



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 CHROMATOGRAFIE NA TENKÉ VRSTVĚ
K FRAKCIONACI A CHARAKTERIZACI
ORGANICKÉ HMOTY IZOLOVANÉ Z ALGINITU**

USE OF THIN LAYER CHROMATOGRAPHY FOR FRACTIONATION AND CHARACTERIZATION OF ORGANIC MATTER ISOLATED FROM ALGINITE

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Pavel Solanský

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. Vojtěch Enev, Ph.D.

BRNO 2021

Zadání diplomové práce

Číslo práce: FCH-DIP1623/2020 Akademický rok: 2020/21
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie
Student: **Bc. Pavel Solanský**
Studijní program: Spotřební chemie
Studijní obor: Spotřební chemie
Vedoucí práce: **Ing. Vojtěch Enev, Ph.D.**

Název diplomové práce:

Využití chromatografie na tenké vrstvě k frakcionaci a charakterizaci organické hmoty izolované z alginitu

Zadání diplomové práce:

Izolace huminových látek z alginitu pomocí standardního postupu IHSS.

Vypracovat aktuální literární rešerši na téma nových možností frakcionace organické hmoty tvořící supramolekulární strukturu huminových látek s ohledem na využití chromatografie na tenké vrstvě.

Na základě vypracované literární rešerše navrhnout a realizovat metodu frakcionace organické hmoty s využitím chromatografie na tenké vrstvě.

Optimalizovat postup frakcionace organické hmoty a následně podrobit získané frakce fyzikálně–chemické charakterizaci s použitím spektrometrických metod.

Dále podrobit základní fyzikálně–chemické charakterizaci izolované huminové látky.

Diskutovat získané experimentální výstupy, zhodnotit praktickou využitelnost navržené metody frakcionace.

Termín odevzdání diplomové práce: 28.5.2021:

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

Bc. Pavel Solanský
student(ka)

Ing. Vojtěch Enev, 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

Tato diplomová práce se zabývá studiem struktury a fyzikálně-chemických vlastností organických frakcí huminových látek, které byly získány pomocí metody chromatografie na tenké vrstvě. Příslušné vzorky huminových látek byly v této práci izolovány ze vzorku slovenského alginitu na základě postupu mezinárodní společnosti pro výzkum huminových látek (IHSS). K charakterizaci izolovaných vzorků huminových látek byly vybrány následující analytické techniky: termogravimetrická a elementární analýza, molekulová absorpční spektrometrie (UV/Vis), infračervená spektrometrie s Fourierovou transformací (FTIR) a ustálená fluorescenční spektrometrie (*steady-state*). Jednotlivé organické frakce huminových látek byly charakterizovány pomocí metod molekulové absorpční spektrometrie (UV/Vis) a ustálené fluorescenční spektrometrie (*steady-state*). Pomocí fluorescenční spektrometrie bylo zjištěno, že HL jsou složeny z fluorescenčních domén huminového a ne-huminového (proteinového) charakteru. Organické frakce, které odpovídaly huminovým fluoroforům byly charakterizovány vyšším zastoupením kyslíkatých substituentů na aromatickém jádře, vyšším stupněm aromaticity a rovněž vyšší molekulovou hmotností. Cílem této diplomové práce bylo navrhnout a optimalizovat postup frakcionace organické hmoty za účelem detailního porozumění struktury a vlastností huminových látek, které byly izolovány ze sedimentární horniny alginitu. Na základě toho byla zhodnocena praktická využitelnost metody tenkovrstvé chromatografie k významnému snížení molekulární heterogenity studovaných HL.

KLÍČOVÁ SLOVA

Organická hmota, huminové látky, frakcionace, chromatografie na tenké vrstvě (TLC), UV/Vis spektrometrie, FTIR spektrometrie, fluorescenční spektrometrie

ABSTRACT

This diploma thesis is focused on the study of structure and physicochemical properties of organic fractions of humic substances, which were obtained by the method of thin-layer chromatography. Humic substances, which were used in this study, were isolated from a sample of Slovak alginite based on the procedure of the International Humic Substances Society (IHSS). The following analytical techniques were selected for the characterization of isolated humic substances: thermogravimetric and elemental analysis, molecular absorption spectroscopy (UV/Vis), Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) and steady-state fluorescence spectroscopy. Each organic fraction of humic substances were characterized by molecular absorption spectroscopy (UV/Vis) and steady-state fluorescence spectroscopy. Using steady-state fluorescence spectroscopy, humic substances were found to be composed of fluorophores of humic and non-humic (protein) character. Organic fractions corresponding to the humic fluorophores were characterized by a higher content of oxygen substituents on the aromatic nucleus, a higher degree of aromaticity and also a higher molecular weight. The aim of this diploma thesis was to design and optimize the process of organic matter fractionation for the purpose of detailed understanding of the structure and properties of humic substances, which were isolated from the sedimentary rock alginite. Based on this, the practical applicability of the thin layer chromatography method to significantly reduce the molecular heterogeneity of the studied humic substances was evaluated.

KEYWORDS

Organic matter, humic substances, fractionation, thin-layer chromatography (TLC), UV/Vis spectroscopy, FTIR spectroscopy, fluorescence spectroscopy

SOLANSKÝ, P. *Využití chromatografie na tenké vrstvě k frakcionaci a charakterizaci organické hmoty izolované z alginitu*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2021, 71 s. Vedoucí diplomové práce Ing. Vojtěch Enev, Ph.D.

PROHLÁŠENÍ

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

.....
Pavel Solanský

PODĚKOVÁNÍ

Tímto bych rád poděkoval především vedoucímu mé diplomové práce Ing. Vojtěchu Enevovi, Ph.D. za odborné vedení, ochotu a trpělivost. Dále bych chtěl poděkovat všem, kteří mi při psaní této práce věnovali svůj čas.

OBSAH

1	ÚVOD	8
2	TEORETICKÁ ČÁST	9
2.1	Vznik alginitu	9
2.2	Složení alginitu	9
2.3	Humínové látky	10
2.3.1	Rozdělení humínových látek	10
2.3.2	Vznik humínových látek	12
2.3.3	Molekulární struktura humínových látek	14
2.3.4	Využití humínových látek	19
2.4	Rozdělení organické hmoty dle velikosti částic	21
2.4.1	Částicová organická hmota (POM)	21
2.4.2	Rozpuštěná organická hmota (DOM)	22
2.5	Současný stav řešené problematiky	23
2.5.1	Fyzikální frakcionace OM	23
2.5.2	Chemická frakcionace OM	24
2.5.3	Frakcionace OM chromatografickými metodami	25
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	28
3.1	Použité metody a přístroje	28
3.2	Použité chemikálie	28
3.3	Charakterizace alginitu	28
3.3.1	Elementární analýza	28
3.3.2	Termogravimetrická analýza	28
3.3.3	Infračervená spektrometrie	29
3.4	Izolace humínových látek na kolonách	29
3.4.1	Separace HK	29
3.4.2	Separace FK	30
3.5	Charakterizace humínových a fulvinových kyselin	31
3.5.1	Elementární analýza	32
3.5.2	Termogravimetrická analýza	32
3.5.3	Infračervená spektrometrie	32
3.5.4	UV/Vis spektrometrie	32
3.5.5	Fluorescenční spektrometrie	33

3.6	Frakcionace pomocí TLC.....	34
3.7	Základní fyzikálně-chemická charakterizace frakcí HL.....	34
3.7.1	UV/Vis spektrometrie frakcí HL	34
3.7.2	Fluorescenční spektrometrie frakcí HL	34
4	DISKUZE A VÝSLEDKY.....	35
4.1	Elementární a termogravimetrická analýza alginitu.....	35
4.2	Infračervená spektrometrie alginitu.....	35
4.3	Stanovení obsahu HL v alginitu	37
4.4	Elementární a termogravimetrická analýza HL.....	37
4.5	UV/Vis spektrometrie HL	38
4.6	Infračervená spektrometrie HL	40
4.7	Fluorescenční spektrometrie HL	43
4.8	UV/Vis spektrometrie TLC frakcí HL	44
4.9	Fluorescenční spektrometrie TLC frakcí HL	47
5	ZÁVĚR.....	55
6	LITERATURA	57
7	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....	66
8	PŘÍLOHY	67

1 ÚVOD

Půdní organická hmota (SOM) je část půdy, která se skládá z rostlinné nebo živočišné tkáně v různých stádiích a stupních rozkladu, které spoluvytvářejí tzv. půdní nekroedafon. Organická hmota je tvořena z různých složek, které lze rozdělit do tří hlavních typů. První typ tvoří mikrobiální biomasa a zbytky odumřelých těl rostlin. Druhým typem SOM je aktivní půdní organická hmota, označována jako detrit. Tyto dva typy organických látek přispívají k úrodnosti půdy, jelikož dekompozicí těchto frakcí dochází k uvolňování rostlinných živin, jako jsou dusík, fosfor nebo draslík. Posledním typem je stabilní půdní organická hmota, často označována jako humus, která se tvoří z rozložených rostlinných a živočišných tkání. Frakce humusu je důležitá, jelikož přispívá k drobtovité struktuře půdy a kationtové výměnné kapacitě jejích částic. Je také frakcí, která určuje tmavou barvu půdy. Přítomnost stabilní SOM s sebou přináší také celou řadu fyzikálních, chemických a biologických výhod. Díky její přítomnosti se zvyšuje stabilita půdního agregátu, zlepšuje se infiltrace vody a provzdušňování půdy. Dále se snižuje lepivost jílovitých půd a usnadňuje se tak jejich obdělávání. Mezi důležité chemické vlastnosti humusu pak patří schopnost odolávat změnám pH, urychlovat rozklad půdních minerálů a zpřístupňovat živiny v minerálech (Ca^{2+} , Mg^{2+} , K^+), které jsou následně transportovány k rostlinám. Humus také poskytuje potravu živým organismům v půdě a zvyšuje mikrobiální biologickou rozmanitost a aktivitu, čímž napomáhá při potlačení negativních vlivů, které jsou v dnešní době především spjaty s antropogenní činností člověka [1; 2].

Huminové látky (HL) jsou nedílnou součástí stabilní půdní organické hmoty. Představují heterogenní směs přirozeně se vyskytujících organických látek. Tyto sloučeniny jsou v přírodě všudypřítomné a vznikají mikrobiální degradací odumřelé rostlinné hmoty, jako je lignin a jiných biopolymerních látek. Tento proces samovolné přeměny vědci často uvádějí pod názvem *humifikace* [3]. HL jsou po procesu humifikace velmi odolné vůči další biodegradaci. Přesné vlastnosti a struktura daného vzorku HL závisí na zdroji přírodní matrice a na konkrétních podmínkách geneze, při kterých jsou tyto biokoloidní látky syntetizovány. Frakcionace těchto látek může být pak použita k izolaci strukturně jednodušších resp. homogennějších frakcí HL. Tento přístup se zdá být vhodným k podrobnější interpretaci jejich složité struktury a v neposlední řadě i k pochopení jejich unikátních fyzikálně-chemických vlastností [4].

Cílem této práce bylo izolovat HL ze vzorku slovenského alginitu pomocí standardní metody navržené mezinárodní společností pro výzkum huminových látek (IHSS). Dále bylo potřeba navrhnout a realizovat metodu frakcionace organické hmoty z izolovaných vzorků HL s využitím chromatografie na tenké vrstvě (TLC), která by mohla být nápomocná k objasnění a získání informací o struktuře, a také k predikci jednotlivých stavebních kamenů těchto biokoloidních látek. Posledním úkolem pak bylo zhodnotit praktickou využitelnost metody tenkovrstvé chromatografie pro frakcionaci složitých organických systémů.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Vznik alginitu

Alginit je komplexní půdní agregát fosilní biomasy na bázi řas, jílovitého sopečného popela a uhličitanu vápenatého. Spolu s amorfni organickou hmotou bývá součástí některých typů kerogenu. Podle studií [5] existují dvě odlišné formy alginitu. Jsou to Alginit A (telalginit), který obsahuje morfologicky rozlišitelné mikrofosilie, a Alginit B (lamalginit), jenž je více amorfni.

Vznik alginitu byl zapříčiněn tzv. bazaltovým vulkanismem, kdy se v sopečných kráterech vytvořil kruhový val z tufového materiálu, který se po ukončení sopečné aktivity přestal dále rozšiřovat a vznikl tak sopečný zárodek nazývaný se maar. Kráter vyhaslé sopky se poté postupně zaplnil dešťovou vodou a vzniklo kráterové jezero, v jehož vodě obsahující velké množství minerálních živin (fosfor, draslík, hořčík, vápník), se dařilo drobným vodním rostlinám, zejména pak řasám. Ke vzniku samotného alginitu poté došlo postupnou sedimentací odumřelých kolonií řas, které se na dně kráterového jezera obohatily o minerální živiny a o různé stopové prvky splavené spolu s jílem z tufového úvalu. Vzniklá usazená hornina dostala název *alginit* právě díky vysokému obsahu odumřelých řas (řasy = *algae*) [6; 7].

2.2 Složení alginitu

Alginit má polyminerální charakter, ze kterého logicky vyplývá jeho chemické složení a také jeho sorpční vlastnosti. Dominantní zastoupení v alginitu má smektit s obsahem molekulární vody. Smektit patří do skupiny vrstevnatých silikátů a jeho zastoupení v alginitu může být až 60 hm. %. Dále byl v alginitu potvrzen výskyt křemene a živce, které mají zastoupení přibližně 10–15 hm. %. V alginitu jsou přítomny také –OH skupiny jílových minerálů, zejména pak illitu. Právě illit společně se smektitem, kaolinitem a organickou hmotou jsou schopny eliminovat rizikové prvky v půdách. Alginit je také tvořen kalcitem, se zastoupením zhruba 12 hm. %, a vápencem, jenž tvoří přibližně 11 hm. % alginitu. Alginit obsahuje kromě organické hmoty také primární a sekundární alumosilikáty, které ovlivňují další fyzikální a chemické vlastnosti této horniny [8].

Mineralogické složení alginitu limituje také jeho chemické vlastnosti. Jak již bylo zmíněno výše, alginit obsahuje velké množství organické hmoty, což řadí tuto horninu mezi produkty fosilního charakteru. Zastoupení ve formě oxidů křemičitého (SiO_2) a hlinitého (Al_2O_3) je velmi významné pro technologie výroby silikátů. Na základě naměřených hodnot pH se alginit řadí mezi neutrální látky s poměrně vysokým obsahem humusu. Co se týče biogenních prvků, jsou v této hornině přítomny N (NO_2^-), P (P_2O_5), Na^+ , K^+ , Ca^{2+} (CaO), Mg^{2+} (MgO) a SO_4^{2-} . Ze stopových prvků lze v alginitu nalézt Mn^{2+} (MnO), Cu^{2+} , B^{3+} , Mo^{4+} a Zn^{2+} a z rizikových prvků se zde v malé míře vyskytují As^{3+} , Cd^{2+} , Pb^{2+} , Hg^{2+} a Cr^{3+} . Materiál je tedy charakterizován vyváženým poměrem biogenních a stopových prvků a velmi nízkým obsahem rizikových prvků a těžkých kovů. Díky tomu je alginit hojně využíván v zemědělském agrochemickém průmyslu při dekontaminaci půd a úpravě jejich fyzikálně-chemických vlastností. Alginit, jenž je aplikován do půdy, je schopen zlepšit její drobtovitou strukturu a pomáhá navíc při regeneraci půdní organické hmoty. Je to slibný materiál, který

dokáže kultivovat půdu bez nepříznivých účinků. Kromě použití alginitu jako půdního kondicionéru je také možné použít huminové kyseliny, izolované z alginitu, ke stabilizaci prospěšných mikroorganismů, či jako stimulanty pro prospěšné bakterie. Tento netoxický materiál se vyskytuje v jižní části Slovenska, a také ve východní části Maďarska [9].

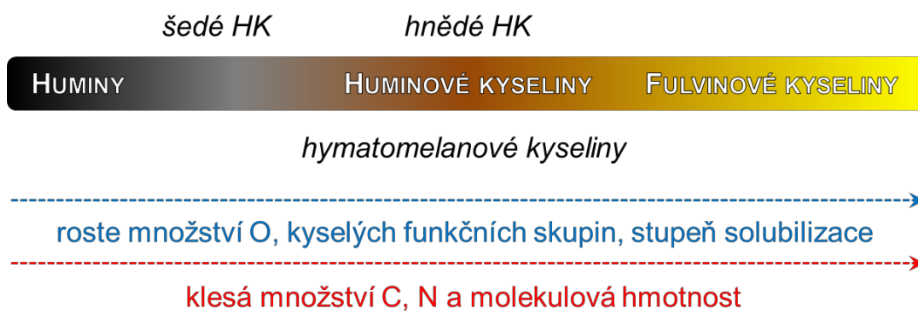
2.3 Huminové látky

Huminové látky jsou přírodní organické sloučeniny, které vznikly chemickým a biologickým rozkladem organické hmoty a syntetickou činností mikroorganismů. Protože jsou hlavní složkou půdního humusu, vyskytují se huminové látky v určitém množství ve všech druzích půd, ale také v rašelině, hnědém uhlí, sedimentech, nebo i v povrchové a podzemní vodě [10]. Množství huminových látek v půdě ovlivňuje odlišné podnebí a s tím související vlhkost půdy. Tyto látky jsou přítomny v nížinných i horských půdách, v tropických i chladných arktických podnebí a mohou být jak ve vlhkých, tak i v suchých půdách. Známé svým vysokým obsahem organické hmoty jsou mollisoly, půdy pod travnatou vegetací polovlhkých oblastí [11; 12]. Obsah huminových látek v přírodních maticích kolísá od stopových množství (písky, jíly), přes jednotky procent (běžné zeminy) až k desítkám procent (hnědé uhlí, lignit). Mimořádně vysoký obsah pak vykazuje např. rašelina, ve které může být obsah huminových látek 80 hm. % a více [13].

Huminové látky jsou tmavě zbarvené, kyselé, převážně aromatické chemicky složité sloučeniny s molekulovou hmotností v rozmezí od $1 \cdot 10^2$ do $1 \cdot 10^5$ Da. Tyto poměrně stabilní komplexní sloučeniny obsahují heteroatomy, mezi kterými jsou významné zejména kyslíky v karboxylových a fenolických funkčních skupinách. Dále se v huminových látkách vyskytuje také síra a dusík, které však nejsou tolik významné. Huminové látky mají velmi složitou strukturu, která dosud nebyla přesně objasněna i přesto, že jsou tyto látky předmětem zkoumání už více než 100 let. Důležitou vlastností huminových látek je jejich schopnost tvořit ve vodě rozpustné i nerozpustné komplexy s kovovými ionty, a také interagovat s jílovými materiály a organickými sloučeninami jako jsou alkany, mastné kyseliny, dialkylftaláty či pesticidy [10; 14].

2.3.1 Rozdělení huminových látek

Za hlavní složky huminových látek jsou obvykle považovány huminové kyseliny (HK), fulvinové kyseliny (FK) a humin (HU). Mezi tyto typy huminových látek, jejichž fyzikálně-chemické vlastnosti jsou porovnány na Obr. 1, autoři občas zařazují i hymatomelanové kyseliny (HY), což jsou frakce huminových kyselin. Tyto složky se od sebe liší chemickou strukturou, molekulovou hmotností a svou rozpustností v zásadách a kyselinách [10; 13; 12].



Obr. 1: Fyzikálně-chemické vlastnosti huminových látek a jejich rozdělení [15]

Fulvinové kyseliny jsou skupinou huminových látek, které jsou rozpustné v zásadách, kyselinách i ve vodě. Předpokládá se, že jde o koloidní polydispergované látky, které mají žlutou až žlutohnědou barvu. Ze všech tří hlavních typů huminových látek mají fulvinové kyseliny nejnižší molekulovou hmotnost, která se uvádí v rozmezí od 175 do 3570 Da. Tyto látky vykazují hydrofilní chování a jsou kyselé povahy. Je to z toho důvodu, že fulvinové kyseliny obsahují větší počet funkčních skupin kyselého charakteru, především skupin karboxylových ($-\text{COOH}$), fenolických ($-\text{OH}$) a karbonylových ($\text{C}=\text{O}$). Fulvinové kyseliny jsou díky těmto kyselým funkčním skupinám považovány za nejreaktivnější frakce huminových látek ve vodném prostředí [11; 16].

Huminové kyseliny tvoří nejkvalitnější složku huminových látek. Jsou to sloučeniny, které jsou rozpustné v bazických rozpouštědlech. Na rozdíl od fulvinových kyselin jsou však omezeně rozpustné ve vodě a nerozpustné za silně kyselých podmínek. Jsou to koloidní polydispergované látky tmavě hnědé až černé barvy a jsou, rovněž jako fulvinové kyseliny, hydrofilní a kyselé povahy [13]. Tyto sloučeniny mají velkou molekulovou hmotnost, která se pohybuje v rozmezí od několika stovek až po tisíce Daltonů. Tyto látky jsou tvořeny aromatickým jádrem, které je fenolového či chinonového typu. Na jádro jsou vázány alifatické řetězce s variabilním obsahem různých funkčních skupin, ze kterých reaktivitu ovlivňují nejvíce karboxylové ($-\text{COOH}$) a fenolické ($-\text{OH}$) skupiny. Kromě těchto funkčních skupin jsou v HK přítomny také enolové, hydrochinonové, laktónové, etherové, ketonové, methylové a alkoholové. V malém množství se mohou vyskytovat také skupiny aminové, sulfonové a fosfátové [16; 17]. V důsledku svého chemického složení, jsou huminové kyseliny schopné vázat polární i nepolární sloučeniny. Huminové kyseliny mohou být získány alkalickým loužením vhodné matrice a následným okyselením výluhu [13].

Kromě již zmíněných rozdílů v rozpustnosti a molekulové hmotnosti, se tyto dvě huminové látky liší také v rozdílném obsahu jednotlivých funkčních skupin v jejich struktuře. Zatímco u fulvinových kyselin je prakticky veškerý kyslík obsažen v karboxylových ($-\text{COOH}$), alkoholových ($-\text{OH}$) a ketonových funkčních skupinách, u huminových kyselin je kyslík především součástí esterových a etherových funkčních skupin. Fulvinové kyseliny mají ve své struktuře rovněž vyšší obsah ketonových $\text{C}=\text{O}$ skupin, kdežto u huminových kyselin se vyskytují spíše chinonové $\text{C}=\text{O}$ skupiny [16]. Huminové kyseliny obsahují také více aromatických struktur, zatímco fulvinové kyseliny mají ve své struktuře více alifatických postranních řetězců a mají tak více homogenní strukturu [18].

Dalším typem huminových látek jsou hmatomelanové kyseliny (HY). Jedná se o frakci huminových kyselin, která je rozpustná v alkoholech, a která se získává při extrakci huminové kyseliny za použití zásady. Tato frakce má světlejší barvu než huminová kyselina (světle hnědou) a má vyšší obsah uhlíku, přibližně 62 % [12].

Poslední hlavní složku huminových látek tvoří huminy. Jedná se o huminové látky černého zbarvení, které jsou nerozpustné jak v kyselých, tak v bazických rozpouštědlech. Vykazují vysoký stupeň kondenzace a polymerizace a jsou oproti huminovým kyselinám více dehydrované [16]. Tyto látky zůstávají po extrakci huminových a fulvinových kyselin z půdy jako nerozpustná složka. Vzhledem k jejich nerozpustnosti, obtížné extrakci a izolaci přilákaly tyto sloučeniny nejméně pozornosti výzkumu, ačkoliv je jejich přítomnost v půdách známá už od samotného počátku výzkumu huminových látek [11]. Podle některých autorů [12; 19] je humin směsí vysoce kondenzovaných huminových kyselin, které jsou silně vázané na jílové minerály, fungální melaniny a parafinické sloučeniny. Autoři Schnitzer a Khan [20] zase tvrdí, že má humin chemické složení blízké huminové kyselině, avšak s nižší aromaticitou. Předpokládají, že to souvisí s alifatickými polysacharidovými složkami v molekule huminu, které způsobují jeho nerozpustnost v alkalických rozpouštědlech. Vyšší obsah polysacharidů je podle autorů používán k odlišení huminu od huminové kyseliny.

2.3.2 Vznik huminových látek

Proces vzniku huminových látek neboli humifikace, není dodnes zcela objasněn a jedná se o jeden z nejzajímavějších aspektů chemie huminových látek. Existuje několik teorií vzniku těchto sloučenin. Jedná se zejména o degradační (ligninovou) teorii, syntetickou (polyfenolovou) teorii a kondenzační teorii [18]. Tyto mechanismy vzniku huminových látek, jejichž schéma je zobrazeno na Obr. 2, mohou působit ve všech půdách, avšak nikoliv ve stejné míře. Ligninová dráha může převládat ve špatně odvodněných půdách či v bažinách, zatímco syntéza huminových látek z polyfenolů může mít význam v některých lesních půdách. Syntéza humusu kondenzací cukrů a aminů zase může probíhat častěji v povrchových půdách v drsném kontinentálním podnebí, kde dochází k častým a ostrým výkyvům vlhkosti a teploty [11; 12].

Ligninová (degradační) teorie

Ligninová teorie byla po mnoho let řadou vědců považována za hlavní v oblasti syntézy huminových látek. V dnešní době je již považována za zastaralou, avšak lignin stále hraje roli v ostatních teoriích, které v současnosti podporuje většina autorů. Mezi těmito teoriemi má výsadní postavení polyfenolová teorie [11; 21].

Ligninová teorie popisuje vznik huminových látek mikrobiálním rozkladem odumřelého rostlinného materiálu, kdy z těžko rozložitelných látek jako je lignin, kutin nebo melanin vznikají vysokomolekulární huminy. Modifikace ligninu zahrnuje ztrátu methoxylových ($-OCH_3$) skupin za vzniku o-hydroxyfenolů a oxidaci alifatických postranních řetězců za vzniku karboxylových ($-COOH$) skupin. Vzniklé huminy jsou poté oxidací transformovány nejprve na huminové kyseliny a poté na fulvinové kyseliny, které mohou podléhat další dekompozici na ještě menší molekuly. Pokud degradační mechanismus dále pokračuje, jsou huminové látky postupně přeměněny až na oxid uhličitý a vodu [11; 12; 22].

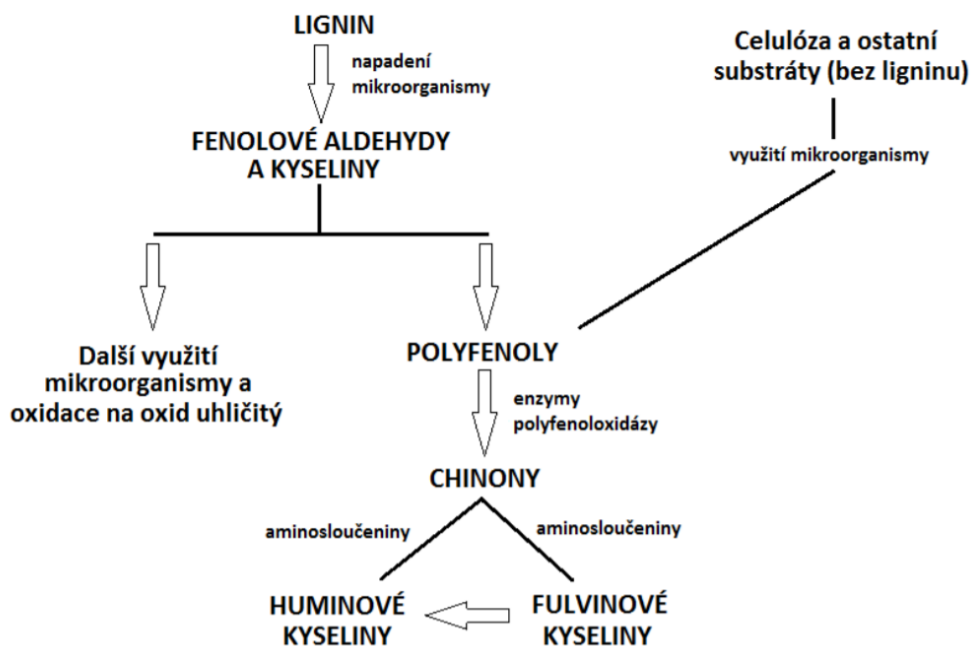
I přesto, že degradace ligninu mikroorganismy neprobíhá tak snadno jako u ostatních rostlinných složek, v přírodě existují mechanismy pro jeho úplný aerobní rozklad. Lignin může být zcela degradován houbami bílé hniloby (lignovorními), které jsou schopné produkovat lignolytické enzymy, které oxidativně štěpí monomery fenylypropanu na nízkomolekulární produkty ještě před samotnou syntézou HL. Tyto lignovorní houby se však běžně nenacházejí v sedimentech s vysokou vlhkostí [12; 21; 23]. Ostatní mikroorganismy, které jsou přítomny v půdě, jsou schopny rozložit lignin jen částečně. Při částečném rozkladu dojde sice k porušení mnoha vazeb biopolymeru, avšak zbytek skeletu se nerozpadá. Na vzniklá vazebná místa se mohou poté vázat různé části sloučenin, které se uvolňují z živného humusu během procesu mineralizace [24].

Polyfenolová (syntetická) teorie

V polyfenolové teorii jsou klíčovými složkami pro vznik huminových látek fenoly, chinony a aminokyseliny. Syntéza huminových látek zde může probíhat dvěma mechanismy. V prvním mechanismu zastává stále důležitou roli lignin, jelikož právě z něj se uvolňují fenolické aldehydy a kyseliny, které během mikrobiálního napadení podléhají enzymatické přeměně na chinony, jež poté polymerují za přítomnosti či nepřítomnosti aminosloučenin a dochází tak ke vzniku huminových látek.

Druhý mechanismus syntézy huminových látek je odlišný pouze v tom, že jsou polyfenoly syntetizovány mikroorganismy z jiných zdrojů než z ligninu, například z celulózy nebo jiných polysacharidů. Při tomto procesu dochází k rozkladu celulózy aerobními myxobakteriemi a vzniklé fenoly jsou poté oxidovány na chinony za působení enzymů polyfenoloxidázy. Chinony následně reagují s dusíkatými sloučeninami za vzniku huminových látek.

Mezi další zdroje fenolů pak uvádí autoři také rostlinná pletiva, která neobsahují lignin, např. mechy a kapradiny. Většina autorů však v současnosti upřednostňuje koncept, podle kterého huminové látky vznikají z chinonů a z ligninů, které byly syntetizovány mikroorganismy [12; 19; 25].



Obr. 2: Ligninová a polyfenolová teorie vzniku HL [26]

Kondenzace sacharidů s aminy

Představu, že jsou huminové látky tvořeny ze sacharidů lze spatřit do samotného počátku chemie huminových látek. Podle tohoto konceptu jsou klíčovými složkami pro syntézu huminových látek monosacharidy a aminokyseliny a nejsou zde přítomny žádné deriváty ligninu. Redukující monosacharidy a aminokyseliny, vytvořené jako vedlejší produkty mikrobiálního metabolismu, se zde podrobují ne-enzymatické či abiotické polymeraci za vzniku dusíkatých polymerů.

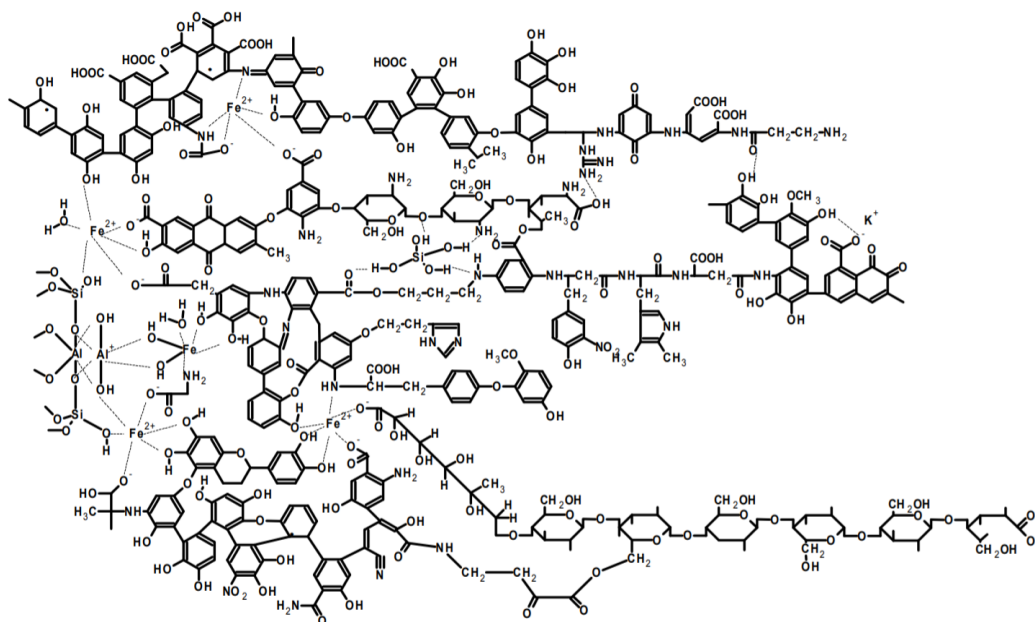
Mechanismus začíná vznikem Schiffovy báze, která je výsledkem reakce monosacharidu s aminem. Sloučenina je poté převedena na n-substituovaný glykosylamin, který následně podstoupí komplikovaný Amadoriho přesmyk. Produktem tohoto přesmyku, zahrnujícího glykosylamin, je N-substituovaná-1-amino-deoxy-2-ketóza, která poté podléhá fragmentaci a ztrátě vody. Výsledné sloučeniny, jako acetal, glycerinaldehyd, dihydroxyaceton, reduktony a hydroxymethylfurfural, jsou všechny vysoce reaktivní a snadno polymerují v přítomnosti aminosloučenin za vzniku huminových látek [11; 12; 27].

2.3.3 Molekulární struktura huminových látek

Pochopení molekulární struktury huminových látek je nejdůležitější a zároveň nejobtížnější oblastí půdní chemie, kterou se již několik desítek zabývají mnohé vědecké týmy [17]. Huminové látky jsou polydisperzní polyelektrolyty a jako takové sdílejí charakteristicky vysoký stupeň molekulární nepravidlosti a heterogenity. V důsledku toho neexistují v půdě či ve vodě žádné dvě identické molekuly huminových látek, a proto stále neexistuje žádný obecný strukturní vzorec pro tyto organické látky [28].

Ačkoli není možné uvést žádný obecný strukturní vzorec huminové látky, je publikováno mnoho studií zabývajících se molekulárními modely těchto látek, které vznikaly jako důsledek polymerního modelu. Jedním z mnoha strukturních modelů huminových látek je

Kleinhempelův model, zobrazený na Obr. 3, který ukazuje teoretickou molekulu půdní huminové látky adsorbované na povrchu jílové částice. Na molekule lze snadno identifikovat aromatické struktury, alifatické řetězce, sacharidy, volné radikály, peptidové vazby a chinoidní struktury. Kyselou povahu lze podle Kleinhempela přičíst velkému množství karboxylových ($-\text{COOH}$) a fenolických ($-\text{OH}$) funkčních skupin, které nejsou v rovnováze se základními funkčními skupinami, jako jsou aminové ($-\text{NH}_2$) skupiny [28].



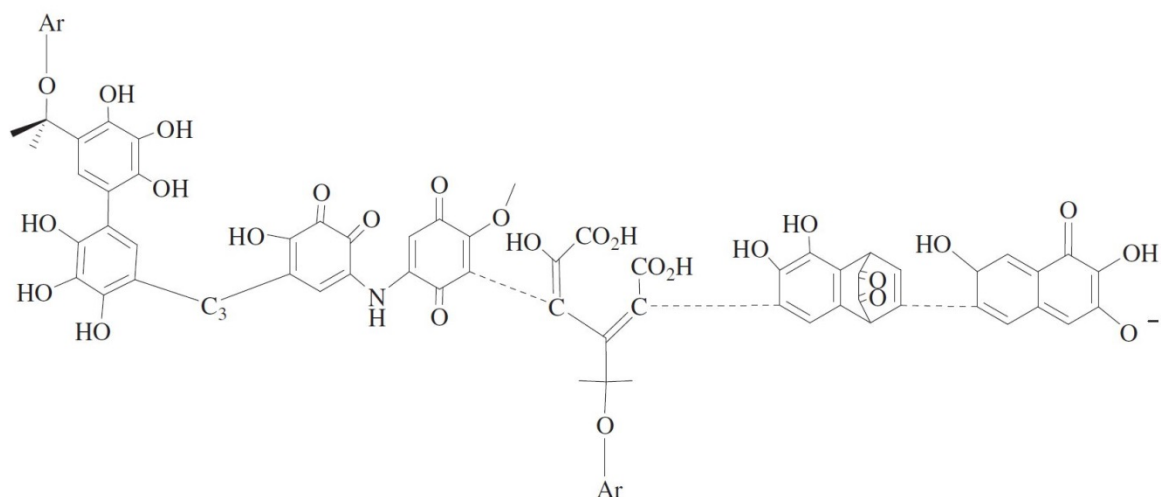
Obr. 3: Molekulární struktura HK podle Kleinhempela (1970) [29]

Polymerní model struktury huminových látek

Za jeden z původních modelů struktury huminových kyselin byl označován tzv. polymerní model. Tento hypotetický model, který autoři získali pozorováním huminových kyselin pod elektronovým mikroskopem, charakterizuje huminové kyseliny jako látky s polymerní strukturou, která se objevuje ve formě kruhů, řetězců a klastrů [30]. Na základě polymerního modelu bylo publikováno několik hypotéz o struktuře huminových kyselin, avšak těmito hypotézám schází žádoucí jednotnost a stále je kolem nich spousta neshod. Mezi nejčastěji uváděné strukturální modely patří struktury podle Schnitzera a Khana (1972), Flaiga (1975), Stevensona (1994) a Schnitzera a Schultena (1994) [31; 32].

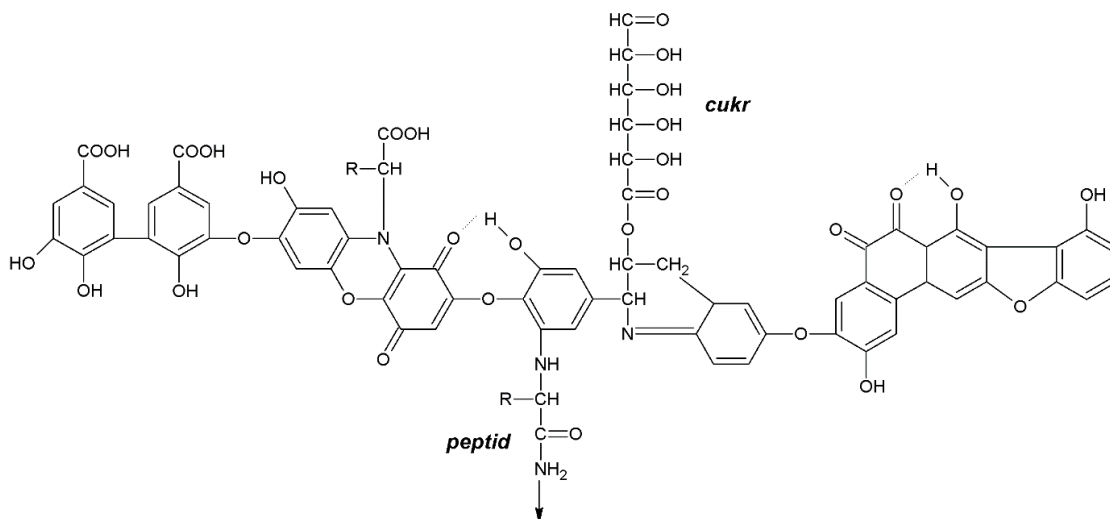
Strukturální model Schnitzera a Khana [14] se zakládá na informacích získaných z chemické degradace fulvinových kyselin. Autoři zastávají názor, že huminové látky je nutné nejprve rozdělit na jednotlivé podjednotky, aby bylo následně možné studovat jejich strukturu. Na degradaci fulvinové kyseliny použili autoři ve své studii metody oxidace, redukce, hydrolýzy a biologické degradace. Na základě převládajících nálezů benzenových derivátů Schnitzer a Khan předpokládali, že je fulvinová kyselina složená z fenolových a benzenkarboxylových kyselin, které jsou navzájem spojeny vodíkovými vazbami za vzniku polymerní struktury, ve které mohou být zachyceny další organické sloučeniny, jako jsou aminokyseliny a sacharidy [31].

Flaig a spol. [33] se naproti tomu domnívali, že lignin je zdrojem či výchozím bodem pro tvorbu huminových a fulvinových kyselin. Předpokládali, že je lignin štěpen degradací či rozkladem na jeho základní jednotky (tj. monomery koniferylalkoholu nebo guajacylu). Tyto základní jednotky ligninu nejprve podléhají oxidaci, poté demethylaci na substitutované polyfenoly a následně další oxidací na chinonové deriváty. Kondenzací chinonových skupin s aminokyselinami a polysacharidy se pak mohou formovat látky podobné huminové kyselině. Produkty ligninové degradace byly detekovány při hydrolyze huminových kyselin. Tato teorie je známá pod pojmem lignoproteinová teorie [31].



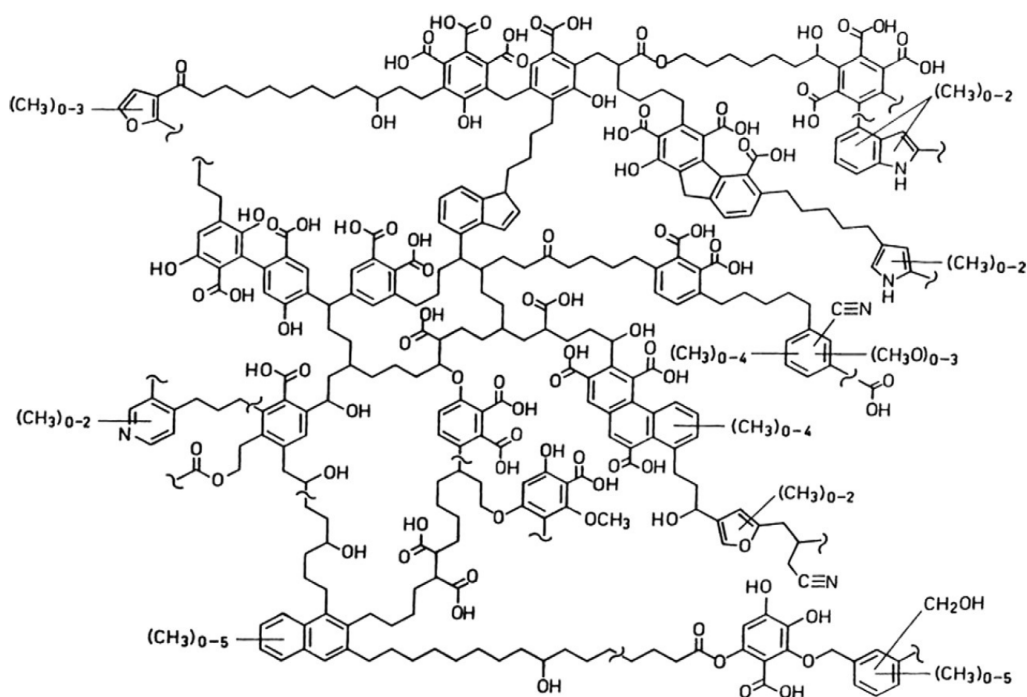
Obr. 4: Molekulární struktura HK podle Flaiga (1975) [34]

Podle Stevenson (1994) se mohou huminové látky formovat všemi výše diskutovanými mechanismy. Autor zastává názor, že k vytvoření složité struktury HL přispěly mechanismy popsané v lignoproteinové teorii, polyfenolové teorii a v teorii kondenzace cukrů a aminů. Kondenzační reakce se účastní velké množství prekurzorů, které tak mohou vést k řadě kombinací. Proto Stevenson pro zjednodušení tohoto složitého strukturního problému navrhl tzv. koncept dimeru, ve kterém rozdělil jádro huminové molekuly do čtyř stavebních jednotek: dimer, vytvořený spojením dvou ligninových monomerů, fenol-aminový komplex, hydrochinon a ligninová jednotka C₆ – C₃ [31]. Strukturní vzorec huminové kyseliny podle Stevenson je zobrazen na Obr. 5.



Obr. 5: Molekulární struktura HK podle Stevenson (1994) [16]

V Schultenově a Schnitzerově modelu (1994), je struktura huminových kyselin tvořena aromatickými kruhy, které jsou navzájem spojeny alkylovými strukturami s dlouhým řetězcem. Autoři lokalizovali velké množství karboxylových a hydroxylových funkčních skupin jak na samotných aromatických kruzích, tak na alkylových bočních řetězcích [35]. Autoři se ve své práci pokusili pomocí softwarového modelování vytvořit sofistikovanější trojrozměrný strukturní model huminových látek. Navázali tak na Hatchera a spol. [36], kteří vytvořili jednoduché dvojrozměrné diagramy struktur huminových látek. Tato 3D struktura, ve které byly přítomny jak flexibilní kovalentní vazby, tak nevazebné vodíkové vazby a van der Waalsovy síly, by podle autorů mohla zachytit tři hlavní složky HL, kterými jsou aromatické a alifatické sloučeniny a také sloučeniny obsahující dusík.

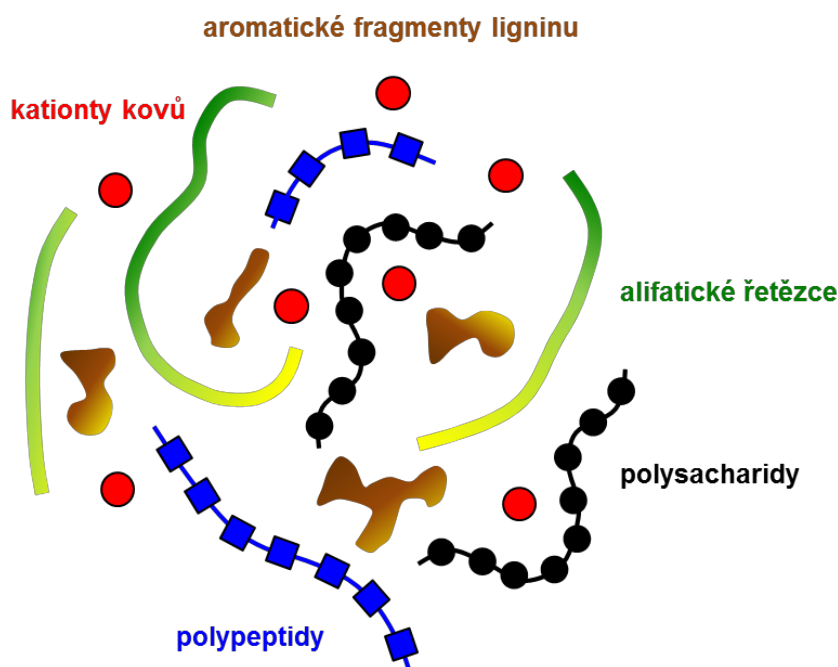


Obr. 6: Molekulární struktura HK podle Schnitzera a Schultena (1994) [34]

Supramolekulární model struktury huminových látek

Spolu s novými a modernějšími analytickými metodami, se nevyhnutelně vyvinul pokrok a s ním i nový pohled na strukturu huminových látek. Mezi tyto analytické metody patřila zejména pyrolýza spojená s různými chromatografickými metodami, dále termochemolýza, hmotnostní spektrometrie, gelová permeační chromatografie a nukleární magnetická rezonance izotopu uhlíku ^{13}C [37]. Supramolekulární model struktury (Obr. 7) navrhli Piccolo a spol. [38], kteří tak vyvrátili dosud tradiční názor, že huminové látky jsou biopolymery v rozličných přírodních matricích. Tradiční názor, že huminové látky jsou biopolymery, totiž není podložen žádnými přímými důkazy a je založen pouze na základě laboratorních experimentů s modelovými molekulami, navíc s nesprávně použitými analytickými a matematickými postupy. Velké množství důkazů místo toho ukazuje alternativní chápání konformační povahy huminových látek, které by mělo být podle Piccolla a spol. považováno za supramolekulární asociace samovolně se seskupujících heterogenních a relativně malých molekul odvozených z rozkladu a degradace odumřelého biologického materiálu.

Hlavním aspektem huminové supramolekulární struktury je, že je převážně stabilizována slabými disperzními silami namísto kovalentních vazeb. Za velkou velikost molekul huminových látek jsou zodpovědné vodíkové vazby společně s hydrofobními interakcemi (van der Waalsovy síly, π - π a CH- π interakce), jejichž účinek se zvětšuje se zvyšujícím se pH. Tento novější popis struktury huminových látek lépe odpovídá jejich zásadní úloze při zajišťování a udržení fyzikálních a chemických vlastností půdy, ale také jejich reaktivitě vůči pesticidům a dalším environmentálním kontaminantům půdy [38].



Obr. 7: Supramolekulární struktura HL [32]

Supramolekulární teorii podpořil také Simpson (2002), který zkoumal roztoky huminových látek pomocí vícerozměrné NMR spektrometrie, konkrétně pomocí metody dvourozměrné Diffusion-ordered spectroscopy (DOSY) [39; 40]. Dalšími autory, kteří se přiklání k této

teorii jsou Pédrot a spol. [41], kteří ve své studii potvrdili přítomnost ne vazebných interakcí v supramolekulární struktuře huminových látek. Autoři dále zjistili, že na destabilizaci struktury těchto látek má výrazný vliv nízká hodnota pH. Změna huminové konformační struktury může být podle autorů klíčovým faktorem, který určuje mobilitu zachycených kationtů a kationtů tvořící komplexy.

2.3.4 Využití huminových látek

Huminové látky a DOM představují jednu z největších zásobáren uhlíku na planetě Zemi. Už od pradávna lidé využívali cenných vlastností huminových látek, aniž by si to vůbec uvědomovali, nebo aniž by měli bližší představu o jejich charakteru či původu. V dřívějších dobách je lidé používali při léčení široké škály onemocnění (např. léčení ran, bahenní koupele). V poslední době jsou tyto přírodní organické sloučeniny využívány díky svým specifickým vlastnostem zejména v zemědělství, průmyslu, životním prostředí a biomedicíně [42; 43].

Aplikace v zemědělství

Huminové látky hrají důležitou roli z agronomického hlediska, jelikož významně ovlivňují kvalitu a produktivitu půdy. Kromě zlepšení fyzikálních vlastností a vlhkosti půdy vykazují huminové látky také vysokou výměnnou kapacitu, což je určujícím faktorem pro úrodnost půdy. V současné době se huminové látky používají jako přísady do anorganických hnojiv. Ke zvýšení úrodnosti půdy se používají zejména různé soli huminových látek, jako jsou například humát vápenatý, humát sodný a humát amonný.

Produktivita půdy se za přítomnosti huminových látek zvyšuje různými způsoby. Důležité jsou tzv. nepřímé účinky huminových látek, které tvoří s železem a dalšími kovy chelátové komplexy, které jsou poté dodávány rostlinám, a které účinně reagují na skutečné potřeby rostlin v důsledku nedostatku mikroprvku v půdě. Další role huminových látek spočívá ve zvýšení kvality půd, které jsou velmi chudé na organickou hmotu, a také ke zvýšení produkce biomasy tak, že v kořenové části rostlin udržují tyto látky ve vodě rozpustná anorganická hnojiva a snižují tak jejich vyluhování a následnou mobilitu v půdním prostředí [42; 44].

Průmyslové využití

Huminové látky se používají v několika různých odvětvích průmyslu. HL a materiály obsahující HL se používají například ve stavebnictví jako přísady k řízení rychlosti tuhnutí betonu. Dále našly HL uplatnění také při úpravě kůže. Zpočátku byly využívány jako barvivo na kůži, později jako prostředek pro činění a nakonec jako přísada pro roztok k finální úpravě kůže. Další oblastí, kde se používají HL je dřevozpracující průmysl. Jejich využití zde spočívá v přípravě přírodního indiga k barvení dřevěné dýhy, nebo jako složka ve vodě rozpustných mořidel pro dřevěný nábytek. Huminové látky našly také uplatnění při výrobě plastů, zejména jako tvrdidla polyuretanových pěn či barviva pro barvení polymerů Nylonu 6 nebo PVC. V případě PVC jsou tyto látky využity také jako jedna z přísad do změkčovadel tohoto polymeru. Dalším průmyslem, kde našly huminové látky uplatnění je papírenský průmysl a keramický průmysl. V papírenském průmyslu jsou HL využívány v různých výrobních

postupech, například při výrobě papíru s vysokou pevností v tahu, při výrobě elektricky vodivého papíru, nebo také při recyklaci papíru. V keramickém průmyslu se HL používají hlavně jako přísady ke zvýšení mechanické pevnosti nezpracované keramiky, ke zlepšení reologických vlastností keramiky, k barvení keramických dlaždic nebo k přípravě kameniny.

Huminové látky se v průmyslu také používají jako iontoměniče, nebo mohou být použity ke zvýšení těžby uranu z jeho rud. Jsou také součástí syntetických uhlovodíků a topných olejů. Jejich schopnost zadržovat přechodné kovy a vytvářet metalorganické komplexy má za následek, že jsou tyto kovy více dostupné pro rostliny, které je pak začleňují do potravinového řetězce. Zajímavé jsou také možnosti průmyslové výroby těchto látek při zpracování odpadu. Studie ukázaly, že při výrobě recyklovaných nápojových kartonů dochází ke konverzi celulózy na lignohumáty tzn. HL antropogenní povahy [42; 45].

Ochrana životního prostředí

Přírodní organické koloidy jsou důležité, jelikož tvoří ve vodě rozpustné komplexy s mnoha kovy včetně radionuklidů. Bylo potvrzeno, že přítomnost huminových látek v přírodních vodách může ovlivnit migraci radionuklidů do povrchových a podzemních vod. Transport radionuklidů prostředím však mohou zajistit pouze FK. V případě HK se tato xenobiotika vážou na minerální částice v tzv. organominerálním komplexu a jsou tedy imobilizovány.

Hlavním úkolem huminových látek v životním prostředí je odstranit toxické kovy, antropogenní organické chemikálie a jiné znečišťující látky z vody. Bylo zjištěno, že iontoměničové materiály na bázi humátu vápenatého jsou vhodné k odstraňování těžkých kovů jako jsou Fe^{2+} , Fe^{3+} , Ni^{2+} , Hg^{2+} , Cd^{2+} a Cu^{2+} z přírodních vod, a také k odstraňování radioaktivních prvků z odpadních vod jaderných elektráren. Huminové látky jsou také schopné se selektivně vázat, čehož se využívá při odstraňování chemických bojových látek. Materiály obsahující huminové látky jsou také používány pro adsorpci plynů, kdy lze mírně upravené humáty použít k odstranění sirovodíku a thiolu (merkaptanu) ze zemního plynu a oxidu siřičitého ze zplodin. Tyto materiály jsou díky svým adsorpčním schopnostem schopné zachytit i další znečišťující látky jako jsou herbicidy, fungicidy, insekticidy, dioxiny a také některé farmaceutické výrobky, mezi něž patří např. estrogeny sloučeniny [42; 46; 47; 48].

Lékařství a biomedicína

V současné době neustále roste zájem o aplikaci huminových látek v medicíně a biologii. Hlavním důvodem zvýšené pozornosti, která je věnována těmto látkám, jsou jejich antivirové, profibrinolytické, protizánětlivé a estrogeny účinky. Další důležitou vlastností huminových látek je jejich potenciál vytvářet chelátové komplexy s těžkými kovy (jako je kadmium), díky čemuž dochází jejich vlivem k eliminaci těchto kovů v živých organismů. Bylo také pozorováno, že huminové látky ve vodních systémech a vodních sedimentech úzce souvisejí s účinností hydroterapie a balneoterapie.

Důležitou roli v biomedicíně zastávají také fulvinové kyseliny, u kterých mnoho lékařských studií poukázalo na skutečnost, že tyto látky mají schopnost chránit organismus

před rakovinou a před viry způsobujícími rakovinu. Studie také často poukazují na speciální léčebné terapie huminovými látkami, které by měly průběh této nemoci zcela zvrátit. Jiné klinické studie také ukázaly, že obtížně léčitelná virová respirační onemocnění, častá u dětí, mohou být snadno léčena doplňkem stravy, který obsahuje fulvinové kyseliny [42; 49].

Huminové látky však nemusí mít pouze pozitivní vliv na lidský organismus. Mnohé studie [50] prokázaly, že huminová kyselina může být toxická pro mnoho savčích buněk, avšak její konkrétní mechanismus cytotoxicity zůstává stále nejasný. Vliv na toxicitu huminových kyselin mohou mít jejich redoxní vlastnosti, kdy jsou huminové kyseliny schopné redukovat a uvolňovat železo z feritinu. Bylo prokázáno, že uvolněné železo urychluje peroxidaci (oxidační degradaci) lipidů vyvolanou huminovou kyselinou. Huminové kyseliny spojené s uvolňováním železa proto mohou narušit redoxní rovnováhu a vyvolat tak oxidační stres v biologickém systému. Tento mechanismus může mít zásadní vliv na vyvolanou cytotoxicitu huminových kyselin v organismu savců.

2.4 Rozdělení organické hmoty dle velikosti částic

Půda je složitým systémem fyzikálních, chemických a biologických komponent, vzájemně interagujících mezi sebou. Koloidizací půdy dochází ke vzniku tzv. půdních agregátů, které jsou považovány za nejmenší funkční jednotky. Jsou to stabilní složené struktury, které lze rozdělit do různých tříd podle molekulových hmotností, nebo podle jejich velikostí v měřítku od centimetrů až po mikrometry. Tvorba agregátů nastává při kohezi a shlukování minerálních částic a organické hmoty (OM). Klíčovou úlohu při tomto procesu zastávají organické materiály různého původu.

Půdní organická hmota (SOM) je přítomna v různých formách a stavech, od čerstvého a nerozloženého materiálu až po vysoce degradovaný či stabilizovaný SOM. Půdní OM tvoří 4–6 % z celkové hmotnosti půdy. Jedná se o důležitou součást půdy, která právě odlišuje půdu od horniny, a která zajišťuje její úrodnost. SOM je definována jako soubor organických látek nahromaděných v půdě, jež pochází z odumřelých zbytků rostlin, živočichů a mikroorganismů v různém stupni přeměny a v různém stupni smíšení s minerálním podílem. Podle Bucka a spol. [51] ji lze rozdělit dle velikosti na částicovou organickou hmotu (POM) a rozpuštěnou organickou hmotu (DOM). Při tvorbě agregátu tvoří POM jádro, které se obklopuje minerálními částicemi, a ty poté chrání implementovanou POM před další mikrobiální degradací, čímž dochází ke stabilizaci agregátu. Podobně hraje důležitou roli při tvorbě SOM rozpuštěná organická hmota (DOM), která vzhledem ke své mobilitě zprostředkovává přenos živin v rámci ekosystému i mezi ekosystémy [52].

2.4.1 Částicová organická hmota (POM)

Částicová organická hmota (POM) je heterogenní směs sorbované organické hmoty obsahující nabitě a neutrální funkční skupiny. Částice této organické hmoty dosahují velikostí 0,45 μm až 1000 μm . Jak již bylo zmíněno výše, POM zahrnuje neustále se rozkládající zbytky rostlin, živočichů a mikroorganismů, které se výrazně podílejí na jejím rozkladu a humifikaci. Při rozkladu poskytuje POM velkou část energie potřebnou pro půdní organismy a zajišťuje stálé uvolňování živin do půdního prostředí. Množství živin uvolněných během rozkladu závisí na biologických a chemických vlastnostech POM, jako je poměr

zastoupení uhlíku a dusíku. Kromě uvolňování živin hrají důležitou roli při zkvalitnění struktury půdy také tzv. rozkladače, které kolonizují POM. Mezi nejmenější rozkladače POM patří houby, které vytváří plísňové mycelium, jež zaplétá částice půdy a uvolňuje do půdy rozličné exudáty, které nakonec tvoří již zmíněné agregáty půdy. Obsah POM v půdě je ovlivňován organickými vstupy a aktivitou půdních rozkladačů. Přidání organických materiálů, jako je hnůj nebo zbytky plodin, obvykle vede ke zvýšení POM. Rozklad POM je ovlivňován také teplotou a vlhkostí půdy [53; 54; 55].

2.4.2 Rozpuštěná organická hmota (DOM)

Rozpuštěná organická hmota (DOM) je heterogenní skupina ve vodě rozpustných sloučenin, které obsahují redukovaný (organický) uhlík z různých biologických a geologických zdrojů. Je to složitá směs organických molekul složená nejen z uhlíku, vodíku a kyslíku, ale také z heteroatomů dusíku, fosforu a síry. Tato heterogenita výrazně ztěžuje přesnou charakterizaci této OM. Kvůli různorodému molekulárnímu složení může být DOM vysoce reaktivní a podporovat tak růst mikroorganismů, nebo může být na druhou stranu poměrně neaktivní. Rozpuštěná OM bývá často definována jako jakákoliv OM, která je schopná projít filtrem, čímž se zásadně liší od POM. Částice této frakce OM zaujímají velikost $< 0,45 \mu\text{m}$. Jedná se o klíčovou složku v biochemickém cyklu uhlíku, a také nejmobilnější frakci půdních organických látek.

Specifické molekulární složení DOM je důležité pro pochopení její reaktivity a úlohy jakou zastává v přírodním prostředí. DOM se skládá z široké škály biomolekul a organických skupin od velkých biopolymerů a geopolymérů, až po nízkomolekulární monomery. Dominantní třídy biomolekul zahrnují proteiny, nukleové kyseliny, karbohydráty (cukry), lipidy (mastné kyseliny, steroly a alkeny), pigmenty a řady menších primárních a sekundárních metabolitů. Rozpuštěná OM může také zahrnovat geologicky a antropogenně odvozené sloučeniny, mezi něž patří zejména pesticidy, detergenty, povrchově aktivní látky, léčiva, sloučeniny odvozené od ropy a další vznikající kontaminující látky.

Jak již bylo zmíněno dříve, DOM hraje hlavní roli v uhlíkovém cyklu a různorodost všech přítomných molekul zapříčiňuje, že některé frakce OM jsou labilní a snadno odbouratelné různými mikroorganismy, zatímco ostatní frakce jsou stabilní a mohou přetrvávat tisíce let. Hlavním zdrojem labilních a snadno rozložitelných látek v půdě jsou rostlinné zbytky, kořenové zbytky a půdní mikroorganismy. Vedlejšími zdroji labilních látek v půdě pak jsou organická hnojiva a rozličné exsudáty. Na množství rozpuštěných látek má vliv biologická aktivita půdy, adsorpční a desorpční procesy v půdě, půdní reakce, chemismus půdy a složení půdního roztoku, klimatické podmínky (srážky a teplota) a antropogenní vlivy (hnojení, závlahy odlesnění atd.) [56; 57].

2.5 Současný stav řešené problematiky

Frakcionace organické hmoty (OM) je již dlouhodobě významným krokem k objasnění, jakou roli zastává OM v půdních procesech. Frakcionace se provádí kvůli několika účelům, jako je pochopení procesů stabilizace půdního organického uhlíku (SOC), kvantifikace potenciálně labilních SOC či krátkodobě dostupných makroživin v rostlinách, nebo kvantifikace environmentálních změn při dlouhodobé sekvestraci SOC. Úspěšná frakcionace HL rozšiřuje naše znalosti o jejich molekulové hmotnosti, obsahu funkčních skupin nebo prvkovém složení [58]. K frakcionaci OM se v dnešní době používá celá řada metod, přičemž všechny poskytují důležité informace o funkci OM v půdě. Jednotlivé frakce lze určit na základě odlišných fyzikálních a chemických parametrů, a proto lze frakcionační metody rozdělit na fyzikální a chemické. Metody fyzikální frakcionace bývají zpravidla nedestruktivní, zatímco postupy chemické frakcionace bývají většinou destruktivní. V současnosti se však čím dál více využívají frakcionační metody založené na instrumentálních technikách, zejména pak na chromatografických [59; 60; 61].

2.5.1 Fyzikální frakcionace OM

Fyzikální frakcionace půdy zdůrazňuje úlohu půdních minerálů a strukturu půdy při obnově SOM. Pojem fyzikální frakcionace zahrnuje řadu různých metod, z nichž je každá navržena pro konkrétní účel, a dosud nebylo přijato žádné obecné schéma frakcionace. Společným prvkem však je, že se většina metod pokouší vyhnout jakýmkoliv chemickým změnám v SOM během procesu frakcionace. Zachování neporušených agregátů půdy je užitečné pro všechny výzkumné otázky, které se konkrétně zabývají strukturou půdy, protože poskytuje představu o současném rozdělení agregátů v půdě. Fyzikální frakcionace se také snaží rozlišovat mezi SOM, která není pevně vázaná s půdními materiály, SOM, která je začleněna do primárních organominerálních komplexů a SOM, která je zachycena v agregátech, tedy v sekundárních organominerálních komplexech. Fyzikální frakcionace zahrnuje metody separace SOM na základě rozdílné hustoty, velikosti částic či stupně disperzity půdy. Mezi tyto metody patří sedimentace částic rozdílné hustoty, prosévání, ultrafiltrace, nebo mechanická a ultrazvuková dispergace [59; 62; 63].

Metody fyzikální frakcionace použili ve své studii Six a spol. [60] k separaci a identifikaci organického uhlíku ze šesti různých vzorků lesních půd v Severní Americe. Pomocí prosévání a flotace izolovali frakce agregovaných částic organických látek o různé velikosti. K frakcionaci použili autoři síta o velikostech ok 2000, 250 a 53 μm a proséváním za mokra rozdělili organickou hmotu na mikroagregáty (53–250 μm) a makroagregáty (250–2000 μm). Z mikroagregátů poté pomocí flotace v polywolframanu sodném izolovali částicovou organickou hmotu, ze které analyticky stanovili množství organického uhlíku ve vzorcích půdy.

Při studování struktury SOM použili autoři Schmidt a spol. [64] ve své práci metodu ultrazvukové dispergace k izolaci primárních organominerálních komplexů z půd. Tuto metodu fyzikální frakcionace autoři provedli ve třech horizontech A a ve dvou horizontech B, pocházejících ze čtyř typů půd (glejosol, černice, podzol, alisol) lišících se jejich pedogenezí. Jednotlivé dispergované vzorky byly rozděleny do sedmi frakcí podle velikosti jejich částic. Autoři usoudili, že použitá ultrazvuková dispergace byla dostatečná pro úplné rozptýlení

vzorků z různých půd a pedogenetických horizontů. Ultrazvukovou dispergací také podle autorů nedošlo ke změně struktury SOM, a ani ke snížení jejího obsahu v půdě. Podle tohoto poznatku dospěli autoři k názoru, že se zvyšující se ultrazvukovou energií, dochází při rozpadu agregátů k uvolňování primárních organominerálních komplexů, které si zachovávají přidruženou OM.

2.5.2 Chemická frakcionace OM

Metody chemické frakcionace lze rozdělit na extrakci, hydrolyzu a oxidaci. Kromě toho jsou také používány chemikálie k destrukci minerálů, což slouží k následnému uvolňování organické hmoty z těchto minerálů. Extrakce se provádí nejčastěji ve vodě, vodných roztocích o různé iontové síle, organických rozpouštědlech nebo zásadách, jako je NaOH nebo $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$. Hydrolyza se provádí vodou nebo kyselinami, jako jsou HCl nebo HF. Výhodou obou postupů je, že poskytují čisté organické frakce bez minerálních částic. Podstatou hydrolyzy je izolovat frakce OM s odlišnými chemickými vlastnostmi, u nichž se předpokládá, že jsou důležité pro jejich chování v půdě. Metoda oxidace se naproti tomu provádí tak, že napodobuje silný exoenzymatický rozpad a izoluje frakci, která je poté stabilizována proti rozkladu [63; 65].

Autoři Rumpel a spol. [66] se ve své práci snažili odhalit, jaký účinek mají metody chemické frakcionace na chemické složení OM s vysokým stupněm humifikace a OM se značným obsahem minerálních látek. Vzorky autoři odebrali z ornice (horizont O) a z horizontu obsahující humus (horizont A) z dystrického kambisolu. V samotném experimentu autoři nejprve vysušili vzorky kambisolu a poté z něj pomocí metody prosévání odstranili frakce o velikosti částic > 2 mm. Následně provedli bazickou hydrolyzu, pomocí které se jim podařilo uvolnit z jednotlivých horizontů půdy 9–30 % organického materiálu sestávajícího z alkoholů, karboxylových kyselin a hydroxykyselin. Značnou část OM, nacházející se v horizontu s nejvyšším stupněm humifikace a obsahem půdních minerálů, tedy horizontu A, se však autorům nepodařilo extrahovat. Rumpel a spol. tak došli k závěru, že při procesu bazické hydrolyzy došlo pravděpodobně k odstranění velkého množství alifatických biopolymerů, které byly dominantní součástí horizontu A. Zbývající alifatický materiál byl pak nejspíš přítomen v ne-esterově vázaných strukturách, které byly silně vázány s půdními minerály.

Metody chemické frakcionace OM ve své studii použili i autoři Mikutta a spol. [67], kteří analyzovali izotopové složení (^{14}C , ^{13}C) OM vázané s minerály a OM odolné proti rozkladu, nacházející se v podpovrchových horizontech v deseti kyselých lesních půdách. Pro frakcionaci OM autoři využili nejprve metodu oxidace pomocí chlornanu sodného (NaClO) a poté kyselou hydrolyzu za použití kyseliny fluorovodíkové (HF). V experimentu autoři pomocí analýzy a výpočtů zjistili, že po oxidaci NaClO došlo k vyextrahování labilní složky organické hmoty (LOC), která představuje částicovou OM a oxidovatelnou část OM, a v pevném zbytku zůstala stabilní složka organické hmoty (SOC). U následné hydrolyzy byla poté extrahována OM vázaná s minerály (MOC) a v pevném zbytku zůstala OM odolná proti rozkladu (ROC). Jako výhody NaClO oxidace autoři uvedli zejména její vysokou účinnost a spolehlivost při izolaci stabilní OM bez toho, aniž by došlo k rozpuštění pedogenních oxidů. Chemická degradace tímto oxidačním činidlem odstranila přednostně struktury OM, které

byly nechráněné minerální maticí. Jako přínos kyselé hydrolyzy HF pak autoři uvedli její schopnost rozpustit půdní minerály a minerály vázané s OM.

2.5.3 Frakcionace OM chromatografickými metodami

V dnešní době jsou chromatografické metody hojně využívány k izolaci a frakcionaci rozpuštěné organické hmoty (DOM). Díky jejich vysoké účinnosti jsou tyto techniky schopné rozdělit extrahovanou DOM do několika frakcí na základě odlišné velikosti molekul, rozdílné adsorpce k danému sorbentu, rozdílné polaritě směsi či na základě odlišného náboje [68].

Adsorpční chromatografie (SPE)

Princip metody adsorpční chromatografie spočívá v navázání rozpuštěné látky na pevnou fázi slabými van der Waalsovými silami. Adsorpce probíhá v kolonách, které mohou být naplněny anorganickými adsorbenty (aktivní uhlí, oxid hlinitý, hydroxid hlinitý, oxid hořečnatý, silikagel) nebo organickými makroporézními pryskyřicemi [69].

Adsorpci na pryskyřici XAD-8, společně s ultrafiltrací, použili Kitis a spol. [70] při zkoumání reaktivity vedlejších produktů dezinfekce vody, vznikajících při reakcích rozpuštěné organické hmoty (DOM) s dezinfekčními činidly. Autoři izolovali DOM ze dvou povrchových vod, z nichž každá měla výrazně odlišnou specifickou absorpci UV záření (SUVA), distribuci molekulové hmotnosti a polaritu. Po provedení frakcionace na pryskyřici XAD-8 a následné ultrafiltrace autoři získali sedm frakcí DOM lišících se jejich molekulovou hmotností. Výsledky z následné analýzy frakcí pomocí UV/Vis spektrometrie potvrdily, že frakcionací XAD-8 pryskyřicí a ani ultrafiltrací se nezměnily spektroskopické vlastnosti původní DOM. Během procesu rovněž nedošlo ke změně reaktivních míst v rámci DOM, zodpovědných za tvorbu vedlejších produktů dezinfekce. Na závěr se autoři shodli také na tom, že při navrhování frakcionačních experimentů v kolonách je klíčovým parametrem koeficient distribuce kolony (k'), podle kterého je možné porovnávat výsledky v různých vědeckých studiích.

Autoři Zherebker a spol. [71] ve své práci izolovali huminové látky ze sladkovodního zdroje pomocí dvou typů makroporézních adsorbentů, kterými byly pryskyřice Amberlite XAD-8 a náplň Bond Elute PPL v pevné fázi. Bond Elute PPL je polymer styren-divinylbenzenu (SDVB), který má modifikovaný hydrofobní povrch. Po izolaci huminových látek autoři poté provedli jejich analýzu pomocí metody iontové cyklotronové rezonance s Fourierovou transformací (FT-ICR MS) za účelem porovnání obou použitých adsorbentů. Z analýzy bylo zjištěno, že ačkoliv huminové látky izolované pomocí obou typů adsorbentů mají z velké části stejnou strukturu, tak se autorům i přesto podařilo mezi nimi objevit podstatnou selektivitu. Podle jejich výsledků byl produkt izolovaný na pryskyřici XAD-8 charakterizován vyšším stupněm aromaticity a vyšší mírou oxidace, zatímco produkt izolovaný pomocí náplně PPL měl vyšší koncentraci alifatických strukturních jednotek a obsahoval více dusíkatých složek.

Za účelem porozumění interakcím mezi přírodní organickou hmotou a kontaminanty použili autoři Dai a spol. [72] metodu adsorpční chromatografie na koloně obsahující pryskyřici XAD-8 a na koloně obsahující katex Amberlite IR-120. Pomocí této metody autoři nejprve izolovali FK ze vzorku půdy z rýžového pole (*Paddy Soil*) a následně u získané FK

provedli sekvenční frakcionaci za použití různých elučních činidel: ethanol, deionizovaná voda, tlumivé roztoky (pH=4,8; 7,0; 11,0). Všechny pět získaných frakcí FK poté autoři analyzovali pomocí instrumentálních technik (EA, FTIR, ¹H NMR, ¹³C NMR). Získané výsledky byly při porovnání jednotlivých metod sekvenční frakcionace konzistentní a shodovaly se na tom, že později eluované frakce obsahovaly nižší podíl karboxylových funkčních skupin a naopak vyšší podíl alkylových skupin než frakce, které byly eluovány dříve.

Velikostně-vylučovací chromatografie (SEC)

Běžnou separační metodou je velikostně-vylučovací chromatografie (SEC), která dělí jednotlivé složky OM na základě rozdílných velikostí a v některých případech na základě jejich molekulových hmotností. Chromatografická kolona je naplněna porézními kuličkami (o průměru menším než 10 μm) nejčastěji z polymerů dextranu (Sephadex), z agarózy (Sephacrose) nebo z polyakrylamidu (Sephacryl, BioGel P). Separace spočívá v tom, že největší frakce vycházejí z kolony nejdříve, jelikož vůbec nevstupují do pórů, kde by se na nějaký čas zdržely, zatímco menší frakce do pórů na určitou dobu vstupují a poté vycházejí z kolony v pořadí podle jejich klesající velikosti [73; 74].

Strukturní a funkční charakterizace rozpuštěné organické hmoty (DOM) je náročná z důvodu její inherentní heterogenity a její schopnosti tvořit složité komplexy. S relativně novou metodou založenou na preparativní vysoce účinné velikostně-vylučovací chromatografii (HPSEC) přišli autoři Chon a spol. [75], kteří jako mobilní fázi použili deionizovanou vodu a frakcionovali DOM v závislosti na rozdílné velikosti molekul a molekulové hmotnosti. Jako primární zdroje DOM autoři použili vzorek povrchové vody z řeky *Yeongsan* a vzorek odpadní vody z čističky odpadních vod. Autoři dospěli k závěru, že navrhovaná metoda preparativní HPSEC, používající deionizovanou vodu jako mobilní fázi, může účinně oddělit DOM do různých frakcí podle molekulové hmotnosti se zanedbatelnou ztrátou (výťažek > 97 %) rozpuštěného organického uhlíku (DOC). Kromě toho také nedochází během procesu k významným změnám ve struktuře DOM. Výsledky analýzy fluorescenční spektrometrie také odhalily, že každá frakce DOM vykazovala výrazně odlišné fyzikálně-chemické vlastnosti. Frakce DOM se střední hodnotou molekulové hmotnosti vykazovaly, oproti frakcím s nízkou a vysokou velikostí molekul, vyšší vazebnou afinitu k anorganickým kovům, a tedy vyšší pravděpodobnost tvorby komplexů.

Tenkvrstvá chromatografie (TLC)

Tenkvrstvá chromatografie je užitečnou metodou pro analýzu různých biologických sloučenin a přírodních produktů, jelikož poskytuje jednoduchou separaci a pohodlnou vizualizaci paralelně v relativně krátkém čase. Pomocí metody TLC dochází k separaci OM na základě odlišné adsorpce ke stacionární fázi, kterou bývá nejčastěji hliníková destička pokrytá sorbentem (silikagel, Al₂O₃) [76].

Metodu TLC ve spojení s testem potenciálu tvorby trihalomethanů (THMFP) použili při svém experimentu Eish a spol. [77] na frakcionaci HK a FK, izolovaných z vodních zdrojů. Na základě retenčního faktoru autoři identifikovali tři stejné frakce u HK i FK. U jednotlivých vzorků frakcí autoři následně analyzovali koncentrace rozpuštěného organického uhlíku

(DOC) a THMFP. Podle těchto analýz dospěli k závěru, že ke tvorbě trihalomethanů nejvíce přispěly tři primární frakce FK připravené při pH 6, zejména pak frakce č.1, která obsahovala nejvíce hydrofobní části a reagovala tak s chlorem, čímž přispěla k výrazné tvorbě chloroformu.

K frakcionaci FK, která byla izolovaná z HK, použili autoři Ma a spol. [78] tradiční metodu tenkovrstvé chromatografie. Jednotlivé získané frakce poté autoři analyzovali za použití metod UV/Vis spektrometrie a fluorescenční spektrometrie. Pomocí TLC se autorům podařilo identifikovat celkem osm frakcí FK, které se od sebe lišily nejen vizuálně, ale také svou střední molekulovou hmotností a absorpčními a fluorescenčními vlastnostmi. U některých frakcí FK autoři dokonce stanovili vyšší kvantový výtěžek fluorescence, než jaký byl u původního vzorku FK. Poměry fluorescence ku absorbanci, specifické absorbance a specifické fluorescence dále potvrdily vysokou složitost fulvinové kyseliny. Autoři u této přírodní sloučeniny navrhli více než 40 modelových organických sloučenin, které představují fluorofory a chromofory. Na závěr se Ma a spol. shodli na tom, že metoda TLC je velmi vhodná pro separaci, frakcionaci a vizualizaci těchto složitých biokoloidních sloučenin.

Khairy [79] ve své práci využil metodu tenkovrstvé chromatografie pro kvantitativní analýzu huminových kyselin. Autor použil k TLC frakcionaci celkem sedm vzorků přírodních HK, izolovaných z rašeliny, hnědého uhlí, ze dvou svrchních horizontů půdy, a také jeden vzorek syntetické HK. Po TLC frakcionaci obsahovaly všechny vzorky HK tři frakce, jejichž obsah byl silně vázán na použité přírodní matrici a na metodě izolace HK resp. pH extrakčního činidla. Khairy ve své studii zjistil, že u většiny HK existuje lineární vztah mezi koncentrací vzorku a vzdáleností chromatografické frakce od startu TLC chromatogramu. Autor rovněž uvedl, že zatímco přírodní HK byly rozděleny na jednotlivé zóny, v případě vzorku syntetické HK se vytvořil na chromatogramu jediný pás na sebe navazujících frakcí, což značně ztížilo stanovení hranic mezi jednotlivými frakcemi.

Tok ve fokusujících polích (FFF)

Frakcionace tokem ve fokusujících polích (FFF) je chromatografická metoda, při které se využívá současného působení sil efektivních polí a toku kapaliny na jednotlivé složky frakcionovaného vzorku uvnitř separačního kanálu. Podobně jako v chromatografii je zde vzorek v roztoku či disperzi transportován nosnou kapalinou, a při tom dochází k interakci pole se složkami vzorku, načež se vytvoří koncentrační gradient. Po dosažení rovnováhy jsou pak výsledné zóny složek vzorku fokusovány [80].

Benedetti a spol. [81] ve své práci využili metodu toku ve fokusujících polích k charakterizaci částicové a koloidní organické hmoty izolované z řeky *Amazonky* a řeky *Rio Negro*. V experimentu byla použita metoda FFF ke zkoumání distribuce molekulové hmotnosti koloidních částic. Tyto koloidní částice autoři rozdělili na frakci A (> 100 kDa) a frakci B (100 kDa – 5 kDa). Poté autoři provedli analýzu získaných frakcí OM pomocí UV/Vis spektrometrie, podle které zjistili, že koloidní frakce (A+B), izolované z řeky *Rio Negro*, představovaly 10–30 % z celkového množství organického uhlíku (TOC), zatímco rozpuštěný organický uhlík (DOC), získaný ze vzorku řeky *Amazonky*, představoval více než 75 % z TOC.

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Použité metody a přístroje

- UV/Vis spektrometrie (Hitachi U3900H, Hitachi High Technologies America, Inc);
- elementární analýza (EA3000, CHNS-O elementární analyzátor EuroVector);
- termogravimetrická analýza (TGA Q5000 termogravimetrický analyzátor TA Instruments);
- FTIR spektrometrie (Nicolet iS50, Thermo Fisher Scientific, Inc);
- fluorescenční spektrometrie (FluoroLog®, Horiba Jobin Yvon Scientific, Inc, a FS5 spektrofluorimetr, Edinburgh Instruments);
- lyofilizace (lyofilizátor Vir-Tis);
- rotační odparka;
- skleněná kolona malá pro DAX-8 (l ~ 250 mm, d ~ 40 mm);
- skleněná kolona velká pro Amberlite IR 120 (l ~ 600 mm, d ~ 50 mm);
- TLC destičky, Silica gel na TLC Al foliích, (š ~ 20 cm, h ~ 20 cm, Sigma Aldrich s.r.o.);

3.2 Použité chemikálie

- 0,1 M NaOH (Sigma Aldrich s.r.o.);
- 0,1 M KOH (Sigma Aldrich s.r.o.);
- 0,1 M HCl (Sigma Aldrich s.r.o.);
- 0,3 M HF (Sigma Aldrich s.r.o.);
- Na₂HPO₄·2H₂O, NaH₂PO₄·2H₂O (Sigma Aldrich s.r.o.);
- KCl (Sigma Aldrich s.r.o.);
- KBr pro FTIR spektrometrii (Sigma Aldrich s.r.o.);
- methanol p.a. (Sigma Aldrich s.r.o.);
- ethyl-acetát (Sigma Aldrich s.r.o.).

3.3 Charakterizace alginitu

U vzorku slovenského alginitu byla provedena základní fyzikálně-chemická charakterizace metodou elementární analýzy (EA), termogravimetrické analýzy (TGA) a infračervené spektrometrie s Fourierovou transformací (FTIR) za účelem zjištění jeho prvkového složení a obsahu funkčních skupin.

3.3.1 Elementární analýza

Elementární složení vzorku alginitu bylo získáno pomocí CHNS-O elementárního analyzátoru EA3000. Kalibrace elementárního analyzátoru byla provedena pomocí standardní látky *sulphanilamidu*. Do cínových kapslí bylo naváženo ~ 1 mg vzorku. Vzorek byl navážen celkem ve třech opakováních. Následně byly tyto navážené vzorky spáleny v atmosféře kyslíku při pracovní teplotě reaktoru 980 °C. Prvkové složení alginitu bylo získáno pomocí vyhodnocovacího programu *Callidus*TM5.1.

3.3.2 Termogravimetrická analýza

Vzorek alginitu byl termogravimetricky analyzován na TGA Q5000. Hmotnost navážky činila ~ 5 mg. Toto množství vzorku bylo spáleno z laboratorní teploty na konečnou teplotu 1000 °C v atmosféře vzduchu s průtokem 50 ml·min⁻¹ a s rychlostí ohřevu pece 10 °C·min⁻¹.

Ze získaných experimentálních dat byl poté určen obsah nespalitelného podílu, tj. popela, a také obsah sorbované vlhkosti.

3.3.3 Infračervená spektrometrie

Infračervená spektrometrie s Fourierovou transformací (FTIR) byla v této práci použita k získání základních informací o struktuře, povaze a obsahu jednotlivých funkčních skupin přítomných v alginitu. Pro získání FTIR spekter byla použita metoda DRIFT (*Diffuse Reflectance Infrared Fourier Transform Spectroscopy*).

Vzorek pro měření FTIR spektra alginitu byl připraven následujícím způsobem. V achátové třecí misce bylo rozetřeno 100 mg předem vyžíhaného KBr a k tomuto množství byly poté přidány 3 mg vzorku alginitu. Směs byla následně homogenizována a homogenizovaný vzorek byl vložen do nástavce difuzně-reflexní jednotky spektrometru Nicolet iS50. FTIR spektrum bylo měřeno v rozmezí vlnočtů $4000\text{--}400\text{ cm}^{-1}$ se spektrálním rozlišením 4 cm^{-1} a s počtem akumulovaných záznamů 512. Získané DRIFT spektrum bylo převedeno na jednotky *Kubelka-Munk*, které odpovídají jednotkám absorbance při transmisním měření, tzn. měření vzorku na průchod. FTIR spektrum vzorku bylo normalizováno na hodnotu nejintenzivnějšího absorpčního pásu přítomného ve spektru.

3.4 Izolace huminových látek na kolonách

Izolace huminových látek z alginitu byla provedena na základě postupu mezinárodní společnosti pro výzkum huminových látek (IHSS). Tento postup probíhal následovně. Z pevného vzorku alginitu byl nejprve alkalickou extrakcí připraven výluh HL, který obsahoval HK, FK a snadno hydrolyzující organické kyseliny. Výluh HL byl připraven z navážky 300 g vysušeného alginitu, ke kterému bylo do PE nádoby přidáno 1000 ml 0,1 M roztoku HCl a toto množství se nechalo třepat na rotační třepačce (rychlost $10\text{ ot}\cdot\text{min}^{-1}$) po dobu 1 hodiny. Poté byla suspenze zneutralizována roztokem NaOH o koncentraci 1 M na hodnotu $\text{pH} \sim 7$. Dále byla suspenze odstředěna na odstředivce při 4000 RPM po dobu 15 min. Po odstředění byl odlit kapalný podíl od pevného. K pevnému podílu bylo následně přidáno 500 ml 0,1 M roztoku NaOH a tato suspenze se nechala třepat přes noc při $10\text{ ot}\cdot\text{min}^{-1}$. Suspenze byla poté znovu odstředěna v odstředivce při 4000 RPM po dobu 20 min. Alkalický roztok byl dále okyselen koncentrovanou HCl ($\sim 35\text{ obj.}\%$) na hodnotu $\text{pH} \sim 1$ a byl tak ponechán přes noc, kdy docházelo ke koagulaci „makromolekulárního“ klubka HK.

3.4.1 Separace HK

Po koagulaci HK, během které docházelo k úplnému zabalení „makromolekulárního“ klubka HK, byly HK odděleny od supernatantu odstředěním v odstředivce při 4000 RPM po dobu 20 min. Po odstředění byl supernatant uschován na pozdější izolaci FK. Vysrážené HK poté byly znovu rozpuštěny přidávkem 100 ml 0,1 M roztoku KOH. K roztoku bylo následně přidáno 2,2 g KCl a poté byl roztok odstředěn v odstředivce při 4000 RPM po dobu 30 min. V tomto kroku docházelo k uvolňování nerozpustných frakcí, hlavně HU, z makromolekulárního klubka HK. Na tomto místě je nutné podotknout, že v průběhu koagulace HK dochází k adsorpci nerozpustných HU přítomných v supernatantu na povrch koagulovaných HK, a následně jsou tyto nerozpustné frakce HL „uzamčeny“ ve sférické

struktury HK. Po odstranění nerozpustné frakce byl poté roztok HK okyselen koncentrovanou HCl (~ 35 obj. %) na hodnotu pH ~ 1 a byl takto ponechán, stejně jako v předchozím případě, přes noc, kdy opět docházelo k vysrážení HK. Následně byly vysrážené HK odděleny od supernatantu odstředěním v odstředivce při 4000 RPM po dobu 20 min. K vysráženým HK bylo poté přidáno 500 ml roztoku směsi 0,1 M HCl a 0,3 M HF a vzniklá suspenze se nechala třepat 2 dny na rotační třepačce (rychlost 10 ot·min⁻¹). Tímto purifikačním krokem byly z vysrážených HK odstraněny zejména sorbované křemičitany nebo také některé sloučeniny iontů kovů. Po uplynutí této doby byly vysrážené HK opět odděleny centrifugací při 4000 RPM po dobu 20 min. Následně byl pevný podíl HK převeden do dialyzační membrány o velikosti pórů 1 kDa. Dialýza probíhala po dobu 5 dnů proti deionizované vodě. Po dialýze byly vzorky HK vymrazeny na rotační odparce v lyofilizačních baňkách a následně lyofilizovány na laboratorním lyofilizátoru do úplného vysušení. Následující den byl z lyofilizačních baněk odebrán výtěžek HK, který byl zvážen na analytických vahách.

3.4.2 Separace FK

Pro separaci FK bylo nutné využít metodu selektivní adsorpce na hydrofobní pryskyřici DAX. Bylo nezbytné použít tento postup vzhledem k rozpustnosti fulvinových kyselin v alkalických i kyselých roztocích, a také proto, že získaný supernatant obsahující FK obsahoval i jinou nežádoucí rozpustnou organickou hmotu, tj. snadno hydrolyzující organické kyseliny.

Příprava kolony s pryskyřicí DAX

Množství pryskyřice DAX, které bylo dáno rozměry skleněné kolony, bylo převedeno do kádinky, která se naplnila methanolem tak, aby hladina nad vrstvou pryskyřice byla minimálně 2 cm vysoká. Takto připravená suspenze pryskyřice a methanolu byla ponechána na magnetické míchačce při 350 ot·min⁻¹ po dobu 15 min. Následně byl methanol slit a pryskyřice byla promyta destilovanou vodou. Po převedení pryskyřice do kolony sahala destilovaná voda přibližně 2 cm nad pryskyřicí, aby nedocházelo k vysychání pryskyřice.

Selektivní adsorpce FK na pryskyřici DAX

Ještě před samotnou separací FK na chromatografické koloně byl získaný supernatant obsahující FK podroben ultrafiltraci na filtru o velikosti 0,45 μm. Tímto krokem byl roztok zbaven případných nežádoucích pevných částic, případně vysrážených zbytků HK z roztoku. Následně byl přefiltrovaný roztok opakovaně proléván kolonou. Po nadávkování veškerého obsahu FK byla kolona promývána destilovanou vodou, dokud nebyla absorbance vody na výstupu z kolony menší než 0,015 (při λ = 350 nm). Desorpce fulvinových kyselin z pryskyřice byla poté provedena pomocí roztoku 0,1 M NaOH, dokud nebyla absorbance desorpčního roztoku na výstupu z kolony menší než 0,03 (při λ = 350 nm). Promýváním destilovanou vodou byla z kolony eluována DOM, kterou tvoří z velké části nežádoucí snadno hydrolyzující jednoduché organické kyseliny.

Po adsorpci FK na pryskyřici DAX a jejich následné desorpci bylo nezbytné provést regeneraci použité pryskyřice a připravit ji tedy k dalšímu použití. Tato regenerace byla provedena promýváním pryskyřice 0,1 M HCl. Promývání probíhalo, dokud hodnota pH HCl vytékající z kolony nebyla stejná s pH HCl na vstupu do kolony. Na závěr pak byla kolona

promyta destilovanou vodou dokud, stejně jako v předchozím případě, nebyla hodnota pH vody na výstupu z kolony stejná jako na vstupu do kolony. Destilovaná voda byla poté ponechána v koloně tak, aby sahala cca 2 cm nad pryskyřici a nedošlo tedy k vysychání pryskyřice.

Příprava kolony s katexem Amberlite IR 120

Množství katexu pryskyřice Amberlite, které bylo dáno rozměry skleněné kolony, bylo převedeno do kádinky, která se naplnila methanolem tak, aby hladina nad vrstvou pryskyřice byla minimálně 2 cm vysoká. Takto připravená suspenze pryskyřice a methanolu byla ponechána na magnetické míchačce při $350 \text{ ot} \cdot \text{min}^{-1}$ po dobu 15 min. Následně byl methanol slit a pryskyřice byla promyta destilovanou vodou. Po převedení pryskyřice do kolony sahala destilovaná voda přibližně 2 cm nad pryskyřici, aby nedocházelo k vysychání pryskyřice. Vstup do kolony byl následně zakryt parafínovou folií.

Zpětná protonace FK na katexu pryskyřice Amberlite

Jelikož během selektivní adsorpce a následně desorpce FK z pryskyřice DAX byly získány fulvinové kyseliny ve formě sodných solí tj. fulvátů-Na, bylo nutné kyseliny zpět naprotonovat. Z alkalického roztoku FK byly pomocí katexu Amberlite IR 120 odstraněny sodné kationty (Na^+), které byly nahrazeny vodíkovými protony (H^+).

Postup zpětné protonace probíhal následovně. Roztok FK byl opakovaně proléván kolonou, dokud neklesla hodnota elektrické vodivosti pod hodnotu $120 \mu\text{S} \cdot \text{cm}^{-1}$. Poté byla kolona promývána destilovanou vodou, dokud hodnota absorbance na výstupu z kolony nedosáhla hodnoty $< 0,015$ (při $\lambda = 350 \text{ nm}$).

Podobně jako v předchozím případě bylo nezbytné provést regeneraci použité pryskyřice a připravit ji k dalšímu použití. Vymytí adsorbovaných sodných iontů bylo provedeno pomocí 0,1 M HCl (zpětná protonace kolony). Nejprve byla kolona promyta celkovým objemem 1000 ml 0,1 M HCl a poté byla promývána destilovanou vodou, dokud se pH vody na výstupu z kolony nepohybovalo kolem hodnoty 7. Do kolony bylo opět nalito takové množství vody, aby její hladina byla cca 2 cm nad pryskyřicí a nedocházelo tedy k vysychání pryskyřice. Vstup do kolony byl následně zakryt parafilmem.

Zakoncentrování a lyofilizace FK

Roztoky FK byly zakoncentrovány a vymrazeny na rotační vakuové odparce a následně lyofilizovány na laboratorním lyofilizátoru do úplného vysušení. Poté byl z lyofilizačních baněk odebrán výtěžek FK ve formě světle hnědého prášku, který byl zvážen na analytických vahách.

3.5 Charakterizace huminových a fulvinových kyselin

Po izolaci huminových látek na kolonách byla provedena jejich fyzikálně-chemická charakterizace za účelem stanovení elementárního složení, čistoty, aromaticity, stupně humifikace, obsahu funkčních skupin a dalších detailních informací týkajících se struktury těchto látek. U získaných HK a FK byla provedena analýza pomocí metod elementární

analýzy (EA), termogravimetrie (TGA), infračervené spektrometrie (FTIR), UV/Vis spektrometrie a ustálené fluorescenční spektrometrie (*steady-state*). U vzorku huminu (HU), který byl získán jako nerozpustná frakce, byla provedena pouze analýza pomocí metod EA, TGA a FTIR.

3.5.1 Elementární analýza

Elementární složení vzorků HK, FK a HU bylo získáno pomocí CHNS-O elementárního analyzátoru EA3000. Vzorky získaných HL byly podrobeny prvkové analýze stejným způsobem jako v případě alginitu. Elementární analyzátor byl nejprve kalibrován pomocí standardní látky *sulphanilamidu*. Navážené vzorky jednotlivých huminových látek byly poté spáleny v atmosféře kyslíku při pracovní teplotě reaktoru 980 °C. Do cínových kapslí bylo naváжено ~ 1 mg vzorku. Všechny tři vzorky (HK, FK i HU) byly naváжены celkem ve třech opakováních. Elementární složení HL bylo získáno pomocí vyhodnocovacího programu *Callidus*TM5.1.

3.5.2 Termogravimetrická analýza

Vzorky HL byly termogravimetricky analyzovány na TGA Q5000. I v tomto případě byl postup stejný jako v případě termogravimetrické analýzy alginitu. Vzorky HK, FK a HU, jejichž navážka činila ~ 5 mg, byly spáleny z laboratorní teploty na konečnou teplotu 1000 °C v atmosféře vzduchu s průtokem 50 ml·min⁻¹ a s rychlostí ohřevu pece 10 °C·min⁻¹. Ze získaných hodnot byl poté určen obsah sorbované vlhkosti a nespalitelného podílu tj. popela.

3.5.3 Infračervená spektrometrie

U analýzy HL látek pomocí infračervené spektrometrie byla podobně jako v případě alginitu použita metoda difuzní reflektance DRIFT. V achátové třecí misce bylo postupně rozetřeno 100 mg vyžíhaného KBr a 3 mg vzorku HL. Po provedení homogenizace směsi byl připravený vzorek umístěn do nástavce difuzně reflexní jednotky spektrometru Nicolet iS50. Spektrum bylo měřeno v rozmezí vlnočtů 4000–400 cm⁻¹ se spektrálním rozlišením 4 cm⁻¹ a s počtem akumulovaných záznamů 512. Toto infračervené spektrum bylo převedeno na jednotky *Kubelka-Munk*, které odpovídají jednotkám absorpance při transmisním měření, tzn. měření vzorku na průchod. FTIR spektrum vzorku bylo normalizováno na hodnotu nejintenzivnějšího absorpčního pásu přítomného ve spektru.

3.5.4 UV/Vis spektrometrie

Metoda UV/Vis spektrometrie byla v této práci použita za účelem primární charakterizace získaných vzorků huminových a fulvinových kyselin. Pro charakterizaci byly ze získaných absorpčních spekter vypočteny absorpční koeficienty E₂/E₄, E₂/E₃, E₄/E₆ a E_{ET}/E_{BZ}, které byly získány poměrem absorbancí při přesně definovaných vlnových délkách. Absorpční koeficient E₂/E₃ byl získán z poměru absorbancí při vlnových délkách 265 a 365 nm, koeficient E₂/E₄ při vlnových délkách 265 a 465 nm a koeficient E₄/E₆, který je označován jako tzv. humifikační index, byl získán při vlnových délkách 465 a 665 nm. Absorpční koeficient E_{ET}/E_{BZ}, který je výrazně citlivý k obsahu polárních substituentů na aromatickém jádře HL, byl určen poměrem absorbancí v UVC oblasti absorpčního spektra při 253 a 220 nm.

Vzorky pro měření absorpčních spekter byly připraveny následujícím způsobem. Nejprve byly připraveny zásobní roztoky studovaných HK a FK o hmotnostní koncentraci $100 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ v 0,1 M roztoku NaOH. Následně byly z těchto zásobních roztoků HL připraveny, pipetováním a následným doplněním pufrům, roztoky HL, jejichž výsledná koncentrace byla $50 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$. Takto připravené roztoky byly v práci použity za účelem studia izolovaných HL pomocí tzv. humifikačního indexu, který představuje absorpční koeficient E_4/E_6 . Pro získání absorpčních koeficientů E_2/E_4 , E_2/E_3 a E_{ET}/E_{Bz} byly dále připraveny roztoky HK a FK o hmotnostní koncentraci $10 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$. Tyto roztoky byly opět připraveny pipetováním roztoků o koncentraci $50 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$, které byly následně doplněny pomocí standardního fosfátového pufru (směs Na_2HPO_4 a NaH_2PO_4 v objemovém poměru 0,61:0,39) o koncentraci $0,05 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-1}$ a hodnotě pH ~ 7 .

Takto připravené vzorky HK a FK byly měřeny na UV/Vis spektrometru Hitachi U3900H. Absorpční spektra byla měřena v rozsahu vlnových délek 200–800 nm s krokem měření 1 nm a rychlostí skenu $600 \text{ nm} \cdot \text{min}^{-1}$. Veškeré měření bylo realizováno v křemenné kyvetě s optickou dráhou 1 cm.

3.5.5 Fluorescenční spektrometrie

Stacionární fluorescenční spektrometrie (*steady-state*) byla v této práci použita za účelem získání detailních informací týkajících se struktury, heterogenity, stupně humifikace, kondenzace aromatických struktur a přítomnosti elektron-donorních a elektron akceptorních funkčních skupin. Charakteristika získaných HK a FK byla provedena pomocí excitačně-emisních spekter (EEM), ze kterých byly odečteny polohy jednotlivých fluorescenčních domén, tzn. typů fluoroforů.

Pro měření fluorescenčních spekter byly použity stejné roztoky HK a FK o hmotnostní koncentraci $10 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$, které byly připravené už pro měření UV/Vis spekter v kapitole 3.4.4.

Měření EEM spekter bylo provedeno na *steady-state* fluorescenčním spektrometru Edinburgh Instruments FS5 s nastavenou šířkou štěrbin excitačního a emisního monochromátoru 4 nm v křemenné kyvetě pro fluorescenční spektrometrii s optickou dráhou 1 cm. EEM fluorescenční spektra byla u vzorků HK a FK změřena v rozsahu vlnových délek excitační osy 220–450 nm a v rozsahu vlnových délek emisní osy 300–600 nm. EEM spektra byla měřena s krokem 5 nm. Rovněž byla všechna naměřená fluorescenční spektra resp. jejich intenzity fluorescence korigovány pomocí matematického aparátu navrženého Lakowiczem [82], a to z důvodu silného vnitřního filtračního efektu roztoků HL. Tento matematický zápis je definován rovnicí:

$$F_{corr} = F_{obs} \times 10^{0,5(A_{ex}+A_{em})}, \quad (1)$$

kde F_{obs} je experimentálně zjištěná intenzita fluorescence, A_{ex} je absorbance při excitační vlnové délce (v našem případě $A_{ex}=\lambda_{220-450 \text{ nm}}$), A_{em} je absorbance při emisní vlnové délce (v našem případě $A_{em}=\lambda_{300-600 \text{ nm}}$) a F_{corr} je korigovaná intenzita fluorescence.

3.6 Frakcionace pomocí TLC

Z pevných vzorků HK, FK a HU, izolovaných z alginitu, byly nejprve připraveny roztoky, které bylo poté možné nanášet na TLC fólii. Pevné vzorky HL byly rozpuštěny v 1 ml methanolu a vzniklé roztoky byly postupně aplikovány na TLC fólie pomocí skleněné kapiláry. Po odpaření methanolu se TLC fólie nechala vyvíjet ve skleněné nádobě obsahující směs methanolu a ethyl-acetátu v poměru 2:1. TLC záznam byl vyvíjen po dobu 60 min. U vzorků HK a FK bylo po ukončení vyvíjení chromatografického záznamu pozorováno pod UV lampou pozorovací komory 6 zón, které odpovídaly jednotlivým studovaným organickým frakcím. U TLC huminu (HU) bylo pozorováno pouze 5 zón. Jednotlivé organické frakce byly pojmenovány HKE1–HKE6 (pro HK), FKE1–FKE6 (pro FK) a HUE1–HUE5 (pro HU).

3.7 Základní fyzikálně-chemická charakterizace frakcí HL

U jednotlivých organických frakcích HL byla provedena základní analýza pomocí metod UV/Vis spektrometrie a ustálené fluorescenční spektrometrie.

3.7.1 UV/Vis spektrometrie frakcí HL

Pro analýzu pomocí UV/Vis spektrometrie byly připraveny vzorky jednotlivých frakcí seškrábáním silikagelu s TLC záznamem, který byl poté rozpuštěn v 0,1 M NaOH a převeden do standardního fosfátového pufru. Tímto způsobem byly připraveny roztoky všech frakcí HK, FK a HU. Následně byla z připravených roztoků změřena UV/Vis spektra, ze kterých byly následně vypočteny absorpční koeficienty E_{ET}/E_{Bz} , E_2/E_3 a E_2/E_4 . Známý a tradičně používaný absorpční koeficient E_4/E_6 , daný jako poměr absorbancí při 465 nm a 665 nm, nemohl být použit z důvodu nízké absorpce frakcí v oblasti vlnových délek 550–800 nm. Namísto něj byl použit absorpční koeficient E_2/E_4 , který je konzistentní s koeficientem E_4/E_6 , a který je charakterizován jako poměr absorbancí při 265 nm a 465 nm. Dále byl použit absorpční koeficient E_2/E_3 , definovaný jako poměr absorbancí při 265 a 365 nm a koeficient E_{ET}/E_{Bz} , definovaný při 253 a 220 nm. Měření absorpčních spekter všech vzorků bylo provedeno při stejném experimentálním nastavení spektrometru Hitachi U3900H jako v kapitole 3.4.4.

3.7.2 Fluorescenční spektrometrie frakcí HL

Hlavní metodou pro studium organických frakcí HL izolovaných z alginitu byla v této práci metoda ustálené fluorescenční spektrometrie (*steady-state*). Jednotlivé organické frakce HK a FK byly změřeny na fluorescenčním spektrometru FluoroLog® (Horiba Scientific) a frakce HU na fluorescenčním spektrometru Edinburgh Instruments FS5 s nastavenou šířkou štěrbin excitačního a emisního monochromátoru 4 nm v křemenné kyvetě pro fluorescenční spektrometrii s optickou dráhou 1 cm. EEM fluorescenční spektra byla u vzorků HL změřena v rozsahu vlnových délek excitační osy 240–450 nm a v rozsahu vlnových délek emisní osy 290–600 nm. EEM spektra byla měřena s krokem 5 nm. Z důvodu silného vnitřního filtračního efektu roztoků organických frakcí HL byla, stejně jako v kapitole 3.5.5, intenzita fluorescence korigována pomocí matematického aparátu navrženého Lakowiczem [82].

4 DISKUZE A VÝSLEDKY

4.1 Elementární a termogravimetrická analýza alginitu

Naměřené hodnoty elementárního složení alginitu, jeho atomových poměrů H/C, O/C a N/C a obsahu popela a celkové vlhkosti, získaných pomocí termogravimetrie, jsou zobrazeny v Tab. 1. Z výsledků elementární analýzy je zřejmé, že alginit je tvořen převážně uhlíkem, vodíkem, kyslíkem a minoritně i dusíkem. Elementární složení alginitu je uvedeno v atomových procentech z důvodu nízké atomové hmotnosti vodíku, který by byl při vyjádření pomocí hmotnostních procent výrazně podhodnocen. Atomové poměry H/C a O/C uvedené v Tab. 1 představují vhodnou metodu, jak jednoduše charakterizovat některé fyzikálně-chemické vlastnosti přírodních organických látek tzn. podíl aromatických či alifatických strukturních jednotek, míru hydrogenace, oxidace nebo dekarboxylace. Z atomových poměrů lze vyčíst, že nejvyšší hodnotu má poměr H/C, což naznačuje značnou vysokou míru hydrogenace alginitu. Hodnota atomového poměru O/C je však také poměrně vysoká, což značí, že alginit obsahuje velké množství strukturních jednotek, které jsou substituovány kyslík obsahujícími funkčními skupinami, jako jsou karboxylové, –OH fenolické či alkoxylové skupiny tzn. –OCH₃.

Tab. 1: Elementární složení alginitu (v atom. %), vypočtené atomové poměry H/C a N/C, obsah popela a celkové vlhkosti

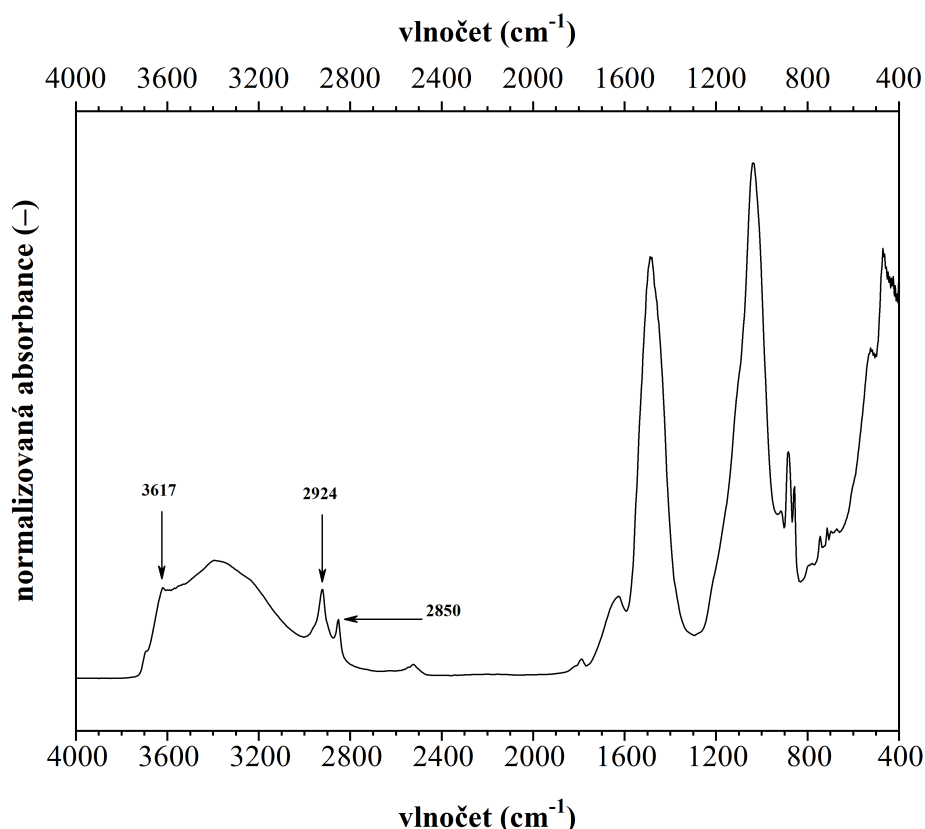
vzorek	elementární složení v atom. %				H/C	O/C	N/C	popel	vlhkost
	C	H	N	O				(hm. %)	(hm. %)
Alginit	18,01	65,50	0,50	15,99	3,64	0,89	0,03	64,37	4,92

Podle hodnot, získaných z termogravimetrického záznamu, je zřejmé, že alginit obsahuje velké množství nespalitelného podílu (tj. popela), což je způsobeno pravděpodobně silnou mineralizací vzorku anorganickými sloučeninami, jako jsou např. kaolinit nebo illit, které bývají běžnou součástí alginitu. Celková vlhkost alginitu je způsobena především adsorbovanou vzdušnou vlhkostí prostřednictvím hydrofilních karboxylových (–COOH) a fenolických (–OH) skupin.

4.2 Infračervená spektrometrie alginitu

Na Obr. 8 je zobrazeno FTIR spektrum vzorku alginitu získané metodou difuzní reflektance. Spektrální oblast 3640–3550 cm⁻¹ se specifickým absorpčním pásem při 3617 cm⁻¹ je připisována valenčním vibracím O–H vazeb v krystalové mřížce kaolinitu anebo montmorillonitu. Dále lze pozorovat široký absorpční pás v oblasti 3480–3250 cm⁻¹ se specifickým pásem při 3394 cm⁻¹, který je obvykle připisován valenčním vibracím O–H vazeb v karboxylových kyselinách, alkoholech a jiným strukturním jednotkám obsahující O–H skupinu. Charakteristické absorpční pásy lokalizovány v oblastech 2924 a 2850 cm⁻¹ jsou přisuzovány asymetrickým a symetrickým valenčním vibracím C–H vazeb methylenových funkčních skupin. Dále si můžeme všimnout absorpčního pásu v oblasti vlnočtů 2600–2500 cm⁻¹ s maximem specifické absorpce při 2522 cm⁻¹, který je přiřazován valenční symetrické vibraci O–H...O vazeb v karboxylových kyselinách vázaných

vodíkovými můstky. Absorpční pás lokalizovaný při 1816–1770 cm^{-1} je připisován valenční symetrické vibraci karbonylové C=O skupiny v aryl-karbonátech. V oblasti kolem 1630 cm^{-1} byl dále pozorován absorpční pás připadající symetrické valenční vibraci C=O skupin v sekundárních amidech. Velmi výrazný absorpční pás můžeme pozorovat v oblasti 1490 cm^{-1} , jenž je přisuzován valenčním vibracím C=O vazeb v uhličitanu. Ve FTIR spektru byl dále lokalizován velmi intenzivní a ostrý absorpční pás při 1037 cm^{-1} , který je způsoben přítomností anorganických složek, zejména valenční symetrickou vibrací Si–O vazeb v kaolinitu a montmorillonitu. Přítomnost křemičitanových komponent (Si–O) se projevuje i ve spektrální oblasti při 914 cm^{-1} a 790 cm^{-1} . Tato hypotéza je rovněž podpořena zbytkovým popelem, který byl stanoven pomocí termogravimetrie. Dále byl v infračerveném spektru lokalizován dublet absorpčních pásů při 883 cm^{-1} a 856 cm^{-1} . Tyto absorpční pásy potvrzují přítomnost anorganických příměsí ve vzorku alginitu tj. uhličitanových aniontů. Oba zmíněné pásy odpovídají deformačním vibracím C=O vazeb v CO_3^{2-} . Můžeme si také povšimnout absorpčního pásu, který byl identifikován v oblasti při 752–740 cm^{-1} . Tento pás je tradičně připisován deformační vibraci C–H vazeb v *ortho*-substituovaných aromatických sloučeninách. Závěrem je tedy možné tvrdit, že se v infračerveném spektru alginitu podle očekávání projevují charakteristické spektrální znaky organické hmoty (přítomnost aromatických a alifatických uhlovodíků) s majoritním obsahem jílových minerálů, jako jsou kaolinit a montmorillonit [32; 83; 84].



Obr. 8: FTIR-DRIFT spektrum alginitu

4.3 Stanovení obsahu HL v alginitu

V Tab. 2 jsou uvedeny vypočtené výtěžky HL, které byly izolovány ze vzorku slovenského alginitu podle standardního postupu mezinárodní společnosti pro výzkum huminových látek (IHSS). Tento postup byl podrobně popsán v kapitole 3.3. Z výsledků termogravimetrické analýzy byl rovněž vypočten celkový obsah organické hmoty ve vzorku alginitu. Výsledky ukazují, že vzorek alginitu obsahoval 30,71 hm. % celkové organické hmoty, což je v dobré shodě s výsledky ostatních autorů [85], kteří se zabývali analýzou alginitu. Obsah izolovaných HL však byl stanoven pouze na 0,30 hm. %, přičemž HK byly zastoupeny v majoritním množství. Vzhledem k původu alginitu je možné předpokládat, že jeho organická hmota je majoritně tvořena kerogenem typu II, který je součástí řas (*algae*). Jak totiž bylo zmíněno dříve, alginit vznikl postupnou sedimentací odumřelých kolonií řas.

Tab. 2: Celkový obsah organické hmoty v alginitu (hm. %), výtěžky izolovaných HL (hm. %)

vzorek	celk. org. hmota (hm. %)	HL (hm. %)	HK (hm. %)	FK (hm. %)
Alginit	30,71	0,30	0,20	0,10

4.4 Elementární a termogravimetrická analýza HL

Výsledky z elementární analýzy izolovaných HL potvrzují předpoklad, že získané HL jsou tvořeny převážně vodíkem, uhlíkem, kyslíkem a minoritně dusíkem. Síra je zastoupena pouze v minimálním množství u vzorků HK a FK. Prvkové složení je v Tab. 3 uvedeno opět v atomových procentech (*atom. %*) z důvodu silného podhodnocení obsahu vodíku. Z výsledků uvedených v Tab. 3 lze konstatovat, že analyzované vzorky vykazují typické prvkové složení HL izolovaných z dnových sedimentů [86; 87]. V Tab. 3 také můžeme vidět, že vzorky FK a HK jsou v porovnání se vzorkem HU tvořeny vyšším obsahem uhlíku a také kyslíku, který je obsažen v kyselých funkčních skupinách, jako jsou karboxylové ($-\text{COOH}$), fenolické ($-\text{OH}$), ketonové ($\text{C}=\text{O}$) nebo také alkoxylové ($\text{O}-\text{CH}_3$) či etherové. Také si nelze nepovšimnout, že při analýze byl u vzorku FK detekován vyšší obsah síry v porovnání se vzorkem HK. Tato skutečnost značí, že vzorek FK má ve své chemické struktuře vyšší zastoupení hydrofilních sulfonových skupin ($-\text{SO}_3\text{H}$). Absence síry u vzorku HU by mohla být vysvětlena tím, že v této diplomové práci byla použita GC kolona, která umožňuje stanovení tohoto biogenního prvku v minimální hmotnostní koncentraci 0,5 hm. %. Obsah dusíku byl u vzorků HK a FK prakticky totožný. Naopak v případě nerozpustné frakce HU byl dusík zastoupen ve velmi malém množství. Řada autorů dává ve spojitost obsah dusíku v HL s mikrobiální činností během procesu humifikace.

Ze získaných výsledků elementární analýzy byly dále vypočítány atomové poměry H/C, O/C a N/C, které slouží k charakterizaci fyzikálně-chemických vlastností HL, jako je stupeň aromaticity nebo míra dehydrogenace, dekarboxylace a oxidace. Při pohledu na výsledky můžeme vidět, že atomový poměr H/C byl nejvyšší u vzorku huminu (HU) a naopak nejnižší u vzorku fulvinové kyseliny (FK). Tento poměr charakterizuje míru dehydrogenace a aromaticity HL. Z výsledků tedy vyplývá, že vzorek FK je charakterizován vyšší mírou aromaticity a dehydrogenace než vzorky HK a HU. Naopak atomový poměr O/C, který nás

informuje o obsahu kyselých funkčních skupin tj. karboxylových a fenolických, byl nejvyšší právě v případě vzorku FK. Znamená to tedy, že tato biokoloidní sloučenina má ve své struktuře nejvyšší obsah kyselých funkčních skupin, naproti tomu vzorek HU jich má nejméně. Z Tab. 3 lze také vyčíst, že všechny vzorky HL byly charakterizovány přibližně stejnými hodnotami atomových poměrů N/C, které se pohybovaly v rozmezí ~ 0,05–0,07. Z toho důvodu můžeme usuzovat, že vzorky HK, FK a HU obsahují ve svých strukturách obdobná množství dusík obsahujících funkčních skupin.

Tab. 3: *Elementární složení HL izolovaných z alginitu (v atom. %), vypočtené atomové poměry H/C a N/C, obsah popela a celkové vlhkosti*

vzorek	elementární složení v atom. %					H/C	O/C	N/C	popel	vlhkost
	C	H	N	O	S				(hm. %)	(hm. %)
HK	34,84	52,55	2,40	9,42	0,79	1,51	0,27	0,07	1,25	6,64
FK	34,84	48,38	2,29	12,92	1,57	1,39	0,37	0,07	25,60	5,58
HU	27,65	66,19	1,49	4,67	nd	2,39	0,17	0,05	54,60	4,75

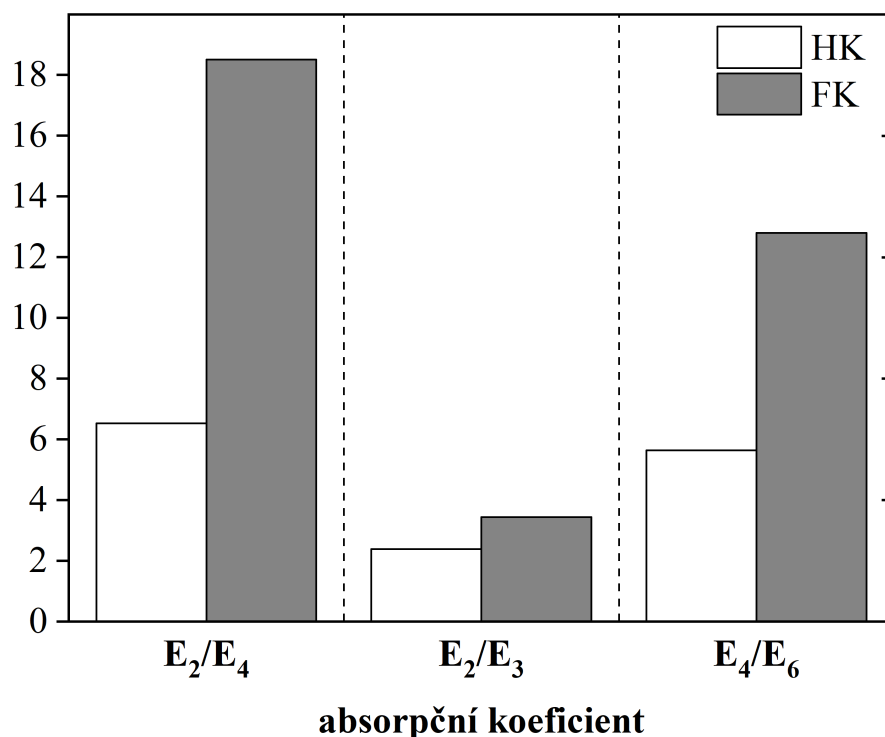
Poznámka: nd – nebylo detekováno.

Z porovnání HL z hlediska obsahu nespalitelného zbytku tj. popela (viz Tab. 3) je zřejmé, že vzorek HK vykazoval jednoznačně nejvyšší čistotu. Naopak nejvíce anorganických příměsí obsahoval vzorek huminu (HU), jehož obsah nespalitelného zbytku přesahoval 54 hm. %. Nízký obsah popela v případě HK je způsoben zejména odlišným postupem při izolaci těchto biokoloidních sloučenin z přírodní matrice. Odlišné jsou také jednotlivé purifikační kroky, které v případě HK zahrnují působení směsí 0,3 M HF a HCl za účelem dekalcinace a desilifikace, a také dialýzu na membránách, jejichž *cut-off* hodnota je < 1 kDa. U izolace FK probíhá purifikace nejprve na koloně s pryskyřicí DAX a poté, při zpětné protonaci, na koloně s katexem Amberlite IR 120. Při TGA analýze byla také stanovena vlhkost jednotlivých HL. Ta se u analyzovaných vzorků pohybovala v rozmezí 5–7 %, přičemž nejvyšší obsah sorbované vlhkosti byl stanoven u vzorku HK. Vyšší hodnoty sorbované vlhkosti u HK a FK jsou způsobeny pravděpodobně vysokým obsahem kyselých funkčních skupin, což nám dokazuje také atomový poměr O/C, který byl nejvyšší právě u těchto zmíněných sloučenin.

4.5 UV/Vis spektrometrie HL

Metoda molekulové absorpční spektrometrie v ultrafialové a viditelné oblasti elektromagnetického záření (UV/Vis) patří mezi základní instrumentální techniku pro charakterizaci rozpuštěné organické hmoty a huminových látek izolovaných z různých přírodních matric. Získané HK a FK byly v této diplomové práci charakterizovány pomocí absorpčních koeficientů, které byly vyneseny do sloupcových grafů. Absorpční koeficienty E_2/E_4 , E_2/E_3 , E_4/E_6 jsou zobrazeny na Obr. 9 a sloupcový graf s koeficienty E_{ET}/E_{Bz} je možné vidět na Obr. 10. Naměřená spektra HL vykazovala kvaziexponenciální průběh, který je charakteristický pro tyto biokoloidní sloučeniny. Z výsledků můžeme vidět, že použité vzorky vykazují typické hodnoty absorpčních koeficientů HL izolovaných ze sedimentárních přírodních matric.

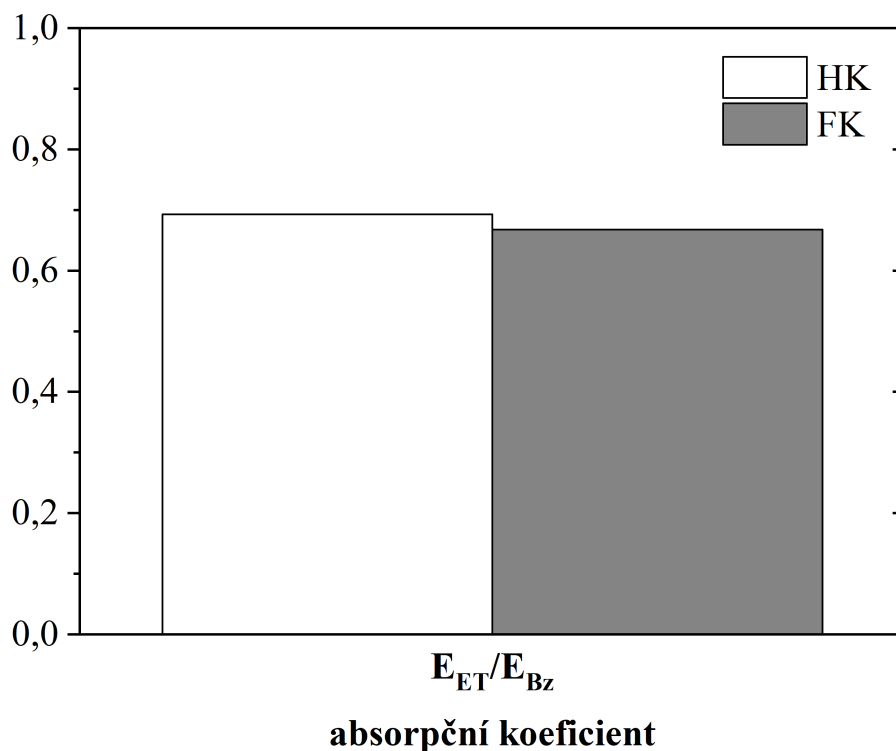
Na Obr. 9 lze vidět, že absorpční koeficienty E_2/E_4 a E_4/E_6 (tj. humifikační index), byly výrazně vyšší v případě vzorku FK. Vysoká hodnota absorpčního koeficientu E_2/E_4 svědčí o tom, že vzorek FK je charakterizován nižším stupněm humifikace a také nižší střední molekulovou hmotností. Při porovnání obou izolovaných HL si můžeme v případě vzorku FK všimnout také vyššího absorpčního koeficientu E_2/E_3 , který společně s koeficientem E_2/E_4 charakterizuje FK nižším stupněm aromaticity. Nízké hodnoty koeficientů E_2/E_3 , E_2/E_4 a E_4/E_6 naopak charakterizují izolovanou HK větší střední molekulovou hmotností, vyšším stupněm aromaticity a rovněž také vyšším stupněm humifikace.



Obr. 9: Absorpční koeficienty HK a FK izolovaných z alginitu

Ze sloupcového grafu na Obr. 10 lze vyčíst, že hodnota absorpčního koeficientu E_{ET}/E_{Bz} byla tentokrát vyšší pro vzorek HK. Koeficient E_{ET}/E_{Bz} je velmi citlivý k přítomnosti polárních a alifatických substituentů na aromatickém jádře HL a jeho vyšší hodnota tedy znamená, že jsou aromatická jádra substituována hydrofilními funkčními skupinami, jako jsou skupiny fenolické ($-OH$), karboxylové ($-COOH$) nebo karbonylové ($C=O$). Z nižší hodnoty koeficientu E_{ET}/E_{Bz} naopak vyplývá, že jsou aromatická jádra HL substituována převážně hydrofobními skupinami. Nízký koeficient E_{ET}/E_{Bz} může být také příčinou výskytu méně substituovaných aromátů ve struktuře HL. Při porovnání analyzovaných vzorků HK a FK můžeme tedy konstatovat, že aromatická jádra u vzorku FK jsou více substituována hydrofobními skupinami. Naopak vzorek HK je charakterizován vyšším stupněm substituce aromatického jádra polárními funkčními skupinami. Nicméně je zapotřebí říci, že vypočtené hodnoty tohoto absorpčního koeficientu jsou hodnotově dosti podobné, a to zejména z důvodu, že tento koeficient je schopen reflektovat pouze ty substituenty, které jsou přítomny na Ar jednotkách HL. Jinými slovy, výše zmíněný koeficient není schopen zohlednit

příspěvek vycházející z přítomnosti alifatických organických kyselin, jakkoliv substituovanými polárními či hydrofobními funkčními skupinami.



Obr. 10: Absorpční koeficienty E_{ET}/E_{Bz} vzorků HK a FK

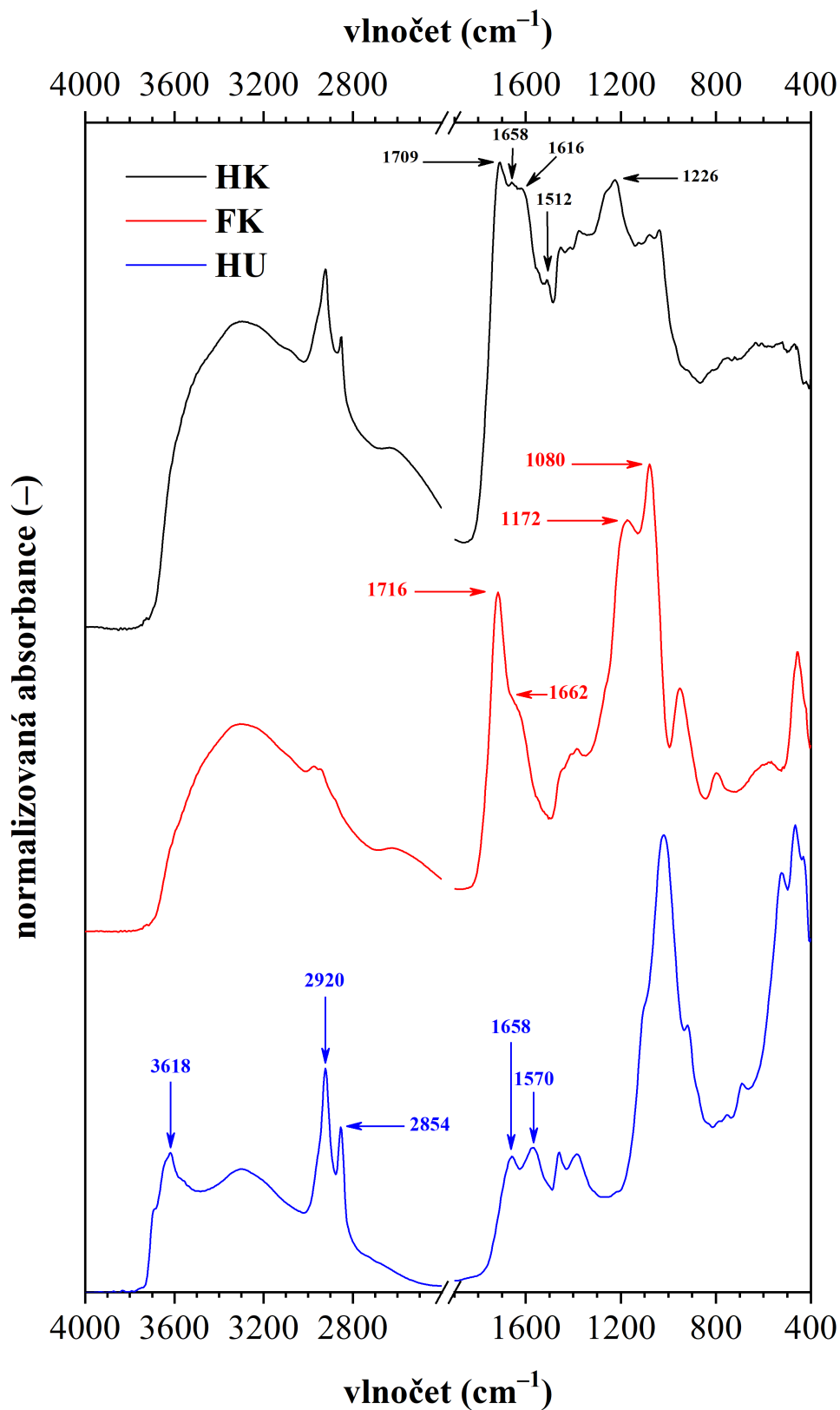
4.6 Infračervená spektrometrie HL

Na Obr. 11 jsou zobrazena FTIR spektra izolovaných huminových látek, tedy HK, FK a HU. Spektra byla získána pomocí metody difuzní reflektance. Absorpční pás v oblasti vlnočtů $3640\text{--}3602\text{ cm}^{-1}$ se specifickým pásem při 3618 cm^{-1} u vzorku HU je připisován valenčním vibracím O–H vazeb v krystalové mřížce kaolinitu anebo montmorillonitu. Dále si můžeme u HK a FK všimnout širokého absorpčního pásu v oblasti vlnočtů $3500\text{--}3150\text{ cm}^{-1}$, který je tradičně přisuzován valenčním vibracím O–H vazeb v karboxylových kyselinách, alkoholech a jiných strukturních jednotkách obsahující –OH skupinu. Eminentní širokost tohoto absorpčního pásu je rovněž způsobena valenční symetrickou vibrací N–H vazeb v sekundárních amidech (–CO–NH–). V případě vzorku HU je tento absorpční pás méně intenzivní a je lokalizován v oblasti $3350\text{--}3200\text{ cm}^{-1}$. Dále lze u vzorku FK zpozorovat méně intenzivní absorpční pás v oblasti 2973 cm^{-1} , který je připisován asymetrickým vibracím C–H vazeb v CH_3 skupinách. U vzorků HK a HU je dále lokalizován absorpční pás v oblasti 2923 resp. 2920 cm^{-1} . Tento absorpční pás odpovídá asymetrické vibraci C–H vazeb v – CH_2 – funkčních skupinách. V případě vzorku FK je tento absorpční pás přítomen v oblasti 2946 cm^{-1} . U vzorků HK a HU si také můžeme všimnout absorpčního pásu v oblasti 2850 resp. 2854 cm^{-1} , který je přisuzován symetrickým vibracím C–H vazeb v methylenových funkčních skupinách (– CH_2 –). Dále je ve FTIR spektru vzorků HK a FK lokalizován široký absorpční pás v oblasti $2665\text{--}2500\text{ cm}^{-1}$. Tento absorpční pás je tradičně

připisován valenční symetrické vibraci O–H···O vazeb v karboxylových kyselinách, které jsou vázané vodíkovými můstky za vzniku dimerní formy –COOH. Hlavní absorpční pásy jednotlivých funkčních skupin vzorků HK a FK byly pozorovány v oblasti vlnočtů 1800–900 cm⁻¹. V této oblasti byl lokalizován významný absorpční pás při 1709 cm⁻¹ pro vzorek HK a při 1716 cm⁻¹ pro vzorek FK. Tento velmi intenzivní absorpční pás odpovídá symetrické valenční vibraci C=O vazeb v karboxylových kyselinách. Ve spektru dále můžeme u všech vzorků HL pozorovat absorpční pás v oblasti 1658 cm⁻¹ pro HK a HU a v oblasti 1662 cm⁻¹ pro vzorek FK. Zmíněný absorpční pás odpovídá C=O vibracím v sekundárních amidech. U vzorku HK můžeme také vidět absorpční pás v oblasti 1616 cm⁻¹, který je připisován valenčním symetrickým vibracím C=C vazeb v aromátech. Těmto symetrickým vibracím je rovněž připisován absorpční pás v oblasti 1512 cm⁻¹. Dále si ve FTIR spektru vzorku HU nelze nepovšimnout absorpčního pásu při 1570 cm⁻¹, který můžeme přiřadit deformačním vibracím N–H a valenčním vibracím C–N vazeb v sekundárních amidech. V případě vzorku HU byla také lokalizována dvojice absorpčních pásů v oblastech při 1458 a 1385 cm⁻¹. Absorpční pás v oblasti 1458 cm⁻¹ odpovídá deformačním vibracím C–H vazeb v methylenových (–CH₂–) a methylových (–CH₃) funkčních skupinách, kdežto pás v oblasti 1385 cm⁻¹ je přisuzován pouze deformačním vibracím v methylových (–CH₃) skupinách. Absorpční pásy, odpovídající symetrickým deformačním vibracím C–H vazeb v methylových (–CH₃) skupinách, byly lokalizovány také u vzorků HK a FK. U zmíněných HK a FK byly tyto pásy lokalizovány v oblastech vlnočtů 1377 resp. 1380 cm⁻¹. Intenzivní absorpční pás v oblasti 1226 cm⁻¹, lokalizovaný pouze u vzorku HK, je tradičně připisován asymetrické vibraci C–O a deformační vibraci O–H vazeb v karboxylových a fenolických –OH skupinách. U vzorku HK byl také lokalizován absorpční pás v oblasti 1037 cm⁻¹, jenž je přisuzován valenční symetrické vibraci C–O vazeb v primárních alkoholech. Dále si můžeme u stejného vzorku všimnout dvou méně intenzivních absorpčních pásů v oblastech 835–798 cm⁻¹ a 775–740 cm⁻¹. Tyto zmíněné absorpční pásy odpovídají deformační vibraci C–H vazeb v *ortho*- resp. v *para*-substituovaných aromatických sloučeninách. V FTIR-DRIFT spektru vzorku FK si lze dále povšimnout několika důležitých absorpčních pásů. Méně intenzivní absorpční pás lokalizovaný při 1414 cm⁻¹ je připisován deformační vibraci C–O vazeb v karboxylátovém aniontu. Další významný absorpční pás, vyznačený na Obr. 11, byl lokalizován v oblasti 1172 cm⁻¹. Tento pás je zpravidla připisován vazebné vibraci C–C–O vazeb v alifatických esterech. U vzorku FK si také nelze nevšimnout velmi ostrého a intenzivního absorpčního pásu v oblasti 1080 cm⁻¹, jenž je tradičně přisuzován valenční symetrické vibraci C–O–C a valenční symetrické vibraci C–O vazeb v alifatických etherech a sekundárních alkoholech. V oblasti deformačních vibrací aromatických C–H vazeb si u vzorku FK můžeme také všimnout absorpčního pásu v oblasti 810–790 cm⁻¹, který je pokládán za indikátor *ortho*-substituovaných aromatických sloučenin. V této oblasti je také u vzorku HU přítomna dvojice absorpčních pásů při 795–780 cm⁻¹ a 760–745 cm⁻¹. Tyto pásy jsou indikátory *ortho*- a *para*-substituovaných aromatických sloučenin [32; 83; 84; 88; 89].

Z infračervených spekter izolovaných HL je zřejmé, že použitá metoda izolace těchto biokoloidních látek byla z hlediska jejich kvalitativních vlastností úspěšná. Absorpční pásy jednotlivých HL, které připadaly různým funkčním skupinám či strukturním jednotkám,

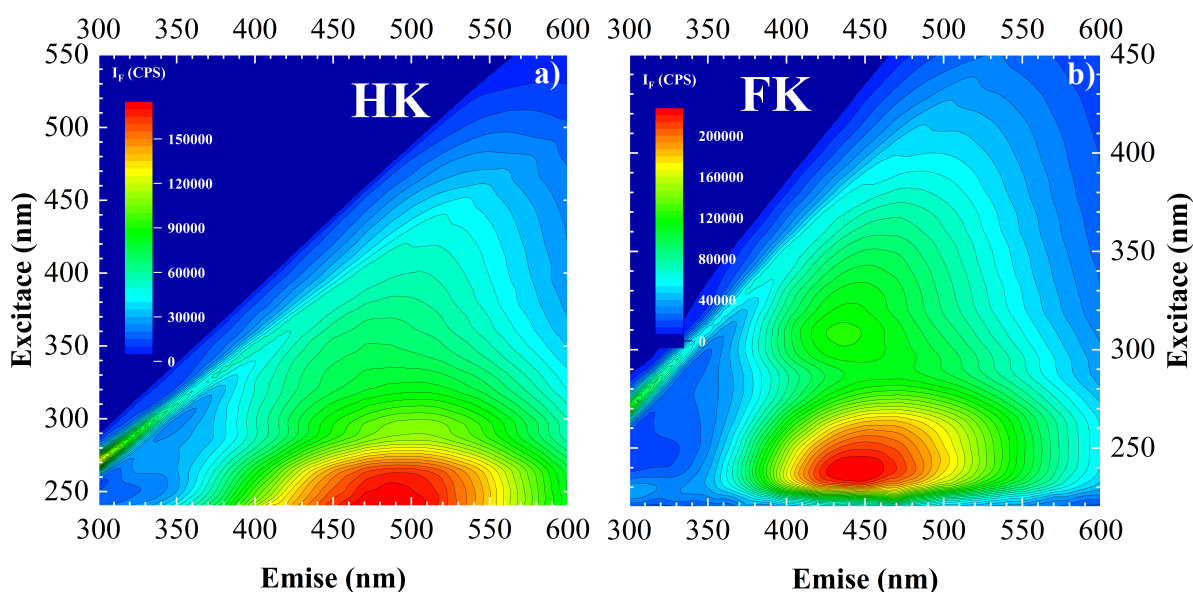
odpovídaly absorpčním pásům, které byly stanoveny a charakterizovány celou řadou autorů [84; 88; 89; 90; 91].



Obr. 11: Normalizovaná FTIR-DRIFT spektra HL izolovaných z alginitu

4.7 Fluorescenční spektrometrie HL

Excitačně-emisní (EEM) spektra HK a FK jsou uvedena na Obr. 12. V EEM spektru vzorku HK (Obr. 12a) bylo lokalizováno fluorescenční maximum v oblasti vlnových délek 240–280/400–500 nm ($\lambda_{ex}/\lambda_{em}$), které je tradičně připisováno fluoroforu A (*fulvic-like*). Tento fluorofor je podle mnoha autorů typický pro HL izolované z různých přírodních matric, kam zpravidla řadíme kaustobiolity, půdní matrice, sedimenty a určité sladkovodní zdroje jako jsou řeky a jezera. U vzorku FK (Obr. 12b) bylo toto maximum lokalizováno v oblasti vlnových délek 235–245/430–460 nm ($\lambda_{ex}/\lambda_{em}$). Při porovnání obou EEM spekter HL lze konstatovat, že v případě vzorku FK byl zmíněný fluorofor A (*fulvic-like*) lokalizován při kratších vlnových délkách emise než u vzorku HK. Rovněž si můžeme všimnout, že tento fluorofor měl v případě vzorku FK vyšší intenzitu fluorescence. Obecně platí, že kratší emisní vlnové délky a větší intenzita fluorescence naměřená v EEM spektrech charakterizují daný vzorek nižším stupněm aromaticity a zároveň nižší molekulovou hmotností. Naopak vyšší vlnové délky a nižší intenzita fluorescence I_F (CPS) znamenají, že je daný vzorek charakterizován přítomností kondenzovaných aromatických strukturních jednotek a elektron-donorních substituentů, zejména substituentů obsahujících karbonylové, hydroxylové a alkoxylové funkční skupiny. Na základě uvedených výsledků můžeme tedy konstatovat, že vzorek izolované FK je charakterizován vyšším množstvím hydroxylových, alkoholových a karbonyl obsahujících funkčních skupin (–COOH a –NH–CO–). Lze také předpokládat, že je vzorek izolované FK charakterizován nižší molekulovou hmotností, nižším stupněm aromaticity a rovněž nižším stupněm kondenzace aromatického jádra, s čím souvisí také menší obsah strukturních jednotek s konjugovaným systémem dvojných vazeb. Tento závěr byl podpořen rovněž i výsledky z elementární analýzy a UV/Vis spektrometrie.



Obr. 12: Excitačně-emisní spektra izolovaných HL a) Alginin HK b) Alginin FK

V případě vzorku FK (Obr. 12b) si dále můžeme povšimnout méně intenzivního fluorescenčního maxima v oblasti 300–310/430–450 nm ($\lambda_{ex}/\lambda_{em}$), které je obvykle přisuzováno fluoroforu C (*humic-like*). Toto fluorescenční maximum je mnohými autory považováno za charakteristické pro HL izolované z půdy, rašeliny či sladkovodních zdrojů.

V případě našeho vzorku FK souvisí tento fluorofor pravděpodobně s přítomností aromatických struktur, které jsou vysoce substituovány reaktivními funkčními skupinami, zejména pak karboxylovými ($-\text{COOH}$) skupinami. Vzorek HK naproti tomu neobsahoval podle EEM spektra žádné další zjevné fluorescenční domény, jako např. fluorofory C (*humic-like*) či fluorofory ne-huminového – mikrobiálního původu (*tyrosin-like*, *tryptofan-like*). Z Obr. 12a však vyplývá, že tyto fluorofory mohou být ve vzorku přítomny, což se ostatně projevilo i v EEM spektrech organických frakcí HK (viz Obr. 13). Vzhledem k multikomponentálnímu charakteru a vysoké molekulové hmotnosti vzorku HK mají totiž potenciální fluorofory podobu překrývajících se fluorescenčních maxim. Za tímto účelem byla proto v této práci použita metoda chromatografie na tenké vrstvě (TLC) [32; 89; 92; 93; 94; 95].

4.8 UV/Vis spektrometrie TLC frakcí HL

V naměřených UV/Vis spektrech nebyly, s výjimkou dvou frakcí HK (HKE1 a HKE6), pozorovány žádné výrazné spektrální rysy. Pouze v případě zmíněných frakcí HKE1 a HKE6 bylo pozorováno lokální absorpční maximum v oblasti vlnové délky 280 nm (viz Obr. 16). Absorpční spektra ostatních naměřených vzorků byla charakterizována bez jakýchkoliv viditelných absorpčních maxim a jejich absorbance se kvaziexponenciálně zvyšovala s klesající vlnovou délkou. Všechny získané organické frakce absorbují výhradně v ultrafialové oblasti. Absorpce v této oblasti elektromagnetického záření znamená, že většina přítomných typů chromoforů obsahuje různě substituované aromatické struktury.

V Tab. 4 jsou zobrazeny vypočtené hodnoty absorpčních koeficientů pro TLC organické frakce HK. Hodnoty retardačních faktorů R_f jednotlivých frakcí HK jsou zobrazeny v Tab. 10. Z výsledků můžeme vidět, že se absorpční koeficient E_{ET}/E_{Bz} u frakcí HK pohyboval v rozmezí 0,10–0,48. Nejvyšších hodnot tento koeficient dosahoval u frakcí HKE2 a HKE5, z čehož vyplývá, že tyto organické frakce byly charakterizovány vyšší mírou substituce aromatického jádra kyslík obsahujícími funkčními skupinami, jako jsou karboxylové, hydroxylové, karbonylové a esterové. Naopak nejnižších hodnot nabýval koeficient E_{ET}/E_{Bz} u frakcí HKE1 a HKE6, tedy frakcí, které, jak již bylo zmíněno dříve, vykazovaly v UV/Vis spektrech nejvyšší míru absorpce (viz Obr. 16). Nízké hodnoty koeficientu E_{ET}/E_{Bz} pak mohou znamenat vyšší substituci aromatických struktur nepolárními funkčními skupinami nebo alifatickými řetězci. Absorpční koeficienty E_2/E_3 a E_2/E_4 se u frakcí HK pohybovaly v rozmezí 3,25–18,60 resp. 7,80–53,14. Z Tab. 4 lze vyčíst, že frakce HKE2 a HKE3 byly charakterizovány nejnižšími hodnotami těchto koeficientů. Lze tedy předpokládat, že tyto frakce mají vysokou molekulovou hmotnost a jsou charakterizovány vysokým stupněm aromaticity. Naopak frakce, lokalizované na obou koncích TLC chromatogramu (HKE1 a HKE6), jsou charakterizovány velmi nízkou molekulovou hmotností a jsou, v porovnání s ostatními frakcemi, více alifatické.

Tab. 4: Vypočtené hodnoty absorpčních koeficientů pro organické frakce HK

Organická frakce HK	Absorpční koeficienty		
	E_2/E_3	E_2/E_4	E_{ET}/E_{Bz}
HKE1	6,83	19,63	0,17
HKE2	3,41	9,67	0,48
HKE3	3,25	7,80	0,32
HKE4	4,25	13,60	0,33
HKE5	4,58	15,71	0,41
HKE6	18,60	53,14	0,10

V případě organických frakcí FK můžeme vidět (viz Tab. 5), že koeficient E_{ET}/E_{Bz} , charakterizující míru substituce aromatického jádra polárními skupinami, měl nejvyšší hodnotu u frakce lokalizované u čela TLC chromatogramu (FKE1). Hodnoty retardačních faktorů R_f jednotlivých frakcí FK jsou uvedeny v Tab. 11. Můžeme si také všimnout, že hodnota zmíněného absorpčního koeficientu stoupala se zvyšujícím se retardačním faktorem R_f jednotlivých organických frakcí FK. Jinými slovy byly frakce, které byly eluovány na TLC nejpomaleji resp. jeho pozice byla v blízkosti nanesení vzorku (startu), charakterizovány nižší mírou substituce aromatického jádra kyslík obsahujícími funkčními skupinami. Tyto frakce (FKE4, FKE5 a FKE6) naopak obsahovaly větší množství aromatických struktur, jež byly substituovány nepolárními skupinami, jako jsou zejména methylové ($-CH_3$) skupiny. Hodnoty absorpčních koeficientů E_2/E_3 a E_2/E_4 se u organických frakcí FK pohybovaly v rozmezí 2,32–3,86 resp. 3,36–17,08, přičemž jejich nejvyšší hodnoty byly stanoveny pro frakce FKE3 a FKE4. Znamená to tedy, že tyto zmíněné frakce mají nižší molekulovou hmotnost a jsou charakterizovány nízkým stupněm aromaticity. Při porovnání frakcí HK a FK si lze také všimnout, že frakce FK byly charakterizovány užším rozpětím hodnot absorpčních koeficientů E_2/E_3 a E_2/E_4 , a tedy i užší distribucí střední molekulové hmotnosti. Obecně je možné konstatovat, že vzorek HK byl v porovnání se vzorkem FK charakterizován vyšší polydisperzitou konstitučních jednotek supramolekulárních asociací.

Tab. 5: *Vypočtené hodnoty absorpčních koeficientů pro organické frakce FK*

Organická frakce FK	Absorpční koeficienty		
	E_2/E_3	E_2/E_4	E_{ET}/E_{Bz}
FKE1	2,99	8,19	0,64
FKE2	2,86	6,74	0,61
FKE3	3,86	17,08	0,61
FKE4	3,79	11,20	0,58
FKE5	3,61	7,21	0,54
FKE6	2,32	3,36	0,58

Absorpční koeficienty organických frakcí nerozpustného HU jsou zobrazeny v Tab. 6 a hodnoty retardačních faktorů R_f jednotlivých frakcí HU můžeme vidět v Tab. 12. Z výsledků je patrné, že hodnota absorpčního koeficientu E_{ET}/E_{Bz} , na rozdíl od organických frakcí FK, klesá s rostoucím retardačním faktorem R_f . Z toho vyplývá, že organické frakce HU, které byly na TLC destičce eluovány nejrychleji, jsou charakterizovány nižší polaritou, a tedy nižší substituací aromatického jádra kyslík obsahujícími funkčními skupinami, jako jsou karboxylové, hydroxylové, karbonylové a esterové. Jisté posloupnosti si můžeme také všimnout u absorpčních koeficientů E_2/E_3 a E_2/E_4 , jejichž hodnota roste se zvyšujícím se retardačním faktorem R_f . Na základě těchto výsledků lze konstatovat, že organické frakce HU, které byly lokalizovány v blízkosti čela TLC chromatogramu, jsou charakterizovány nižší střední molekulovou hmotností a nižším stupněm aromaticity. Při pohledu na úzké rozpětí hodnot absorpčních koeficientů E_2/E_3 (2,14–3,83) a E_2/E_4 (3,49–7,67) můžeme rovněž konstatovat, že vzorek HU byl charakterizován nejnižší polydisperzitou konstitučních jednotek spoluvytvářejících supramolekuly, ze všech z alginitu izolovaných HL.

Tab. 6: *Vypočtené hodnoty absorpčních koeficientů pro organické frakce HU*

Organická frakce HU	Absorpční koeficienty		
	E_2/E_3	E_2/E_4	E_{ET}/E_{Bz}
HUE1	3,83	7,67	0,40
HUE2	2,75	5,50	0,41
HUE3	2,55	4,67	0,44
HUE4	2,36	4,73	0,50
HUE5	2,14	3,49	0,60

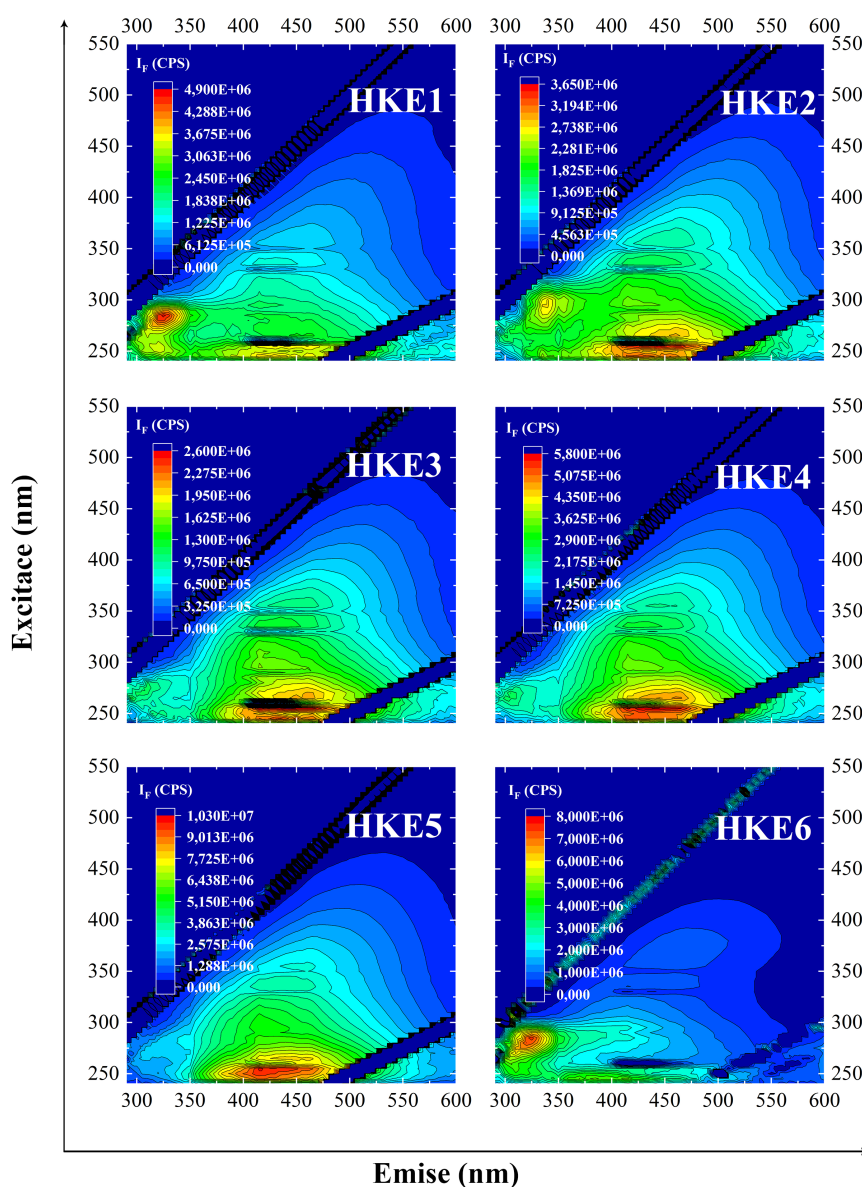
4.9 Fluorescenční spektrometrie TLC frakcí HL

Excitačně-emisní spektra jednotlivých TLC frakcí vzorku HK jsou zobrazena na Obr. 13. V Tab. 7 jsou pak uvedeny přesné hodnoty excitačních a emisních vlnových délek pro jednotlivé fluorescenční domény získané z EEM spekter frakcí HK. Fluorescenční maxima byla lokalizována v UV oblasti excitačních vlnových délek (tj. UVA, UVB a UVC oblast spektra) v rozmezí 240–390 nm. U emisních vlnových délek byla fluorescenční maxima přítomna v oblasti 300–510 nm. V EEM spektru si také můžeme všimnout Rayleighova rozptylu prvního a druhého řádu, který se zde objevuje ve formě dvou diagonálních čar. Jak je zřejmé z Obr. 13, organické frakce HK, analyzované v této práci, vykazují typická fluorescenční maxima HL a DOM izolovaných z kaustobiolitů. V EEM spekter všech frakcí HK si můžeme všimnout fluorescenčního maxima v oblasti vlnových délek 240–260/400–480 nm ($\lambda_{ex}/\lambda_{em}$), které je tradičně připisováno fluoroforu *A* (*fulvic-like*). Z naměřených výsledků vyplývá, že s rostoucí eluční rychlostí na TLC chromatogramu dochází v případě těchto fluoroforů k červenému posunu fluorescenčního maxima tzn. *red-shift*. Tento bathochromní posun může být způsoben vyšší přítomností aromatických struktur, které jsou substituovány elektron-donorními substituenty, zejména substituenty obsahující karbonylové, hydroxylové a alkoxylové funkční skupiny.

Dále můžeme ve všech EEM spektrech frakcí HK vyjma vzorku HKE6 zpozorovat tři izolované fluorescenční domény, které byly lokalizovány v oblasti *humic-like* (300–400/400–500 nm) ($\lambda_{ex}/\lambda_{em}$). Tyto méně intenzivní fluorescenční maxima byla označena *C1* (290–300/410–445 nm), *C2* (330–350/410–470 nm) a *C3* (350–390/415–510 nm) ($\lambda_{ex}/\lambda_{em}$). Jelikož byly HL izolovány z alginitu, který vznikl postupnou sedimentací odumřelých kolonií řas (*algae*), lze fluorofor *C1* (290–300/410–445 nm) ($\lambda_{ex}/\lambda_{em}$) považovat za *marine-like*. Tento fluorescenční pik je mnohými autory považován typické fluorescenční maximum HK izolovaných z pobřežních a mořských sedimentů. Obecně kratší hodnoty emisních vlnových délek u fluoroforů *A* a *C1* mohou být spojeny s nízkomolekulárními složkami nebo s jednoduchými aromatickými strukturami, které obsahují 1–3 benzenová jádra. Podle některých autorů [92] lze oblast *A* připsat nejen aromatickým systémům, ale také lipidům, jako jsou například steroidy. Naproti tomu fluorofory *C2* a *C3*, které jsou lokalizovány při vyšších vlnových délkách emise (nad 430 nm), budou pravděpodobně spojeny s aromatickými strukturami se třemi a/nebo čtyřmi benzenovými jádry. Na základě získaných výsledků můžeme také konstatovat, že frakce HKE6, která je charakterizována nižším obsahem rozličných fluorescenčních domén, je v porovnání s ostatními organickými frakcemi HK charakterizována nižší “molekulární” heterogenitou. Rovněž si můžeme v případě frakcí HKE2 a HKE3 povšimnout nízkých hodnot I_F (CPS) a také absorpčních koeficientů E_2/E_3 a E_2/E_4 (Tab. 4), které charakterizují tyto dvě frakce vysokou molekulovou hmotností.

V EEM spektru všech organických frakcí HK byla dále lokalizována fluorescenční maxima ne-huminového – mikrobiálního původu. Tato fluorescenční maxima byla lokalizována v tzv. oblasti *H* (250–320/300–380 nm) ($\lambda_{ex}/\lambda_{em}$), která je tradičně přisuzována vedlejším produktům rozpustných sloučenin mikrobiálního původu. Tato oblast je také podle studie Doskočila a spol. [92] charakterizována výskytem jednoduchých aromatických

struktur, které jsou substituovány elektron-donorními skupinami jako jsou alkylové nebo methoxylové skupiny. Jak můžeme vidět na Obr. 13 a v Tab. 7, v EEM spektrech byly v oblasti *H* lokalizovány i konkrétní fluorofory, které jsou produkovány na základě biologické aktivity mikroorganismů, jež mají svůj původ v látkách, jako jsou aminokyseliny tyrosin a tryptofan. V případě frakcí HKE1, HKE3, HKE4 a HKE6 bylo pozorováno fluorescenční maximum v oblasti 250–285/310–325 nm ($\lambda_{ex}/\lambda_{em}$), které odpovídá fluoroforu *B* (*tyrosin-like*). U frakce HKE2 bylo maximum lokalizováno v oblasti vyšších vlnových délek emise tzn. 300/340 nm ($\lambda_{ex}/\lambda_{em}$), z čehož lze usuzovat, že se jedná o fluorofor *T* (*tryptofan-like*). Ostatní fluorescenční maxima vyskytující se v oblasti *H* pak odpovídají blíže nespecifikovaným fluoroforům produkováným na základě mikrobiální aktivity v průběhu humifikačního procesu [32; 89; 92; 93; 94; 95].



Obr. 13: Excitačně-emisní (EEM) spektra TLC frakcí izolované HK

Tab. 7: Lokalizace excitačně-emisních délek jednotlivých fluoroforů u organických frakcí HK

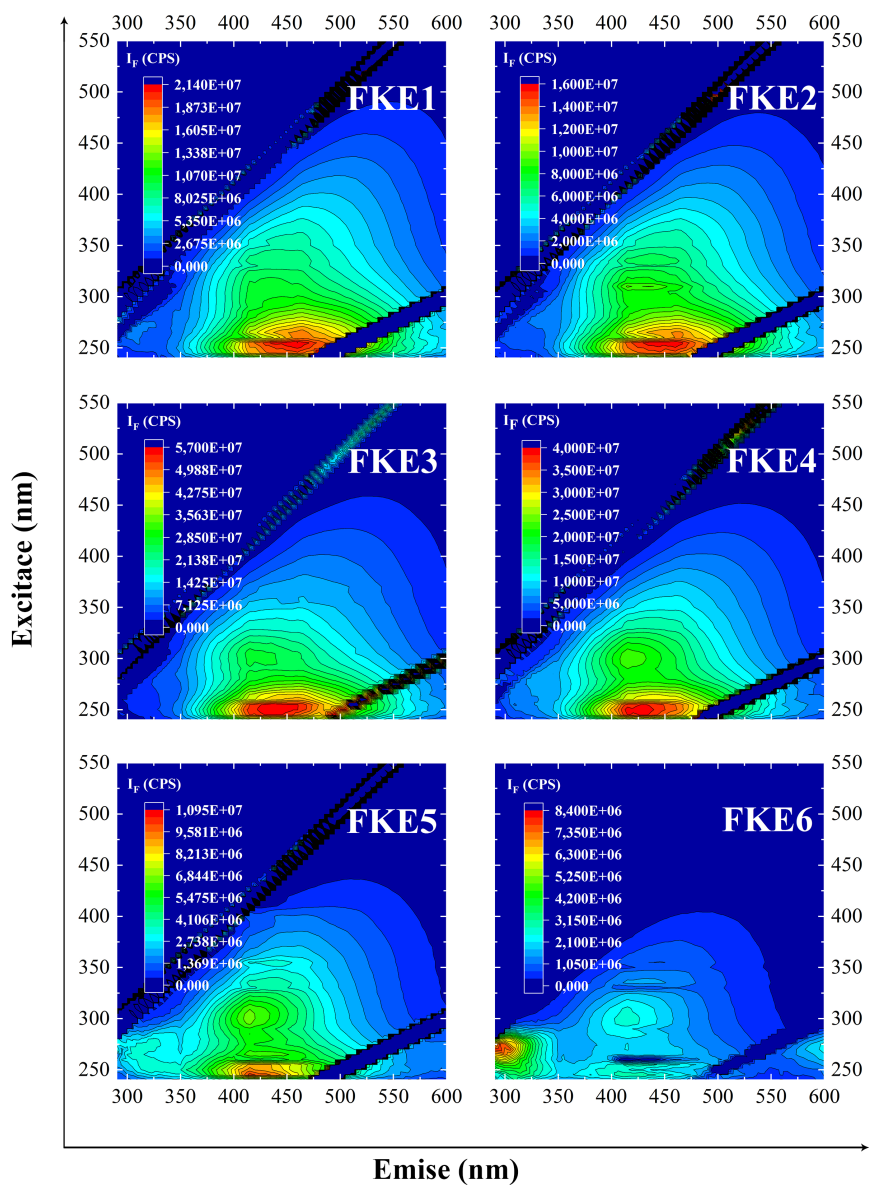
Organická frakce HK	Oblast fluorescenčního maxima					
	A	C			H	
		C1	C2	C3	B	T
	Ex/Em (nm)	Ex/Em (nm)	Ex/Em (nm)	Ex/Em (nm)	Ex/Em (nm)	Ex/Em (nm)
HKE1	250/430	290/415	335/430	360/450	285/325 260/320	
HKE2	260/445	295/425	335/440	360/450		300/340
HKE3	260/450	300/415	340/435	360/455	250/325 270/310	
HKE4	260/450	300/430	335/430	355/445	270/310	
HKE5	250/430	300/420	340/440	355/455		
HKE6	250/400		335/440	370/470	285/325	

EEM spektra organických frakcí FK jsou zobrazena na Obr. 14 a jednotlivé hodnoty excitačně-emisních délek fluorescenčních maxim získaných z těchto spekter jsou zobrazeny v Tab. 8. V EEM spektrech všech frakcí FK můžeme zpozorovat fluorescenční maximum *A* (*fulvic-like*), které bylo lokalizováno v oblasti vlnových délek 240–280/405–470 nm ($\lambda_{ex}/\lambda_{em}$). Podobně jako u frakcí HK (viz Obr. 13) si můžeme všimnout, že s rostoucí eluční rychlostí na TLC chromatogramu docházelo v případě fluoroforů *A* k bathochromnímu posunu fluorescenčního maxima (*red-shift*). Obecně delší emisní vlnové délky mohou naznačovat přítomnost aromatických struktur, které jsou substituovány elektron-donorními substituenty. Spolu s výsledky z UV/Vis spektrometrie resp. hodnotou koeficientu E_{ET}/E_{Bz} (viz Tab. 5) lze předpokládat, že frakce FKE1 obsahuje aromatická jádra, která jsou silně substituována karbonyl obsahujícími funkčními skupinami, jakož i $-OCH_3$, $-OH$, $-NH_2$. Naproti tomu nízká intenzita fluoroforu *A* u frakce FKE6 znamená, že je tato frakce charakterizována vyšším obsahem kondenzovaných aromatických struktur.

Dále byl v EEM spektrech všech frakcí, kromě frakce FKE1, lokalizována fluorescenční maxima v oblasti *humic-like* (290–360/405–470 nm) ($\lambda_{ex}/\lambda_{em}$). U frakce FKE1 byly v této oblasti pozorovány pouze nevýrazná raménka bez zjevného maxima. Fluorescenční maxima *humic-like* u ostatních frakcí byla opětovně označena jako *C1* (290–315/405–460 nm), *C2* (330–340/415–470 nm) a *C3* (350–355/415–460) ($\lambda_{ex}/\lambda_{em}$). Vzhledem k nízkým vlnovým délkám excitace můžeme doménu *C1* opět označit jako *marine-like*. Tento fluorofor je tradičně lokalizován v oblasti 290–310/370–410 nm ($\lambda_{ex}/\lambda_{em}$) a je považován za prekurzor terestriálního fluoroforu *C* (*humic-like*). Z výsledků uvedených v Tab. 8 lze jako v případě

frakcí HK předpokládat, že fluorofory *A* a *C1* jsou vzhledem ke svému nízkým vlnovým délkám emise tvořeny nízkomolekulárními složkami či jednoduchými aromatickými strukturami obsahující 1–3 benzenová jádra na konstituční jednotku. Oblast *A* (*fulvic-like*) může být rovněž připisována také lipidům, jako jsou například steroidy. Naopak fluorofory *C2* a *C3*, které se vyskytují při vlnových délkách emise vyšších než 430 nm, jsou s velkou pravděpodobností spojeny s aromatickými strukturami se třemi a/nebo čtyřmi benzenovými jádry. Dále si nelze nevšimnout, že všechny tři *humic-like* fluorofory (*C1–C3*) byly přítomny pouze v případě frakcí FKE5 a FKE6, z čehož lze usuzovat, že právě tyto dvě frakce byly v porovnání s ostatními frakcemi charakterizovány vyšší “molekulární” heterogenitou. V EEM spektrech můžeme u organických frakcí FKE3 a FKE4 také zpozorovat vysoké hodnoty I_F (CPS), které svědčí o nízké molekulové hmotnosti těchto frakcí. Tyto výsledky jsou v dobré shodě s absorpčními koeficienty E_2/E_3 a E_2/E_4 , které jsou uvedeny v Tab. 5.

V EEM spektrech všech frakcí FK byly také přítomny fluorofory proteinového (mikrobiálního) charakteru. Tyto ne-huminové fluorofory byly, jako v případě frakcí HK, lokalizovány v oblasti *H* (250–320/300–380 nm) ($\lambda_{ex}/\lambda_{em}$), která je připisována vedlejším produktům rozpustných sloučenin mikrobiálního původu. Oblast *H* je navíc, jak již bylo zmíněno dříve, charakterizována výskytem jednoduchých aromatických struktur, jež jsou substituovány elektron-donorními skupinami, tj. methoxylovými a alkoxylovými skupinami. V případě frakcí FKE1 a FKE6 bylo v této oblasti lokalizováno fluorescenční maximum *B* (*tyrosin-like*) při vlnových délkách 270/290–315 nm ($\lambda_{ex}/\lambda_{em}$). U ostatních TLC frakcí FK byly v oblasti *H* pozorovány pouze nevýrazná raménka bez zjevného fluorescenčního maxima. Tato raménka odpovídají s největší pravděpodobností blíže nespecifikovaným fluoroforům, které jsou produkovány na základě mikrobiální aktivity v průběhu humifikačního procesu. Můžeme si také povšimnout, že ve frakcích FK nebyla v porovnání s frakcemi HK přítomna fluorescenční doména *tryptofan-like* [32; 89; 92; 93; 94; 95].



Obr. 14: Excitačně-emisní (EEM) spektra TLC frakcí izolované FK

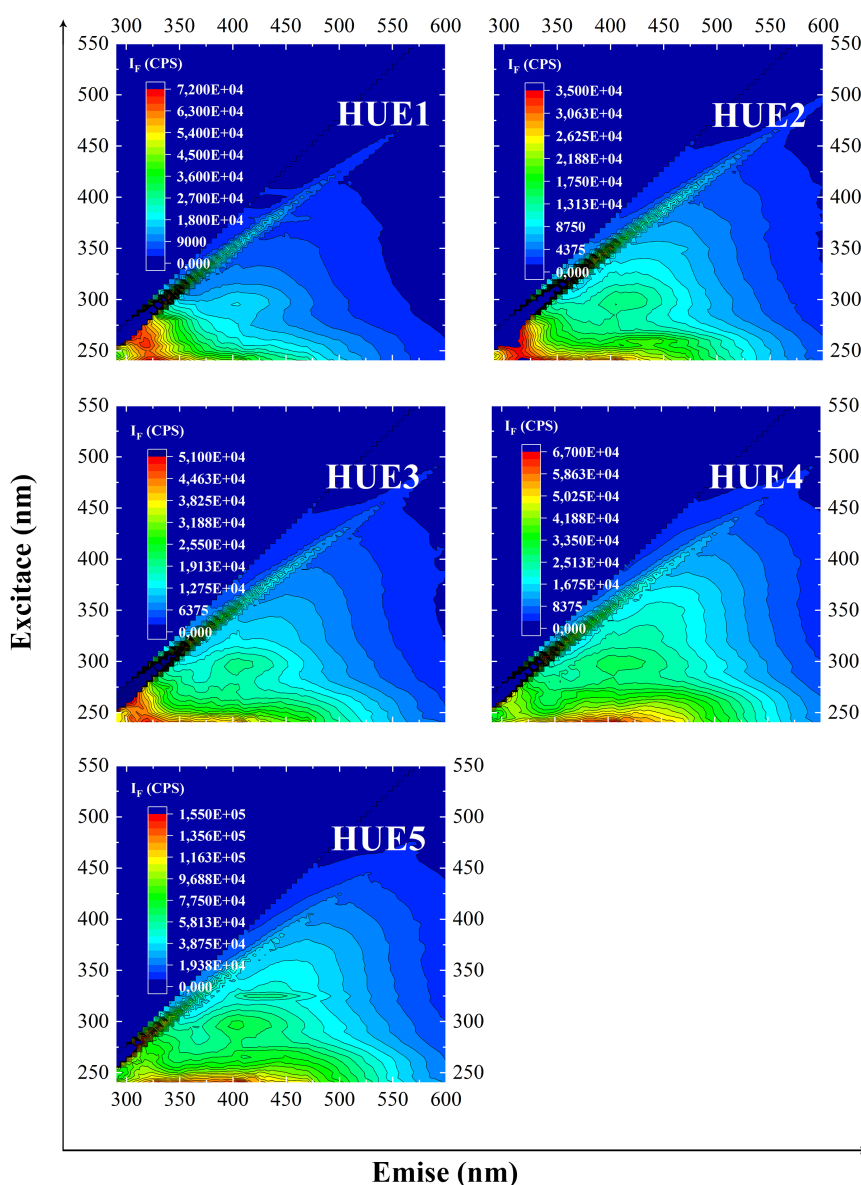
Tab. 8: Lokalizace excitačně-emisních délek jednotlivých fluoroforů u organických frakcí FK

Organická frakce FK	Oblast fluorescenčního maxima				
	A	C			H
		C1	C2	C3	B
	Ex/Em (nm)	Ex/Em (nm)	Ex/Em (nm)	Ex/Em (nm)	Ex/Em (nm)
FKE1	260/460				270/315
FKE2	255/450	310/435	340/440		
FKE3	255/445	300/425			
FKE4	250/425	300/420			
FKE5	240/420	300/415	330/425	355/430	
FKE6	245/425 260/420	300/420	335/430	350/440	270/290

Excitačně-emisní spektra organických frakcí HU jsou zobrazena na Obr. 15. V Tab. 9 jsou poté opět uvedeny přesné hodnoty excitačních a emisních vlnových délek pro jednotlivá fluorescenční maxima získaná z EEM spekter frakcí HU. Už při prvním pohledu na EEM spektra těchto frakcí můžeme vidět, že jsou v nich majoritně zastoupeny fluorofory ne-huminového charakteru. Jinými slovy jde o fluorofory, které jsou produkovány na základě biologické aktivity mikroorganismů, jež mají původ v látkách, jako jsou aminokyseliny tyrosin a tryptofan. V případě frakcí HUE1–HUE3 je v oblasti *H* (250–320/300–380 nm) ($\lambda_{ex}/\lambda_{em}$) lokalizováno fluorescenční maximum při 240–265/300–320 nm ($\lambda_{ex}/\lambda_{em}$), které lze připsat fluoroforu *B* (*tyrosin-like*). Můžeme také předpokládat, že v případě měření EEM spekter od excitační vlnové délky 200 nm by u všech frakcí HU bylo možné lokalizovat zjevné fluorofory v oblasti mikrobiálně derivovaných sloučenin.

Dále si při pohledu na jednotlivá EEM spektra frakcí HU můžeme povšimnout, že u všech frakcí bylo lokalizováno fluorescenční maximum *C1* v oblasti *humic-like*. Vzhledem k nízkým excitačním a emisním vlnovým délkám 290–310/390–430 nm ($\lambda_{ex}/\lambda_{em}$) je možné toto maximum připsat fluoroforu *M* (*marine-like*), tedy fluoroforu, který je pokládán za typické fluorescenční maximum HL izolovaných z pobřežních a mořských sedimentů. Pouze v případě vzorku HUE5, který byl eluován nejpomaleji resp. jeho pozice byla v blízkosti nanesení vzorku (startu), byl v oblasti 325/430 nm ($\lambda_{ex}/\lambda_{em}$) lokalizován fluorofor *C2* (*humic-like*). Z výsledků je tedy zřejmé, že s rostoucí eluční rychlostí bylo zastoupení

humínových fluoroforů u jednotlivých frakcí nižší, naopak ale narůstalo zastoupení fluoroforů mikrobiálního (proteinového) původu. To ostatně můžeme vidět i na TLC diagramu HU na Obr. 21, kde u frakce HUE1 dochází k největší emisi záření z důvodu přítomnosti sloučenin proteinového původu. Tento závěr může souviset také se strukturou silikagelu, na který byl vzorek HU nanášen. Vzhledem k velkému zastoupení –OH funkčních skupin se totiž zadržují na TLC destičce nejprve frakce obsahující fluorofor *humic-like*, který má vyšší obsah kyselých funkčních skupin a je tedy charakterizován vyšší afinitou k silikagelu. Tento výsledek je v dobré shodě s absorpčními koeficienty E_{ET}/E_{Bz} získanými pomocí UV/Vis spektrometrie (viz Tab. 6) [32; 89; 92; 93; 94; 95].



Obr. 15: Excitačně-emisní (EEM) spektra TLC frakcí izolovaného HU

Tab. 9: Lokalizace excitačně-emisních dělek jednotlivých fluoroforů u organických frakcí HU

Organická frakce HU	Oblast fluorescenčního maxima		
	C		H
	C1	C2	B
	Ex/Em (nm)	Ex/Em (nm)	Ex/Em (nm)
HUE1	295/405		260/320
HUE2	290/410		260/315
HUE3	295/405		265/305
HUE4	300/410		
HUE5	290/370 295/405	325/430	

5 ZÁVĚR

Diplomová práce byla zaměřena na detailní charakterizaci struktury HL, především na jednotlivé frakce HK, FK a HU, které byly frakcionovány pomocí metody chromatografie na tenké vrstvě (TLC). Vzorky HL použité v této práci byly izolovány ze vzorku slovenského alginitu na základě postupu mezinárodní společnosti pro výzkum huminových látek (IHSS). Fyzikálně-chemická charakterizace byla provedena nejprve u původního vzorku alginitu za využití elementární analýzy (EA), termogravimetrie (TGA) a infračervené spektrometrie s Fourierovou transformací (FTIR). HL, získané z alginitu, byly následně charakterizovány metodami elementární analýzy (EA), termogravimetrie (TGA), infračervené spektrometrie s Fourierovou transformací (FTIR), molekulové absorpční spektrometrie (UV/Vis) a fluorescenční spektrometrie v ustáleném stavu. Po frakcionaci metodou TLC byly jednotlivé frakce HK, FK a HU dále charakterizovány pomocí metod molekulové absorpční spektrometrie (UV/Vis) a fluorescenční spektrometrie v ustáleném stavu.

Elementární analýza alginitu potvrdila, že je tato přírodní matrice tvořena převážně uhlíkem, vodíkem, kyslíkem a minoritně dusíkem. Z atomových poměrů H/C a O/C poté vyplývalo, že je vzorek charakterizován značnou mírou hydrogenace a také velkým zastoupením strukturních jednotek, které jsou substituovány kyslík obsahujícími funkčními skupinami, jako jsou karboxylové, fenolické či alkoxylové. Pomocí termogravimetrické analýzy a infračervené spektrometrie alginitu bylo dále zjištěno, že je vzorek silně mineralizován anorganickými sloučeninami, jako jsou kaolinit, illit či montmorillonit. Alginit dále obsahoval 30,71 hm % celkové organické hmoty, z toho však pouze 0,30 hm % tvořily HL. Vzhledem k původu alginitu je možné předpokládat, že jeho organická hmota je majoritně tvořena kerogenem typu II, který je součástí řas (*algae*).

Elementární analýza izolovaných HL potvrdila, že jsou tyto vzorky tvořeny uhlíkem, vodíkem, kyslíkem a v malém množství i dusíkem. U vzorků HK a FK byla rovněž v minimálním množství zastoupena síra. Celkově lze z výsledků konstatovat, že vzorky HL vykazují typické prvkové složení HL izolovaných z dnových sedimentů. Z atomových poměrů bylo poté prokázáno, že vzorek FK byl, v porovnání s HK a HU, charakterizován vyšší mírou dehydrogenace a také vyšším obsahem kyselých funkčních skupin tj. karboxylových a fenolických. Pomocí metody UV/Vis spektrometrie byl naopak vzorek HK charakterizován vyšším stupněm humifikace, vyšším stupněm aromaticity a rovněž větší střední molekulovou hmotností. TGA analýza dále odhalila nižší obsah popela u izolované HK a tím pádem i vyšší čistotu tohoto vzorku. V případě HK se jednalo o 1,25 hm. %, oproti tomu obsah popela u vzorku FK dosahoval téměř 26 hm. %. Vyšší obsah popela ve vzorku FK byl pravděpodobně způsoben vynecháním purifikace izolovaných FK za použití směsi HCl a HF. U vzorku HU byl obsah popela nejvyšší (~ 55 hm %), což však lze považovat za poměrně očekávaný výsledek i z toho důvodu, že se v infračerveném spektru tohoto vzorku projeví absorpční pásy charakteristické pro jílové minerály, jako jsou kaolinit a montmorillonit. Cenné informace byly získány také díky výsledkům fluorescenční spektrometrie, které charakterizovaly vzorek FK větším množstvím hydroxylových, alkoholových a karbonyl obsahujících funkčních skupin (–COOH a –NH–CO–). Vzorek HK byl naproti tomu

charakterizován vyšším stupněm kondenzace aromatického jádra a také vyšším obsahem strukturních jednotek s konjugovaným systémem dvojných vazeb.

Z výsledků UV/Vis spektrometrie organických frakcí HL je zřejmé, že jednotlivé vzorky HL vykazovaly zcela odlišnou afinitu ke stacionární fázi, tj. silikagelu. U izolované HK se postupně s rychlostí eluce zvyšovala molekulová hmotnost a stupeň aromaticity až do samotného středu TLC chromatogramu, kde tyto hodnoty byly nejvyšší (HKE3, HKE4). Od středu chromatogramu poté u frakcí HK následoval pokles těchto charakteristických vlastností. Naproti tomu u vzorku FK klesala molekulová hmotnost i stupeň aromaticity až do středu TLC chromatogramu (FKE3, FKE4), odkud poté následoval nárůst těchto vlastností až do ukončení TLC záznamu. U frakcí HU byl zaznamenán pokles stupně aromaticity a molekulové hmotnosti se zvyšující se eluční rychlostí. Rovněž lze konstatovat, že frakce FK byly charakterizovány velmi úzkou distribucí střední molekulové hmotnosti. Dále byl u frakcí FK pozorován se zvyšující se rychlostí eluce nárůst aromatických struktur substituovaných polárními skupinami, zatímco u frakcí HU byly frakce s nejdlejší vzdáleností od startu TLC chromatogramu charakterizovány vyšší substituací aromatických struktur nepolárními skupinami. U vzorku HK byly nízkou polaritou charakterizovány frakce na obou koncích TLC záznamu, tedy HKE1 a HKE6.

Během měření fluorescenčních spekter vykazovaly všechny studované vzorky odpovídající fluorescenční maxima HL izolovaných z terestriálních přírodních matric. Na základě naměřených výsledků bylo u HK a FK zjištěno, že s rostoucí eluční rychlostí na TLC destičce dochází v případě fluoroforů *A* (*fulvic-like*) k výraznému červenému posunu (*red-shift*) fluorescenčního maxima. Tento posun je pravděpodobně způsoben přítomností aromatických struktur, které jsou substituovány elektron-donorními substituenty, zejména substituenty obsahující karboxylové, hydroxylové a alkoxylové funkční skupiny. V případě vzorku HU bylo rovněž zjištěno, že nejvyšší afinitu k silikagelu vykazovaly fluorescenční domény *humic-like*, které byly bohatě substituovány reaktivními funkčními skupinami, jako jsou karboxylové (–COOH) a fenolické resp. alkoholové (–OH). Dále byl v oblasti *humic-like* u všech frakcí lokalizován fluorofor *M* (*marine-like*), který je typickým fluoroforem HL pocházejících z pobřežních a mořských sedimentů, a který jen potvrzuje vznik alginitu postupnou sedimentací odumřelých kolonií řas (*algae*). U jednotlivých frakcí HL byly kromě huminových fluoroforů pozorovány také fluorofory mikrobiálního (proteinového) původu. Přítomnost těchto fluoroforů koreluje s výsledky z UV/Vis spektrometrie, konkrétně s výskytem aromatických struktur, které jsou substituovány semipolárními skupinami (koeficient E_{ET}/E_{Bz}). Tento výsledek lze vysvětlit tím, že fluorofory ne-huminového charakteru jsou produkovány na základě biologické aktivity mikroorganismů, jež mají původ v látkách, jako jsou aminokyseliny tyrosin a tryptofan, které obsahují ve své struktuře méně polární aminovou skupinu v porovnání se silně hydrofilními skupinami –COOH, –OH apod.

Výsledky této diplomové práce ukázaly, že metoda chromatografie na tenké vrstvě je velmi vhodná pro frakcionaci, separaci a vizualizaci komplexních biomolekul, jako je přírodní organická hmota resp. huminové látky. Použití metody TLC chromatografie v této diplomové práci vedlo k výraznému snížení molekulární heterogenity studovaných HL, jejichž struktura a vlastnosti mohly být díky tomu detailně studovány.

6 LITERATURA

- [1] Soil organic matter: Agronomy Fact Sheet Series. In: *Cornell University: Department of Crop and Soil Sciences* [online]. Ithaca, New York [cit. 2020-12-23]. Dostupné z: <http://franklin.cce.cornell.edu/resources/soil-organic-matter-fact-sheet>
- [2] BRADY, N. a R. WEIL. *The Nature and Properties of Soils*. 14. Edition. New Jersey: Pearson Prentice Hall, 2008. ISBN 978-0-13-227939-0.
- [3] MACCARTHY, P., R. MALCOLM, C. CLAPP a P. BLOOM. An Introduction to Soil Humic Substances. In: *Humic Substances in Soil and Crop Sciences: Selected Readings*. Madison, WI, USA: Soil Science Society of America, 1990, s. 1-12. ISBN 9780891188742. DOI:10.2136/1990.humicsubstances.c1
- [4] NEBBIOSO, A. a A. PICCOLO. Advances in humeomics: Enhanced structural identification of humic molecules after size fractionation of a soil humic acid. In: *Analytica Chimica Acta*. 2012, , s. 77-90. ISSN 00032670. DOI:10.1016/j.aca.2012.01.027
- [5] MACAULEY, G., F.D. BALL a F.D. SNOWDON. *Geochemistry and geological factors governing exploitation of selected Canadian oil shale deposits*. Canada: Canadian Govt. Pub. Centre, Supply and Services Canada, 1985. ISBN 0-660-11905-6.
- [6] PETRÁNEK, J., J. BŘEZINA, E. BŘÍZOVÁ, J. CHÁB, J. LOUN a P. ZELENKA. *Encyklopedie geologie*. Praha: Česká geologická služba, 2016. ISBN ISBN978-80-7075-901-1.
- [7] VAAS, D. a V. KONEČNÝ. Bohatstvo skryté v našich sopkách. *Tech SME* [online]. Lesnícka fakulta Technickej univerzity, Zvolen: Štátny geologický ústav Dionýza Štúra [cit. 2020-04-23]. Dostupné z: <https://tech.sme.sk/c/790745/bohatstvo-skryte-v-nasich-sopkach.html>
- [8] KULICH, J., J. VALKO a D. OBERNAUER. Perspective of exploitation of alginite in plant nutrition. In: *Journal of Central European Agriculture*. Volume 2. 2001. ISSN 1332-9049.
- [9] BARANČÍKOVÁ, G. a T. LITAVEC. Comparison of Chemical Structure of Alginite Humic Acids Isolated with Two Different Procedures with Soil Humic Acids. In: *Agriculture (Polnohospodárstvo)*. Bratislava: De Gruyter, 2016, , s. 138-148. ISSN 1338-4376. DOI:10.1515/agri-2016-0014
- [10] HAVELCOVÁ, M., J. MIZERA, V. MACHOVIČ, O. PŘIBYL, L. BORECKÁ a I. KRAUSOVÁ. Sorbenty na bázi huminových látek a chitosanu. *Chemické listy*. 2011, (105), 913-917.

- [11] TAN, Kim. *Humic matter in soil and the environment: principles and controversies*. Second edition. Boca Raton, FL: CRC Press, 2014. Books in soils, plants, and the environment. ISBN 978-1-4822-3445-9.
- [12] STEVENSON, F. *Humus chemistry: genesis, composition, reactions*. 2nd ed. New York: Wiley, 1994. ISBN 978-0-471-59474-1.
- [13] VESELÁ, L., M. KUBAL, J. KOZLER a P. INNEMANOVÁ. Struktura a vlastnosti přírodních huminových látek typu oxihumolitu. *Chemické listy*. 2005, **99**, 711-717.
- [14] SCHNITZER, M. a S. KHAN. *Soil organic matter*. Vol. 8. New York: distributors for the U.S. and Canada, Elsevier/North-Holland, 1978. ISBN 0-444-4 16 10-2.
- [15] O huminových látkách. *INTERNATIONAL HUMIC SUBSTANCES SOCIETY (IHSS)* [online]. 2018 [cit. 2018-12-18]. Dostupné z: <http://www.ihss-cz.cz/o-huminovych-latkach.html>
- [16] SKOKANOVÁ, M. a K. DERCOVÁ. Humínové kyseliny. Pôvod a štruktúra. *Chemické listy*. 2008, (102), 262-268.
- [17] PICCOLO, A. *Humic substances in terrestrial ecosystems*. New York: Elsevier, 1996. ISBN 978-0-444-81516-3.
- [18] PIVOKONSKÝ, M., L. PIVOKONSKÁ, P. BUBÁKOVÁ a V. JANDA. Úprava vody s obsahem huminových látek. In: *Chemické listy*. 104. Praha, 2010, s. 1015-1022.
- [19] KONONOVA, M. *Soil Organic Matter: Its Nature, Its Role in Soil Formation and in Soil Fertility*. 2. Ed. Moscow: Pergamon Press Ltd., 1966. ISBN 978-1483169873.
- [20] KHAN, S.U. a M. SCHNITZER. The retention of hydrophobic organic compounds by humic acid. In: *Geochimica et Cosmochimica Acta*. 1972, , s. 745-754. ISSN 00167037. DOI:10.1016/0016-7037(72)90085-3
- [21] MIRSAL, I. *Soil Pollution: Origin, Monitoring & Remediation*. 2. Ed. Berlin: Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2008, 312 s. ISBN 978-3-540-70775-2.
- [22] WAKSMAN, A. *Humus: origin, chemical composition, and importance in nature*. Baltimore: The Williams & Wilkins Company, 1936, 508 s. ISBN 978-0-59-896662-9.
- [23] KIRK, T. a R. FARRELL. Enzymatic "Combustion": The Microbial Degradation of Lignin. In: *Annual Review of Microbiology*. Cambridge, 1987, , s. 465-501. ISSN 0066-4227. DOI:10.1146/annurev.mi.41.100187.002341
- [24] Význam půdních mikroorganismů pro produkční a mimoprodukční funkce půdy. In: *Mendelova univerzita v Brně* [online]. Brno [cit. 2020-12-23]. Dostupné z: http://web2.mendelu.cz/af_291_projekty2/vseo/print.php?page=4009&typ=html

- [25] STEVENSON, F. Organic Forms of Soil Nitrogen. In: *Nitrogen in Agricultural Soils*. Madison, WI, USA: American Society of Agronomy, Crop Science Society of America, Soil Science Society of America, 1982, s. 67-122. Agronomy Monographs. ISBN 9780891182160. DOI:10.2134/agronmonogr22.c3
- [26] STEINBÜCHEL, A. a M. HOFRICHTER. *Biopolymers*. Chichester: Wiley-VCH, 2001. ISBN 3527302301.
- [27] KEEPAX, R., D. JONES, S. PEPPER a N. BRYAN. The effects of humic substances on radioactivity in the environment. In: *Interactions of Microorganisms with Radionuclides*. Elsevier, 2002, s. 143-177. Radioactivity in the Environment. ISBN 9780080437088. DOI:10.1016/S1569-4860(02)80034-1
- [28] STEINBERG, C. *Ecology of Humic Substances in Freshwaters: Determinants from Geochemistry to Ecological Niches*. 1. Ed. Berlin: Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2003, 440 s. ISBN 978-3-662-06815-1.
- [29] CHERNYSHEVA, M. a G. BADUN. Tritium label in studying sorption of humic substances by carbon-based nanomaterials. In: *European Journal of Chemistry*. 2011, , s. 61-64. ISSN 2153-2257. DOI:10.5155/eurjchem.2.1.61-64.229
- [30] RUTKOWSKA, A. a D. PIKU. Effect of Crop Rotation and Nitrogen Fertilization on the Quality and Quantity of Soil Organic Matter. *Soil Processes and Current Trends in Quality Assessment*. InTech, 2013. ISBN 978-953-51-1029-3. DOI:10.5772/53229
- [31] TAN, K. *Principles of soil chemistry*. 4th ed. Boca Raton, Fla.: CRC Press, 2011. Books in soils, plants, and the environment. ISBN 978-1-4398-1392-8.
- [32] ENEV, V. *Spektrometrické metody pro výzkum huminových látek*. Brno, 2015, 131 s. (přílohy 77 s.). Disertační práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická. Vedoucí práce Prof. Ing. Martina Klučáková, Ph.D.
- [33] FLAIG, W., H. BEUTELSPACHER a E. RIETZ. *Chemical Composition and Physical Properties of Humic Substances*. Berlin: Springer, Berlin, Heidelberg, 1975. ISBN 978-3-540-06861-7.
- [34] AL-FAIYZ, Y. CPMAS ¹³C NMR characterization of humic acids from composted agricultural Saudi waste. In: *Arabian Journal of Chemistry*. 2017, , S839-S853. ISSN 18785352. DOI:10.1016/j.arabjc.2012.12.018
- [35] TAN, K. *Humic Matter in Soil and the Environment: Principles and Controversies: Books in Soils, Plants, and the Environment*. 1. Ed. Athens, Georgia: CRC Press, 2003, 408 s. ISBN 978-0824742720.

- [36] HATCHER, P., M. SCHNITZER, L. DENNIS a G. MACIEL. Aromaticity of Humic Substances in Soils. In: *Soil Science Society of America Journal*. 1981, , s. 1089-1094. ISSN 03615995. DOI:10.2136/sssaj1981.03615995004500060016x
- [37] SAIZ-JIMENEZ, C. The Chemical Structure of Humic Substances. In: *Humic Substances in Terrestrial Ecosystems*. Elsevier, 1996, s. 1-44. ISBN 9780444815163. DOI:10.1016/B978-044481516-3/50002-5
- [38] PICCOLO, A. The supramolecular structure of humic substances: A novel understanding of humus chemistry and implications in soil science. *Advances in agronomy*. Vol. 75. New York: Academic Press, 2002, s. 57-134. ISBN 978-0-1200-0793-6.
- [39] SIMPSON, A., W. KINGERY, M. HAYES et al. Molecular structures and associations of humic substances in the terrestrial environment. In: *Naturwissenschaften*. 2002, , s. 84-88. ISSN 0028-1042. DOI:10.1007/s00114-001-0293-8
- [40] SUTTON, R. a G. SPOSITO. Molecular Structure in Soil Humic Substances: The New View. In: *Environmental Science & Technology*. 2005, , s. 9009-9015. ISSN 0013-936X. DOI:10.1021/es050778q
- [41] PÉDROT, M., A. DIA a M. DAVRANCHE. Dynamic structure of humic substances: Rare earth elements as a fingerprint. In: *Journal of Colloid and Interface Science*. 2010, , s. 206-213. ISSN 00219797. DOI:10.1016/j.jcis.2010.01.069
- [42] PENA-MÉNDEZ, E., J. HAVEL a J. PATOČKA. Humic substances - compounds of still unknown structure: applications in agriculture, industry, environment, and biomedicine. In: *Journal of Applied Biomedicine*. 2005, , s. 13-24. ISSN 1214021X. DOI:10.32725/jab.2005.002
- [43] SEDLÁČEK, P. *Hydrogely huminových kyselin - experimentální model i aplikační forma*. Brno, 2009. Dizertační práce. Vysoké učení technické v Brně. Vedoucí práce Prof. Ing. Martina Klučáková, Ph.D.
- [44] KOCABAGLI, N., M. ALP, N. ACAR a R. KAHRAMAN. The Effects of Dietary Humate Supplementation on Broiler Growth and Carcass Yield. In: *Poultry Science*. 2002, , s. 227-230. ISSN 00325791. DOI:10.1093/ps/81.2.227
- [45] SCHMEIDE, K., S. POMPE, M. BUBNER, K. HEISE, G. BERNHARD a Heino NITSCHKE. Uranium(VI) sorption onto phyllite and selected minerals in the presence of humic acid. In: *Radiochimica Acta*. 2000, . ISSN 2193-3405. DOI:10.1524/ract.2000.88.9-11.723
- [46] DAVIES, G. a E. GHABBOUR. *Humic Substances: Structures, Properties and Uses*. 1. Ed. Cambridge, UK: Woodhead Publishing, 1998, 272 s. ISBN 978-1-85573-806-5.

- [47] OHLENBUSCH, G., M. KUMKE a F. FRIMMEL. Sorption of phenols to dissolved organic matter investigated by solid phase microextraction. In: *Science of The Total Environment*. 2000, , s. 63-74. ISSN 00489697. DOI:10.1016/S0048-9697(00)00376-4
- [48] POERSCHMANN, J., U. TROMMLER, P. NYPLOVA, P. MORGENSTERN a T. GÓRECKI. Complexation–flocculation of organic contaminants by the application of oxyhumolite-based humic organic matter. In: *Chemosphere*. 2008, , s. 1228-1237. ISSN 00456535. DOI:10.1016/j.chemosphere.2007.08.004
- [49] KLÖCKING, R., B. HELBIG, A. STEINBÜCHEL a M. HOFRICHTER. Humic Substances, Medical Aspects and Applications of. *Biopolymers Online*. Weinheim, Germany, 2005. ISBN 3527600035. DOI:10.1002/3527600035.bpol1013
- [50] HO, K., T. LIU, T. HUANG a F. LU. Humic acid mediates iron release from ferritin and promotes lipid peroxidation in vitro: a possible mechanism for humic acid-induced cytotoxicity. In: *Archives of Toxicology*. 2003, , s. 100-109. ISSN 0340-5761. DOI:10.1007/s00204-002-0378-y
- [51] BUCKA, F., A. KÖLBL, D. UTEAU, S. PETH a I. KÖGEL-KNABNER. Organic matter input determines structure development and aggregate formation in artificial soils. In: *Geoderma*. 2019, . ISSN 00167061. DOI:10.1016/j.geoderma.2019.113881
- [52] Přírodní humusové látky. In: *Mendelova univerzita v Brně* [online]. Brno [cit. 2020-12-23]. Dostupné z: http://web2.mendelu.cz/af_291_projekty2/vseo/print.php?page=4269&typ=html
- [53] CAMBARDELLA, C. a E. ELLIOTT. Particulate Soil Organic-Matter Changes across a Grassland Cultivation Sequence. In: *Soil Science Society of America Journal*. 1992, , s. 777-783. ISSN 03615995. DOI:10.2136/sssaj1992.03615995005600030017x
- [54] FITZSIMONS, M.F., M.C. LOHAN, A.D. TAPPIN a G.E. MILLWARD. The Role of Suspended Particles in Estuarine and Coastal Biogeochemistry. In: *Treatise on Estuarine and Coastal Science*. Elsevier, 2011, s. 71-114. ISBN 9780080878850. DOI:10.1016/B978-0-12-374711-2.00404-6
- [55] SIX, J, H BOSSUYT, S DEGRYZE a K DENEFF. A history of research on the link between (micro)aggregates, soil biota, and soil organic matter dynamics. In: *Soil and Tillage Research*. 2004, , s. 7-31. ISSN 01671987. DOI:10.1016/j.still.2004.03.008
- [56] HARTNETT, H. Dissolved Organic Matter (DOM). In: *Encyclopedia of Engineering Geology*. Cham: Springer International Publishing, 2018, s. 1-3. Encyclopedia of Earth Sciences Series. ISBN 978-3-319-12127-7. DOI:10.1007/978-3-319-39193-9_155-1
- [57] FINDLAY, S. a T. PARR. Dissolved Organic Matter. In: *Methods in Stream Ecology*. Elsevier, 2017, s. 21-36. ISBN 9780128130476. DOI:10.1016/B978-0-12-813047-6.00002-4

- [58] SWIFT, R. Fractionation of Soil Humic Substances. AIKEN, G., M. MCKNIGHT, R. WERSHAW a P. MCCARTHY. *Humic substances in soil, sediment, and water: Geochemistry, isolation, and characterization*. Colorado: John Wiley & Sons, Inc., 1985, s. 387-409. ISBN 0-471-88274-7.
- [59] CHRISTENSEN, B. Matching Measurable Soil Organic Matter Fractions with Conceptual Pools in Simulation Models of Carbon Turnover: Revision of Model Structure. In: *Evaluation of Soil Organic Matter Models*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 1996, s. 143-159. ISBN 978-3-642-64692-8. DOI:10.1007/978-3-642-61094-3_11
- [60] SIX, J., P. CALLEWAERT, S. LENDERS, S. DE GRYZE, S. MORRIS, E. GREGORICH, E. PAUL a K. PAUSTIAN. Measuring and Understanding Carbon Storage in Afforested Soils by Physical Fractionation. In: *Soil Science Society of America Journal*. Madison, USA: Soil Sci Soc Amer, 677 South Segoe Road, Madison, USA, WI, 53711, 2002, , s. 1981-1987. ISSN 03615995. DOI:10.2136/sssaj2002.1981
- [61] HOUGHTON, J. a A. RAMAN. *Laboratory Handbook for the Fractionation of Natural Extracts*. 1. vydání. Reading: Chapman & Hall, 1998. ISBN 978-1-4613-7662-0.
- [62] CHRISTENSEN, B. Physical Fractionation of Soil and Organic Matter in Primary Particle Size and Density Separates. In: *Soil Restoration*. New York, NY: Springer New York, 1992, s. 1-90. Advances in Soil Science. ISBN 978-1-4612-7684-5. DOI:10.1007/978-1-4612-2930-8_1
- [63] DON, A. a C. POEPLAU. Physical Methods. *SOM Fractionation* [online]. Braunschweig [cit. 2020-12-23]. Dostupné z: www.somfractionation.org
- [64] SCHMIDT, M., C. RUMPEL a I. KÖGEL-KNABNER. Evaluation of an ultrasonic dispersion procedure to isolate primary organomineral complexes from soils. In: *European Journal of Soil Science*. 2003, , s. 87-94. ISSN 1351-0754. DOI:10.1046/j.1365-2389.1999.00211.x
- [65] VON LÜTZOW, M., I. KÖGEL-KNABNER, B. LUDWIG et al. Stabilization mechanisms of organic matter in four temperate soils: Development and application of a conceptual model. In: *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*. 2008, , s. 111-124. ISSN 14368730. DOI:10.1002/jpln.200700047
- [66] RUMPEL, C., A. SERAPHIN, M. DIGNAC, W. MICHAELIS, K. EUSTERHUES a I. KÖGEL-KNABNER. Effect of base hydrolysis on the chemical composition of organic matter of an acid forest soil. In: *Organic Geochemistry*. 2005, , s. 239-249. ISSN 01466380. DOI:10.1016/j.orggeochem.2004.08.001

- [67] MIKUTTA, R., M. KLEBER, M. TORN a R. JAHN. Stabilization of Soil Organic Matter: Association with Minerals or Chemical Recalcitrance?. In: *Biogeochemistry*. 2006, , s. 25-56. ISSN 0168-2563. DOI:10.1007/s10533-005-0712-6
- [68] SANDRON, S., A. ROJAS, R. WILSON et al. Chromatographic methods for the isolation, separation and characterisation of dissolved organic matter. In: *Environmental Science Processes & Impacts*. 2015, , s. 1531-1567. ISSN 2050-7887. DOI:10.1039/C5EM00223K
- [69] STANBURY, Peter, Allan WHITAKER a Stephen HALL. The recovery and purification of fermentation products. *Principles of Fermentation Technology*. 3rd Edition. Elsevier, 2017, s. 619-686. ISBN 978-0-08-099953-1. DOI:10.1016/B978-0-08-099953-1.00010-7
- [70] KITIS, M., T. KARANFIL, A. WIGTON a J. KILDUFF. Probing reactivity of dissolved organic matter for disinfection by-product formation using XAD-8 resin adsorption and ultrafiltration fractionation. In: *Water Research*. 2002, , s. 3834-3848. ISSN 00431354. DOI:10.1016/S0043-1354(02)00094-5
- [71] ZHEREBKER, A., I. PERMINOVA, A. KONSTANTINOV, A. VOLIKOV, Yu. KOSTYUKEVICH, A. KONONIKHIN a E. NIKOLAEV. Extraction of humic substances from fresh waters on solid-phase cartridges and their study by Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry. In: *Journal of Analytical Chemistry*. Moscow: Pleiades Publishing, Ltd, 2016, , s. 372-378. ISSN 1061-9348. DOI:10.1134/S1061934816040109
- [72] DAI, J., W. RAN, B. XING, M. GU a L. WANG. Characterization of fulvic acid fractions obtained by sequential extractions with pH buffers, water, and ethanol from paddy soils. In: *Geoderma*. Nanjing: Elsevier, 2006, , s. 284-295. ISSN 00167061. DOI:10.1016/j.geoderma.2006.01.003
- [73] POUCHLÝ, Julius. *Fyzikální chemie makromolekulárních a koloidních soustav*. Vyd. 2. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 2001. ISBN 80-708-0422-X.
- [74] GARRETT, R. a CH. GRISHAM. *Biochemistry*. 5th ed. Belmont, CA: Brooks/Cole, Centrage Learning, 2013. ISBN 978-113-3106-296.
- [75] CHON, K., K. CHON a J. CHO. Characterization of size fractionated dissolved organic matter from river water and wastewater effluent using preparative high performance size exclusion chromatography. In: *Organic Geochemistry*. 2017, , s. 105-112. ISSN 01466380. DOI:10.1016/j.orggeochem.2016.11.003
- [76] SOBSTYL, E., A. SZOPA, H. EKIERT, S. GNAT, R. TYPEK a I. CHOMA. Effect directed analysis and TLC screening of Schisandra chinensis fruits. In: *Journal of Chromatography A*. 2020, . ISSN 00219673. DOI:10.1016/j.chroma.2020.460942

- [77] EISH, M. a M. WELLS. Assessing the trihalomethane formation potential of aquatic fulvic and humic acids fractionated using thin-layer chromatography. In: *Journal of Chromatography A*. 2006, , s. 272-276. ISSN 00219673. DOI:10.1016/j.chroma.2006.03.064
- [78] MA, X. a S. GREEN. Fractionation and spectroscopic properties of fulvic acid and its extract. In: *Chemosphere*. Little Rock, Arkansas, USA: Elsevier, 2008, , s. 1425-1434. ISSN 00456535. DOI:10.1016/j.chemosphere.2008.05.029
- [79] KHAIRY, Ahmed. Contribution to the quantification of humic acids by thin layer chromatography. In: *Zeitschrift für Pflanzenernährung und Bodenkunde*. Alexandria: Rheinisch-Bergische Druckerei- und Verlagsgesellschaft, 1990, , s. 133-140. ISSN 00443263. DOI:10.1002/jpln.19901530302
- [80] JANČA, J. Frakcionace tokem ve fokusujících polích. In: *Chemické listy*. Praha, 1998, s. 449-456. ISSN 1213-7103.
- [81] BENEDETTI, M., J. RANVILLE, M. PONTHEU a J. PINHEIRO. Field-flow fractionation characterization and binding properties of particulate and colloidal organic matter from the Rio Amazon and Rio Negro. In: *Organic Geochemistry*. 2002, , s. 269-279. ISSN 01466380. DOI:10.1016/S0146-6380(01)00159-0
- [82] LAKOWICZ, J. *Principles of fluorescence spectroscopy*. 3rd ed. New York: Springer, 2006, 954 s. ISBN 978-0-387-31278-1.
- [83] COATES, J. Interpretation of Infrared Spectra, A Practical Approach. *Encyclopedia of Analytical Chemistry*. New Jersey, USA: John Wiley & Sons Ltd, 2006, s. 10815-10837. ISBN 9780470027318.
- [84] CHEN, Y., C. ZOU, M. MASTALERZ, S. HU, C. GASAWAY a X. TAO. Applications of Micro-Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) in the Geological Sciences—A Review. In: *International Journal of Molecular Sciences*. Beijing, 2015, , s. 30223-30250. ISSN 1422-0067. DOI:10.3390/ijms161226227
- [85] SVĚTLÍK, R., J. SMILEK, M. KALINA, L. PUNČOCHÁŘOVÁ a P. SEDLÁČEK. Vliv pomocných půdních látek na transport pesticidů do podzemních vod. In: *Zahradnictví: Vědecká příloha: Rostliny v suchých oblastech a klimatická změna*. Lednice: Praha: Profi Press, 2019, s. 148-156. ISSN 1213-7596.
- [86] CIESLEWICZ, J. a S. GONET. Properties of humic acids as biomarkers of lake catchment management. In: *Aquatic Sciences - Research Across Boundaries*. Bydgoszcz, Poland, 2004, , s. 178-184. ISSN 1015-1621. DOI:10.1007/s00027-004-0702-0
- [87] CIESLEWICZ, J., S.S. GONET a W. MARSZELEWSKI. Differences in the properties of the bottom sediments in the system of Wdzydze Lakes. In: *Soil and Water Research*. Torun, Poland, 2008, , s. 21-30. ISSN 18015395. Dostupné z: doi:10.17221/2095-SWR

- [88] CHANG, R., R. MYLOTTE, M. HAYES, R. MCLNERNEY a Y. TZOU. A comparison of the compositional differences between humic fractions isolated by the IHSS and exhaustive extraction procedures. *Naturwissenschaften*. 2014, **101**(3), 197-209. ISSN 0028-1042. DOI:10.1007/s00114-013-1140-4
- [89] ENEV, V., P. SEDLÁČEK, L. KUBÍKOVÁ, Š. SOVOVÁ, L. DOSKOČIL, M. KLUČÁKOVÁ a M. PEKAŘ. Polarity-Based Sequential Extraction as a Simple Tool to Reveal the Structural Complexity of Humic Acids. In: *Agronomy*. Brno, 2021, . ISSN 2073-4395. DOI:10.3390/agronomy11030587
- [90] BAIGORRI, R., M. FUENTES, G. GONZÁLEZ-GAITANO, J. GARCÍA-MINA, G. ALMENDROS a F. GONZÁLEZ-VILA. Complementary Multianalytical Approach To Study the Distinctive Structural Features of the Main Humic Fractions in Solution: Gray Humic Acid, Brown Humic Acid, and Fulvic Acid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2009, **57**(8), 3266-3272. ISSN 0021-8561. DOI:10.1021/jf8035353
- [91] SCHMEIDE, K., S. SACHS, M. BUBNER, T. REICH, K. HEISE a G. BERNHARD. Interaction of uranium(VI) with various modified and unmodified natural and synthetic humic substances studied by EXAFS and FTIR spectroscopy. *Inorganica Chimica Acta*. 2003, **351**, 133-140. ISSN 00201693. DOI:10.1016/S0020-1693(03)00184-1
- [92] DOSKOČIL, L., V. ENEV, M. PEKAŘ a J. WASSERBAUER. The spectrometric characterization of lipids extracted from lignite samples from various coal basins. In: *Organic Geochemistry*. Brno: Elsevier, 2016, , s. 34-40. ISSN 01466380. DOI:10.1016/j.orggeochem.2016.02.008
- [93] ENEV, V., L. DOSKOČIL, L. KUBÍKOVÁ a M. KLUČÁKOVÁ. The medium-term effect of natural compost on the spectroscopic properties of humic acids of Czech soils. In: *The Journal of Agricultural Science*. Brno: Cambridge University Press, 2018, , s. 877-887. ISSN 0021-8596. DOI:10.1017/S0021859618000874
- [94] DOSKOČIL, L., J. BURDÍKOVÁ-SZEWIECZKOVÁ, V. ENEV, L. KALINA a J. WASSERBAUER. Spectral characterization and comparison of humic acids isolated from some European lignites. *Fuel*. Brno, 2018, (213), 123-132. ISSN 00162361. DOI:10.1016/j.fuel.2017.10.114
- [95] HANČ, A., V. ENEV, T. HŘEBEČKOVÁ, M. KLUČÁKOVÁ a M. PEKAŘ. Characterization of humic acids in a continuous-feeding vermicomposting system with horse manure. In: *Waste Management*. Praha: Elsevier, 2019, , s. 1-11. ISSN 0956053X. DOI:10.1016/j.wasman.2019.08.032

7 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

DOM	rozpuštěná organická hmota (<i>Dissolved Organic Matter</i>)
DOSY	Diffusion Ordered Spectroscopy
DRIFT	difuzní reflektance
EA	elementární analýza
EEM	excitačně-emisní matice (spektra)
FK	fulvinová kyselina
FKE	frakce fulvinové kyseliny
FTIR	infračervená spektrometrie s Fourierovou transformací
GC	plynová chromatografie
HK	humínová kyselina
HKE	frakce humínové kyseliny
HL	humínové látky
HU	humín
HUE	frakce humínu
IHSS	mezinárodní společnost pro výzkum humínových látek
OM	organická hmota
PCB	polychlorované bifenyly
POM	částicová organická hmota
PVC	polyvinylchlorid
SOM	půdní organická hmota
TGA	termogravimetrická analýza
TLC	chromatografie na tenké vrstvě
UV/Vis	ultrafialová a viditelná oblast elektromagnetického záření

8 PŘÍLOHY



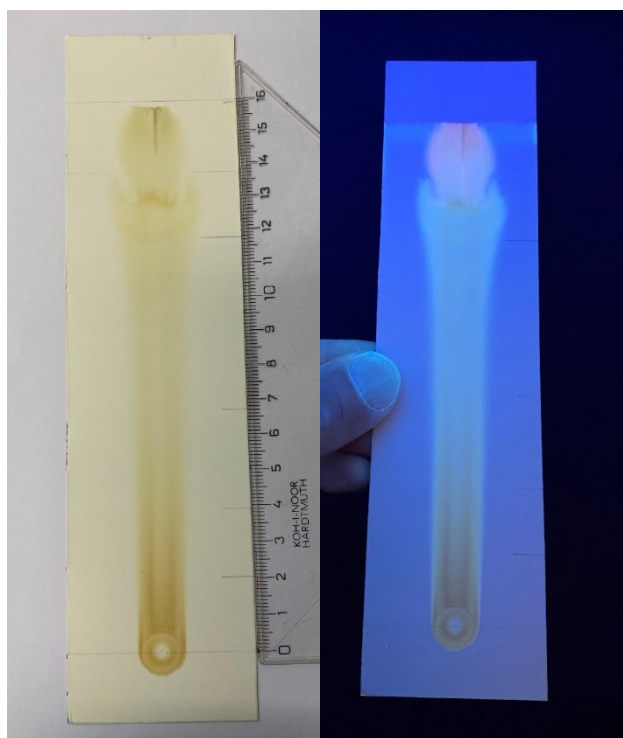
Obr. 16: *Vzorky vysrážených HK (vlevo) a jejich následná dialýza proti deionizované vodě (vpravo)*



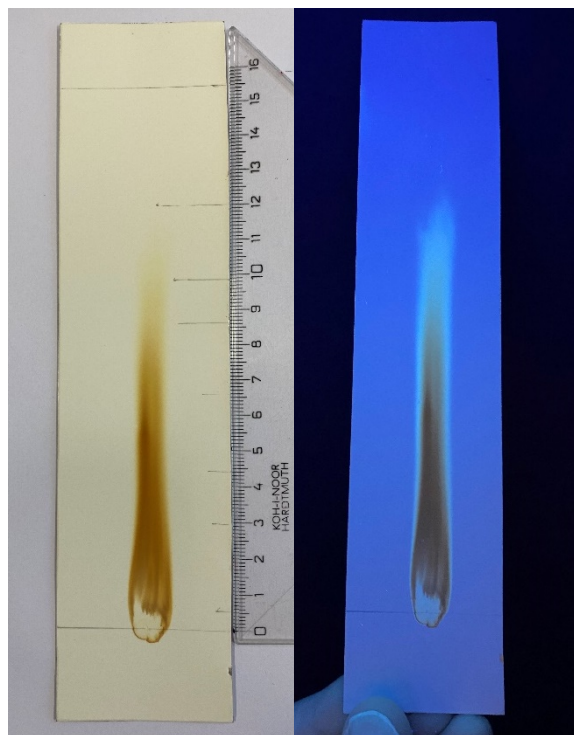
Obr. 17: *Adsorpce FK na pryskyřici DAX-8 (vlevo); zpětná protonace roztoku FK pomocí pryskyřice Amberlite (vpravo)*



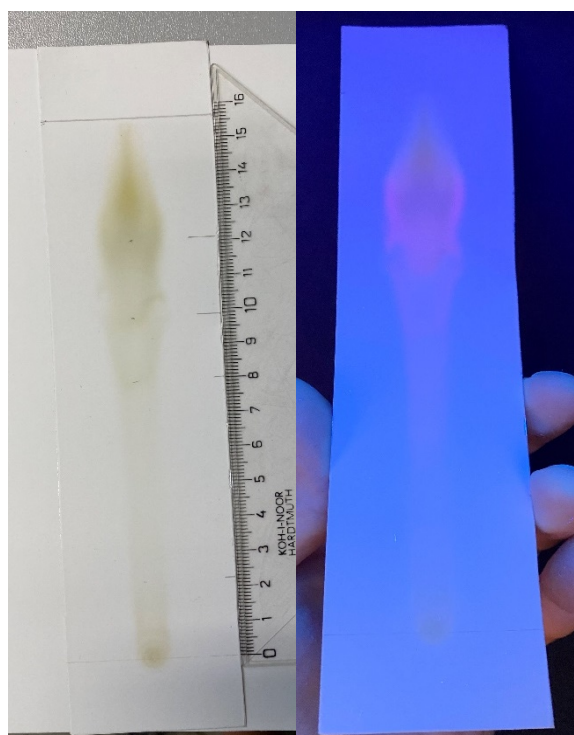
Obr. 18: Izolované vzorky FK (vlevo) a HK (vpravo) po lyofilizaci



Obr. 19: TLC chromatogram vzorku HK při denním světle (vlevo) a pod UV zářením v pozorovací komoře (vpravo)



Obr. 20: TLC chromatogram vzorku FK při denním světle (vlevo) a pod UV zářením v pozorovací komoře (vpravo)



Obr. 21: TLC chromatogram vzorku HU při denním světle (vlevo) a pod UV zářením v pozorovací komoře (vpravo)

Tab. 10: Retardační faktory organických frakcí HK

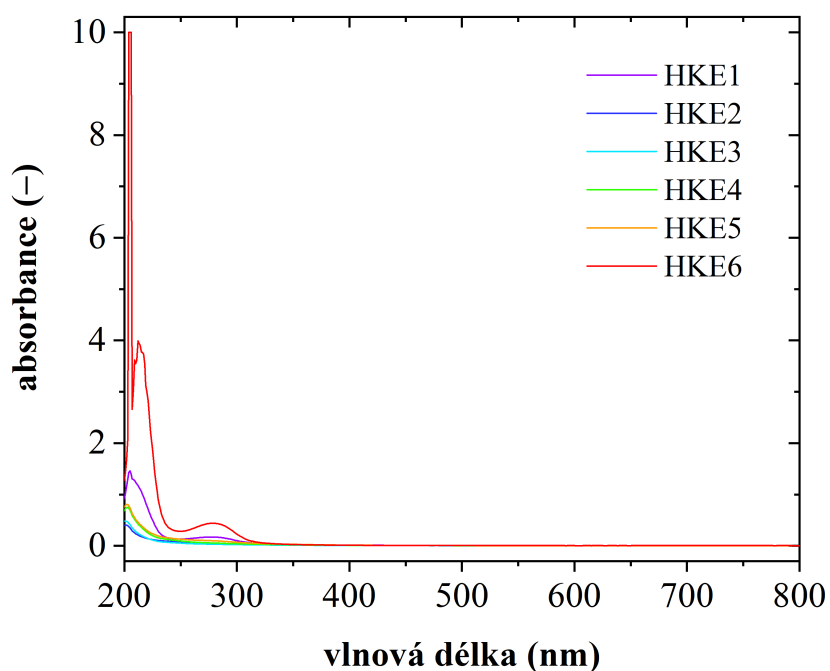
Organická frakce HK	HKE6	HKE5	HKE4	HKE3	HKE2	HKE1
R _f	0,13	0,24	0,42	0,74	0,86	1,00

Tab. 11: Retardační faktory organických frakcí FK

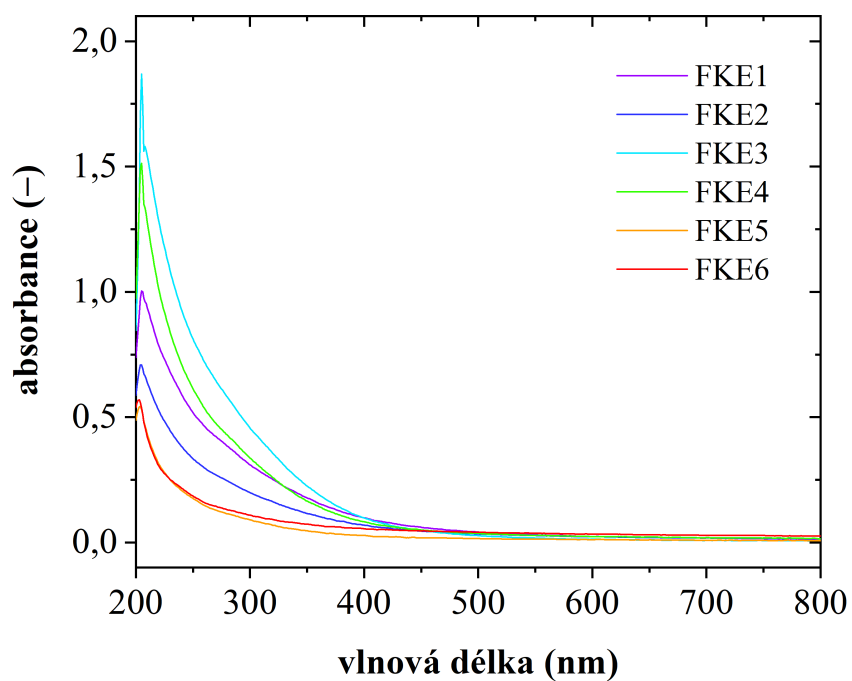
Organická frakce FK	FKE6	FKE5	FKE4	FKE3	FKE2	FKE1
R _f	0,19	0,28	0,55	0,64	0,77	1,00

Tab. 12: Retardační faktory organických frakcí HU

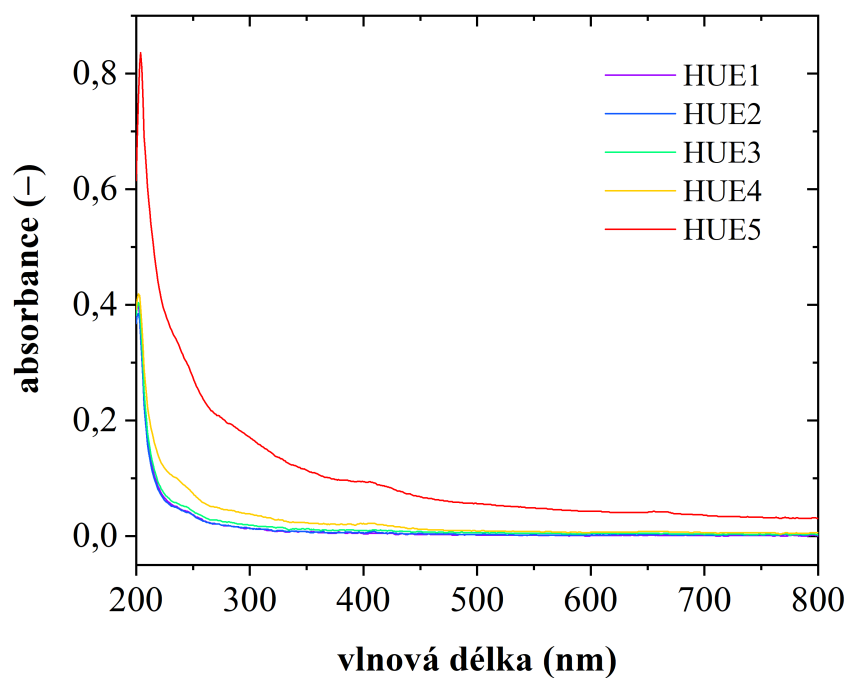
Organická frakce HU	HUE5	HUE4	HUE3	HUE2	HUE1
R _f	0,14	0,51	0,63	0,77	1,00



Obr. 22: UV/Vis spektra TLC frakcí HK izolované z alginitu



Obr. 23: UV/Vis spektra TLC frakcí FK izolované z alginitu



Obr. 24: UV/Vis spektra TLC frakcí HU izolovaného z alginitu