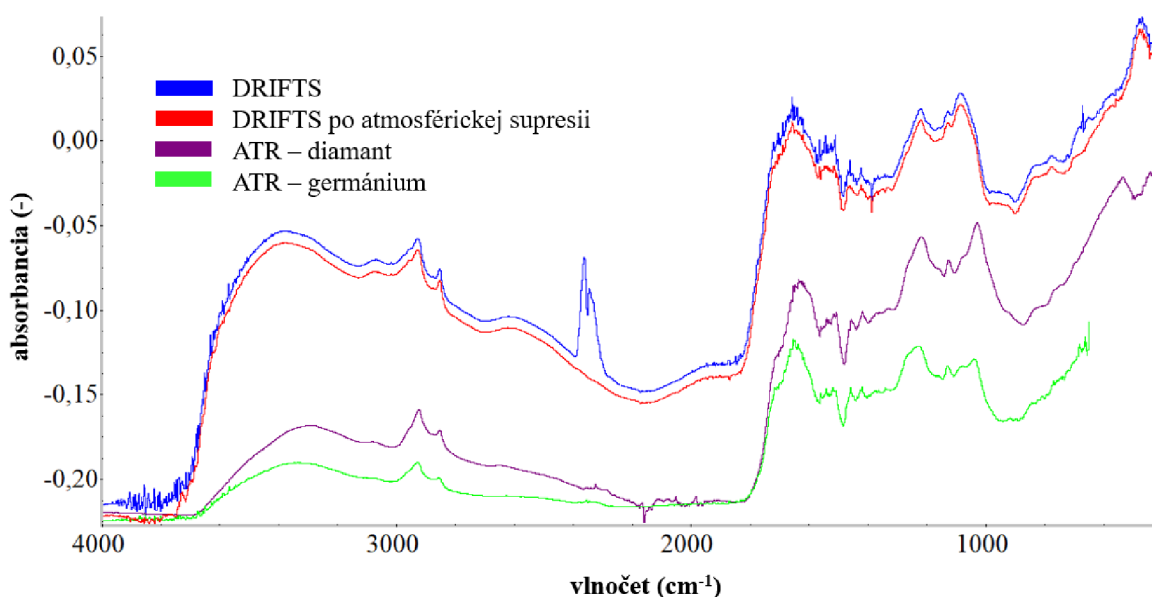
5 VÝSLEDKY A DISKUSIA

5.1 VÝBER VHODNEJ FTIR TECHNIKY

Pre výber vhodnej techniky boli analyzované spektrá humínových a metylovaných humínových kyselín izolovaných z černoze pomocou troch metód – ATR technika s využitím kryštálu z technického diamantu, ATR technika s využitím kryštálu z germánia a DRIFTS technika. Bolo zistené, že najkvalitnejšie spektrá z hľadiska pomeru signál/šum a rozlíšenia boli získané pomocou DRIFTS techniky. Jej najväčšou nevýhodou je prejavenie vplyvu vodnej pary a atmosférického CO₂ vo výsledných spektrách, čo je však možné jednoducho odstrániť následným spracovaním spektra v programe OMNIC pomocou korekčnej funkcie *Atmospheric suppression*.

Na druhej strane, spektrá získané pomocou ATR techník sú čiastočne zdeformované, pri nižších vlnôčtoch vykazujú vyššiu intenzitu oproti vyšším vlnovým číslam. Celkovo majú spektrá získané pomocou tejto techniky nižšiu intenzitu oproti spektrám z DRIFTS techniky. Pomocou Ge kryštálu tiež nie je možné zmerať absorpciu žiarenia vzorkou pri nízkych vlnôčtoch (< 600 cm⁻¹). Výhodou ATR techniky je však jednoduchá manipulácia so vzorkou, je potrebné veľmi malé množstvo vzorky a nie je nutné ju riediť. Porovnanie spektier humínových kyselín získaných jednotlivými metódami je zobrazené na Obr. 7. Rovnaký trend bol sledovaný aj u metylovaných humínových kyselín (Príloha 1).

Práve kvôli jednoduchej príprave vzorky bola pre ďalšie merania zvolená aj technika ATR s diamantovým kryštálom, no hlavnou technikou produkujúcou spektrá vhodné pre podrobnejšiu analýzu je technika DRIFTS.



Obr. 7 Porovnanie spektrier humínových kyselín izolovaných z černoze získaných rôznymi FTIR technikami

5.2 VPLYV METYLÁCIE NA ŠTRUKTÚRU HUMÍNŮVÝCH KYSELÍN

Pre štúdium vplyvu metylácie na štruktúru HK boli analyzované dvojice metylovaných a nemetylovaných humínových kyselín z troch rôznych zdrojov – z černoze, z lignitu a štandard humínových kyselín IHSS Leonardite. Vplyv metylácie je najlepšie viditeľný v spektrách HK z černoze a IHSS štandardu, ktoré sú zobrazené na Obr. 8 a Obr. 9. Podobný trend bol sledovaný

aj v spektrách HK izolovaných z lignitu (Príloha 2). Interpretácia absorpčných pásov bola prevedená na základe odbornej literatúry [60, 61].

V rozmedzí vlnočtu $3\ 600 - 3\ 000\ \text{cm}^{-1}$ je viditeľný široký pás valenčných vibrácií O–H skupín viazaných vodíkovými väzbami. U neasociovej O–H skupiny by bol očakávaný vlnočtet okolo $3\ 600\ \text{cm}^{-1}$, pričom nižšie vlnočty svedčia práve o intramolekulárnych alebo intermolekulárnych vodíkových mostíkoch. Pri metylovaných humínových kyselinách je viditeľné zúženie tohto pásu, čo môže byť spôsobené menším počtom vodíkových mostíkov v štruktúre mHK.

Absorpčný pás vo vlnočte okolo $3\ 050\ \text{cm}^{-1}$ je pripisovaný valenčným vibráciám aromatickej C–H skupiny a mal by byť viditeľný vo spektrách všetkých humínových kyselín, pretože ich aromatické kruhy nie sú kompletne substituované. Aj v tomto prípade je viditeľné, že intenzita tohto pásu zostala po metylácii takmer nezmenená.

Vlnočet $2\ 950 - 2\ 900\ \text{cm}^{-1}$ je charakteristický pre valenčné vibrácie alifatických C–H väzieb. Intenzita tohto píku je pri metylovaných humínových kyselinách značne zvýšená vďaka $-\text{CH}_3$ väzbám v ich štruktúre (v metylesteroch karboxylových skupín).

V okolí $2\ 600\ \text{cm}^{-1}$ sú typické valenčné vibrácie O–H väzieb karboxylových skupín, viazaných vodíkovými mostíkmi do dimérov. Pri mHK je viditeľný znížený príspevok týchto väzieb v dôsledku nahradenia časti karboxylových O–H skupín metoxy skupinou.

Píky v okolí vlnočtu $1\ 720\ \text{cm}^{-1}$ sú priradené najmä valenčným vibráciám C=O v karboxylových skupinách, no môžu tu byť viditeľné aj vibrácie C=O skupín v aldehydoch alebo ketónoch, s možným príspevkom esterových skupín. Vplyvom metylácie je viditeľný modrý posun (posun doľava, k vyššiemu vlnočtom) tohto píku a jeho intenzita je oproti nemetylovaným HK oveľa vyššia vďaka vyššiemu obsahu esterových C=O skupín. Absorpčné pásy C=O väzieb esterov mávajú maximá práve v okolí vlnočtu $1\ 730\ \text{cm}^{-1}$.

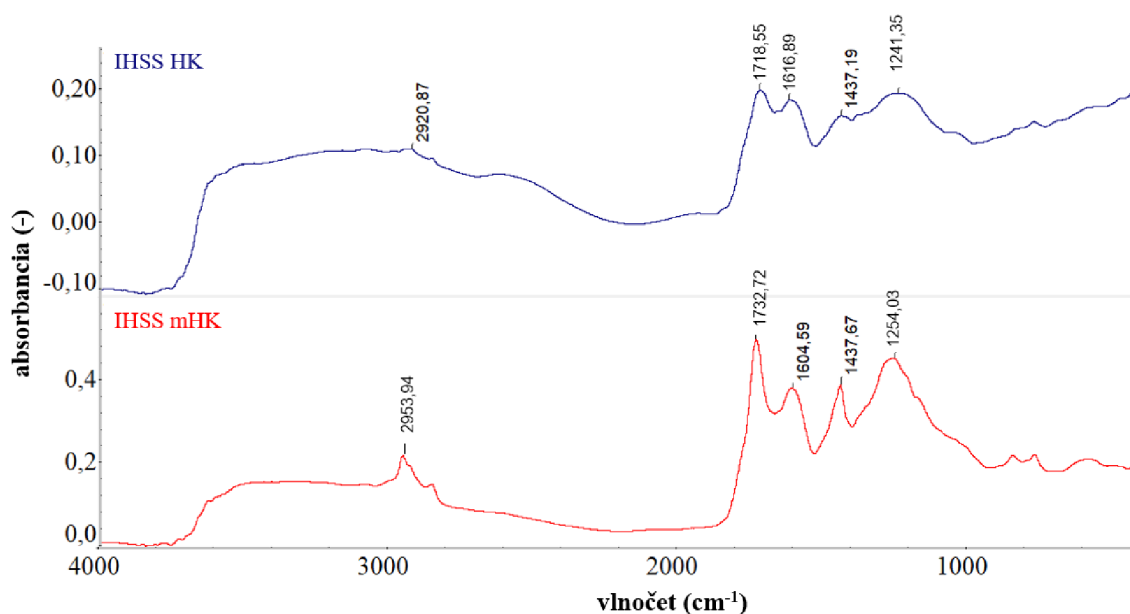
Pokiaľ humínové kyseliny obsahujú viac dusíku, bývajú pozorované absorpčné pásy aj v okolí $1\ 650\ \text{cm}^{-1}$, ktoré sú typické pre valenčné vibrácie amidu. Takéto píky sú pozorované najmä pri humínových kyselinách izolovaných z černoze (Obr. 9) a je viditeľné, že intenzita tohto píku sa po metylácii nijak nezmenila.

Pás v okolí $1\ 610\ \text{cm}^{-1}$ prislúcha vibráciám väzby C=C v aromatických štruktúrach a patrí k najsilnejším pásom v infračervenom spektre HK. Je viditeľný vo vzorkách IHSS štandardov (Obr. 8) alebo vo vzorke lignitických HK (Príloha 2) a taktiež je vidieť, že po metylácii je tento pás posunutý k nižším vlnovým dĺžkam.

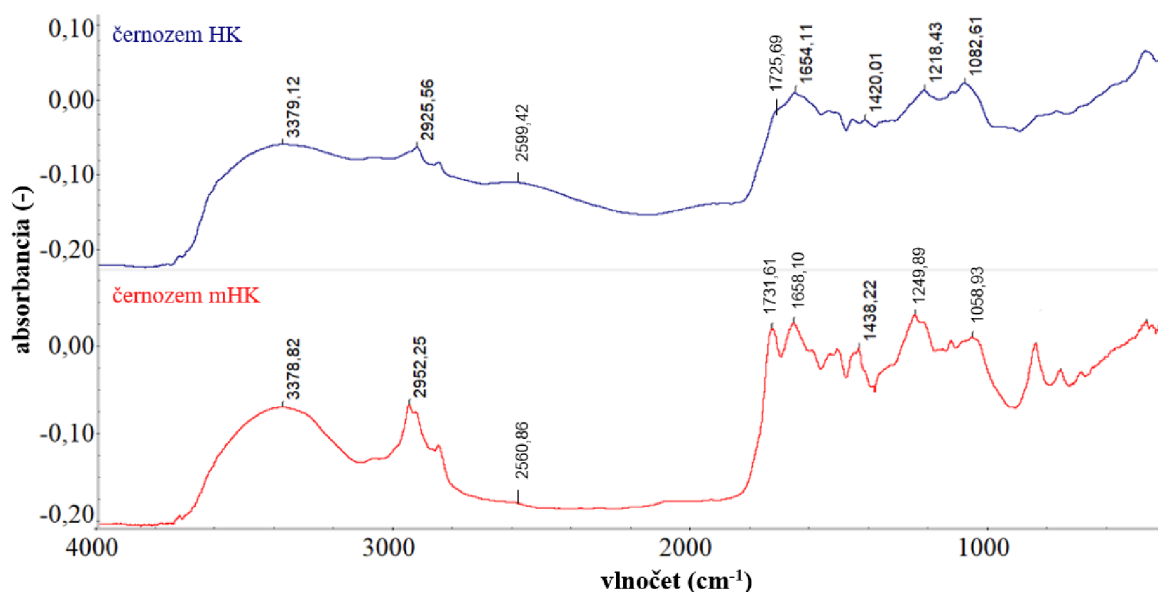
Absorpčné pásy vo vlnočte $1\ 460 - 1\ 440\ \text{cm}^{-1}$ patria antisymetrickým deformačným vibráciám C–H skupín v alifatických $-\text{CH}_3$ alebo $-\text{CH}_2-$ skupinách. Značne vyšší pík v tejto oblasti je u mHK z dôvodu zvýšenia počtu $-\text{CH}_3$ skupín metyláciou.

V spektrách lignitických HK aj humínových kyselín izolovaných z černoze je pomerne výrazný absorpčný pás vo vlnočte $1\ 080 - 1\ 035\ \text{cm}^{-1}$, pričom táto absorpcia môže byť vyvolaná valenčnými vibráciami C–O polysacharidov, no často ide len skôr o Si–O vibrácie minerálnych nečistôt, ktoré znižujú význam tejto oblasti spektra. Taktiež sa v tejto oblasti môžu nachádzať valenčné vibrácie C–OH alifatických alkoholov.

Oblasť vlnočtov pod $1\ 000\ \text{cm}^{-1}$ nie je pre štúdium štruktúry humínových kyselín veľmi podstatná a absorpčné pásy v tejto oblasti bývajú málo intenzívne. Zvyčajne patria mimorovinným deformačným vibráciám aromatických C–H väzieb [60].



Obr. 8 Porovnanie spektier HK a mHK štandardu IHSS Leonardite



Obr. 9 Porovnanie spektier HK a mHK izolovaných z černoze

5.3 POROVNANIE SPEKTIER ČISTÝCH HK A HK ROZPUSTENÝCH V 0,01M NaOH

Ako už bolo opísané v kapitole 4.3.1, ako porovnanie pre komplexy humínových kyselín s jednotlivými aktívnymi látkami boli pripravené slepé vzorky. Ich príprava spočívala v rozpustení HK alebo mHK v 0,01M NaOH, zmiešaní tohto roztoku s destilovanou vodou v objemovom pomere 1 : 1 a následnej dialýze proti destilovanej vode. Táto kapitola je venovaná zmenám pozorovaným v spektrách HK a mHK, ktoré prešli týmto postupom oproti spektrám čistých HK a mHK IHSS štandardov. Analýza spektier v tejto kapitole bola vypracovaná s prihliadnutím k prácam [60, 61].

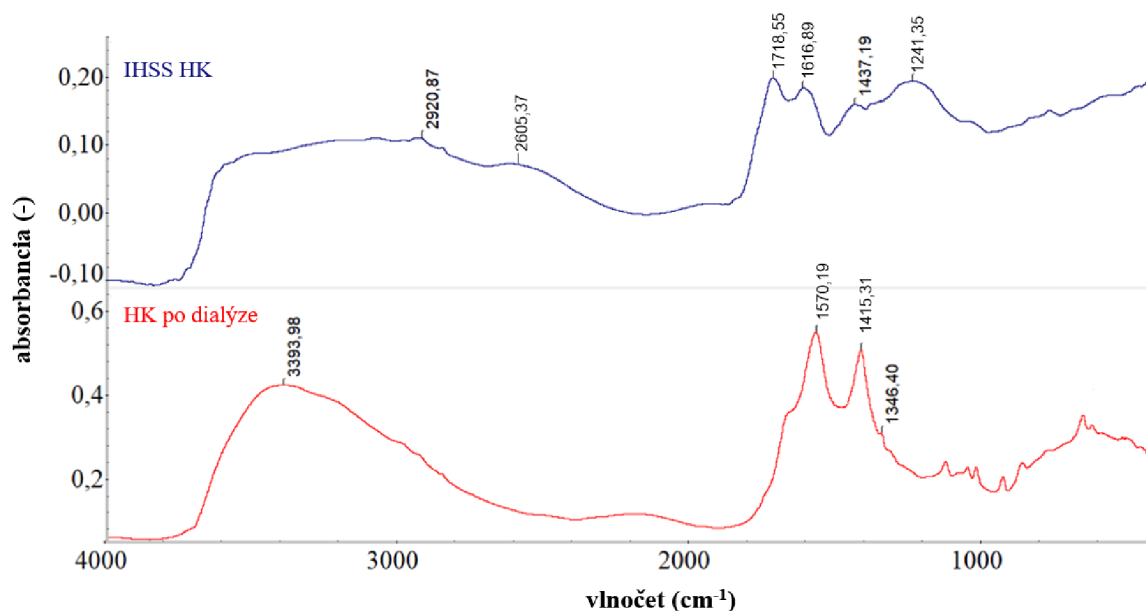
Porovnanie týchto spektier je zobrazené na Obr. 10. Prvou zmenou pozorovateľnou v spektre HK po rozpustení v NaOH oproti čistej HK je obľejší (užší) absorpčný pás O–H valenčných vibrácií viazaných vodíkovými väzbami v rozmedzí vlnočtu 3 600 – 2 900 cm^{-1} . Táto zmena môže byť spôsobená menším vplyvom vodíkových mostíkov po rozpustení humínovej kyseliny v hydroxide sodnom v dôsledku disociácie –COOH skupín na COO^- ióny, pričom táto disociácia je dokázaná v ďalších oblastiach spektra.

Napríklad pri vlnočte okolo 2600 cm^{-1} je v spektre humínovej kyseliny IHSS štandardu viditeľný absorpčný pás patriaci valenčným vibráciám O–H karboxylovej skupiny, viazanej vodíkovým mostíkom. V spektre humínovej kyseliny po dialýze už tento pás viditeľný nie je.

Ďalším dôkazom vzniku karboxylátov je absencia absorpčného pásu pri 1 718 cm^{-1} v spektre HK po dialýze. Tento pás prislúcha práve valenčným vibráciám C=O v karboxylových skupinách. V dôsledku vzniku solí sa namiesto tohto pásu objavujú dva nové – pri 1 570 cm^{-1} a 1 415 cm^{-1} , zodpovedajúce absorpcii karboxylátového iónu COO^- [60]. Vznik týchto intenzívnych pásov pravdepodobne spôsobil potlačenie píkov pri 1 616 cm^{-1} (patriaci vibrácii väzby C=C v aromatických štruktúrach) a 1 437 cm^{-1} (patriaci antisymetrickým C–H deformačným vibráciám alifatických skupín –CH₃ a –CH₂–), ktoré v spektre humínovej kyseliny po rozpustení v NaOH nie sú rozoznateľné.

V spektre HK po dialýze je taktiež viditeľný nový, málo intenzívny pik pri 1 346 cm^{-1} prislúchajúci symetrickým valenčným vibráciám COO^- skupiny.

Absorpčný pás v spektre IHSS HK pri vlnočte 1 241 cm^{-1} , ktorý patrí valenčným vibráciám C–O väzby a deformačným vibráciám O–H väzby v skupine –COOH, taktiež už nie je viditeľný v spektre slepej vzorky, čo znovu dokazuje rozpad karboxylových skupín. Vznik karboxylátov nastal pravdepodobne pri rozpustení HK v NaOH a reakcia humínovej kyseliny s hydroxidom podnietila vznik solí.



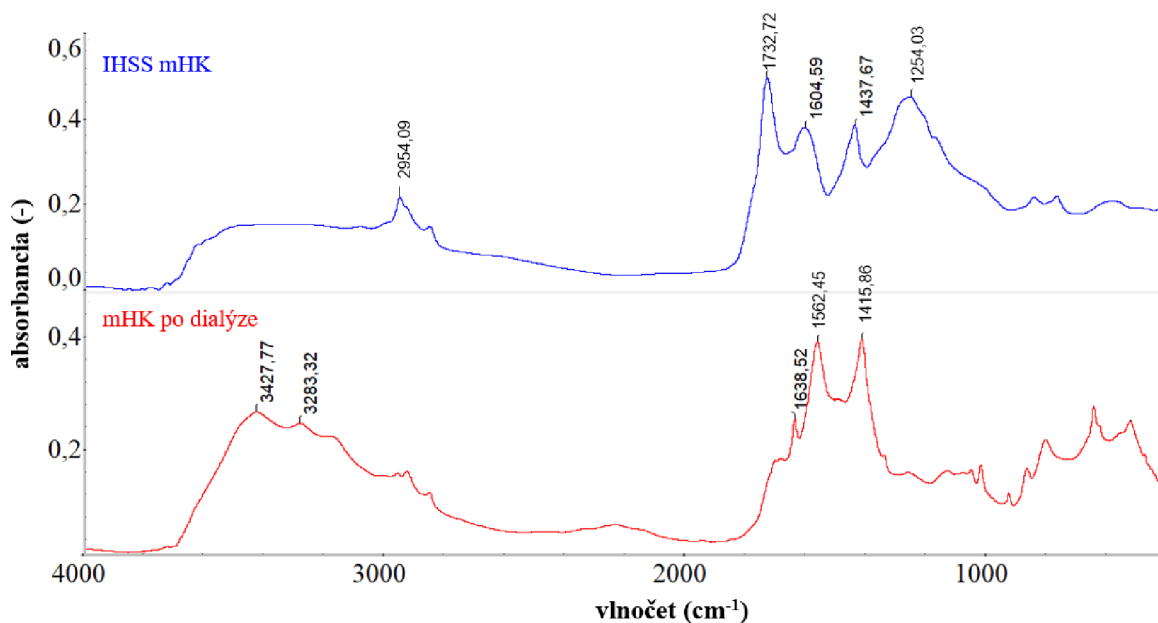
Obr. 10 Porovnanie spektier čistého IHSS štandardu humínovej kyseliny a HK po procese prípravy slepej vzorky

Porovnanie spektier metylovaných IHSS štandardov a vzoriek získaných po ich rozpustení v NaOH a následnej dialýze (Obr. 11) dalo prekvapivo podobné výsledky so spektrami nemetylovaných HK. Vznik karboxylátov bol očakávaný len u nemetylovaných HK, no taktiež v spektrách mHK sú viditeľné absorpčné pásy solí. To naznačuje neúplnú metyláciu HK alebo opätovnú demetyláciu po rozpustení mHK v hydroxide sodnom. Pre objasnenie presného mechanizmu a zistenie, v ktorom kroku prípravy vzorky došlo k zmene jej štruktúry by bolo dobré podrobiť túto interakciu ešte ďalšiemu štúdiu.

Jedným z výraznejších rozdielov oproti spektrám nemetylovaných humínových kyselín je niekoľko nových viditeľných pík v rozmedzí vlnočtu $3\,600 - 2\,900\text{ cm}^{-1}$. Absorpčný pás pri $3\,283\text{ cm}^{-1}$ by mohol prislúchať symetrickým valenčným vibráciám N–H väzieb v $-\text{NH}_2$ skupinách, no bežne v spektrách humínových kyselín nebýva viditeľný z dôvodu širokého pásu O–H skupín v dôsledku väzby týchto skupín intramolekulárnymi alebo intermolekulárnymi vodíkovými mostíkmi.

Ďalšia zmena bola zaznamenaná pri vlnočte $2\,954\text{ cm}^{-1}$ v ktorom je absorpcia vyvolaná vibráciou alifatických C–H väzieb. Dochádza k zníženiu intenzity tohto absorpčného pásu, pričom táto zmena je pravdepodobne dôsledkom čiastočnej demetylácie humínových kyselín a teda úbytku počtu C–H skupín v molekule.

V spektre mHK po dialýze je taktiež viditeľný úplne nový absorpčný pás pri $1\,638\text{ cm}^{-1}$. V spektrách IHSS štandardov bol tento pík pravdepodobne prekrytý intenzívnejšími absorpčnými pásmi v okolí $1\,732$ a $1\,604\text{ cm}^{-1}$ a nebol samostatne rozoznateľný. Poloha tohto absorpčného pásu by mohla zodpovedať vibráciám amidickej skupiny, pričom je pravdepodobné, že amidy sa v štruktúre humínových kyselín naozaj nachádzajú, no v dôsledku vodíkových mostíkov býva pík prislúchajúci tejto skupine zvyčajne rozšírenejší. Úzky tvar absorpčného pásu v analyzovanom spektre by mohol naznačovať, že sa jedná iba o kontamináciu spektra nežiaducou zložkou, ktorá by mohla pochádzať napríklad z dialyzačnej membrány. Pre vylúčenie tejto kontaminácie by bolo vhodné v budúcnosti zmerať aj spektrum samotnej membrány.



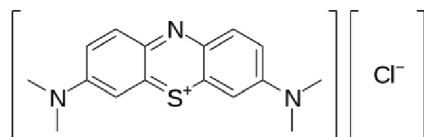
Obr. 11 Porovnanie spektier čistého metylovaného IHSS štandardu humínovej kyseliny a mHK po procese prípravy slepej vzorky

5.4 FTIR ANALÝZA KOMPLEXOV HUMÍNOVÝCH KYSELÍN S ORGANICKÝMI IÓNMÍ

5.4.1 SPEKTRÁ AKTÍVNYCH LÁTOK

5.4.1.1 METYLÉNOVÁ MODRÁ

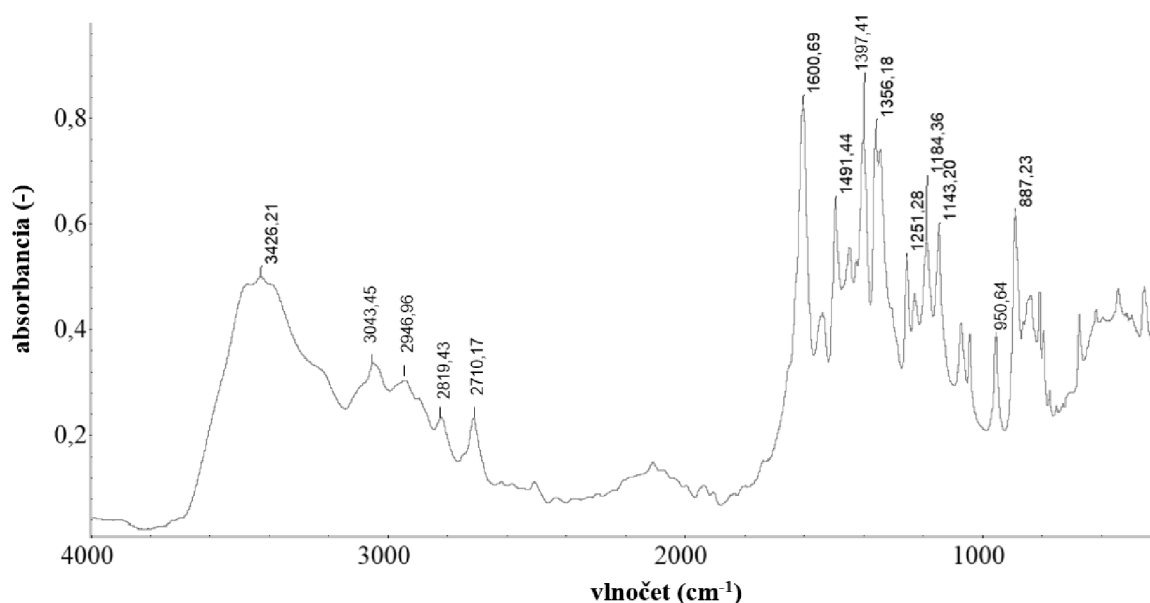
Metylénová modrá je heterocyklická aromatická zlúčenina. Na Obr. 12 je zobrazená jej štruktúra a Obr. 13 zobrazuje jej FTIR spektrum získané technikou DRIFTS. Interpretácia spektra bola prevedená na základe odbornej literatúry [62].



Obr. 12 Štruktúra metylénovej modrej [63]

Absorpčný pás v spektre MB v rozmedzí vlnočtu $3\,560 - 3\,170\text{ cm}^{-1}$ je asociovaný s vibráciami O–H skupín podieľajúcich sa na väzbách s atómami dusika heterocyklu metylénovej modrej a atómami dusika nenasýtenej dimetylamo skupiny pri tvorbe hydrátov. Pomerne široký absorpčný pás pri $3\,043\text{ cm}^{-1}$ prislúcha heterocyklickým C–H valenčným vibráciám. Symetrické a antisymetrické vibrácie $-\text{CH}_3$ skupín je možné nájsť pri $2\,946\text{ cm}^{-1}$ a $2\,893\text{ cm}^{-1}$. V oblasti $2\,819\text{ cm}^{-1}$ je možné pozorovať absorpciu vyvolanú valenčnou vibráciou väzby N–C v skupine $\text{N}-(\text{CH}_3)_2$. Pomerne intenzívny pík pri $2\,710\text{ cm}^{-1}$ patrí vibráciám $\text{N}(\text{CH}_3)_2$ väzieb, ktoré sa podieľajú na vodíkových mostíkoch.

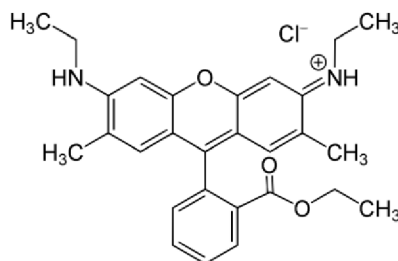
Najintenzívnejší absorpčný pás spektra pri $1\,600\text{ cm}^{-1}$ je vyvolaný vibráciou C=C a C=N väzieb v heterocykle molekuly. Pík napravo potom patrí vibráciám väzieb C–C a C–N v heterocykle. Absorpčné pásy pri vlnočtoch $1\,491$, $1\,444$, $1\,397$, $1\,250$, $1\,224$, $1\,184$, 887 , 833 a 803 cm^{-1} sú vyvolané deformačnými vibráciami rôznych typov väzby C–H. Valenčné vibrácie C–N a C=S⁺ väzieb sa prejavujú vo vlnočtoch $1\,356$ a $1\,340\text{ cm}^{-1}$ a vibrácie MB⁺ heterocyklu pri $1\,143$ a $1\,069\text{ cm}^{-1}$.



Obr. 13 FTIR spektrum metylénovej modrej získané technikou DRIFTS

5.4.1.2 RHODAMIN 6G

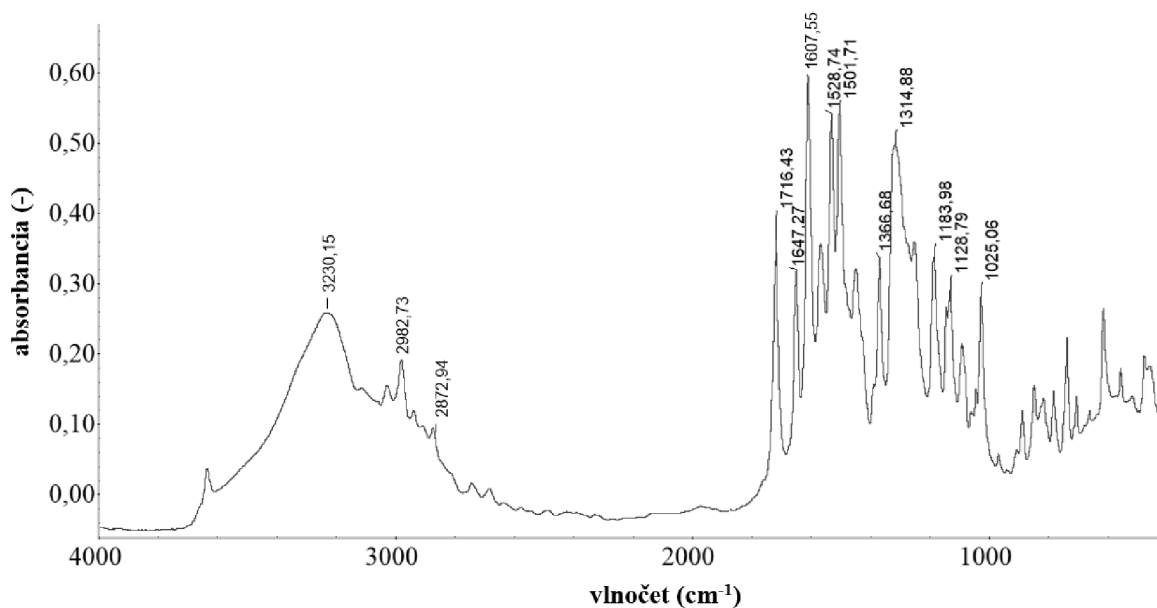
Ďalšou analyzovanou organickou látkou bol rhodamin 6G, ktorého štruktúru zobrazuje Obr. 14 a na Obr. 15 je možné vidieť jeho namerané FTIR spektrum, taktiež získané metódou DRIFTS. Interpretácia tohto spektra bola vypracovaná na základe práce [64].



Obr. 14 Štruktúra rhodaminu 6G [65]

V spektre R6G sa nachádza široký absorpčný pás pri vlnočte $3\,230\text{ cm}^{-1}$, kde absorbuje valenčná vibrácia N–H väzby. Tento pík je rozšírený vďaka vodíkovým mostíkom. Slabý absorpčný pás pri $3\,031\text{ cm}^{-1}$ patrí valenčným vibráciám aromatických C–H väzieb.

Pík pri $2\,982\text{ cm}^{-1}$ je vyvolaný asymetrickou valenčnou vibráciou C–CH₃ väzby a píky pri $2\,943$ a $2\,872\text{ cm}^{-1}$ sú vyvolané asymetrickými a symetrickými valenčnými vibráciami CH₂ väzieb alkylových reťazcov.



Obr. 15 FTIR spektrum rhodaminu 6G získané technikou DRIFTS

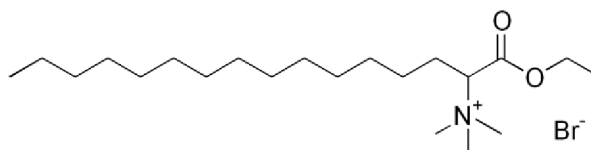
C=O valenčným vibráciám esterovej karbonylovej väzby prislúcha absorpčný pás pri $1\,716\text{ cm}^{-1}$. Napravo od neho je viditeľný pás nožnicových deformačných vibrácií N–H väzby. Vlnočty $1\,607$, $1\,565$, $1\,501$ a $1\,445\text{ cm}^{-1}$ patria C=C vibráciám kostry aromatického kruhu.

Rovinné deformačné vibrácie C–N väzby sa prejavujú v absorpčnom páse pri $1\,528\text{ cm}^{-1}$ a pás pri $1\,314\text{ cm}^{-1}$ potom patrí jej valenčným vibráciám. Deformačná vibrácia metylovej skupiny vyvoláva absorpciu vo vlnočte $1\,366\text{ cm}^{-1}$.

Vibrácie esterových väzieb sa prejavujú aj pri nižších vlnočtoch, ako napríklad pri $1\,249\text{ cm}^{-1}$, kde je absorpcia vyvolaná valenčnou vibráciou C–O väzby zahrňujúcej karbonylový uhlík. Vibrácie v oblasti $1\,150 - 1\,000\text{ cm}^{-1}$ sú pripisované rôznym typom jednoduchej C–O väzby.

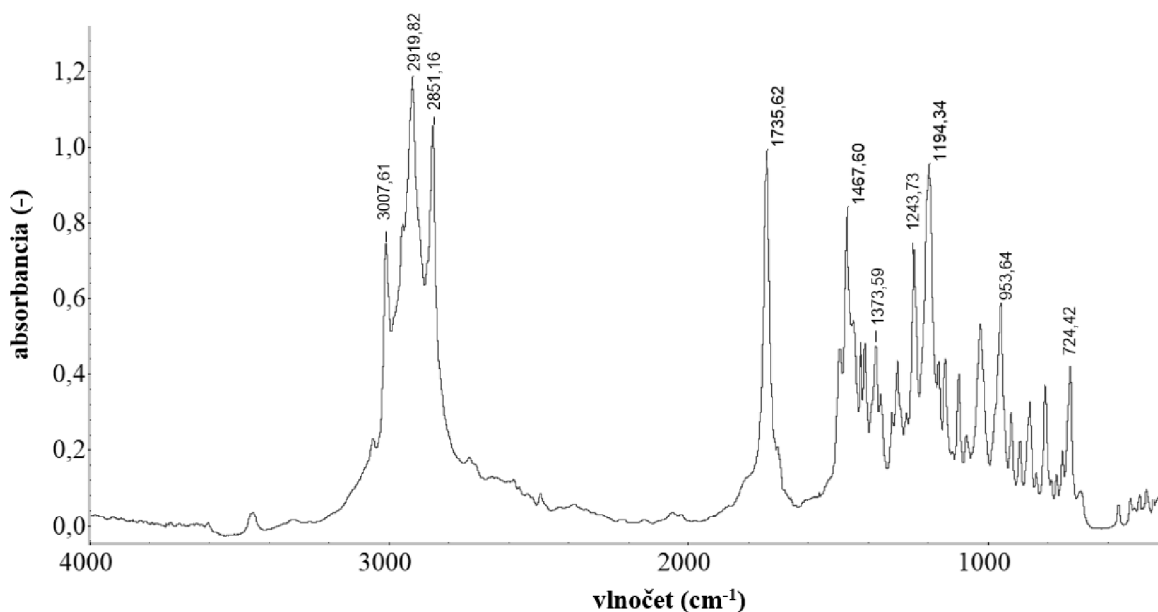
5.4.1.3 SEPTONEX

Septonex je kvartérna amóniová zlúčenina využívaná ako dezinfekčná látka a jej štruktúra je zobrazená na Obr. 16. Technikou DRIFTS bolo zmerané jej FTIR spektrum (Obr. 17). Analýza spektra v tejto kapitole bola vypracovaná s prihliadnutím k prácam [66, 67, 68]. V ľavej časti spektra sú viditeľné tri intenzívne píky. Prvý, s maximom vo vlnočte $3\,007\text{ cm}^{-1}$, patrí asymetrickým valenčným vibráciám $(\text{CH}_3)_3\text{N}^+$ skupiny. Absorpčné pásy pri $2\,919$ a $2\,851\text{ cm}^{-1}$ prislúchajú asymetrickým a symetrickým valenčným vibráciám CH_2 väzieb alkylových reťazcov.



Obr. 16 Štruktúra Septonexu [69]

Absorpčný pás vykazujúci veľmi silný signál s maximom pri $1\,735\text{ cm}^{-1}$ patrí valenčnej vibrácii C=O esterovej väzby. Príspevky esterovej väzby sú viditeľné aj pri vlnočtoch $1\,243\text{ cm}^{-1}$, $1\,194\text{ cm}^{-1}$ a $1\,025\text{ cm}^{-1}$, pričom absorpciu v týchto oblastiach vyvoláva C–O väzba.



Obr. 17 FTIR spektrum Septonexu získané technikou DRIFTS

K pomerne veľkej intenzite píku pri $1\,467\text{ cm}^{-1}$ prispieva niekoľko vibrácií, ako napríklad symetrické a asymetrické valenčné vibrácie väzby C–H zo skupiny $\text{CH}_3\text{-N}^+$ či deformačné vibrácie $-\text{CH}_3$ a $-\text{CH}_2-$ skupín. Absorpčný pás pri $1\,373\text{ cm}^{-1}$ je tvorený symetrickými deformačnými vibráciami C– CH_3 väzby.

Pri nízkych vlnočtoch sú rozoznateľné ešte dva pomerne intenzívne píky. Jeden z nich, pri 953 cm^{-1} , prislúcha asymetrickým valenčným vibráciám C– $\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$ väzby a deformačným asymetrickým vibráciám $(\text{CH}_3)_3\text{N}^+$ skupiny. Absorpciu pri 724 cm^{-1} vyvolávajú symetrické valenčné vibrácie C–N väzby.

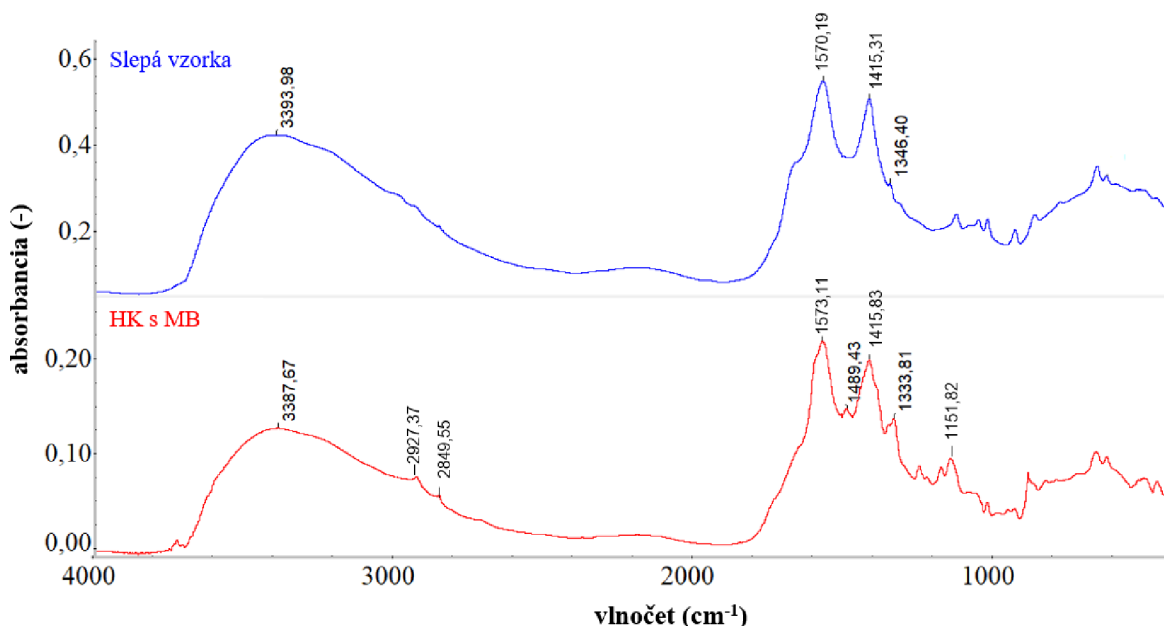
5.4.2 SPEKTRÁ KOMPLEXOV

V tejto kapitole sú rozobraté rozdiely v spektrách komplexov nemetylovaných alebo metylovaných humínových kyselín s modelovými organickými iónmi oproti spektrám pripravených slepých vzoriek. Postupne sú interpretované spektrá HK/mHK po interakcii s metylénovou modrou, rhodaminom 6G a Septonexom. V spektrách komplexov prevláda príspevok humínovej kyseliny oproti organickému iónu, no v každom spektre sú viditeľné aj pásy prislúchajúce aktívnym látkam.

Ako už bolo opísané v kapitole 4.3.2, komplexy HK/mHK s MB a R6G boli dialyzované cez dve membrány s rôznou hodnotou cut-off. Po dialýze cez 500Da membránu sa výsledné vzorky javili ako príliš zafarbené a bolo predpokladané, že vo vzorkách zostalo ešte priveľa voľných (nenaviazaných) atómov farbiva, a preto boli vzorky pripravené znovu a následne dialyzované cez membránu s cut-off hodnotou 1 kDa. Výsledné spektrá komplexov však prekvapivo ukazujú, že po dialýze cez 1kDa membránu bol v spektre značne zvýšený príspevok farbiva a naopak pásy prislúchajúce HK mali menšiu intenzitu, a preto je pravdepodobné, že cez membránu s väčšími pórmí prechádzali aj určité frakcie humínových látok. Pre analýzu interakcií medzi HK/mHK a organickými iónmi boli preto vybrané spektrá komplexov dialyzovaných cez membránu s menšími pórmí a spektrá získané dialýzou cez 1kDa membránu sú pre porovnanie uvedené v prílohách (Príloha 3 až Príloha 6).

5.4.2.1 HK/MHK A METYLÉNOVÁ MODRÁ

Na Obr. 18 je viditeľné porovnanie spektier slepej vzorky a komplexu HK s metylénovou modrou. Prvou viditeľnou zmenou v spektrách je mierny nárast píkov pri $2\,927\text{ cm}^{-1}$ a $2\,849\text{ cm}^{-1}$, ktoré zodpovedajú symetrickým a antisymetrickým valenčným vibráciám $-\text{CH}_3$ skupín, prípadne valenčným vibráciám väzby N-C v skupine N-(CH_3)₂ v metylénovej modrej.



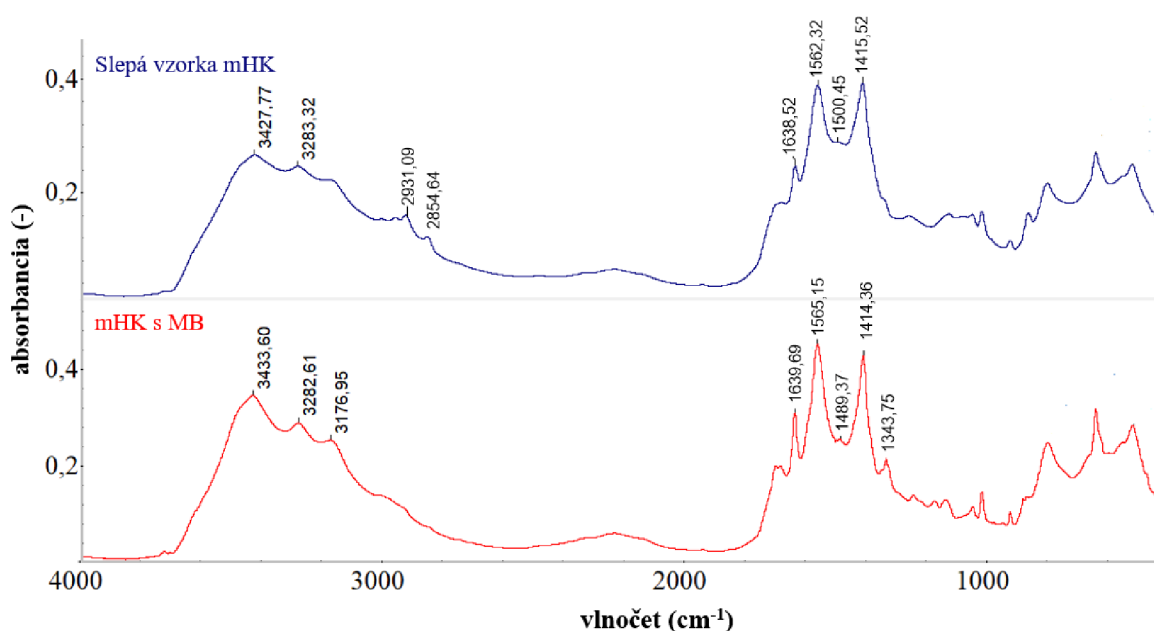
Obr. 18 Porovnanie spektra komplexu humínovej kyseliny s MB a spektra slepej vzorky

Absorpčné pásy pri $1\,570$ a $1\,415\text{ cm}^{-1}$, ktoré zodpovedajú absorpcii karboxylátového iónu $-\text{COO}^-$, na prvý pohľad po interakcii s MB nevykazujú žiadne výraznejšie zmeny. Pri vlnócte $1\,600\text{ cm}^{-1}$ je však viditeľný náznak nového absorpčného pásu valenčných vibrácií C=C a C=N väzieb v heterocykle metylénovej modrej.

Nové píky sú viditeľné napríklad pri $1\,489\text{ cm}^{-1}$ (vibrácie C–C a C–N väzieb v heterocykle), pri $1\,335\text{ cm}^{-1}$ (C–N a C=S⁺ valenčné vibrácie heterocyklu MB) a pri $1\,151\text{ cm}^{-1}$ (C–N a C–S–C vibrácie MB⁺ v heterocykle). Nárast absorpčných pásov v oblasti $1\,253$ a $1\,177\text{ cm}^{-1}$ by mohol byť pripísaný deformačným vibráciám rôznych typov C–H väzby.

Spektrum komplexu metylovanej HK s MB (Obr. 19) na prvý pohľad vykazuje rovnaké znaky ako toto spektrum pri použití nemetylovanej kyseliny, ale príspevok absorpčných pásov prislúchajúcich metylénovej modrej je menší. Najvýraznejšou zmenou je nárast píky pri vlnócte $1\,639\text{ cm}^{-1}$, ktorý sa u komplexu s nemetylovanou HK vôbec nenachádzal. Tento absorpčný pás pravdepodobne patrí amidickým skupinám, no ako už bolo bližšie opísané v kapitole 5.3, môže ísť aj o určité kontaminujúce zložky.

Naopak, malé píky pri $2\,927$ a $2\,857\text{ cm}^{-1}$ svoju intenzitu znížili ako oproti spektru metylovanej slepej vzorky, tak oproti komplexu HK s MB. To značí zníženie počtu –CH₃ skupín v komplexe.

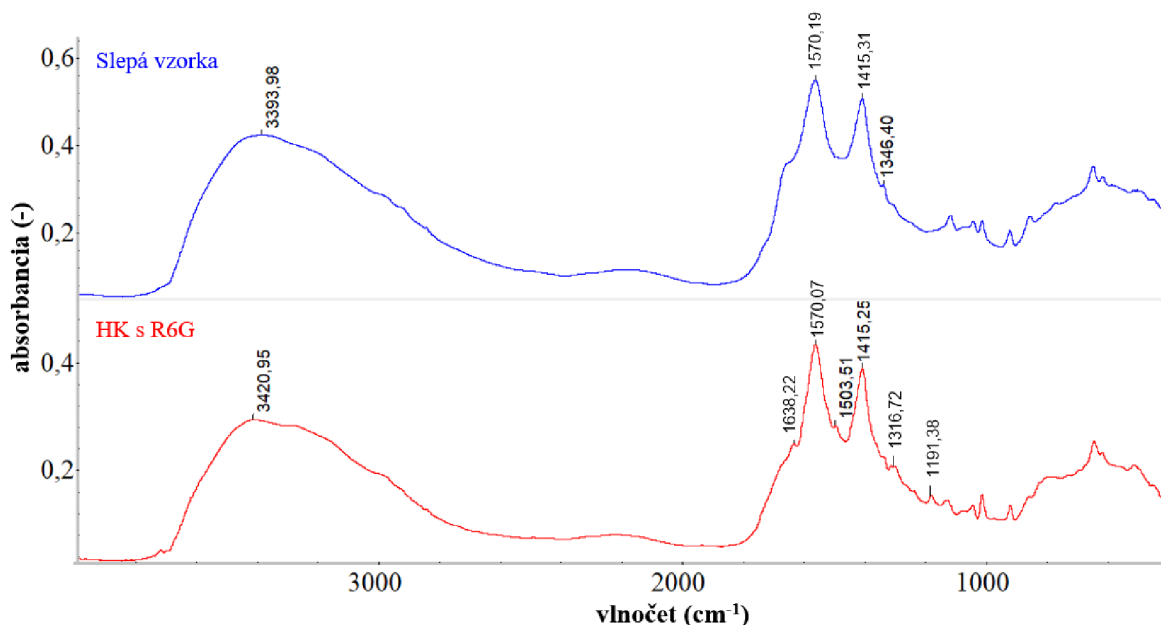


Obr. 19 Porovnanie spektra komplexu metylovanej humínovej kyseliny s MB a spektra slepej vzorky mHK

5.4.2.2 HK/MHK A RHODAMIN 6G

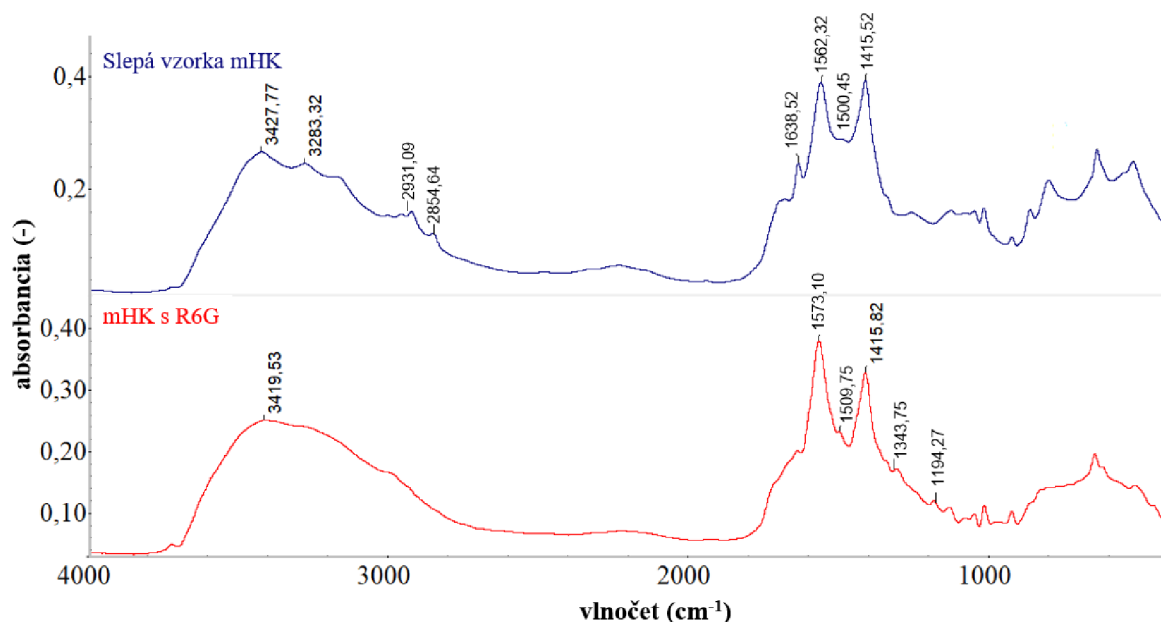
Podobne ako pri komplexoch s metylénovou modrou, aj v spektrách komplexov HK s R6G prevláda príspevok humínovej látky a pásy prislúchajúce farbivu sú pomerne malej intenzity. Porovnanie spektra tohto komplexu so slepou vzorkou je na Obr. 20.

Pri $1\,503\text{ cm}^{-1}$ je viditeľný nárast absorpčného pásu, ktorý patrí rovinným deformačným vibráciám C–N skupiny. Mierne vyšší pík pri $1\,316\text{ cm}^{-1}$ je pripísaný valenčným vibráciám C–N skupiny z rhodaminu 6G. Zvýšená intenzita absorpčného pásu pri $1\,191\text{ cm}^{-1}$ by mohla byť spôsobená valenčnými vibráciami C–O väzby esterovej skupiny.



Obr. 20 Porovnanie spektra komplexu humínovej kyseliny s R6G a spektra slepej vzorky

V spektrách metylovaných humínových kyselín je zaznamenaných niekoľko zmien (Obr. 21). V oblasti vlnôčtu $3\ 600 - 3\ 000\ \text{cm}^{-1}$ zanikajú jednotlivé píky a je viditeľný jeden obľý a široký absorpčný pás. Za tento jav sú zvyčajne zodpovedné silné vodíkové väzby v molekule, čo by mohlo značiť, že v komplexe mHK s R6G vzniklo niekoľko nových vodíkových mostíkov. Podobne ako pri komplexe s MB, intenzita píkov pri $2\ 931\ \text{cm}^{-1}$ a $2\ 854\ \text{cm}^{-1}$ je v komplexe oproti slepej vzorke znížená, čo by znovu mohlo dokazovať úbytok $-\text{CH}_3$ skupín v molekule.



Obr. 21 Porovnanie spektra komplexu metylovanej humínovej kyseliny s R6G a spektra slepej vzorky mHK

Taktiež absorpčný pás pri $1\ 638\ \text{cm}^{-1}$ má v spektre komplexu značne nižšiu intenzitu, čo je opačný trend oproti komplexu HK s R6G, v ktorom bola intenzita tohto pásu naopak mierne zvýšená. Podobný trend ako pri komplexe nemetylovaných HK s rhodaminom 6G je potom viditeľný pri

1 503, 1 314 a 1 194 cm^{-1} . Výraznejšou zmenou oproti nemetylovanému komplexu je fakt, že pik slepej vzorky pri 1 562 cm^{-1} je v komplexe mHK s R6G posunutý k vyšším vlnočtom, a to konkrétne k 1 573 cm^{-1} .

5.4.2.3 HK/MHK A SEPTONEX

Zo všetkých analyzovaných komplexov humínových kyselín s organickými iónmi je práve v komplexoch so Septonexom najjasnejšie vidieť príspevok aktívnej látky v spektrách. Porovnanie spektra slepej vzorky a spektra komplexu HK so Septonexom je zobrazené na Obr. 22.

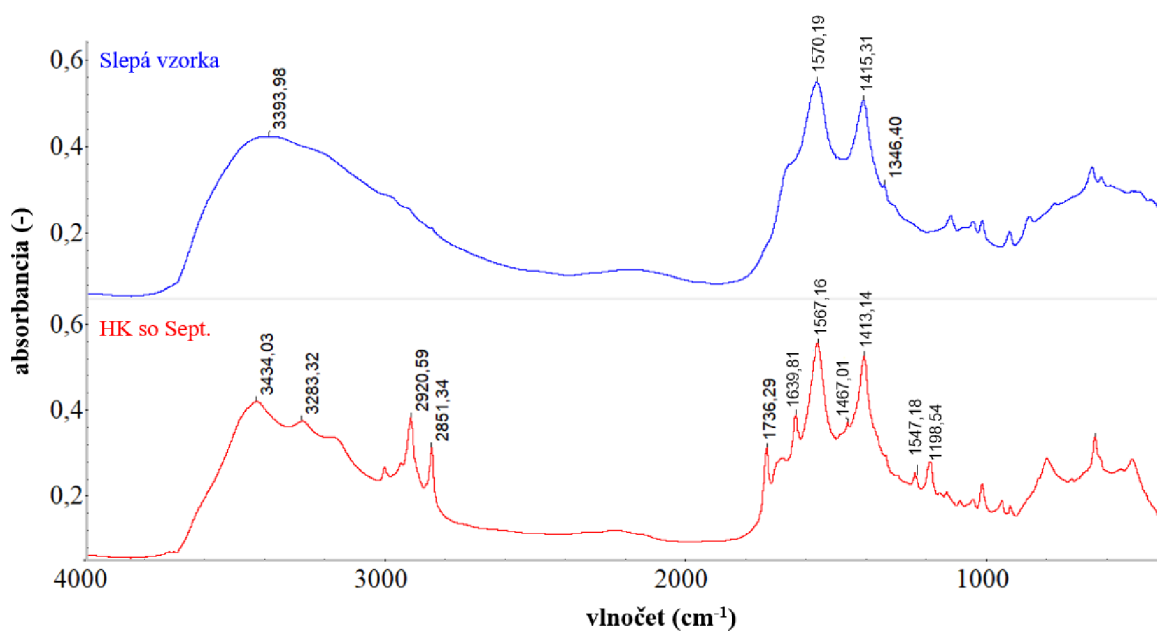
Hneď pri vysokých vlnových dĺžkach sú viditeľné výrazné zmeny. V oblasti vlnočtu 3 600 – 3 100 cm^{-1} sa v komplexe objavili nové píky a celý široký absorpčný pás je menej zaoblený. Tento jav by mohol byť následkom zníženého počtu vodíkových mostíkov v molekule komplexu.

V oblasti okolo 3 000 – 2 800 cm^{-1} sú v komplexe tri nové absorpčné pásy patriace Septonexu. Absorpcia pri 3 007 cm^{-1} je vyvolaná asymetrickými valenčnými vibráciami $(\text{CH}_3)_3\text{N}^+$ skupiny a pri 2 920 a 2 851 cm^{-1} je vyvolaná asymetrickými a symetrickými valenčnými vibráciami CH_2 väzieb alkylových reťazcov Septonexu.

V komplexe je spozorovaný nový absorpčný pás aj pri vlnočte 1 736 cm^{-1} , ktorý patrí valenčným vibráciám $\text{C}=\text{O}$ esterovej skupiny Septonexu. Príspevky esterovej skupiny sú viditeľné aj pri 1 247 a 1 198 cm^{-1} , kde sú absorpčné pásy vyvolané valenčnou vibráciou $\text{C}-\text{O}$ väzieb.

Zaujímavou zmenou je vznik nového absorpčného pásu pri 1 639 cm^{-1} , ktorý sa v FTIR spektre čistého Septonexu vôbec nenachádza. Ako už bolo diskutované v predchádzajúcich kapitolách, mohlo by sa jednať iba o absorpčný pás určitej kontaminujúcej zložky.

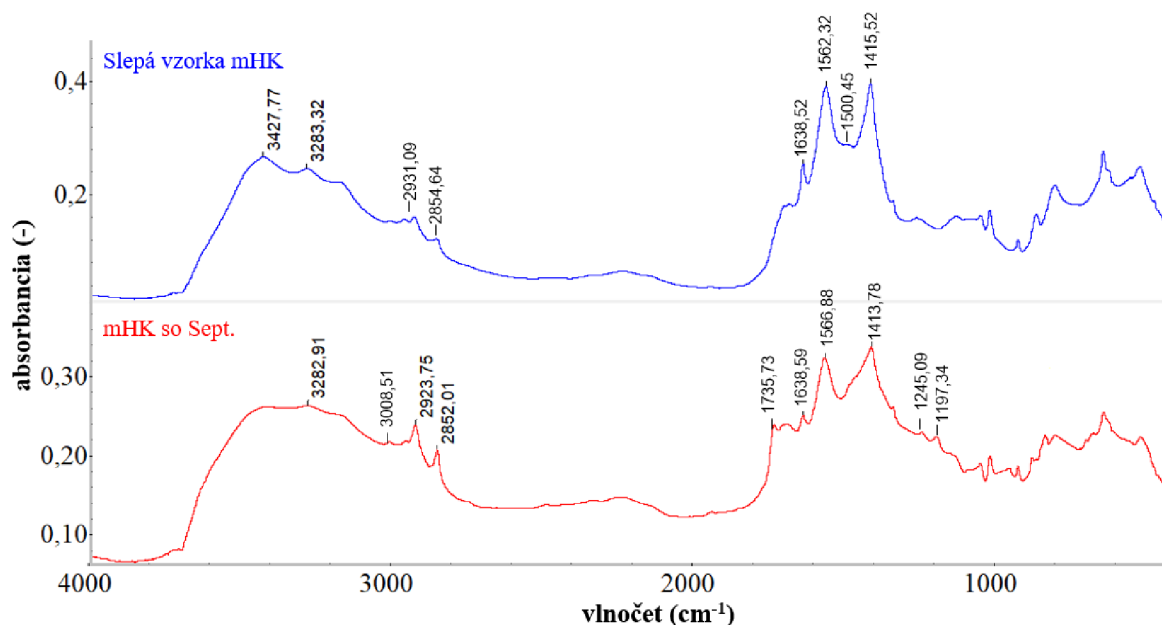
Absorpčný pás v oblasti 1 467 cm^{-1} s malou intenzitou pochádza pravdepodobne zo symetrických a asymetrických valenčných a deformačných vibrácií $\text{C}-\text{H}$ väzby zo skupiny CH_3-N^+ a $-\text{CH}_2-$ skupín.



Obr. 22 Porovnanie spektra komplexu humínovej kyseliny so Septonexom a spektra slepej vzorky

Metylovaný komplex vykazuje podobné výsledky ako nemetylovaný, s niekoľkými rozdielmi (Obr. 23). Prvá pozorovateľná zmena je, že oproti komplexu nemetylovanej humínovej kyseliny so Septonexom je absorpčný pás v oblasti $3\ 600 - 3\ 100\ \text{cm}^{-1}$ naopak zaoblenejší ako v prípade slepej vzorky a jednotlivé píky už nie je možné jednoznačne rozlíšiť. Tento trend je podobný ako pri komplexe mHK s R6G.

Ďalšou zmenou oproti nemetylovanému komplexu je zníženie intenzity absorpčného pásu pri $1\ 638\ \text{cm}^{-1}$. Ostatné charakteristické znaky spektra komplexu mHK so Septonexom sú zhodné so spektrom nemetylovaného komplexu.

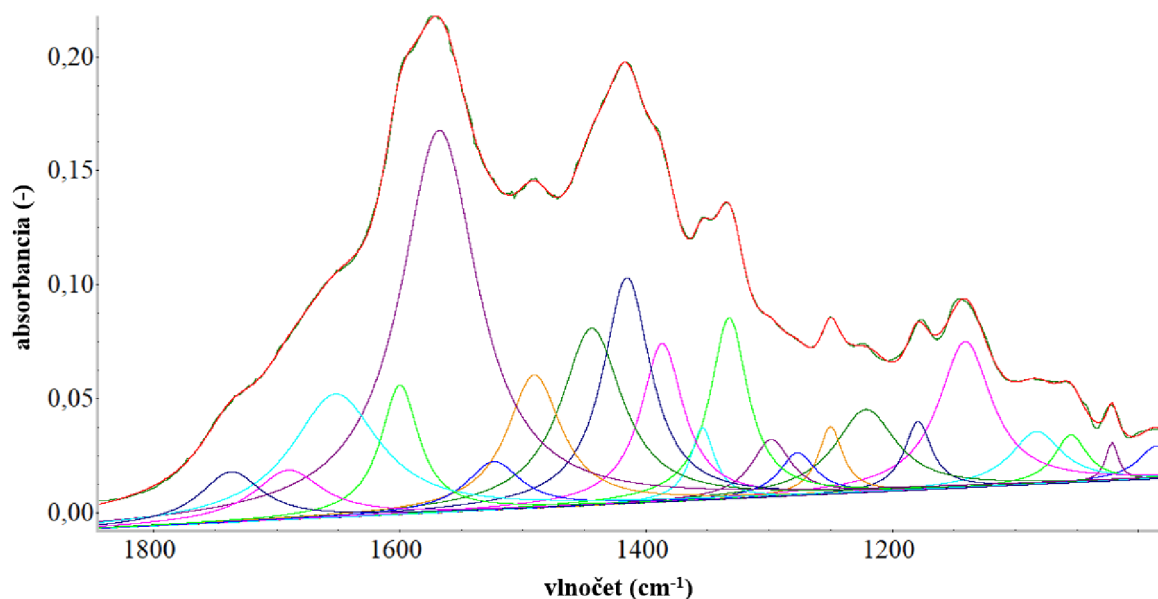


Obr. 23 Porovnanie spektra komplexu metylovanej humínovej kyseliny so Septonexom a spektra slepej vzorky mHK

5.5 POKROČILÁ ANALÝZA FTIR SPEKTIER POMOCOU DEKONVOLÚCIE

FTIR spektrá sú často náročné na interpretáciu. Najmä keď obsahujú veľký počet komponentov, jednotlivé absorpčné pásy sa často prekrývajú a je veľmi náročné ich individuálne rozoznať. Pomocou dekonvolúcie je možné získať presnú pozíciu jednotlivých absorpčných pásov a taktiež detailnejšie informácie o ich intenzite (výška, plocha pásu). Táto metóda bola aplikovaná na získané spektrá humínových kyselín a ich komplexov s organickými iónmi pre nadobudnutie presnejších dát o konkrétnych interakciách medzi týmito látkami. Úseky spektier v rozmedzí vlnočtu približne $1\ 900 - 1\ 000\ \text{cm}^{-1}$ boli podrobené tejto analýze v programe OMNIC pomocou funkcie Peak Resolve. Ukážka takto získaného spektra je na Obr. 24.

Pre získanie detailnejších informácií o interakciách v spektrách komplexov boli sledované hlavne posuny a zmeny intenzity (relatívnej plochy) jednotlivých identifikovaných a dekonvolúciou separovaných absorpčných pásov. Tabuľky zobrazujúce tieto zmeny sú obsiahnuté v prílohách. Sú v nich zobrazené iba nájdené píky s dostatočne veľkou intenzitou pre ovplyvnenie interakcie, nie sú v nich teda uvedené všetky píky nájdené pomocou tejto funkcie.



Obr. 24 Spektrum komplexu HK s MB po aplikovaní funkcie Peak Resolve

Najvýraznejšie posuny absorpčných pásov v spektrách HK a MB (Príloha 7) boli zaznamenané pri vlnočtoch 1 397, 1 538 a 1 669 cm^{-1} . Pás pri 1 397 cm^{-1} bol po interakcii posunutý o 11,1 cm^{-1} k nižším vlnočtom, pričom pravdepodobne prislúcha rôznym typom C–H väzby v metylénovej modrej. Zaujímavým posunom je posun pásu patriaceho C–C a C–N väzbám v heterocykle MB o 15,7 cm^{-1} k nižším vlnočtom. Mohol by naznačovať zapojenie heterocyklu v interakciách s humínovými kyselinami. Výrazný posun o 20,7 cm^{-1} k vyšším vlnočtom bol zaznamenaný aj pri vlnočtoch zodpovedajúcich C=O väzbám amidov, chinónov alebo konjugovaných ketónov humínových kyselín, pričom pri tomto páse bol zaregistrovaný aj pomerne značný pokles jeho intenzity. Poklesy intenzity vykazovali aj pásy prislúchajúce absorpcii COO^- iónov pri 1 572 cm^{-1} a vibráciám C=C a C=N väzieb v heterocykle MB pri 1 601 cm^{-1} . Práve na tieto väzby by bolo vhodné v budúcnosti zamerať podrobnejšie štúdie a zistiť presnejší mechanizmus ich interakcií.

U komplexov metylovaných HK s MB (Príloha 8) naopak nie sú viditeľné žiadne výrazné zmeny v pikoch zodpovedajúcich COO^- iónom. Tento jav by mohol naznačovať väčšiu dôležitosť týchto skupín v komplexoch nemodifikovaných HK. Pokles intenzity pásu pri 1 601 cm^{-1} C=C a C=N väzieb heterocyklu znovu potvrdzuje zapojenie heterocyklu farbiva v interakciách s humínovými kyselinami.

V spektrách komplexov HK s R6G (Príloha 9) boli výrazné posuny absorpčných pásov zaregistrované pri vlnočtoch zodpovedajúcich C=O väzbe v esterovej skupine rhodaminu 6G alebo v aromatických ketónoch humínových kyselín. Tieto píky boli posunuté o približne 12 cm^{-1} k vyšším vlnočtom a zdôrazňujú podiel karbonylovej väzby na interakciách HK s R6G. Najvýraznejšia zmena polohy píky však bola zaznamenaná pri 1 248 cm^{-1} a je pripisovaná fenolickým C–OH väzbám. Fenoly by teda taktiež mohli hrať dôležitú rolu pri tvorbe komplexov HK s R6G. Pokles intenzity pásu prislúchajúceho C–N väzbám rhodaminu 6G tiež naznačuje zapojenie týchto väzieb v sledovanej interakcii.

Aj v metylovaných komplexoch (Príloha 10) sú spozorované zmeny v rovnakých absorpčných pásoch ako u nemodifikovaných HK. To potvrdzuje dôležitosť týchto väzieb v interakcii medzi rôznymi HK a rhodaminom 6G a zároveň naznačuje, že metylácia nemá na tieto interakcie veľký vplyv. Na druhej strane je nutné podotknúť, že po rozpustení HK v NaOH bola zaznamenaná

čiasočná demetylácia HK a aj to môže spôsobiť, že medzi komplexmi s HK a mHK sú len nevelké rozdiely.

V komplexoch so Septonexom boli podobné zmeny sledované u nemetylovaných (Príloha 11) aj metylovaných (Príloha 12) komplexov. V oboch prípadoch bol zaznamenaný pokles intenzity pásov pri 1 566 a 1 738 cm^{-1} prislúchajúcich vibráciám COO^- iónov HK a C=O väzbám esterov Septonexu, pričom neboli zaregistrované výrazné posuny týchto absorpčných pásov. U nemetylovaného komplexu je evidovaný posun píku C=O väzieb v aromatických ketónoch HK o 11,5 cm^{-1} k vyšším vlnčtom. Tieto zmeny potvrdzujú významnosť karbonylových väzieb v interakciách humínových kyselín s organickými iónmi, ktorá bola sledovaná už v predchádzajúcich komplexoch.

Zaujímavosťou je zaznamenanie úplne nových píkov pri 1 521 cm^{-1} (valenčné vibrácie aromatických C=C väzieb), 1 602 cm^{-1} (aromatické valenčné vibrácie C=C, C=O v konjugovaných ketónoch) a pri 1 641 cm^{-1} (valenčné vibrácie C=O v amidickej skupine alebo C=O chinónov; sledovaný len v slepej vzorke mHK), ktoré neboli zaznamenané ani v spektrách čistých slepých vzoriek, ani v spektre čistého Septonexu [60, 61]. Nové absorpčné pásy zvyčajne naznačujú vznik nových kovalentných väzieb, čo v tomto prípade nebolo očakávané a pôvod týchto píkov by bolo potrebné ešte bližšie preskúmať v budúcich štúdiách. Keďže sa však javí, že vlnčty týchto pásov patria vibráciám aromatických väzieb, je možné, že do interakcie zapojené aromatické štruktúry v dôsledku interakcie so Septonexom zosilňujú svoju vibráciu.

6 ZÁVER

Táto bakalárska práca bola zameraná na využitie infračervenej spektroskopie pri štúdiu interakcií humínových látok s organickými iónmi. Prvým cieľom tejto práce bolo spracovanie literárnej rešerše na tému metód štúdia štruktúrnych aspektov interakcie humínových látok s xenobiotikami a organickými iónmi. Bolo zistené, že najčastejšie využívanými metódami sú napríklad fluorescenčná spektrometria, potenciometrické merania, difúzne experimenty alebo infračervená spektroskopia. Práve infračervená spektroskopia sa javí ako vhodná metóda pre štúdium konkrétnych funkčných skupín zapojených v tejto interakcii a hlavným cieľom tejto práce bolo overenie jej využiteľnosti.

Za modelové humínové látky boli zvolené štandardy humínových kyselín IHSS Leonardite v nemodifikovanej a metylovej forme. Za zástupcov organických iónov boli zvolené farbivá metylénová modrá a rhodamin 6G a dezinfekčná látka Septonex. Vplyv metylácie na štruktúru HK bol pre porovnanie sledovaný aj na HK/mHK izolovaných z černoze alebo z lignitu.

Ako prvé boli prevedené optimalizačné merania pre výber vhodnej FTIR techniky. Bolo zistené, že ATR technika s kryštálom z technického diamantu je najjednoduchšia na použitie a prípravu vzorky, no spektrá získané touto technikou sú čiastočne zdeformované a nemajú dostatočné rozlíšenie. Preto boli všetky dôležité analýzy prevedené na spektrách získaných pomocou techniky DRIFTS, ktoré vykazovali najlepšie vlastnosti.

Ďalej bol študovaný vplyv metylácie na štruktúru HK. V spektrách mHK bola metylácia dokázaná najmä zvýšením intenzity absorpčných pásov prislúchajúcich alifatickým C–H väzbám a esterom a naopak absenciou pásov vyvolaných vibráciami karboxylových skupín.

Analýza spektier komplexov humínových kyselín s organickými iónmi dokázala využiteľnosť tejto metódy pri štúdiu ich interakcií. Bolo zistené, že získané absorpčné spektrá nie sú iba súčtom spektier ich čistých zložiek, ale boli zaznamenané aj posuny a zmeny intenzity jednotlivých absorpčných pásov. V spektre každého komplexu prevláda príspevok humínovej látky nad príspevkom organického iónu. Výsledky naznačujú, že dôležitú úlohu by v komplexoch mohli hrať napríklad karboxylové skupiny alebo aromatické štruktúry. Taktiež je pravdepodobné, že v interakcii humínových kyselín s metylénovou modrou je do veľkej miery zapojený heterocyklus farbiva. Získané výsledky však nedávajú jednoznačné odpovede na štruktúrne otázky a v budúcnosti bude potrebné vykonať podrobnejšie analýzy pre ich vysvetlenie. Keďže boli na základe prevedených experimentov nájdené funkčné skupiny, ktoré by sa na interakcii mohli podieľať, v nadväzujúcej práci by mohli byť vybrané modelové nízkomolekulárne komponenty, ktoré sa v štruktúre HK vyskytujú a obsahujú tieto skupiny. Následná FTIR analýza komplexov týchto komponentov s modelovými aktívnymi látkami (Septonex, MB, R6G) by potom mohla potvrdiť alebo vyvrátiť zapojenie sledovaných funkčných skupín v danej interakcii.

7 ZOZNAM POUŽITÝCH ZDROJOV

- [1] MCMURRY, John. Organická chemie. Brno: Vysoké učení technické v Brně, nakladatelství VUTIUM, 2015. Překlady vysokoškolských učebnic. ISBN 978-80-7080-930-3.
- [2] MURRAY, Robert K. Harperova ilustrovaná biochemie. 5. české vyd., 1. v nakl. Galén. Praha: Galén, c2012. Překlady vysokoškolských učebnic. ISBN 978-80-7262-907-7.
- [3] MURRAY, Robert K. Technický slovník naučný. 5. české vyd., 1. v nakl. Galén. Praha: Encyklopedický dům, 2005. Překlady vysokoškolských učebnic. ISBN 80-860-4426-2.
- [4] TÁBORSKÁ, Eva a Jaromír SLÁMA. Medical chemistry. 5. české vyd., 1. v nakl. Galén. Brno: Masarykova univerzita, 2006. Překlady vysokoškolských učebnic. ISBN 80-210-4091-2.
- [5] ATKINS, P. W. a Julio DE PAULA. *Fyzikální chemie*. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 2013. ISBN 978-80-7080-830-6.
- [6] CHEN, Tao, Meixiu LI a Jingquan LIU. *Π - π Stacking Interaction: A Nondestructive and Facile Means in Material Engineering for Bioapplications*. 2018, **18**(5), 2765-2783. ISSN 1528-7483. Dostupné z: doi:10.1021/acs.cgd.7b01503
- [7] Illustrated Glossary of Organic Chemistry. *UCLA Department of Chemistry & Biochemistry* [online]. Los Angeles: University of California, 2017 [cit. 2020-12-27]. Dostupné z: http://www.chem.ucla.edu/~harding/IGOC/A/aromatic_aromatic_interaction.html
- [8] Pi-Stacking (chemistry). *Wikipedia* [online]. 2021 [cit. 2021-6-30]. Dostupné z: [https://en.wikipedia.org/wiki/Pi-Stacking_\(chemistry\)](https://en.wikipedia.org/wiki/Pi-Stacking_(chemistry))
- [9] What Are Humic Substances. *International Humic Substances Society* [online]. Colorado: IHSS, 2019 [cit. 2020-05-17]. Dostupné z: <http://humic-substances.org/what-are-humic-substances-2/>
- [10] SÁIZ-JIMÉNEZ, Cesáreo. *Origin and chemical nature of soil organic matter* [online]. Delft, 1988 [cit. 2020-05-17]. Dostupné z: <http://hdl.handle.net/10261/86703>. Dizertační práce. Technische Universiteit Delft.
- [11] CHOUDHRY, Ghulam Ghaus. *Humic Substances: Structural, photophysical, photochemical and free radical aspects and interactions with environmental chemicals*. United Kingdom: Gordon and Breach Science Publishers, 1984. ISBN 0-677-06440-3.
- [12] PICCOLO, Alessandro. The supramolecular structure of humic substances. *Soil Science* [online]. 2001, **166**(11), 810-832 [cit. 2020-05-17]. Dostupné z: https://journals.lww.com/soilsci/Abstract/2001/11000/THE_SUPRAMOLECULAR_STRUCTURE_OF_HUMIC_SUBSTANCES.7.aspx
- [13] SMILEK, J., P. SEDLÁČEK, M. KALINA a M. KLUČÁKOVÁ. On the role of humic acids' carboxyl groups in the binding of charged organic compounds. *Chemosphere*. 2015, r. 138, s. 503–510. ISSN 0045-6535.
- [14] STEVENSON, F. J. *Humus chemistry: genesis, composition, reactions*. 2nd ed. New York: Wiley, 1994. ISBN 978-0-471-59474-1.
- [15] SKOKANOVÁ, Marianna a Katarína DERCOVÁ. Humínové kyseliny. Pôvod a štruktúra. *Chemické listy* [online]. 2008, **102**(4), 262-268 [cit. 2020-05-19]. Dostupné z: <http://www.chemicke-listy.cz/ojs3/index.php/chemicke-listy/article/view/1662/1662>

- [16] KLEINHEMPEL, D. Ein Beitrag zur Theorie des Huminstoffzustandes. *Albrecht-Thaer-Archiv*. 1970, **14**(1), 3-14.
- [17] VESELÁ, Lenka, Martin KUBAL, Josef KOZLER a Petra INNEMANOVÁ. Struktura a vlastnosti přírodních huminových látek typu oxihumolitu. *Chemické listy* [online]. 2005, **99**(10), 711-717 [cit. 2020-05-26]. Dostupné z: <http://www.chemicke-listy.cz/ojs3/index.php/chemicke-listy/article/view/1987/1987>
- [18] SENESI, Nicola. Binding mechanisms of pesticides to soil humic substances. *The Science of the Total Environment*. Amsterdam: Elsevier Science Publishers, 1992, (123/124), 63-76.
- [19] PERMINOVA, Irina a Kirk HATFIELD. Remediation Chemistry of Humic Substances: Theory and Implications for Technology. *Use of Humic Substances to Remediate Polluted Environments: from Theory to Practice*. 2005, (01), 3-36.
- [20] TAN, Kim H. *Humic Matter in Soil and the Environment: Principles and Controversies*. New York: Marcel Dekker, 2003. ISBN 0-8247-4272-9.
- [21] BOLLAG, Jean-Marc, Carla J. MYERS a Robert D. MINARD. Biological and chemical interactions of pesticides with soil organic matter. *The Science of the Total Environment*. Amsterdam: Elsevier Science Publishers, 1992, (123/124), 205-217.
- [22] SULLIVAN J.D. a G.T. FELBECK. A study of the interaction of s-triazine herbicides with humic acids from three different soils. *Soil Sci*. 1968, (106), 42-50.
- [23] LI G.C. a G.T. FELBECK, Jr. A study of the mechanism of atrazine adsorption by humic acid from muck soil. *Soil Sci*. 1972, (113), 430-433.
- [24] KHAN S.U. Interaction of humic acid with chlorinated phenoxyacetic and benzoic acids. *Environ. Lett*. 1973, (4), 141-148.
- [25] MURRAY, Robert K. Technický slovník naučný. 5. české vyd., 1. v nakl. Galén. Praha: Encyklopedický dům, 2005. Překlady vysokoškolských učebnic. ISBN 80-860-4426-2.
- [26] FTIR Spectroscopy. *METTLER TOLEDO* [online]. [cit. 2020-06-19]. Dostupné z: https://www.mt.com/gb/en/home/products/L1_AutochemProducts/ReactIR/ftir-spectroscopy.html
- [27] Infračervená spektroskopie. *VŠCHT* [online]. Praha [cit. 2020-06-19]. Dostupné z: <http://old.vscht.cz/lms/Zverze/Infrared.htm>
- [28] Infrared Spectroscopy: Identifying Functional Groups. *Oregon State University* [online]. Oregon State University, 2019 [cit. 2020-06-19]. Dostupné z: <https://sites.science.oregonstate.edu/~gablek/CH335/Chapter10/IR.htm>
- [29] Infračervená spektroskopie. *Katedra fyzikální chemie Univerzity Palackého v Olomouci* [online]. Olomouc, 2005 [cit. 2020-06-19]. Dostupné z: https://fch.upol.cz/skripta/zfcm/ir/ir_teorie.htm
- [30] BOGUTA, Patrycja a Zofia SOKOŁOWSKA. Interactions of humic acids with metals. *Acta Agroph. Monogr*. 2013, **2**, 1-113. ISSN 2084-3429.
- [31] FTIR Sample Techniques: Attenuated Total Reflection (ATR). *ThermoFisher Scientific* [online]. Thermo Fisher Scientific [cit. 2020-12-30]. Dostupné z: <https://www.thermofisher.com/sk/en/home/industrial/spectroscopy-elemental-isotope-analysis/spectroscopy-elemental-isotope-analysis-learning-center/molecular-spectroscopy-information/ftir-information/ftir-sample-handling-techniques/ftir-sample-handling-techniques-attenuated-total-reflection-atr.html>

- [32] FTIR Sample Techniques – Diffuse Reflectance (DRIFTS). *ThermoFisher Scientific* [online]. Thermo Fisher Scientific [cit. 2020-12-30]. Dostupné z: <https://www.thermofisher.com/cz/en/home/industrial/spectroscopy-elemental-isotope-analysis/spectroscopy-elemental-isotope-analysis-learning-center/molecular-spectroscopy-information/ftir-information/ftir-sample-handling-techniques/ftir-sample-handling-techniques-diffuse-reflectance-drifts.html>
- [33] MACHOVIČ, Vladimír a František NOVÁK. Difuzně-reflexní infračervená spektroskopie půdních bitumenů z oblasti Šumavy. *Chemické Listy*. 1998, **92**(2), 151-156.
- [34] GIOVANELA, M., J.S. CRESPO, M. ANTUNES, D.S. ADAMETTI, A.N. FERNANDES, et al.. Chemical and spectroscopic characterization of humic acids extracted from the bottom sediments of a Brazilian subtropical microbasin. *Journal of Molecular Structure*. Elsevier, 2010, 981(**1-3**), 111-119.
- [35] RAHMAN M.A., M.A. HASAN, A. RAHIM a A.M.S. ALAM. Characterization of Humic Acid from the River Bottom Sediments of Burigonga: Complexation Studies of Metals with Humic Acid. *Pak. J. Anal. Environ. Chem.* 2010, **11**(1), 42-52.
- [36] PEHLIVAN E. a G. ARSLAN. Uptake of Metal Ions on Humic Acids. *Energy Sources, Part A: Recovery, Utilization and Environ. Effects*. 2006, **28**(12), 1099-1112.
- [37] SENESI N., G. SPOSITO a J.P. MARTIN. Copper (II) and iron (III) complexation by humic acid-like polymers (melanins) from soil fungi. *Science of the Total Environment*. 1987, **62**, 241-252.
- [38] KOWALKOWSKI T. a B. BUSZEWSKI. Speciation and transport modeling of heavy metals in soils. *Ekol. Techn.* 2002, **10**(1), 3-11.
- [39] ESHWAR, M., M. SRILATHA, K. Bhanu REKHA a S. Harish Kumar SHARMA. Characterization of metal complexes with humic fractions by potentiometric titrations. *International Journal of Chemical Studies*. 2017, **5**(5), 1463-1466.
- [40] STEVENSON, F. J. a Y. CHEN. Stability Constants of Copper(II)-Humate Complexes Determined by Modified Potentiometric Titration. *Soil Science*. 1991, **55**(6), 1586-1591.
- [41] ELKINS, Kelly M. a Donald J. NELSON. Fluorescence and FT-IR spectroscopic studies of Suwannee river fulvic acid complexation with aluminum, terbium and calcium. *Journal of Inorganic Biochemistry*. 2001, **87**(1-2), 81-96.
- [42] CHENG, Wen Po a Fung-Hwa CHI. A study of coagulation mechanism of polyferric sulfate reaction with humic acid using a fluorescence-quenching method. *Water Research*. 2002, **36**(18), 4583-4591.
- [43] SENESI, Nicola, Teodoro M. MIANO, Maria R. PROVENZANO a Gennaro BRUNETTI. Characterization, Differentiation, and Classification of Humic Substances by Fluorescence Spectroscopy. *Soil Science*. 1991, **152**(4), 259-271.
- [44] HERNÁNDEZ, Diana, César PLAZA, Nicola SENESI a Alfredo POLO. Detection of Copper(II) and zinc(II) binding to humic acids from pig slurry and amended soils by fluorescence spectroscopy. *Environmental Pollution*. 2006, **143**(2), 212-220.
- [45] EVANGELOU V.P., M. MARSÍ a M.A. CHAPPELL. Potentiometric–spectroscopic evaluation of metalion complexes by humic fractions extracted from corn tissue. *Spectrochimica Acta Part A*. 2002, **58**, 2159-2175.
- [46] CHASSAPIS K., M. ROULIA, G. NIKA. Fe(III)–humate complexes from Megalopolis peaty lignite: A novel eco-friendly fertilizer. *Fuel*. 2010, **89**, 1480-1484.

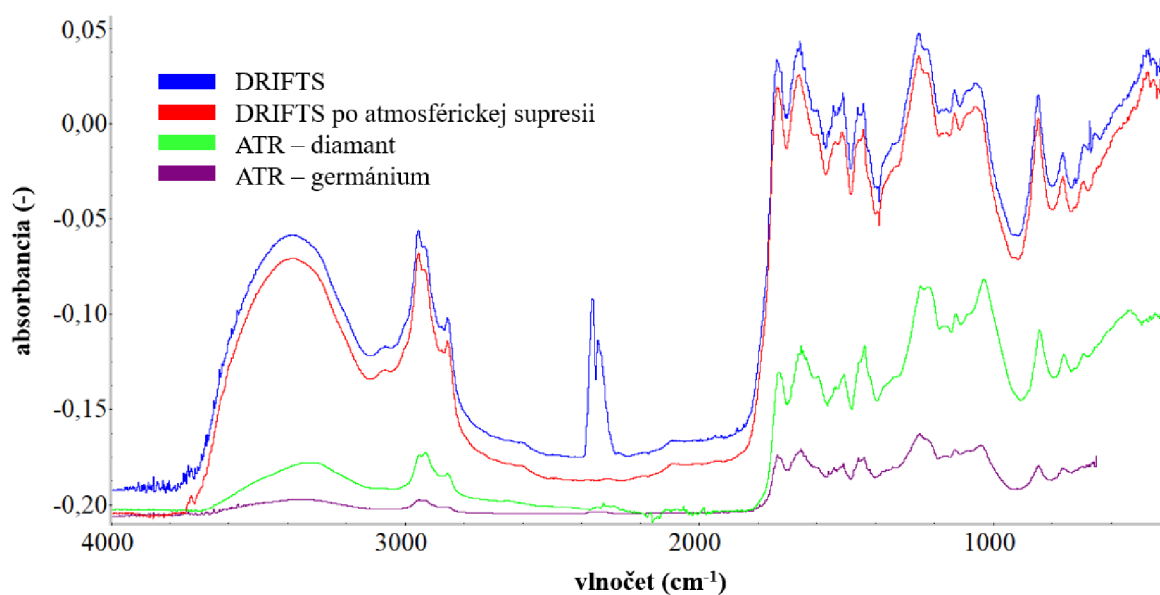
- [47] SENESI, Nicola, Y. CHEN, a , ed. Interactions of Toxic Organic Chemicals with Humic Substances. GERSTL, Z., Y. CHEN, U. MINGELGRIN a B. YARON. *Toxic Organic Chemicals in Porous Media*. 1. Berlin: Springer-Verlag, 1989, s. 37-90. ISBN 978-3-642-74470-9.
- [48] VETTORAZZI, G. State of the art of the toxicological evaluation carried out by the Joint FAO/WHO Expert Committee on Pesticide Residues. III. Miscellaneous pesticides used in agriculture and public health. GUNTHER, Francis A., ed. *Residue Reviews*. 66. New York: Springer-Verlag, 1977, s. 137-184. ISBN 978-1-4612-6354-8.
- [49] HAQUE, Rizwanul a Sue LILLEY. Infrared spectroscopic studies of charge transfer complexes of diquat and paraquat. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 1972, **20**(1), 57-58.
- [50] BURNS, Ian G., Michael H. B. HAYES a Manaurice STACEY. Spectroscopic Studies on the Mechanisms of Adsorption of Paraquat by Humic Acid and Model Compounds. *Pestic. Sci*. 1973, (4), 201-209.
- [51] KHAN, S. U. Adsorption of Bipyridylum Herbicides by Humic Acid. *Journal of Environmental Quality*. 1974, **3**(3), 202-206.
- [52] SENESI, Nicola, Ciro TESTINI a Teodoro M. MIANO. Interaction mechanisms between humic acids of different origin and nature and electron donor herbicides: A comparative IR and ESR study. *Org. Geochem*. 1987, **11**(1), 25-30.
- [53] EPR spektroskopie. *Katedra fyzikální chemie Univerzity Palackého v Olomouci* [online]. Olomouc, 2005 [cit. 2020-06-22]. Dostupné z: https://fch.upol.cz/skripta/zfcm_pred/6_EPR.pdf
- [54] FRYŠOVÁ, E. Vliv chemické modifikace huminových kyselin na jejich interakce s organickými ionty. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2017. 74 s. Vedoucí diplomové práce Ing. Petr Sedláček, Ph.D.
- [55] AHMED, Zakiuddin, G. H. JHATIAL a Nadir BUKSH. FTIR - A didactic approach for the study of humic acid - Chromium chelation during the environmental remediation. *Pakistan Journal of Scientific and Industrial Research Series A: Physical Sciences*. 2013, **56**(1), 1-5.
- [56] PICCOLO, A. a G. CELANO. Hydrogen-bonding interactions between the herbicide glyphosate and water-soluble humic substances. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 1994, **13**(11), 1737-1741.
- [57] FU, Hong-bo, Xie QUAN, Shuo CHEN, Hui-min ZHAO a Ya-zhi ZHAO. Interaction of humic substances and hematite: FTIR study. *Journal of Environmental Sciences*. 2005, **17**(1), 43-47.
- [58] MARTIN-NETO, Ladislau, Eni M. VIEIRA a Garrison SPOSITO. Mechanism of Atrazine Sorption by Humic Acid: A Spectroscopic Study. *Environmental Science & Technology*. 1994, **28**(11), 1867-1873.
- [59] Klucakova, M., Kalina, M., Sedlacek, P., Grasset, L., 2014. Reactivity and transport mapping of Cu(II) ions in humic hydrogels. *J. Soil. Sediment*. 14, 368-376.
- [60] NOVÁK, František, Vladimír MACHOVIČ, Hana HRABALOVÁ a Miroslava NOVOTNÁ. Kvantitativní FTIR spektrometrie huminových látek. *Chemické Listy*. 2017, **111**(6), 363-373.

- [61] TATZBER, Michael, Michael STEMMER, Heide SPIEGEL, Christian KATZLBERGER, Georg HABERHAUER, Axel MENTLER a Martin H. GERZABEK. FTIR-spectroscopic characterization of humic acids and humin fractions obtained by advanced NaOH, Na₄P₂O₇, and Na₂CO₃ extraction procedures. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*. 2007, **170**(4), 522-529. ISSN 14368730. Dostupné z: doi:10.1002/jpln.200622082
- [62] OVCHINNIKOV, Oleg V., Anna V. EVTUKHOVA, Tamara S. KONDRATENKO a Mikhail S. SMIRNOV. Manifestation of intermolecular interactions in FTIR spectra of methylene blue molecules. *Vibrational Spectroscopy*. 2016, **86**, 181-189. Dostupné z: doi:https://doi.org/10.1016/j.vibspec.2016.06.016
- [63] Methylene blue. *Wikipedia* [online]. [cit. 2021-7-19]. Dostupné z: https://en.wikipedia.org/wiki/Methylene_blue
- [64] REN, Hui, Dhaval D. KULKARNI, Rajesh KODIYATH, Weinan XU, Ikjun CHOI a Vladimir V. TSUKRUK. *Competitive Adsorption of Dopamine and Rhodamine 6G on the Surface of Graphene Oxide*. 2014, **6**(4), 2459-2470. ISSN 1944-8244. Dostupné z: doi:10.1021/am404881p
- [65] Rhodamine 6G. *Wikipedia* [online]. [cit. 2021-7-19]. Dostupné z: https://en.wikipedia.org/wiki/Rhodamine_6G
- [66] BANJARE, Ramesh Kumar, Manoj Kumar BANJARE a Sandhyarani PANDA. Effect of Acetonitrile on the Colloidal Behavior of Conventional Cationic Surfactants: A Combined Conductivity, Surface Tension, Fluorescence and FTIR Study. *Journal of Solution Chemistry*. 2020, **49**(1), 34-51. ISSN 0095-9782. Dostupné z: doi:10.1007/s10953-019-00937-4
- [67] ANASTASSOPOULOU, Jane D., Manoj Kumar BANJARE a Sandhyarani PANDA. Mass and FT-IR Spectra of Quaternary Ammonium Surfactants: A Combined Conductivity, Surface Tension, Fluorescence and FTIR Study. *Chemistry and Properties of Biomolecular Systems*. Dordrecht: Springer Netherlands, 1991, 1991, **49**(1), 1-9. Topics in Molecular Organization and Engineering. ISBN 978-94-010-5606-9. ISSN 0095-9782. Dostupné z: doi:10.1007/978-94-011-3620-4_1
- [68] SMITH, Brian C. The C=O Bond, Part VI: Esters and the Rule of Three. *Spectroscopy* [online]. 2018, **33**(7), 20-23 [cit. 2021-7-19]. Dostupné z: https://www.spectroscopyonline.com/view/co-bond-part-vi-esters-and-rule-three
- [69] Karbethopendeciniumbromid. *Wikipedia* [online]. [cit. 2021-7-19]. Dostupné z: https://cs.wikipedia.org/wiki/Karbethopendeciniumbromid

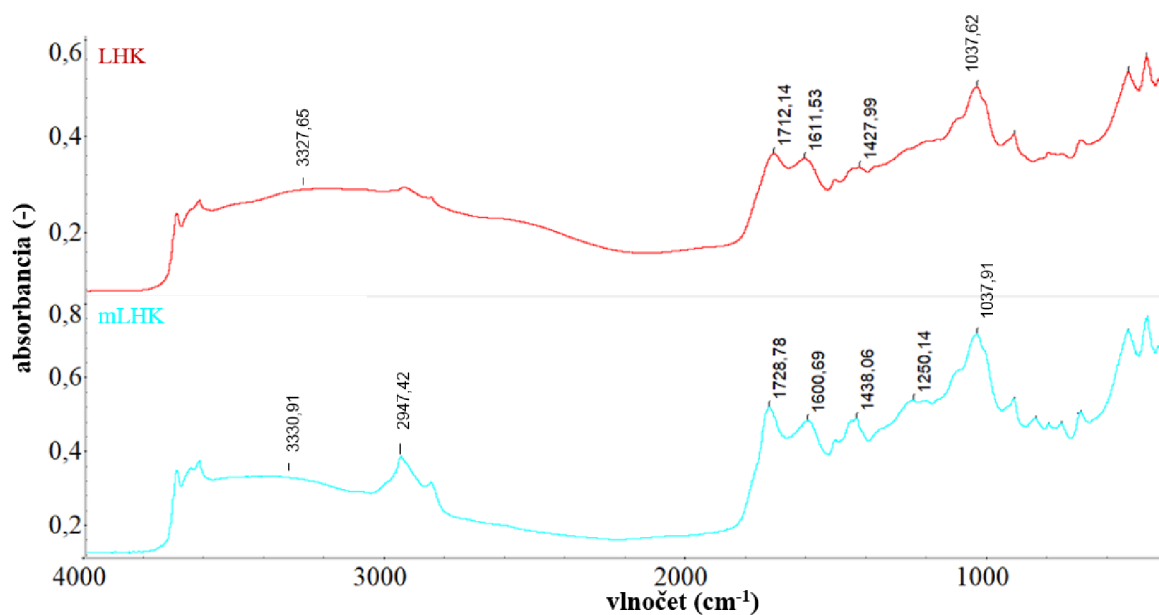
8 ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK A SYMBOLOV

ATR	úplný zoslabený odraz
DRIFTS	difúzna reflektancia
ESR	elektrónová spinová rezonancia
FK	fulvokyselina
FTIR	infračervená spektroskopia s Fourierovou transformáciou
HK	humínová kyselina
HL	humínová látka
IČ	infračervený
IHSS	Medzinárodná spoločnosť pre humínové látky
LHK	lignitické humínové kyseliny
MB	metylénová modrá
mHK	metylovaná humínová kyselina
mLHK	metylované lignitické humínové kyseliny
MWCO	molecular weight cut-off
NMR	jadrová magnetická rezonančná spektroskopia
PAH	polyaromatické uhľovodíky
R6G	rhodamin 6G
UV	ultrafialový
UV-VIS	ultrafialová a viditeľná časť spektra
<i>A</i>	absorbancia
<i>T</i>	transmitancia

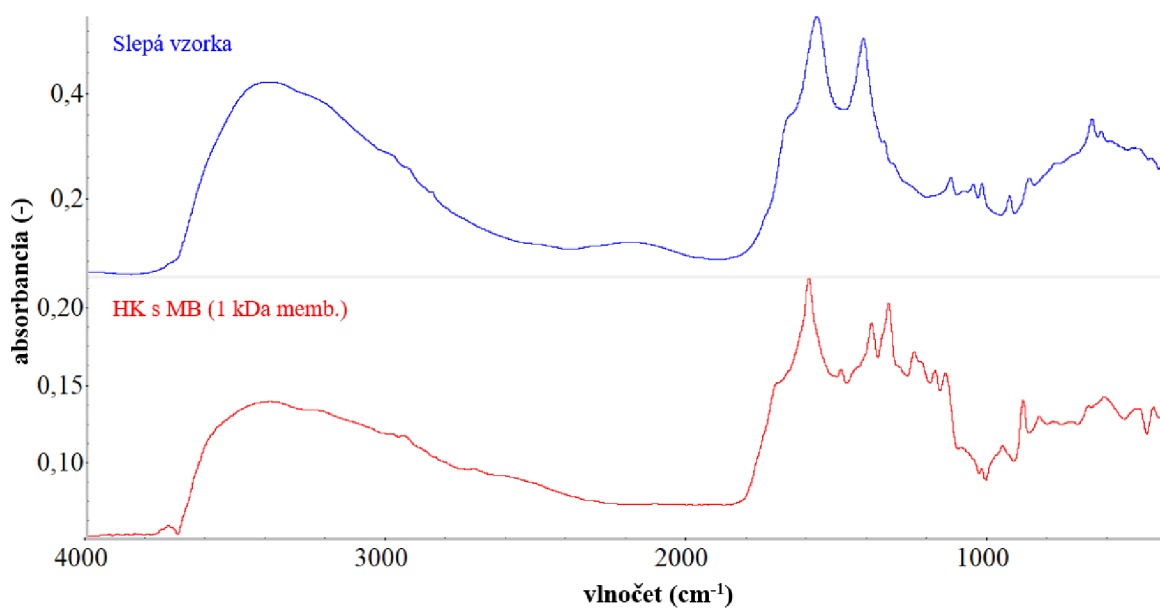
9 PRÍLOHY



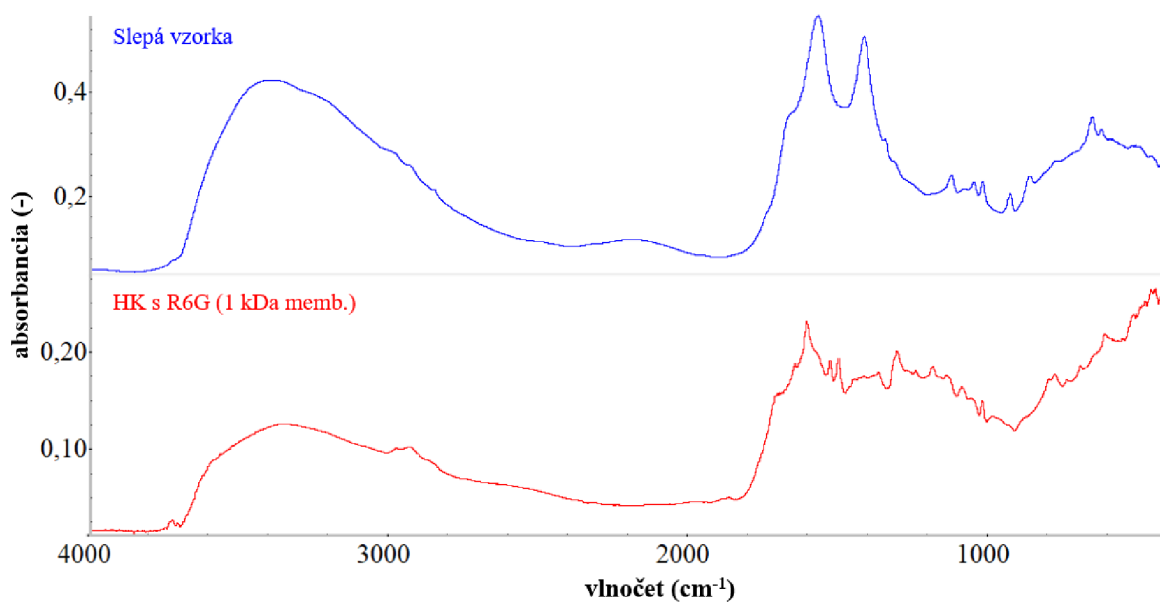
Príloha 1 Porovnanie spektier metylovaných huminových kyselín izolovaných z černoze získaných rôznymi FTIR technikami



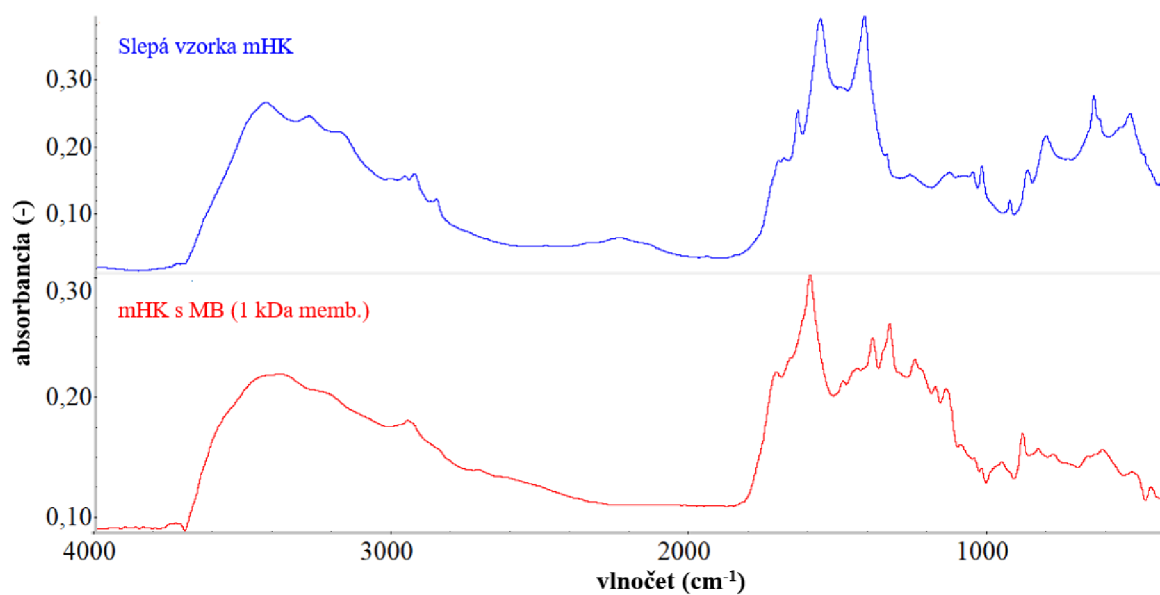
Príloha 2 Porovnanie spektier HK a mHK izolovaných z lignitu



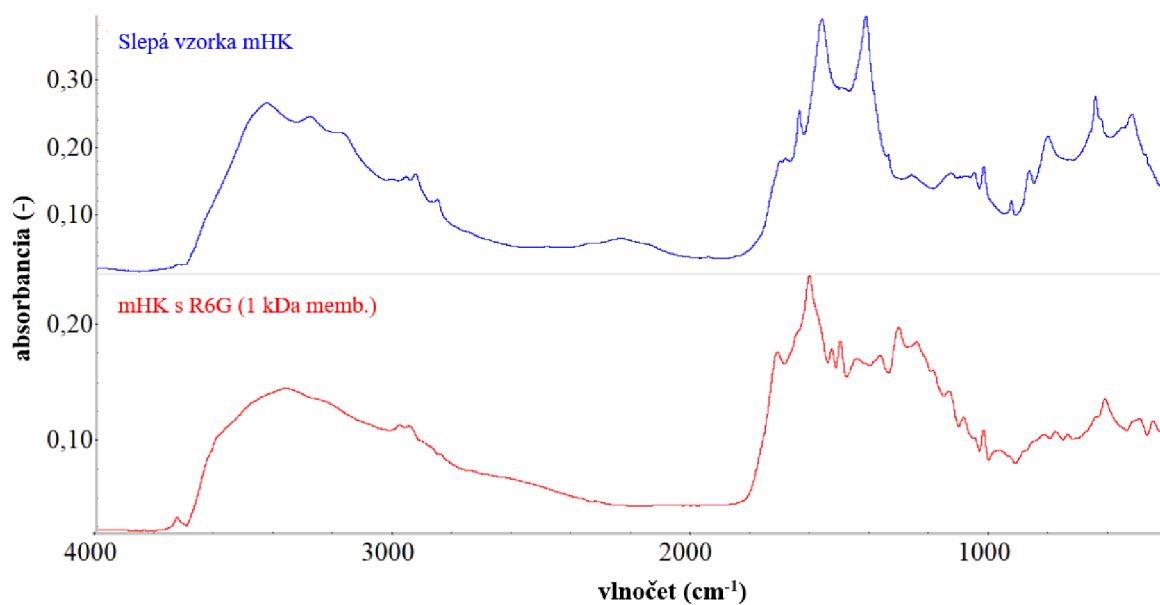
Príloha 3 Porovnanie spektra komplexu humínovej kyseliny s MB dialyzovaného cez 1kDa membránu a spektra slepej vzorky



Príloha 4 Porovnanie spektra komplexu humínovej kyseliny s R6G dialyzovaného cez 1kDa membránu a spektra slepej vzorky



Príloha 5 Porovnanie spektra komplexu metylovanej humínovej kyseliny s MB dialyzovaného cez 1kDa membránu a spektra slepej vzorky mHK



Príloha 6 Porovnanie spektra komplexu metylovanej humínovej kyseliny s R6G dialyzovaného cez 1kDa membránu a spektra slepej vzorky mHK

Príloha 7 Porovnanie polohy a intenzity jednotlivých absorpčných pásov v čistých HK a MB a po ich interakcii, významné zmeny sú zvýraznené tučne

Pôvod		Po interakcii		Zmena		Typ väzby; príspevok látky
Poloha (cm ⁻¹)	Rel. plocha (%)	Poloha (cm ⁻¹)	Rel. plocha (%)	Poloha (cm ⁻¹)	Rel. plocha (%)	
1077,1	0,6%	1081,8	2,2%	4,7	1,6%	C-C alif. skupín; C-O alkoholov a alif. esterov; HK
1144,2	4,4%	1139,7	6,2%	-4,5	1,8%	C-N a C-S-C vibrácie MB ⁺ heterocyklu; MB
1224,4	3,5%	1220,6	4,1%	-3,8	0,6%	rôzne typy väzby C-H; MB
1339,8	9,0%	1331,7	5,5%	-8,1	-3,6%	C-N a C=S ⁺ valenčné vibrácie heterocyklu; MB
1357,3	3,0%	1353,4	1,4%	-3,9	-1,6%	
1397,3	9,9%	1386,2	5,4%	-11,1	-4,5%	rôzne typy väzby C-H; MB
1414,6	14,1%	1414,9	8,7%	0,3	-5,4%	-COO ⁻ ; HK
1447,9	12,2%	1443,5	8,7%	-4,4	-3,5%	rôzne typy väzby C-H; MB
1490,9	5,7%	1490,2	5,8%	-0,7	0,1%	rôzne typy väzby C-H; MB
1538,8	5,2%	1523,1	5,8%	-15,7	0,5%	C-C a C-N väzby v heterocykle; MB
1572,7	41,8%	1567,4	23,5%	-5,4	-18,4%	-COO ⁻ ; HK
1601,4	15,8%	1599,4	4,0%	-2,0	-11,8%	C=C a C=N väzby v heterocykle; MB
1669,5	13,8%	1690,2	2,7%	20,7	-11,1%	C=O amidov, chinónov; HK
1745,5	0,2%	1736,8	2,5%	-8,7	2,3%	C=O v karboxyloch, s príspevkom ketónov, karbonylov, esterov; HK

Príloha 8 Porovnanie polohy a intenzity jednotlivých absorpčných pásov v čistých mHK a MB a po ich interakcii, významné zmeny sú zvýraznené tučne

Pôvod		Po interakcii		Zmena		Typ väzby; príspevok látky
Poloha (cm ⁻¹)	Rel. plocha (%)	Poloha (cm ⁻¹)	Rel. plocha (%)	Poloha (cm ⁻¹)	Rel. plocha (%)	
1077,2	2,1%	1076,1	0,7%	-1,1	-1,4%	C-C alif. skupín; C-O alkohol. a alif. ester.; mHK
1144,2	4,4%	1138,9	2,4%	-5,3	-2,0%	C-N a C-S-C vibrácie MB ⁺ heterocyklu; MB
1224,4	3,5%	1217,4	1,6%	-7,0	-1,9%	rôzne typy väzby C-H; MB
1339,8	9,0%	1335,5	4,3%	-4,3	-4,7%	C-N a C=S ⁺ valenčné vibrácie heterocyklu; MB
1357,3	3,0%	1356,2	0,6%	-1,1	-2,4%	
1397,3	9,9%	1387,5	3,0%	-9,8	-6,9%	rôzne typy väzby C-H; MB
1414,2	8,9%	1413,3	8,6%	-0,9	-0,3%	-COO ⁻ ; mHK
1447,9	12,2%	1434,7	7,8%	-13,2	-4,4%	rôzne typy väzby C-H; MB
1490,9	5,7%	1494,4	19,0%	3,5	13,3%	rôzne typy väzby C-H; MB
1567,2	31,6%	1564,9	25,3%	-2,3	-6,2%	-COO ⁻ ; mHK
1601,4	15,8%	1601,8	1,9%	0,4	-13,9%	C=C a C=N väzby v heterocykle; MB
1681,1	5,8%	1686,3	7,5%	5,2	1,7%	C=O amidov, chinónov; mHK
1732,8	1,7%	1733,4	1,4%	0,6	-0,3%	C=O v karboxyloch, s príspevkom ketónov, karbonylov, esterov; mHK

Príloha 9 Porovnanie polohy a intenzity jednotlivých absorpčných pásov v čistých HK a R6G a po ich interakcii, významné zmeny sú zvýraznené tučne

Pôvod		Po interakcii		Zmena		Typ väzby; príspevok látky
Poloha (cm ⁻¹)	Rel. plocha (%)	Poloha (cm ⁻¹)	Rel. plocha (%)	Poloha (cm ⁻¹)	Rel. plocha (%)	
1184,8	2,7%	1185,4	1,9%	0,6	-0,8%	C-O esterovej väzby; R6G
1251,6	10,2%	1242,1	3,0%	-9,5	-7,2%	C-O väzba zahrňujúca karbonylový uhlík; R6G
1248,8	7,1%	1273,8	1,9%	25,1	-5,2%	C-OH fenolické; HK
1299,6	13,6%	1305,1	3,1%	5,5	-10,5%	C-N väzba; R6G
1372,7	3,8%	1370,1	7,9%	-2,6	4,0%	-COO ⁻ ; HK
1414,6	14,1%	1414,8	14,0%	0,2	0,0%	-COO ⁻ ; HK
1445,7	5,6%	1445,1	4,7%	-0,7	-0,9%	C=C vibrácie kostry aromatického kruhu; R6G
1476,8	3,9%	1480,2	2,7%	3,4	-1,2%	C=C vibrácie kostry aromatického kruhu; R6G
1572,7	41,8%	1569,8	36,5%	-2,9	-5,4%	-COO ⁻ ; HK
1647,8	3,4%	1643,8	2,4%	-4,0	-1,0%	N-H väzba; R6G
1669,5	13,8%	1682,7	10,5%	13,2	-3,3%	C=O v aromatických ketónoch; HK
1716,7	5,7%	1728,8	2,0%	12,1	-3,7%	C=O esterovej väzby; R6G

Príloha 10 Porovnanie polohy a intenzity jednotlivých absorpčných pásov v čistých mHK a R6G a po ich interakcii, významné zmeny sú zvýraznené tučne

Pôvod		Po interakcii		Zmena		Typ väzby; príspevok látky
Poloha (cm ⁻¹)	Rel. plocha (%)	Poloha (cm ⁻¹)	Rel. plocha (%)	Poloha (cm ⁻¹)	Rel. plocha (%)	
1184,8	2,7%	1185,6	2,0%	0,8	-0,7%	C-O esterovej väzby; R6G
1251,6	10,2%	1239,3	2,7%	-12,3	-7,5%	C-O väzba zahrňujúca karbonylový uhlík; R6G
1261,7	9,6%	1270,5	2,1%	8,8	-7,5%	C-OH fenolické; mHK
1299,6	13,6%	1308,9	5,6%	9,3	-8,0%	C-N väzba; R6G
1382,7	4,3%	1369,0	5,5%	-13,7	1,1%	-COO ⁻ ; mHK
1414,2	8,9%	1414,8	15,6%	0,6	6,7%	-COO ⁻ ; mHK
1445,7	5,6%	1445,8	5,2%	0,1	-0,4%	C=C vibrácie kostry aromatického kruhu; R6G
1567,2	31,6%	1571,5	31,4%	4,2	-0,2%	-COO ⁻ ; mHK
1647,8	3,4%	1644,7	3,2%	-3,1	-0,2%	N-H väzba; R6G
1681,1	5,8%	1680,5	8,9%	-0,7	3,1%	C=O v aromatických ketónoch; mHK
1716,7	5,7%	1726,3	3,8%	9,6	-1,9%	C=O esterovej väzby; R6G

Príloha 11 Porovnanie polohy a intenzity jednotlivých absorpčných pásov v čistých HK a Septonexu a po ich interakcii, významné zmeny sú zvýraznené tučne

Pôvod		Po interakcii		Zmena		Typ väzby; príspevok látky
Poloha (cm ⁻¹)	Rel. plocha (%)	Poloha (cm ⁻¹)	Rel. plocha (%)	Poloha (cm ⁻¹)	Rel. plocha (%)	
1139,6	2,7%	1134,8	2,4%	-4,8	-0,4%	C-C väzba; Sept.
1190,2	8,1%	1193,9	3,5%	3,7	-4,6%	C-O esterovej väzby; Sept.
1244,5	6,0%	1242,5	1,3%	-2,0	-4,7%	C-O esterovej väzby, Sept.; prip. C-OH fenolické, HK
1344,4	0,7%	1340,4	2,3%	-4,0	1,6%	-COO ⁻ , prip. C-CH ₃ v alif. skupinách; HK
1371,4	3,3%	1375,0	7,8%	3,7	4,5%	C-CH ₃ väzby; Sept.
1414,6	14,1%	1413,5	11,9%	-1,0	-2,2%	-COO ⁻ ; HK
1445,9	6,9%	1444,4	5,2%	-1,5	-1,7%	C-H väzby; Sept.
1468,2	5,8%	1467,6	1,2%	-0,6	-4,6%	
1493,3	4,1%	1488,0	4,3%	-5,2	0,2%	
-		1521,0	3,8%	nový pás		aromatické C=C
1572,7	41,8%	1566,9	21,7%	-5,8	-20,2%	-COO ⁻ ; HK
-		1602,0	8,5%	nový pás		arom. C=C, C=O ketónov
-		1641,2	3,5%	nový pás		C=O amidov, chinónov
1669,5	13,8%	1681,0	6,3%	11,5	-7,5%	C=O v aromatických ketónoch; HK
1736,8	12,9%	1738,3	3,3%	1,5	-9,7%	C=O esterov; Sept.

Príloha 12 Porovnanie polohy a intenzity jednotlivých absorpčných pásov v čistých mHK a Septonexu a po ich interakcii, významné zmeny sú zvýraznené tučne

Pôvod		Po interakcii		Zmena		Typ väzby; príspevok látky
Poloha (cm ⁻¹)	Rel. plocha (%)	Poloha (cm ⁻¹)	Rel. plocha (%)	Poloha (cm ⁻¹)	Rel. plocha (%)	
1139,6	2,7%	1143,5	3,8%	3,9	1,1%	C-C väzba; Sept.
1190,2	8,1%	1196,0	3,1%	5,8	-5,0%	C-O esterovej väzby; Sept.
1244,5	6,0%	1243,6	5,2%	-0,9	-0,8%	C-O esterovej väzby; Sept.
1342,4	1,7%	1341,1	2,7%	-1,3	1,0%	-COO ⁻ , prip. C-CH ₃ v alif. skupinách; mHK
1371,4	3,3%	1369,3	3,8%	-2,1	0,5%	C-CH ₃ väzby; Sept.
1414,2	8,9%	1411,9	6,0%	-2,3	-2,9%	-COO ⁻ ; mHK
1445,9	6,9%	1437,1	8,3%	-8,8	1,4%	C-H väzby; Sept.
1468,2	5,8%	1465,8	4,4%	-2,4	-1,4%	
1493,3	4,1%	1489,2	3,8%	-4,1	-0,3%	
-		1517,0	2,0%	nový pás		aromatické C=C
1567,2	31,6%	1568,9	24,8%	1,6	-6,8%	-COO ⁻ ; mHK
1681,1	5,8%	1682,3	6,7%	1,2	0,9%	C=O v aromatických ketónoch; mHK
1708,2	2,8%	1712,3	4,5%	4,1	1,7%	C=O v karbonyloch, aldehydroch a alif. Ketónoch; mHK
1736,8	12,9%	1738,3	2,8%	1,5	-10,1%	C=O esterov; Sept.