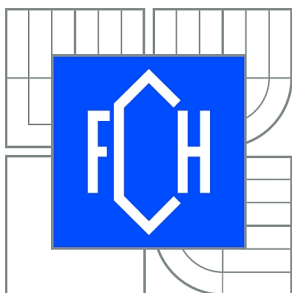




VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA CHEMICKÁ

ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE

FACULTY OF CHEMISTRY

INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

SPEKTROMETRICKÉ METODY PRO VÝZKUM HUMINOVÝCH LÁTEK

SPECTROMETRIC METHODS FOR RESEARCH OF HUMIC SUBSTANCES

DIZERTAČNÍ PRÁCE

DOCTORAL THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Ing. VOJTĚCH ENEV

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

prof. Ing. MARTINA KLUČÁKOVÁ,
Ph.D.

BRNO 2015



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

Zadání dizertační práce

Číslo dizertační práce:	FCH-DIZ0122/2015	Akademický rok: 2015/2016
Ústav:	Ústav fyzikální a spotřební chemie	
Student(ka):	Ing. Vojtěch Enev	
Studijní program:	Fyzikální chemie (P1404)	
Studijní obor:	Fyzikální chemie (1404V001)	
Vedoucí práce	prof. Ing. Martina Klučáková, Ph.D.	
Konzultanti:		

Název dizertační práce:

Spektrometrické metody pro výzkum huminových látek

Zadání dizertační práce:

Posoudit význam vybraných metod pro výzkum v oblasti huminových látek s cílem navrhnout standardizované postupy charakterizace těchto látek.

Termín odevzdání dizertační práce: 31.12.2015

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

Ing. Vojtěch Enev
Student(ka)

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

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
Ředitel ústavu

V Brně, dne 5.1.2015

prof. Ing. Tereza Yáňalová, Úřad
Děkan fakulty

ABSTRAKT

Hlavním cílem disertační práce bylo studium fyzikálně-chemických vlastností huminových látek (HL) prostřednictvím moderních instrumentálních technik. Předmětem studia této disertační práce byly HL izolované z jihomoravského lignitu, jihočeské rašeliny, lesní půdy *Humic Podzol* a extraktu hnědé mořské řasy *Ascophyllum nodosum*. S ohledem na poznání struktury a reaktivity těchto unikátních “biokoloidních” sloučenin byly mimo jiné studovány i standardy, které jsou dodávány mezinárodní společností pro výzkum huminových látek tzn. Leonardite HK, Elliott Soil HL a Pahokee Peat HL. Za tímto účelem byly veškeré HL charakterizovány pomocí elementární analýzy (EA), molekulové absorpční spektrometrie v ultrafialové a viditelné oblasti elektromagnetického záření (UV/Vis), infračervené spektrometrie s Fourierovou transformací (FTIR), spektrometrie nukleární magnetické resonance isotopu uhlíku ^{13}C (LS ^{13}C NMR), ustálené a časově rozlišené fluorescenční spektrometrie. Z naměřených fluorescenčních, UV/Vis a ^{13}C NMR spekter byly vypočteny fluorescenční indexy, absorpční koeficienty, hodnoty specifických absorbancí a strukturní parametry, které byly využity k základní charakterizaci těchto “biokoloidních” sloučenin. Infračervená spektrometrie s Fourierovou transformací byla použita k identifikaci funkčních skupin a strukturních jednotek studovaných HL. V oblasti “otisku palce” tzv. *fingerprintu* komplikují identifikaci infračervených spekter HL překrývající se absorpční pásy jednotlivých funkčních skupin. Tento problém byl řešen pomocí Fourierovy autodekonvoluce. Stacionární fluorescenční spektrometrie byla využita k detailnější charakterizaci použitých HL s ohledem na poznání jejich původu, jednotlivých strukturních jednotek, množství substituentů uplatňujících elektron-donorní a elektron-akceptorní efekt, obsahu reaktivních funkčních skupin, “molekulární” heterogenity, stupně humifikace aj. Pomocí upravené Stern-Volmerovy rovnice byly získány parametry komplexace vzorků Elliott Soil s Cu^{2+} , Pb^{2+} a Hg^{2+} ionty, které jsou základními kritérii posouzení reaktivity těchto “biokoloidních” sloučenin. Klíčovou oblast celé disertační práce pak tvoří časově rozlišená fluorescenční spektrometrie. Poprvé je zde použita metoda tzv. časově rozlišených přes plochu normalizovaných spekter (TRANES), ze kterých lze určit, zda pozorovaná emise HL pochází ze dvou či více emisních jednotek, nebo pouze z jedné. Z průběhu časově rozlišených emisních spekter (TRES) bylo usuzováno o viskozitě mikroprostředí okolo excitovaných fluoroforů HL.

KLÍČOVÁ SLOVA

huminové látky, van Kreveleného diagram, absorpční koeficienty, Fourierova autodekonvoluce, fluorescenční maxima, reaktivita, komplexace, ^{13}C NMR spektrometrie, isoemisní bod, hydrofobní domény

ABSTRACT

The main aim of doctoral thesis is the study on physicochemical properties of humic substances (HS) by modern instrumental techniques. The subject of the study were HS isolated from South Moravian lignite, South Bohemian peat, forest soil *Humic Podzol* and finally extract from brown sea algae *Ascophyllum nodosum*. With respect on determination of structure and reactivity of these unique “biocolloids”, standard samples (*Leonardite* HA, *Elliott Soil* HS and *Pahokee Peat* HS) were also studied. These samples were obtained from International Humic Substances Society (IHSS). All mentioned substances were characterized by elemental analysis (EA), molecular absorption spectroscopy in ultraviolet and visible region (UV/Vis), infrared spectroscopy with Fourier transformation (FTIR), nuclear magnetic resonance spectroscopy of carbon isotope ^{13}C (LS ^{13}C NMR), steady-state and time resolved fluorescence spectroscopy. Obtained fluorescence, UV/Vis and ^{13}C NMR spectra were used for calculation of fluorescence and absorption indexes, values of specific absorbance and structural parameters respectively, which were used for fundamental characterization of these “biocolloidal” compounds. Infrared spectroscopy with Fourier transformation was utilized for the identification of functional groups and structural units of HS. Evaluation of infrared spectra is quiet complicated by overlapping of absorption bands especially in fingerprint region. This problem was overcome by Fourier self-deconvolution (FSD). Steady-state fluorescence spectroscopy was used for deeper characterization of HS with respect to origin, structural units, amount of substituents with electron-donor and electron-acceptor effects, content of reactive functional groups, “molecular” heterogeneity, the degree of humification, etc. Parameters of complexation of samples *Elliott Soil* with heavy metal ions (Cu^{2+} , Pb^{2+} and Hg^{2+}) were obtained by using modified Stern-Volmer equation. These ions were chosen purposefully, because the interaction of HS with these ions is one of the fundamental criteria for the assessment of the reactivity of HS. Key part of the whole doctoral thesis is time-resolved fluorescence spectroscopy. It is able to determine the origin of emission of HS by method Time-Resolved Area Normalized Emission Spectra (TRANES). The viscosity of micro medium about excited fluorophores of HS was determined by Time-Resolved Emission Spectra (TRES).

KEYWORDS

humic substances, van Krevelen diagram, absorption coefficients, Fourier self-deconvolution, fluorescence maxima, reactivity, complexation, ^{13}C NMR spectroscopy, isoemission point, hydrophobic domains

ENEV, V. Spektrometrické metody pro výzkum huminových látek. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2015. 131 s. (přílohy 77 s.). Vedoucí disertační práce prof. Ing. Martina Klučáková, Ph.D.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že tato disertační práce byla vypracována samostatně, a že všechny použité literární zdroje jsou správně a úplně citovány. Tato práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické Vysokého učení technického v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího disertační práce a děkana FCH VUT v Brně.

.....
Ing. Vojtěch Enev

Tato práce byla podpořena Centrem materiálového výzkumu na Fakultě chemické Vysokého učení technického v Brně a projektu: Centrum materiálového výzkumu na FCH VUT v Brně; udržitelnost a rozvoj, r.č. LO1211, za finanční podpory Národního programu udržitelnosti I (Ministerstvo školství, mládeže a tělovýchovy).

Na tomto místě bych velmi rád poděkoval mé školitelce, prof. Ing. Martině Klučákové, Ph.D., za všestranné vedení, cenné rady, spoustu energie a čas, který mi během studia a mimo jiné i při vypracování této disertační práce věnovala. Dále děkuji skvělým kolegům Ing. Jiřímu Smilkovi, Ing. Michalu Kalinovi, Ph.D., Ing. Jakubu Mondekovi a Ing. Filipu Mravcovi, Ph.D., za naprosto ojedinělou a vždy perfektní spolupráci při řešení rozličných experimentálních i vědeckých problémů. V neposlední řadě bych rád poděkoval Ing. Leoši Doskočilovi, Ph.D., Ing. Petru Sedláčkovi, Ph.D., Ing. Janě Burdíkovej, Ing. Andrei Kargerovej, Ph.D., a Ing. Lucii Törökovej, Ph.D., za jejich čas a přátelskou vstřícnost, kterou mi věnovali po celou dobu mého studia.

Zvláštní poděkování patří mé celé rodině za jejich podporu, trpělivost a perfektní zázemí, které mi bylo vždy oporou.

OBSAH

1	ÚVOD	8
2	TEORETICKÉ ZÁKLADY	9
2.1	Huminové látky a rozpuštěná organická hmota	9
2.1.1	<i>Rozdělení huminových látek</i>	9
2.1.2	<i>Rozdělení přírodní organické hmoty dle fluorescenční spektrometrie</i>	11
2.1.3	<i>Vznik huminových látek</i>	13
2.1.4	<i>Molekulární struktura huminových látek</i>	15
2.1.5	<i>Organominerální komplex</i>	18
2.1.6	<i>Vazebné možnosti huminových látek</i>	18
2.1.7	<i>Využití huminových látek</i>	19
2.2	Luminiscence.....	22
2.2.1	<i>Franck-Condonův princip</i>	23
2.2.2	<i>Stokesův posun</i>	24
2.2.3	<i>Hlavní charakteristiky fluorescence</i>	24
2.2.4	<i>Steady-state a časově rozlišená fluorescence</i>	25
2.2.5	<i>Pulzní metoda měření časově rozlišených fluorescenčních spekter</i>	26
2.2.6	<i>Metoda měření TCSPC</i>	27
2.2.7	<i>TCSPC data</i>	28
2.2.8	<i>Konvoluční integrál</i>	29
2.2.9	<i>Vyhodnocení</i>	29
2.2.10	<i>Analýza měření časově rozlišené fluorescence</i>	30
2.2.11	<i>Vnitřní filtrační efekt</i>	31
2.2.12	<i>Časově rozlišená emisní spektra</i>	32
3	SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	34
3.1	UV/Vis spektrometrie HL a DOM	34
3.2	Infračervená spektrometrie s Fourierovou transformací HL a DOM.....	35
3.3	Ustálená a časově rozlišená fluorescenční spektrometrie HL a DOM.....	38
3.4	¹³ C spektrometrie nukleární magnetické resonance HL a DOM.....	44
4	CÍLE DISERTAČNÍ PRÁCE	47
5	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	48
5.1	Zdroje huminových látek.....	48
5.1.1	<i>Další zdroje huminových látek</i>	48
5.2	Izolace huminových kyselin	48

5.3	Použité metody a techniky	49
5.3.1	<i>Analýza rozpuštěného organického uhlíku (DOC)</i>	49
5.3.2	<i>Elementární analýza</i>	49
5.3.3	<i>UV/Vis spektrometrie</i>	50
5.3.4	<i>FTIR spektrometrie</i>	50
5.3.5	<i>Ustálená fluorescenční spektrometrie</i>	51
5.3.6	<i>Časově rozlišená fluorescenční spektrometrie</i>	55
5.3.7	<i>¹³C spektrometrie nukleární magnetické resonance</i>	56
6	VÝSLEDKY A DISKUZE	58
6.1	Elementární a DOC analýza huminových látek	58
6.2	UV/Vis spektrometrie huminových látek.....	61
6.3	FTIR spektrometrie a Fourierova autodekonvoluce huminových látek.....	65
6.4	Ustálená fluorescenční spektrometrie huminových látek.....	78
6.4.1	<i>Vnitřní filtrační efekt huminových látek</i>	78
6.4.2	<i>Ustálená fluorescenční spektrometrie huminových látek</i>	81
6.5	Časově rozlišená fluorescenční spektrometrie huminových látek.....	95
6.6	Liquid-state ¹³ C NMR spektrometrie huminových látek.....	103
7	ZÁVĚR	109
8	LITERATURA.....	112
9	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	126
10	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ	129
11	PŘÍLOHY	132
11.1	UV/Vis spektrometrie huminových látek.....	132
11.2	Časově rozlišená fluorescenční spektrometrie huminových látek.....	134
11.3	Liquid-state ¹³ C NMR spektrometrie huminových látek.....	139
12	VĚDECKÁ A PUBLIKAČNÍ ČINNOST AUTORA	141
12.1	Články v impaktovaném časopise	141
12.2	Články v recenzovaném časopise.....	142
12.3	Konferenční příspěvky indexované v databázi Web of Science	142
12.4	Příspěvky na mezinárodních konferencích.....	142
12.5	Příspěvky na tuzemských a studentských konferencích.....	143
12.6	Souhrnné výzkumné zprávy	144

1 ÚVOD

Tradičně jsou huminové látky (HL) pokládány za “biokoloidní” sloučeniny, které společně s ostatními frakcemi DOM (*Dissolved Organic Matter*) tvoří nedílnou součást organické hmoty (OM). Jestliže si uvědomíme, kde všude se s těmito látkami můžeme setkat, jedná se bezesporu o nejvíce rozšířený organický materiál na zemském povrchu. Jednotlivé frakce HL (HK – huminové kyseliny, FK – fulvinové kyseliny a v neposlední řadě nerozpustné huminy) se ve svém přirozeném prostředí vyskytují v různých formách. V přírodních ekosystémech se HL nejčastěji vyskytují v pevné, nerozpuštěné formě, kde jsou součástí tzv. organominerálního komplexu, nebo se mohou nacházet ve formě koloidních roztoků (jako hlavní frakce rozpuštěného organického uhlíku DOC přirozeně se vyskytujícího v půdních a vodních ekosystémech). Pozoruhodné vlastnosti HL resp. DOM (samočištění a vazba CO₂ v půdě, pufrovací a sorpční schopnost, biologická aktivita, ...) jsou lidské společnosti známy již několik desetiletí, vzhledem k tomu, že je publikováno mnoho odborných prací, které se věnují této problematice. I když je studiu HL stále věnována značná část vědeckého zájmu, je znalost struktury těchto látek, stejně jako ligninu doposud ne zcela objasněná. Obecně můžeme říci, že čím více nejasností se objevuje v otázkách struktury a geneze HL resp. DOM, tím více je značná část vědeckého zájmu fokusována na oblasti aplikačního potenciálu těchto látek v nejrůznějších oblastech lidské činnosti, ať už se jedná o průmysl, zemědělství, ochranu životního prostředí či biomedicínských aplikací.

Pro studium budoucích aplikací je nezbytně nutná znalost struktury a reaktivity těchto unikátních “biokoloidních” sloučenin. Jeden z možných způsobů představuje využití nedestruktivních analytických metod: molekulová absorpční spektrometrie v ultrafialové a viditelné oblasti (UV/Vis), infračervená spektrometrie s Fourierovou transformací (FTIR), ¹³C spektrometrie nukleární magnetické rezonance (¹³C NMR), ustálená (steady-state) a časově rozlišená fluorescenční spektrometrie. Obecně nám tyto spektrometrické techniky poskytují mnoho cenných informací týkajících se struktury, reaktivity a fyzikálně-chemických vlastností HL a DOM.

2 TEORETICKÉ ZÁKLADY

2.1 Huminové látky a rozpuštěná organická hmota

V úvodních částech tematických monografií a odborných publikací jsme konfrontováni s výrokem, že huminové látky (HL) jsou nejrozšířenějšími organickými sloučeninami na zemském povrchu. Toto tvrzení nabývá dogmatického rozměru, pokud si uvědomíme, kde všude se s těmito látkami můžeme setkat. Huminové látky jsou majoritní součástí půdní organické hmoty, rovněž se vyskytují v *kaustobiolitech* (sedimentech organického původu) a terestriálních matricích. V nižších koncentracích se také vyskytují ve vodách sladkovodních i podzemních a také jsou součástí přímořských sedimentů [1–4]. Jejich přítomnost byla dokázána v gastrointestinálních traktech a krvi především teplokrevných živočichů [5]. V důsledku tohoto zjištění můžeme konstatovat, že HL jsou součástí živé i neživé přírody. Toto tvrzení je podpořeno faktem, že HL byly rovněž izolovány z buněčných pletiv hnědé řasy *Pilayella littoralis* aj. [6–7].

Huminové látky jsou přírodní organické sloučeniny, které vznikají nejčastěji chemickým a biologickým rozkladem organické hmoty (tj. zbytků rostlinných a živočišných těl) a syntetickou činností mikroorganismů. Tento proces je obecně nazýván jako humifikace [8]. Obsah HL v přírodních matricích kolísá od stopových množství (písky, jíly), přes jednotky procent (běžné zeminy) až k desítkám procent (hnědá uhlí). Mimořádně vysoký obsah huminových látek vykazují hnědá uhlí (lignit, leonardit a oxyhumolit) a rašelina, proto se tyto uvedené přírodní matrice jeví jako vhodné zdroje HL pro neenergetické aplikace. V mnoha odborných publikacích se uvádí, že celkový obsah uhlíku ve formě HL je až $6 \cdot 10^{12}$ tun, což ve srovnání s celkovým obsahem organického uhlíku v živých organismech ($7 \cdot 10^{11}$ tun) převyšuje téměř desetkrát [9].

2.1.1 Rozdělení huminových látek

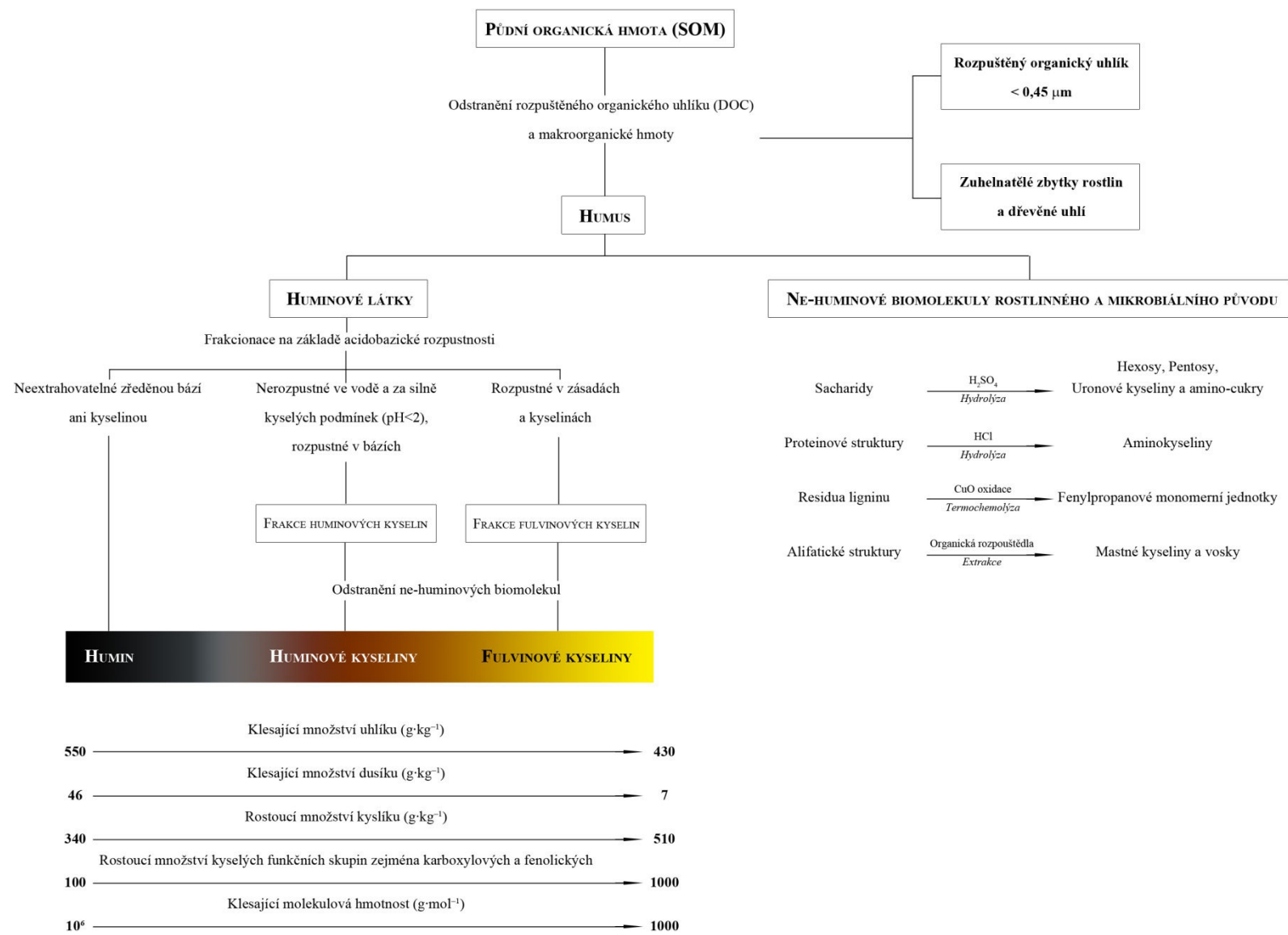
První relevantní rozdělení huminových látek bylo předloženo švédským chemikem Berzeliusem roku 1839, který rozdělil a klasifikoval HL do tří kategorií na základě rozpustnosti jednotlivých frakcí HL v alkalickém a kyselém prostředí [10]. Na jeho poznatky navázal Mulder, který doplnil jeho teorii rozdělení HL o vlastnosti popisující barevnost a jejich rozpustnost v příslušných rozpouštědlech.

Dle acidobazické rozpustnosti resp. nerozpustnosti můžeme HL rozdělit do následujících kategorií, které odpovídají jednotlivým základním frakcím HL:

fulvinové kyseliny (FK), tato frakce HL zůstává v okyseleném vodném roztoku daného výluhu, tzn., jsou rozpustné v celém rozsahu pH;

humínové kyseliny (HK), jsou nerozpustné za silně kyselých podmínek (koagulují) a velmi málo rozpustné ve vodě, v alkalickém prostředí jsou HK rozpustné;

huminy (HU), jsou nerozpustné a proto je nelze převést do roztoku kyselými ani zásaditými extrakčními činidly.



Obr. 1: Rozdělení půdní organické hmoty SOM (Soil Organic Matter) [12]

Jak uvádí Obr. 1, jednotlivé frakce HL se podstatně liší svými fyzikálně-chemickými vlastnostmi, i když je jejich chemická struktura velmi podobná. Na první pohled je zřejmé, že jednotlivé frakce HL se navzájem liší barvou (FK jsou žluté, HK jsou hnědé až hnědočerné a HU jsou černé). Huminové kyseliny mohou být rozděleny na *hnědé* HK (nekoagulují s přidavkem elektrolytu v alkalickém prostředí) a *šedé* HK (s přidavkem elektrolytu koagulují). Frakce HK, která je rozpustná v alkoholu se nazývá *hymatomelanová kyselina*, která je rovněž známa jako lipidická frakce HK. Obdobou hymatomelanové kyseliny je v případě FK *kyselina fugavová*, která je rozpustná při nízkých hodnotách pH.

Podle polymerního konceptu vzniku HL je jejich tmavé zbarvení vázáno na přítomnost složek s vysokou molekulovou hmotností (tj. složek polymerního charakteru). Jak je vidět z Obr. 1, tento koncept vysvětluje rozdíly mezi jednotlivými frakcemi HL diferencemi v jejich molekulových hmotnostech, počtu kyselých funkčních skupin zejména karboxylových a fenolických, množství biogenních prvků (C, O a N) a v neposlední řadě v jejich stupních polymerace. Tento koncept relevantně vystihuje fyzikálně-chemické vlastnosti HL.

HK jsou obecně charakterizovány vyšším obsahem uhlíku a dusíku, ale nižším obsahem kyslíku v porovnání s FK. HK obsahují nižší množství kyselých funkčních skupin zejména karboxylových i jejich celková kyselost je nižší nežli je tomu v případě FK.

Zastoupení jednotlivých frakcí HL se liší podle druhu a typu přírodní matrice. Hnědá uhlí (*lignit a leonardit*) prakticky neobsahují FK nebo takové sloučeniny, které by byly FK podobné, zatímco jejich organická hmota je převážně složena z frakcí HK [3, 11].

V obecnějším pohledu můžeme HL považovat za sloučeniny, které jsou nedílnou součástí přírodní organické hmoty. Přírodní organická hmota (NOM – *Natural Organic Matter*) je významnou součástí terestriálních a přímořských ekosystémů. Podle velikosti částic se NOM dělí na rozpuštěné (DOM – *Dissolved Organic Matter*) a nerozpuštěné (SOM – *Suspended Organic Matter*). Dohodou byla velikostní hranice mezi rozpuštěnými a nerozpuštěnými organickými látkami stanovena na 0,45 μm . Jedná se o složitou směs aromatických a alifatických uhlovodíkových struktur s mnoha typy funkčních skupin (např. amidové, karboxylové, hydroxylové, ketonické a mnoha dalších) s různými fyzikálními a chemickými vlastnostmi. DOM mohou být původu alochtonního nebo autochtonního. Mezi alochtonní organické látky řadíme výluhy z půd a sedimentů (půdní a rašelinné HL, případně výluhy z listů a tlejícího dřeva), mezi autochtonní pak produkty životní činnosti rostlinných a živočišných organismů a bakterií a rovněž látky vzniklé biologickými a chemickými přeměnami odumřelých buněk. Proto je přírodní organická hmota tvořena HL (HK a FK) a látkami nehuminového charakteru (především proteiny, sacharidy, alifatickými strukturami a residui ligninu) [13–15].

2.1.2 Rozdělení přírodní organické hmoty dle fluorescenční spektrometrie

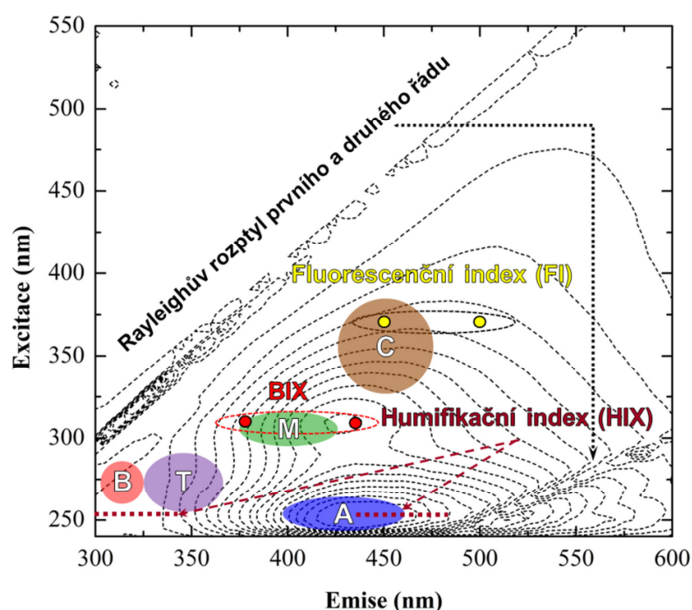
Musíme si uvědomit, že přírodní organická hmota (NOM – *Natural Organic Matter*) je tvořena HL a fragmenty, které pocházejí z doposud nehumifikované organické hmoty. Jedná se především o dusíkaté sloučeniny vzniklé mikrobiální činností půdní a vodní flóry [16].

Fluorescence NOM závisí na mnoha faktorech, které přímo ovlivňují její chování a následnou interpretaci naměřených fluorescenčních spekter. Nezanedbatelný vliv má původ a stáří přírodní matrice, pH roztoku a přítomnost funkčních skupin uplatňujících elektron-donorní ($-\text{OH}$, $-\text{NH}_2$ a $-\text{OCH}_3$) a elektron-akceptorní ($-\text{COOH}$) efekt na aromátech. Obecně

platí, že elektron-donorové substituenty zvyšují intenzitu fluorescence organických sloučenin. V případě elektron-akceptorních funkčních skupin je pozorován efekt opačný, kdy dochází ke zhasnutí fluorescence NOM. Bathochromní (*červený*) posun fluorescenčního maxima je vázán na přítomnost karbonylových funkčních skupin ve struktuře NOM, zatímco hypsochromní (*modrý*) posun bývá principiálně vysvětlen na základě obsahu aromatických struktur a konjugovaných nenasycených vazeb, které jsou příčinou vzniku elektronového mraku [17–18].

Huminové látky pocházející z terestriálních přírodních matric jsou charakterizovány dvěma fluorescenčními maximy (píky), které jsou v odborných pramenech označovány symboly *A* a *C* [17], případně α' a α [21]. Fluorofor *A* (α') je v excitačně-emisním spektru (EEM) lokalizován v oblasti vlnových délek 240–280/400–500 nm ($\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}}$) v tzv. *UV-light* oblasti, kdežto fluorescenční pík *C* (α) se nachází v oblasti vyšších vlnových délek excitace 300–380/400–500 nm. V EEM spektrech HK izolovaných z kaustobiolitických a půdních matric můžeme nalézt vedlejší fluorescenční maxima (tzv. *humic-like fluorofory*), které jsou lokalizovány v oblasti vyšších vlnových délek 435–450/500–540 nm excitace a emise. Fluorescenční píky *A* (α') a *C* (α) jsou pokládány za typické fluorofory charakterizující HL a DOM. Fluorofor *M* (β) je specifické fluorescenční maximum HK izolovaných z pobřežních a mořských sedimentů. Toto fluorescenční maximum (*marine humic-like*) se výhradně nachází v oblasti vlnových délek 290–310/370–410 nm. Obvykle je považován za prekursor terestriálního fluoroforu *C* (α) [20].

Fluorofory *B* (γ) a *T* (δ) jsou produkovány na základě biologické aktivity mikroorganismů vodní flóry. Jedná se o fragmenty doposud nehumifikované organické hmoty, které mají svůj původ v látkách jako je tyrosin a tryptofan. Z tohoto důvodu jsou součástí výhradně DOM tj. vzorků přírodních vod. Tyto sloučeniny jsou charakterizovány dvěma fluorescenčními maximy. Fluorofor *B* (γ) – tyrosin-like je v EEM spektru lokalizován v oblasti vlnových délek 270–280/300–315 nm, zatímco fluorescenční pík *T* (δ) – tryptofan-like se nachází v oblasti vyšších vlnových délek emise 270–280/345–360 nm [17, 19–22]. Příklad EEM spektra vzorku přírodní vody *Suwannee River* je uveden na obrázku 2.



Obr. 2: EEM spektrum vzorku přírodní vody *Suwannee River* (standard IHSS) [157]

2.1.3 Vznik huminových látek

I když se výzkumem geneze HL zabývá široká vědecká společnost, není doposud znám její přesný mechanismus. Je publikováno mnoho teorií, které popisují proces formování HL během rozkladu organické hmoty (tj. *humifikace*). Nejdiskutovanějšími koncepty vzniku HL jsou teorie *ligninová*, *polyfenolová* a *kondenzační* (Obr. 3) [11, 23–24].

Ligninová teorie

Podle této teorie je lignin hlavním prekurzorem vzniku HL. V prvním kroku je lignin degradován mikroorganismy. Rozložený organický materiál je začleněn do již humifikované organické hmoty, kde je podroben řadám změn, ve kterých dochází k odštěpení methoxylové skupiny ($-OCH_3$), vznikají *o*-hydroxyfenoly a konečnou oxidací alifatických částí molekuly vznikají karboxylové skupiny. Takto pozměněné části ligninu jsou podrobeny dalším reakcím, ve kterých prvotně vznikají vysokomolekulární HU, dále HK a nakonec FK.

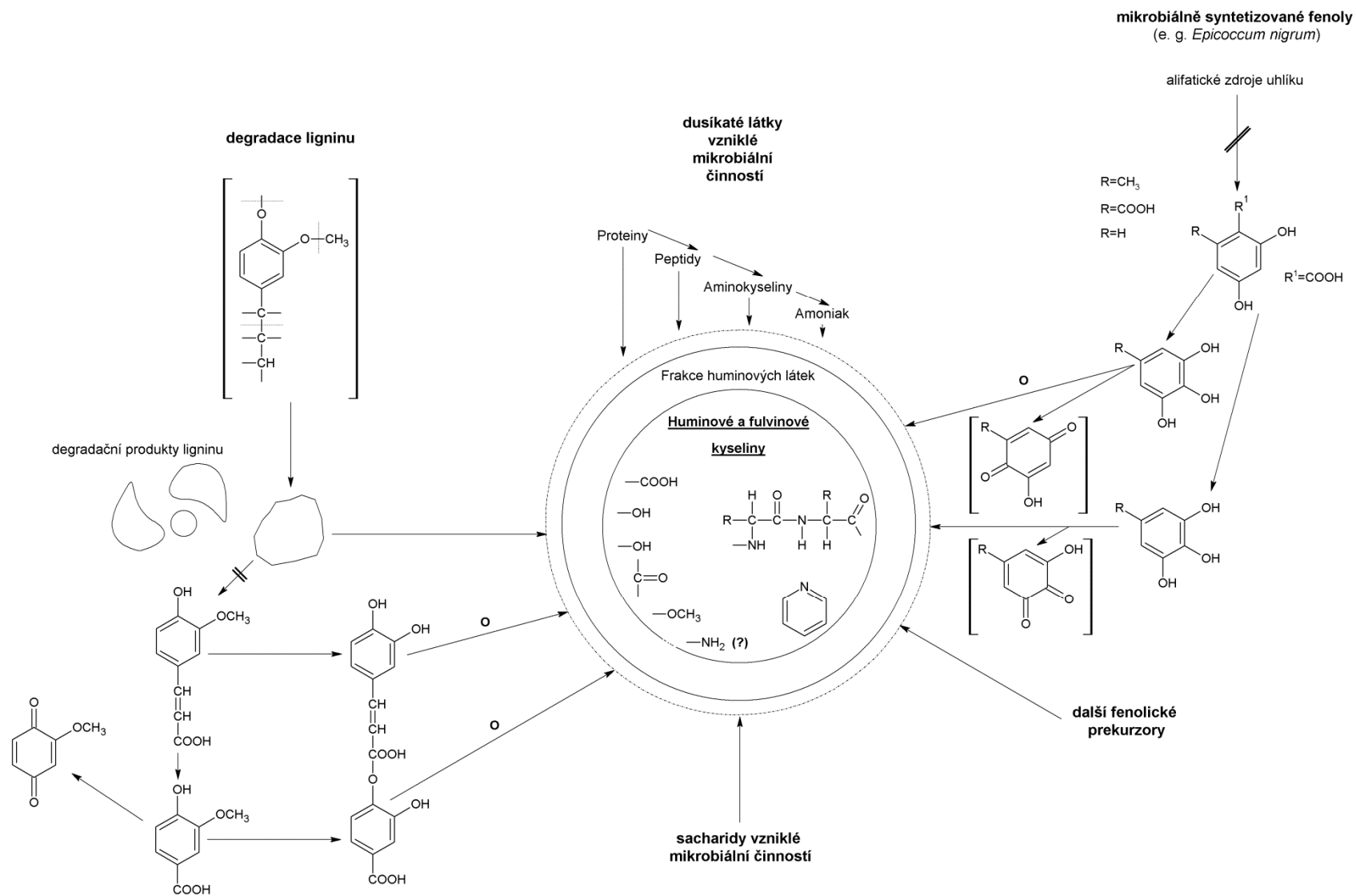
Při ztrátě methoxylových skupin a následné oxidaci alifatických částí molekuly obsahují prekurzory HL vyšší množství kyslíku a nižší množství uhlíku. Dále bylo zjištěno, že lignin při oxidačním procesu reaguje s amoniakem za vzniku kondenzačních produktů, v nichž se dusík začleňuje do cyklických molekul.

Polyfenolová teorie

Polyfenolová teorie popisuje vznik HL z polyfenolových stavebních jednotek, které jsou z největší části syntetizovány mikroorganismy. V prvním kroku podléhá odumřelá rostlinná tkáň rozkladným procesům, ve kterých jsou rostlinné zbytky rozloženy na základní strukturní jednotky. Při tomto procesu zanikají vazby mezi ligninem a celulózou. Alifatické postranní řetězce jsou demetylovány a následně oxidovány na polyfenoly, které jsou enzymatickou reakcí převedeny na chinony. Enzym, který je využíván při konverzi polyfenolů na chinony se nazývá *polyfenoloxidáza*. Chinony následně reagují se sloučeninami obsahujícími dusík a při následné polymeraci jsou syntetizovány HL. Nejprve vznikají FK, dále HK a nakonec HU. Polyfenolová teorie byla doplněna hypotézou, která vysvětluje vznik polyfenolů z látek jiného než ligninového původu, např. celulózy a jiných polysacharidů. Některé HL jsou syntetizovány z rostlinných pletiv, které lignin neobsahují, např. mechy a kapradiny.

Kondenzace sacharidů s aminy

Podle této teorie se mikroorganismy přímo nepodílejí na vzniku HL, které jsou syntetizovány z velké části chemickými reakcemi, a proto jde převážně o ne-enzymatické reakce. Účinkem metabolismu přítomných mikroorganismů jsou polysacharidy a proteiny štěpeny na monosacharidy a aminokyseliny. V následujících krocích se již mikroorganismy nepodílejí na vzniku HL. Následně je $-NH_2$ skupina adována na karbonylovou skupinu za vzniku *N*-substituovaných glykosylaminů. Vzniklé glykosylaminy jsou konformovány na *N*-substituované aminodeoxyketózy. Tímto mechanismem jsou vytvořeny tří-uhlíkaté zbytky aldehydů a ketonů, které jsou ochuzeny o molekuly vody (např. glyceraldehyd, dihydroxyaceton a hydroxyaceton). Následnou polymerací těchto látek jsou syntetizovány polymery charakteristického hnědého zbarvení, které jsou podobné HL.



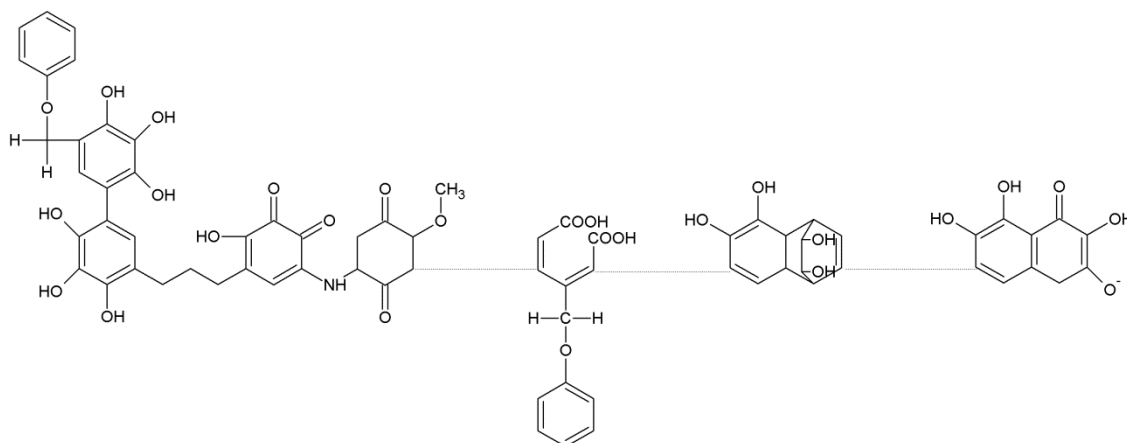
Obr. 3: Schéma vzniku půdních huminových látek podle Flaiga [25]

Nově diskutovaný koncept považuje genezi HL za dvoustupňový proces. V prvním kroku dochází k biodegradaci rostlinných a živočišných prekurzorů na jednodušší stavební jednotky. Následně jsou tyto degradační produkty formovány do supramolekulárních struktur, které jsou stabilizovány slabými vazebnými interakcemi (van der Waalsovy síly, vodíkové vazby, π -vazby a především hydrofobní interakce) [26].

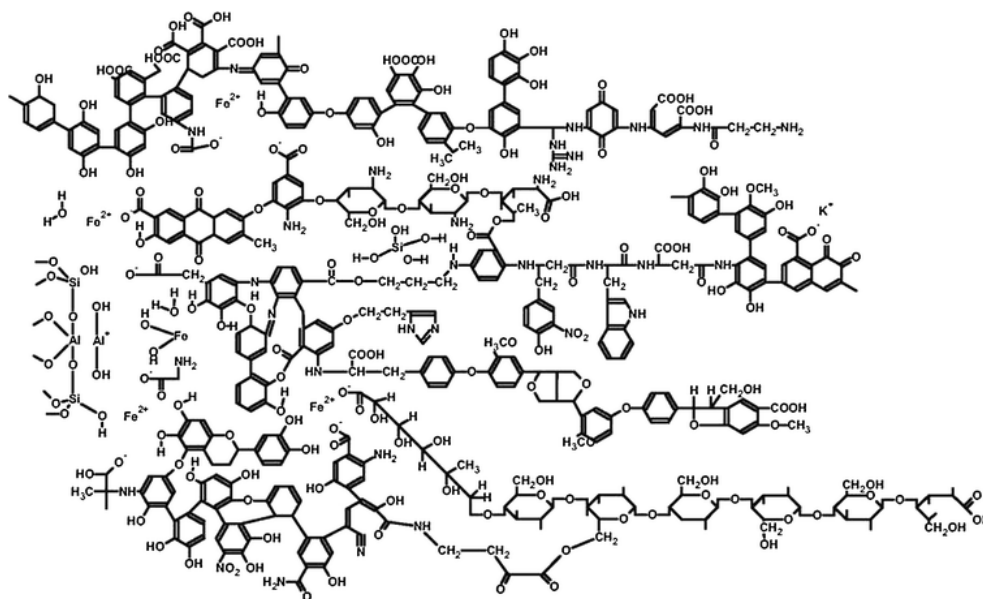
2.1.4 Molekulární struktura huminových látek

Pochopení molekulární struktury HL je nejdůležitější a rovněž nejobtížnější oblastí půdní chemie, kterou se již desítky let zabývají mnohé vědecké týmy. Za hnací sílu tohoto zájmu může být považován fakt, že objasněním struktury HL získáme představu o jejich základních fyzikálně-chemických vlastnostech, které jsou nedílnou součástí k pochopení jejich rozpustnosti, vazebných možností s různými látkami zejména s běžnými organickými a anorganickými polutanty případně s esenciálními půdními živinami, reaktivity a mnoha dalších.

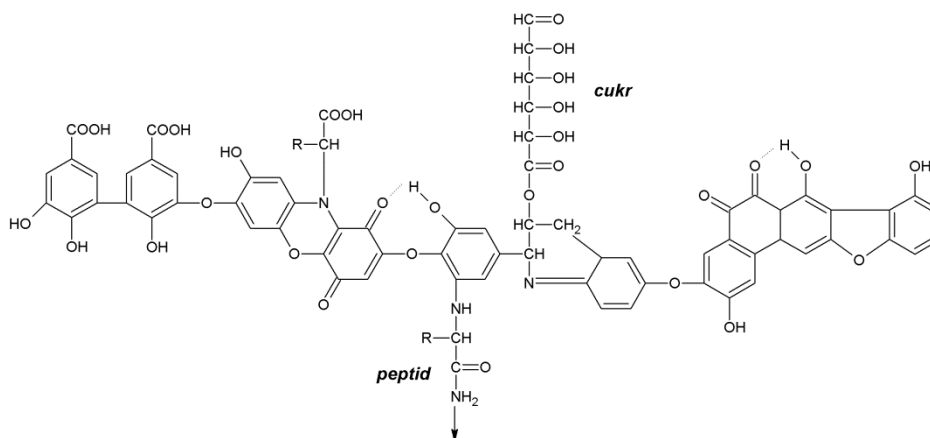
Musíme si uvědomit, že možnosti výzkumu struktury HL byly limitovány tehdy dostupnými analytickými metodami. V posledních několika desetiletích bylo publikováno mnoho vědeckých prací zabývajících se strukturou a charakterem huminových látek. Za nejpravděpodobnější hypotetický model struktury HK byl z historického hlediska považován tzv. polymerní model, který pohlíží na HK jako na makromolekuly s lineární strukturou. Z tohoto polymerního konceptu struktury HK vychází mnoho strukturních modelů (viz Obr. 4), mezi nejznámější patří struktury podle Flaiga [27], Kleinhumpela [28], Stevensona [11] a také Schultena a Schnitzera [29]. Tyto polymerní modely definovaly huminové kyseliny jako volně ohebné polyelektrolyty, které mohou zaujímat konformaci náhodného klubka různých tvarů podle náboje na polymerním řetězci, aktuálního pH a přesného chemického složení polymerního řetězce. V kyselém prostředí byl předpokládán klubkovitý tvar polymerního řetězce, kdy dochází k protonizaci a následné koagulaci HK, naproti tomu v alkalickém prostředí dochází k disociaci karboxylových funkčních skupin, což má za následek protáhlý tvar makromolekulárního klubka HK [30, 31].



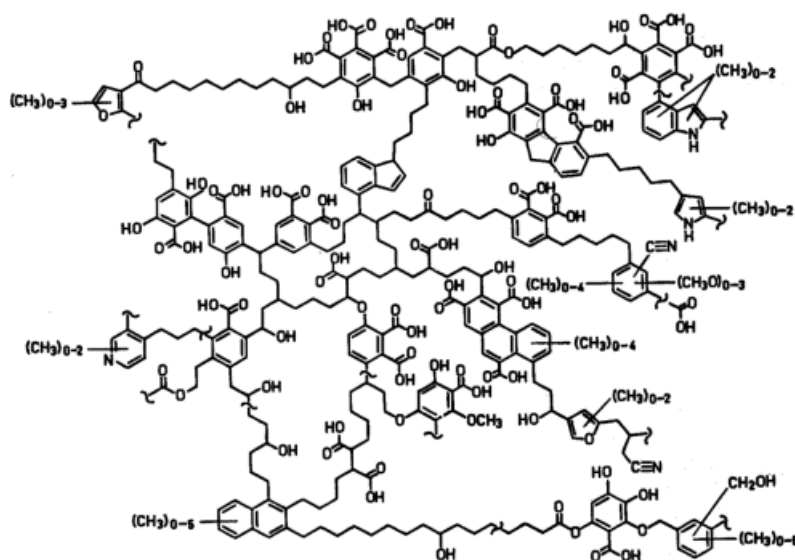
Molekulární struktura HK podle Flaiga [27] ...



...podle Kleinhumpela [28]



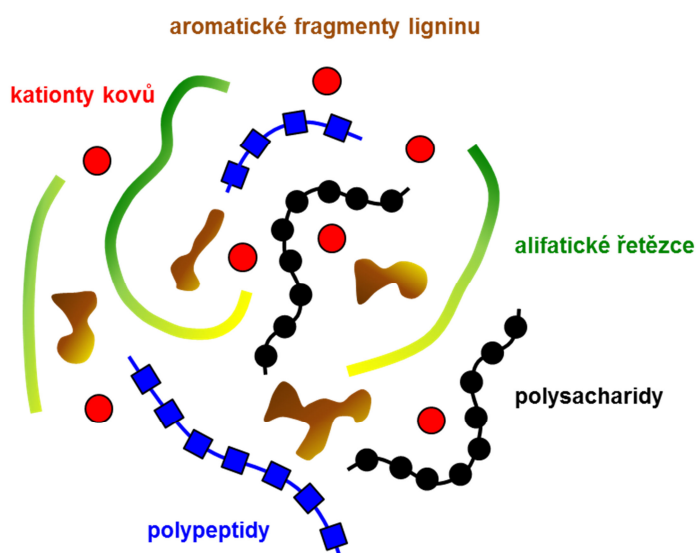
...podle Stevensona [11]



...podle Schultena a Schnitzera [29]

Obr. 4: Příklad historických strukturních modelů HK

S příchodem moderních instrumentálních analytických metod (pyrolýza spojená s různými chromatografickými metodami, termochemolýza, SEC, MS a především ^{13}C NMR) nastává odklon od běžně přijímaného polymerního konceptu struktury HK, což vedlo k jisté kontroverzi mnoha vědeckých skupin [32, 34–36]. Struktura a prostorové konformace HK jsou poněkud složitější, než se původně předpokládalo. V důsledku provedených experimentů byl definován nový koncept pohlížející na HK jako na supramolekuly [26, 42]. V souladu s tímto supramolekulárním modelem HK jsou i studie mnoha dalších autorů [32, 34]. Podle těchto autorů jsou HK supramolekulární agregáty relativně malých heterogenních molekul (< 2 kDa), které jsou stabilizovány disperzními hydrofobními interakcemi, jako jsou van der Waalsovy síly, π - π a CH_3 - π . Stavební bloky této supramolekulární struktury nejsou navzájem poutány kovalentními vazbami jako v případě předchozího polymerního konceptu. V kyselém prostředí dochází ke vzniku vodíkových vazeb, což má za následek zborcení supramolekulární struktury, kdy dochází k poklesu velikosti částic HK. Simpson [37] popisuje HK jako supramolekulární agregáty skládající se z velkého počtu nízkomolekulárních fragmentů. Tento systém je tvořen heterogenními komponenty, jako jsou např. alifatické kyseliny, aromatické fragmenty ligninu, polypeptidy, polysacharidy, ethery, estery a alkoholy. Tyto organické komponenty jsou k sobě poutány slabými disperzními silami a kovalentní vazbou s kovovými kationty případně sorpcí na povrchu pevných částic. Ionty kovů hrají klíčovou roli v celkové stabilitě těchto agregátů tvořící supramolekulu HK. Schéma supramolekulární struktury HK je znázorněno na obrázku 5. Schaumann a Ray von Wandruszka [38, 39] popisují supramolekulární strukturu HK jako agregáty tvořené nepolární částí HK, které jsou orientovány do vnitřní části supramolekulární struktury, zatímco polární funkční skupiny tvoří vnější obal této supramolekuly. Přítomnost hydrofobních domén ve struktuře HK zvyšuje prostorovou heterogenitu celé supramolekuly. Tyto domény jsou charakterizovány nízkou vnitřní mobilitou. Supramolekula HK je rovněž tvořena menšími heterogenními molekulami, které se seskupují do mobilních asociátů hydrofilního charakteru, které mohou vázat různé látky.



Obr. 5: Schéma supramolekulární struktury HK podle Simpsona [37]

Studium struktury HL patří mezi jednu z nejdůležitějších a rovněž problematických oblastí huminového výzkumu. Základní znalost struktury, konformace a velikosti HL je

předpokladem k pochopení jejich role a funkce v nejrůznějších přírodních ekosystémech a rovněž může napomoci k využití těchto látek v aplikační oblasti.

2.1.5 Organominerální komplex

Rozsáhlé studie věnované morfologii půdních koloidů ukazují, že jen velmi malý podíl huminových látek se v půdě vyskytuje ve volné (neimobilizované) formě. Velká část HL je vázána na minerální složky půdy, které spolu tvoří organominerální komplex. Vznik tohoto komplexu v půdním roztoku je popsán následujícími způsoby [40, 41]:

Jako sůl nízkomolekulární organické kyseliny

Vzniká působením nízkomolekulárních organických kyselin (octové, šťavelové, mléčné, fumarové aj.) na minerály (magnetit, siderit a kalcit).

Jako soli HL s alkalickými kationty

Do této skupiny jsou zařazeny soli tvořené anionty huminových (*humáty*) a fulvinových (*fulváty*) kyselin s monovalentními případně polyvalentními kationty (Na^+ , K^+ , Ca^{2+} a Mg^{2+}). Soly HL vznikají kationtovou výměnou vodíkového kationtu karboxylové skupiny s alkalickými kationty příslušných hydroxidů.

Jako organické komplexy s jíly

Interakce půdních koloidů (organických molekul a jílových minerálů) vychází z fyzikálních, chemických a biologických vlastností půdního roztoku. Huminové látky jsou v půdním roztoku adsorbovány na povrchu jílových minerálů řadou fyzikálně-chemických mechanismů. Mezi ně patří *van der Waalsovy síly*, *vodíkové můstky a vazby* a mimo jiné penetrace a adsorpce nízkomolekulárních frakcí HL zejména “*agresivních*” fulvinových kyselin v pórech jílového minerálu.

Jako komplexy s kovovými ionty

Schopnost HL vytvářet stabilní komplexy s kovovými ionty je klíčovou vlastností, která hraje svou nezastupitelnou roli v oblasti ochrany životního prostředí a výživy rostlin. Jak již bylo uvedeno, jednomocné kationty (Na^+ a K^+) jsou v molekule huminových látek vázány pouze jednoduchou iontovou výměnou, při které vznikají soli karboxylových kyselin. Polyvalentní kationty jsou schopné vytvářet koordinační vazby s příslušnými funkčními skupinami HL, a to prostřednictvím iontové výměny, chelatace, povrchové adsorpce, koagulace a rovněž peptizačními reakcemi.

2.1.6 Vazebné možnosti huminových látek

Jak již bylo uvedeno dříve, huminové látky představují unikátní agregační systém obsahující ve své struktuře množství funkčních skupin, které jsou příhodnými vazebnými centry pro interakce s látkami rozličného chemického charakteru [11, 43–44].

Iontová vazba

Tento typ vazebné interakce je reprezentován působením elektrostatických sil mezi některými funkčními skupinami HL a ionty běžně se vyskytujícími v půdním roztoku. Vznik této vazby nastává interakcí HL s alkalickými kovy.

Koordinační vazba

Tento typ vazebné interakce je významným vazebným mechanismem v oblasti imobilizace těžkých kovů v životním prostředí. Těžké kovy jsou zejména vázány prostřednictvím karboxylových a fenolických funkčních skupin HL. Vznik a příslušná stabilita těchto koordinačních vazeb je závislá na hodnotě pH. Ve slabě kyselém a neutrálním prostředí se na vzniku této vazby podílejí především karboxylové skupiny. Při pH vyšším než 7 jsou do vzniku této vazby zapojovány i fenolické skupiny. Je obecně známo, že stabilita kovových komplexů HL roste se zvyšující se hodnotou pH.

Kovalentní vazba

Těžké kovy a polyaromatické polutanty se váží na HL převážně kovalentní vazbou v důsledku přítomnosti karboxylových a fenolických funkčních skupin. Afinita karboxylových skupin k iontům těžkých kovů se zvyšuje v případě přítomnosti další kyslík obsahující funkční skupiny, která se nachází v *o*-poloze vzhledem k příslušné karboxylové skupině. Toto morfologické uspořádání funkčních skupin je charakterizováno vznikem silných komplexů s vysokými hodnotami konstanty stability [46].

Vodíkové můstky

Vznik této vazby lze předpokládat na základě přítomnosti některých funkčních skupin, jako jsou amidová, laktamová a nitrilová. Konstanta stability tohoto vazebného mechanismu je poměrně nízká, avšak i tato vazba se může podílet na vazebných možnostech HL.

Hydrofobní interakce

Hydrofobní interakce vznikají prostřednictvím nepolárních skupin (např. alkylových), které vytvářejí ve struktuře HL tzv. hydrofobní domény. Zde mohou tyto interakce vycházet z působení van der Waalsových sil nebo přesunu π -elektronů. Hydrofobní interakce jsou nejčastěji předpokládaným vazebným mechanismem HL s nepolárními polutanty, kdy dochází k imobilizaci těchto cizorodých látek v hydrofobních doménách [45].

2.1.7 Využití huminových látek

Huminové látky nacházejí své uplatnění v širokém množství oborů lidské činnosti, ať již se jedná o zemědělství, průmysl nebo jiná spotřebitelská odvětví. Jako jedna z dominantních složek lignitu byly téměř výhradně využívány v energetickém průmyslu. V současné době je proces spalování uhlí v tepelných elektrárnách omezován v důsledku nepříznivého vlivu na životní prostředí. Snahou mnoha vědeckých skupin je nalézt jiné neenergetické uplatnění těchto látek.

Aplikace v zemědělství

Efekt přirozeného obsahu humusu na úrodnost půd je člověku znám již od pradávna, aniž by měl ponětí, že právě HL jsou nositeli těchto pozitivních vlastností. Huminové látky jsou v zemědělství využívány především pro jejich pozitivní vliv na strukturu půdy, kdy jsou schopny stmelovat půdní částice a tím podporovat drobtovitou strukturu půdy, rovněž mají velký vliv na obsah živin a zadržování vody v půdě. Jsou energetickým základem biologických procesů v půdě, kdy stimulují vývoj půdní mikroflóry a jsou zdrojem fyziologicky aktivních látek regulujících růst a stresovou odolnost rostlin. Jejich působením se v půdě aktivují bakterie, které urychlují procesy degradace organické hmoty a dokáží tak

zkrátit dobu potřebnou k tvorbě humusu v příslušných půdních horizontech [47, 49–50]. HL jsou využívány jako aditivum k běžně používaným minerálním hnojivům, především ve formě humátů tj. solí huminových kyselin. Existuje mnoho preparátů na bázi HL, které se používají za tímto účelem, např. vápenaté soli HK a FK v kombinaci s rašelinou, humát sodný nebo draselný aplikovaný přímo na listy rostlin, amonné soli HK, směsi draselných solí HK a FK s aminokyselinami, oligopeptidy a auxiny [48]. Velmi dobré review o aplikaci lignitu a lignitických HK v oblasti remediace půd přináší reference [51].

Průmyslové využití

Příkladem průmyslového využití huminových látek resp. HK je jejich aplikace ve stavebnictví, kdy se tyto látky používají jako vhodná aditiva cementů, přičemž ovlivňují jeho disperzitu, reologické chování a adhezi vzniklých povrchů. Rovněž se uplatňují jako účinná složka plastifikátorů betonových směsí. V keramickém průmyslu se HK využívají jako aditivum, které zvyšuje odolnost vůči mechanickému namáhání doposud nevypálené keramiky. Tato aditiva na bázi HK rovněž pozitivně ovlivňují reologické chování odlévacích porcelánových hmot. HL jsou využívány jako přírodní pigmenty v kožedělném, textilním a papírenském průmyslu. Rovněž se uplatňují při výrobě plastů, kde plní funkci změkčovadla PVC a Nylonu 6. Speciální využití HL představuje výroba filtrů, které obsahují aktivní jádro s přísadkou HK. Nejčastěji jsou tyto filtry využívány k odstranění karcinogenních iontů chromu (Cr^{6+}), barviv, pesticidů, různých uhlovodíkových sloučenin a fenolů z městských a průmyslových odpadních vod. Vhodně substituované humáty mohou být použity k zachycení merkaptanů a sirovodíku z dodávek zemního plynu a rovněž SO_2 , který je součástí průmyslových emisí. Iontově-výměnné a chelatační schopnosti HL mohou být zhodnoceny např. v přípravě iontově-výměnných kolon pro těžební průmysl uranové rudy [47, 52].

Ochrana životního prostředí

V oblasti ochrany životního prostředí jsou HL, konkrétně pak HK schopny vázat těžké kovy, pesticidy, polycyklické sloučeniny, barviva a povrchově aktivní látky, a to z půd i z vod [53–56]. Proto jsou HL nejvýznamnější přírodní ligandy, které mohou fyzikálně i chemicky interagovat s širokou škálou polutantů za vzniku méně biologicky dostupných komplexů. Tím dochází ke snížení toxicity a bioakumulace v přírodních ekosystémech. Řada odborných prací je věnována problematice vazby těžkých kovů s HL [57–58]. Velmi dobré review o interakcích HL s organickými polutanty přináší reference [59].

Aplikace v lékařství a biomedicíně

Z historického hlediska má nejdelší tradici použití HL ve formě terapeutických zábalů, které jsou podstatou mnoha lázeňských procedur. Farmaceutické a kosmetické využití HK souvisí zejména s jejich antivirovým, protizánětlivým a v neposlední řadě chelatačním charakterem. V poslední době jsou HL spojovány s izolací a následnou identifikací jejich strukturních jednotek, které by mohli být v budoucnu použity při výrobě léčiv. HK katalyzují některé enzymatické reakce a přispívají tak k zlepšení metabolických dějů v organismu člověka. Snižují produkci stresových hormonů (adrenokortikotropinu, katecholaminu, epinefrinu a dalších), což příznivě ovlivňuje srdeční činnost, krevní tlak a psychický stav jedince. Podporují krevtvorbu a zvyšují saturaci kyslíku v erytrocytech. Rovněž příznivě ovlivňují imunitní systém a zabraňují vzniku autoimunitních onemocnění např. artritidy. Jsou prokázány imunosupresivní, detoxikační a analgetické účinky. Dále ovlivňují hladinu cukru

v krvi. Stimulují regeneraci měkkých tkání a přispívají tak k rychlému hojení ran a popálenin. Léčebný efekt HL je využíván především v dermatologii a lázeňských procedurách [60]. Naproti tomu, využití HL ve farmakologii omezuje fakt, že mohou způsobovat mutagenezi buněčné DNA. Velmi dobrý souhrn o aplikaci HL ve farmaceutickém průmyslu stejně jako o jejich případných zdravotních rizicích přináší reference [8, 60].

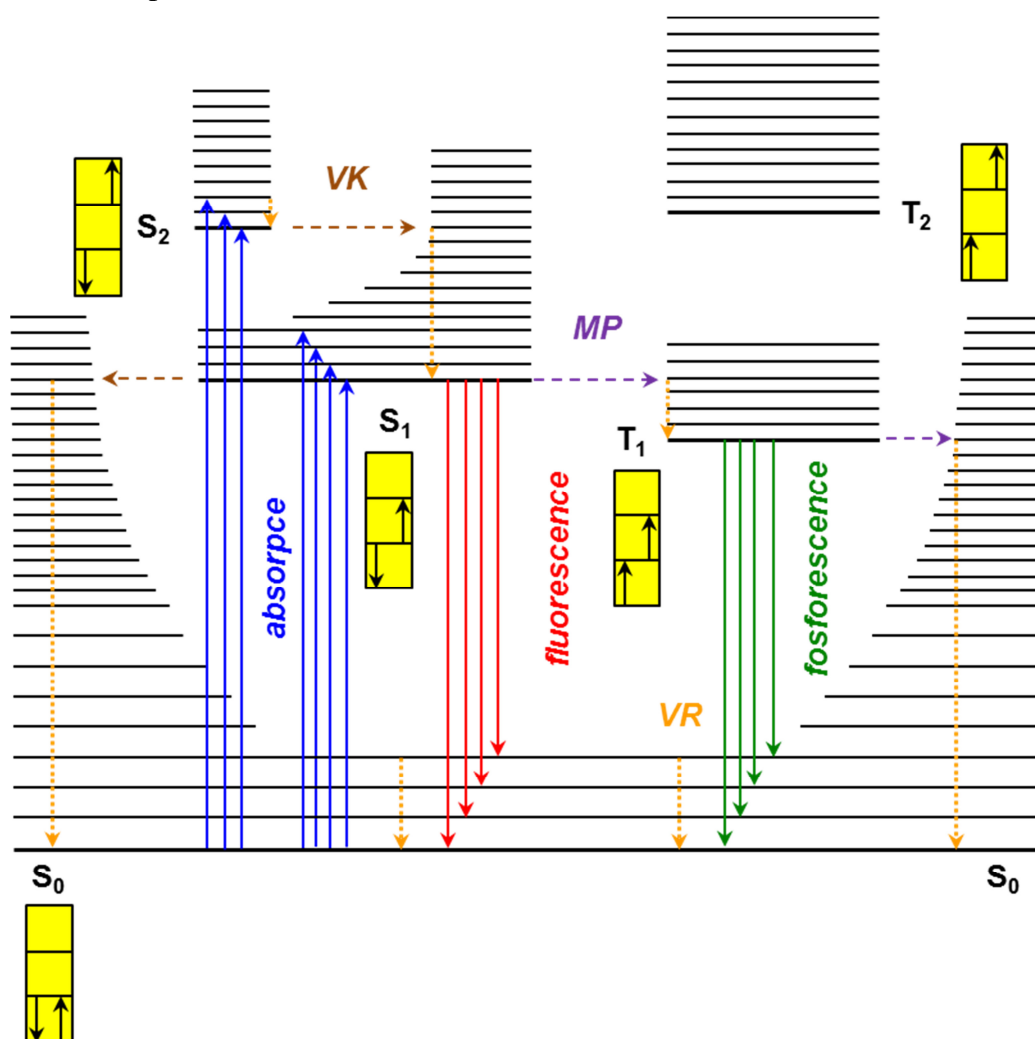
2.2 Luminiscence

Luminiscenční jevy (*fluorescence* a *fosforescence*) jsou definovány na základě multiplicity excitovaného elektronového stavu, který emituje záření [61].

O *fluorescenci* mluvíme v případě, že excitovaná molekula emituje ze singletového stavu, kdy elektron v excitovaném orbitalu má opačný spin než elektron v párovém orbitalu v základním stavu. Přechod excitovaného elektronu zpět na základní hladinu je proces velmi rychlý a spinově dovolený díky zachování multiplicity.

Fosforescence je emise záření z tripletového excitovaného stavu, kdy elektron v excitovaném orbitalu má stejný spin jako párový elektron ve stavu základním. Přechod excitovaného elektronu zpět na základní hladinu je proces z kvantově-mechanického hlediska zakázaný, jelikož se mění multiplicita excitovaného elektronového stavu.

V případě *zpožděné fluorescence* dochází k zářivému přechodu z totožného singletního stavu jako při fluorescenci, ale s delší dobou dohasínání danou časem, po který je molekula v metastabilním tripletovém stavu [61–64].



Obr. 6: Jablonskiho diagram: VR – vibrační relaxace (oranžová šipka), VK – vnitřní konverze (hnědá šipka), MP – mezi-systémový přechod (fialová šipka) [64]

Základní elektronový stav je v Jablůnskiho diagramu (Obr. 6) označen symbolem S_0 , kdy jde o energeticky nejchudší elektronovou hladinu. Vyšší elektronové hladiny, které jsou obsazovány excitovanými elektrony, jsou označovány symboly S_1, S_2, \dots, S_n . Tyto energetické hladiny představují stavy o postupně vyšších energiích. Každý takový stav je tvořen určitým počtem vibračně-rotačních hladin, které jsou označovány symboly S_0^1, S_0^2 atd. Jednotlivé elektronové přechody jsou v diagramu znázorněny šipkami.

Při excitaci je elektron vybuzen na vyšší energetickou hladinu, kde může zaujmout jakoukoliv z možných vibračních hladin. V tomto okamžiku následují de-excitační procesy ať už *zářivé* (luminiscence) či *nezářivé* (vnitřní konverze, mezi-systémový přechod, vibrační relaxace, konformační změna molekuly, intramolekulární přenos náboje, interakce s jinými molekulami např. přenos elektronu i protonu, vytvoření excimeru nebo exciplexu aj.).

Prakticky okamžitě po excitaci elektron přechází na nejnižší vibrační hladinu elektronového stavu, ve kterém se právě nachází, přičemž dochází k částečné disipaci energie, která je uvolněna ve formě tepla. Tento jev je označován jako *vibrační relaxace*.

Vnitřní konverze je jev, který popisuje přechod mezi elektronovými stavy se stejnou multiplicitou spinu. Elektron se tak dostává většinou na nenulovou vibrační hladinu jiného elektronového stavu, kdy následuje proces vibrační relaxace. K tomuto ději dochází častěji v případě, kdy je nejnižší vibrační hladina excitovaného stavu na stejné úrovni jako některá z vibračních hladin nižšího elektronového stavu. Přechody z elektronových hladin S_2 na S_1 jsou pravděpodobnější než přechody z elektronových stavů S_1 na S_0 z důvodu větší blízkosti energetických hladin S_1 a S_2 .

V průběhu *mezi-systémového* přechodu dochází k převrácení spinu excitovaného elektronu, kdy systém přechází do tripletového stavu. Tento kvantově-mechanický děj je zpravidla jevem fosforescence a v omezeném pojetí i zpožděné fluorescence. Z důvodu nižší energie tohoto záření je emisní spektrum posunuto k vyšším vlnovým délkám oproti fluorescenci. V důsledku přechodu systému do nižšího tripletového stavu dochází k určité disipaci energie, která je "ztracena" tímto nezářivým přechodem.

Po návratu do základního elektronového stavu se elektron obvykle nachází na některé z vyšších vibračně-rotačních energetických hladin, kdy nastává proces vibrační relaxace a elektron se tak dostává zpět na základní hladinu S_0^0 [64].

2.2.1 Franck-Condonův princip

Hlavní myšlenkou Franck-Condonova principu je rozdíl v rychlosti pohybu elektronů a jader. Pohyb elektronů je mnohem rychlejší, než samotná vibrace molekuly. Přechod elektronu do jiných elektronových hladin se odehrává tak rychle, že během tohoto procesu nedochází ke změně pozice jádra molekuly a molekul prostředí. Tento děj můžeme označit za termodynamicky nestabilní. Z tohoto důvodu je elektron vybuzen na takovou vibračně-rotaci energetickou hladinu vyššího elektronového stavu, aby následně nemuselo dojít ke změnám pozice jádra molekuly a molekul prostředí. Podobně je tomu i v případě de-excitace, kdy elektron většinou nepřechází přímo do nejnižší vibračně-rotaci hladiny základního elektronového stavu. Takto je docíleno termodynamické rovnováhy daného systému [61].

2.2.2 Stokesův posun

Zrcadlová symetrie mezi absorpčním a fluorescenčním pásem platí pro velké množství organických molekul a je způsobena tím, že absorpce i emise z odpovídajících si vibračně-rotálních hladin mají stejnou pravděpodobnost. Většina absorbujících a emitujících molekul se nachází v termodynamicky rovnovážném vibračním stavu, přičemž vibrační struktura základního a excitovaného stavu mají stejnou strukturu. Po absorpci fotonu přechází elektron z rovnovážné vibrační hladiny základního elektronového stavu S_0 na vyšší vibrační hladinu excitovaného elektronového stavu S_{1-n} , poté dochází k rychlé vibrační relaxaci na rovnovážnou vibrační hladinu stavu S_1 a teprve poté následuje zářivý přechod na vyšší vibrační hladinu základního elektronového stavu S_0 a další vibrační relaxace na rovnovážnou vibrační hladinu základního elektronového stavu S_0 . Rozdíl v energiích mezi maximy absorpčního a emisního pásu se nazývá *Stokesův posun*. Jednou z hlavních příčin Stokesova posunu je tedy disipace energie, která je podmíněna vibrační relaxací. Rovněž se na tomto jevu podílí skutečnost, že při de-excitaci (fluorescenci) nedochází k přesunu elektronu na nejnižší vibrační hladinu základního elektronového stavu S_0^0 [61]. Stokesův posun je ovlivněn také rozpouštědlem, reakcemi, které probíhají v excitovaných stavech molekul, přenosem energie atd. [64].

2.2.3 Hlavní charakteristiky fluorescence

Mezi hlavní charakteristiky fluorescence patří: absorpční, excitační, emisní a synchronní fluorescenční spektra, kvantový výtěžek a doba života aj [61, 64].

Emisní fluorescenční spektra nám dávají informace o distribuci pravděpodobnosti různých přechodů z nejnižší vibrační hladiny excitovaného stavu S_1 do různých vibračních hladin základního elektronového stavu S_0 . Tyto spektra jsou odrazem chemického složení fluoroforu a fyzikálně-chemických vlastností prostředí (rozpouštědla), ve kterém je daný fluorofor rozpuštěn.

Na základě *Kashova pravidla* [63] můžeme emisní fluorescenční spektra považovat za nezávislá na excitační vlnové délce z důvodu disipace energie, kdy fluorescenční přechod nastává z nejnižší vibrační hladiny elektronového stavu S_1 .

Kvantový výtěžek fluorescence je definován jako poměr počtu emitovaných fotonů k počtu fotonů, které jsou soustavou absorbovány [64]. Pro látky de-excitující zářivými přechody platí:

$$Q = \frac{\Gamma}{\Gamma + k_{nr}}, \quad (1)$$

kde Q je kvantový výtěžek, Γ a k_{nr} jsou rychlostní konstanty depopulace excitovaného stavu. Rychlostní konstanta Γ představuje zářivý přechod, zatímco k_{nr} přechody nezářivé. Kvantové výtěžky nabývají hodnot < 1 .

Kvantový výtěžek lze definovat následujícím způsobem:

$$\int_0^\infty F_\lambda(\lambda_F) d\lambda_F = \Phi_F, \quad (2)$$

kde $F_\lambda(\lambda_F)$ je naměřené emisní spektrum. Intenzita fluorescence $I_F(\lambda_F)$ měřená při vlnové délce λ_F je přímo úměrná $F_\lambda(\lambda_F)$ a počtu absorbovaných fotonů o jisté excitační vlnové délce

λ_E . Počet fotonů můžeme nahradit intenzitou absorbovaného záření $I_A(\lambda_E)$, které je definováno jako rozdíl mezi intenzitou dopadajícího záření $I_0(\lambda_E)$ a intenzitou prošlého (transmisního) záření $I_T(\lambda_E)$:

$$I_A(\lambda_E) = I_0(\lambda_E) - I_T(\lambda_E). \quad (3)$$

Pro intenzitu fluorescence potom platí:

$$I_F(\lambda_E, \lambda_F) = kF_\lambda(\lambda_F)I_A(\lambda_E). \quad (4)$$

Člen k je závislý na prostorovém úhlu pozorování a na šířce pásu monochromátorů tj. $\Delta\lambda$. Intenzitu prošlého záření můžeme vyjádřit pomocí *Lambert-Beerova zákona*:

$$I_T(\lambda_E) = I_0(\lambda_E)\exp[-2,3\varepsilon(\lambda_E)lc], \quad (5)$$

kde $\varepsilon(\lambda_E)$ je extinkční koeficient fluoroforu při vlnové délce λ_E ($\text{dm}^3 \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$), l je optická délka vzorku reprezentována tloušťkou kyvety (cm) a c je koncentrace fluoroforu ($\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$). Výraz $\varepsilon(\lambda_E) \cdot l \cdot c$ představuje absorbanci $A(\lambda_E)$ při vlnové délce λ_E .

Intenzita fluorescence je přímo úměrná koncentraci fluoroforu jen při nízkých hodnotách absorbance roztoku.

Úpravou rovnic (2), (3) a (4) lze intenzitu fluorescence vyjádřit vztahem:

$$I_F(\lambda_E, \lambda_F) = kF_\lambda(\lambda_F)I_0(\lambda_E)\{1 - \exp[-2,3\varepsilon(\lambda_E)lc]\}. \quad (6)$$

2.2.4 Steady-state a časově rozlišená fluorescence

Fluorescenční techniky (*časově rozlišená fluorescence* a především *steady-state*) jsou hojně využívanými metodami v oblasti charakterizace HL a slouží zejména k jejich klasifikaci a rozřídění do jednotlivých skupin dle fluorescenčního chování. Fluorescenční spektrometrie poskytuje nepřeborné množství informací týkajících se struktury, interakcích fluoroforu s rozpouštědlem, konformačních změn, vazebných interakcí atd. Jedná se o experimentálně jednoduché metody, které se vyznačují relativně vysokou citlivostí vůči analyzovaným vzorkům HL, SOM a DOM [17, 21, 65].

Fluorescenční metody můžeme rozdělit na dvě základní skupiny: *steady-state* (ustálená fluorescence) a *časově rozlišená fluorescence*. Ustálená fluorescence je základní instrumentální technika, která je založena na měření emisních fluorescenčních spekter při konstantní vlnové délce excitačního záření. Naproti tomu, *časově rozlišená fluorescence* je založena na měření poklesů intenzit emise a anizotropie, kdy na základě těchto naměřených dat jsou vyhodnoceny doby života měřených fluoroforů.

Obecně *steady-state* fluorescenční spektrum může být výsledkem několika překrývajících se spekter pocházejících z více fluoroforů či z jednoho typu fluoroforu, který se nachází v několika formách. Tyto cenné informace jsme schopni získat pouze z *časově rozlišených* fluorescenčních spekter. Měření ustálené fluorescence nám poskytuje pouze informace o průměrné intenzitě, která je dána váženým průměrem všech dob života daného systému.

Vztah mezi intenzitou ustálené fluorescence (I_{SS}) a dobou života excitovaného stavu je dán rovnicí [64]:

$$I_{SS} = \int_0^\infty I_0 e^{-\frac{t}{\tau}} dt = I_0 \tau, \quad (7)$$

kde I_0 je parametr, který je závislý na koncentraci fluoroforu a instrumentálních parametrech měřicího přístroje. Proto je intenzita ustálené fluorescence přímo úměrná době života daného fluoroforu.

2.2.5 Pulzní metoda měření časově rozlišených fluorescenčních spekter

V případě pulzní metody (*time-domain*) je vzorek excitován krátkým pulzem budícího záření. Musíme si uvědomit, že šířka tohoto pulzu by měla být co nejmenší a jeho doba by měla být pokud možno kratší, než je doba života excitovaného stavu daného fluoroforu. Po excitačním pulzu následuje měření intenzity fluorescence v závislosti na čase. Dobu života můžeme následovně stanovit ze směrnice závislosti $\log I(t)$ na t , či z času, ve kterém intenzita fluorescence poklesne na $1/e$ z intenzity v čase $t = 0$ s [64, 66].

Význam doby života fluoroforu

V případě, kdy je vzorek excitován nekonečně ostrým pulzem budícího záření je excitována pouze určitá část počáteční populace fluoroforů (n_0). Rozměr této excitované populace klesá rychlostí $\Gamma + k_{nr}$ dle rovnice:

$$\frac{dn(t)}{dt} = -(\Gamma + k_{nr})n(t), \quad (8)$$

kde symbol $n(t)$ reprezentuje počet excitovaných molekul v čase t , Γ je rychlost popisující úbytek excitované populace fluoroforů prostřednictvím emisního záření, k_{nr} je rychlost, která je spjata s nezářivými de-excitačními procesy. Rovněž si musíme uvědomit, že každá excitovaná molekula fluoroforu má vlastní pravděpodobnost emise v daném časovém úseku, jež má za následek exponenciální tvar poklesu populace excitovaných fluoroforů, a proto se tyto poklesy populace řídí kinetikou *prvního řádu*. V tomto případě je kinetika prvního řádu dána vztahem:

$$n(t) = n_0 e^{-\frac{t}{\tau}}. \quad (9)$$

Jelikož je intenzita fluorescence přímo úměrná počtu excitovaných molekul $n(t)$ můžeme rovnici (9) napsat ve tvaru pro časově závislé intenzity $I(t)$. Do rovnice (8) dosadíme místo počtu excitovaných molekul časově závislou intenzitu a po její integraci dostáváme rovnici ve tvaru popisujícím jedno-exponenciální pokles:

$$I(t) = I_0 e^{-\frac{t}{\tau}}, \quad (10)$$

kde I_0 je časová intenzita v čase $t = 0$, přičemž doba života τ je převrácená hodnota celkové rychlosti poklesu $(\Gamma + k_{nr})^{-1}$.

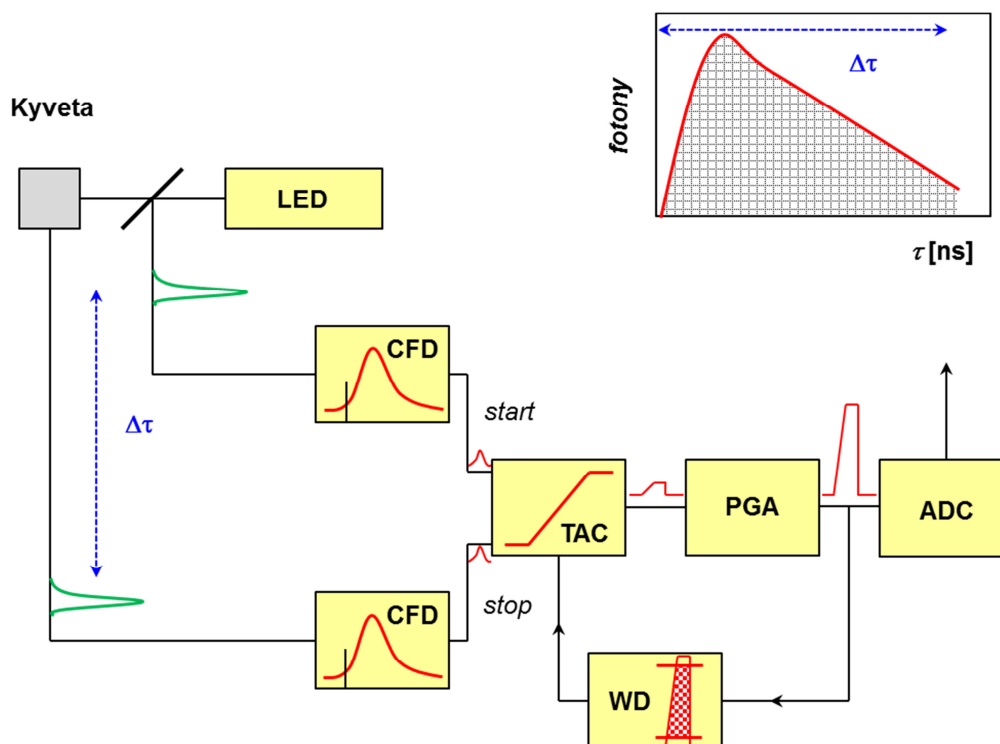
Převrácením hodnoty doby života excitovaného stavu daných fluoroforů dostáváme soubor všech rychlostí, které způsobují depopulaci excitovaných molekul. Ze statistického hlediska je doba života pravděpodobnostní událost, a proto některé fluorofory emitují v delším čase, než je doba života, zatímco určitá část populace emituje v časech kratších. Tím dostáváme jistou časovou distribuci emitovaných fotonů. V případě jedno-exponenciálního poklesu je doba života definována jako průměrný čas, který fluorofor setrvává v excitovaném stavu:

$$\langle t \rangle = \tau. \quad (11)$$

Rovnice (11) neplatí pro složitější systémy, které jsou charakterizovány *multi* či *non-exponenciálními* poklesy [64].

2.2.6 Metoda měření TCSPC

Měřicí technika TCSPC (*Time-Correlated-Single-Photon-Counting*) je metoda časově korelovaného sčítání fotonů. Tato metoda je založena na principu, že pravděpodobnost detekce jednoho fotonu v čase t po předešlém excitačním pulzu je úměrná intenzitě fluorescence v tomto čase [64, 66].



Obr. 7: Schéma instrumentace TCSPC [64]

Vzorek je excitován velmi rychlým pulzem budícího zařízení, který je realizován laserovými diodami. Obvykle platí, že na jeden excitační pulz je detekován méně než jeden foton, avšak nejčastěji jde o jeden foton, který připadá na sto za sebou jdoucích excitačních pulzů. V průběhu měření je sledován čas mezi excitačním pulzem a zaznamenáním fotonu, který je pak zanesen v histogramu. Osa x v histogramu představuje časové intervaly tzv. kanály, zatímco osa y počet fotonů, které jsou detekovány v příslušném časovém intervalu.

Měření je iniciováno excitačním pulzem (viz Obr. 7), který excituje molekuly ve vzorku a zároveň je i signálem, který je předán elektronice. Signál jde do prvního kanálu, kde prochází “diskriminátorem konstantní funkce” (CFD – *constant function discriminator*), který změří přesný čas příchodu excitačního pulzu. Následně je signál veden přes převodník času na amplitudu (TAC – *time-to-amplitude convertor*), kde se začne generovat napětí, které je lineárně rostoucí s časem. Druhým kanálem je zaznamenáván signál, který pochází z detekovaného fotonu emitovaného vzorkem. Čas příchodu fotonu je přesně změřen druhým CFD prvkem, který v tomto čase posílá *stop*-signál do TAC, kde do této doby bylo generováno napětí. V tomto okamžiku se TAC přestane nabíjet, kdy velikost tohoto napětí je úměrná časovému zpoždění mezi excitačním signálem (excitačním pulzem) a emisním signálem (čas dopadu fotonu). Výsledné napětí je podle potřeby zesíleno na “programovatelném výsledném zesilovači” (PGA – *programmable gain amplifier*) a následně je převedeno na numerickou hodnotu pomocí “analogově-digitálního převodníku” (ADC –

analog-to-digital converter). V důsledku minimalizace chybných hodnot je signál omezen určitým rozsahem napětí. V případě, kdy velikost naměřeného napětí nevyhovuje danému intervalu je tento signál potlačen pomocí diskriminátoru (WD – *window discriminator*) [64]. Mnohonásobným opakováním tohoto procesu (množství excitačních pulzů) získáme daný histogram.

V současné době jsou prakticky všechna TCSPC měření realizována v tzv. *reverzním módu*. To znamená, že nabíjení TAC je iniciováno emisním pulzem a jeho nabíjení je pozastaveno pulzem excitačním. Z tohoto důvodu musí být excitační pulzy generovány v pravidelných intervalech. Jak již bylo uvedeno výše, foton je generován přibližně po sto za sebou jdoucích excitačních pulzech, startovacích pulzů je tedy podstatně méně, a proto jen malá část excitačních pulzů je schopna iniciovat tzv. *stop*-signál [64, 66].

V průběhu měření může být detekován pouze první foton následující po excitačním pulzu, aby nedocházelo ke zkreslení histogramu.

Počet emisních pulzů musí být menší než množství excitačních pulzů. V důsledku toho je pravděpodobnost detekce dvou emisních pulzů, které připadají na jeden excitační pulz prakticky zanedbatelná. Jinak by byl v TAC registrován pouze první “rychlejší” excitační pulz, a tím by došlo ke zkrácení celého poklesu v histogramu. Tato negativní skutečnost je nazývána jako “*pile-up efekt*”.

2.2.7 TCSPC data

Naměřená data poklesu intenzity se zpravidla skládají ze tří křivek: naměřená data $N(t_k)$, funkce přístrojové odezvy $L(t_k)$ a proložená funkce poklesu (fit) $N_c(t_k)$. Na ose x je vyneseno čas v kanálech případně v nanosekundách, z nichž je každý charakterizován známou hodnotou času t_k a šířkou Δt [64].

Funkce přístrojové odezvy (IRF – *instrument response function*) je odezva budícího záření na nulovou dobu života excitovaného stavu. Tuto funkci přístrojové odezvy získáme, změříme-li zředěný roztok, který je schopen rozptylovat záření. K tomuto účelu se nejčastěji používá koloidní oxid křemičitý tzv. Ludox. Tento pokles reprezentuje profil nejkratšího času, který jsme schopni daným přístrojem zaznamenat. Důležitou charakteristikou funkce přístrojové odezvy je její šířka v polovině maxima.

Výška naměřeného poklesu intenzity $N(t_k)$ na ose y reprezentuje celkový počet fotonů detekovaných v časovém horizontu $t_k - t_k + \Delta t$, kde Δt je šířka časového kanálu. Nejvyšší počet detekovaných fotonů se nachází v kanálu maxima intenzitního poklesu.

Proložená funkce poklesu $N_c(t_k)$ představuje konvoluci naměřeného poklesu intenzity s IRF. Tato funkce je předpokládaným časovým profilem změřeného poklesu intenzity. V případě jedno-exponenciálního poklesu je hodnota doby života τ ta, která je charakterizována nejlepší shodou mezi naměřenými daty a proloženou funkcí poklesu. Analýza multi-exponenciálního poklesu je zpravidla komplikovanější. Získané hodnoty α_i a τ_i musí být v dobré shodě s naměřenými daty. Symbol α_i představuje tzv. *pre-exponenciální faktor*, který souvisí s jednotlivými detekovanými časy τ_i [64, 66–67].

2.2.8 Konvoluční integrál

Je třeba si uvědomit, že čas $t = 0$ s není v TCSPC definován, protože zde neexistuje jednoduchá δ -funkce iniciující daný pokles. Z tohoto důvodu funkce přístrojové odezvy není formulována pro tento čas. Většina funkcí přístrojové odezvy jsou široké v rozmezí 0,5–2 ns, proto si můžeme excitační pulz představit jako sérii δ -funkcí, které jsou charakterizovány odlišnými amplitudami. Naměřená data funkce $N(t_k)$ jsou sumou všech těchto exponenciálních poklesů, které jsou definovány rozdílnými amplitudami a časy. V průběhu měření jsou poklesy intenzity zaznamenávány do té doby, než funkce přístrojové odezvy klesne na nulovou hodnotu [64].

2.2.9 Vyhodnocení

Analýza dat metodou nelineárních nejmenších čtverců

Naměřená časově rozlišená data jsou většinou natolik složitá, že nemohou být analyzovány běžnými grafickými metodami. V dnešní době jsou naměřená TCSPC data vyhodnocována metodou *nelineárních nejmenších čtverců* [64, 69–70]. V případě, kdy jsou naměřená data definována dostatečným počtem parametrů, tak každý tento soubor dat může být proložen jistým matematickým modelem. Hlavním principem této metody je zjistit, zda se soubor dat shoduje s matematickým modelem, kterým byla tato data proložena. Touto metodou jsme rovněž schopni určit hodnotu pravděpodobnosti správnosti daných experimentálních dat pomocí parametru, který porovná naměřená data $N(t_k)$ s příslušným matematickým modelem $N_c(t_k)$. Toho je docíleno pomocí parametru minimalizace správnosti proložení, který je definován rovnicí:

$$\chi^2 = \sum_{k=1}^n \frac{1}{\sigma_k^2} [N(t_k) - N_c(t_k)]^2 = \sum_{k=1}^n \frac{[N(t_k) - N_c(t_k)]^2}{N(t_k)}, \quad (12)$$

kde proměnná n představuje počet dat (počet kanálů) a σ_k je standardní odchylka každého datového bodu.

Dané výsledky není vhodné interpretovat pouze na základě zjištěné hodnoty χ^2 , z důvodu závislosti naměřených dat na mnoha faktorech. Hodnota minimalizace správnosti proložení se bude zvyšovat s rostoucím množstvím naměřených dat. Z tohoto důvodu je výhodnější interpretovat naměřená data pomocí hodnoty *redukované správnosti proložení* χ_R^2 , která je na množství dat nezávislá. Parametr χ_R^2 je definován rovnicí:

$$\chi_R^2 = \frac{\chi^2}{n-p} = \frac{\chi^2}{\nu}, \quad (13)$$

kde n je množství dat, p zde představuje počet parametrů volnosti a ν je počet stupňů volnosti. V případě TCSPC je množství naměřených dat většinou mnohem větší, než počet parametrů volnosti, z tohoto důvodu je jmenovatel zlomku $(n-p)$ roven přibližně n . Při měření, kdy se projevují pouze náhodné chyby je hodnota $\chi_R^2 \approx 1$. V případě, kdy se použitý matematický model nebude shodovat s naměřenými daty, bude hodnota $\chi_R^2 > 1$.

K posouzení, do jaké hodnoty χ_R^2 je správné zachovávat použitý matematický model, se podle Lakowicze [64] nabízejí dvě metody (*matematická a pozorovací*). Podle matematického modelu by jednotlivá proložení neměla překročit hodnotu $\chi_R^2 = 1,2$. V případě, kdy je tato hodnota vyšší, měl by být daný matematický model zamítnut a naměřená data by měla být

proložena jiným matematickým modelem. Názorným příkladem může být systém charakterizovaný jednou dobou života, kde se objevují systematické chyby a jedno-exponenciální proložení je charakterizováno hodnotou $\chi_R^2 = 1,2$. Následně je použit bi-exponenciální model, který způsobí snížení χ_R^2 , ale to povede k chybné interpretaci naměřených dat. Musíme si uvědomit, že úplným spolehnutím se na matematické hodnoty χ_R^2 může vést k chybnému vyhodnocení fluorescenčních dat. V případě, kdy hodnota χ_R^2 výrazně neklesne při použití složitějšího matematického modelu, tak můžeme říci, že tato hodnota v sobě odráží špatnou kvalitu získaných dat. Obecně se považuje za správný pokles hodnoty χ_R^2 ten, který se sníží více jak dvakrát.

2.2.10 Analýza měření časově rozlišené fluorescence

Pro analýzu dob života mohou být naměřená data prokládána 1–5 exponenciálními funkcemi [72]. Obecnou matematickou funkcí, kterou lze naměřená data prokládat je:

$$F(t) = A + B_i \exp\left(-\frac{t}{T_i}\right), \quad (14)$$

kde t je čas, A je fitovací parametr, B je před-exponenciální faktor, který je v souvislosti s množstvím emitujícího fluoroforu v analyzovaném vzorku a T je příslušná doba života.

V případě multi-exponenciálních poklesů se zavádí tzv. *průměrná doba života*, která může být vypočtena pomocí dvou metod [71]. Průměrnou dobu života můžeme vypočítat podle rovnice:

$$T_a = \sum_{i=1}^n a_i T_i, \quad (15)$$

kde $a_i = B_i \cdot 0,01$. Druhým způsobem výpočtu T_a , který se používá např. ve Stern-Volmerově grafu, je:

$$T_a = \frac{\sum_{i=1}^n a_i T_i^2}{\sum_{i=1}^n a_i T_i}. \quad (16)$$

2.2.11 Vnitřní filtrační efekt

Musíme si uvědomit, že intenzita fluorescence je úměrná koncentraci fluoroforu jen v omezeném rozsahu optických hustot. V případě, kdy je koncentrace daného fluoroforu vyšší, dochází tak k odchylce od lineárního průběhu závislosti I_F (steady-state) na c emitujících molekul v důsledku vnitřního filtračního efektu (IFE – *inner filter effect*). Tento jev můžeme rozdělit na vnitřní filtrační efekt prvního a druhého druhu [64, 73].

IFE prvního druhu je dán skutečností, že v případě klasického uspořádání je emisní záření detekováno z centrální části kyvety, a proto je značná část dopadajícího (excitačního) záření absorbována. Tento efekt má za následek snížení intenzity fluorescence.

Obsahuje-li roztok chromofor, který absorbuje záření při blízké vlnové délce jako zkoumaný fluorofor, tak se tato molekula chromoforu chová obdobně jako filtr, který propustí k analytu jen část excitačního záření. Tímto způsobem je popsán vnitřní filtrační efekt druhého druhu.

Obecně tyto efekty snižují intenzitu budícího a emisního záření v důsledku mechanismu reabsorpce světla.

Vlivem vnitřního filtračního efektu je pozorovaná intenzita fluorescence HL nižší, než ve skutečnosti je. Z tohoto důvodu je nezbytně nutné tyto spektra korigovat, aby nedocházelo ke zkreslení naměřených dat. Nejpoužívanějšími matematickými aparáty, kterými jsou korigována fluorescenční spektra, jsou metody podle Lakowicze [64], Gauthiera [74] a Larssona [75].

Korekční vztah je podle *Lakowicze* definován rovnicí:

$$F_{corr} = F_{obs} \times 10^{\frac{1}{2}(OD_{ex} + OD_{em})}, \quad (17)$$

kde F_{obs} je experimentálně získaná intenzita fluorescence, OD_{ex} je optická hustota při excitační vlnové délce, OD_{em} je optická hustota při emisní vlnové délce. Protože mezi optickou hustotou a absorbcí platí vztah:

$$OD = \frac{A_\lambda}{l}, \quad (18)$$

může být optická hustota nahrazena absorbcí v případě, kdy je optická dráha vzorku (tloušťka kyvety) rovna 1 cm. Po dosazení rovnice (18) do korekčního vztahu (17) dostáváme rovnici:

$$F_{corr} = F_{obs} \times 10^{\frac{1}{2}(A_{ex} + A_{em})}, \quad (19)$$

kde A_{ex} je absorbance při excitační vlnové délce a A_{em} je absorbance při emisní vlnové délce.

V případě korekčního modelu podle *Gauthiera* je vztah definován rovnicí:

$$F_{corr} = F_{obs} \frac{2,3dO_{ex}}{1-10^{-dO_{ex}}} 10d_2O_{em} \frac{2,3w_2O_{em}}{1-10^{-w_2O_{em}}}, \quad (20)$$

kde F_{obs} je změřená intenzita fluorescence, O_{ex} je absorbance při excitační vlnové délce, O_{em} je absorbance při emisní vlnové délce, d je optická dráha kyvety, w_2 je vnitřní rozměr kyvety a d_2 je tloušťka stěny kyvety ve směru detekce emisního záření.

Posledním modelem je vztah podle *Larssona*, který je definován rovnicí:

$$F_{corr} = F_{obs}(\lambda_{ex}) \frac{\vec{r}_{blind}(\lambda_{ex})}{\vec{r}_{obs}(\lambda_{ex})}, \quad (21)$$

kde F_{obs} je experimentálně zjištěná intenzita fluorescence, $\vec{r}_{blind}(\lambda_{ex})$ je vektor popisující plochu Ramanova píku rozpouštědla (blanku) při excitační vlnové délce a $\vec{r}_{obs}(\lambda_{ex})$ je vektor charakterizující plochu Ramanova píku vzorku při excitační vlnové délce.

Velmi dobrá review, která se věnují metodám korekce IFE, představují reference [73, 76].

2.2.12 Časově rozlišená emisní spektra

Měřením časově rozlišených emisních spekter (TRES – *Time Resolved Emission Spectra*) je možné získat informace o probíhajících procesech v excitovaných stavech molekul [82]. Tato technika je nejčastěji využívána ke studiu relaxace rozpouštědla v blízkosti excitovaného fluoroforu. Relaxace molekul rozpouštědla způsobuje částečnou disipaci energie fluoroforu, kdy dochází k batochromnímu posunu emisního spektra, který je nositelem informací o polaritě a viskozitě mikroprostředí v okolí daného fluoroforu [64].

V případě TRES jde o soubor časově závislých poklesů intenzit fluorescence, které jsou měřeny při určitém kroku vlnových délek $\Delta\lambda$ napříč celým emisním spektrem. Doby života excitovaného stavu, které jsou reprezentovány danými poklesy intenzit fluorescence, jsou závislé na vlnové délce. To je způsobeno časem přechodu ze stavu Franck-Condonova do stavu relaxovaného případně do stavu jiného, který je vymezen těmito limitními kvantově-mechanickými stavy, ze kterých pak daný fluorofor emituje. Jestliže fluorofory emitují po delší době, můžeme se domnívat, že ztrácejí více energie, která je tak předána molekulám rozpouštědla, a proto dané fluorofory emitují v oblasti vyšších vlnových délek. Metoda přímého měření TRES se obvykle nepoužívá, proto jsou tyto spektra získávána nepřímo. Proces začíná měřením časově rozlišených poklesů intenzit při zvoleném kroku vlnových délek napříč celým emisním spektrem. Naměřená TCSPC data jsou vyhodnocena pomocí vhodného matematického modelu (1–5 exponenciální funkce). Takto jsou získány parametry potřebné k výpočtu intenzit fluorescence v různých časech. Z jednotlivých dob života a příslušných relativních amplitud můžeme následně vypočítat časově rozlišená emisní spektra. V případě, kdy pozorujeme změnu daného emisního spektra, bude v systému probíhat reakce v excitovaném stavu fluoroforu [77, 79, 80, 82]. V těchto případech se nejedná o přímou excitaci formované molekuly, ale o formování z předešlého excitovaného stavu. Co se týká samotného zkonstruování TRES, lze ho spočítat pomocí rovnice:

$$I(\lambda, t) = I_{SS}(\lambda) \frac{\sum_i \alpha_i(\lambda) e^{-\frac{t}{\tau_i(\lambda)}}}{\sum_i \alpha_i(\lambda) \tau_i(\lambda)}, \quad (22)$$

kde I_{SS} představuje intenzitu fluorescence (steady-state), τ_i je doba života excitovaného stavu a α_i je příslušná relativní amplituda v čase t .

Z časově rozlišených emisních spekter lze určit, zda pozorovaná emise v systému je ze dvou či více emisních jednotek nebo pouze z jedné [78, 81–82]. To můžeme určit výpočtem tzv. časově rozlišených přes plochu normalizovaných spekter (TRANES – *Time Resolved Area Normalized Emission Spectra*). Je experimentálně a matematicky dokázáno, že dvě na sobě nezávislé emisní jednotky způsobují protnutí jednotlivých emisních spekter v tzv. *isoemisním bodu*, který je specifický v případě emise ze dvou jednotek [78]. TRANES lze

zkonstruovat normalizací plochy pod křivkou časově rozlišených emisních spekter tak, že plocha pod křivkou v čase t se bude rovnat ploše spektra v čase $t = 0$:

$$I_N(\lambda, t) = \frac{S_0}{S_t} I(\lambda, t), \quad (23)$$

kde S_0 představuje plochu pod křivkou v čase $t = 0$ a S_t je plocha pod křivkou v čase $t = t$.

3 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

3.1 UV/Vis spektrometrie HL a DOM

Molekulová absorpční spektrometrie v ultrafialové a viditelné oblasti (UV/Vis) je stále běžně používanou technikou při studiu HL a DOM [87]. UV/Vis spektra HL patří k nejlépe prostudovaným, a proto jsou mnohými autory využívány k základní charakterizaci jejich vlastností. Cenné informace o povaze HL resp. DOM je možné získat z tzv. *absorpčních koeficientů*, které jsou definovány jako poměry absorbancí při vhodně zvolených vlnových délkách [83–92]. Tradičně se používá především poměr E_4/E_6 , který je znám jako tzv. *humifikační index*. Tento absorpční koeficient je definován jako poměr absorbancí při vlnových délkách 465 a 665 nm. Podle Chena a spol. [83] hodnota humifikačního indexu klesá s molekulovou hmotností HL a je závislá na pH roztoku. Tento absorpční koeficient rovněž vypovídá o stupni kondenzace aromatických jader ve struktuře HL. Musíme si uvědomit, že toto tvrzení se výhradně opírá o korelace mezi humifikačním indexem (E_4/E_6) a střední molekulovou hmotností (\overline{M}_w) studovaných HL. Terestriální HK mají zpravidla hodnoty E_4/E_6 nízké (3–4,5), kdežto FK pocházející z pozemních přírodních matric jsou charakterizovány vyššími hodnotami humifikačního indexu (6–8,5). Je ovšem třeba mít na zřeteli, že velmi nízká absorpance při 665 nm zatěžuje absolutní hodnotu tohoto parametru již značnou chybou. Z tohoto důvodu byl navržen ekvivalentní absorpční koeficient E_2/E_4 , který je definován jako poměr absorbancí při 265 a 465 nm [84].

Kumada a spol. [85, 86] rozdělil půdní HK na základě hodnot absorpčního koeficientu $\Delta \log K$ na typy: *A*, *B* a *Rp*. Tento absorpční koeficient vychází z rozdílu logaritmických hodnot absorbancí při 400 nm ($E_4^{1\%}$) a 600 nm ($E_6^{1\%}$).

Typ *A* představuje půdní HK s vysokým stupněm humifikace (hodnoty $\Delta \log K < 0,6$). HK v této skupině jsou charakterizovány vysokou stabilitou vůči mineralizaci, mají vysokou molekulovou hmotnost a obsahují více aromatických struktur především polyfenolového a chionidního typu.

Typ *B* je skupina HK s hodnotou $\Delta \log K$ v rozmezí 0,6–0,8. Tyto HK se vyznačují nižším stupněm humifikace a molekulovou hmotností.

Typ *Rp* představuje HK s hodnotou $\Delta \log K > 0,8$. Tato skupina HK je charakterizována jistou labilitou vůči mineralizaci, mají nejnižší molekulovou hmotnost a vysoký obsah alifatických funkčních skupin ($-\text{CH}_3$, $-\text{CH}_2-$ a $-\text{CH}=\text{}$). V případě klasifikace půdních HK je $\Delta \log K$ v dobré shodě s humifikačním indexem.

Peuravuori a spol. [87, 88] definoval spojitost mezi navrhovaným absorpčním koeficientem E_2/E_3 a molekulovou hmotností HL a DOM, eventuálně stupněm aromaticity. Vztah mezi absorpčním koeficientem E_2/E_3 ($A_{250 \text{ nm}}/A_{365 \text{ nm}}$) a molekulovou hmotností HL pocházejících z přírodních vod je dán rovnicí:

$$\text{aromaticita} = 52,509 - 6,780 \times (E_2/E_3). \quad (24)$$

Obecně platí, že s klesající hodnotou absorpčního koeficientu E_2/E_3 roste aromaticita a molekulová hmotnost HL. Obdobných výsledků bylo dosaženo v práci Bakera a spol. [89], kterým byla ověřena spojitost mezi absorpčním koeficientem E_{254}/E_{410} ($A_{254 \text{ nm}}/A_{410 \text{ nm}}$) a molekulovou hmotností rozličných vzorků DOM [90].

Dalším strukturním parametrem, který je definován na základě UV/Vis spekter HL a DOM, je absorpční koeficient E_{ET}/E_{Bz} . Tento koeficient vychází z poměru absorbancí při 253 nm (substituenty přenosu náboje) a 203 nm (benzenoidních struktur). Tento absorpční koeficient je výrazně citlivý k přítomnosti polárních substituentů na aromatickém jádře a poskytuje tedy informace o typu substituentů ve struktuře HL. Zvýšení obsahu polárních funkčních skupin (–OH, –COOH, –C=O a –O–) vede k výraznému zvýšení absorpance při 253 nm a tím také k růstu absorpčního koeficientu E_{ET}/E_{Bz} . Např. vyšší obsah alifatických substituentů se projeví nižšími hodnotami tohoto poměru. Podrobně se monitoringu vlastností HL a DOM prostřednictvím uvedeného absorpčního koeficientu věnují reference [91, 92]. Absorbance při 203 nm může být nepříznivě ovlivněna přítomností dusičnanových aniontů ve vzorku HL, proto Korshin a spol. [91] definoval další absorpční koeficienty E_{253}/E_{220} (A_{253}/A_{220}) a E_{253}/E_{230} (A_{253}/A_{230}), které jsou v dobré korelaci s E_{ET}/E_{Bz} .

Cenné informace o struktuře HL resp. DOM můžeme získat z tzv. *specifických absorbancí* (A_{280} [93], A_{285} [94] a $SUVA_{254}$ [95]), které jsou definovány při různých λ_{Abs} , nejčastěji však v UV-oblasti absorpčního spektra. Chin a spol. [93] našel spojitost mezi navrženou specifickou absorbancí A_{280} a molekulovou hmotností (stupněm aromaticity) HL izolovaných z vzorků přírodních vod. Obdobných výsledků bylo dosaženo v práci Weishaara [95], kterým byla definována specifická absorpance $SUVA_{254}$ jako poměr A_{254} nm k celkovému obsahu organického uhlíku TOC ve vzorku.

Velmi dobré review o této problematice poskytují reference [88].

3.2 Infračervená spektrometrie s Fourierovou transformací HL a DOM

Infračervená spektrometrie (IR), resp. infračervená spektrometrie s Fourierovou transformací (FTIR) je stále běžně používanou technikou při studiu HL a DOM izolovaných z rozličných přírodních matric [96]. FTIR spektrometrie se vyznačuje snadností a rychlostí obsluhy přístroje, rozsáhlým počtem publikovaných prací týkajících se infračervených spekter HL a DOM, požadavkem malého množství vzorku 1–2 mg a především možností spojení FTIR s dalšími technikami (TG/FTIR, Py/GC/FTIR a GC/FTIR/MS) [97–100]. I přes složitou strukturu HL pozorujeme v jejich infračervených spektrech celou řadu absorpčních pásů, které odpovídají jednotlivým funkčním skupinám. Infračervená spektrometrie poskytuje cenné informace o struktuře a povaze HL resp. DOM, jejich reaktivitě, prostorovém uspořádání funkčních skupin, podílu sacharidových a proteinových jednotek atd.

V některých případech komplikují interpretaci infračervených spekter HL překrývající se pásy jednotlivých funkčních skupin. Tuto nevýhodu lze s obezřetným přístupem řešit pomocí tzv. *Fourierovy autodekonvoluce* (Fourier self-deconvolution) případně metodou proložení křivky [101–103].

Obecně v infračervené spektrometrii, obdobně jako u jiných spektrometrických metod, platí Lambert-Beerův zákon, a proto při použití zmiňovaných dekonvolučních postupů má tato technika dobré předpoklady pro kvantitativní analýzu funkčních skupin [101]. Ve většině případů je vzorek upraven do formy tablety v přítomnosti KBr, který má bohužel hydrokopické vlastnosti, a to podstatně komplikuje interpretaci změřeného spektra v oblasti $3600\text{--}3000\text{ cm}^{-1}$, 1650 cm^{-1} a $800\text{--}500\text{ cm}^{-1}$ [104]. Stevenson [11] upozorňuje, že za jistých podmínek KBr katalyzuje dekarboxylaci kyselých funkčních skupin, případně jejich deprotonizaci. Alternativou je využití jevu difuzního odrazu, v odborné literatuře

označovaného jako DRIFTS (*Diffuse Reflectance Infrared Fourier Transform Spectroscopy*), nebo jedno-odrazové reflexe na nástavci ATR (*Attenuated Total Reflection*) [96, 105–108].

Musíme si uvědomit, že infračervené ATR spektrum je ovlivněno vlnovou délkou IČ záření, poměrem indexů lomu měřeného vzorku a ATR krystalu, úhlem dopadu záření na fázové rozhraní a účinností kontaktu mezi měřeným vzorkem a ATR krystalem. Výsledná hloubka penetrace infračerveného záření do vzorku je dána rovnicí:

$$d_p = \frac{\lambda}{2\pi n_k \sqrt{\sin^2 \theta - \left(\frac{n_v}{n_k}\right)^2}}, \quad (25)$$

kde d_p představuje hloubku průniku záření do vzorku, λ představuje vlnovou délku záření, θ je úhel dopadu záření na fázové rozhraní, n_v a n_k jsou indexy lomu vzorku a krystalu. Aby došlo k úplnému vnitřnímu odrazu, musí být úhel dopadu větší než kritický úhel θ_c , který je definován vztahem:

$$\theta_c = \frac{1}{\sin\left(\frac{n_v}{n_k}\right)}. \quad (26)$$

Z rovnice (25) vyplývá, že penetrační hloubka d_p závisí na vlnové délce infračerveného záření (s rostoucí vlnovou délkou tj. s klesajícím vlnočtem se zvyšuje hloubka penetrace). Ve skutečnosti to znamená, že relativní intenzita absorpčních pásů se snižuje s rostoucí energií IČ záření tj. v oblasti vyšších vlnočtů. Tento jev je většinou kompenzován tzv. *ATR korekcí* [109].

V infračervených spektrech nativních HL, případně vzorků DOM můžeme nalézt celou řadu fundamentálních pásů, které jsou charakteristické pro jednotlivé funkční skupiny.

Absorpční pás v oblasti $3400\text{--}3300\text{ cm}^{-1}$ odpovídá valenčním vibracím --OH skupin. Hydroxylové skupiny velmi ochotně tvoří v HL vodíkové můstky a poskytují tak velmi široký pás, který znesnadňuje identifikaci aromatických struktur v oblasti $\approx 3030\text{ cm}^{-1}$. V rozmezí vlnočtů $2900\text{--}2800\text{ cm}^{-1}$ se nachází oblast specifické absorpce alifatických funkčních skupin (--CH , --CH_2 a --CH_3). V infračervených spektrech nativních HL můžeme nalézt absorpční pásy v oblasti $\approx 2920\text{ cm}^{-1}$ a $\approx 2850\text{ cm}^{-1}$, které odpovídají asymetrickým a symetrickým valenčním vibracím methylenových funkčních skupin. Absorpční pás v oblasti $\approx 2960\text{ cm}^{-1}$ je charakteristický pro methylované a acetylované HK, který připadá asymetrickým vibracím --CH_3 skupin. Ostrý pás lokalizovaný v oblasti $\approx 1725\text{--}1710\text{ cm}^{-1}$ náleží valenčním vibracím karbonylových funkčních skupin v karboxylových kyselinách. Soli HL (*humáty* a *fulváty*) jsou charakterizovány absorpčními pásy v oblasti $\approx 1550\text{ cm}^{-1}$ a $\approx 1400\text{ cm}^{-1}$, které odpovídají symetrickým a asymetrickým vibracím karboxylátového aniontu COO^- . V případě methylovaných HK můžeme v FTIR spektrech pozorovat absorpční pásy v oblasti $1785\text{--}1735\text{ cm}^{-1}$ náležící vibracím karbonylových funkčních skupin v methyl esterech. V infračervených spektrech acetylovaných HK můžeme identifikovat specifické absorpční pásy při $\approx 1840\text{ cm}^{-1}$, $\approx 1815\text{ cm}^{-1}$, $\approx 1775\text{ cm}^{-1}$ a $\approx 1740\text{ cm}^{-1}$, které odpovídají vibracím karbonylových funkčních skupin v cyklických anhydridech, případně v acetanhydridech. Interpretace absorpčního pásu v oblasti $\approx 1610\text{ cm}^{-1}$ je poněkud složitější v důsledku specifických absorpcí strukturně odlišných funkčních skupin. Obecně je tento absorpční pás připisován vibracím konjugovaných dvojných vazeb (--C=C--) v aromatických strukturách HL. Musíme si uvědomit, že v této oblasti infračerveného spektra rovněž absorbují sloučeniny chinoidního charakteru. Absorpční pás v oblasti $1690\text{--}1635\text{ cm}^{-1}$ náleží vibracím

karbonylových funkčních skupin v chinonech, případně konjugovaných ketonech. V případě lokalizace širokého absorpčního pásu v této oblasti IČ spektra ($1690\text{--}1600\text{ cm}^{-1}$) musíme brát v úvahu všechny tyto aspekty. V FTIR spektrech nativních HL můžeme nalézt ostrý absorpční pás v oblasti 1500 cm^{-1} , který náleží valenčním vibracím jednoduchých aromatických struktur. Absorpční pás lokalizovaný v oblasti $1460\text{--}1450\text{ cm}^{-1}$ je obvykle připisován deformačním vibracím alifatických funkčních skupin. V infračervených spektrech těchto látek můžeme rovněž nalézt absorpční pás při $\approx 1400\text{ cm}^{-1}$, který odpovídá deformačním vibracím hydroxylových skupin a vibracím C–O fenolických –OH skupin, případně deformačním vibracím C–H v methylenových a methylových skupinách. Široký absorpční pás v oblasti $1280\text{--}1200\text{ cm}^{-1}$ je principiálně přisuzován deformačním vibracím hydroxylových funkčních skupin v karboxylových kyselinách, nebo C–O vibracím v aryl etherech. V rozmezí vlnočtů $1170\text{--}950\text{ cm}^{-1}$ se nachází oblast specifické absorpce alifatických alkoholů (–C–OH), případně C–O vazebné vibrace polysacharidů nebo polysacharidům podobných látek [11].

Esteves a spol. [110] pomocí Fourierovy autodekonvoluce (FSD) dokázal přiřadit jednotlivé C=O vibrace příslušným funkčním skupinám (amidovým, aldehydickým, karboxylovým, karboxylátovým, ketonickým, esterovým a chinonovým). Rovněž se mu podařilo prokázat, že absorpční pás v oblasti $\approx 1610\text{ cm}^{-1}$ přísluší valenčním vibracím aromatického kruhu. Dále zjistil, že poměr absorpčních pásů aromatických a alifatických funkčních skupin ($1610/2920\text{ cm}^{-1}$, $1610/2850\text{ cm}^{-1}$, případně $\approx 1500/2920\text{ cm}^{-1}$ nebo 2850 cm^{-1}) ztelně koreluje s hodnotou aromaticity (α) získanou pomocí ^{13}C NMR spektrometrie.

Významnou vlastností HL, především HK je jejich vysoká afinita vůči těžkým kovům případně organickým polutantům. Do interakce s kovovými ionty se nejvíce zapojují karboxylové a fenolické funkční skupiny, které vynikají svojí reaktivitou a schopností tvořit silné kovalentní vazby s těmito ionty [111–116]. Terkhimu a spol. [111] se podařilo určit, že Hg^{2+} ionty jsou v HK poutány prostřednictvím karboxylových a fenolických funkčních skupin, kdy dochází v infračervených spektrech k poklesu absorpčních pásů v oblasti 1715 cm^{-1} a 1400 cm^{-1} , které náleží valenčním vibracím karbonylových funkčních skupin v karboxylových kyselinách a C–O vazebným vibracím fenolických –OH skupin. Tento fakt je rovněž podpořen intenzivnějšími absorpčními pásy při 1570 cm^{-1} a 1430 cm^{-1} , které odpovídají asymetrickým a symetrickým vibracím COO^- . Martyniuka a spol. [112] se ve své práci zabývali sorpcí kovových iontů na lignitické HK. Autorům se podařilo zjistit, že HK ve formě gelu vykazují vyšší afinitu vůči všem studovaným iontům v porovnání s práškovými HK. Tento rozdíl je nejvíce patrný v případě Cr^{3+} iontů. Z infračervených spekter $\text{Me}^{X+}\text{--HK}$ je zřejmé, že při $\text{pH} < 5$ interaguje s kovovými ionty pouze část z celkového počtu karboxylových funkčních skupin. Při určité hodnotě pH, nejčastěji však $\text{pH} > 6$ se do interakce zapojují všechny karboxylové a fenolické funkční skupiny. Výjimku tvoří Pb^{2+} , Ag^+ a Cu^{2+} ionty, které jsou schopny interagovat s fenolickými –OH skupinami již při $\text{pH} < 6$, kdy tvoří smíšené karboxylát-fenolické komplexy. Obdobným výsledkům dosáhl ve své práci Piccolo a spol. [113], který studoval vazebné interakce Cu^{2+} , Pb^{2+} a Ca^{2+} iontů s půdními HL. Velmi dobré review přináší reference [114, 115].

Je všeobecně známo, že modifikované HL (upravené methylovanými případně acetylovanými) se vyznačují podstatně nižší sorpční kapacitou. V případě methylovaných a acetylovaných HK jsou nejreaktivnější funkční skupiny (–COOH a fenolické –OH) blokovány zavedením methylových a acetylových funkčních skupin, kdy vznikají methyl estery a anhydridy HK.

Gardea-Torresdey a spol. [116] se podařilo zjistit, že methylování dochází ke snížení vazebné kapacity HK pro Cu^{2+} ionty. Následnou alkalickou hydrolyzou bylo zjištěno, že po odštěpení methylových funkčních skupin dochází k opětovnému obnovení sorpční kapacity HK.

Tyto výsledky potvrzují význam karboxylových a fenolických $-\text{OH}$ skupin v problematice sorpce a imobilizace iontů těžkých kovů.

3.3 Ustálená a časově rozlišená fluorescenční spektrometrie HL a DOM

Ustálená fluorescenční spektrometrie (steady-state) je hojně využívanou technikou při studiu a charakterizaci HL a DOM pocházejících z odlišných přírodních matric [117]. V poslední době se dostává do popředí vědeckého zájmu i možnost využití časově rozlišené fluorescence pro studium těchto látek [118]. Fluorescenční spektrometrie nám obecně poskytuje nepřehledná množství informací týkajících se struktury, heterogenity, přítomnosti elektron-donorních ($-\text{OH}$, $-\text{NH}_2$, $-\text{O}^-$, $-\text{CN}$, $-\text{OCH}_3$ a $-\text{OR}$) a elektron-akceptorů ($-\text{COOH}$ a $-\text{NO}_2$) funkčních skupin, stupně humifikace a “kondenzace” aromatických struktur aj. [17, 119].

$A (\alpha')$ – *fulvic-like* a $C (\alpha)$ – *humic-like* jsou typickými fluorofory huminových látek (HK a FK) izolovaných z terestriálních přírodních matric, případně některých frakcí DOM. V excitačně-emisních spektrech (EEM) HK pocházejících z kaustobiolitických a půdních matric můžeme nalézt vedlejší fluorescenční maxima (tzv. odvozené C – *humic-like* fluorofory), které jsou lokalizovány v oblasti vyšších vlnových délek excitace a emise. Tyto fluorofory jsou mnohými autory pokládány za typická fluorescenční maxima charakterizující HL a DOM. V případě HL, případně vzorků DOM pocházejících z pobřežních a mořských sedimentů můžeme v EEM spektrech lokalizovat specifické fluorescenční maximum, které je v odborných pramenech označováno symbolem $M (\beta)$ – *marine humic-like*. Můžeme se setkat s tvrzením, že toto fluorescenční maximum je prekurzorem fluoroforu $C (\alpha)$.

$B (\gamma)$ – *tyrosin-like* a $T (\delta)$ – *tryptofan-like* jsou specifickými fluorescenčními maximy DOM pocházejících z přírodních vod, které mají svůj původ v látkách jako je tyrosin a tryptofan. Jedná se o residua doposud nehumifikované organické hmoty, které jsou produkovány na základě mikrobiologické aktivity vodní flóry. Fluorescenční píky $B (\gamma)$ a $T (\delta)$ jsou typickými fluorofory vzorků přírodních vod [17, 21, 120].

Musíme si uvědomit, že poloha jednotlivých fluorescenčních maxim (fluoroforů A , C , M , B a T) v EEM spektrech je z mnoha pohledů unikátní (tzv. *fingerprint*), na jejichž základě můžeme HL resp. DOM klasifikovat [21–22, 117, 121–122]. Poloha a intenzita fluorescenčního maxima (I_F) závisí na mnoha faktorech, které musí být při interpretaci fluorescenčních spekter uvažovány. Velmi dobré review týkající se této problematiky přináší reference [123].

Jak již bylo uvedeno dříve, vlivem IFE prvního a druhého druhu je pozorovaná intenzita fluorescence HL a DOM nižší, než ve skutečnosti je. Tento fakt je bohužel mnohými autory ignorován a přehlížen, a proto se ve svých pracích dopouštějí nepřesné interpretace naměřených dat. Musíme si uvědomit, že IFE ovlivňuje nejen intenzitu fluorescence, ale i polohu fluoroforu, případně může dojít k úplnému vymizení fluorescenčního maxima v EEM spektrech, zvláště pak v tzv. *UV-light* oblasti ($\lambda_{ex, abs} = 200\text{--}350$ nm) [76]. IFE rovněž nepříznivě ovlivňuje vypočtené hodnoty fluorescenčních indexů, kterými jsou HL a DOM

charakterizovány. Vnitřní filtrační efekt musí být zohledněn i v případě měření časově rozlišených fluorescenčních spekter.

Obecně můžeme v EEM spektrech vodných roztoků pozorovat Rayleighův a Ramanův rozptyl světla. Tyto rozptylové jevy mohou být odstraněny případně potlačeny, jestliže odečteme z EEM spekter HL a DOM excitačně-emisní spektrum blanku tj. ultra-čisté vody – *Mili-Q*. Intenzita Rayleighova rozptylu světla může být potlačena v případě, kdy jsou monochromátory nastaveny do vzájemné polohy 90°, nebo automatickou korekcí fluorescenčního spektrometru.

Cenné informace o povaze HL a DOM je možné získat z tzv. *fluorescenčních koeficientů*, které jsou definovány jako poměry intenzit fluorescence, případně jako plochy pod křivkou při vhodně zvolených vlnových délkách emise. Tradičně se používá především koeficient *FI*, který je znám jako *fluorescenční index* [124]. Tento fluorescenční koeficient je definován jako poměr intenzit fluorescence při emisních vlnových délkách 450 a 500 nm, přičemž excitační vlnová délka je 370 nm. Podle McKnighta a spol. hodnota fluorescenčního indexu vypovídá o původu HL a DOM. Huminové látky (HK a FK) případně některé DOM pocházející z terestriálních přírodních matric mají hodnoty *FI* nízké ($\approx 0,2-1,4$), kdežto FK a DOM, které jsou produkovány na základě mikrobiologické aktivity vodní flóry, jsou charakterizovány vyššími hodnotami fluorescenčního indexu ($> 1,9$).

Huguet a spol. [125] navrhl ekvivalentní fluorescenční koeficient *BIX*, který je definován jako poměr I_F při emisních vlnových délkách 380 (fluorofor *M – marine humic-like*) a 430 nm (fluorofor *C – humic-like*). HL a DOM izolované z terestriálních případně kaustobiolitických přírodních matric jsou charakterizovány nižšími hodnotami fluorescenčního koeficientu *BIX* ($< 0,8$), které vypovídají o alochtonním původu těchto látek. HL především však DOM mají zpravidla hodnoty *BIX* vyšší (0,8–1), které jsou charakteristické pro látky autochtonního původu, které vznikají biologickou aktivitou vodních mikroorganismů.

Dalším strukturním parametrem, který je definován na základě emisních spekter HL a DOM, je humifikační index *HIX*. Tento fluorescenční koeficient vychází z poměru ploch pod křivkou emisního spektra, kde příslušné plochy A_1 a A_4 jsou vypočteny jako plošné integrály v rozmezí vlnových délek 435–480 nm (A_4) a 300–345 nm (A_1), přičemž excitační vlnová délka je 254 nm. Podle Zsolnaye a spol. [126] je tento fluorescenční koeficient výrazně citlivý k přítomnosti aromatických jader a poskytuje tedy informace o stupni humifikace HL resp. DOM. Zvýšení obsahu aromatických struktur vede k výraznému zvýšení intenzity fluorescence v oblasti A_4 a tím také k růstu humifikačního indexu *HIX*. Huminové látky případně některé frakce DOM izolované z terestriálních a kaustobiolitických matric mají hodnoty *HIX* vysoké (> 5), naproti tomu HL a především DOM pocházející z přírodních vod jsou charakterizovány nižšími hodnotami humifikačního indexu (< 5).

Obdobných výsledků bylo dosaženo v práci Milori a spol. [127], která definovala ekvivalentní fluorescenční koeficient A_{440} . Tento fluorescenční koeficient je definován jako plošný integrál pod celým emisním spektrem tj. v rozmezí vlnových délek emise 460–650 nm, přičemž budící záření je pro tento koeficient 440 nm. Obecně můžeme konstatovat, že se zvyšující se hodnotou A_{440} roste stupeň humifikace HL a DOM.

Musíme si uvědomit, že poloha jednotlivých fluorescenčních maxim huminového (*A*, *C* a *M*) a proteinového (*B* a *T*) charakteru je v příslušných EEM regionech neměnná. Případné posuny fluorescenčních maxim *A*, *C* a *M* jsou z pravidla způsobeny přítomností některých

funkčních skupin, heterogenitou, stupněm humifikace a obsahem aromatických struktur s konjugovaným systémem dvojných vazeb [17, 117, 119, 128].

Huminové látky (HK a FK) a některé frakce DOM pocházející z terestriálních přírodních matric jsou principiálně charakterizovány dvěma fluorescenčními maximy $A (\alpha')$ a $C (\alpha)$. V případě FK jsou tyto fluorofory lokalizovány v oblasti nižších vlnových délek excitace a emise. Fulvinové kyseliny se obvykle vyznačují vyšší intenzitou fluorescence v porovnání s HK. Tyto výsledky naznačují, že FK jsou charakterizovány vyšším obsahem elektron-donorních funkčních skupin, nižší molekulovou hmotností, vyšší molekulární heterogenitou, nižším stupněm humifikace a nižším obsahem aromatických struktur s konjugovaným systémem dvojných vazeb [21, 65, 84, 88, 124]. Podle mnohých autorů [117, 129–131], kteří se zabývali studiem HK izolovaných z kaustobiolitických a půdních matric můžeme v jejich EEM spektrech nalézt minoritní fluorescenční maxima tzv. $C (\alpha)$ odvozené *humic-like* fluorofory, které se nacházejí v oblasti vyšších vlnových délek excitace a emise (tj. ≈ 435 – $450/500$ – 540 nm). Přítomnost těchto fluoroforů v excitačně-emisních spektrech je typická pro HK, které se vyznačují vysokou molekulovou hmotností, nízkou molekulární heterogenitou, vysokým stupněm humifikace, který je indikátorem vysokého obsahu aromatických jader chinonového typu [117]. $B (\gamma)$ – *tyrosin-like* (270–280/300–315 nm) a $T (\delta)$ – *tryptofan-like* (270–280/345–360 nm) jsou typickými fluorescenčními maximy DOM pocházejících z přírodních sladkovodních a mořských vod. Kromě těchto fluoroforů můžeme v jejich EEM spektrech nalézt i fluorescenční maxima huminového původu tj. fluorofory A , C a M [17, 21, 132–133]. Musíme mít na zřeteli, že sladkovodní zdroje (řeky a jezera) mohou být kontaminovány opticky zjasňujícími látkami (tzv. *optical brighteners*), které pocházejí z odpadních vod. Jedná se především o deriváty 1,2-difenylethenu, které mají fluorescenční maxima v oblasti vlnových délek 330–350/410–450 nm. Podle Hendersona a spol. [22] je nezbytně nutné jednotlivé frakce DOM izolovat, aby nedocházelo k nepřesné interpretaci EEM spekter.

Musíme si uvědomit, že HL a DOM jsou neustále modifikovány v závislosti na čase a podmínkách, kterým jsou během humifikačních procesů vystaveny. Celý proces je ovlivňován především přítomností mikroorganismů, vlivem vlhkosti, teploty a provzdušnosti přírodní matrice, enzymy aj.

Humifikovaná OM představuje jeden z hlavních faktorů řídící fyzikálně-chemické a biologické vlastnosti půdy a svým množstvím a složením ovlivňuje nejen úrodnost půdy, ale plní i velmi významnou úlohu v půdní hygieně, tj. schopnosti imobilizovat těžké kovy a organické polutanty. Této problematice je věnováno mnoho odborných publikací, které pojednávají o vlivu přídatku OM (kompostu [134], chlévské mrvy [135], odpadního kalu [136] a komunálního odpadu [137]) na vlastnosti HL izolovaných z rozličných půdních matric. Podle mnohých autorů, kteří se zabývali studiem HL izolovaných z kompostu, statkového hnoje a odpadního kalu (málo humifikovaných OM) můžeme v jejich EEM spektrech nalézt specifické fluorescenční maxima $B (\gamma)$ a $T (\delta)$, případně fluorofory $A (\alpha')$ – *fulvic-like*. Přítomnost těchto fluoroforů v EEM spektrech je typická pro HL, které se vyznačují nízkou molekulovou hmotností, vysokou molekulární heterogenitou, nízkým stupněm humifikace, který je indikátorem nízkého obsahu aromatických jader v “kondenzovanějším” stavu. Musíme mít na zřeteli, že aplikace OM do půdy vede k její částečné humifikaci, kdy v jejich EEM spektrech můžeme pozorovat další fluorescenční maxima, která se nacházejí v oblasti vyšších vlnových délek excitace a emise, tj. $C (\alpha)$ a jeho

odvozené *humic-like* fluorofory. V průběhu humifikačního procesu se intenzita fluorescence HL izolovaných z obohacených půd postupně snižuje, kdy dochází k částečné mineralizaci OM, která byla do půd aplikována [138].

Zhášení fluorescence HL a DOM

Musíme si uvědomit, že termín *zhášení fluorescence* v sobě zahrnuje jakýkoliv proces, který je doprovázen snížením I_F . Zhášení, které vychází z kolizních střetů mezi molekulami fluoroforu HL a látkou, která je schopna zhášení se nazývá *dynamické*. V případě, kde se na fluorofory HL váží látky způsobující zhášení (nejčastěji ionty těžkých kovů) mluvíme o zhášení *staticém*, které je doprovázeno vznikem tzv. *nefluoreskujícího komplexu*. Statické zhášení je z hlediska studia a charakterizace HL velmi významné, proto se budeme tomuto procesu dále blíže věnovat.

Základním principem statického zhášení je vznik nefluoreskujícího komplexu. K formaci tohoto komplexu může dojít buď díky tzv. *sféře statického zhášení*, anebo přímou tvorbou nefluoreskujícího komplexu v základním elektronovém stavu. Jelikož předpokladem zhášení fluorescence v tzv. *sféře statického zhášení* je stav, ve kterém se látka, která je schopna zhášení fluorescence nachází uvnitř sféry vymezené fluoroforem a zároveň musí platit, že fluorofor v excitovaném stavu a zhášeující látka nemohou měnit svoji vzájemnou polohu v prostoru během doby života v excitovaném stavu, např. v prostředí s vysokou viskozitou, je tato situace pro vodné roztoky HL nepravděpodobná [63–64].

Pravděpodobnější je, že HL a DOM s ionty těžkých kovů tvoří nefluoreskující komplexy v poměru 1:1 dle rovnice:



Doba života excitovaného stavu zůstává neměnná, protože k tvorbě komplexu dochází v základním stavu.

Závislost intenzity fluorescence na koncentraci Q můžeme odvodit pomocí konstanty stability nefluoreskujícího komplexu. Konstanta stability nefluoreskujícího komplexu je definována z předchozí rovnice vztahem:

$$K_S = \frac{[MQ]}{[M][Q]}, \quad (28)$$

přičemž celková koncentrace fluoroforu $[M]_0$ je:

$$[M]_0 = [M] + [MQ], \quad (29)$$

kdy po dosazení $[M]_0$ do rovnice (28) a následné úpravě dostáváme rovnici:

$$\frac{[M]}{[M]_0} = \frac{1}{1 + K_S[Q]}. \quad (30)$$

Vezmeme-li v úvahu, že intenzita fluorescence je přímo úměrná koncentraci fluoroforu (platí pouze pro zředěné roztoky), tak rovnici (30) můžeme napsat ve tvaru:

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_S[Q]. \quad (31)$$

Výsledná závislost $\frac{F_0}{F}$ na koncentraci Q je lineární, mluvíme tedy o lineárním modelu *Stern-Volmerovy rovnice*.

Rychlostní konstanta zhášení fluorescence je v případě statického zhášení rovna konstantě stability komplexu.

V případě některých iontů těžkých kovů, zvláště pak Cu^{2+} není závislost $\frac{F_0}{F}$ na koncentraci Q lineární. Možným vysvětlením nelinearity Stern-Volmerovy rovnice je existence dvou populací fluoroforu HL, z nichž jedna je přístupná k zhášení a druhá nikoliv. Je zřejmé, že pouze fluorescence vycházející z přístupného typu fluoroforu podléhá statickému zhášení. Podrobné odvození *upravené Stern-Volmerovy rovnice* přináší reference [64, 139–140]. Upravená Stern-Volmerova rovnice je dána vztahem:

$$\frac{F_0}{F} = \frac{1}{f_a K_a [Q]} + \frac{1}{f_a}, \quad (32)$$

kde f_a představuje část počáteční fluorescence, která je schopna podlehnout statickému zhášení a K_a představuje konstantu stability $[\text{HL}-\text{Me}^{X+}]$ komplexu [141].

Je obecně známo, že unikátní struktura HL resp. DOM umožňuje vznik komplexů s celou řadou sloučenin, především však s ionty těžkých kovů [139–151]. Musíme si uvědomit, že jednotlivá vazebná místa HL a DOM mají odlišné komplexační vlastnosti. Rozsah a mechanismus komplexace závisí především na pH, iontové síle, povaze kovového iontu, morfologii vazebného místa a v neposlední řadě i na koncentraci ligandu HL. Ionty těžkých kovů jsou v HL vázány především funkčními skupinami, které obsahují volný elektronový pár, případně π vazebné elektrony (karboxylové, fenolické, enolické a aromatické strukturální jednotky). Komplexační kapacitu HL můžeme definovat jako maximální počet specifických míst, které jsou přístupné k navázání kovových iontů [142]. Jak již bylo uvedeno dříve, hodnota pH přímo ovlivňuje míru disociace HL a DOM. Obecně platí, že s rostoucí hodnotou pH ($\approx 3,5$ – $8,5$) se zvyšuje komplexační kapacita HL (tj. sorpční schopnost), avšak při $\text{pH} > 9$ může docházet k hydrolyze již sorbovaných iontů [143]. Velmi dobré review týkající se této problematiky přináší reference [144].

Přechodné kovy Hg^{2+} , Cu^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Fe^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{3+} , Cr^{3+} , La^{3+} , Tb^{3+} , UO_2^{2+} , Cr^{4+} mohou efektivně zhášet fluorescenci ligandů HL a DOM, přičemž zhášecí efekt Cd^{2+} , Pb^{2+} a Al^{3+} iontů je méně výrazný [145–146]. Je všeobecně známo, že alkalické kovy, případně kovy alkalických zemin nevykazují zhášecí účinek. Přechodné kovy mají energetickou d -hladinu níže než excitovaný singletový stav HL a DOM, a proto mohou účinně zhášet fluorescenci těchto ligandů v důsledku intermolekulárního přenosu energie. Plazovi a spol. [147] se podařilo určit, že terestriální HK obsahují ve své struktuře molekuly porfyrinového typu, kde centrálními atomy těchto sloučenin jsou sorbované Cu^{2+} ionty. Podle Ryana a spol. [148] je větší zhášecí schopnost Cu^{2+} iontů způsobena jejich schopností tvořit s ligandy HL silné komplexy vnitřní sféry $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})_4]_{\text{L}_{2,4}}$. Antunes a spol. [149] se ve své práci zabývala sorpcí kovových iontů na HL. Autorům se podařilo zjistit, že konstanty stability $[\text{FK}-\text{Me}^{X+}]$ klesají v následujícím pořadí $\text{Fe}^{3+} > \text{UO}_2^{2+} > \text{Hg}^{2+} > \text{Cu}^{2+}$. Rovněž standard HK *Fluka* byl charakterizován nejvyšší hodnotou konstanty stability Fe^{3+} komplexů. Nejvíce podléhal statickému zhášení vzorek HK po komplexaci s Cu^{2+} ionty, kde fluorescenční záření může být zhášeno až z 91 %. Zhaovi a spol. [139] se podařilo zjistit, že ionty těžkých kovů o stejné valenci, především Fe^{3+} a Al^{3+} soupeří o vazebná místa v HL. Obdobných výsledků bylo dosaženo v práci Merdyho a spol. [150], který se zabýval studiem půdní organické hmoty po komplexaci s Cr^{3+} , Cu^{2+} a Pb^{2+} ionty. Z naměřených dat zjistil, že konstanty stability (adsorpčních koeficientů) klesají v následujícím pořadí $\text{Cu}^{2+} > \text{Cr}^{3+} > \text{Pb}^{2+}$.

Rovněž poukázal na fakt, že příslušné ionty jsou silněji sorbovány na půdní organickou hmotu, která se nachází v nižších vrstvách půdního profilu. To znamená, že se v nižších vrstvách půdního profilu nacházejí “starší” více humifikované HL, jejichž molekuly obsahují více aromatických struktur s kyselými funkčními skupinami. Lu a spol. [151] se ve své práci zabýval sorpcí Hg^{2+} iontů na DOM. Autorům se podařilo zjistit, že fluorescenční záření DOM je efektivně zhaseno jejich komplexací s těmito ionty. Vzorky DOM byly charakterizovány konstantou stability ($\log K$) Hg^{2+} komplexů a hodnotou zhasení fluorescence f_a . Tyto parametry komplexace byly stanoveny pomocí modifikované *Stern-Volmerovy* rovnice tzv. lineární model. Hodnoty $\log K$ Hg^{2+} komplexů se nacházely v rozmezí 4,1–4,8. Subbiah a spol. [152] se zabýval studiem interakcí HK s povrchově aktivními látkami (CTAB – kationaktivní, SDS – anionaktivní a neionogenní – Triton X-100). V alkalickém prostředí jsou HL záporně nabitě polyelektrolity, a proto se očekávaly poměrně slabé intermolekulární interakce s anionaktivními a neionogenními povrchově aktivními látkami. Autorům se podařilo zjistit, že anionaktivní a neionogenní PAL nejsou schopny zhaset fluorescenci HK. Dále zjistili, že při dosažení kritické micelární koncentrace CTAB v roztoku HK dochází k úplnému zhasení fluorescence a k absenci daných fluorescenčních maxim v EEM spektrech. Tento pokles I_F je způsoben silnými intermolekulárními interakcemi mezi kladně nabitými molekulami CTAB a záporně nabitými “makromolekulami” huminových kyselin.

Obecně můžeme říci, že časově rozlišená fluorescenční spektrometrie nám poskytuje cenné informace o probíhajících procesech v excitovaných stavech molekul. Tato technika je založena na měření poklesů intenzit emise a anizotropie, kdy na základě těchto naměřených dat můžeme vyhodnotit doby života τ a jejich příslušné relativní amplitudy B . Musíme mít na paměti, že doba života excitovaného stavu τ silně závisí na okolním prostředí, a proto ji můžeme použít k určení fyzikálně-chemických vlastností rozpouštědla (tj. polaritě, pH, teploty, ...). Bohužel, problematice časově rozlišené fluorescence HL a DOM se věnuje jen velmi málo odborných publikací [118, 153–156].

Kumkemu a spol. [154] se podařilo zjistit, že HL pocházející z terestriálních přírodních matric mají tři doby života $\tau_1 < 1$ ns, $\tau_2 \approx 2\text{--}5$ ns a $\tau_3 \approx 8\text{--}14$ ns.

Periasama a spol. [82] se ve své práci zabývali interpretací časově rozlišených emisních spekter (TRES) a z nich vypočtených časově rozlišených přes plochu normalizovaných spekter (TRANES) β -naftolu a 2-[2-(4-*N,N*-diethyl-aminofenyl)thiazolo[4,5]chinoxalinu v systémech s odlišnou polaritou okolního prostředí. Autorům se podařilo zjistit, že až na některé výjimky dochází v TRES spektrech k poklesu intenzity fluorescence s rostoucím časem t_k . Tento pokles intenzity fluorescence může způsobit ztrátu pozorovaných změn ve tvaru a průběhu TRES spektra. Tento problém lze s výhodou řešit pomocí časově rozlišených přes plochu normalizovaných spekter (TRANES).

Autoři rovněž rozdělili TRES a TRANES spektra na základě pozorovaných změn v jejich morfologii tzn. tvaru, průběhu, přítomnosti isoemisních bodů aj.

V případě, kdy je pozorováno identické spektrum při všech zvolených časech ($0\text{--}t_k$) mluvíme o systému *typu A*, ve kterém je přítomen pouze jeden druh fluoroforu resp. emisní jednotky. V TRES spektrech dochází pouze ke kontinuálnímu poklesu intenzity fluorescence a jednotlivé emisní křivky ($0\text{--}t_k$) jsou v TRANES spektrech totožné.

Pokud v časovém intervalu $0\text{--}t_k$ dochází ke změně tvaru TRES spekter a v TRANES je identifikován tzv. *isoemisní bod* (tj. vlnová délka, při které se intenzita fluorescence v čase t_k

nemění), mluvíme o systému *typu B*, ve kterém jsou přítomny právě dvě na sobě nezávislé emisní jednotky.

Dále se autorům podařilo zjistit, že v případě emise tří a více na sobě nezávislých emisních jednotek (*typ C*) jsou v časově rozlišených přes plochu normalizovaných spektrech přítomny isoemisní body, jejichž počet je o jednotku menší, než je počet druhů fluoroforů resp. emisních jednotek.

Jestliže dochází v TRES a TRANES spektrech k nepřetržitému posunu emisního maxima v časovém intervalu $0-t_k$, který je obvykle následovaný isoemisním bodem v čase $t > t_k$ mluvíme o fluorescenčním systému *typu D*, který v prvním časovém intervalu indikuje přítomnost kontinua druhů fluoroforu a v intervalu vymezeným časem $t > t_k$ poukazuje na přítomnost dvou na sobě nezávislých emisních jednotek.

Posledním případem diskutovaným v této práci je situace, při které dochází ke kontinuálnímu posunu emisního maxima s časem (*typ E*). Tento typ TRANES spektra poukazuje na přítomnost kontinua druhů fluoroforu.

Koti a spol. [80] se ve své práci zabývali studiem populační heterogenity použitých fluorescenčních sond v lipidových dvojvrstvách L- α -fosfatidylcholinu. Autorům se podařilo zjistit, že TRES a TRANES spektra jsou vhodnými experimentálními technikami, kterými je možno sledovat polaritu a viskozitu mikroprostředí kolem excitovaných fluoroforů v lipidových dvojvrstvách.

Tiseanovi a spol. [158] se pomocí TRES a TRANES spekter podařilo určit distribuci terbia v hydratovaných a kalcinovaných mikromezoporézních zeolitech.

Velmi dobrá review, která se věnují problematice TRES a TRANES spekter, představují reference [80–81].

3.4 ^{13}C spektrometrie nukleární magnetické resonance HL a DOM

^{13}C spektrometrie nukleární magnetické resonance resp. ^{13}C NMR spektrometrie s Fourierovou transformací je považována za základní a nepostradatelnou metodu studia struktury HL a DOM pocházejících z odlišných přírodních matic [159]. ^{13}C NMR spektrometrie v kapalně fázi (liquid state) se vyznačuje vyšší rozlišovací schopností, rozsáhlým počtem publikovaných prací týkajících se ^{13}C NMR spekter HL a DOM, požadavkem malého množství vzorku 3–5 mg a především možností spojení ^{13}C NMR s dalšími technikami (LC/NMR, LC/NMR/MS, HPLC/NMR a HPLC/NMR/MS). ^{13}C spektrometrie nukleární magnetické resonance nám poskytuje cenné informace o struktuře, chemických a biologických vlastnostech HL a DOM, jejich heterogenitě, přítomnosti a prostorovém uspořádání funkčních skupin, podílu aromatických fragmentů ligninu, sacharidových, peptidových a alifatických jednotek, stupni humifikace a “kondenzace” aromatických struktur aj. [160].

V některých případech komplikuje interpretaci ^{13}C NMR spekter HL tzv. rozšíření signálu, které je způsobeno přítomností paramagnetických iontů (nejčastěji Fe^{3+} a Mn^{2+}) nebo nehomogenitou rozpuštěného vzorku HL resp. DOM [161]. Z tohoto důvodu je nutné mít na zřeteli, že ^{13}C NMR spektrometrie klade vysoké nároky na čistotu a rozpustnost HL a DOM.

^{13}C NMR spektrum HL, případně vzorků DOM můžeme rozdělit na čtyři základní oblasti, které jsou charakteristické pro jednotlivé strukturní jednotky resp. funkční skupiny HL: oblast alifatických atomů uhlíku (0–45 ppm), oblast *O*-alkylových a peptidových atomů uhlíku (45–110 ppm), oblast aromatických a fenolických atomů uhlíku (110–160 ppm) a oblast karboxylových a karbonylových atomů uhlíku (160–200/230 ppm).

Pozice signálů v oblasti 0–45 ppm odpovídá absorpci alkanových uhlíků mastných kyselin a vosků. V ^{13}C NMR spektrech HL můžeme nalézt signál v oblasti ≈ 22 ppm, který odpovídá absorpci methylových funkčních skupin. Pozice signálů lokalizovaných v oblasti 20–60 ppm náleží absorpci proteinových struktur HL a DOM. V ^{13}C NMR spektrech HL můžeme rovněž nalézt signály v oblastech ≈ 27 , 31 a 40 ppm, které odpovídají absorpci methylenových funkčních skupin v alifatických strukturách HL. V této oblasti ^{13}C NMR spektra rovněž absorbují sloučeniny alkylfenolového typu. Pozice signálů v oblasti 60–90 ppm odpovídá absorpci polysacharidových jednotek. Signál lokalizovaný v oblasti ≈ 55 –58 ppm je obvykle připisován methoxy skupinám methylovaných sacharidů v hemicelulózách. V této oblasti ^{13}C NMR spektra můžeme rovněž nalézt signály ≈ 56 –62 ppm, které odpovídají absorpci α -uhlíku v aminokyselinách a methylenových funkčních skupin v aromatických strukturách ligninu. Intenzivní signál lokalizovaný v oblasti ≈ 72 ppm je obvykle připisován absorpci C-2, C-3 a C-5 uhlíku v celulóze. V ^{13}C NMR spektrech těchto látek můžeme rovněž nalézt signál v oblasti ≈ 105 ppm, který odpovídá absorpci C-1 uhlíku v celulóze. Pozice signálů lokalizovaných v oblasti 95–105 ppm jsou principiálně přisuzovány absorpci anomerních uhlíků v sacharidech. V oblasti ^{13}C NMR spektra ohraničeného chemickým posunem 62–80 ppm můžeme nalézt signály, které jsou připisovány různým alifatickým alkoholům a sacharidům. Aromatické strukturní jednotky HL resp. DOM jsou odvozeny od ligninu, který je tvořen monomerními jednotkami 4-hydroxycinnamylalkoholu, koniferylalkoholu a sinapylalkoholu. V oblasti aromatických a fenolických atomů uhlíku (110–160 ppm) můžeme nalézt tři intenzivní signály při hodnotách chemických posunů ≈ 115 , 130 a 145–150 ppm. Pozice signálu v oblasti ≈ 105 ppm odpovídá absorpci C-2 a C-6 atomů uhlíku v sinapylových tj. syringylových jednotek. V ^{13}C NMR spektrech HL resp. DOM můžeme rovněž nalézt signál v oblasti ≈ 130 ppm, který je obvykle připisován absorpci kvarterních aromatických uhlíků C-1. V této oblasti chemického posunu můžeme identifikovat i absorpci aromatických uhlíků pokud se však nacházejí v poloze *ortho* nebo *para* k *O*-substituovaným aromatickým uhlíků. Pozice signálů lokalizovaných v oblasti ≈ 145 –148 ppm jsou obvykle připisovány absorpci C-3 a C-5 uhlíků vázaných β -O-4 vazbou v sinapylalkoholových jednotkách. Rovněž v této oblasti chemického posunu můžeme nalézt absorpci C-3 a C-4 aromatických uhlíků v koniferylalkoholových jednotkách. Pozice signálů v oblasti 165–190 ppm odpovídá absorpci $-\text{COOH}$ resp. $-\text{COO}^-$ funkčních skupin v karboxylových kyselinách. V ^{13}C NMR spektrech HL resp. DOM můžeme rovněž nalézt signál v oblasti ≈ 190 –230 ppm, který je obvykle připisován absorpci karbonylových atomů uhlíku.

Velmi dobré review o této problematice poskytují reference [162–165].

Cenné informace o povaze HL resp. DOM je možné získat z tzv. *strukturních parametrů*, které jsou definovány jako poměry intenzit signálů, případně jako plochy pod křivkou při vhodně zvolených chemických posunech [166–172]. Tradičně se používá především koeficient α (f_a), který je znám jako *index aromaticity*. Tento strukturní parametr je definován jako poměr aromatických a fenolických atomů uhlíku (≈ 106 –165 ppm) ke všem atomům uhlíku (≈ 0 –165 ppm) vyjma karboxylových a karbonylových atomů ^{13}C . Podle Hatchera

a spol. [166] hodnota indexu aromaticity roste s molekulovou hmotností a stupněm humifikace HL. Terestriální HK mají zpravidla hodnoty α (f_a) vysoké ($\alpha > 0,5$), kdežto FK pocházející z pozemních přírodních matric jsou charakterizovány nižšími hodnotami indexu aromaticity ($\alpha < 0,5$).

Piccolo a spol. [167] definoval spojitost mezi navrhovaným strukturním parametrem BiA a biologickou účinností HL resp. HK. Parametr biologické aktivity (BiA) vychází z poměru obsahu biologicky účinných atomů uhlíku tj. aromatických fragmentů HL a karboxylových funkčních skupin (106–230 ppm) k biologicky inaktivním tj. alifatických a *O*-alkylových funkčních skupin (0–106 ppm). Obecně můžeme říci, že s rostoucí hodnotou indexu biologické aktivity BiA roste schopnost HL ovlivňovat biologické mechanismy v rozličných přírodních ekosystémech. Obdobných výsledků bylo dosaženo v práci Canellase a spol. [168].

Dalším strukturním parametrem, který je definován na základě ^{13}C NMR spekter HL a DOM, je index hydrofobnosti a hydrofilnosti (H_{fi}/H_{fo}). Tento koeficient je definován jako poměr obsahu uhlíkových atomů vázaných v C–O, C–N a *O*-, *N*-alkylových skupinách a atomů uhlíku, které tvoří hydrofobní část molekuly HL resp. DOM. Zvýšení obsahu alifatických a aromatických funkčních skupin vede k výraznému zvýšení signálu v oblasti chemických posunů 0–45 a 106–165 ppm a tím dochází ke snížení indexu hydrofobnosti a hydrofilnosti HL. Např. vyšší obsah polárních funkčních skupin se projeví vyššími hodnotami tohoto poměru. Novákovi a spol. [169] se podařilo zjistit, že půdní HL jsou zpravidla charakterizovány vyššími hodnotami H_{fi}/H_{fo} v porovnání s HK izolovanými z odlišných přírodních matric tj. leonardit, lignit, oxyhumolit, rašelina atd. Podrobně se monitoringu vlastností HL resp. DOM prostřednictvím uvedeného strukturního parametru věnují reference [170–172].

Huminové látky (HK a FK) a některé frakce DOM pocházející z terestriálních přírodních matric jsou principiálně charakterizovány vyšším obsahem aromatických jader, které jsou substituovány karboxylovými a fenolickými skupinami [159, 173]. Sladkovodní a mořské FK se obvykle vyznačují vyšším obsahem alifatických a hetero-alifatických funkčních skupin [174]. Podle mnohých autorů [175–177], kteří se zabývali studiem FK izolovaných z těchto přírodních matric můžeme v jejich struktuře nalézt majoritní podíl fragmentů mastných kyselin (*n*-C₁₂, *n*-C₁₄, *n*-C₁₆, *n*-C₁₇, *n*-C₁₈, *n*-C_{19–32}), vosků, peptidových (Arg., Asp., Glu., Gly., His., Ile., Leu., Thr., Tyr., aj.) a sacharidových (Gluc., Gal., Man., Fuk., Rha., Ara., Rib., Xyl., aj.) jednotek. Přítomnost těchto stavebních jednotek je typická pro FK, které se vyznačují nízkou molekulovou hmotností, vysokou molekulární heterogenitou, nízkým stupněm humifikace a “kondenzace” aromatického jádra.

Flaigovi a spol. [178] se podařilo určit, že lignin listnatých stromů je tvořen z jednotek koniferylalkoholu a sinapylalkoholu, zatímco lignin jehličnanů obsahuje převážně jednotky koniferylalkoholu. V případě ligninu trav je významněji zastoupen i *p*-kumarylalkohol. Dále zjistil, že v případě půdních HK může být této difference využito k predikci jejich původu a geneze.

4 CÍLE DISERTAČNÍ PRÁCE

Disertační práce je zaměřena na studium HL izolovaných z odlišných přírodních matric s ohledem na poznání jejich struktury a reaktivity. Pro studium HL, případně některých frakcí DOM, byly zvoleny především nedestruktivní analytické metody: molekulová absorpční spektrometrie v ultrafialové a viditelné oblasti (UV/Vis), infračervená spektrometrie s Fourierovou transformací (FTIR), ^{13}C spektrometrie nukleární magnetické rezonance (^{13}C NMR liquid state), ustálená (steady-state) a časově rozlišená fluorescenční spektrometrie.

UV/Vis spektra HL resp. DOM patří k nejlépe prostudovaným, a proto budou využity k základní charakterizaci těchto “biokoloidních” sloučenin. K tomuto účelu byly vybrány absorpční koeficienty E_4/E_6 , E_2/E_4 , E_2/E_3 , E_{254}/E_{410} , $\Delta \log K$, $E_{\text{ET}}/E_{\text{Bz}}$ a specifické hodnoty absorbancí A_{280} a $SUVA_{254}$. Dále bude využita infračervená spektrometrie s Fourierovou transformací, která poskytuje cenné informace o struktuře a povaze HL, jejich reaktivitě, prostorovém uspořádání funkčních skupin, podílu sacharidových a proteinových jednotek atd. V některých případech komplikují interpretaci infračervených spekter HL překrývající se pásy jednotlivých funkčních skupin. Tento problém bude řešen pomocí Fourierovy autodekonvoluce, případně metodou proložení křivky. Stacionární fluorescenční spektrometrie bude v disertační práci využita k identifikaci a lokalizaci jednotlivých fluorescenčních maxim, které nám poskytují komplexní soubor informací týkajících se původu, struktury, heterogenity, přítomnosti některých substituentů uplatňujících elektron-donorní a elektron-akceptorní efekt, stupně humifikace a “kondenzace” aromatických struktur HL a DOM. Po komplexaci HL s vybranými ionty těžkých kovů budou z emisních spekter pomocí Stern-Volmerovy rovnice vypočítány konstanty stability $[\text{HL}-\text{Me}^{\text{X}+}]$ komplexů, jež jsou základním kritériem posouzení sorpčních schopností těchto “biokoloidních” sloučenin. Poprvé je zde použita metoda tzv. časově rozlišených přes plochu normalizovaných fluorescenčních spekter (TRANES), ze kterých lze určit, zda pozorovaná emise HL resp. DOM pochází ze dvou či více emisních jednotek, nebo pouze z jedné. V neposlední řadě bude v této disertační práci použita ^{13}C spektrometrie nukleární magnetické rezonance v kapalně fázi (^{13}C NMR liquid state), která nám poskytuje cenné informace o struktuře, chemických a biologických vlastnostech HL resp. DOM, jejich heterogenitě, přítomnosti reaktivních a biologicky aktivních funkčních skupin (karboxylových, -OH fenolických, aromatických fragmentů ligninu aj.) stupni humifikace a “kondenzace” aromatických stavebních jednotek. Z naměřených ^{13}C NMR spekter budou vypočteny tzv. *strukturní parametry* HL, které jsou nepostradatelnými indikátory aromaticity, biologické aktivity, stupně hydrofilnosti a hydrofobnosti těchto unikátních “biokoloidních” sloučenin.

5 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

5.1 Zdroje huminových látek

Předmětem studia této disertační práce byly HL extrahované z odlišných přírodních matric. Ve většině experimentů byly používány HL izolované z lignitu, půdy, rašeliny a extraktu hnědé mořské řasy. Lignitická HK (JMLHK) byla izolována z jihomoravského lignitu (lokalita důl Mír, Mikulčice u Hodonína, Česká republika). Půdní HL (P1HK, P2HK a PFK) byly extrahovány metodou alkalické extrakce z lesní půdy *Humic Podzol* (lokalita Krkonoše, Česká republika). Zdrojovou matricí rašeliništních HL (JČRHK a JČRFK) byla jihočeská rašelina těžená v povrchovém dolu v Branné, poblíž Třeboně v České republice. AHK byla izolována z extraktu hnědé mořské řasy *Ascophyllum nodosum*, který je znám pod komerčním označením *SWE Acadian*.

Půdní a rašeliništní HL byly izolovány na pracovišti Biologického centra AV ČR v Českých Budějovicích pod odborným vedením Dr. Nováka.

5.1.1 Další zdroje huminových látek

S ohledem na poznání struktury a reaktivity těchto “biokoloidních” sloučenin byly v této disertační práci použity i standardy HL tzn. Leonardite HK, Elliott Soil HL a Pahokee Peat HL. Zdrojovou matricí standardu Leonardite HK (LEOHK) je zoxidované hnědé uhlí (leonardit) těžené v povrchovém dolu Gascoyne, poblíž Bowman County v Severní Dakotě, USA. Standardy půdních HL (ESHK a ESFK) jsou izolovány z úrodné prérijní půdy Elliott Soil (lokalita Joliet, Illinois, USA). Standardy rašeliništních HL (PPHK a PPFK) jsou extrahovány z floridské rašeliny (lokalita NP Everglades, Florida, USA). Tyto vzorky standardů HL byly zakoupeny od Mezinárodní společnosti huminových látek (International Humic Substances Society – IHSS) již ve formě izolovaných preparátů. Bližší informace přináší reference [179].

5.2 Izolace huminových kyselin

Před upravený lignit byl pomlet v planetárním mlýnku při $400 \text{ ot} \cdot \text{min}^{-1}$ po dobu 15 min a následně byl separován síťováním. Pro vlastní izolaci lignitické HK byly využity frakce o velikosti částic $< 200 \mu\text{m}$. Takto připravený lignit byl následně vysušen v sušárně při teplotě $105 \text{ }^\circ\text{C}$ a následujících 24 hodin byl volně ponechán na vzduchu při laboratorní teplotě. Výsledná vlhkost jihomoravského lignitu se pak pohybovala kolem 9 hm. %.

Jihomoravský lignit byl dekalcinován $0,1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ roztokem HCl. Následně byla suspenze promyta dostatečným množstvím deionizované vody do úplného odstranění Cl^- iontů. Zkouška na přítomnost Cl^- iontů v roztoku supernatantu byla provedena $0,1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ roztokem AgNO_3 . Dekalcinovaný lignit byl extrahován směsí roztoků NaOH a $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 10 \text{ H}_2\text{O}$ o shodné koncentraci $0,1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Použitý poměr byl 30 g dekalcinovaného lignitu a 1 dm^3 extrakčního roztoku. Suspenze byla ponechána na rotační třepačce přes noc tj. ≈ 12 hodin. Supernatant obsahující extrahované HL byl oddělen od pevného podílu odstředěním na centrifuze při 4000 RPM. Tento roztok byl okyselen 20% roztokem HCl na hodnotu $\text{pH} < 2$. Při takto nízké hodnotě pH dochází ke koagulaci HK z roztoku supernatantu. Vysrážené HK byly od roztoku FK a nízkomolekulárních organických

látek odděleny odstředěním na centrifuze při shodných parametrech centrifugace tj. 4000 RPM, $t_c \approx 20$ min a $T \approx 283,15$ K. Takto získaný gel HK byl purifikován směsí roztoků minerálních kyselin HCl a HF o koncentraci 0,5 obj. %. Suspenze byla ponechána na rotační třepače po dobu 48 hodin. Po uplynutí této doby byl pevný podíl HK oddělen od purifikačního roztoku odstředěním na centrifuze za pozměněných podmínek centrifugace (tzn. při nižší teplotě centrifugačního prostoru $T \approx 278,15$ K, při které významně klesá rozpustnost HK). Gel HK byl převeden do dialyzačních membrán o velikosti pórů 1000 Da a dialyzován proti ultra-čisté vodě do úplného odstranění Cl^- a F^- iontů. I v tomto případě byly během tohoto purifikačního procesu prováděny zkoušky na přítomnost těchto iontů v dialyzačním médiu. V případě negativní zkoušky na přítomnost Cl^- a F^- iontů v dialyzačním roztoku byly HK vymrazeny a následně lyofilizovány.

Obdobnou metodou alkalické extrakce byly izolovány HK z extraktu hnědé mořské řasy *Ascophyllum nodosum*. Tento přírodní extrakt NOM je běžně znám pod komerčním označením SWE Acadian. Bližší informace o extrakci HL z těchto přírodních matric přináší reference [7].

5.3 Použité metody a techniky

- lyofilizátor (lyofilizační stanice Bench Top 4K ZL, VirTis)
- elementární analýza (EA3000, CHNS-O elementární analyzátor EuroVector)
- termogravimetrická analýza (TGA Q5000 termogravimetrický analyzátor TA Instruments)
- UV/Vis spektrometrie (Hitachi U3900H, Hitachi High Technologies America, Inc)
- FTIR spektrometrie (Nicolet iS50, Thermo Fisher Scientific, Inc)
- stacionární, polarizovaná fluorescenční spektrometrie (FluoroLog[®], Horiba Jobin Yvon Scientific, Inc)
- časově rozlišená fluorescenční spektrometrie (FluoroCube[®], Horiba Jobin Yvon Scientific, Inc)

5.3.1 Analýza rozpuštěného organického uhlíku (DOC)

Stanovení množství rozpuštěného organického uhlíku vzorků HL bylo provedeno pracovištěm Vodohospodářských laboratoří Povodí Moravy v Brně.

5.3.2 Elementární analýza

Elementární složení vzorků HK izolovaných z jihomoravského lignitu a extraktu hnědé mořské řasy *Ascophyllum nodosum* bylo zjištěno pomocí CHNS-O elementárního analyzátoru EA3000. Kalibrace elementárního analyzátoru byla provedena pomocí standardní látky *N*-fenylethanamidu (Acetanilidu). Navážené vzorky HK byly spáleny v atmosféře kyslíku při pracovní teplotě reaktoru 980 °C. V okamžiku spalování vzorku je však tato teplota podstatně vyšší, v důsledku silně exotermní reakce oxidace kovového cínu na SnO_2 . Každý vzorek HK byl navážen ve třech opakováních. Elementární složení vzorků HK bylo zjištěno pomocí vyhodnocovacího programu *Callidus*TM 5.1.

Elementární analýza půdních a rašeliništních HL byla provedena na pracovišti Biologického centra AV ČR v Českých Budějovicích.

Všechny vzorky HL použité v této disertační práci byly termogravimetricky analyzovány na TGA Q5000. Vzorky HL o navážce ≈ 5 mg byly spáleny z laboratorní teploty na konečnou teplotu $1000\text{ }^\circ\text{C}$ v atmosféře vzduchu s průtokem $50\text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ a s rychlostí ohřevu pece $10\text{ }^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$. Ze získaných experimentálních dat byl následně určen obsah nespalitelného podílu tj. popela a celkové vlhkosti HL.

5.3.3 UV/Vis spektrometrie

Molekulová absorpční spektrometrie v ultrafialové a viditelné oblasti (UV/Vis) je stále běžně používanou technikou při studiu HL, a proto byla použita v této disertační práci k primární charakterizaci těchto “biokoloidních” sloučenin. Na základě provedené literární rešerše byly k tomuto účelu vybrány tyto absorpční koeficienty a specifické absorbance E_4/E_6 , E_2/E_4 , E_2/E_3 , E_{254}/E_{410} , $\Delta\log K$, E_{ET}/E_{Bz} , A_{280} a $SUVA_{254}$, které jsou definovány jako poměry absorbancí při vhodně zvolených vlnových délkách, případě jako hodnoty absorbance při různých λ_{Abs} .

Pro účely charakterizace použitých HL pomocí absorpčních koeficientů E_4/E_6 a $\Delta\log K$ byly připraveny roztoky HL o koncentraci $100\text{ mg}\cdot\text{dm}^{-3}$ v $0,05\text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ roztoku NaHCO_3 . Tyto absorpční koeficienty jsou silně závislé na hodnotě pH, a proto bylo pH těchto solů upraveno $0,01\text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ roztokem NaOH na finální hodnotu pH 8,00–8,07.

V případě absorpčních koeficientů E_2/E_4 , E_2/E_3 , E_{254}/E_{410} a E_{ET}/E_{Bz} byly připraveny soly HL o hmotnostní koncentraci $10\text{ mg}\cdot\text{dm}^{-3}$ v $0,01\text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ roztoku $\text{CH}_3\text{COONa}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$. Jako v předchozím případě bylo pH těchto vzorků upraveno $0,01\text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ roztokem HCl na konečnou hodnotu pH 7,00–7,11.

Za účelem studia HL pomocí specifických absorbancí byly připraveny jejich roztoky o koncentraci $10\text{ mg}\cdot\text{dm}^{-3}$ ve standardním fosfátovém pufru (směs $\text{Na}_2\text{HPO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ a $\text{NaH}_2\text{PO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ v poměru 0,61:0,39) o koncentraci $0,05\text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ a hodnotě pH 7,05.

Takto připravené roztoky HL byly změřeny na UV/Vis spektrometru Hitachi U3900H v rozmezí vlnových délek 200–900 nm v křemenné kyvetě SUPRASIL[®] s optickou dráhou 1 cm.

Podrobně se monitoringu vlastností HL prostřednictvím uvedených absorpčních koeficientů a specifických absorbancí věnují reference [83–95].

5.3.4 FTIR spektrometrie

Infračervená spektrometrie (IR), resp. infračervená spektrometrie s Fourierovou transformací (FTIR) poskytuje cenné informace o struktuře a povaze HL, jejich reaktivitě, obsahu jednotlivých funkčních skupin, a proto byla využita v této disertační práci k základnímu screeningu těchto “biokoloidních” látek. Jak již bylo diskutováno v kapitole 3.2 při použití “klasické” metody (tj. lisování HL v přítomnosti KBr) může docházet k dekarboxylaci kyselých funkčních skupin, případně jejich deprotonizaci. Z tohoto důvodu byla v této práci použita metoda difuzního odrazu, v odborné literatuře označována jako DRIFTS – *Diffuse Reflectance Infrared Fourier Transform Spectroscopy*.

Práškové vzorky HL byly připraveny k měření DRIFT spekter podle následujícího postupu [180]. V achátové třecí misce bylo rozetřeno 200 mg vyžíhaného KBr . K tomuto množství bromidu draselného bylo přidáno 1–2 mg vzorku HL a následně byla tato směs důkladně

homogenizována. Takto připravený vzorek HL byl vložen do nástavce difuzně-reflexní jednotky. Následně byla upravena poloha vzorkovací pánvičky v DRIFTS cele k maximální optimalizaci infračerveného záření dopadajícího na detektor FTIR spektrometru. Difuzně-reflexní FTIR spektra HL byly měřeny na FTIR spektrometru Nicolet iS50 vybaveném DRIFTS nástavcem SpectraTech model 0002–395 v rozmezí vlnočtů $4000\text{--}400\text{ cm}^{-1}$ se spektrálním rozlišením 4 cm^{-1} a s celkovým počtem akumulovaných záznamů (No. of scans) 256. Naměřená DRIFT spektra vzorků HL byla převedena pomocí softwaru OMNIC 9.0 na jednotky *Kubelka-Munk* (KM) odpovídající jednotkám absorbance při transmisním měření. V oblasti “otisku palce” tzv. fingerprintu ($1500\text{--}400\text{ cm}^{-1}$) komplikují interpretaci infračervených spekter HL překrývající se pásy jednotlivých funkčních skupin. Tento problém byl v této disertační práci řešen pomocí Fourierovy autodekonvoluce (FSD – Fourier self-deconvolution). Analýza FSD spekter v oblasti $1800\text{--}600\text{ cm}^{-1}$ byla provedena pomocí vyhodnocovacího programu OMNIC 9.0 Version 0.535. Velmi dobrá review týkající se této problematiky přinášejí reference [110, 181–183].

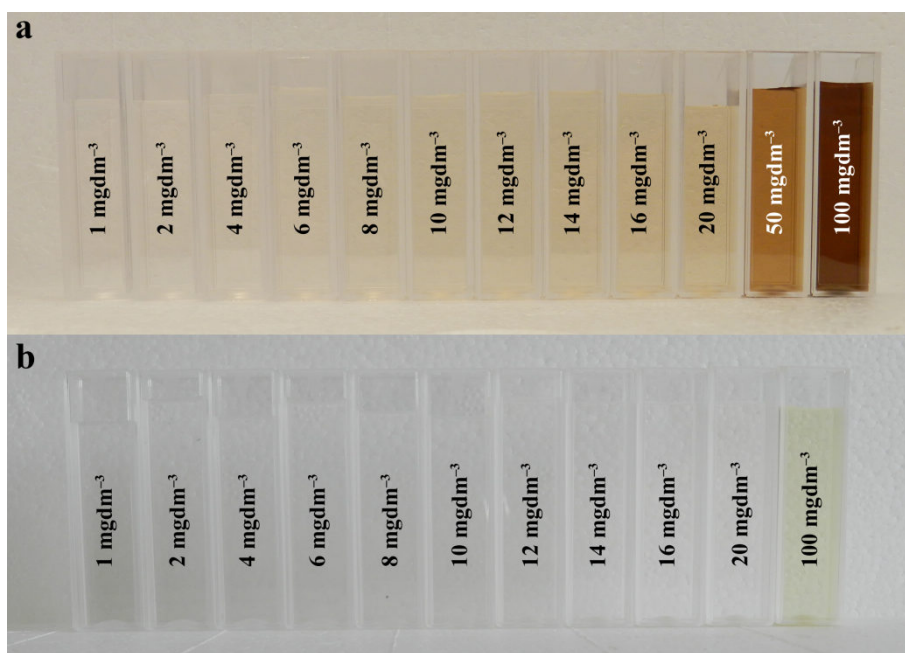
5.3.5 Ustálená fluorescenční spektrometrie

Vnitřní filtrační efekt

Hlavní myšlenkou této části disertační práce bylo ověřit a otestovat robustnost použití běžně používaného korekčního vztahu navrženého Lakowiczem v oblasti studia HL pomocí ustálené (steady-state) fluorescenční spektrometrie. Jak již bylo uvedeno v kapitole 3.3 je problematika vnitřního filtračního efektu prvního a druhého druhu roztoků HL mnohými autory opomíjena a přehlížena, a proto se ve svých odborných pracích dopouštějí nepřesné interpretace naměřených experimentálních dat. Je zřejmé, že vnitřní filtrační efekt (IFE – *inner filter effect*) ovlivňuje nejen výslednou intenzitu fluorescence HL, ale i polohu jejich fluorescenčních maxim případně vypočtené hodnoty fluorescenčních indexů, kterými jsou HL studovány. Závěry této kapitoly sloužily rovněž k optimalizaci hmotnostní koncentrace roztoků HL použitých při ustálené a časově rozlišené fluorescenční spektrometrie.

Pro studium vnitřního filtračního efektu HL a jeho odstranění pomocí matematického aparátu navrženého Lakowiczem byly použity standardy půdních HL Elliott Soil tj. ESHK a ESKF. Za tímto účelem byly připraveny roztoky HL v rozmezí hmotnostních koncentrací $1\text{--}20\text{ mg}\cdot\text{dm}^{-3}$ ve standardním fosfátovém pufru (směs $\text{Na}_2\text{HPO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ a $\text{NaH}_2\text{PO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ v poměru 0,61:0,39) o koncentraci $0,05\text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ a hodnotě pH 7,02–7,13. Takto připravené roztoky standardů ESHL byly změřeny na UV/Vis spektrometru Hitachi U3900H v rozmezí vlnových délek $200\text{--}900\text{ nm}$ v křemenné kyvetě SUPRASIL[®] s optickou dráhou 1 cm. Z naměřených UV/Vis spekter roztoků HL byly odečteny hodnoty absorbancí při vhodně zvolených vlnových délkách, ze kterých byly následně sestrojeny kalibrační křivky (Obr. 14 v kapitole 6.4.1). Jelikož průběh UV/Vis spekter HL obvykle nevykazuje zjevné maxima, byly pro ověření lineárního průběhu koncentrační řady těchto sloučenin zvoleny hodnoty absorbancí při vlnových délkách odvozených od absorpčních koeficientů a specifických hodnot absorbancí, tak aby došlo k co nejširšímu pokrytí UV/Vis spektra těchto “biokoloidních” sloučenin. Shodné vlnové délky byly použity i při studiu IFE prvního a druhého druhu a jeho odstranění v excitačních fluorescenčních spektrech standardů HL. Za účelem studia IFE byly takto připravené soly HL změřeny na steady-state fluorescenčním spektrometru Horiba FluoroLog[®] s nastavenou šířkou štěrbin excitačního a emisního monochromátoru 5 nm v křemenné kyvetě SUPRASIL[®] pro fluorimetrii s optickou dráhou

1 cm. Emisní fluorescenční spektra roztoků ESHL byla změřena v rozsahu vlnových délek 380–600 nm při konstantní vlnové délce budícího záření 360 nm. Excitační fluorescenční spektra těchto sloučenin byla pořízena v rozsahu vlnových délek 240–600 nm při konstantní vlnové délce emise 520 nm. Vnitřní filtrační efekt roztoků HL byl korigován pomocí matematického aparátu navrženého Lakowiczem (rovnice č. 19, kapitola 2.2.11). Prezentované výsledky vždy představují průměrné hodnoty ze tří nezávislých opakování. Směrodatné odchylky (σ) reprezentované chybovými úsečkami nepřevyšují velikost použitých symbolů v příslušných grafech, a proto nejsou v těchto IFE grafech prezentovány.



Obr. 8: Koncentrační řady roztoků půdních HL; a) standard huminové kyseliny *Elliott Soil*; b) standard fulvinové kyseliny *Elliott Soil*

Ustálená fluorescenční spektrometrie

Podstatná část této disertační práce je věnována studiu HL pomocí ustálené (steady-state) fluorescenční spektrometrie. Hlavní ideou této kapitoly bylo navrhnout a následně provést pilotní experimenty, které by vedly k detailnější charakterizaci těchto biokoloidních sloučenin s ohledem na poznání jejich původu resp. geneze, jednotlivých strukturních jednotek, množství substituentů uplatňujících elektron-donorní a elektron-akceptorní efekt, obsahu reaktivních funkčních skupin (–COOH a fenolické –OH), heterogenity, stupně humifikace a “kondenzace” aromatických struktur aj. Jak již bylo uvedeno dříve (kapitola 3.3), stacionární fluorescenční spektrometrie představuje vhodnou metodou studia a charakterizace HL pocházejících z rozličných přírodních matic.

Za účelem studia a charakterizace použitých HL pomocí ustálené fluorescenční spektrometrie byly připraveny jejich roztoky o hmotnostní koncentraci 10 mg·dm⁻³ ve standardním fosfátovém pufru (směs Na₂HPO₄ 2H₂O a NaH₂PO₄ 2H₂O v poměru 0,61:0,39) o koncentraci 0,05 mol·dm⁻³ a hodnotě pH 7,00–7,18. Takto připravené soly HL byly změřeny na steady-state fluorescenčním spektrometru Horiba FluoroLog[®] s nastavenou šířkou štěrbin excitačního a emisního monochromátoru 5 nm v křemenné kyvetě SUPRASIL[®] pro fluorescenční spektrometrii s optickou dráhou 1 cm. Teplota cely s kyvetou byla během měření veškerých fluorescenčních spekter udržována na konstantní hodnotě 20±1 °C pomocí

oběhového termostatu NeslabTM RTE7 Digital Plus, Thermo Scientific. Emisní fluorescenční spektra roztoků HL připravených podle předešlého postupu byla změřena v rozsahu vlnových délek 380–600 nm při konstantní vlnové délce excitačního záření 360 nm. Při měření excitačních spekter těchto “biokoloidních” sloučenin byl emisní monochromátor nastaven na 520 nm. Tyto fluorescenční spektra byla měřena v rozsahu vlnových délek 300–500 nm. V těchto mono-dimensionálních fluorescenčních spektrech byly sledovány pozice fluorescenčních maxim a jejich intenzit. Z důvodu lepší orientace a lokalizace příslušných fluorescenčních maxim byla intenzita fluorescence HL normalizována ve vyhodnocovacím programu OriginPro Version 8.0. Excitačně-emisní fluorescenční spektra (EEM – *Excitation Emission Matrix*) solí HL byla změřena v rozsahu vlnových délek emisní osy 300–600 nm a v rozsahu vlnových délek excitační osy 240–550 nm. Mapování EEM fluorescenčních spekter všech vzorků HL proběhlo při shodném nastavení kroku měření emise a excitace 5 nm. Jak již bylo diskutováno dříve (kapitola 3.3), v EEM spektrech vodných roztoků můžeme pozorovat Rayleighův a Ramanův rozptyl světla. Tyto rozptylové artefakty byly potlačeny případně odstraněny odečtením EEM spektra blanku tj. ultra-čisté vody od naměřených spekter těchto “biokoloidních” sloučenin. Z naměřených experimentálních dat byly vytvořeny matice, ze kterých byly následně vymodelovány konturové mapy (contour maps) vzorků HL pomocí vyhodnocovacího softwaru OriginPro 8.0.

Cenné informace o původu, genezi, humifikaci aj. HL je možné získat z tzv. *fluorescenčních koeficientů*, které jsou definovány jako poměry intenzit fluorescence, eventuálně jako plochy pod křivkou při vhodně zvolených vlnových délkách emise, a proto byly použity v této disertační práci k základní charakterizaci těchto “biokoloidních” sloučenin. Na základě provedené literární rešerše byly k tomuto účelu vybrány tyto fluorescenční koeficienty *FI*, *BIX*, *HIX* a v neposlední řadě i *Milori index*. Za účelem studia a charakterizace použitých HL pomocí těchto fluorescenčních koeficientů byly připraveny jejich roztoky o hmotnostní koncentraci $10 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ ve standardním fosfátovém pufru o koncentraci $0,05 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ a hodnotě $\text{pH} \approx 7$.

Fluorescenční index (*FI*) byl získán z emisních spekter HL jako poměr intenzit fluorescence při vlnových délkách emise 450 a 500 nm. Tyto emisní fluorescenční spektra byla měřena v rozsahu vlnových délek 390–600 nm při konstantní vlnové délce excitačního záření 370 nm.

Obdobným způsobem byl obdržen i fluorescenční koeficient *BIX*, který je definován jako poměr I_F při emisních vlnových délkách 380 (fluorofor typu *M*) a 430 nm (fluorofor typu *C*). Za tímto účelem byly změřeny fluorescenční spektra roztoků HL v rozmezí vlnových délek emise 330–600 nm při konstantní vlnové délce budícího záření 310 nm.

Fluorescenční koeficient podle Zsolnaye (*HIX*) byl získán z poměru ploch emisního spektra HL, kde příslušné plochy A_1 a A_4 jsou vypočteny jako plošné integrály v rozmezí vlnových délek 435–480 nm (plocha A_4) a 300–345 nm (plocha A_1). K tomuto účelu byly změřeny emisní fluorescenční spektra připravených solí HL v rozmezí vlnových délek emise 280–600 nm. Při měření těchto fluorescenčních spekter byl excitační monochromátor nastaven na pozici 254 nm.

Podobným způsobem byl opatřen i *Milori index*, který je definován, jako plošný integrál pod celým emisním spektrem HL. Tyto fluorescenční spektra vzorků HL použitých v této

disertační práci byly změřeny v rozsahu vlnových délek 460–650 nm při konstantní $\lambda_{\text{ex}} = 400$ nm.

Bližší informace o fluorescenčních koeficientech použitých v této disertační práci přináší reference [124–127].

Jako v předcházejících případech byly hodnoty fluorescenčních intenzit (I_F) korigovány pomocí matematického aparátu navrženého Lakowiczem [64] k odstranění IFE prvního a druhého druhu roztoků HL.

Zhášení fluorescence

Hlavní myšlenkou této kapitoly bylo provést pilotní experimenty zaměřené na proces komplexace ligandů HL s vybranými ionty těžkých kovů. Jak již bylo uvedeno dříve (kapitola 3.3), unikátní struktura HL, především přítomnost reaktivních funkčních skupin (–COOH a fenolické –OH) umožňuje vznik komplexů s celou řadou sloučenin zejména však s ionty těžkých kovů. Na základě provedené literární rešerše byly pro studium reaktivity HL, reprezentované konstantami stabilit komplexů [HL–Me^{X+}], vybrány ionty těžkých kovů Cu²⁺, Pb²⁺ a Hg²⁺. Za účelem studia efektivního zhášení fluorescence s Cu²⁺, Pb²⁺ a Hg²⁺ ionty byly zvoleny jako ligandy komplexace půdní HL izolované z úrodné půdy Elliott Soil tj. standardy IHSS ESHL.

V prvním kroku byly připraveny zásobní roztoky HL o hmotnostní koncentraci 30 mg·dm^{–3} v 1 mol·dm^{–3} roztoku KOH. Takto připravené soly HL byly zneutralizovány 1 mol·dm^{–3} roztokem HNO₃. Jak již bylo diskutováno dříve (kapitola 3.3), hodnota pH roztoků HL přímo ovlivňuje míru disociace Me^{X+} iontů v nefluoreskujícím komplexu [HL–Me^{X+}], a proto bylo pH těchto zásobních roztoků upraveno 0,1 mol·dm^{–3} roztokem KOH na finální hodnotu pH 6,35–6,37. Konečná koncentrace HL v zásobním roztoku s definovanou hodnotou pH byla 30 mg·dm^{–3}. V druhém kroku byly připraveny roztoky iontů těžkých kovů Cu(NO₃)₂, Pb(NO₃)₂ a Hg(NO₃)₂ v rozmezí molárních koncentrací 0–350 μM v 0,1 mol·dm^{–3} roztoku KNO₃. Následně byly připraveny roztoky systému HL–Me²⁺ o výsledné hmotnostní koncentraci ESHL 15 mg·dm^{–3} a látkové koncentraci iontů těžkých kovů 0–175 μM. Podrobnější informace ohledně přípravy komplexů HL přináší reference [147, 184].

Za účelem studia reaktivity HL byly takto připravené roztoky změřeny na stacionárním fluorescenčním spektrofotometru Horiba FluoroLog[®] s nastavenou šířkou štěrbin obou monochromátorů 5 nm v křemenné kyvetě SUPRASIL[®] pro fluorimetrii s optickou dráhou 1 cm. Jako v předchozích případech byla teplota cely s kyvetou během měření všech emisních spekter udržována na konstantní hodnotě 20±1 °C pomocí oběhového termostatu Neslab[™] RTE7 Digital Plus, Thermo Scientific.

Rovněž i v tomto případě byly hodnoty I_F korigovány podle Lakowicze [64] pro odstranění IFE HL.

Z naměřených experimentálních dat byly pomocí upravené Stern-Volmerovy rovnice získány parametry komplexace ESHL s Cu²⁺, Pb²⁺ a Hg²⁺ ionty. Pro vlastní výpočet parametrů komplexace byla použita Stern-Volmerova rovnice v upraveném tvaru:

$$\frac{F_0}{\Delta F} = \frac{F_0}{(F_0 - F)} = \frac{1}{f_a K_a [Me^{2+}]} + \frac{1}{f_a}. \quad (33)$$

Po vynesení závislosti poměru $\frac{F_0}{\Delta F}$ na převrácené hodnotě molární koncentrace zhášeče tj. iontu Me^{2+} musíme dospět k lineární závislosti vnesených experimentálních dat. Pokud body vnesené závislosti leží na přímce, tak tato přímka vymezuje na ose y úsek, který náleží hodnotě $\frac{1}{f_a}$ (převrácená hodnota části počáteční fluorescence, která je schopna podlehnout statickému zhášení). Hodnotu konstanty stability komplexu $[\text{HL}-\text{Me}^{2+}]$ pak můžeme určit ze směrnice této přímky $\frac{1}{f_a K_a [\text{Me}^{2+}]}$.

Velmi dobrá review týkající se vyhodnocení experimentálních dat pomocí lineárního modelu Stern-Volmerovy rovnice přináší reference [185–186].

5.3.6 Časově rozlišená fluorescenční spektrometrie

Významná část této disertační práce byla věnována studiu HL pomocí časově rozlišené fluorescenční spektrometrie. Hlavní myšlenkou této kapitoly bylo otestovat a následně zavést nové metody studia HL, které by vedly k detailnějšímu pochopení kvantově-mechanických procesů probíhajících v excitovaných stavech těchto “biokoloidních” sloučenin. Jak již bylo diskutováno dříve (kapitola 3.3), problematice časově rozlišené fluorescence HL se doposud věnuje jen velmi málo odborných publikací, a proto se pokusíme v této disertační práci o maximální využití potenciálu, který je v oblasti studia a charakterizace HL resp. DOM stále ne plně využit. K tomuto účelu byla na základě provedené literární rešerše vybrána metoda měření časově rozlišených emisních spekter (TRES – *Time Resolved Emission Spectra*), ze kterých byly následně pomocí normalizace plochy pod křivkou TRES spekter zkonstruovány tzv. časově rozlišené přes plochu normalizované emisní spektra (TRANES – *Time Resolved Area Normalized Emission Spectra*). Rovněž byla v této práci použita metoda dekonvoluce steady-state emisních spekter pomocí zjištěných relativních zastoupení příslušných dob života (τ_i) při daných vlnových délkách. Takto bylo steady-state fluorescenční spektrum studovaných HL rozděleno na jednotlivá spektra přítomných emisních jednotek resp. druhů.

Teoretické podrobnosti o použití TRES a TRANES v oblasti studia směsí fluoroforů přináší reference [78, 80–82, 187].

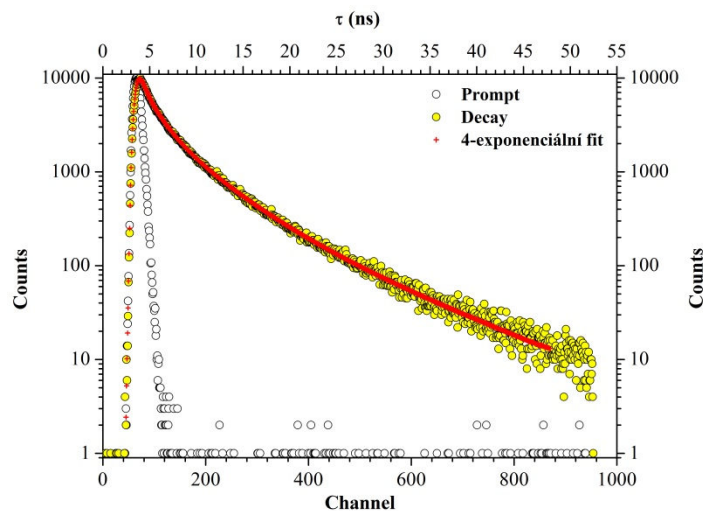
Za účelem studia HL pomocí časově rozlišené fluorescenční spektrometrie byly připraveny jejich roztoky o hmotnostní koncentraci $10 \text{ mg}\cdot\text{dm}^{-3}$ ve standardním fosfátovém pufru o koncentraci $0,01 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ a hodnotě pH 7,00–7,10. Takto připravené soly HL byly změřeny na časově rozlišeném fluorescenčním spektrometru Horiba FluoroCube[®] pracujícím na základě metody TCSPC s nastavenou šířkou šterbiny emisního monochromátoru 4–8 nm v křemenné kyvetě SUPRASIL[®] pro fluorescenční spektrometrii s optickou dráhou 1 cm. Měření poklesů intenzit fluorescence roztoků HL probíhalo v tzv. reverzním módu (viz. kapitola 2.2.6). Rozsah *time-to-amplitude convertor* (TAC) byl nastaven na hodnotu 50 ns s celkovým počtem kanálu 1024. Zpoždění signálu (*coaxial delay*) bylo v tomto případě nastaveno na 65 ns a hodnota synchronizačního zpoždění (*sync. delay*) byla ponechána v předvolené velikosti tj. 0 ns. Pro excitaci solů HL byla použita nanoLED dioda o vlnové délce budícího záření 329 nm s šířkou pulzu 1,2 ns a opakovací frekvencí 1 MHz. K získání kvalitního poklesu intenzity fluorescence HL tj. počet fotonů v maximu poklesu, byla hodnota *peak pre-set* nastavena na 10 000 counts. Teplota cely s kyvetou byla během měření veškerých fluorescenčních spekter udržována na konstantní hodnotě 20 ± 1 °C pomocí oběhového termostatu NesLab Haake A25, Thermo Scientific. Signál nanoLED diody tzv.

prompt byl stanoven pomocí koloidního roztoku křemíku známého pod komerčním označením LUDOX[®] Sigma Aldrich s emisním monochromátorem nastaveným na vlnovou délku použité diody tj. 329 nm.

V případě všech vzorků HL byly poklesy intenzit fluorescence měřeny s krokem 5 nm napříč celým emisním spektrem tzn. v rozmezí vlnových délek emise 390–600 nm při konstantní vlnové délce použité *nanoLED* diody 329 nm. Tyto poklesy intenzit fluorescence HL byly obdrženy pomocí softwaru DataStation Version 2.4. K analýze experimentálních TCSPC dat byl použit vyhodnocovací program DAS6 – *Fluorescence Decay Analysis Version* 6.0, který pracuje na principu metody vyhodnocení nelineárních nejmenších čtverců viz. kapitola 2.2.9. Naměřené poklesy intenzit fluorescence vzorků HL byly výhradně vyhodnoceny pomocí čtyř-exponenciálního modelu. Na tomto místě je velmi důležité zmínit, že při vyhodnocení poklesů intenzit fluorescence byla hodnota parametru redukované správnosti proložení $\chi_R^2 \leq 1,2$. Příklad vyhodnocení naměřených TCSPC experimentálních dat uvádí Obr. 9.

K získání časově rozlišených emisních spekter TRES resp. TRANES byly naměřeny steady-state fluorescenční spektra HL v rozsahu vlnových délek 390–600 nm při konstantní vlnové délce excitačního záření 329 nm.

Jako v předcházejících případech byly hodnoty fluorescenčních intenzit (I_F) korigovány pomocí matematického aparátu navrženého Lakowiczem [64] k odstranění IFE prvního a druhého druhu roztoků HL.



Obr. 9: Vyhodnocení naměřených TCSPC experimentálních dat standardu fulvinové kyseliny *Elliott Soil*

5.3.7 ¹³C spektrometrie nukleární magnetické resonance

¹³C NMR spektrometrie vzorků HL byla provedena na pracovišti Centrálních laboratoří NMR spektrometrie Vysoké školy chemicko-technologické v Praze pod odborným vedením doc. Hrabala.

Závěrečná část této disertační práce je věnována studiu a charakterizaci HL pomocí ¹³C NMR spektrometrie v roztoku. Tato technika je rovněž označována v odborné literatuře jako *liquid state* resp. ¹³C NMR LS. V této kapitole disertační práce si klademe za cíl

navrhnout a následně provést pilotní experimenty, které by vedly k podrobnějšímu poznání struktury, chemických a biologických vlastností těchto unikátních “biokoloidních” sloučenin.

Za tímto účelem byly připraveny roztoky HL o koncentraci 50–100 mg·cm⁻³ v 0,1 mol·dm⁻³ roztoku NaOD v D₂O. Takto připravené soly HL byly změřeny na ¹³C NMR spektrometru Bruker® Avance III 500 MHz s pracovní frekvencí 125,77 MHz, počtem akumulací na jedno spektrum 25 000, délkou excitačního pulsu 10,5 μs, akvizičním časem 0,52 s a s relaxační dobou mezi jednotlivými skeny 2,00 s. Pro potlačení nežádoucích deformací základní linie ¹³C NMR spekter HL byla použita metoda pulsní sekvence “ZRSEGPIG”.

Na základě provedené literární rešerše byly ¹³C NMR spektra HL integrovány v oblasti alifatických atomů uhlíku (0–45 ppm), *O*-alkylových a peptidových atomů uhlíku (45–106 ppm), aromatických a fenolických atomů uhlíku (106–165 ppm) a v oblasti karboxylových a karbonylových atomů ¹³C (165–220 ppm).

Dále byly HL použité v této disertační práci charakterizovány pomocí tzv. *strukturních parametrů*, které jsou definovány jako poměry intenzit signálů, případně jako plochy pod křivkou při vhodně zvolených chemických posunech.

Index aromaticity f_a (α) byl získán z ¹³C NMR spekter HL jako poměr aromatických a fenolických atomů uhlíku (\approx 106–165 ppm) ke všem atomům uhlíku (\approx 0–165 ppm) vyjma karboxylových a karbonylových atomů ¹³C. Tento strukturní parametr můžeme vypočítat podle rovnice:

$$f_a = \frac{I_{106-165}}{I_{0-165}}. \quad (34)$$

Obdobným způsobem můžeme získat z ¹³C NMR spekter HL tzv. *parametr biologické aktivity HL (BiA)*, který je dán rovnicí:

$$BiA = \frac{I_{106-230}}{I_{0-106}}, \quad (35)$$

kde $I_{106-230}$ představuje oblast aromatických fragmentů HL a karboxylových funkčních skupin, přičemž I_{0-106} náleží oblasti alifatických a *O*-alkylových funkčních skupin, které jsou biologicky inaktivní.

Strukturní parametr podle Piccola (H_{fi}/H_{fo}) byl obdržen z poměru obsahu uhlíkových atomů vázaných v C–O, C–N a *O*-, *N*-alkylových skupinách a atomů uhlíku, které tvoří hydrofobní část molekuly HL. Index hydrofobnosti a hydrofilnosti (H_{fi}/H_{fo}) je definován rovnicí:

$$\frac{H_{fi}}{H_{fo}} = \frac{I_{45-106} + I_{165-230}}{I_{0-45} + I_{106-165}}, \quad (36)$$

Bližší informace o ¹³C NMR strukturních parametrech přinášejí reference [166–172, 188].

6 VÝSLEDKY A DISKUZE

6.1 Elementární a DOC analýza huminových látek

S ohledem na publikované strukturní vzorce huminových látek, ať už jsme stoupenci “historického” polymerního nebo supramolekulárního vyjádření jejich struktury, musí být naše pozornost v případě elementární analýzy fokusována na obsah biogenních prvků tj. uhlíku, vodíku, dusíku, síry a v neposlední řadě i kyslíku, vzhledem k tomu, že tyto elementy tvoří majoritní část skeletu těchto unikátních “biokoloidních” sloučenin.

Veškeré HL použité v této disertační práci byly podrobeny základní charakterizaci pomocí elementární a Dissolved Organic Carbon – DOC analýzy. Naměřené výsledky elementárního složení, množství rozpuštěného organického uhlíku DOC a termogravimetrické analýzy určující obsah popela a celkové vlhkosti jsou uvedeny v Tab. 1.

Tab. 1: Elementární složení použitých HL (elementární složení vzorků HL jsou uvedena v *atom. %* a vztažena na suchý vzorek bez popela), obsah popela, celkové vlhkosti a rozpuštěného organického uhlíku DOC

vzorek HL	elementární složení v atom. %					DOC (mg·g _{HL} ⁻¹)	vlhkost (hm. %)	popel (hm. %)
	C	H	N	S	O			
LEOHK	48,29	33,37	0,80	0,22	17,33	(–)	7,91	2,13
JMLHK	43,73	32,79	0,65	(–)	22,83	748	7,21	3,62
ESHK	44,40	33,49	2,71	0,13	19,27	(–)	6,20	0,99
P1HK	32,07	38,29	2,56	(–)	26,77	532	5,02	17,19
P2HK	37,44	42,86	1,11	(–)	18,59	612	5,61	1,37
PPHK	42,74	34,51	2,40	0,20	20,15	(–)	6,95	1,03
JČRHK	39,31	38,01	1,36	0,13	21,19	780	5,89	4,78
AHK	34,99	42,42	1,33	(–)	21,26	636	6,10	0,28
ESFK	37,01	37,66	2,37	0,25	22,71	(–)	7,57	3,71
PFK	35,98	39,99	0,54	(–)	23,49	656	7,58	5,95
PPFK	39,74	33,04	1,73	0,22	25,27	(–)	8,42	6,53
JČRFK	38,74	37,44	0,90	0,22	22,69	627	6,39	3,85

Výsledky z elementární analýzy ukazují, že použité HL jsou převážně tvořeny uhlíkem, vodíkem, kyslíkem a minoritně dusíkem a sírou. Prvkové složení použitých HL je v Tab. 1 uvedeno v atomových procentech (*atom. %*) z důvodu, že hmotnostní procenta (*hm. %*) nevystihují elementární složení těchto “biokoloidních” sloučenin v důsledku silného podhodnocení obsahu vodíku. Jak je patrné z výsledků uvedených v Tab. 1, použité vzorky vykazují typické prvkové složení HL izolovaných z terestriálních přírodních matric [98, 189]. V obecném pohledu na dosažené výsledky elementárního složení HL můžeme konstatovat, že HK vyjma vzorků izolovaných z lesní půdy *Humic Podzol* (P1HK a P2HK) a extraktu hnědé mořské řasy *Ascophyllum nodosum* (AHK) obsahují v porovnání s FK více organického uhlíku a jeho rozpustné formy DOC. Naproti tomu byly FK použité v této disertační práci

charakterizovány vyšším obsahem vodíku a kyslíku s výjimkou již zmiňovaných půdních a mořských HK. Jak uvádí ve své práci Stevenson [11] v případě půdních a rašelinistních HL je vyšší obsah dusíku indikátorem mikrobiální činnosti půdních a vodních mikroorganismů v průběhu geneze těchto “biokoloidních” sloučenin. Rovněž poukázal na skutečnost, že jednotlivé diference v elementárním složení HL jsou především spjaty s druhem přírodní matrice tzn. z jakých přírodních matric byly HL resp. některé frakce DOM izolovány. Elementární analýza půdních HL (P1HK, P2HK a PFK) ukázala, že tyto vzorky jsou tvořeny nižším obsahem uhlíku, dusíku a síry v porovnání se standardy půdních HL ESHK a ESFK. V neposlední řadě byly tyto “biokoloidní” sloučeniny s výjimkou vzorku izolovaného z lesní půdy *Humic Podzol* (P2HK) charakterizovány vyšším obsahem kyslíku oproti standardům půdních HL ESHK a ESFK, které byly v této kapitole disertační práce použity především jako referenční materiál. Obdobných závěrů bylo dosaženo i v případě HL izolovaných z jihočeské rašeliny. Analýza prvkového zastoupení rašelinistních HL (JČRHK a JČRFK) odhalila, že tyto vzorky obsahují nižší množství uhlíku, dusíku a síry v porovnání s jejichmi příslušnými standardy (PPHK a PPFK). V porovnání s použitým standardem Pahokee Peat FK bylo zjištěno, že vzorek FK izolovaný z jihočeské rašeliny (JČRFK) obsahuje nižší množství kyslíku. Kvantitativní prvková analýza HK izolované z jihomoravského lignitu (JMLHK) ukázala, že tento vzorek je tvořen nižším obsahem uhlíku, vodíku, dusíku a síry, ale zároveň vyšším obsahem kyslíku vzhledem ke standardu LEOHK. V případě vzorku HK izolované z extraktu hnědé mořské řasy *Ascophyllum nodosum* (AHK) elementární analýza odhalila, že tento vzorek obsahuje poměrně nízké množství uhlíku, kdežto obsah vodíku byl druhou nejvyšší hodnotou z celého souboru studovaných HL. Množství dusíku a kyslíku bylo srovnatelné s rašelinistní HK pocházející z jihočeské rašeliny (JČRHK).

Jak je patrné z výsledků uvedených v Tab. 1, vlhkost použitých vzorků HL se pohybovala v rozmezí $\approx 5,0$ – $8,4$ hm. %. Tato vlhkost je převážně způsobena adsorbovanou vzdušnou vlhkostí prostřednictvím karboxylových a fenolických –OH funkčních skupin.

Z porovnání použitých HL s jejichmi příslušnými standardy z hlediska obsahu popela tj. nespalitelného zbytku anorganických příměsí, které zůstávají na platinové pánvičce po termogravimetrické analýze je zřejmé, že standardy HL vykazovaly vyšší čistotu, jejichž popel byl stanoven v rozmezí $0,99$ – $6,53$ hm. %. Podle Aikena a spol. [190] běžnou alkalickou extrakcí bez zapojení purifikačních kroků jsou izolovány HL s obsahem popela často i převyšujících ≈ 35 hm. %. Je zřejmé, že nižší obsah popela v případě standardů HL je vázán převážně na samotný způsob izolace těchto “biokoloidních” sloučenin z terestriálních přírodních matric. Proces alkalické extrakce HL podle postupu mezinárodní společnosti pro výzkum HL zahrnuje několik purifikačních kroků tj. opakované proplachování $0,3 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ směsí HCl a HF (dekalcinace a desilikace), purifikace na koloně obsahující pryskyřici DAX-8 resp. XAD-8 a v neposlední řadě dialýza v membránách, jejichž cut-off nepřevyšuje 10 kDa. Na základě termogravimetrického stanovení byl nejvyšší obsah popela stanoven v případě HK izolované z lesní půdy *Humic Podzol* (P1HK), i když byl tento vzorek izolován metodou alkalické extrakce dle společnosti IHSS, jež zahrnuje všechny zmiňované purifikační procedury. Nadprůměrně vysoký obsah popela je v tomto případě způsoben patrně silnou mineralizací vzorku P1HK anorganickými sloučeninami, které mají svůj původ v látkách jako je kaolinit nebo montmorillonit, jejichž absorpční pásy byly lokalizovány v infračerveném spektru tohoto vzorku půdní HK. Podrobněji se budeme věnovat identifikaci anorganických příměsí v použitých HL v následující kapitole této disertační práce.

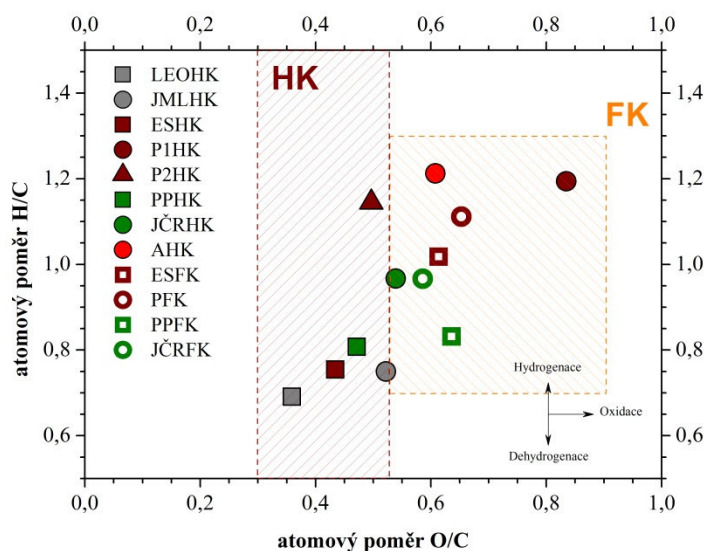
Z naměřených hodnot elementárních složení HL byly vypočteny atomové poměry H/C, O/C a N/C, které jsou uvedeny v Tab. 2. Z vypočtených hodnot atomových poměrů H/C a O/C byl sestaven *van Krevelenův* diagram na jehož základě mohou být klasifikovány tyto “*biokoloidní*” sloučeniny. Atomové poměry H/C a O/C sumarizované v tomto diagramu jsou vhodným aparátem k rychlé a snadné interpretaci některých fyzikálně-chemických vlastností HL tzn. mechanismu humifikace, podílu aromatických resp. alifatických strukturních jednotek, míry (de)hydrogenace, oxidace a v neposlední řadě i dekarboxylace. Van Krevelenův diagram použitých vzorků HL je uveden na Obr. 10.

Tab. 2: Atomové poměry H/C, O/C a N/C vypočtené z příslušných hodnot elementárního složení použitých HL

vzorek HL	H/C	O/C	N/C
LEOHK	0,69	0,36	0,02
JMLHK	0,75	0,52	0,01
ESHK	0,75	0,43	0,06
P1HK	1,19	0,83	0,08
P2HK	1,14	0,50	0,03
PPHK	0,81	0,47	0,06
JČRHK	0,97	0,54	0,03
AHK	1,21	0,61	0,04
ESFK	1,02	0,61	0,06
PFK	1,11	0,65	0,02
PPFK	0,83	0,64	0,04
JČRFK	0,97	0,59	0,02

Podle Klavinse a spol. [191–192] je výhodné a správné HL pocházející z odlišných přírodních matric porovnávat na základě průměrných hodnot atomových poměrů H/C a O/C a určit tak např. stupeň (de)hydrogenace, oxidace, dekarboxylace nebo i mechanismus humifikace. Jak je patrné z výsledků uvedených v Tab. 2, použité vzorky vykazují typické hodnoty atomových poměrů HL izolovaných z terestriálních přírodních matric [193]. V širším pohledu na prezentované výsledky atomových poměrů HL můžeme říci, že HK vyjma vzorků izolovaných z lesní půdy *Humic Podzol* (P1HK a P2HK) a extraktu hnědé mořské řasy *Ascophyllum nodosum* (AHK) jsou v porovnání s FK charakterizovány nižšími hodnotami atomového poměru H/C, který je indikátorem aromaticity a míry dehydrogenace těchto “*biokoloidních*” sloučenin. Naproti tomu byly FK použité v této disertační práci charakterizovány vyššími hodnotami tohoto atomového poměru, který v sobě odráží informace o podílu alifatických jednotek a tudíž i míry hydrogenace těchto unikátních “*biokoloidních*” sloučenin. Z porovnání použitých HL z hlediska atomového poměru O/C je zřejmé, že HK s výjimkou vzorku P1HK vykazují nižší obsah strukturních jednotek, které jsou substituovány kyslík obsahujícími funkčními skupinami a to převážně karboxylovými a –OH fenolickými, jejichž atomový poměr O/C se pohyboval v rozmezí 0,36–0,61. Vypočtené hodnoty atomového poměru O/C použitých FK poukazují na vyšší stupeň oxidace těchto “*biokoloidních*” sloučenin.

Jak je patrné z Obr. 10, půdní HL (P1HK, P2HK a PFK) vykazují vyšší míru hydrogenace a oxidace v porovnání se standardy ESHK a ESFK. Obdobných výsledků bylo dosaženo i v případě HL izolovaných z jihočeské rašeliny. Pozice rašeliníštních HL (JČRHK a JČRFK) ve *van Kreveleného diagramu* odhalila, že tyto vzorky jsou silněji substituovány alifatickými a v případě vzorku JČRHK i polárními funkčními skupinami v porovnání s jejich příslušnými standardy (PPHK a PPFK). V porovnání s použitým standardem PPFK bylo zjištěno, že vzorek FK izolovaný z jihočeské rašeliny (JČRFK) obsahuje nižší množství kyslík obsahující funkčních skupin tj. karboxylové, –OH fenolické a v neposlední řadě i –OCH₃ methoxylové funkční skupiny. Poloha lignitické HK (JMLHK) ve *van Kreveleného diagramu* vypovídá o vyšším stupni oxidace a hydrogenace skeletu této “biokoloidní” sloučeniny vzhledem k použitému standardu LEOHK. Jak je z Obr. 10 zřejmé, HK izolovaná z extraktu hnědé mořské řasy *Ascophyllum nodosum* (AHK) byla charakterizována nejvyšší hodnotou atomového poměru H/C, jež dává tušit značnou míru hydrogenace této “biokoloidní” sloučeniny. Hodnota atomového poměru O/C byla v tomto případě shodná se standardem půdní FK (ESFK).



Obr. 10: van Krevelenův diagram použitých vzorků HL

6.2 UV/Vis spektrometrie huminových látek

Molekulová absorpční spektrometrie v ultrafialové a viditelné oblasti elektromagnetického záření (UV/Vis) je mnohými autory pokládána za základní instrumentální techniku studia a charakterizace HL resp. DOM izolovaných z rozličných přírodních matric [87–95]. Za tímto účelem byly navrženy tzv. absorpční koeficienty a specifické hodnoty absorbancí, které jsou zpravidla definovány jako poměry absorbancí při vhodně zvolených vlnových délkách, anebo jako hodnoty absorbance při specifických vlnových délkách, které odpovídají absorpci aromatických struktur tzn. energetickým změnám při elektronových přechodech výhradně $n \rightarrow \pi^*$ a $\pi \rightarrow \pi^*$. Absorpční koeficienty jsou zpravidla ukazateli střední molekulové hmotnosti, aromaticity, stupně humifikace a mimo jiné i míry substituce aromatického jádra polárními a hydrofobními funkčními skupinami. S výjimkou absorpčního koeficientu navrženého Korshinem [91], musíme mít na paměti, že výše uvedená tvrzení se výhradně opírají o korelace mezi absorpčními koeficienty a strukturálními charakteristikami HL např. střední molekulovou hmotností a aromaticitou, které jsou však stanoveny pomocí ostatních

instrumentálních metod především SEC – *Size Exclusion Chromatography* a ^{13}C NMR. Z tohoto důvodu by bylo vhodné, získané výsledky z UV/Vis spektrometrie podpořit závěry z velikostně-vylučovací chromatografie, spektrometrie nukleární magnetické resonance, či jinými instrumentálními technikami, které jsou schopny přímo kvantifikovat tyto unikátní “*biokoloidní*” sloučeniny. Hlavní myšlenkou této části disertační práce bylo ověřit a otestovat konvekčně využívané absorpční koeficienty a specifické absorpce v oblasti charakterizace a studia HL. Veškeré HL použité v této disertační práci byly podrobeny základnímu screeningu pomocí UV/Vis spektrometrie. Jednou z primárních a časově nenáročných metod, jak mohou být HL charakterizovány je měření jejich absorpčních spekter, ze kterých byly následně vypočítány zmiňované UV/Vis charakteristiky. Vypočtené absorpční koeficienty E_4/E_6 , E_2/E_4 , E_2/E_3 , E_{254}/E_{410} , $\Delta \log K$, $E_{\text{ET}}/E_{\text{Bz}}$ a hodnoty specifických absorbancí A_{280} a $SUVA_{254}$ jsou sumarizovány v Tab. 3.

Tab. 3: Vypočtené hodnoty absorpčních koeficientů a specifických hodnot absorbancí použitých HL

vzorek HL	absorpční koeficienty						specifické absorpce	
	$E_{\text{ET}}/E_{\text{Bz}}$ (–)	E_4/E_6 (–)	E_2/E_4 (–)	$\Delta \log K$ (–)	E_2/E_3 (–)	E_{254}/E_{410} (–)	A_{280} (–)	$SUVA_{254}$ ($\text{g}_{\text{HL}} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{m}^{-1}$)
LEOHK	0,84	4,74	5,86	0,66	2,58	3,95	0,36	8,58
JMLHK	0,86	6,54	6,03	0,74	2,65	3,99	0,42	9,21
ESHK	0,83	3,49	4,49	0,52	2,33	3,32	0,25	7,72
P1HK	0,76	5,72	5,79	0,58	3,27	4,77	0,11	3,26
P2HK	0,48	8,86	10,35	0,94	3,61	6,25	0,13	3,95
PPHK	0,79	5,31	6,43	0,71	2,79	4,32	0,28	7,55
JČRHK	0,68	8,60	8,70	0,90	3,16	5,36	0,17	5,28
AHK	0,73	6,51	4,92	0,74	2,44	3,37	0,09	2,10
ESFK	0,67	12,83	19,21	1,11	4,96	10,25	0,18	5,45
PFK	0,55	12,21	14,53	1,11	3,75	7,49	0,13	4,32
PPFK	0,74	10,31	13,68	0,98	4,26	7,97	0,21	5,80
JČRFK	0,65	16,47	20,06	1,31	4,33	9,61	0,13	4,61

Sumarizované výsledky v Tab. 3 vždy představují průměrné hodnoty ze tří nezávislých opakování. Vypočtené směrodatné odchylky (σ) absorpčních koeficientů a specifických hodnot absorbancí byly zanedbatelné, a proto nejsou ve výše prezentované tabulce uvedeny. Naměřená UV/Vis spektra studovaných HL se vyznačovala kvaziexponenciálním průběhem, který je příznačný pro tyto “*biokoloidní*” sloučeniny. Z Obr. 1P, který je uveden v příloze této disertační práce vyplývá, že absorpce HK probíhá v oblasti vlnových délek $\approx 200\text{--}800$ nm. Jak uvádí ve své práci Chen a spol. [83] v případě HK izolovaných z terestriálních přírodních matric je intenzivnější absorpce v oblasti vlnových délek $\approx 500\text{--}800$ nm ukazatelem vyššího obsahu aromatických struktur a alifatických řetězců s konjugovaným systémem nenasyčených vazeb. Naproti tomu, FK izolované z tých přírodních matric se obvykle vyznačují velmi nízkou absorpcí ve výše uvedené oblasti elektromagnetického záření. Jak je patrné z výsledků sumarizovaných v Tab. 3, použité vzorky vykazují typické hodnoty absorpčních koeficientů

a specifických hodnot absorbancí HL izolovaných z terestriálních a kaustobiolitických přírodních matric. Z globálního hlediska můžeme konstatovat, že HK, vyjma vzorků izolovaných z lesní půdy *Humic Podzol* (P2HK) a jihočeské rašeliny (JČRHK), jsou v porovnání s FK charakterizovány vyšší mírou substituce aromatických struktur polárními funkčními skupinami. Podle Korshina a spol. [91] je absorpční koeficient E_{ET}/E_{Bz} výrazně citlivý k přítomnosti polárních a alifatických substituentů na aromatickém jádře HL resp. DOM. Rovněž poukázal na skutečnost, že nižší hodnoty absorpčního koeficientu E_{ET}/E_{Bz} vypovídají o substituci aromatického jádra převážně hydrofobními skupinami, anebo svědčí o přítomnosti méně substituovaných aromátů ve struktuře HL. Naopak, hodnota tohoto koeficientu je vyšší, pakliže jsou aromatická jádra substituována hydrofilními skupinami tzn. –OH, –COOH, C=O a v neposlední řadě přicházejí v úvahu i karbonyly esterů. Naproti tomu byly FK použité v této disertační práci charakterizovány nižšími hodnotami E_{ET}/E_{Bz} , a proto se můžeme domnívat, že tyto vzorky jsou tvořeny vyšším stupněm substituce aromatických struktur hydrofobními skupinami. Vypočtené hodnoty absorpčního koeficientu E_{ET}/E_{Bz} půdních HL (P1HK, P2HK a PFK) dávají tušit přítomnost aromatických sloučenin, které jsou více substituovány alifatickými funkčními skupinami v porovnání s jejich půdními standardy *Elliott Soil*. Jak je patrné z výsledků uvedených v Tab. 3, podobných závěrů bylo dosaženo i v případě HL izolovaných z jihočeské rašeliny. Jako v předešlém případě, se rašelinistní HL vyznačovaly nižšími hodnotami absorpčního poměru E_{ET}/E_{Bz} , a proto lze konstatovat, že tyto vzorky jsou v porovnání se svými standardy PPHK a PPFK charakterizovány nižší mírou substituce aromatického jádra polárními funkčními skupinami. Kromě toho, přichází v úvahu i možnost, kde jsou aromatická jádra rašelinistních HL více substituována alifatickými funkčními skupinami. Nejvyšší hodnoty absorpčního koeficientu E_{ET}/E_{Bz} z celého souboru studovaných HL vykazovaly HK izolované z jihomoravského lignitu (JMLHK) a *Leonarditu* (LEOHK). Z výše uvedeného faktu lze říci, že tyto vzorky obsahují v porovnání s ostatními HL vysoký podíl hydrofilních substituentů, které uplatňují při měření UV/Vis spekter silný efekt elektronového přesunu (ET – *electron-transfer effect*). Rovněž si v Tab. 3 nelze nepovšimnout, že vypočtené hodnoty absorpčního koeficientu E_{ET}/E_{Bz} byly v případě uhelných HK prakticky totožné. UV/Vis analýza odhalila, že HK izolovaná z extraktu hnědé mořské řasy *Ascophyllum nodosum* (AHK) se vyznačuje srovnatelnou mírou a typem substituce aromatických struktur jako již dříve diskutovaný standard FK *Pahokee Peat*. Kromě toho je na tomto místě nutné říci, že tyto výsledky obdržené pomocí absorpčního koeficientu navrženého Korshinem [91] jsou v dobré shodě se závěry z elementární analýzy (*van Kreveleneho diagramu*) a ^{13}C NMR spektrometrie.

Z naměřených UV/Vis spekter HL byly vypočteny absorpční koeficienty E_4/E_6 , E_2/E_4 , $\Delta \log K$, E_2/E_3 a E_{254}/E_{410} , jejichž hodnoty jsou dobrými ukazateli molekulové hmotnosti a aromaticity těchto unikátních “*biokoloidních*” sloučenin. Bližší informace o výše zmíněných absorpčních koeficientech poskytují reference [83–92] a lze je i nalézt v odstavcích kapitoly 3.1 této disertační práce. Jak je zřejmé z výsledků uvedených v Tab. 3, studované vzorky vykazují obvyklé hodnoty absorpčních koeficientů HL izolovaných z hnědouhelných, půdních a rašelinistních přírodních matric [194–200]. V širším pohledu na prezentované výsledky absorpčních koeficientů E_4/E_6 , E_2/E_4 , $\Delta \log K$, E_2/E_3 a v neposlední řadě i E_{254}/E_{410} můžeme říci, že HK jsou v porovnání s FK charakterizovány vyšší molekulovou hmotností a stupněm aromaticity. Naproti tomu byly půdní a rašelinistní FK charakterizovány nesporně vyššími hodnotami těchto absorpčních koeficientů, které v sobě nesou informace o molekulové hmotnosti, aromaticitě a stupni humifikace. Vypočtené hodnoty absorpčních koeficientů

půdních HK (P1HK a P2HK) naznačují, že tyto vzorky jsou v porovnání se svým standardem ESHK charakterizovány nižší molekulovou hmotností, stupněm humifikace a aromaticitou. Jak je patrné z výsledků sumarizovaných v Tab. 3, FK izolovaná z lesní půdy *Humic Podzol* se vyznačovala nižšími hodnotami absorpčních poměrů E_4/E_6 , E_2/E_4 , E_2/E_3 a E_{254}/E_{410} , a proto můžeme říci, že tato FK je oproti svému standardu ESFK charakterizována vyšší molekulovou hmotností, stupněm humifikace a aromaticitou. Chen a spol. [84] ve své práci uvádí, že z důvodu velmi nízké absorpce FK a některých vzorků DOM při vlnové délce 665 nm je vhodnějším koeficientem absorpční index, který je definován jako poměr absorbancí při 265 a 465 nm, oproti obvykle používanému humifikačnímu indexu E_4/E_6 . Obdobných závěrů bylo dosaženo i v případě HL izolovaných z jihočeské rašeliny. Jako v případě absorpčního koeficientu navrženého Korshinem [91] tj. E_{ET}/E_{Bz} se rašelinistní HL (JČRHK a JČRFK) vyznačovaly nižšími hodnotami absorpčních koeficientů, a tudíž lze říci, že tyto vzorky jsou v porovnání se svými standardy PPHK a PPFK charakterizovány nižší molekulovou hmotností a aromaticitou. Z výše uvedeného závěru lze usuzovat i na nižší stupeň humifikace těchto “biokoloidních” sloučenin. Tyto závěry jsou ve velmi dobré shodě s výsledky prezentovanými v odborné publikaci Purmalise a spol. [201], který se v této práci zabýval studiem a charakterizací HL izolovaných z litevské rašeliny pomocí UV/Vis spektrometrie. Jak je patrné z výsledků uvedených v Tab. 3, HK izolovaná z jihomoravského lignitu (JMLHK) se v porovnání se svým standardem LEOHK vyznačovala vyššími hodnotami absorpčních indexů E_4/E_6 , E_2/E_4 , $\Delta \log K$, E_2/E_3 a E_{254}/E_{410} , a proto můžeme říci, že tento vzorek je charakterizován nižším stupněm humifikace. Tyto hodnoty absorpčních koeficientů rovněž svědčí o nižší molekulové hmotnosti této “biokoloidní” sloučeniny. Kromě toho si nelze nepovšimnout, že HK izolovaná z extraktu hnědé mořské řasy *Ascophyllum nodosum* (AHK) se vyznačovala srovnatelnými hodnotami použitých koeficientů v porovnání s výše diskutovaným vzorkem JMLHK. V případě vzorku AHK jsou vypočtené hodnoty těchto koeficientů spíše ukazateli střední molekulové hmotnosti \overline{M}_w nežli stupně aromaticity, jak vyplývá ze specifických hodnot absorbancí a indexu f_a , který byl vypočten na základě naměřeného ^{13}C NMR spektra.

Z naměřených UV/Vis spekter a obsahů rozpuštěného organického uhlíku byly stanoveny a vypočteny specifické hodnoty absorbancí, které jsou v odborné literatuře označovány zkratkami A_{280} a $SUVA_{254}$ (*Specific Ultraviolet Absorption Coefficient*) a jejichž hodnoty jsou výhradně ukazateli aromaticity těchto “biokoloidních” sloučenin. Podrobné informace o výpočtu specifické absorpce $SUVA_{254}$, jejichž hodnota je zpravidla normalizována na obsah rozpuštěného organického uhlíku DOC přináší reference [95–202–203]. V některých případech se můžeme setkat s tím, že tento parametr je normalizován na obsah celkového organického uhlíku TOC – *Total Organic Carbon*. Jak uvádí ve své práci Uyguner a spol. [204], v případě studia a charakterizace neporušených vzorků HL izolovaných z kaustobiolitických přírodních matric je vhodnější jejich hodnoty specifické absorpce UV_{254} a UV_{365} normalizovat na obsah celkového organického uhlíku TOC. Jak je patrné z výsledků sumarizovaných v Tab. 3, použité vzorky vykazují typické hodnoty specifických absorbancí HL pocházejících z terestriálních přírodních matric [205–207]. Z globálního hlediska můžeme konstatovat, že použité standardy HL, s výjimkou HK izolované z oxidovaného lignitu, jsou v porovnání s ostatními HL charakterizovány vyšším stupněm aromaticity. Z výše uvedeného faktu lze usuzovat, že použité standardy HL obsahují vyšší podíl aromatických sloučenin s různou mírou a typem substituce aromatického jádra. Podle Weishaara a spol. [95] je specifická absorpce $SUVA_{254}$ velmi dobrým ukazatelem aromaticity HL resp. DOM. Mimo

jiné poukázal na skutečnost, že s rostoucí hodnotou specifické absorpce se zvyšuje i stupeň aromaticity těchto unikátních “biokoloidních” sloučenin. Z výše uvedeného závěru lze předpokládat, že vypočtené hodnoty $SUVA_{254}$ mohou být v dobré korelaci s indexem aromaticity f_a , který je definován na základě naměřeného ^{13}C NMR spektra jako poměr aromatických a fenolických atomů uhlíku ($\approx 106\text{--}165$ ppm) ke všem atomům uhlíku ($\approx 0\text{--}165$ ppm) vyjma karboxylových a karbonylových atomů ^{13}C . Ověřením spojitosti mezi navrženým parametrem specifické absorpce a indexem aromaticity f_a se budeme věnovat v následující části této disertační práce, která je zaměřena na studium a charakterizaci HL pomocí ^{13}C NMR spektrometrie. Hodnoty specifických absorpčních půdních HL tzn. P1HK, P2HK a PFK vypovídají o nižším obsahu aromatických jader, které jsou v tomto případě přisuzovány mono- a poly-substituovaným kyselinám a fenolům [208]. Naproti tomu byly standardy půdních HL charakterizovány vyšším podílem výše zmíněných aromátů. Jak je patrné z výsledků uvedených v Tab. 3, obdobných závěrů bylo dosaženo i v případě HL izolovaných z jihočeské rašeliny. Vypočtené hodnoty specifických absorpčních A_{280} a $SUVA_{254}$ naznačují, že rašelinistní HL jsou v porovnání se svými standardy méně aromatické, a proto jsou rovněž charakterizovány nižším stupněm humifikace E_4/E_6 . Tyto závěry jsou ve velmi dobré shodě s výsledky uvedenými v odborné publikaci Malcolma [209], který se v této práci zabýval studiem a charakterizací HL izolovaných z půd, rašelin, kaustobiolitů a sladkovodních zdrojů pomocí UV/Vis a ^{13}C NMR spektrometrie. Naproti tomu, HK izolovaná z jihomoravského lignitu se oproti standardu LEOHK vyznačovala vyššími hodnotami specifických absorpčních. Kromě toho, je na tomto místě nutné konstatovat, že stanovené hodnoty A_{280} a $SUVA_{254}$ byly v případě výše uvedeného vzorku JMLHK nominálně nejvyšší. To ovšem znamená, že HK izolovaná z jihomoravského lignitu obsahuje v porovnání s ostatními HL nejvyšší podíl aromatických struktur, o kterém svědčí i parametr f_a vypočítaný na základě naměřeného ^{13}C NMR spektra. Kromě toho, si v Tab. 3 nelze nepovšimnout skutečnosti, že HK pocházející z extraktu hnědé mořské řasy *Ascophyllum nodosum* (AHK) byla charakterizována nejnižšími hodnotami specifických absorpčních. Z výše uvedeného faktu, se lze tedy domnívat, že tato HK je převážně tvořena alifatickými strukturními jednotkami *O*- a *N*- alkylového typu, které jsou ukazateli látek, kam zpravidla řadíme mastné kyseliny, vosky, proteiny a v neposlední řadě i polysacharidy. Tyto závěry byly mimo jiné podpořeny i výsledky z elementární analýzy (*van Kreveleneho diagramu*), infračervené spektrometrie s Fourierovou transformací a především ^{13}C NMR spektrometrie.

6.3 FTIR spektrometrie a Fourierova autodekonvoluce huminových látek

Infračervená spektrometrie s Fourierovou transformací (FTIR), resp. její metoda difuzního odrazu, která je v odborné literatuře známa pod zkratkou DRIFTS – *Diffuse Reflectance Infrared Fourier Transform Spectroscopy* byla v této disertační práci použita k základnímu screeningu tzn. identifikaci funkčních skupin a strukturních jednotek tvořící skelet těchto unikátních “biokoloidních” sloučenin. Z naměřených DRIFTS spekter použitých vzorků bylo zřejmé, že v oblasti “otisku palce” tzv. fingerprintu ($\approx 1500\text{--}400$ cm^{-1}) znesnadňují interpretaci infračervených spekter HL překrývající se absorpční pásy jednotlivých funkčních skupin. Tato překážka byla v této disertační práci vyřešena pomocí Fourierovy autodekonvoluce (FSD – Fourier self-deconvolution).

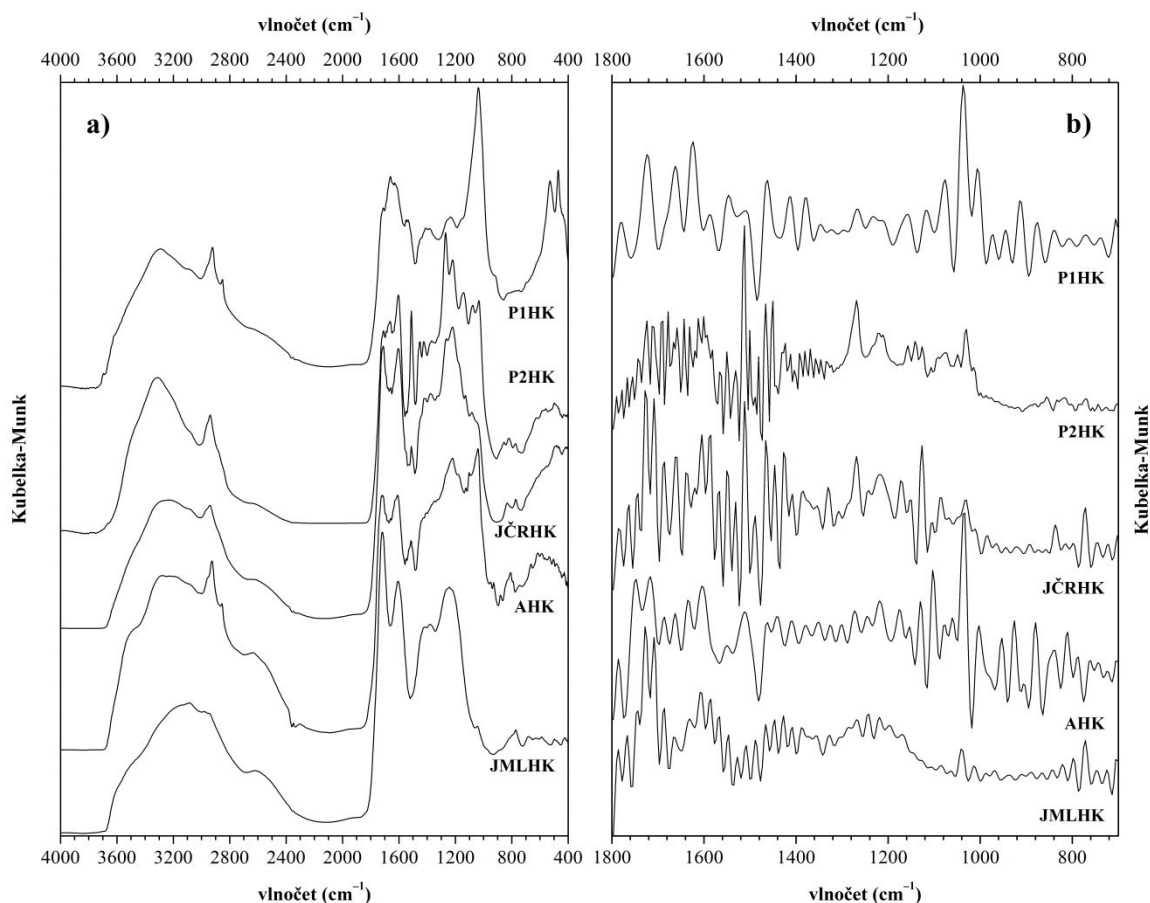
Na Obr. 11a jsou uvedena typická FTIR-DRIFTS spektra HK izolovaných z terestriálních a nižších rostlinných (autotrofních) přírodních matric. Interpretace absorpčních pásů byla

provedena na základě odborné literatury [11, 161, 210–215], pokud není uvedeno jinak. Široký absorpční pás v oblasti 3316–3137 cm^{-1} odpovídá valenčním vibracím O–H a N–H skupin v karboxylových kyselinách, fenolech, alifatických alkoholech, amidech, etherech, ..., aj. Hydroxylové funkční skupiny velmi ochotně tvoří v HL vodíkové můstky a poskytují tak velmi široký pás, který obvykle znesnadňuje identifikaci valenčních vibrací C–H skupin v aromatických strukturách těchto “biokoloidních” sloučenin. Vyjma vzorku JMLHK byly v jejich DRIFTS spektrech lokalizovány absorpční pásy v oblastech 2941–2922 cm^{-1} a 2856–2852 cm^{-1} připadající asymetrickým a symetrickým valenčním vibracím C–H vazeb methylenových funkčních skupin. Naproti tomu, byl v DRIFTS spektru vzorku HK izolované z jihomoravského lignitu (JMLHK) identifikován dublet odpovídající asymetrické valenční vibraci C–H vazeb methylových funkčních skupin, jejichž specifická absorpce je vymezena oblastí 2970–2950 cm^{-1} . Absorpční pás při 1452 cm^{-1} připadající deformačním vibracím –CH₃ a –CH₂– skupin byl pozorován pouze u vzorku HK izolované z lesní půdy *Humic Podzol* (P2HK). S výjimkou vzorku P2HK a AHK byl v jejich DRIFTS spektrech lokalizován absorpční pás v oblasti vlnočtů 1382–1378 cm^{-1} odpovídající symetrické deformační vibraci C–H vazeb v methylových skupinách nebo symetrické valenční vibraci karboxylového anionu (COO⁻). Přítomnost tohoto pásu a absence signálu v oblasti valenčních vibrací methylových funkčních skupin v případě všech vzorků HK vyjma již zmiňovaného preparátu JMLHK indikuje přítomnost elektronegativního atomu např. kyslíku v této funkční skupině. V případě vzorků HK izolovaných z jihomoravského lignitu (JMLHK) a extraktu hnědé mořské řasy *Ascophyllum nodosum* (AHK) bylo v jejich DRIFTS spektrech identifikováno nevýrazné absorpční maximum v oblasti 3086–3010 cm^{-1} připadající symetrické valenční vibraci C–H skupin v aromátech. Přítomnost aromatických strukturních jednotek byla rovněž potvrzena absorpčními pásy, jejichž pozice byly lokalizovány v oblastech vlnočtů 1606–1601 cm^{-1} a 1514–1510 cm^{-1} připadající valenčním skeletálním (dýchací) vibracím ...C–C=C... vazeb v aromatickém kruhu. Tyto absorpční pásy byly identifikovány u všech vzorků vyjma HK izolované z lesní půdy *Humic Podzol* (P1HK). Podle Peuravuorihho a spol. [216] je absorpční pás lokalizovaný při $\approx 1510 \text{ cm}^{-1}$ s největší pravděpodobností indikátorem ligninu nebo z ligninu odvozených strukturních jednotek. Jak je patrné z Obr. 11a, intenzita tohoto absorpčního pásu klesala v pořadí P2HK > AHK > JČRHK > JMLHK. Ostrý absorpční pás v oblasti 1719–1710 cm^{-1} odpovídá symetrické valenční vibraci C=O skupin v karboxylových kyselinách. Ve všech DRIFTS spektrech vzorků HK byly lokalizovány méně či více intenzivní absorpční pásy v oblasti vlnočtů ≈ 1680 – 1630 cm^{-1} připadající symetrickým valenčním vibracím karboxylových funkčních skupin v chinonech, případně konjugovaných ketonech. Absorpční pás při 1630 cm^{-1} připadající symetrické valenční vibraci C=O skupin v sekundárních amidech byl pozorován pouze u vzorku HK pocházející z lesní půdy *Humic Podzol* (P1HK). Vyjma vzorku JMLHK byl v jejich DRIFTS spektrech identifikován absorpční pás v oblasti 1548–1532 cm^{-1} , který je tradičně připisován valenční vibraci C–N a deformační vibraci N–H vazeb v sekundárních amidech. Jak je z Obr. 11a zřejmé, s výjimkou vzorku P1HK a AHK byl v jejich infračervených spektrech lokalizován méně výrazný absorpční pás v oblasti 1423–1416 cm^{-1} odpovídající symetrické valenční vibraci karboxylového anionu (COO⁻). Rovněž byl v DRIFTS spektrech vyjma vzorků HK izolovaných z jihočeské rašeliny (JČRHK) a lesní půdy *Humic Podzol* (P2HK) identifikován absorpční pás při $\approx 1410 \text{ cm}^{-1}$ připadající deformační vibraci O–H vazeb fenolických –OH skupin. V případě vzorku HK izolované z extraktu hnědé mořské řasy *Ascophyllum nodosum* bylo v jejím infračerveném spektru identifikováno nevýrazné absorpční maximum při

1348 cm^{-1} , které je obvykle přisuzováno deformační asymetrické vibraci C–H vazeb methylových funkčních skupin. Pouze u vzorků P2HK, JČRHK a JMLHK byl v jejich IR spektrech identifikován absorpční pás odpovídající asymetrické vibraci C–O–C vazeb v aryl etherech, jejichž specifická absorpce je vymezena oblastí 1269–1244 cm^{-1} . S výjimkou HK izolované z jihomoravského lignitu (JMLHK) byl v jejich FTIR-DRIFTS spektrech lokalizován poměrně intenzivní a široký absorpční pás, který je tradičně připisován valenční asymetrické vibraci C–O a deformační vibraci O–H vazeb v karboxylových a fenolických –OH skupinách, jejichž vlnčet specifické absorpce je dán rozmezím 1233–1220 cm^{-1} . Podle Ibarri a spol. [103] náleží tento absorpční pás i valenční asymetrické vibraci aryl–O skupiny v aromatických etherech. Absorpční pás při 1180–1142 cm^{-1} připadající valenční asymetrické vibraci C–O–C vazeb v alkyl-etherech byl pozorován pouze u vzorků HK izolovaných z lesní půdy *Humic Podzol* (P2HK) a extraktu hnědé mořské řasy *Ascophyllum nodosum* (AHK). Vyjma vzorků JMLHK a P1HK byly v jejich infračervených spektrech lokalizovány méně či více intenzivní absorpční pásy v oblasti 1129–1077 cm^{-1} , které jsou zpravidla přisuzovány valenční asymetrické vibraci C–O–C a valenční symetrické vibraci C–O vazeb v alifatických etherech a sekundárních alkoholech. S výjimkou vzorku HK pocházející z jihočeské rašeliny byl v jejich DRIFTS spektrech identifikován absorpční pás odpovídající valenční symetrické vibraci C–O a valenční vibraci Si–O vazeb v primárních alkoholech, polysacharidech a silikátech, jejichž specifická absorpce je vymezena oblastí 1044–1033 cm^{-1} . Široký a intenzivní absorpční pás při 1037 cm^{-1} připadající valenční vibraci Si–O vazeb v kaolinitu byl pozorován pouze u vzorku HK izolované z lesní půdy *Humic Podzol* (P1HK). Jak je z Obr. 11a zřejmé, na silnou mineralizaci vzorku P1HK anorganickými sloučeninami poukazují i další absorpční pásy, které byly lokalizovány v oblastech vlnčetů 3800–3600 cm^{-1} , 796–775 cm^{-1} a v neposlední řadě i 529–471 cm^{-1} . Méně intenzivní absorpční pás při 3696 cm^{-1} je obvykle připisován valenční vibraci O–H vazeb v kaolinitu. Přítomnost anorganických příměsí byla rovněž potvrzena méně či více výraznými absorpčními pásy, jejichž pozice byly lokalizovány v oblastech vlnčetů 796–775 cm^{-1} a 529–471 cm^{-1} připadající valenční vibraci Si–O, deformační vibraci Si–O–Al a Si–O–Si vazeb v kaolinitu, montmorillonitu, křemenu eventuálně jeho amorfní modifikaci. Tyto výsledky nejsou nikterak překvapivé s ohledem na již zjištěný obsah popela, který byl v případě tohoto vzorku nejvyšší.

Jak již bylo řečeno v úvodním odstavci této kapitoly, z naměřených FTIR-DRIFTS spekter použitých vzorků bylo zjevné, že v oblasti tzv. *fingerprintu* znesnadňují interpretaci infračervených spekter HL překrývající se absorpční pásy jednotlivých funkčních skupin. Tato nesnáze byla v této disertační práci řešena pomocí Fourierovy autodekonvoluce, která je v odborné literatuře známa pod zkratkou FSD – *Fourier self-deconvolution*. Pomocí Fourierovy autodekonvoluce byly získány “nové” absorpční pásy, které nebyly v naměřených DRIFTS spektrech vzorků HL doposud pozorovány, případně se jevíly pouze jako nevýrazná raménka bez zjevného maxima, kterým nebylo možné přiřadit hodnotu daného vlnčtu.

Na Obr. 11b jsou uvedena FSD-DRIFTS spektra HK izolovaných z jihomoravského lignitu, lesní půdy *Humic Podzol*, jihočeské rašeliny a extraktu hnědé mořské řasy *Ascophyllum nodosum*. Interpretace absorpčních pásů byla provedena na základě odborných publikací [110, 181–183, 217].



Obr. 11: a) FTIR-DRIFTS spektra HK izolovaných z terestriálních a nižších rostlinných přírodních matic; b) jejich FSD-DRIFTS spektra

Vyjma vzorku P1HK byl v jejich FSD-DRIFTS spektrech lokalizován poměrně intenzivní absorpční pás v oblasti $1748\text{--}1742\text{ cm}^{-1}$ odpovídající valenční symetrické vibraci $\text{C}=\text{O}$ skupin alifatických esterů karboxylových kyselin. Přítomnost alifatických esterů byla rovněž potvrzena absorpčním pásem, jehož pozice byla lokalizována v oblasti vlnočtů $1197\text{--}1158\text{ cm}^{-1}$ připadající valenční vibraci $\text{C}-\text{O}$ vazeb v alkyl-esterech. Jak je z Obr. 11b zřejmé, na přítomnost aromatických esterů ve studovaných HK poukazují absorpční pásy, které byly lokalizovány v oblastech vlnočtů $1732\text{--}1723\text{ cm}^{-1}$, $1307\text{--}1266\text{ cm}^{-1}$ a $1130\text{--}1100\text{ cm}^{-1}$. Ostrý a intenzivní absorpční pás při $1732\text{--}1723\text{ cm}^{-1}$ je tradičně připisován valenční symetrické vibraci karbonylové skupiny v aryl-esterech. Méně či více intenzivní absorpční pásy lokalizované v oblasti “klasického” otisku palce tzn. při $1307\text{--}1266\text{ cm}^{-1}$ a $1130\text{--}1100\text{ cm}^{-1}$ odpovídají valenční vibraci $\text{Ar}-\text{C}-\text{O}$ a $\text{O}-\text{C}-\text{C}$ vazeb v aromatických esterech. Ostrý absorpční pás v oblasti $1597\text{--}1586\text{ cm}^{-1}$ náleží valenční asymetrické vibraci $\text{C}=\text{O}$ skupin v karboxylovém anionu COO^- . Ve všech FSD-DRIFTS spektrech vzorků HK byl lokalizován méně intenzivní absorpční pás v oblasti vlnočtů $1099\text{--}1086\text{ cm}^{-1}$, který je obvykle připisován rovinné deformační vibraci $\text{C}-\text{H}$ vazeb v aromátech. S výjimkou vzorku HK izolované z lesní půdy *Humic Podzol* (P1HK) si v jejich infračervených FSD spektrech nelze nepovšimnout tři charakteristických absorpčních pásů, které se nacházejí v oblastech vlnočtů $880\text{--}867\text{ cm}^{-1}$, $819\text{--}813\text{ cm}^{-1}$ a v neposlední řadě i $748\text{--}744\text{ cm}^{-1}$. Absorpční pás při $880\text{--}867\text{ cm}^{-1}$ odpovídá mimorovinné deformační vibraci $\text{C}-\text{H}$ vazeb v *meta*-substituovaných aromatických sloučeninách odvozených od ligninu tzn. koniferylalkoholu a sinapylalkoholu. Naproti tomu, absorpční pás lokalizovaný v oblasti $819\text{--}813\text{ cm}^{-1}$ je tradičně připisován mimorovinným

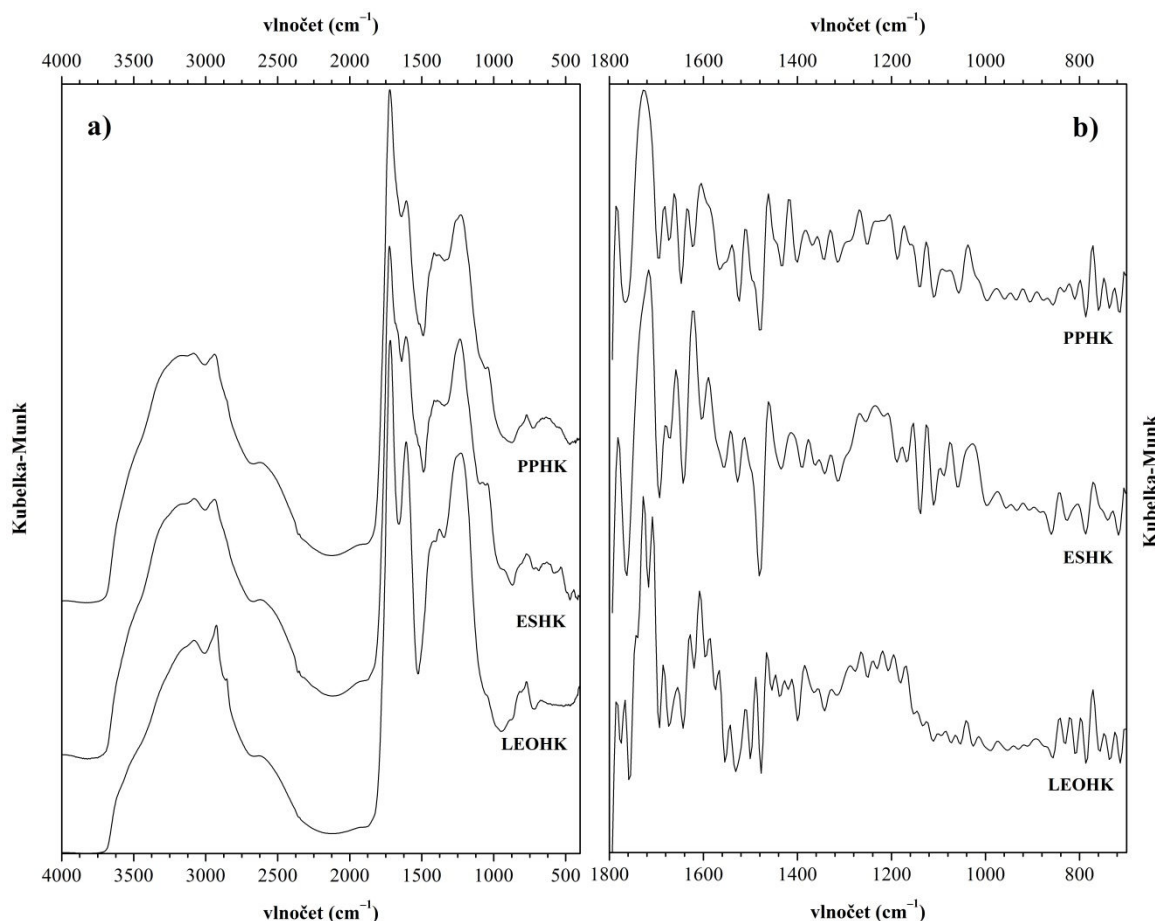
deformacím aromatických C–H vazeb v *para*-substituovaných sloučeninách. V případě HK resp. HL se může jednat o strukturní jednotky odvozených od 4-hydroxycannamylalkoholu. Jak je z Obr. 11b zřejmé, z těchto absorpčních pásů byl identifikován jako nejintenzivnější signál, který je z pravidla přičítán mimorovinné deformační vibraci C–H vazeb v *ortho*-substituovaných aromatických sloučeninách, jehož specifická absorpce se nachází v oblasti 748–744 cm^{-1} . Rovněž je nutné podotknout, že po aplikaci Fourierovy autodekonvoluce se absorpční pásy lokalizované v oblasti 1680–1630 cm^{-1} nacházely při stejných vlnočtech, avšak jejich intenzita byla nesrovnatelně vyšší v porovnání s původními DRIFTS spektry. To vše může přispět k lepší lokalizaci a následné identifikaci absorpčních pásů, které odpovídají specifickým vibracím jednotlivých funkčních skupin. Ve všech FSD-DRIFTS spektrech vzorků HK byly identifikovány intenzitně proměnlivé absorpční pásy, které jsou výhradně připisovány valenčním vibracím C–N a deformačním vibracím N–H vazeb v sekundárních amidech, jejichž specifická absorpce je vymezena oblastí 1573–1565 cm^{-1} a 1557–1550 cm^{-1} . Jak je z Obr. 11b zřejmé, na přítomnost alifatických funkčních skupin ve studovaných HK poukazují absorpční pásy, které byly lokalizovány v oblastech vlnočtů 1491–1483 cm^{-1} , 1472–1465 cm^{-1} a 1458–1443 cm^{-1} . Ostrý avšak méně intenzivní absorpční pás při 1491–1483 cm^{-1} je obvykle připisován deformační vibraci methylenových funkčních skupin. Naproti tomu, o přítomnosti koncových $-\text{CH}_3$ skupin ve studovaných HK svědčí poměrně intenzivní absorpční pás, který odpovídá deformační vibraci C–H vazeb v methylových skupinách, jehož specifická absorpce je vytyčena vlnočty 1472–1465 cm^{-1} . V případě absorpčního pásu lokalizovaného v oblasti 1458–1443 cm^{-1} nejsme schopni rozlišit, zda pozorovaná absorpce pochází z deformačních vibrací $-\text{CH}_2-$ nebo $-\text{CH}_3$ alifatických funkčních skupin. Na přítomnost delších nebo rozvětvených alifatických řetězců, vyjma vzorku HK izolované z lesní půdy *Humic Podzol* (P1HK), poukazuje absorpční pás, který byl lokalizován při $720 \pm 2 \text{ cm}^{-1}$. Přítomnost tohoto absorpčního pásu v infračerveném spektru je typická pro sloučeniny (alkany) stávajících se ze čtyř a více methylenových skupin. Absence absorpčního pásu při 720 cm^{-1} v FSD-DRIFTS spektru P1HK je s největší pravděpodobností způsobena silnou mineralizací HK anorganickými sloučeninami (montmorillonit, případně křemen v krystalické a amorfní modifikaci), které mají v této části IR spektra svoji specifickou absorpci. Ve všech FSD-DRIFTS spektrech vzorků HK byly identifikovány intenzitně proměnlivé absorpční pásy, které jsou obvykle připisovány deformačním vibracím C–H vazeb v methylových skupinách, jejichž specifická absorpce je vymezena oblastí 1356–1346 cm^{-1} a 1330–1323 cm^{-1} . Také je nutné podotknout, že tyto absorpční pásy odpovídající deformačním vibracím v $-\text{CH}-$ skupinách mají v IR spektrech nejčastěji podobu dubletu, jestliže však nejsou maskovány intenzivnějšími absorpčními pásy solí karboxylových kyselin tj. karboxylátů (COO^-). Na výskyt delších resp. rozvětvených alifatických řetězců s výjimkou vzorků HK izolovaných z lesní půdy *Humic Podzol* (P1HK a P2HK) poukazuje absorpční pás při 1069–1060 cm^{-1} , který je tradičně pokládán za indikátor skeletálních vibrací C–C vazeb v alifatických skupinách. Podle Ibarri a spol. [103] absorpční pás při 1176–1170 cm^{-1} můžeme připsat nejen asymetrické valenční vibraci C–O–C vazeb v alkyl-etherech, ale i valenční vibraci C–O vazeb ve fenolických $-\text{OH}$ skupinách. Rovněž je nutné říci, že po aplikaci Fourierovy autodekonvoluce byly ve všech FSD spektrech lokalizovány poměrně intenzivní absorpční pásy v oblastech vlnočtů 1129–1116 cm^{-1} , $\approx 1090 \text{ cm}^{-1}$, 1110–1104 cm^{-1} a v neposlední řadě i 1085–1075 cm^{-1} , které jsou tradičně prisuzovány valenční asymetrické vibraci C–O–C a valenční symetrické vibraci C–O vazeb v alifatických etherech a sekundárních alkoholech. Jak již bylo diskutováno výše, v této části IR spektra přispívají

svojí absorpcí i aromatické estery a aromáty, a proto musí být tyto sloučeniny brány v úvahu. V případě HK izolované z lesní půdy *Humic Podzol* (PHK) nelze ani vyloučit, že poměrně výrazný absorpční pás při 1117 cm^{-1} odpovídá valenční vibraci Si–O vazeb v křemenu, kaolinitu anebo montmorillonitu s ohledem na vysoký obsah popela v tomto analyzovaném vzorku. Jak je z Obr. 11b patrné, i v tomto případě se po aplikaci Fourierovy autodekonvoluce absorpční pásy lokalizované v oblastech $1063\text{--}1050\text{ cm}^{-1}$, $1040\text{--}1030\text{ cm}^{-1}$, $987\text{--}980\text{ cm}^{-1}$, $975\text{--}961\text{ cm}^{-1}$ a $945\text{--}942\text{ cm}^{-1}$ nacházely při totožných vlnótech, nicméně jejich intenzita byla mnohem vyšší v porovnání s původními difuzními IR spektry. To vše nepochybně přispělo k lepší identifikaci a do značné míry i interpretaci absorpčních pásů, které v sobě skrývají informace o specifických absorpcích jednotlivých funkčních skupin. Tyto absorpční pásy lokalizované v FSD spektrech jsou obvykle připisovány valenční symetrické vibraci C–O a valenční vibraci Si–O vazeb v primárních alkoholech, polysacharidech a jílových minerálech tzn. kaolinitech a montmorillonitech. Absorpční pás při $1013\text{--}1000\text{ cm}^{-1}$ odpovídá s největší pravděpodobností rovinné deformační vibraci C–H vazeb v aromatických sloučeninách, jak je patrné z reference [181].

Na Obr. 12a jsou uvedena difuzní infračervená spektra standardů HK izolovaných z úrodné půdy *Elliott Soil*, rašeliny *Pahokee Peat* a oxidovaného hnědého uhlí *Leonardite*. Z porovnání naměřených DRIFTS spekter vzorků HK je zřejmé, že infračervená spektra standardů HK mají monotónnější průběh v celém rozsahu použitého IR záření a v neposlední řadě obsahují nižší počet absorpčních pásů, které odpovídají specifickým vibracím jednotlivých funkčních skupin. Absence některých absorpčních pásů může být vysvětlena tím, že v naměřených IR spektrech standardů HK dochází k splynutí jednotlivých absorpčních maxim do jednoho širšího pásu. Takový absorpční pás pak obsahuje určitý počet nevýrazných maxim případně ramének, kterým obvykle nelze hodnotu vlnótu stanovit. I v tomto případě byla naměřená FTIR-DRIFTS spektra standardů HK vyhodnocena na základě odborné literatury [11, 161, 210–215, 218].

Široký absorpční pás lokalizovaný v oblasti $\approx 3600\text{--}3200\text{ cm}^{-1}$ s maximem specifické absorpce při $3177\text{--}3139\text{ cm}^{-1}$ je výhradně připisován valenčním vibracím O–H a N–H vazeb v karboxylových kyselinách, fenolech, alkoholech a v neposlední řadě i v primárních a sekundárních amidech. Jak již bylo diskutováno dříve, především hydroxylové skupiny v karboxylových kyselinách velmi ochotně tvoří v HL resp. DOM intermolekulární vodíkové můstky a poskytují tak velmi široký a intenzivní absorpční pás. Rovněž si nelze nepovšimnout, že tento absorpční pás byl v případě standardů HK poněkud výraznější. Pravděpodobně je to způsobeno tím, že tyto vzorky obsahovaly oproti HK izolovaných z terestriálních přírodních matric vyšší adsorbovanou vlhkost, jejíž hodnota byla termogravimetricky stanovena v rozmezí 6,20–7,91 hm. %. V případě standardů HK *Elliott Soil* a *Pahokee Peat* byl v jejich difuzních spektrech identifikován pouze jeden absorpční pás při $2938 \pm 1\text{ cm}^{-1}$ odpovídající asymetrické valenční vibraci C–H vazeb v methylenových skupinách. Naproti tomu, byly v DRIFTS spektru vzorku LEOHK lokalizovány absorpční pásy při 2927 cm^{-1} a 2854 cm^{-1} , které jsou tradičně připisovány asymetrickým a symetrickým valenčním vibracím C–H vazeb v methylenových funkčních skupinách. Absence absorpčního pásu v oblasti $1485\text{--}1430\text{ cm}^{-1}$, který je připisován deformačním vibracím $-\text{CH}_3$ a $-\text{CH}_2-$ skupin je pravděpodobně způsobena silnou absorpcí karboxylových anionů (COO^-), které poskytují v této části IR spektra poměrně široký a intenzivní pás. Nelze ani však vyloučit příspěvek deformačních vibrací O–H vazeb fenolických $-\text{OH}$ skupin, jejichž specifická

absorpce je vymezena oblastí $\approx 1410 \text{ cm}^{-1}$. S výjimkou vzorku ESHK byl v jejich DRIFTS spektrech lokalizován absorpční pás v oblasti vlnočtů $1380\text{--}1378 \text{ cm}^{-1}$ odpovídající symetrické deformační vibraci C–H vazeb v methylových skupinách nebo symetrické valenční vibraci karboxylového anionu (COO^-). Přítomnost tohoto pásu v oblasti deformačních vibrací tzv. *fingerprintu* a absence signálu specifické absorpce methylových funkčních skupin v případě všech vzorků HK s výjimkou již zmiňovaného standardu HK *Elliott Soil* poukazuje na substituci této funkční skupiny elektronegativním atomem, kdy s největší pravděpodobností se jedná o již diskutovaný kyslík. Ve všech difuzních FTIR spektrech standardů HK byl identifikován méně výrazný absorpční pás v oblasti vlnočtů $3085\text{--}3079 \text{ cm}^{-1}$, který náleží symetrické valenční vibraci C–H skupin v aromatických sloučeninách. Přítomnost aromatických sloučenin ve studovaných standardech HK byla rovněž potvrzena absorpčními pásy, které jsou výhradně připisovány valenční “dýchací” vibraci $\dots\text{C}=\text{C}\dots$ vazeb v aromatickém kruhu, jejichž specifická absorpce je vytyčena oblastmi $1611\text{--}1609 \text{ cm}^{-1}$ a $1516 \pm 1 \text{ cm}^{-1}$. Jak je z Obr. 12a zřejmé, vyjma standardu HK pocházející z úrodné půdy *Elliott Soil* byly v jejich DRIFTS spektrech lokalizovány méně či více intenzivní absorpční pásy, které se nacházely v oblastech vlnočtů $883\text{--}873 \text{ cm}^{-1}$ a $\approx 819 \text{ cm}^{-1}$. Absorpční pás při $883\text{--}873 \text{ cm}^{-1}$ je obvykle přisuzován mimorovinné deformační vibraci C–H vazeb v 1,3-di-substituovaných aromatických jednotkách. Naproti tomu, absorpční pás lokalizovaný v oblasti $\approx 819 \text{ cm}^{-1}$ je tradičně připisován mimorovinné deformační vibraci C–H vazeb v 1,4-di-substituovaných aromatických sloučeninách. Jak již bylo diskutováno dříve, tyto absorpční pásy jsou s největší pravděpodobností indikátory strukturních jednotek ligninu (4-hydroxycinnamylalkoholu, koniferylalkoholu a v neposlední řadě i sinapylalkoholu). Ostrý a velmi intenzivní absorpční pás lokalizovaný v oblasti $1724\text{--}1718 \text{ cm}^{-1}$ odpovídá symetrické valenční vibraci karbonylových funkčních skupin v karboxylových kyselinách a aryl-esterech. V naměřených DRIFTS spektrech standardů HK si nelze nepovšimnout širokého absorpčního pásu lokalizovaného v oblasti $\approx 2700\text{--}2400 \text{ cm}^{-1}$ s maximem specifické absorpce při $2627 \pm 5 \text{ cm}^{-1}$, který je výhradně přisuzován valenční symetrické vibraci O–H \cdots O vazeb v karboxylových kyselinách vázaných vodíkovými můstky. Absorpční pás resp. raménko při 1683 cm^{-1} připadající symetrickým valenčním vibracím karbonylových funkčních skupin v chinonech, případně konjugovaných ketonech byl pozorován pouze u vzorku *Elliott Soil* HK. Ve všech DRIFTS spektrech standardů HK byl identifikován intenzivně proměnlivý absorpční pás, který je obvykle připisován deformační vibraci O–H vazeb fenolických –OH skupin, jehož vlnočet specifické absorpce je dán při $\approx 1410 \text{ cm}^{-1}$. Poměrně intenzivní absorpční pás lokalizovaný v oblasti $1234\text{--}1229 \text{ cm}^{-1}$ je výhradně připisován valenční asymetrické vibraci C–O a deformační vibraci O–H vazeb v karboxylových a fenolických –OH skupinách. V případě identifikace tohoto signálu musíme mít na paměti, že tento absorpční pás může odpovídat valenční asymetrické vibraci Ar–O skupiny v aromatických etherech. Méně výrazné absorpční pásy lokalizované v oblasti $1082\text{--}1076 \text{ cm}^{-1}$ jsou obvykle připisovány valenční asymetrické vibraci C–O–C a valenční symetrické vibraci C–O vazeb v alifatických etherech a sekundárních alkoholech. Tyto absorpční pásy byly pozorovány pouze u vzorku HK pocházející z úrodné půdy *Elliott Soil*. S výjimkou vzorku LEOHK byl v jejich difuzních FTIR spektrech identifikován absorpční pás připadající valenční symetrické vibraci C–O a valenční vibraci Si–O vazeb v primárních alkoholech, polysacharidech a silikátech, jejichž specifická absorpce je vymezena oblastí $1045\text{--}1040 \text{ cm}^{-1}$.



Obr. 12: a) FTIR-DRIFTS spektra standardů HK *Pahokee Peat*, *Elliott Soil* a *Leonardite*; b) jejich FSD-DRIFTS spektra

Na Obr. 12b jsou uvedena FSD-FTIR spektra standardů HK *Elliott Soil*, *Pahokee Peat* a *Leonardite*. Absorpční pás při $\approx 1742 \text{ cm}^{-1}$ připadající valenční symetrické vibraci C=O skupin alifatických esterů karboxylových kyselin byl pozorován pouze u vzorku LEOHK. Přítomnost alifatických esterů byla kromě toho potvrzena absorpčními pásy, jejichž pozice byly lokalizovány v oblasti $1195\text{--}1155 \text{ cm}^{-1}$ odpovídající valenční vibraci C–O vazeb v alkyl-esterech. V infračervených FSD-DRIFTS spektrech HK si nelze nepovšimnout tří poměrně intenzivních absorpčních pásů, které byly lokalizovány v oblastech vlnočtů $1729\text{--}1716 \text{ cm}^{-1}$, $1288\text{--}1267 \text{ cm}^{-1}$ a $1124 \pm 1 \text{ cm}^{-1}$. Ostrý a intenzivní absorpční pás při $1729\text{--}1716 \text{ cm}^{-1}$ je zpravidla připisován valenční symetrické vibraci karboxylové skupiny v aryl-esterech. Intenzitně proměnlivé absorpční pásy lokalizované v oblasti tzv. “otisku palce” jsou tradičně přisuzovány valenční vibraci Ar–C–O a O–C–C vazeb v aromatických esterech, jejichž specifická absorpce nastává v oblasti $1288\text{--}1267 \text{ cm}^{-1}$ a $\approx 1124 \text{ cm}^{-1}$. Bohužel v případě absorpčního pásu při 1716 cm^{-1} nejsme schopni rozlišit, zda pozorovaná absorpce pochází z valenčních vibrací C=O funkčních skupin vázaných v karboxylových kyselinách nebo v jejich esterech. Vyjma vzorku HK izolované z rašeliny *Pahokee Peat* byl v jejich FSD spektrech lokalizován absorpční pás v oblasti $1589\text{--}1587 \text{ cm}^{-1}$, který náleží asymetrické valenční vibraci C=O skupin v karboxylátech (COO^-). Na přítomnost aromatických sloučenin poukazuje absorpční pás při $1100\text{--}1092 \text{ cm}^{-1}$ odpovídající rovinné deformační vibraci C–H vazeb. V oblasti deformačních vibrací aromatických C–H vazeb si nelze nepovšimnout čtyř intenzivních absorpčních pásů, které se nacházejí v oblastech vlnočtů $897\text{--}869 \text{ cm}^{-1}$, 842--

798 cm^{-1} a 771–747 cm^{-1} . Dublet při $892 \pm 2 \text{ cm}^{-1}$ a $873 \pm 4 \text{ cm}^{-1}$ je zpravidla připisován mimorovinné deformační vibraci C–H vazeb v *meta*-substituovaných aromatických sloučeninách odvozených od stavebních jednotek ligninu. Naproti tomu, absorpční pásy lokalizované v oblastech 842–798 cm^{-1} a 771–747 cm^{-1} jsou tradičně pokládány z indikátory *ortho*- a *para*-substituovaných aromatických sloučenin. Rovněž je nutné říci, že po aplikaci Fourierovy autodekonvoluce byly získány “nové” absorpční pásy, které nebyly v naměřených DRIFTS spektrech standardů HK doposud pozorovány, případně se jevíly pouze jako nevýrazná raménka bez zjevného maxima. Ve všech difuzních FSD spektrech standardů HK byly identifikovány intenzivně proměnlivé absorpční pásy, které jsou tradičně připisovány symetrickým valenčním vibracím karbonylových skupin v chinonech a konjugovaných ketonech, jejichž specifická absorpce je vymezena oblastí 1684–1629 cm^{-1} . Poměrně výrazné absorpční pásy lokalizované v oblastech $\approx 1567 \text{ cm}^{-1}$ a 1543–1539 cm^{-1} jsou obvykle přisuzovány valenčním vibracím C–N a deformačním vibracím N–H vazeb v sekundárních amidech. Jak je z Obr. 12b zřejmé, na přítomnost alifatických funkčních skupin v analyzovaných standardech HK poukazují méně či více intenzivní absorpční pásy lokalizované v oblastech vlnočtů $\approx 1489 \text{ cm}^{-1}$, 1461–1461 cm^{-1} a v neposlední řadě i 1447 cm^{-1} . Velmi ostrý a intenzivní absorpční pás při $\approx 1489 \text{ cm}^{-1}$ přisuzovaný deformační vibraci –CH₂– skupin byl pozorován pouze v infračerveném spektru vzorku HK izolované z *Leonarditu*. Naproti tomu, o přítomnosti alkylových –CH₃ skupin ve studovaných standardech HK svědčí poměrně výrazný absorpční pás, který je tradičně připisován deformační vibraci C–H vazeb v methylových funkčních skupinách, jejichž vlnočet specifické absorpce je dán rozmezím 1464–1461 cm^{-1} . Jak již bylo diskutováno dříve, v případě absorpčního signálu při $\approx 1447 \text{ cm}^{-1}$ nejsme schopni rozlišit, zda pozorovaná absorpce je indikována deformačními vibracemi –CH₃ anebo –CH₂– skupin. Tento absorpční pás byl pozorován rovněž jen u vzorku LEOHK. Výskyt delších nebo rozvětvených alkylových řetězců v analyzovaných standardech HK byl prozrazen přítomností typického absorpčního pásu, který odpovídá symetrické deformační vibraci C–H vazeb v alifatických strukturách stávajících se ze čtyř a více methylenových skupin, jehož specifická absorpce je vytyčena vlnočtem $719 \pm 2 \text{ cm}^{-1}$. Podle Stuartové [219] jsou čtyřčlenné *n*-alkylové řetězce charakterizovány absorpčním pásem výhradně při 735 cm^{-1} , a proto se můžeme domnívat, že alifatické strukturní jednotky studovaných HK jsou tvořeny delšími alkylovými řetězci tzn. alkyly $> -\text{C}_4\text{H}_9$. Jak je z Obr. 12b patrné, ve všech difuzních FSD-FTIR spektrech byl lokalizován dublet absorpčních pásů, který je tradičně pokládán za ukazatele deformačních vibrací C–H vazeb v –CH– skupinách, jejichž specifická absorpce je vymezena oblastí 1358–1354 cm^{-1} a 1330–1328 cm^{-1} . Jak uvádějí ve své práci Terkhi a spol. [111] v případě solí HL tzn. *humátů* a *fulvátů* je tento dublet velmi často maskován silnou absorpcí karboxylového anionu. Na výskyt delších resp. rozvětvených alkylových řetězců vyjma vzorku ESHK poukazuje absorpční pás při 1064–1060 cm^{-1} , který je obvykle pokládán za ukazatele skeletálních vibrací C–C vazeb v alifatických skupinách. Rovněž je na tomto místě nutné říci, že po použití Fourierovy autodekonvoluce byly v oblasti IR záření vytyčeného vlnočty 1218–1204 cm^{-1} nalezeny dosud nediskutované absorpční pásy. Ve všech difuzních infračervených FSD spektrech standardů HK byl identifikován intenzivně proměnlivý absorpční pás v oblasti 1218–1204 cm^{-1} odpovídající výhradně jen deformační vibraci O–H vazeb fenolických –OH skupin. Na druhou stranu by bylo pošetilé tento absorpční pás přiřadit pouze fenolickým –OH skupinám s ohledem na nabízející se ještě jednu možnost identifikace tohoto absorpčního signálu. Kromě toho můžeme tento absorpční pás připisat asymetrické valenční vibraci Ar–O

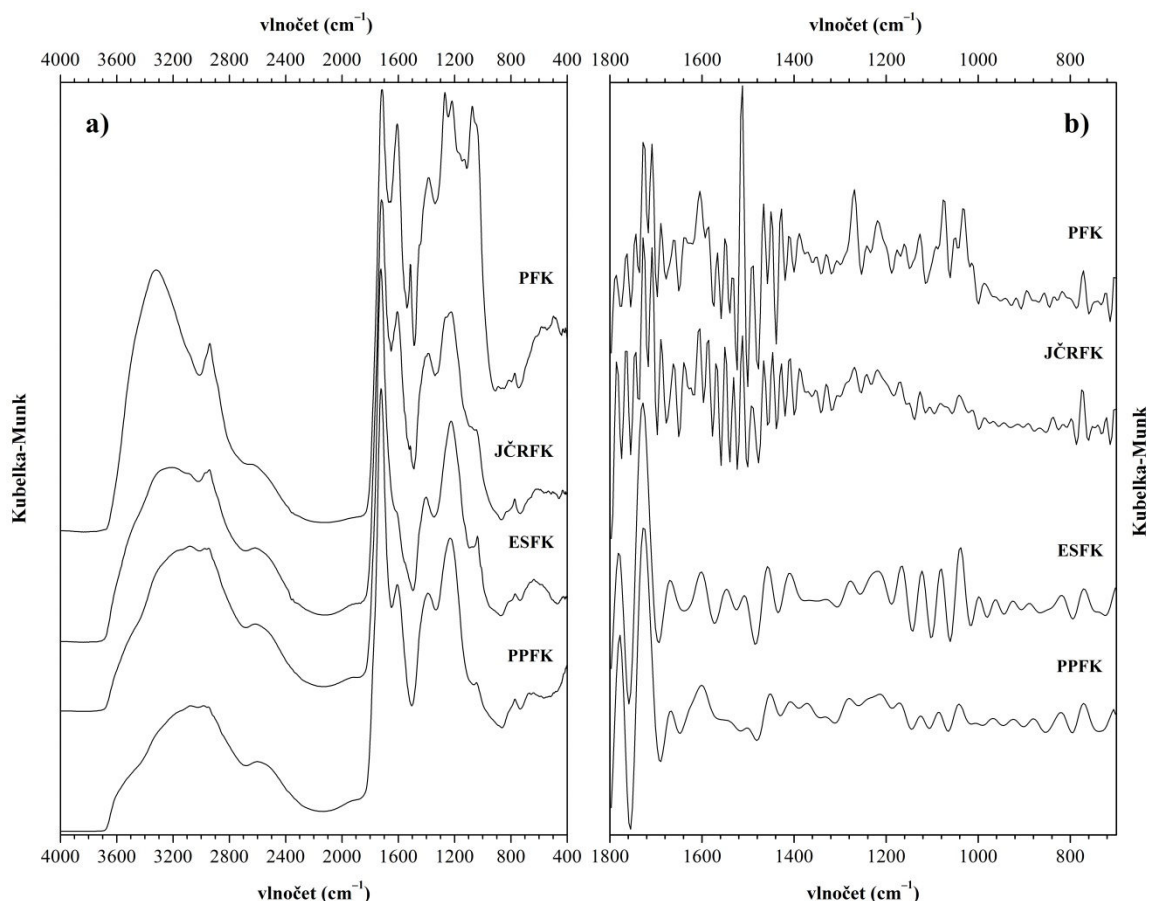
a C–O–C vazeb v aromatických a nenasycených etherech. Jak je z Obr. 12b zřejmé, po aplikaci Fourierovy autodekonvoluce byly ve všech FSD spektrech lokalizovány poměrně intenzivní absorpční pásy v oblastech vlnočtů $1125 \pm 1 \text{ cm}^{-1}$ a $1085\text{--}1075 \text{ cm}^{-1}$, které jsou tradičně přisuzovány valenční asymetrické vibraci C–O–C a valenční symetrické vibraci C–O vazeb v alifatických etherech a sekundárních alkoholech. Absorpční pás při $1125 \pm 1 \text{ cm}^{-1}$ může být rovněž připsán i valenční vibraci O–C–C vazeb v aryl-esterech. Mimoto, Fourierova autodekonvoluce odhalila celou řadu absorpčních pásů, které doposud nebyly v difuzních IR spektrech standardů HK identifikovány. Ve všech FSD spektrech standardů HK byly lokalizovány méně či více intenzivní absorpční pásy v oblastech vlnočtů $1041\text{--}1027 \text{ cm}^{-1}$, $997\text{--}974 \text{ cm}^{-1}$, $947\text{--}940 \text{ cm}^{-1}$ a v neposlední řadě i $920\text{--}918 \text{ cm}^{-1}$, které jsou výhradně připisovány valenční symetrické vibraci C–O a valenční vibraci Si–O vazeb v primárních alkoholech, polysacharidech a jílových minerálech jako je kaolinit a montmorillonit. O přítomnosti aromatických sloučenin svědčí absorpční pás při 1015 cm^{-1} odpovídající rovinné deformační vibraci aromatických C–H vazeb, který byl pozorován pouze u vzorku LEOHK.

Z porovnání naměřených difuzních spekter vzorků FK izolovaných z lesní půdy *Humic Podzol*, jihočeské rašeliny a jejich standardů *Elliott Soil* a *Pahokee Peat* je zřejmé, že infračervená spektra FK se navzájem lišily až na některé výjimky jen velmi málo, a proto budou v této disertační práci diskutovány společně oproti HK, jejichž DRIFTS spektra vykazovaly markantnější rozdíly. Na Obr. 13a jsou uvedena FTIR-DRIFTS spektra vzorků FK izolovaných z lesní půdy *Humic Podzol* (PFK), jihočeské rašeliny (JČRFK), úrodné půdy *Elliott Soil* (ESFK) a v neposlední řadě i rašeliny *Pahokee Peat* (PPFK).

V difuzních infračervených spektrech vzorků FK byl lokalizován obligátní široký absorpční pás v oblasti $\approx 3700\text{--}3200 \text{ cm}^{-1}$ s maximem specifické absorpce v rozmezí vlnočtů $3323\text{--}3223 \text{ cm}^{-1}$, který je čistě připisován vazebným vibracím O–H a N–H vazeb v karboxylových a –OH fenolických funkčních skupinách, dále pak v alkoholech, primárních a sekundárních amidech, případně intramolekulárních vodíkových vazeb O–H \cdots O v adsorbovaných molekulách vzdušné vlhkosti. O přítomnosti těchto intramolekulárních interakcí svědčí i absorpční pás lokalizovaný v oblasti $2619\text{--}2602 \text{ cm}^{-1}$ odpovídající valenční symetrické vibraci O–H \cdots O vazeb v dimerech karboxylových kyselin vázaných vodíkovými můstky. Vyjma standardů FK byl v jejich DRIFTS spektrech identifikován intenzivně proměnlivý absorpční pás při $2941 \pm 1 \text{ cm}^{-1}$, který je tradičně přisuzován valenčním asymetrickým vibracím C–H vazeb v methylenových funkčních skupinách. Naproti tomu, byl v difuzních infračervených spektrech FK izolovaných z úrodné půdy *Elliott Soil* a rašeliny *Pahokee Peat* lokalizován dublet připadající asymetrickým valenčním vibracím alifatických C–H vazeb v koncových –CH₃ skupinách, jejichž specifická absorpce je vymezena oblastí $2975\text{--}2947 \text{ cm}^{-1}$. V porovnání s HK izolovanými z terestriálních a nižších rostlinných přírodních matric nebyly v DRIFTS spektrech FK pozorovány žádné absorpční pásy v oblasti vlnočtů $1485\text{--}1430 \text{ cm}^{-1}$, které jsou připisovány deformačním vibracím alifatických –CH₃ a –CH₂ skupin. Absence těchto absorpčních signálů v difuzních spektrech FK je s největší pravděpodobností způsobena silnou absorpcí solí karboxylových kyselin tj. karboxylátů (COO⁻), které poskytují v této části IR spektra poměrně široké a intenzivní pásy. Kromě toho nelze ani vyloučit subvenci deformačních vibrací O–H vazeb fenolických –OH skupin, jejichž specifická absorpce je vymezena oblastí $\approx 1410 \text{ cm}^{-1}$. S výjimkou vzorku FK pocházející z úrodné půdy *Elliott Soil* (ESFK) byl v jejich FTIR-DRIFTS spektrech lokalizován absorpční

pás v oblasti $1390\text{--}1387\text{ cm}^{-1}$, který je obvykle připisován symetrické tzn. deštníkové deformační vibraci C–H vazeb v methylových skupinách nebo symetrické valenční vibraci karboxylového anionu COO^- . Jak uvádí ve své monografii Mohan [220], přítomnost tohoto signálu a absence absorpčních pásů v oblasti vazebných vibrací $-\text{CH}_3$ skupin v případě vzorků FK izolovaných z lesní půdy *Humic Podzol* (PFK) a jihočeské rašeliny (JČRFK) svědčí o substituci této koncové skupiny elektronegativním atomem, s ohledem na strukturní morfologii HL přichází v úvahu např. atom kyslíku. S výjimkou vzorku PFK byl v jejich difuzních FTIR spektrech identifikován méně výrazný absorpční pás v oblasti $3094\text{--}3078\text{ cm}^{-1}$ odpovídající symetrické vazebné vibraci C–H vazeb v aromatických sloučeninách. Kromě toho o přítomnosti aromatických strukturních jednotek ve studovaných FK svědčí i intenzitně proměnlivé absorpční pásy, které jsou bezesporu považovány za ukazatele valenčních skeletálních vibrací $\dots\text{C}=\text{C}=\text{C}\dots$ vazeb v arylových sloučeninách, jejichž vlnčet specifické absorpce je vymezen oblastmi $1607 \pm 1\text{ cm}^{-1}$ a $1513 \pm 1\text{ cm}^{-1}$. Z důvodu silné absorpce karbonylových funkčních skupin v karboxylových kyselinách, aryl-esterech a v neposlední řadě i absorpce N–H a C–N vazeb v sekundárních amidech nebyl absorpční signál při $1513 \pm 1\text{ cm}^{-1}$ v případě standardů FK pozorován. Ve všech difuzních spektrech analyzovaných FK byl identifikován ostrý a velice intenzivní absorpční pás v oblasti vlnčetů $1724\text{--}1716\text{ cm}^{-1}$, který je zpravidla přisuzován symetrickým vazebným vibracím karbonylových funkčních skupin v karboxylových kyselinách nebo aromatických esterech. Nepříliš intenzivní absorpční pás při $\approx 1659\text{ cm}^{-1}$ připadající symetrickým valenčním vibracím karbonylových funkčních skupin v chinonech, případně konjugovaných ketonech byl pozorován pouze u vzorku PFK. Vyjma standardů FK (ESFK a PPFK) byl v jejich DRIFTS spektrech lokalizován méně či více intenzivní absorpční pás v oblasti specifické absorpce $1267\text{--}1263\text{ cm}^{-1}$ odpovídající asymetrické vibraci C–O–C a valenční vibraci Ar–C–O vazeb v aromatických etherech a esterech. Poměrně intenzivní absorpční pás při $1231\text{--}1220\text{ cm}^{-1}$ je tradičně pokládán za ukazatele valenční asymetrické vibrace C–O a deformační vibrace O–H vazeb v karboxylových a fenolických –OH skupinách. Na přítomnost aryl-esterů poukazuje absorpční pás s vlnčetem specifické absorpce při $\approx 1131\text{ cm}^{-1}$, který je zpravidla připisován valenční vibraci O–C–C vazeb v aromatických esterech. Tento absorpční signál byl pozorován pouze v difuzním IR spektru FK izolované z lesní půdy *Humic Podzol*. S výjimkou standardu FK pocházející z rašeliny *Pahokee Peat* (PPFK) byl v jejich DRIFTS spektrech identifikován intenzitně proměnlivý absorpční pás, který je zpravidla připisován asymetrické vazebné vibraci C–O–C a symetrické vazebné vibraci C–O vazeb v alkyl-etherech a sekundárních alkoholech, jejichž specifická absorpce je vyznačena oblastí $1085\text{--}1074\text{ cm}^{-1}$. Ve všech difuzních FTIR spektrech analyzovaných vzorků FK byl identifikován intenzitně nevýrazný absorpční pás v oblasti vlnčetů $1047\text{--}1038\text{ cm}^{-1}$ odpovídající valenční symetrické vibraci C–O a valenční vibraci Si–O vazeb v primárních alkoholech, polysacharidech a silikátech.

Na Obr. 13b jsou uvedena difuzní FTIR spektra FK izolovaných z lesní půdy *Humic Podzol* (PFK), jihočeské rašeliny (JČRFK) a jejich odpovídajících standardů *Elliott Soil* a *Pahokee Peat* po uplatnění Fourierovy autodekonvoluce v oblasti tzv. “otisku palce” IR záření. Z porovnání získaných FSD-DRIFTS spekter FK je zřejmé, že infračervená FSD spektra standardů FK mají monotónnější průběh v celém rozsahu *fingerprintu* tj. $\approx 1800\text{--}700\text{ cm}^{-1}$ a v neposlední řadě obsahují nižší počet pásů, které odpovídají specifickým absorpcím rozličných funkčních skupin.



Obr. 13: a) FTIR-DRIFTS spektra FK izolovaných z lesní půdy *Humic Podzol*, jihočeské rašeliny a jejich standardů *Elliott Soil* a *Pahokee Peat*; b) jejich FSD-DRIFTS spektra

S výjimkou standardů FK (ESFK a PPFK) byly v jejich FSD spektrech lokalizovány poměrně intenzivní absorpční pásy v oblastech vlnočtů $1744 \pm 1 \text{ cm}^{-1}$, $1160\text{--}1151 \text{ cm}^{-1}$ a 1051 cm^{-1} , které jsou obvykle připisovány valenční symetrické vibraci C=O, valenční vibraci C–C–O a O–C–C vazeb v alkyl-esterech. O přítomnosti alifatických esterů v analyzovaných FK svědčí i absorpční pás odpovídající vazebné vibraci C–C–O vazeb v alkyl-esterech, jehož specifická absorpce náleží vlnočtům $1175\text{--}1166 \text{ cm}^{-1}$. Naproti tomu, přítomnost aromatických esterů ve studovaných FK byla prozrazena čtyřmi intenzitně proměnlivými absorpčními pásy při $1727 \pm 1 \text{ cm}^{-1}$, $1307\text{--}1269 \text{ cm}^{-1}$ a $1126\text{--}1106 \text{ cm}^{-1}$. Ostrý a nejintenzivnější absorpční pás při $1727 \pm 1 \text{ cm}^{-1}$ je hlavním ukazatelem vazebných symetrických vibrací karbonylových funkčních skupin v aryl-esterech karboxylových kyselin. Kromě toho o přítomnosti aromatických esterů v analyzovaných FK svědčí i zbylé dva absorpční pásy lokalizované v oblastech vlnočtů $1307\text{--}1269 \text{ cm}^{-1}$ a $1126\text{--}1106 \text{ cm}^{-1}$, které jsou obvykle připisovány valenční vibraci Ar–C–O a O–C–C vazeb v aryl-esterech HL. Poměrně intenzivní absorpční pás při $1586 \pm 1 \text{ cm}^{-1}$ odpovídající vazebné asymetrické vibraci C=O vazeb v karboxylovém anionu byl pozorován pouze u vzorků FK izolovaných z lesní půdy *Humic Podzol* a jihočeské rašeliny. Vyjma standardů FK byl v jejich difuzních FSD spektrech pozorován triplet absorpčních pásů v oblasti vlnočtů $1688 \pm 1 \text{ cm}^{-1}$, $\approx 1638 \text{ cm}^{-1}$ a v neposlední řadě i $1627 \pm 1 \text{ cm}^{-1}$, jenž je tradičně připisován symetrickým valenčním vibracím karbonylových funkčních skupin v chinonech, konjugovaných ketonech rovněž i v primárních a sekundárních amidech. V případě standardů FK byl v jejich FSD-DRIFTS spektrech pozorován pouze absorpční pás při $\approx 1668 \text{ cm}^{-1}$. Na přítomnost sekundárních

amidů v analyzovaných FK poukazují absorpční pásy identifikované v oblasti vlnočtů 1568–1566 cm^{-1} a 1549–1532 cm^{-1} , které jsou zpravidla připisovány vazebným vibracím C–N a deformačním vibracím N–H vazeb v těchto derivátech karboxylových kyselin. V difuzních FSD-FTIR spektrech vzorků FK si nelze nepovšimnout tří charakteristických absorpčních pásů lokalizovaných v oblastech $\approx 1491 \text{ cm}^{-1}$, $1465 \pm 1 \text{ cm}^{-1}$ a $1457\text{--}1447 \text{ cm}^{-1}$. S výjimkou standardů FK byly v jejich FSD spektrech identifikovány ostré a poměrně intenzivní absorpční pásy, které jsou tradičně prisuzovány deformačním vibracím alifatických C–H v methylových a methylenových funkčních skupinách, jejichž vlnočty specifické absorpce je vymezen oblastmi IR záření $1465 \pm 1 \text{ cm}^{-1}$ a $\approx 1491 \text{ cm}^{-1}$. Jak je z Obr. 13b zřejmé, o přítomnosti těchto alkylů vypovídá i absorpční pás lokalizovaný v oblasti specifické absorpce --CH_3 a $\text{--CH}_2\text{--}$ skupin, který je výhradně připisován deformačním vibracím C–H vazeb v těchto funkčních skupinách, jejichž vlnočty charakteristické absorpce je vytyčen rozmezím $1457\text{--}1447 \text{ cm}^{-1}$. Intenzitně proměnlivý absorpční pás při $732\text{--}721 \text{ cm}^{-1}$ je čistě připisován symetrické deformační kývavé vibraci C–H vazeb v $\text{--CH}_2\text{--}$ skupinách a poukazuje tak na přítomnost delších nebo rozvětvených alifatických řetězců ve studovaných FK. Guignard a spol. [221] zjistili, že rašeliništní HL ve své struktuře obsahovaly minoritní podíl esterů mastných kyselin o celkové délce alifatického řetězce $\text{C}_{17}\text{--}\text{C}_{35}$. S výjimkou standardů FK si v jejich difuzních FSD spektrech nelze nepovšimnout charakteristického dubletu při $1351 \pm 1 \text{ cm}^{-1}$ a $\approx 1330 \text{ cm}^{-1}$, který je obvykle připisován deformačním vibracím alifatických C–H vazeb v methylových skupinách. V případě standardů FK byl v jejich FSD-DRIFTS spektrech pozorován pouze absorpční signál při $1331 \pm 1 \text{ cm}^{-1}$ z důvodu silné absorpce karboxylových anionů v oblasti IR záření vymezeného vlnočty $1390\text{--}1370 \text{ cm}^{-1}$. Absorpční pás při $1241 \pm 1 \text{ cm}^{-1}$ odpovídající asymetrické vibraci C–O–C vazeb v aryl-etherech byl pozorován pouze u vzorků FK izolovaných z jihočeské rašeliny a lesní půdy *Humic Podzol*. Jak je z Obr. 13b zřejmé, po použití Fourierovy autodekonvoluce byly v jejich difuzních FSD spektrech lokalizovány poměrně intenzivní absorpční pásy v oblasti vlnočtů $1086\text{--}1074 \text{ cm}^{-1}$, které jsou pokládány za ukazatele vazebných asymetrických vibrací C–O–C a vazebných symetrických vibrací C–O v alkyl-etherech a sekundárních alkoholech. Rovněž je na tomto místě nutné říci, že po aplikaci Fourierovy autodekonvoluce byly v difuzních FSD spektrech analyzovaných FK lokalizovány absorpční pásy v oblasti $1041\text{--}1031 \text{ cm}^{-1}$, které se nacházely při shodných vlnočtech, nicméně jejich intenzita byla mnohem vyšší v porovnání s původními difuzními IR spektry. Méně intenzivní absorpční pás při $\approx 1088 \text{ cm}^{-1}$ odpovídající rovinné deformační vibraci C–H vazeb v aromatických sloučeninách byl pozorován pouze u vzorku FK izolované z lesní půdy *Humic Podzol*. Ve všech difuzních FSD spektrech studovaných FK si nelze nepovšimnout charakteristického tripletu absorpčních pásů lokalizovaných v oblasti $894\text{--}856 \text{ cm}^{-1}$, $819\text{--}815 \text{ cm}^{-1}$ a v neposlední řadě i $750\text{--}732 \text{ cm}^{-1}$. O přítomnosti strukturních jednotek ligninu tj. koniferylalkohol a sinapylalkohol ve studovaných FK svědčí absorpční pás lokalizovaný v oblasti $894\text{--}856 \text{ cm}^{-1}$, který je obvykle připisován mimorovinné deformační vibraci C–H vazeb v *m*-substituovaných aromatických sloučeninách. Naproti tomu, absorpční signál identifikovaný v oblasti $819\text{--}815 \text{ cm}^{-1}$ je zpravidla považován za ukazatele *p*-kumarylalkoholových jednotek. Ve všech infračervených FSD-DRIFTS spektrech analyzovaných vzorků FK byl lokalizován intenzitně proměnlivý absorpční pás, který je obvykle připisován mimorovinné deformační vibraci C–H vazeb v *ortho*-substituovaných aromatických sloučeninách, jejichž specifická absorpce je vymezena oblastí $750\text{--}732 \text{ cm}^{-1}$. Široký a poměrně intenzivní absorpční pás lokalizovaný v oblasti $1041\text{--}1032 \text{ cm}^{-1}$ připadající vazebné vibraci Si–O vazeb v kaolinitu byl pozorován pouze u vzorků FK izolovaných z lesní

půdy *Humic Podzol* a rašeliny *Pahokee Peat*. Jak je z Obr. 13a, b zřejmé, na silnou mineralizaci těchto vzorků anorganickými sloučeninami poukazují i další absorpční pásy, které byly lokalizovány v oblastech vlnočtů $771 \pm 1 \text{ cm}^{-1}$ a $498\text{--}473 \text{ cm}^{-1}$. Tyto absorpční signály jsou tradičně připisovány vazebné vibraci Si–O, deformační vibraci Si–O–Si a Si–O–Al vazeb v křemenu a jeho amorfní modifikaci, montmorillonitu a kaolinitu. Kromě toho je na tomto místě nutné říci, že dosažené výsledky nejsou nikterak překvapivé s ohledem na již zjištěný obsah popela, který byl v tomto případě stanoven v rozmezí 5,95–6,53 hm. %.

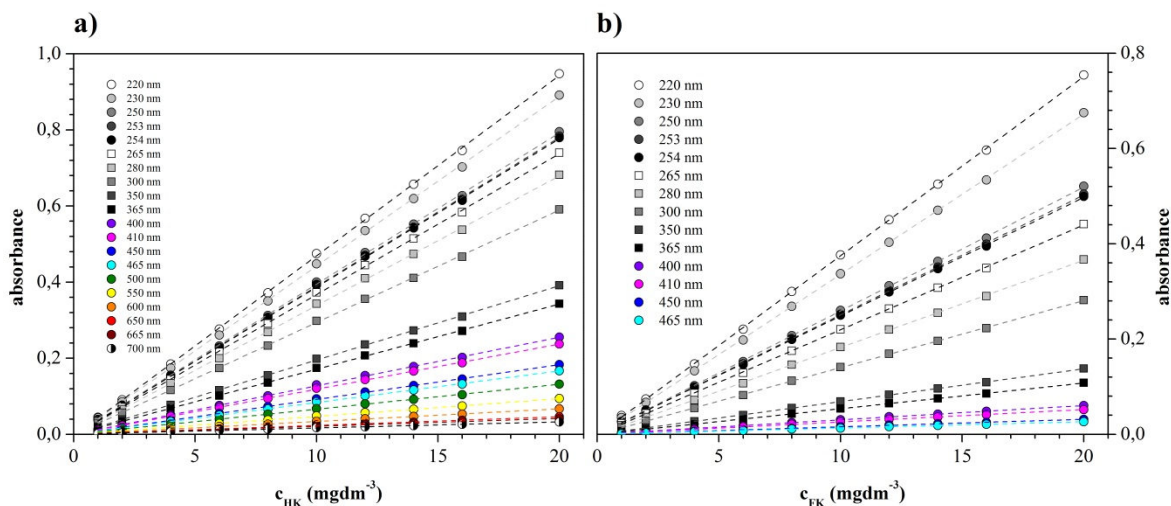
6.4 Ustálená fluorescenční spektrometrie huminových látek

6.4.1 Vnitřní filtrační efekt huminových látek

Primární ideou této části disertační práce bylo ověřit a otestovat efektivnost použití obvykle využívaného korekčního vztahu navrženého Lakowiczem v oblasti studia a charakterizace HL pomocí ustálené (steady-state) fluorescenční spektrometrie. S ohledem na rozsáhlý počet publikovaných prací věnovaných fluorescenční spektrometrii HL resp. DOM musíme však konstatovat, že vnitřnímu filtračnímu efektu je doposud věnováno jen velmi málo vědeckého zájmu. Jak již bylo diskutováno v kapitole 3.3, problematika vnitřního filtračního efektu prvního a druhého druhu roztoků HL je mnohými autory opomíjena a přehlížena, a proto se ve svých odborných publikacích s jistou mírou relevance dopouštějí zavádějící interpretace naměřených experimentálních dat. Kromě toho musíme na tomto místě říci, že vnitřní filtrační efekt, který je v odborné literatuře znám pod zkratkou IFE – *inner filter effect* ovlivňuje nejen výslednou intenzitu fluorescence roztoků HL, ale i polohu fluorescenčních maxim ve spektrech a v neposlední řadě i hodnoty fluorescenčních indexů, kterými jsou tyto unikátní “biokoloidní” sloučeniny charakterizovány. Jak je z Obr. 14 zřejmé, nejsilněji se bude vnitřní filtrační efekt prvního a druhého druhu projevovat v oblasti ultrafialového záření UVC a UVB, které jsou vymezeny v pásmu vlnových délek 200–320 nm. Bohužel nezřídka se můžeme setkat v odborných publikacích, a to i renomovaných autorů, s fluorescenčními spektry HL resp. DOM, které byly naměřeny z roztoků o hmotnostní koncentraci 100–200 $\text{mg}\cdot\text{dm}^{-3}$ [134–137]. Rovněž se nabízí otázka, zda v případě takto koncentrovaných roztoků HL může být vnitřní filtrační efekt stále řádně korigován v důsledku silné absorpce těchto “biokoloidních” sloučenin v UV oblasti elektromagnetického záření. Obecně v molekulové absorpční spektrometrii v ultrafialové a viditelné oblasti (UV/Vis), podobně jako u jiných spektrometrických metod, platí Lambert-Beerův zákon pouze jen v omezeném rozsahu absorbancí tzn. $A \leq 1,5$. Tuto podmínku splňují roztoky HL resp. DOM, jejichž hmotnostní koncentrace jsou zpravidla nižší tj. $c_{\text{HL}} < 30 \text{ mg}\cdot\text{dm}^{-3}$.

Na Obr. 14 jsou uvedeny grafické závislosti absorbance na hmotnostní koncentraci standardů HL (ESHK a ESFK) při vlnových délkách, které byly odvozeny od absorpčních koeficientů a specifických hodnot absorbancí. Z důvodu lepší přehlednosti grafických závislostí nejsou v příslušných grafech hodnoty spolehlivosti R^2 uvedeny, nicméně jejich velikost pro jednotlivá proložení neklesla pod hodnotu $\approx 0,99$. Jak je z Obr. 14 zřejmé, lineární průběh grafické závislosti absorbance na hmotnostní koncentraci použitých HL svědčí o platnosti Lambert-Beerova zákona, i když naměřená UV/Vis spektra nevykazovala v celém rozsahu vlnových délek zjevná maxima. Kromě toho si můžeme povšimnout, že i přes absenci absorpčních maxim v naměřených UV/Vis spektrech standardů HL vykazují dané grafické závislosti lineární průběh při všech vlnových délkách napříč celým spektrem

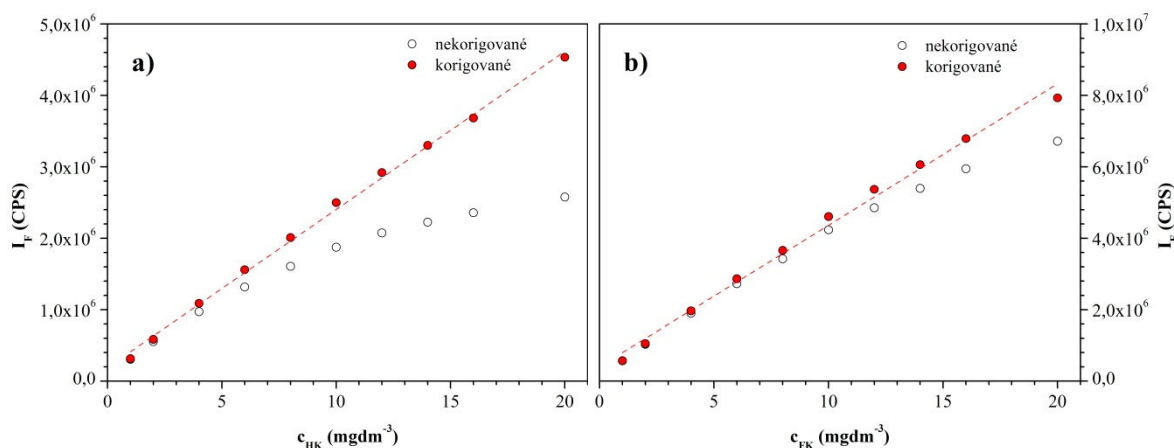
v ultrafialové a viditelné oblasti elektromagnetického záření. V obecném pohledu na dosažené výsledky můžeme konstatovat, že HK izolovaná z úrodné půdy *Elliott Soil* vykazuje v porovnání s jejím standardem FK silnější absorpci ve viditelné oblasti, která je v tomto případě vymezena oblastí 400–700 nm. Absorpce v této oblasti elektromagnetického záření tzn. 400–800 nm je především vázána na obsah organických sloučenin resp. funkčních skupin, které jsou nositeli charakteristického zbarvení těchto “biokoloidních” sloučenin. V odborné literatuře se tyto organické sloučeniny respektive funkční skupiny nazývají chromofory, anebo chromoforní skupiny. Stevenson [11] ve své práci uvádí, že s největší pravděpodobností je zbarvení HL přímo vázáno na obsah organických sloučenin, které mají svůj původ v látkách, jako jsou chinony a konjugované ketony.



Obr. 14: Grafické závislosti absorbance na hmotnostní koncentraci půdních standardů IHSS; **a)** standard půdní HK *Elliott Soil*; **b)** standard půdní fulvinové kyseliny *Elliott Soil*

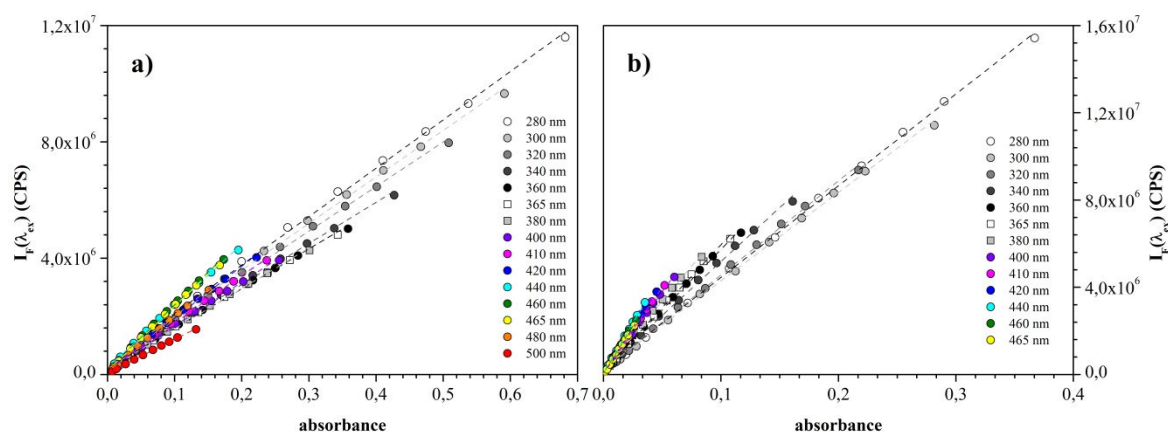
Na Obr. 15 jsou uvedeny grafické závislosti intenzity fluorescence na hmotnostní koncentraci standardů *Elliott Soil* před a po korekci vnitřního filtračního efektu prvního a druhého druhu s využitím matematického aparátu navrženého Lakowiczem. Z Obr. 15 je zřejmé, že po aplikaci korekčního vztahu došlo k opětovné linearizaci grafické závislosti intenzity fluorescence na hmotnostní koncentraci použitých HL, a proto se můžeme domnívat, že tento matematický aparát je vhodný nástrojem opravy naměřených experimentálních dat. Z porovnání naměřených grafických závislostí I_F na c_{HL} standardů HL je evidentní, že IFE prvního a druhého druhu se silněji projevuje v případě HK. Rovněž si můžeme povšimnout, že odklon od lineárního průběhu nastává již při velmi nízkých koncentracích HL v roztoku. V případě HK izolované z úrodné půdy *Elliott Soil* byl počátek nelineárního průběhu grafické závislosti intenzity fluorescence na hmotnostní koncentraci odhadnut v rozmezí $c_{HK} \approx 2\text{--}4 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$. Jak již bylo diskutováno dříve, tmavě-hnědé zbarvení roztoků HK je přímo vázáno na přítomnost *ortho*- a *para*-chinonů a v neposlední řadě i konjugovaných ketonů, které se mohou ve struktuře HK vyskytovat jak v keto tak enol formě, a proto tyto chromofory uplatňují v případě těchto “biokoloidních” sloučenin silnější IFE, především však IFE druhého druhu. Tyto výsledky jsou v dobré shodě s difuzními FTIR spektry HK v jejichž spektrech byly v porovnání s FK lokalizovány intenzivnější absorpční pásy v oblasti vlnočtů $\approx 1680\text{--}1630 \text{ cm}^{-1}$ připadající symetrickým valenčním vibracím karbonylových funkčních skupin v chinonech a konjugovaných ketonech. Kromě toho je na tomto místě nezbytně nutné říci, že z kvazi-exponenciálního průběhu absorpčních křivek je očividné, že ne všude se bude

vnitřní filtrační efekt prvního a druhého druhu projevovat se stejnou intenzitou. Ve fluorescenční praxi studia HL to znamená, že vlivem IFE prvního a druhého druhu může dojít v EEM spektrech až k úplné absenci fluorescenčního maxima, zvláště pak v tzv. UV-light oblasti. Především by se jednalo o fluorofory, které se nacházejí v oblasti vlnových délek 240–310/300–500 nm ($\lambda_{ex}/\lambda_{em}$) tzn. *B* (γ) – *tyrosin-like*, *T* (δ) – *tryptofan-like*, *A* (α) – *fulvic-like* a v neposlední řadě i *M* (β) – *marine humic-like*.



Obr. 15: Grafické závislosti intenzity fluorescence na hmotnostní koncentraci standardů IHSS před a po korekci vnitřního filtračního efektu prvního a druhého druhu; a) standard půdní HK *Elliott Soil*; b) standard půdní FK *Elliott Soil*

Na Obr. 16 jsou uvedeny grafické závislosti intenzity fluorescence na absorbanci standardů HL *Elliott Soil* po korekci vnitřního filtračního efektu prvního a druhého druhu s využitím matematického aparátu nastíněného Lakowiczem. V tomto případě je hmotnostní koncentrace použitých HL reprezentována hodnotami absorbancí při vlnových délkách, které jsou odvozeny z absorpčních indexů a specifických hodnot absorbancí. Kromě toho, i v tomto případě z důvodu lepší orientace v grafických závislostech nejsou v příslušných grafech hodnoty spolehlivosti R^2 prezentovány, avšak jejich velikost pro individuální proložení rovněž neklesla pod hodnotu $\approx 0,99$. Jak je z Obr. 16 zřejmé, po korekci IFE prvního a druhého druhu jsme dospěli k lineární aproximaci grafické závislosti intenzity fluorescence na absorbanci studovaných HL, a tudíž můžeme říci, že vybraný korekční model je účelným prostředkem opravy intenzit fluorescence vodných roztoků těchto “biokoloidních” sloučenin. Podle Lakowicze [64] by měl být IFE prvního a druhého druhu korigován u všech roztoků, jejichž hodnoty optické hustoty OD – *optical density* jsou v maximu absorpční křivky vyšší jak 0,05. Optická hustota OD je ekvivalentem absorpce pouze v případě, jestliže se měří v kyvetě s optickou dráhou 1 cm. Rovněž je na tomto místě nutné říci, že v případě standardů ESHK a ESFK je tato hodnota OD překročena již při hmotnostní koncentraci 1–2 $\text{mg}\cdot\text{dm}^{-3}$ a to především v ultrafialové oblasti elektromagnetického záření, které je vymezeno vlnovými délkami 220–300 nm.



Obr. 16: Grafické závislosti intenzity fluorescence na absorpenci standardů IHSS; **a)** standard půdní HK *Elliott Soil*; **b)** standard půdní FK *Elliott Soil*

Závěrem lze konstatovat, že IFE prvního a druhého druhu HL resp. DOM by měl být korigován vždy, a to i v případě velmi nízkých koncentrací těchto unikátních “biokoloidních” sloučenin v roztoku. V ostatních případech je při nejmenším možné považovat naměřená experimentální data za nesprávná a zavádějící.

6.4.2 Ustálená fluorescenční spektrometrie huminových látek

V posledních několika letech se ustálená fluorescenční spektrometrie (*steady-state*) stala v oblasti studia a charakterizace HL resp. DOM jistým standardem, který nám poskytuje mnoho cenných informací o těchto unikátních “biokoloidních” sloučeninách. Jak je z profilace této disertační práce zřejmé, jednou z hlavních myšlenek bylo navrhnout a následně provést pilotní experimenty, které by vedly k detailnější charakterizaci použitých HL s ohledem na poznání jejich původu resp. geneze, jednotlivých strukturních jednotek, množství substituentů uplatňujících elektron-donorní a elektron-akceptorní efekt, obsahu reaktivních funkčních skupin ($-\text{COOH}$ a v neposlední řadě i fenolické $-\text{OH}$), “molekulární” heterogenity, stupně humifikace a “kondenzace” aromatických struktur aj. Podle Albertse a spol. [117], fluorescenční spektrometrie v ustáleném stavu (*steady-state*) představuje vhodnou instrumentální techniku ke studiu a charakterizaci HL izolovaných z terestriálních, kaustobiolitických, sladkovodních, přímořských a “biologických” přírodních matic.

Excitační a emisní spektra huminových látek

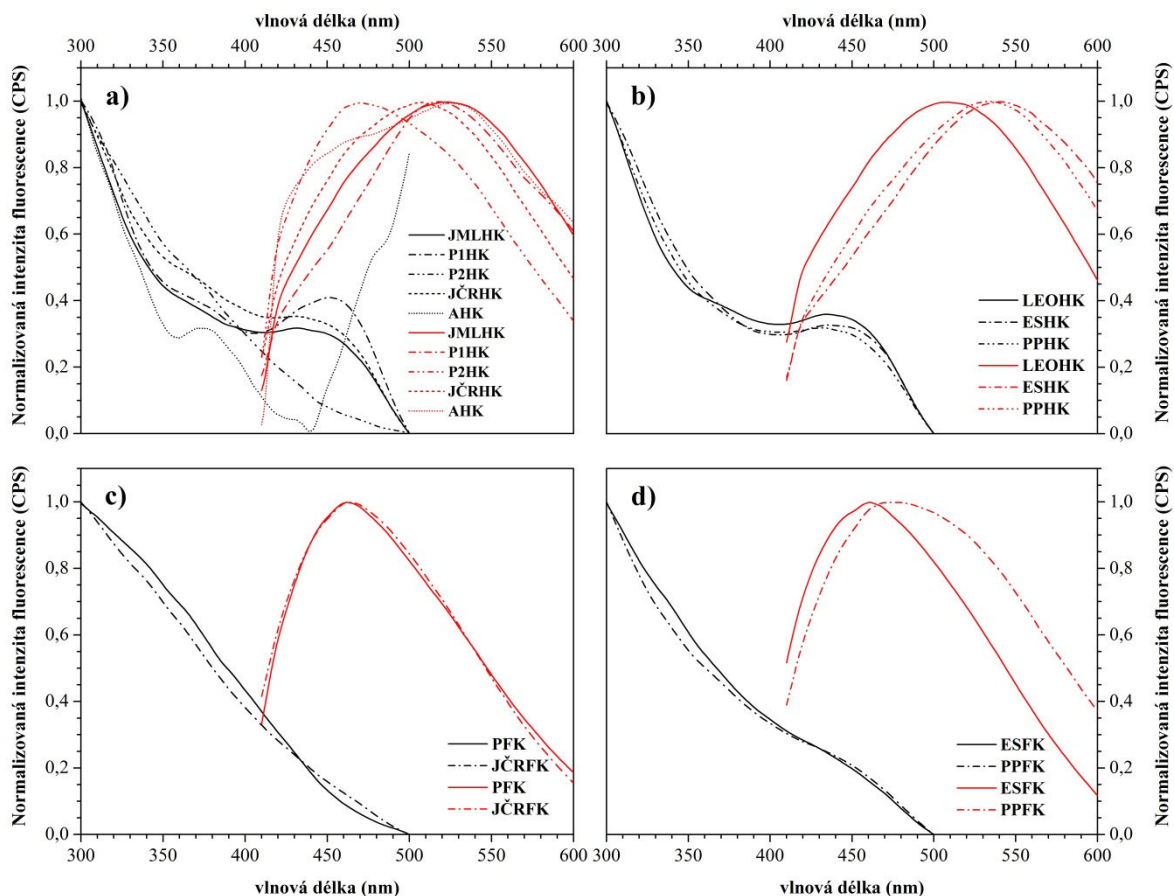
Veškeré HL použité v této disertační práci byly podrobeny základní charakterizaci pomocí ustálené fluorescenční spektrometrie. Jednou ze základních a časově nenáročných metod, jak mohou být HL charakterizovány je měření jejich emisních a excitačních fluorescenčních spekter. Po korekci IFE prvního a druhého druhu byly z naměřených fluorescenčních spekter HL odečteny polohy fluorescenčních maxim s příslušnými hodnotami intenzit fluorescence $I_{F(\text{max.})}$, které jsou v této kapitole uvedeny v Tab. 4.

Tab. 4: Stanovené polohy fluorescenčních maxim a jejich příslušných intenzit fluorescence $I_{F(\max)}$ v emisních a excitačních spektrech použitých HL

vzorek HL	excitační spektrum		emisní spektrum	
	$\lambda_{\text{ex (max.)}}$ (nm)	$I_{F(\max.)}$ (CPS) $\times 10^6$	$\lambda_{\text{em (max.)}}$ (nm)	$I_{F(\max.)}$ (CPS) $\times 10^6$
LEOHK	434	2,26	507	2,52
JMLHK	432	3,57	523	4,28
ESHK	435	2,39	540	3,03
P1HK	452	2,35	518	2,50
P2HK	360–400	(–)	469	0,99
PPHK	431	1,84	533	2,25
JČRHK	431	2,48	508	3,21
AHK	373	0,22	525	0,21
ESFK	(–)	(–)	461	4,56
PFK	(–)	(–)	460	2,34
PPFK	(–)	(–)	474	4,73
JČRFK	(–)	(–)	463	6,21

Jak je patrné z výsledků uvedených v Tab. 4, studované vzorky vykazují typické fluorescenční maxima HL izolovaných z terestriálních a kaustobiolitických přírodních matric [222]. Vyjma vzorků FK izolovaných z lesní půdy *Humic Podzol*, jihočeské rašeliny a jejich standardů *Elliott Soil* a *Pahokee Peat* byly v jejich excitačních spektrech lokalizovány intenzitně proměnlivá fluorescenční maxima v oblasti vlnových délek 373–452 nm, které jsou zpravidla přisuzovány píkům, které mají svůj původ v tzv. α – *humic-like* fluoroforech. Tyto fluorofory jsou mnohými autory pokládány za indikátory molekulové hmotnosti, stupně humifikace a “kondenzace” aromatických struktur HK pocházejících z terestriálních a kaustobiolitických přírodních matric [223]. Absence fluorescenčního maxima α – *humic-like* v excitačních spektrech FK je pravděpodobně způsobena nižším obsahem aromatických struktur s konjugovaným systémem dvojných vazeb. Vyjma vzorků HK izolovaných z lesní půdy *Humic Podzol* (P1HK a P2HK) a extraktu hnědé mořské řasy *Ascophyllum nodosum* (AHK) bylo v jejich excitačních spektrech lokalizováno fluorescenční maximum, které se nacházelo téměř při shodné vlnové délce tzn. $\lambda_{\text{ex (max.)}} \approx 433 \pm 2$ nm. Na Obr. 17a, c jsou uvedena emisní a excitační fluorescenční spektra HL izolovaných z terestriálních a nižších rostlinných (autotrofních) přírodních matric. V excitačním spektru vzorku P1HK si nelze nepovšimnout širokého a poměrně intenzivního fluorescenčního píku, jehož pozice se nacházela při nejvyšší vlnové délce tj. $\lambda_{\text{ex (max.)}} \approx 452$ nm. Naproti tomu byla HK izolovaná z extraktu hnědé mořské řasy *Ascophyllum nodosum* charakterizována nejméně intenzivním fluorescenčním maximem, které se nacházelo v tzv. *UV-light* oblasti při $\lambda_{\text{ex (max.)}} \approx 373$ nm. Jak uvádí ve své práci Rodríguez a spol. [224] v důsledku vyššího obsahu funkčních skupin – NH_2 , $\text{C}=\text{O}$, $-\text{OH}$ a $-\text{OR}$ dochází ve fluorescenčních spektrech HL k bathochromnímu posunu, který je v odborné literatuře označován jako *red-shift*. Kromě toho poukázal na skutečnost, že hypsochromní posun (*blue-shift*) fluorescenčních maxim je zpravidla ukazatelem přítomnosti

jednodušších struktur s nižším obsahem aromatických jader a alifatických řetězců s konjugovaným systémem dvojných vazeb.



Obr. 17: Excitační a emisní fluorescenční spektra studovaných HL; **a, c**) excitační a emisní fluorescenční spektra HL izolovaných z terestriálních a nižších rostlinných přírodních matic; **b, d**) excitační a emisní fluorescenční spektra standardů HL *Leonardite*, *Elliott Soil* a *Pahokee Peat*

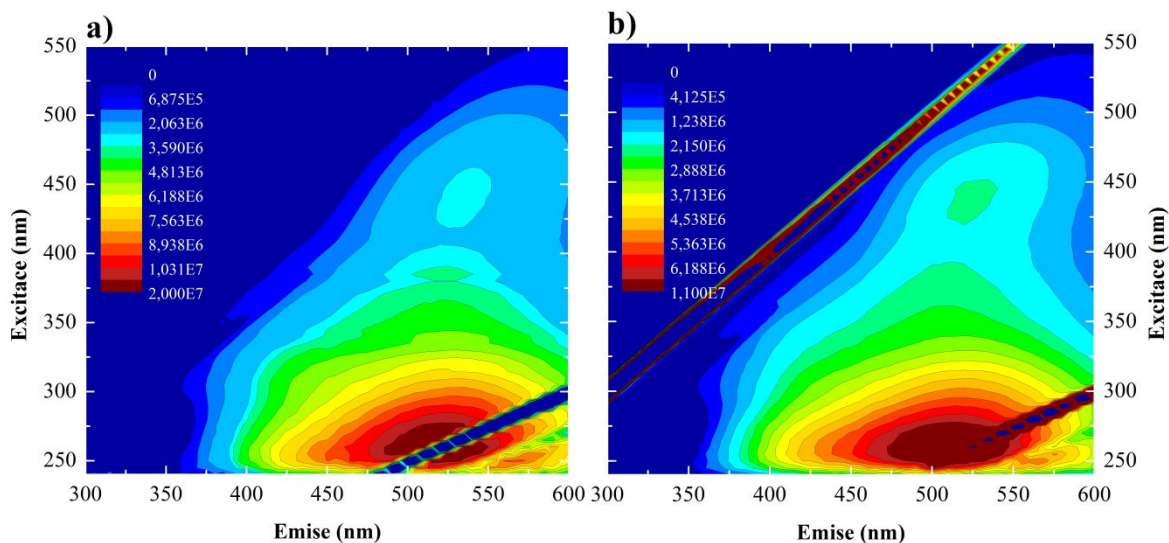
Jak je zřejmé z Obr. 17, s výjimkou vzorku izolovaného z lesní půdy *Humic Podzol* (P2HK) jsou veškeré HK v porovnání s FK charakterizovány fluorescenčními maximy, které byly lokalizovány v oblasti vyšších vlnových délek při $\lambda_{em(max)} \approx 507\text{--}540$ nm. Naproti tomu byly FK použité v této disertační práci vyjma vzorku PFK charakterizovány vyššími hodnotami intenzity fluorescence, nicméně jejich fluorescenční maxima byla lokalizována v oblasti nižších vlnových délek emisního záření. Emisní fluorescenční spektrometrie půdních HL (P1HK, P2HK a PFK) ukázala, že tyto vzorky jsou tvořeny nižším obsahem aromatických jader s elektron-donorními substituenty v porovnání se standardy půdních HL (ESHK a ESKF). Kromě toho musíme mít na zřeteli, že nižší intenzita fluorescence je spjata s vyšším obsahem elektron-akceptorních funkčních skupin $-\text{COOH}$, avšak nemůžeme ani vyloučit vliv molekulové hmotnosti HL. V neposlední řadě byly standardy HL izolované z úrodné půdy *Elliott Soil* charakterizovány vyšším obsahem karbonylových, hydroxylových, alkoxylových a aminových funkčních skupin, které obecně na aromátech uplatňují elektron-donorní efekt, vyšším stupněm humifikace a “kondenzace” aromatického jádra. Tyto výsledky jsou v dobré shodě se závěry z UV/Vis a ^{13}C NMR spektrometrie. Obdobných závěrů bylo dosaženo i v případě HL izolovaných z jihočeské rašeliny. Jak je patrné z výsledků uvedených v Tab. 4, vzorky rašelinistních HL byly charakterizovány intenzivními fluorescenčními maximy, jejichž pozice byly lokalizovány v oblasti nižších vlnových délek v porovnání s jejichmi příslušnými

standardy HL (PPHK a PPFK). V obecném pohledu na tyto výsledky můžeme konstatovat, že HL izolované z jihočeské rašeliny jsou tvořeny nižším obsahem elektron-akceptorních funkčních skupin, nižší molekulovou hmotností, vyšší molekulární heterogenitou, nižším obsahem aromatických jader a alifatických strukturních jednotek s konjugovaným systémem dvojných vazeb. Naproti tomu, vyšší intenzita fluorescence HL izolovaných z jihočeské rašeliny svědčí o přítomnosti silněji substituovaných aromátů elektron-donorními skupinami C=O, -OH a v neposlední řadě i -OR. Rovněž i tyto výsledky jsou v dobré shodě s difuzními FTIR spektry rašelinistních HL, v jejichž spektrech byly v porovnání se standardy PPHK a PPFK identifikovány intenzivní absorpční pásy v oblasti vlnočtů $\approx 1680\text{--}1630\text{ cm}^{-1}$ a $\approx 1263 \pm 1\text{ cm}^{-1}$ připadající symetrické valenční vibraci C=O a asymetrické vibraci C-O-C vazeb v chinonech, konjugovaných ketonech a aryl-etherech. Emisní fluorescenční spektrometrie uhelných HK odhalila, že vzorek izolovaný z jihomoravského lignitu (JMLHK) je oproti standardu LEOHK tvořen vyšším obsahem aromatických strukturních jednotek substituovaných elektron-donorními funkčními skupinami a v neposlední řadě i alifatickými řetězci s konjugovaným systémem dvojných vazeb. Rovněž se nabízí otázka, zda i v tomto případě je vyšší intenzita fluorescence JMLHK ukazatelem nižší molekulové hmotnosti v porovnání se standardem *Leonardite* HK. Tato hypotéza byla podpořena absorpčními koeficienty E_4/E_6 , E_2/E_4 , $\Delta \log K$, E_2/E_3 a E_{254}/E_{410} , které mimo jiné vypovídají o molekulové hmotnosti HL. Jak je zřejmé z Obr. 17a, HK izolovaná z extraktu hnědé mořské řasy *Ascophyllum nodosum* byla charakterizována nejnižší hodnotou intenzity fluorescence, avšak její fluorescenční maximum se nacházelo v oblasti vlnových délek srovnatelných s HK pocházejících z terestriálních a kaustobiolitických přírodních matric. Kromě toho je na tomto místě nutné říci, že interpretovat výsledky pouze na základě emisního spektra AHK by bylo v tomto případě silně zavádějící s ohledem na průběh excitačního spektra, které dává tušit přítomnost intenzivnějších fluorescenčních maxim v krajních oblastech budícího záření tzn. $\lambda_{\text{ex (max.)}} \approx 240\text{--}350\text{ nm}$ a $450\text{--}600\text{ nm}$.

Excitačně-emisní spektra huminových látek

Na Obr. 18 jsou uvedena typická excitačně-emisní fluorescenční spektra (EEM) HK izolované z jihomoravského lignitu (JMLHK) a jejího příslušného standardu *Leonardite* (LEOHK). Interpretace fluorescenčních píků byla provedena na základě odborné literatury [17, 21–22, 117, 225–227]. V excitačně-emisních spektrech HK izolovaných z jihomoravského lignitu a oxidovaného hnědého uhlí *Leonardite* byly lokalizovány dvě fluorescenční maxima v oblasti vlnových délek $\approx 250\text{--}265/505\text{--}510\text{ nm}$ a $\approx 440/525\text{--}535\text{ nm}$ ($\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}}$), které jsou obvykle připisovány fluoroforům A (α) – *fulvic-like* a odvozených C (α) – *humic-like*. Tyto fluorescenční píky jsou mnohými autory pokládány za typická fluorescenční maxima HL izolovaných z terestriálních přírodních matric. V případě vzorku JMLHK byly tyto fluorofory lokalizovány v oblasti vyšších vlnových délek excitace a emise tzn. při $\approx 265/510\text{ nm}$ a $\approx 440/535\text{ nm}$, a proto se můžeme domnívat, že sloučeniny zodpovědné za tuto fluorescenci jsou silněji substituovány elektron-donorními skupinami – NH₂, -OH, C=O a -OR. Kromě toho je tento vzorek charakterizován nižší molekulovou hmotností, o které svědčí vyšší hodnoty I_F (CPS) a absorpčních koeficientů E_4/E_6 , E_2/E_4 , E_2/E_3 , E_{254}/E_{410} a $\Delta \log K$. Mimo jiné si v EEM spektru HK izolované z jihomoravského lignitu nelze nepovšimnout dalších fluorescenčních maxim, které se nacházely v oblasti vlnových délek $\approx 255/450\text{ nm}$ a $\approx 385/520\text{ nm}$. Poměrně intenzivní fluorescenční pik lokalizovaný v oblasti $\approx 255/450\text{ nm}$ je zpravidla přisuzován A (α) – *fulvic-like* fluoroforům.

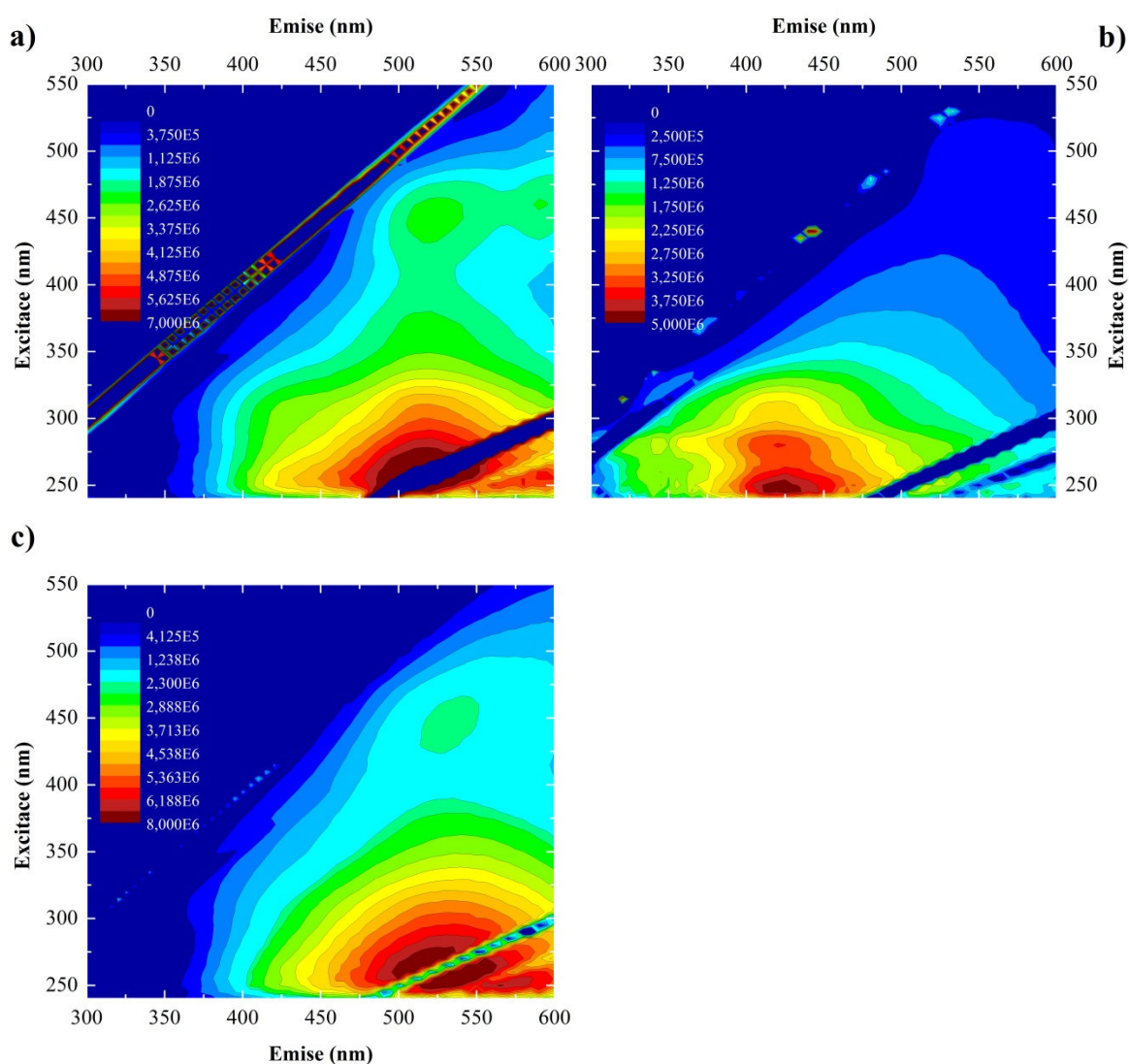
Podle Birdwella a spol. [157] je toto specifické fluorescenční maximum výhradně markerem FK resp. DOM. Toto tvrzení je rovněž podpořeno odbornou prací Doskočila a spol. [228], který z jihomoravského lignitu extrahoval vodorozpustné frakce DOM, jejichž dominantní fluorescenční maximum bylo lokalizováno v oblasti vlnových délek $\approx 250/440$ nm. Méně intenzivní fluorescenční pík při $\approx 385/520$ nm ($\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}}$) je obvykle připisován $C(\alpha)$ – *humic-like* fluoroforům, ze kterých jsou odvozeny fluorescenční maxima, jejichž polohy se nacházejí v oblasti vyšších vlnových délek excitace. Na základě těchto výsledků můžeme říci, že HK izolovaná z jihomoravského lignitu je v porovnání se standardem LEOHK charakterizována vyšší “molekulární” heterogenitou, nižší molekulovou hmotností, nižším stupněm humifikace a “kondenzace” aromatických jader.



Obr. 18: Excitačně-emisní spektra uhelných HK; **a)** HK izolovaná z jihomoravského lignitu; **b)** standard HK *Leonardite*

Excitačně-emisní fluorescenční spektra HK izolovaných z lesní půdy *Humic Podzol* (P1HK a P2HK) a standardu *Elliott Soil* jsou uvedena na Obr. 19. S výjimkou vzorku HK izolované z lesní půdy *Humic Podzol* (P2HK) byly v jejich EEM spektrech lokalizovány dvě fluorescenční maxima v oblasti vlnových délek $\approx 250\text{--}280/420\text{--}500$ nm a $\approx 445\text{--}450/520\text{--}535$ nm ($\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}}$), které jsou tradičně připisovány fluoroforům $A(\alpha)$ – *fulvic-like* a příbuzným $C(\alpha)$ – *humic-like*. Jak je z Obr. 19a zřejmé, v případě vzorku P1HK byl v jeho EEM spektru pozorován poměrně silný Rayleighův rozptyl, v jehož důsledku jsme nebyli schopni přesně lokalizovat fluorescenční pík, který je zodpovědný za fluorescenci $A(\alpha)$ – *fulvic-like* fluoroforů. V případě vzorku P1HK bylo fluorescenční maximum $A(\alpha)$ lokalizováno v oblasti vyšších vlnových délek emise, a tudíž můžeme předpokládat, že tyto fluorofory budou více substituovány funkčními skupinami, které jsou schopny poskytovat elektrony. Naproti tomu lze předpokládat, že fluorescenční maximum $C(\alpha)$ je tvořeno nižším obsahem aromatických jader a alifatických strukturních jednotek s konjugovaným systémem dvojných vazeb. Rovněž je na tomto místě nutné říci, že ačkoliv se na první pohled může zdát, že jednotlivé difference mezi P1HK a jejím standardem *Elliott Soil* nejsou až tak patrné, byly tyto závěry mimo jiné podpořeny i výsledky z UV/Vis a ^{13}C NMR spektrometrie. Pouze u vzorku HK izolované z lesní půdy *Humic Podzol* (P1HK) bylo v jeho EEM spektru lokalizováno fluorescenční maximum v oblasti vyšších vlnových délek excitace a emise tzn. při $\approx 460/590$ nm, a proto může být tento fluorescenční pík připsán fluoroforům, které jsou

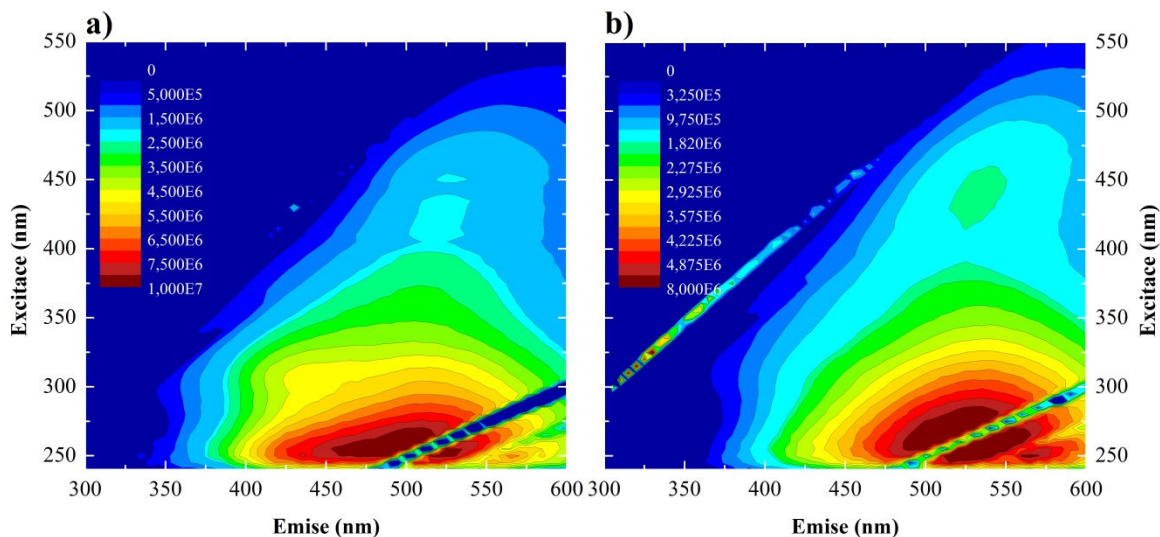
charakterizovány vyšším obsahem aromatických struktur substituovaných elektron-donorními skupinami a v neposlední řadě i vyšším obsahem alifatických řetězců s konjugovaným systémem nenasycených vazeb. Podle Yua a spol. [229] je toto unikátní fluorescenční maximum indikátorem sloučenin doposud nehumifikované organické hmoty, které mají svůj původ v látkách odvozených od porfyrinů a karotenoidů. Jak je z Obr. 19b zřejmé, v případě vzorku P2HK bylo v jeho EEM spektru identifikováno méně intenzivní fluorescenční maximum A (α), které se nacházelo v oblasti vlnových délek $\approx 280/420$ nm. V excitačně-emisním spektru vzorku P2HK si nelze nepovšimnout relativně intenzivních fluorescenčních maxim v oblasti vlnových délek $\approx 280/345$ – 365 nm, které jsou zpravidla připisovány fluoroforům T (δ) – *tryptofan-like*. Podle Liua a spol. [133] jsou fluorofory T (δ) produkovány na základě biologické aktivity půdních mikroorganismů, z nichž nejvýznamnějšími zástupci jsou půdní bakterie rodu *Rhizobium*, *Azotobacter*, *Azomonas*, *Bacillus*, *Vibrio*, *Pseudomonas*, aktinomycety rodu *Streptomyces* a v neposlední řadě i mikromycety, houby a řasy.



Obr. 19: Excitačně-emisní spektra půdních HK; **a, b)** HK izolované z lesní půdy *Humic Podzol*; **c)** standard HK *Elliott Soil*

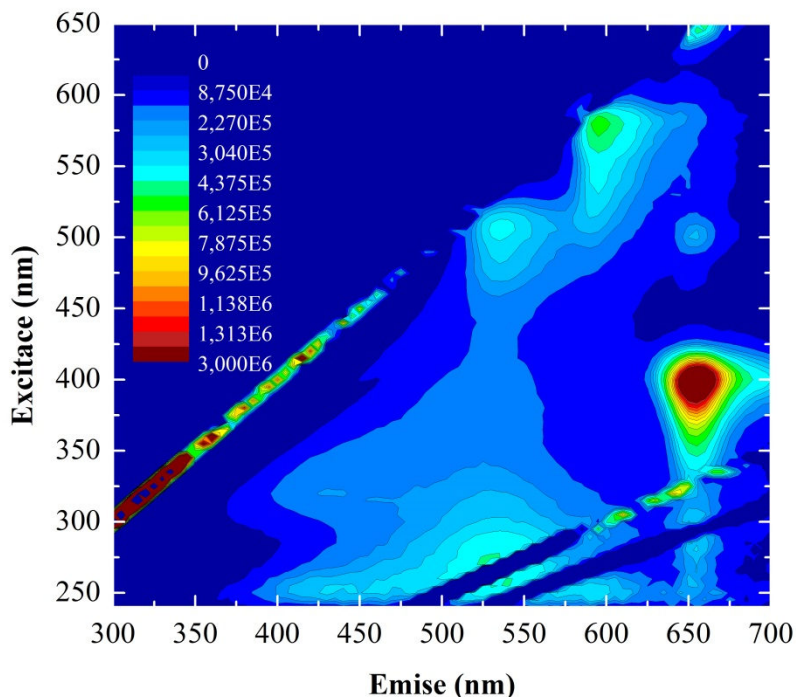
Na Obr. 20 jsou uvedena naměřená EEM spektra HK izolované z jihočeské rašeliny (JČRHK) a jejího příslušného standardu *Pahokee Peat*. Jako v předešlých případech byla interpretace fluorescenčních píků provedena na základě odborných publikací [17, 21–22, 117,

230–231]. Z porovnání naměřených EEM spekter vzorků HK je zřejmé, že excitačně-emisní spektra rašeliništních HK obsahují intenzivní fluorescenční maxima, která jsou typická pro HL pocházejících z terestriálních a kaustobiolitických přírodních matric. V excitačně-emisních spektrech JČRHK a PPHK byly lokalizovány dvě fluorescenční maxima v oblasti vlnových délek $\approx 255\text{--}270/485\text{--}525\text{ nm}$ a $\approx 430\text{--}440/520\text{--}530\text{ nm}$ ($\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}}$), za jejichž fluorescenci jsou zodpovědné $A(\alpha)$ – *fulvic-like* a příbuzné $C(\alpha)$ – *humic-like* fluorofory. V případě HK izolované z jihočeské rašeliny byly tyto fluorescenční píky identifikovány v oblasti nižších vlnových délek excitace a emise tzn. při $\approx 255/485\text{ nm}$ a $\approx 430/520\text{ nm}$, z této skutečnosti lze usuzovat na silnější substituci aromatických struktur elektron-donorními skupinami. Pokud se podíváme na dosažené výsledky globálně, lze konstatovat, že vzorek rašeliništní HK je oproti standardu *Pahokee Peat* charakterizován nižší molekulovou hmotností, vyšší “molekulární” heterogenitou, nižším obsahem aromatických struktur a alifatických řetězců s konjugovaným systémem dvojných vazeb. Interpretace těchto výsledků byla kromě toho podpořena i závěry z elementární analýzy, UV/Vis a ^{13}C nukleární magnetické resonance. V excitačně-emisním spektru vzorku JČRHK si nelze nepovšimnout méně intenzivního fluorescenčního píku identifikovaného v oblasti vyšších vlnových délek excitace tzn. při $\approx 450/525\text{ nm}$, který je zpravidla přisuzován odvozeným $C(\alpha)$ – *humic-like* fluoroforům. Z porovnání naměřených EEM spekter použitých HK je zřejmé, že vzorek PPHK je oproti HK izolované z jihočeské rašeliny charakterizován vyšší molekulovou hmotností, nižší “molekulární” heterogenitou, vyšším stupněm humifikace, který je ukazatelem vyššího obsahu aromatických struktur chinonového typu. Tyto výsledky byly v dobré korelaci s vybranými absorpčními koeficienty a hodnotami specifických absorbcí $SUVA_{254}$ a v neposlední řadě i s vypočtenými hodnotami f_a , které jsou ukazateli molekulové hmotnosti a stupně aromaticity těchto unikátních “biokoloidních” sloučenin.



Obr. 20: Excitačně-emisní spektra rašeliništních HK; a) HK izolovaná z jihočeské rašeliny; b) standard HK *Pahokee Peat*

Excitačně-emisní fluorescenční spektrum HK izolované z extraktu hnědé mořské řasy *Ascophyllum nodosum* (AHK) je prezentováno na Obr. 21. Fluorescenční píky tohoto vzorku byly interpretovány na základě odborné literatury [232].

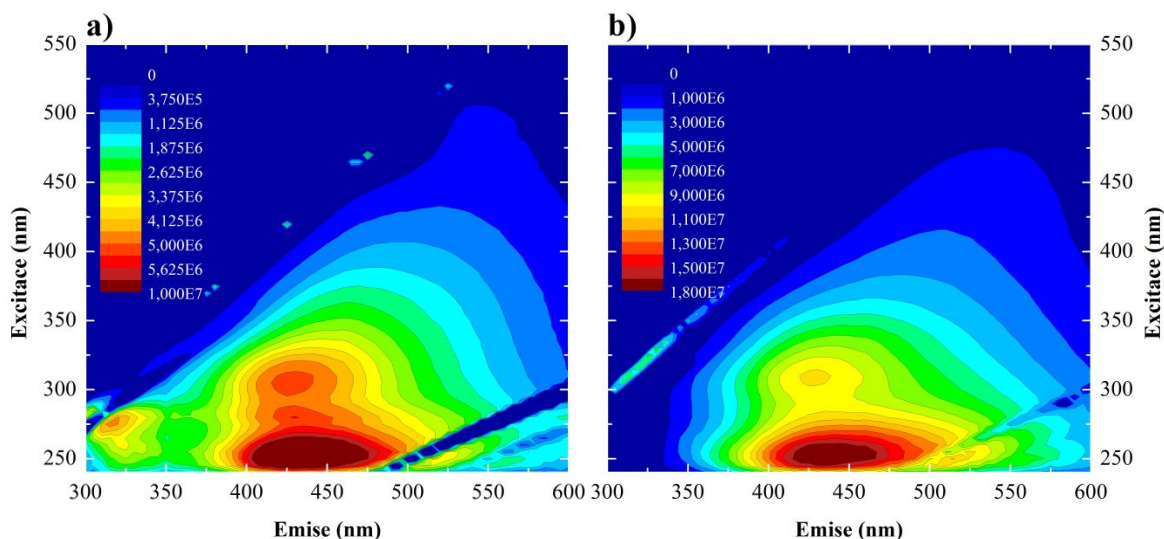


Obr. 21: Excitačně-emisní spektrum HK izolované z extraktu hnědé mořské řasy *Ascophyllum nodosum*

Z porovnání EEM spektra AHK s HK izolovanými z terestriálních přírodních matric je zřejmé, že tento vzorek obsahuje nejen fluorofory typické pro přímořské HL, ale i fluorescenční maxima, která jsou výhradně připisována tzv. *algae pigmentům*. V excitačně-emisním spektru HK izolované z extraktu hnědé mořské řasy *Ascophyllum nodosum* (AHK) byla identifikována tři typická fluorescenční maxima v oblasti vlnových délek $\approx 255\text{--}270/435\text{--}525$ nm ($\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}}$), které jsou tradičně připisována $A(\alpha)$ – *fulvic-like* fluoroforům, z nichž nejintenzivnější fluorescenční pík byl lokalizován v oblasti vyšších vlnových délek excitace a emise tzn. při $\approx 270/525$ nm. Z výše uvedené polohy fluorescenčního maxima při $\approx 270/525$ nm lze usuzovat, že tento fluorofor je v porovnání s ostatními $A(\alpha)$ charakterizován vyšším obsahem aromatických struktur substituovaných funkčními skupinami --NH_2 , C=O , --OH a v neposlední řadě i --OR . Kromě toho si v EEM spektru vzorku AHK nelze nepovšimnout méně intenzivního fluorescenčního maxima identifikovaného v oblasti vlnových délek $\approx 315/425$ nm ($\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}}$), které je zpravidla přisuzováno $M(\beta)$ – *marine humic-like* fluoroforům. Tento fluorescenční pík je mnohými autory pokládán za typické fluorescenční maximum HK izolovaných z pobřežních a mořských sedimentů [233]. Jak uvádí ve své práci Villacorte a spol. [234] fluorescenční pík $M(\beta)$ může být za jistých okolností považován za prekurzor terestriálních fluoroforů $C(\alpha)$ – *humic-like*. O přítomnosti fragmentů doposud nehumifikované organické hmoty (OM) tzn. *algae pigmentů* ve vzorku HK izolované z extraktu hnědé mořské řasy *Ascophyllum nodosum* svědčí fluorescenční píky, které se nacházely v oblasti vysokých vlnových délek excitace a emise tj. při $\approx 400\text{--}580/535\text{--}655$ nm. V excitačně-emisním spektru AHK byla lokalizována intenzitně proměnlivá fluorescenční maxima v oblasti vlnových délek $\approx 400/655$ nm a $500/655$ nm ($\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}}$), která mohou být připsána sloučeninám, jako jsou *chlorofyly*. Podle Hera a spol. [235] je toto specifické fluorescenční maximum výhradně markerem *chlorofylu typu a*, který je majoritně zastoupen v chloroplastech mořských řas řádu *Fucales*. Kromě toho si v EEM spektru AHK nelze nepovšimnout relativně intenzivních fluorescenčních maxim, která byla lokalizována v oblasti nižších vlnových délek emise tzn. při $\approx 505/535$ nm

$a \approx 580/595$ nm ($\lambda_{ex}/\lambda_{em}$), která jsou v tomto případě připisována *algae pigmentum* červené barvy jako je *fytoerytrin*, jehož typickým chromoforem je *phycoerythrobilin*. Závěrem můžeme říci, že HK izolovaná z extraktu hnědé mořské řasy řádu *Fucales* obsahuje sloučeniny nehumínového charakteru, které způsobují výraznou fluorescenci tohoto vzorku. Z výše uvedeného faktu lze usuzovat, že tzv. *algae pigmenty* přispívají k celkové fluorescenci AHK a fluorofory *marine humic-like* identifikované v oblasti $\approx 315/425$ nm mohou být odpovědné za fluorescenci terestriálních HL.

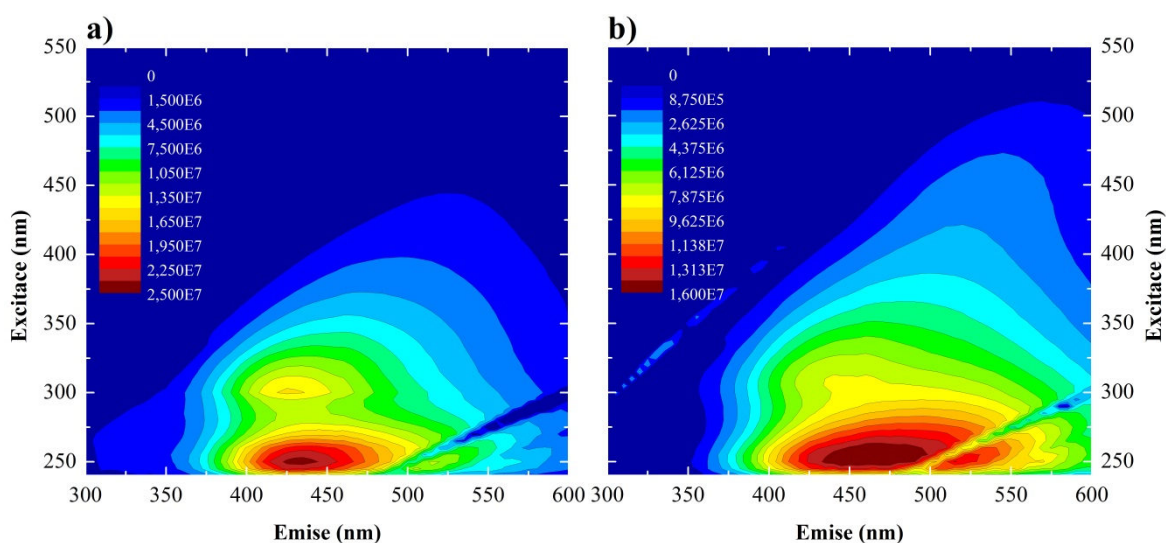
Na Obr. 22 jsou uvedena EEM spektra FK izolované z lesní půdy *Humic Podzol* a jejího příslušného standardu *Elliott Soil*. Z porovnání naměřených EEM spekter vzorků FK je zřejmé, že excitačně-emisní spektra půdních FK obsahují intenzivní fluorescenční maxima, která jsou charakteristická pro HL pocházející z terestriálních přírodních matric. V excitačně-emisních spektrech studovaných FK byla lokalizována dvě dominantní fluorescenční maxima v oblasti vlnových délek $\approx 250/430$ nm a $\approx 305\text{--}310/425\text{--}430$ nm ($\lambda_{ex}/\lambda_{em}$), která jsou i v tomto případě přisuzována *A* (α') – *fulvic-like* a *C* (α) – *humic-like* fluoroforům. Z výše prezentovaných poloh fluorescenčních píků v EEM spektrech použitých FK lze usuzovat, že tyto fluorofory jsou tvořeny obdobným počtem aromatických struktur substituovaných elektron-donorními skupinami. Naproti tomu, nižší intenzita fluorescence FK izolované z lesní půdy *Humic Podzol* svědčí o vyšší molekulové hmotnosti tohoto vzorku. Tyto výsledky jsou v dobré shodě s hodnotami absorpčních koeficientů, které jsou ukazateli molekulové hmotnosti HL. Pouze u vzorku PFK byla identifikována minoritní fluorescenční maxima v oblasti vlnových délek $\approx 280/320\text{--}360$ nm, která jsou tradičně připisována *A* (α') – *fulvic-like* fluoroforům. Z porovnání naměřených EEM spekter studovaných FK je zřejmé, že půdní FK je oproti standardu ESFK charakterizována vyšším počtem fluorescenčních píků, které odpovídají *A* (α') – *fulvic-like* fluoroforům. Z výše uvedené skutečnosti lze usuzovat na vyšší “molekulární” heterogenitu tohoto vzorku izolovaného z lesní půdy *Humic Podzol*.



Obr. 22: Excitačně-emisní spektra půdních FK; **a)** FK izolovaná z lesní půdy *Humic Podzol*; **b)** standard FK *Elliott Soil*

Excitačně-emisní fluorescenční spektrum FK izolované z jihočeské rašeliny (JČRFK) a standardu *Pahokee Peat* (PPFK) jsou sumarizována na Obr. 23. V excitačně-emisních spektrech rašelinistních FK byla lokalizována dvě fluorescenční maxima v oblasti vlnových délek $\approx 250\text{--}255/435\text{--}465$ nm a $\approx 300\text{--}305/425\text{--}460$ nm ($\lambda_{ex}/\lambda_{em}$), která jsou připisována

A (α) – *fulvic-like* a C (α) – *humic-like* fluoroforům. Tyto fluorescenční píky jsou podle Gandoise a spol. [236] typickými fluorescenčními maximy FK izolovaných z rašeliny a rašeliništních půd. V případě vzorku JČRFK byly tyto fluorofory identifikovány v oblasti nižších vlnových délek emise tzn. při $\approx 250/435$ nm a $\approx 300/425$ nm, a proto se můžeme domnívat, že sloučeniny zodpovědné za tuto fluorescenci jsou méně substituovány elektron-donorními skupinami $-\text{NH}_2$, $\text{C}=\text{O}$, $-\text{OH}$ a $-\text{OR}$. Pokud se podíváme na dosažené výsledky komplexně, lze konstatovat, že rašeliništní FK je v porovnání se svým standardem PPFK charakterizována nižším obsahem aromatických jader a alifatických řetězců s konjugovaným systémem nenasycených vazeb. Naproti tomu, nižší intenzita fluorescence FK izolované z rašeliny *Pahokee Peat* je ukazatelem vyšší molekulové hmotnosti a stupně humifikace. Kromě toho si v excitačně-emisním spektru vzorku JČRFK nelze nepovšimnout méně intenzivního fluorescenčního maxima identifikovaného v oblasti nižších vlnových délek emise tzn. při $\approx 255/325$ nm, které je tradičně připisováno F – *fenylalanin-like* fluoroforům [237]. Z porovnání naměřených EEM spekter použitých FK je zřejmé, že vzorek PPFK je oproti FK izolované z jihočeské rašeliny charakterizován vyšší molekulovou hmotností, nižší “molekulární” heterogenitou a vyšším obsahem funkčních skupin, které jsou schopny uplatňovat elektron-donorní efekt na aromátech. Tyto výsledky byly v dobré shodě s absorpčními koeficienty a hodnotami specifických absorbancí $SUVA_{254}$ a v neposlední řadě i s vypočtenými hodnotami indexu f_a , které jsou ukazateli molekulové hmotnosti a stupně aromaticity těchto unikátních “biokoloidních” sloučenin.



Obr. 23: Excitačně-emisní spektra rašeliništních FK; **a)** FK izolovaná z jihočeské rašeliny; **b)** standard FK *Pahokee Peat*

Fluorescenční koeficienty

Fluorescenční spektrometrie v ustáleném stavu byla v této kapitole použita k získání tzv. *fluorescenčních koeficientů*, jejichž vypočtené hodnoty jsou dobrými ukazateli původu a stupně humifikace těchto “biokoloidních” sloučenin. Veškeré HL použité v této disertační práci byly podrobeny základní charakterizaci pomocí výše uvedených koeficientů. Vypočtené hodnoty fluorescenčních indexů jsou sumarizovány v Tab. 5.

Tab. 5: Vypočtené hodnoty fluorescenčních koeficientů studovaných HL (*FI* – fluorescenční index, *BIX* – biologický/autochtonní index, A_{440} – Milori index a *HIX* – humifikační index)

vzorek HL	<i>FI</i> (–)	<i>BIX</i> (–)	$A_{440} \times 10^8$ (CPS)	<i>HIX</i> (–)
LEOHK	0,73	0,43	2,75	34,28
JMLHK	0,67	0,35	4,62	37,49
ESHK	0,65	0,35	3,38	21,48
P1HK	0,57	0,40	3,21	11,35
P2HK	0,90	0,75	0,58	1,94
PPHK	0,67	0,33	2,41	20,76
JČRHK	0,73	0,42	2,03	10,18
AHK	0,80	0,62	0,24	1,17
ESFK	1,03	0,49	1,99	16,42
PFK	1,06	0,56	0,88	2,23
PPFK	0,86	0,35	3,02	38,26
JČRFK	1,00	0,39	1,99	7,94

Vypočtené hodnoty fluorescenčních koeficientů *FI* a *BIX* naznačují, že HL použité v této disertační práci jsou převážně terestriálního a alochtonního původu. Jak je patrné z výsledků uvedených v Tab. 5, studované vzorky vykazují typické hodnoty fluorescenčního a biologického/autochtonního indexu HL izolovaných z rozličných půd a lignitů různého stupně oxidace [157]. V obecném pohledu na dosažené výsledky fluorescenčního indexu HL můžeme říci, že HK vyjma vzorků izolovaných z lesní půdy *Humic Podzol* (P2HK) a extraktu hnědé mořské řasy *Ascophyllum nodosum* obsahují v porovnání s FK nízké množství sloučenin autochtonního původu. Naproti tomu byly FK použité v této disertační práci charakterizovány vyšším obsahem autochtonních sloučenin, které jsou ukazateli mikrobiální dekompozice organické hmoty během humifikačního procesu. Jak uvádí ve své práci Huguet a spol. [125] v případě půdních a rašeliništních HL je vyšší obsah autochtonních sloučenin tzn. *B* (γ) – tyrosin-like, *T* (δ) – tryptofan-like a *F* (φ) – fenylalanin-like fluoroforů indikátorem mikrobiální aktivity autotrofních bakterií. Mimoto poukázal na fakt, že senzitivnějším fluorescenčním koeficientem k posouzení mikrobiální aktivity v průběhu humifikačního procesu je biologický/autochtonní index *BIX*. Hodnoty fluorescenčního indexu *BIX* půdních HL (P1HK, P2HK a PFK) ukázaly, že tyto vzorky jsou tvořeny vyšším obsahem autochtonních sloučenin v porovnání s jejich půdními standardy *Elliott Soil* (ESHK a ESFK). Tyto výsledky naznačují, že dekompozice organické hmoty v průběhu humifikačního procesu HL izolovaných z lesní půdy *Humic Podzol* byla silněji ovlivněna mikrobiální činností autotrofních bakterií. Rovněž můžeme konstatovat, že podobných závěrů bylo dosaženo i v případě HL izolovaných z jihočeské rašeliny. Jak je z Tab. 5 zřejmé, tyto HL obsahují vyšší množství specifických fragmentů autochtonního charakteru v porovnání s jejími standardy *Pahokee Peat* (PPHK a PPFK). Toto tvrzení je podpořeno odbornou prací Tfailyho a spol. [238], který z rašelinišť v severní Minnesotě izoloval vodorozpustné frakce DOM,

jejichž fluorescenční indexy *BIX* byly ve velmi dobré korelaci s obsahem volných a vázaných aminokyselin v proteinových strukturách rozpuštěné organické hmoty. Fluorescenční analýza HK izolované z jihomoravského lignitu (JMLHK) ukázala, že tento vzorek je tvořen nižším obsahem sloučenin autochtonního původu v porovnání s jeho standardem LEOHK. Přítomnost stopového množství autochtonních sloučenin v uhelných HL není nikterak znepokojující, jestliže si uvědomíme, že jmenovateli rané fáze prouhelnění nekromasy jsou mikrobiální činnosti aerobních a anaerobních bakterií [239]. V případě vzorku HK izolované z extraktu hnědé mořské řasy *Ascophyllum nodosum* (AHK) je zřejmé, že vysoké hodnoty fluorescenčních koeficientů *FI* a *BIX* nejsou ukazateli autochtonního původu, nýbrž zdroje biologického. Tyto závěry jsou ve velmi dobré shodě s excitačně-emisními spektry HL, ve kterých byly v případě P2HK, AHK, PFK a JČRFK lokalizovány fluorescenční maxima nehumínového – mikrobiálního původu.

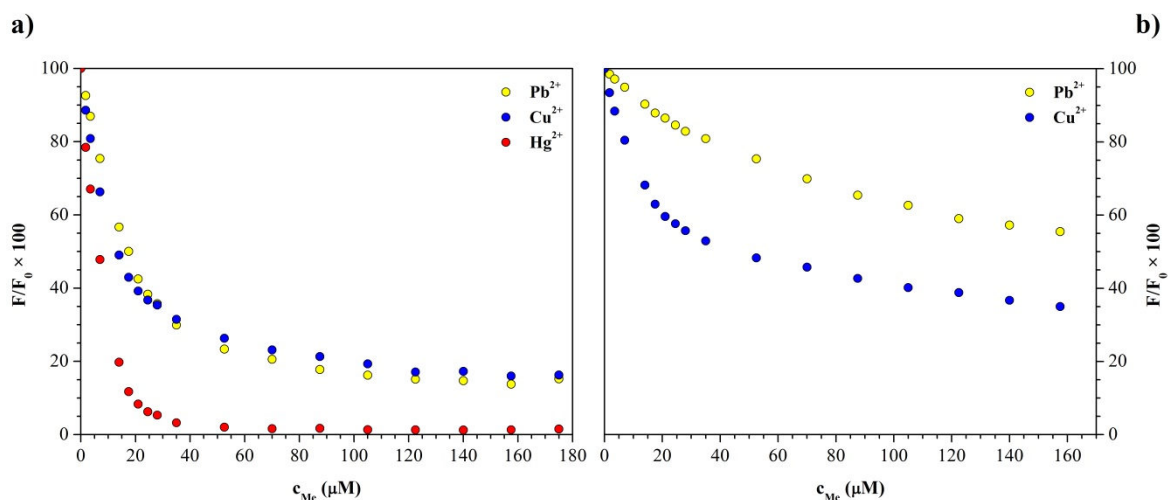
Z naměřených emisních spekter HL byly vypočteny fluorescenční koeficienty A_{440} a *HIX*, jejichž hodnoty jsou dobrými ukazateli aromaticity a stupně humifikace těchto unikátních “biokoloidních” sloučenin. Bližší informace o výpočtu fluorescenčních indexů A_{440} a *HIX* poskytují reference [126–127] a lze je nalézt v odstavcích kapitoly 3.3 této disertační práce. Jak je patrné z výsledků sumarizovaných v Tab. 5, studované vzorky vykazují obvyklé hodnoty fluorescenčních koeficientů HL izolovaných z uhelných, rašeliništních a půdních přírodních matric [92, 240–241]. V širším pohledu na prezentované výsledky humifikačního indexu *HIX* a Milori indexu A_{440} můžeme říci, že HL vyjma vzorku HK izolované z jihomoravského lignitu (JMLHK) jsou v porovnání se svými standardy (ESHK, ESFK, PPHK a PPFK) charakterizovány nižším stupněm humifikace a aromaticity. Naproti tomu byly standardy HL charakterizovány vyššími hodnotami těchto fluorescenčních indexů, které v sobě odráží informace o podílu aromatických struktur a tedy i míry humifikace těchto “biokoloidních” sloučenin. Jak je patrné z výsledků sumarizovaných v Tab. 5, HL izolované z lesní půdy *Humic Podzol* (P1HK, P2HK a v neposlední řadě i PFK) vykazují nižší obsah aromatických struktur, a proto můžeme konstatovat, že tyto půdní HL jsou charakterizovány nižším stupněm humifikace v porovnání se standardy ESHK a ESFK. Tentýž výsledek bylo dosaženo i v případě HL izolovaných z jihočeské rašeliny. Hodnoty fluorescenčních indexů rašeliništních HL (JČRHK a JČRFK) naznačují, že tyto vzorky jsou charakterizovány nižším stupněm humifikace v porovnání s jejich příslušnými standardy IHSS (PPHK a PPFK). Hodnoty fluorescenčních indexů $A_{440} \approx 4,62$ a *HIX* $\approx 37,49$ lignitické HK vypovídají o vyšším stupni humifikace respektive aromaticitě této “biokoloidní” sloučeniny vzhledem k použitému standardu LEOHK. Jak je zřejmé z výsledků uvedených v Tab. 5, HK izolovaná z extraktu hnědé mořské řasy *Ascophyllum nodosum* (AHK) byla charakterizována nejnižšími hodnotami fluorescenčních koeficientů A_{440} a *HIX*, a proto se můžeme domnívat, že tento vzorek HK je v porovnání s ostatními HL tvořen nízkým obsahem aromatických struktur a tudíž i nízkým stupněm humifikace. Rovněž je na tomto místě nutné říci, že tyto závěry jsou ve velmi dobré shodě s výsledky UV/Vis a ^{13}C NMR spektrometrie.

Statické zhášení fluorescence ligandů HL s Cu^{2+} , Pb^{2+} a Hg^{2+} ionty

Humínové látky (HL) jsou obecně definovány jako vysoce reaktivní “biokoloidní” sloučeniny, které se vyznačují schopností interagovat s širokou škálou cizorodých látek, jako jsou těžké kovy [242], povrchově aktivní látky – surfaktanty [152], hydrofobní sloučeniny [243], barviva [244] a v neposlední řadě i s rostlinnými výživovými nutrienty (NH_4^+ , K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , NO_3^- , SO_4^{2-} , H_2PO_4^- , HPO_4^{4-} aj.). Hlavním cílem této kapitoly disertační práce

bylo ověřit a otestovat využití jednoduchých komplexačních experimentů, které by přispěly k lepšímu pochopení reaktivity HL. Kromě toho je na tomto místě nutné říci, že edukaci v oblasti ochrany životního prostředí je v dnešní době věnována značná část lidského úsilí, nicméně problematika environmentálního znečištění těžkými kovy je i přes tuto osvětovou činnost stále aktuální, jak vyplývá z rozsáhlého počtu odborných publikací věnovaných této otázce [245–247]. Na základě provedené literární rešerše byly pro studium reaktivity HL vybrány Cu^{2+} , Pb^{2+} a Hg^{2+} ionty, které s těmito “biokoloidními” sloučeninami tvoří stabilní komplexy [151, 248]. Reaktivita, která je zde reprezentována schopností HL vázat a tím i imobilizovat těžké kovy byla v této disertační práci studována ve formě vodných roztoků těchto “biokoloidních” sloučenin. Tato koloidní forma velmi dobře simuluje chování HL obzvláště FK v tzv. půdním roztoku. Jak uvádí ve své práci Plaza a spol. [147] studium komplexace HL v roztoku přináší mimo jiné i experimentální výhody s ohledem na možnost zvolení fyzikálně-chemických podmínek (koncentrace, teplota, pH, iontová síla aj.).

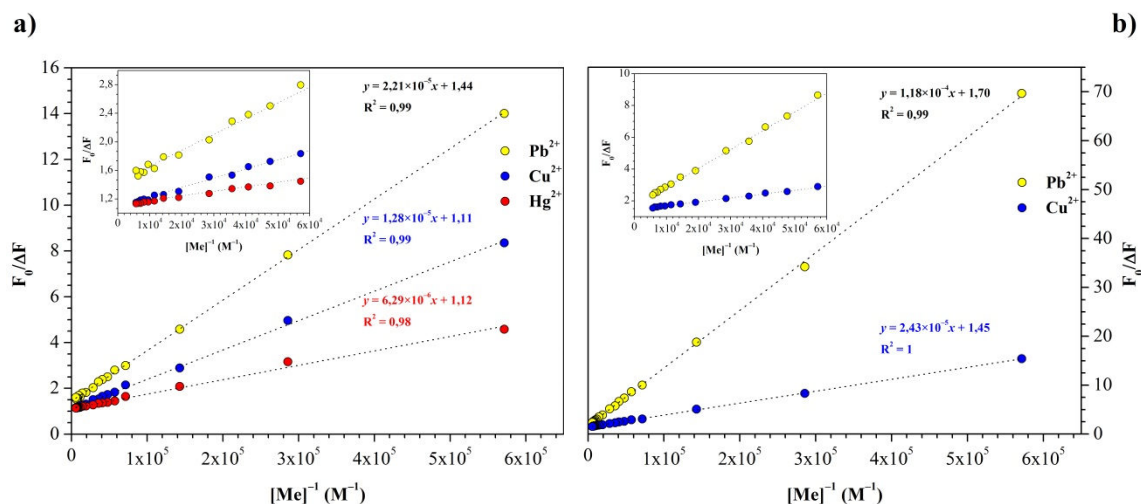
Za účelem studia reaktivity HL, které jsou zde reprezentovány konstantami stability komplexů $[\text{HL}-\text{Me}^{\text{X}+}]$ a částmi počáteční fluorescence, které jsou schopny podlehnout statickému zhášení s Cu^{2+} , Pb^{2+} a Hg^{2+} ionty byly jako ligandy komplexace zvoleny standardy půdních HL (ESHK a ESFK). Z naměřených emisních spekter systémů $\text{HL}-\text{Me}^{2+}$ a roztoků HL bez přítomnosti zhášedce tj. iontů Cu^{2+} , Pb^{2+} a Hg^{2+} byly odečteny hodnoty intenzity fluorescence v maximu emise. Z výše uvedených experimentálních dat byly pomocí upravené Stern-Volmerovy rovnice získány parametry komplexace ESHL s Cu^{2+} , Pb^{2+} a Hg^{2+} ionty. Na Obr. 24 jsou uvedeny grafické závislosti $I_{\text{F}}(\text{Me}^{2+})/I_{\text{F}0} \times 100$ na molární koncentraci použitých iontů Cu^{2+} , Pb^{2+} a Hg^{2+} .



Obr. 24: Grafické závislosti $I_{\text{F}}(\text{Me}^{2+})/I_{\text{F}0} \times 100$ na molární koncentraci použitých iontů těžkých kovů Cu^{2+} , Pb^{2+} a Hg^{2+} ; **a)** standard půdní HK *Elliott Soil*; **b)** standard půdní FK *Elliott Soil*

Jak je z Obr. 24 zřejmé, kvaziexponenciální průběh grafické závislosti $I_{\text{F}}(\text{Me}^{2+})/I_{\text{F}0} \times 100$ na molární koncentraci iontů těžkých kovů svědčí o vzniku komplexů mezi ligandy půdních HL a Cu^{2+} , Pb^{2+} a Hg^{2+} kovy, a proto můžeme konstatovat, že tyto ionty způsobují výrazné zhášení fluorescence těchto “biokoloidních” sloučenin. Kromě toho si můžeme povšimnout, že k efektivnímu zhášení fluorescence použitých HL dochází již při nízkých koncentracích zhášedce v systému $[\text{HL}-\text{Me}^{2+}]$ tj. v rozmezí molárních koncentrací $\approx 1,75\text{--}35 \mu\text{M}$ Cu^{2+} , Pb^{2+} a Hg^{2+} iontů. Poměrně dramatický pokles intenzity fluorescence ve výše uvedeném rozmezí molárních koncentrací vypovídá o silné afinitě ligandů půdních HL k vybraným iontům těžkých

kovů. Jak je z Obr. 24a patrné, nejvíce podléhaly statickému zhášení vzorky půdních HL po komplexaci s Hg^{2+} ionty, přičemž zhášecí efekt rtuťnatého iontu byl v případě FK natolik silný, že nebylo možné z naměřených experimentálních dat stanovit konstantu stability a parametr odpovídající části počáteční fluorescence, která je schopna podlehnout statickému zhášení. Z tohoto důvodu nebyly příslušné grafické závislosti $I_F(\text{Hg}^{2+})/I_{F0} \times 100$ respektive $F_0/\Delta F$ na molární koncentraci Hg^{2+} iontů a její inverzní hodnotě v Obr. 24b a 25b prezentovány.



Obr. 25: Grafické závislosti $F_0/\Delta F$ na převrácené hodnotě molární koncentrace použitých iontů těžkých kovů Cu^{2+} , Pb^{2+} a Hg^{2+} ; a) standard půdní HK *Elliott Soil*; b) standard půdní FK *Elliott Soil*

I když nemáme parametry komplexace k dispozici tj. K_a [Hg^{2+}] a f_a , tak se můžeme na základě pozorování domnívat, že Hg^{2+} ionty tvoří s ligandy půdní FK *Elliott Soil* velmi silné a stabilní komplexy. Tyto závěry jsou v dobré shodě s odbornou prací Zhanga a spol. [140], kterému se podařilo zjistit, že Hg^{2+} ionty jsou velmi silně vázány ligandy půdních FK a DOM, jejichž konstanty stability byly stanoveny v rozmezí hodnot $\approx 3,28$ – $4,48$.

Z naměřených experimentálních dat (Obr. 25) byly pomocí upravené Stern-Volmerovy rovnice vypočteny konstanty stability K_a [Me^{2+}] a parametry f_a ligandů půdních HL po komplexaci s Cu^{2+} , Pb^{2+} a Hg^{2+} ionty. Tyto výsledky zhášení fluorescence půdních HL s vybranými ionty těžkých kovů jsou sumarizovány v Tab. 6.

Tab. 6: Vypočtené hodnoty konstanty stability v logaritickém vyjádření $\log K_a$ [Me^{2+}] a parametr f_a , který odpovídá části počáteční fluorescence, která je schopna podlehnout statickému zhášení s Cu^{2+} , Pb^{2+} a Hg^{2+} ionty.

vzorek HL		$\log K_a$	f_a (%)	R^2
ESHK	Cu^{2+}	4,85	90	0,99
	Pb^{2+}	4,50	69	0,99
	Hg^{2+}	5,15	89	0,98
ESFK	Cu^{2+}	4,45	69	1,00
	Pb^{2+}	3,70	59	0,99
	Hg^{2+}	(–)	(–)	(–)

Jak je patrné z výsledků sumarizovaných v Tab. 6, studované vzorky vykazují typické hodnoty konstanty stability $\log K_a$ a parametru f_a HL izolovaných z terestriálních přírodních matric tzn. HL extrahovaných z rozličných půdních typů [147]. V širším pohledu na dosažené výsledky konstanty stability systému $[\text{HL}-\text{Me}^{2+}]$ a parametru f_a můžeme konstatovat, že půdní HK je v porovnání se svým protějškem charakterizována vyšší stabilitou $[\text{HL}-\text{Me}^{2+}]$ komplexů a podílu počáteční fluorescence, která je schopna podlehnout statickému zhašení s Cu^{2+} , Pb^{2+} a Hg^{2+} ionty. Naproti tomu byla FK izolovaná z úrodné půdy *Elliott Soil* charakterizována nižšími hodnotami těchto ukazatelů efektivity komplexace HL s těmito polutanty. Jak je zřejmé z výsledků uvedených v Tab. 6, nejsilnější komplexy tvořila půdní HK s Hg^{2+} ionty, jejíž konstanta stability $\log K_a$ [Hg^{2+}] dosahovala nejvyšší hodnoty tj. $\approx 5,15$. Kromě toho je na tomto místě nutné říci, že tento systém $[\text{HK}-\text{Hg}^{2+}]$ podléhal statickému zhašení až z 89 %. Jak uvádí ve své práci Ryan a spol. [148] jako i další autoři [151, 249] je vyšší stabilita komplexů HK s Cu^{2+} a Hg^{2+} ionty pravděpodobně způsobena jejich schopností tvořit s těmito ligandy silné komplexy vnitřní sféry. Tento výše uvedený závěr je rovněž podpořen vysokými velikostmi parametru f_a , které dosahovaly hodnot vyšších než 85 %. Mimoto je na tomto místě nutné říci, že hodnoty konstanty stability K_a systému $[\text{HL}-\text{Me}^{2+}]$ zde reprezentují disociační konstanty K_D , jak je zřejmé z matematického odvození Stern-Volmerovy rovnice. Obecně tedy platí, čím je konstanta stability K_a resp. disociační konstanta K_D větší, tím je komplex $[\text{HL}-\text{Me}^{2+}]$ pevnější. Z tohoto pohledu vyplývá, že nejstabilnějším a nejpevněji vázaným iontem je v případě půdních HK rtuťnatý kationt. Naproti tomu jako nejméně stabilní komplexy byly charakterizovány ligandy půdních HL s Pb^{2+} ionty, jejichž hodnoty $\log K_a$ resp. $\log K_D$ byly nejnižší tj. $\log K_a[\text{HK}-\text{Pb}^{2+}] \approx 4,50$ a $\log K_a[\text{FK}-\text{Pb}^{2+}] \approx 3,70$. Jak již bylo diskutováno v kapitole 3.3 je konstanta stability systému $[\text{HL}-\text{Me}^{X+}]$ silně závislá na hodnotě pH prostředí, kterému je komplex vystaven. Podle této studie by mohly představovat jisté environmentální riziko Pb^{2+} ionty vázané půdními FK, které mohou být vyplavovány do nižších vrstev půdy z kontaminované ornice, anebo mohou být transportovány až do zdrojů podzemních vod.

6.5 Časově rozlišená fluorescenční spektrometrie huminových látek

Časově rozlišená fluorescenční spektrometrie, zvláště pak její technika pulzní fluorescenční spektrometrie, která je v odborné literatuře známa pod zkratkou TCSPC – *Time-correlated single photon counting* je mnohými autory pokládána za nejdůležitější metodu studia dynamiky excitovaných stavů zkoumaných organických sloučenin. Ustálená fluorescence je ovlivněna nejen koncentrací fluoroforu či vlnovou délkou budícího záření, ale i přítomností kyslíku, rozpuštěného ve vzorku, který zde plní roli významného zhašeče fluorescence. V případě měření časově rozlišených fluorescenčních spekter nemusí být tyto limitace uvažovány, a to z důvodu, že doba života na výše zmíněných faktorech závislá není, s výjimkou vlnové délky při reakcích v excitovaných stavech. Kromě toho je na tomto místě nutné podotknout, že žádný fluorescenční experiment se neobejde bez měření ustálené fluorescence, poněvadž emisní spektrum patří k základním charakteristikám studovaného vzorku, avšak měření doby života nám poskytuje mnoho jiných informací o zkoumaném systému. Jak uvádí ve své rozsáhlé monografii Lakowicz [64], procesy v excitovaných stavech lze sice vidět i v emisních spektrech, nicméně toto pozorování je omezeno pouze na určitý typ fluorescenčních sloučenin. Jako názorný příklad lze uvést tvorbu excimeru či exciplexu některých polyaromatických uhlovodíků (PAU), anebo přenos náboje v excitovaném stavu, ale v důsledku měření doby života můžeme pozorovat změnu emisního

spektra s časem. Z výše uvedeného faktu je zřejmé, že procesy probíhající v excitovaných stavech organických sloučenin lze studovat pozorováním tzv. časově rozlišených emisních spekter (TRES – *Time Resolved Fluorescence Spectra*). I přes nesporné výhody, které s sebou přináší časově rozlišená fluorescenční spektrometrie je bohužel v oblasti studia HL resp. DOM jen zřídka používanou instrumentální technikou, a to jen ve velmi úzkém pohledu na příslušné doby života těchto “biokoloidních” sloučenin.

Hlavní myšlenkou této části disertační práce bylo navrhnout a následně provést pilotní experimenty, které by přispěly k detailnějšímu pochopení dynamiky excitovaných stavů HL, které jsou velmi důležité k poznání fenoménů, jako jsou reakce a přenos náboje v excitovaném stavu a v neposlední řadě i viskozita mikroprostředí okolo excitovaných fluoroforů těchto unikátních “biokoloidních” sloučenin. Za tímto účelem byla na základě provedené literární rešerše vybrána metoda měření časově rozlišených emisních spekter, ze kterých byly následně pomocí normalizace plochy pod křivkou TRES spekter zkonstruovány tzv. časově rozlišené přes plochu normalizované emisní spektra TRANES – *Time Resolved Area Normalized Emission Spectra*, která jsou dobrými ukazateli výše zmíněných procesů. Veškeré HL použité v této disertační práci byly podrobeny základnímu screeningu pomocí TSCPC spekter. Jednou z primárních metod, jak mohou být HL studovány je měření vyhasínání fluorescence časově rozlišených spekter, ze kterých byly následně stanoveny parametry proložení tzn. doby života τ_i a jejich příslušné relativní amplitudy B_i . Z naměřených poklesů intenzity fluorescence HL byly při λ_{em} odpovídající $I_{F(max)}$ stanoveny výše zmíněné parametry proložení, které jsou uvedeny v Tab. 7. Emisní vlnové délky (λ_{em}) byly vybrány v maximální hodnotě intenzity fluorescence HL, a to z důvodu získání vyšší hodnoty parametru přístrojové odezvy α . Tento parametr mimo jiné ovlivňuje i časovou náročnost sběru dat při daném nastavení a instrumentaci časově rozlišené fluorescenční spektrometrie. Obecně platí, že s klesající hodnotou přístrojové odezvy α roste čas, který je potřebný k získání poklesu intenzity fluorescence při daném počtu fotonů v maximu poklesu. Z výše uvedeného faktu je zřejmé, že vybraným vlnovým délkám emise, při kterých byly naměřeny poklesy vyhasínání fluorescence použitých HL, nebyl přikládán kvantově-mechanický význam, ale jednalo se pouze o instrumentální nastavení prvotních TCSPC experimentů. Rovněž je na tomto místě nutné říci, že tyto výsledky sloužily spíše k získání ucelené představy o časově rozlišené fluorescenční spektrometrii HL, a také k optimalizaci vyhodnocení naměřených experimentálních dat.

Tab. 7: Doby života τ_i a jejich příslušné relativní amplitudy B_i studovaných HL

vzorek HL	doby života excitovaných stavů (ns)				relativní amplitudy (%)			
	τ_1	τ_2	τ_3	τ_4	B_1	B_2	B_3	B_4
LEOHK	0,10 ± 0,00	0,97 ± 0,03	3,55 ± 0,08	8,78 ± 0,05	5,37	16,09	45,51	33,02
JMLHK	0,14 ± 0,01	1,08 ± 0,09	3,55 ± 0,06	8,78 ± 0,10	9,17	21,85	41,66	27,32
ESHK	0,28 ± 0,00	1,37 ± 0,12	3,77 ± 0,04	8,62 ± 0,15	4,84	22,02	45,98	27,16
P1HK	0,15 ± 0,02	1,03 ± 0,08	3,35 ± 0,02	8,59 ± 0,07	8,89	17,16	39,39	34,56
P2HK	0,12 ± 0,01	0,88 ± 0,05	2,87 ± 0,04	7,68 ± 0,08	24,59	23,40	38,21	13,80
PPHK	0,10 ± 0,03	0,94 ± 0,06	3,18 ± 0,10	8,11 ± 0,10	7,70	18,34	43,07	30,89
JČRHK	0,11 ± 0,01	0,84 ± 0,10	3,09 ± 0,05	8,45 ± 0,04	11,04	20,34	41,41	27,22
ESFK	0,32 ± 0,03	1,58 ± 0,07	4,53 ± 0,12	10,81 ± 0,1	9,49	27,22	43,43	19,86
PFK	0,09 ± 0,00	0,65 ± 0,11	2,84 ± 0,05	8,35 ± 0,04	10,73	16,78	43,56	28,93
PPFK	0,19 ± 0,02	1,14 ± 0,09	3,74 ± 0,05	9,84 ± 0,16	8,17	24,98	42,62	24,23
JČRFK	0,21 ± 0,04	1,34 ± 0,06	4,20 ± 0,14	9,99 ± 0,13	9,46	21,48	41,41	27,65

Doby života excitovaných stavů, které jsou uvedeny v Tab. 7, představují průměrné hodnoty ze tří nezávislých opakování. Vypočtené směrodatné odchylky (σ) relativních amplitud byly v porovnání s τ_i zanedbatelné, a proto nejsou ve výše prezentované tabulce uvedeny. Jak je patrné z výsledků sumarizovaných v Tab. 7, použité vzorky vykazují čtyři doby života excitovaného stavu, z nichž nejvýznamněji je zastoupen čas odpovídající hodnotě $\approx 2,9\text{--}4,5$ ns. Tyto výsledky jsou v dobré shodě se závěry publikovanými Kumkem a spol. [153], který se zabýval studiem přírodní organické hmoty NOM pomocí časově rozlišené fluorescenční spektrometrie. Při porovnání příslušných dob života a jejich relativních amplitud je zřejmé, že FK se oproti HK vyznačují poměrně delšími časy $\tau_2\text{--}\tau_4$ a relativní amplitudou B_2 . Jednotlivé nuance mezi stanovenými dobami života excitovaných stavů HL jsou s největší pravděpodobností způsobeny individuálními diferencemi ve strukturní morfologii těchto unikátních “biokoloidních” sloučenin. Kumke a spol. [154] studovali HL izolované ze sladkovodních zdrojů NOM pomocí metody exponenciální série (ESM – *Exponential Series Method*), která je založena na měření poklesů intenzit fluorescence při různém nastavení převodníku času TAC. Na základě získaných experimentálních dat přiřadili krátké době života excitovaného stavu $\tau_1 \approx 1$ ns fluorofory, které mají svůj původ v látkách, jako jsou mono- a polyhydroxybenzoové kyseliny případně obdobně substituované chinony. Podobných závěrů bylo dosaženo i v odborné práci McGowna a spol. [118], který se zabýval studiem alkoholového extraktu z hnědého uhlí pomocí výše uvedené metody ESM rozšířené o metodu maximální entropie (MEM – *Maximum Entropy Method*). Jak je patrné z výsledků uvedených v Tab. 3, použité vzorky vykazují obvyklé hodnoty doby života excitovaných stavů a relativních amplitud HL izolovaných z terestriálních a sladkovodních přírodních matric [153–156]. Závěrem lze tedy tvrdit, že naměřené vyhasínání fluorescence HL bylo prokládáno vhodným matematickým modelem tzn. čtyř-exponenciální matematickou funkcí, jejíž obecný zápis je dán rovnicí (14). Shodnost experimentálních dat s použitým matematickým modelem byla mimo jiné potvrzena hodnotami redukované správnosti

proložení χ_R^2 , které nepřevyšovaly limitní hodnotu 1,2 a zároveň průběhem závislosti vážených residuí na detekčních kanálech.

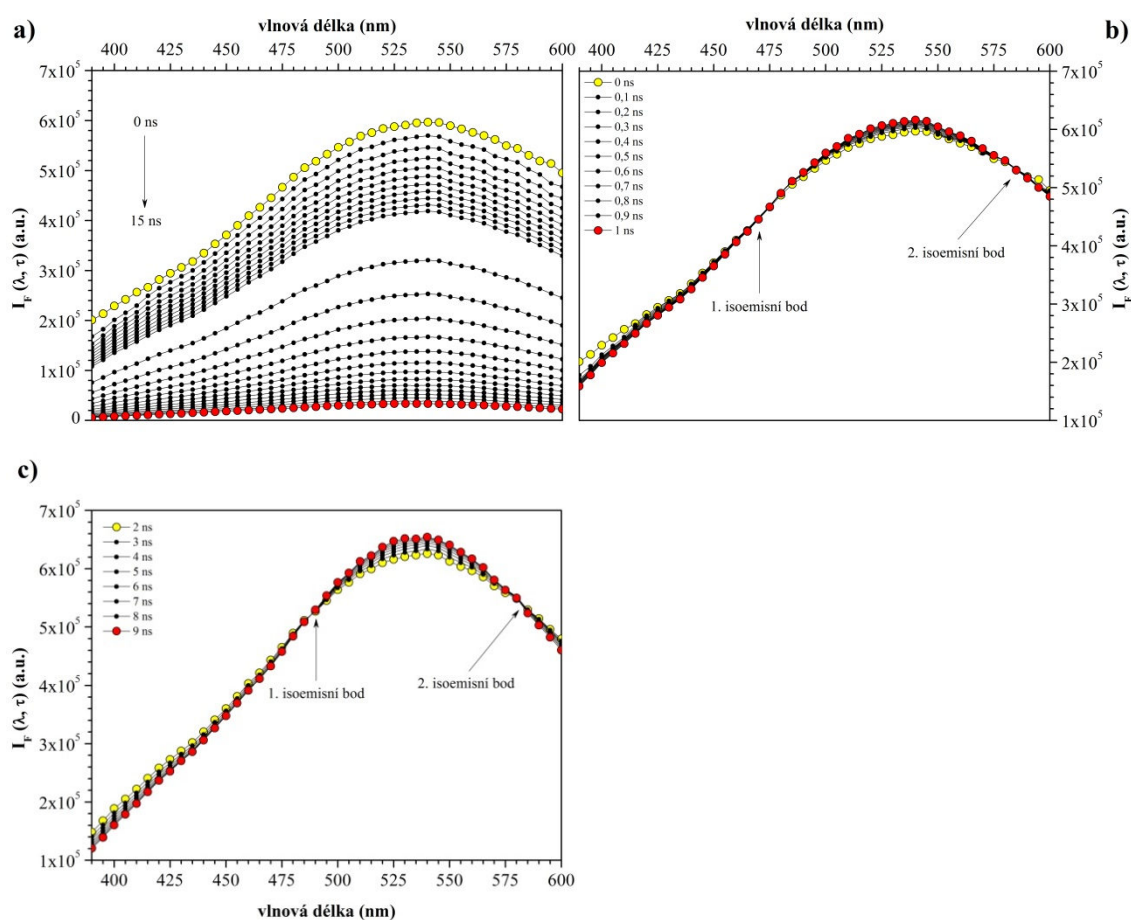
Z naměřených poklesů intenzit fluorescence byly stanoveny doby života a hodnoty relativních amplitud, ze kterých byla následně zkonstruována časově rozlišená emisní spektra podle rovnice (22), která je uvedena v kapitole 2.2.12. Vyhasínání fluorescence HL bylo výhradně vyhodnoceno pomocí čtyř-exponenciálního modelu, který se na základě prvotně provedených experimentů ukázal jako vhodně zvoleným, a proto byl použit k získání výše zmíněných parametrů. Následně byla z TRES spekter studovaných HL rekonstruována časově rozlišená přes plochu normalizovaná spektra TRANES, která jsou dobrými ukazateli, zda pozorovaná emise pochází z jedné, anebo více emisních jednotek běžně označovaných jako *species*. Vzhledem ke komplexnosti časově rozlišené fluorescenční spektrometrie HL bylo nutné uvést veškerá vyhodnocená TRES a TRANES spektra do příloh jako samostatné grafické závislosti (viz. kapitola 11.2). V textu disertační práce budou uvedena pouze modelová spektra standardu půdní HK pocházející z úrodné půdy *Elliott Soil*. Jednotlivé difference v charakteru TRES a TRANES a z nich dedukované závěry budou diskutovány v následujících odstavcích této disertační práce.

Na Obr. 3P jsou uvedena TRES a TRANES spektra HK izolované z jihomoravského lignitu (JMLHK) a jejího odpovídajícího standardu *Leonarditu* (LEOHK). Tvar časově rozlišených emisních spekter studovaných HK svědčí o tom, že průběh vyhasínání fluorescence není ovlivněn procesy excitovaného stavu, kam zpravidla řadíme efekty rozpouštědla a reakce v excitovaném stavu. V opačném případě by byla pozorována změna TRES spektra v čase. Jak uvádí ve své práci Lakowicz [64], v případě efektů rozpouštědla emituje jistá distribuce fluoroforů, která je tvořena nezrelaxovanými a zrelaxovanými molekulami a poskytují tak specifická TRES spektra, jejichž emisní maxima se kontinuálně posunují k delším vlnovým délkám. Kromě toho, je na tomto místě nutné říci, že v této distribuci jsou obsaženy i fluorofory, které se nacházejí v různém stupni částečné zrelaxovanosti. Naproti tomu, při reakcích excitovaného stavu dochází k emisi jak ze stavu nezreagovaného, tak ze stavu zreagovaného, který v důsledku nižší energetické hladiny S_1^0 emituje v oblasti vyšších vlnových délek. Z výše uvedeného faktu je zřejmé, že s rostoucím časem se bude intenzita fluorescence zreagovaných fluoroforů zvyšovat a zároveň, emisní pík lokalizovaný v oblasti nižších vlnových délek se bude s postupujícím časem vytrácet. Z průběhu časově rozlišených emisních spekter uhelných HK je zřejmé, že se veškeré emitující fluorofory nacházejí v oblasti o stejné viskozitě mikroprostředí, kde se molekuly rozpouštědla orientují stejnou rychlostní konstantou relaxace jako excitované “supramolekuly” HK. Pokud by se jen určitá část excitovaných fluoroforů nacházela v oblasti s odlišnou viskozitou mikroprostředí např. v hydrofobních doménách, které jsou zpravidla tvořeny asociáty relativně malých heterogenních molekul [37], tak by v časově rozlišeném emisním spektru docházelo k bathochromnímu posunu fluorescenčního maxima v čase. Podobných závěrů bylo dosaženo i v případě tzv. modelu dvou stavů, kde získané výsledky naznačují, že v průběhu vyhasínání fluorescence HK nedochází k reakci v excitovaném stavu, jako je např. přenos protonu či náboje. V TRANES spektrech hnědouhelných HK si nelze nepovšimnout, že ačkoliv jednotlivé průběhy emisních píků vykazují silnou tendenci se protnout v tzv. *isoemisním bodu*, k exaktnímu splnutí křivek, v jeden konkrétní bod, bohužel u těchto vzorků nedošlo. Tato nesnáze je pravděpodobně způsobena silným rozptylem světla, o kterém svědčí poměrně vysoké hodnoty relativních amplitud B_1 . Nejvyšší hodnoty tohoto parametru byly zjištěny

v krajních oblastech emisního spektra tzn. při $\approx 390\text{--}450\text{ nm}$ a $\approx 550\text{--}600\text{ nm}$. Jak uvádí ve své práci Bekbolet a spol. [250], jedinou možností jak efektivně minimalizovat rozptylové jevy je mikrofiltrace, kdy jsou z roztoků HL odstraněny málo rozpustné agregáty, které jsou zpravidla zdrojem výše zmíněného rozptylu. Naproti tomu, by mohly být odstraněny i s nerozpuštěnými agregáty některé fluorofory, a proto nebyly měřené vzorky HL v této disertační práci nikterak upravovány. Jak již bylo diskutováno dříve (viz. kapitola 2.2.12), dvě na sobě nezávislé emisní jednotky (*species*) způsobí propojení jednotlivých emisních spekter v tzv. *isoemisním bodu*, který je specifický pro emisi právě ze dvou jednotek. Pokud by v systému byly jednotky tři, objevily by se v TRANES dva isoemisní body. Na základě průběhu a tendenci emisních spekter se protnout ve dvou isoemisních bodech se můžeme domnívat, že fluorescence uhelných HK je tvořena třemi samostatnými emisními jednotkami resp. druhy. Jelikož jsou HL považovány za multi-fluoroforní systém a průběh vyhasínání fluorescence HK nebyl ovlivněn procesy excitovaného stavu, můžeme říci, že jednotlivé druhy fluoroforů jsou charakterizovány právě jednou dobou života excitovaných stavů $\tau_2\text{--}\tau_4$. Závěrem však musíme konstatovat, že výše uvedená hypotéza by měla být v případě těchto vzorků HK znovu ověřena měřeními vyhasínání fluorescence a znovu zkonstruováním TRES a TRANES spekter.

Na Obr. 4P a 26 jsou uvedena TRES a TRANES spektra HK izolovaných z lesní půdy *Humic Podzol* (P1HK a P2HK) a standardu ESHK pocházejícího z úrodné půdy *Elliott Soil*. Průběh časově rozlišených emisních spekter HK izolovaných z lesní půdy *Humic Podzol* naznačuje, že vyhasínání fluorescence je ovlivněno probíhajícími procesy v excitovaných stavech. Jak je z Obr. 4P zřejmé, v případě výše zmíněných HK se jejich fluorescenční maxima v pozorovaném časovém intervalu 0–15 ns kontinuálně posunují k delším vlnovým délkám emise, a dochází tak k bathochromnímu posunu, který je zpravidla ukazatelem procesu relaxace rozpouštědla okolo excitovaných fluoroforů. V časově rozlišeném emisním spektru vzorku P2HK si nelze nepovšimnout velmi výrazného bathochromního posunu, jehož velikost byla v pozorovaném časovém intervalu $\approx 25 \pm 2,5\text{ nm}$. Z důvodu toho, že TRES spektra byla vypočtena pomocí parametrů proložení, které byly obdrženy z poklesů intenzit fluorescence měřených s krokem 5 nm, je tedy zřejmé, že hodnoty posunu resp. maxima jsou zatíženy chybou $\approx 2,5\text{ nm}$. Naproti tomu, se vzorek HK izolované z lesní půdy *Humic Podzol* (P1HK) vyznačoval posunem emisního maxima o velikosti $\approx 10 \pm 2,5\text{ nm}$. Z průběhu časově rozlišených emisních spekter půdních HK (P1HK a P2HK) je zřejmé, že určitá část emitujících fluoroforů se nachází v oblasti o vyšší viskozitě, kde se molekuly rozpouštědla vyskytují v různém stupni částečné zrelaxovanosti jako i excitované “supramolekuly” HK. Kromě toho, je na tomto místě nutné říci, že v případě efektů rozpouštědla emituje i jistý podíl fluoroforů, který je tvořen jak zrelaxovanými, tak i doposud nezrelaxovanými molekulami. Na základě těchto výsledků se můžeme domnívat, že určitá část excitovaných fluoroforů se nacházela v oblasti s odlišnou viskozitou mikroprostředí tzn. hydrofobních doménách, které jsou tvořeny nepolárními fragmenty orientovanými dovnitř “supramolekuly” HL [38]. Naopak, polární stavební jednotky, které jsou substituovány převážně karboxylovými a hydroxylovými funkčními skupinami spoluvytvářejí tzv. vnější obal, této “supramolekulární” struktury HL. Průběh a tvar časově rozlišeného emisního spektra standardu *Elliott Soil* (viz. Obr. 26a) svědčí o tom, že během vyhasínání fluorescence nedochází k dynamickým procesům, jako jsou reakce v excitovaných stavech a v neposlední řadě i výše zmíněné efekty relaxace rozpouštědla. Ve všech zrekonstruovaných TRANES půdních HK si nelze nepovšimnout, že jednotlivé průběhy emisních pík se protnulý ve dvou

isoemisních bodech. První isoemisní bod se nacházel na modré straně emisního spektra tzn. v oblasti vlnových délek $\approx 420\text{--}490\text{ nm}$, zatímco druhý bod byl lokalizován v oblasti vyšších vlnových délek emise tj. při $\approx 530\text{--}585\text{ nm}$. Z výše uvedených závěrů se můžeme domnívat, že za fluorescenci půdních HK jsou zodpovědné právě a jenom tři na sobě nezávislé emisní jednotky resp. fluorescenční druhy, které jsou v odborné literatuře označovány jako *species*. Z globálního hlediska můžeme říci, že v případě HK izolovaných z lesní půdy *Humic Podzol* dochází v průběhu vyhasínání fluorescence ke kontinuálnímu posunu emisního píku, který je následován dvěma isoemisními body, které jsou ukazateli tří druhů fluoroforů a jistého kontinua emisních jednotek vzniklého pomalou relaxací molekul rozpouštědla okolo excitovaných stavů fluorescenčních druhů situovaných v hydrofobních doménách HK. Průběh vyhasínání fluorescence standardu půdní HK *Elliott Soil* nebyl nikterak ovlivněn, a v důsledku toho můžeme předpokládat, že jednotlivé druhy fluoroforů jsou charakterizovány právě jednou dobou života excitovaného stavu $\tau_2\text{--}\tau_4$.



Obr. 26: TRES a TRANES spektra standardu půdní HK *Elliott Soil*; **a**) časově rozlišené emisní spektrum (TRES); **b**, **c**) časově rozlišené přes plochu normalizované emisní spektrum (TRANES) v pozorovaných časech 0–1 ns a 2–9 ns

Na Obr. 5P jsou prezentována TRES a TRANES spektra HK izolované z jihočeské rašeliny (JČRHK) a jejího odpovídajícího standardu *Pahokee Peat* (PPHK). Průběh a tvar časově rozlišených emisních spekter studovaných HK svědčí o tom, že vyhasínání fluorescence není ovlivněno probíhajícími procesy v excitovaných stavech, kam obvykle řadíme efekty relaxace rozpouštědla, které spadají do kategorie tzv. kontinuálního modelu, a rovněž přicházejí do úvahy i reakce probíhající v excitovaných stavech molekul, které odpovídají tzv. modelu dvou

stavů. V opačném případě bychom pozorovali v TRES spektrech rašeliništních HK změny, které by se projevíly v morfologii jednotlivých emisních spekter v časovém intervalu 0–15 ns. Jak je z Obr. 5P zřejmé, veškeré emitující fluorofory se nacházejí v oblasti o stejné viskozitě mikroprostředí, kde se molekuly rozpouštědla orientují stejnou rychlostní konstantou relaxace jako excitované “supramolekuly” HK. To znamená, že rychlost reorientace molekul rozpouštědla je mnohem vyšší než samotná fluorescence, a proto dochází k emisi záření z již zcela zrelaxovaných excitovaných stavů. Naproti tomu, pokud by se jen určitá část populace excitovaných fluoroforů rašeliništních HK nacházela v oblasti s odlišnou viskozitou mikroprostředí, v této souvislosti studia máme obvykle namysli tzv. hydrofobní domény, které jsou nedílnou součástí supramolekulárního vyjádření struktury těchto unikátních “biokoloidních” sloučenin, tak by v časově rozlišených emisních spektrech docházelo k bathochromnímu posunu fluorescenčních maxim ve výše uvedeném časovém intervalu 0–15 ns. Podobných závěrů bylo dosaženo i v případě tzv. modelu dvou stavů, kde získané výsledky naznačují, že v průběhu vyhasínání fluorescence rašeliništních HK nedochází k reakci v excitovaném stavu. V opačném případě by byl pozorován pokles intenzity fluorescence na modré straně emisního spektra, který by odpovídal tzv. nezreagovaným stavům, zatímco v oblasti vyšších vlnových délek by docházelo ke kontinuálnímu nárůstu intenzity fluorescence nově vzniklého fluorescenčního maxima odpovídajícího stavům zreagovaným. V TRANES spektru HK izolované z jihočeské rašeliny si nelze nepovšimnout, že ačkoliv jednotlivé průběhy emisních spekter mají silnou tendenci se protnout v tzv. *isoemisním bodu*, k přesnému protnutí křivek, v jeden konkrétní bod, bohužel u tohoto vzorku nedošlo. Jak již bylo diskutováno dříve, tento fakt je pravděpodobně způsoben silným rozptylem světla na málo rozpustných agregátech HK. Jak je z Obr. 5P zřejmé, v případě standardu *Pahokee Peat* se jednotlivé průběhy emisních spekter protnuly ve dvou isoemisních bodech. První isoemisní bod byl lokalizován na modré straně emisního spektra tzn. v oblasti vlnových délek $\approx 485\text{--}490$ nm, zatímco druhý bod se nacházel v červené oblasti, jehož pozice byla vymezena vlnovými délkami $\approx 590\text{--}595$ nm. Na základě průběhu a tendenci emisních spekter se protnout ve dvou isoemisních bodech, můžeme předpokládat, že jako v případě standardu *Pahokee Peat* je fluorescence rašeliništní HK tvořena třemi samostatnými fluorescenčními druhy tzv. *species*. Jak již bylo uvedeno dříve, HL jsou mnohými autory považovány za multi-fluoroformní systém [117, 124, 130] a navíc, průběh vyhasínání fluorescence HK nebyl ovlivněn procesy excitovaného stavu, a proto můžeme konstatovat, že jednotlivé druhy fluoroforů jsou charakterizovány právě jednou dobou života excitovaných stavů $\tau_2\text{--}\tau_4$.

Na Obr. 6P jsou sumarizována TRES a TRANES spektra FK izolované z lesní půdy *Humic Podzol* (PFK) a jejího odpovídajícího standardu *Elliott Soil*. Průběh časově rozlišeného emisního spektra standardu FK pocházející z úrodné půdy *Elliott Soil* naznačuje, že vyhasínání fluorescence je v tomto případě ovlivněno probíhajícími procesy v excitovaném stavu. Jak je z Obr. 6P patrné, v případě výše zmíněné FK se její fluorescenční maxima v pozorovaném časovém intervalu 0–15 ns nepřetržitě posunují k delším vlnovým délkám emise, a dochází tak k bathochromnímu posunu, který je obvykle dobrým indikátorem procesu relaxace rozpouštědla okolo excitovaných fluoroforů. Velikost bathochromního posunu, který je v odborné literatuře označován jako “*red-shift*” [64], byla v pozorovaném časovém intervalu stanovena na $\approx 15 \pm 2,5$ nm. Naproti tomu, u vzorku FK izolované z lesní půdy *Humic Podzol* (PFK) nebyl pozorován žádný posun fluorescenčního maxima, a tudíž se můžeme domnívat, že vyhasínání fluorescence této “biokoloidní” sloučeniny není ovlivněno

probíhajícími procesy v excitovaných stavech, kam zpravidla řadíme výše zmíněné efekty relaxace rozpouštědla a v neposlední řadě i reakce v excitovaných stavech. Průběh časově rozlišeného emisního spektra půdního standardu *Elliott Soil* dává tušit, že určitá část populace emitujících fluoroforů se nachází v oblasti o vyšší viskozitě, kde se molekuly rozpouštědla vyskytují v různé míře částečné zrelaxovanosti jako i excitované “supramolekuly” FK. Na základě těchto výsledků můžeme konstatovat, že jistá část excitovaných fluoroforů se nacházela v oblasti s odlišnou viskozitou mikroprostředí tzn. hydrofobních doménách, které jsou tvořeny stavebními jednotkami nepolárního charakteru. Tyto unikátní oblasti supramolekulární struktury HL jsou stabilizovány převážně slabými disperzními interakcemi, jako jsou *van der Waalsovy* síly, π - π a π -CH₃ [26]. Jak je z Obr. 6P zřejmé, jednotlivé průběhy emisních píků půdních FK se protnulý ve dvou isoemisních bodech. První isoemisní bod se nacházel na modré straně emisního spektra tzn. v oblasti vlnových délek \approx 410–435 nm, zatímco druhý bod byl lokalizován v oblasti vyšších vlnových délek emise tj. při \approx 515–560 nm. Na základě výše sumarizovaných závěrů můžeme říci, že jako v případě půdních HK jsou za fluorescenci těchto “biokoloidních” sloučenin zodpovědné právě a jenom tři na sobě nezávislé emisní jednotky respektive fluorescenční druhy. Z globálního pohledu na dosažené výsledky lze konstatovat, že v případě FK pocházející z úrodné půdy *Elliott Soil* dochází během vyhasínání fluorescence k nepřetržitému posunu fluorescenčního maxima, který je následován přítomností dvou isoemisních bodů, které jsou výhradně ukazateli tří druhů fluoroforů a určitého kontinua emisních jednotek vzniklého pomalou relaxací molekul rozpouštědla okolo excitovaných stavů fluorescenčních druhů situovaných v hydrofobních doménách FK. Tyto závěry jsou ve velmi dobré shodě s výsledky publikovanými v odborné práci Periasamyho a spol. [82], který uvedl několik typů TRES a TRANES spekter se kterými se můžeme v oblasti studia rozličných systémů setkat. Jak již bylo diskutováno dříve, průběh vyhasínání fluorescence půdní FK není nikterak zatížen dynamickými procesy, a tudíž se můžeme domnívat, že jednotlivé *species* jsou charakterizovány právě jednou dobou života excitovaného stavu τ_2 – τ_4 .

Na Obr. 7P jsou uvedena TRES a TRANES spektra FK izolované z jihočeské rašeliny (JČRFK) a jejího odpovídajícího standardu *Pahokee Peat*. Průběh a tvar časově rozlišeného emisního spektra FK izolované z jihočeské rašeliny svědčí o tom, že vyhasínání fluorescence je ovlivněno probíhajícími procesy v excitovaném stavu. V časově rozlišeném emisním spektru tohoto vzorku si nelze nepovšimnout faktu, že v pozorovaném časovém intervalu 0–15 ns dochází ke kontinuálnímu bathochromnímu posunu přítomných fluorescenčních maxim. Tento charakteristický jev je zpravidla způsoben procesy relaxace rozpouštědla okolo excitovaných fluoroforů. Jak je z Obr. 7P zřejmé, velikost výše zmíněného posunu byla v pozorovaném časovém intervalu stanovena na $\approx 10 \pm 2,5$ nm. Na základě těchto výsledků může být vyřčena hypotéza, že se určitá část emitujících fluoroforů nachází v oblasti o vyšší viskozitě, kde se molekuly rozpouštědla vyskytují v různém stupni částečné zrelaxovanosti jako i excitované “supramolekuly” FK. Jak již bylo diskutováno dříve, v případě efektů rozpouštědla emituje i jistý podíl fluoroforů, který je tvořen jak zrelaxovanými, tak i doposud nezrelaxovanými molekulami, v důsledku čehož se objevuje určitá distribuce dob života excitovaného stavu a pozorovaná emise se tak posunuje k delším vlnovým délkám. Na základě těchto výsledků můžeme tvrdit, že se určitá část excitovaných fluoroforů nacházela v hydrofobních doménách tzn. v oblastech s odlišnou viskozitou mikroprostředí. Naproti tomu, průběh a tvar časově rozlišeného emisního spektra standardu *Pahokee Peat* vypovídá o tom, že během vyhasínání fluorescence této “biokoloidní” sloučeniny nedochází k dynamic-

kým procesům, jako jsou reakce v excitovaných stavech a výše uvedené efekty relaxace rozpouštědla. V TRANES spektru FK pocházející z rašeliny *Pahokee Peat* si nelze nepovšimnout, že ačkoliv jednotlivé průběhy emisních spekter vykazují silnou tendenci se protnout v tzv. *isoemisním bodu*, k přesnému protnutí křivek, v jeden konkrétní bod, bohužel u tohoto vzorku rovněž nedošlo. I v tomto případě je tento problém s největší pravděpodobností způsoben přítomností málo nebo ne zcela rozpustných agregátů FK. Naproti tomu, si v TRANES spektru FK izolované z jihočeské rašeliny nelze nepovšimnout, že jednotlivá emisní spektra se po jejich normalizaci protнула ve dvou isoemisních bodech. První isoemisní bod se objevil na modré straně emisního spektra tzn. v oblasti vlnových délek $\approx 415\text{--}430\text{ nm}$, kdežto druhý bod byl lokalizován v oblasti vyšších vlnových délek emise tj. při $\approx 515\text{--}530\text{ nm}$. Na základě průběhu a účelné snaze emisních spekter se protnout ve dvou isoemisních bodech se můžeme domnívat, že jako v případě rašelinistní FK je fluorescence standardu *Pahokee Peat* tvořena třemi samostatnými emisními druhy. Mimo tuto implicitní skutečnost je zřejmé, že průběh vyhasínání fluorescence standardu FK nebyl ovlivněn procesy excitovaného stavu, a proto můžeme říci, že jednotlivé druhy fluoroforů jsou charakterizovány právě jednou dobou života excitovaných stavů $\tau_2\text{--}\tau_4$. Z globálního hlediska lze tvrdit, že v případě FK izolované z jihočeské rašeliny je proces vyhasínání fluorescence doprovázen kontinuálním posunem emisního maxima, který je následován přítomností dvou isoemisních bodů. Z výše uvedeného faktu lze tvrdit, že tyto výsledky jsou specifickými indikátory tří *species* a jistého kontinua emisních jednotek vzniklého pomalou relaxací molekul rozpouštědla okolo excitovaných stavů emisních druhů přítomných v nepolární doméně této FK.

6.6 Liquid-state ^{13}C NMR spektrometrie huminových látek

Spektrometrie nukleární magnetické resonance isotopu uhlíku ^{13}C je mnohými autory pokládána za jednu z hlavních a mimo jiné i nepostradatelných instrumentálních technik studia a charakterizace HL resp. DOM izolovaných z rozličných přírodních matric [251–254]. Jak již bylo diskutováno dříve, přitažlivost ^{13}C spektrometrie nukleární magnetické resonance obzvláště spočívá v tom, že tato instrumentální technika nám zpravidla poskytuje mnoho cenných informací o struktuře, chemických a biologických vlastnostech HL, jejich heterogenitě, přítomnosti a prostorovém uspořádání funkčních skupin, podílu aromatických fragmentů ligninu, alifatických, peptidových a sacharidových jednotek, stupni humifikace, aromaticitě aj. S výjimkou klasického pojetí vyhodnocení ^{13}C NMR spekter tzn. postupné přiřazení chemických posunů určitým funkčním skupinám a strukturním jednotkám, byly za tímto účelem navrženy tzv. strukturní parametry, které jsou definovány jako poměry intenzit signálů, eventuálně jako plochy pod křivkou při vhodně zvolených chemických posunech. Výše zmíněné strukturní parametry jsou zpravidla ukazateli aromaticity, hydrofilnosti resp. hydrofobnosti a mimo jiné i biologické účinnosti, která je především vázána na obsah biologicky aktivních atomů uhlíku tzn. aromatických fragmentů, které jsou substituovány karboxylovými a v neposlední řadě i OH– fenolickými funkčními skupinami. Hlavní snahou této části disertační práce bylo navrhnout a následně provést takové experimenty, které by bezpochyby přispěly k detailnějšímu poznání struktury, chemických a biologických vlastností těchto unikátních “biokoloidních” sloučenin. Vyjma standardů HL byly veškeré vzorky použité v této disertační práci podrobeny základnímu screeningu pomocí ^{13}C NMR spektrometrie. Za tímto účelem byla ^{13}C NMR spektra studovaných HL integrována v oblasti alifatických atomů uhlíku (0–45 ppm), *O*-alkylových a peptidových atomů uhlíku (45–

106 ppm), aromatických a fenolických atomů uhlíku (106–165 ppm) a mimo jiné i v oblasti, jež náleží specifické absorpci karboxylových a karbonylových atomů ^{13}C (165–220 ppm). Na základě výše zmíněných oblastí byly z jejich integrálních hodnot vypočteny tzv. *strukturní parametry* HL. Vypočtené strukturní parametry f_a , H_{fi}/H_{fo} , BiA a hodnoty procentuálního zastoupení uhlíkových atomů v příslušných integrálních oblastech jsou sumarizovány v Tab. 8.

Tab. 8: Stanovené procentuální zastoupení uhlíkových atomů v příslušných integrálních regionech a vypočtené strukturní parametry aromaticity (f_a), hydrofilnosti a hydrofobnosti (H_{fi}/H_{fo}) a biologické aktivity (BiA)

vzorek HL	zastoupení ve spektrální oblasti (%)				f_a (–)	H_{fi}/H_{fo} (–)	BiA (–)
	0–45 ppm	45–106 ppm	106–165 ppm	165–220 ppm			
JMLHK	12	6	61	21	0,77	0,37	4,56
P1HK	18	25	30	27	0,41	1,08	1,33
P2HK	19	31	37	13	0,43	0,79	1,00
JČRHK	16	21	33	30	0,47	1,04	1,70
AHK	38	21	22	19	0,27	0,67	0,69
PFK	16	34	31	19	0,38	1,13	1,00
JČRFK	24	20	30	26	0,41	0,85	1,27

Jak je patrné z výsledků sumarizovaných v Tab. 8, analyzované vzorky vykazují typické hodnoty procentuálního zastoupení uhlíkových atomů a strukturních parametrů HL izolovaných z terestriálních a kaustobiolitických přírodních matric [159–165]. Z globálního hlediska lze konstatovat, že HK vyjma vzorku izolovaného z extraktu hnědé mořské řasy *Ascophyllum nodosum* (AHK) obsahují v porovnání s FK vyšší množství aromatických sloučenin, kam zpravidla řadíme strukturní jednotky ligninu, které mají svůj původ v látkách jako je 4-hydroxycinnamylalkohol, koniferylalkohol a sinapylalkohol. Kromě toho je na tomto místě nutné říci, že v této oblasti ^{13}C NMR spektra dochází mimo jiné i ke specifické absorpci fenolických uhlíků ^{13}C s maximem chemického posunu při 150 ppm. Naproti tomu byla půdní FK charakterizována nejvyšším obsahem *O*-alkylových a peptidových atomů ^{13}C . V této oblasti spektra obvykle nalézáme signály proteinů, alifatických alkoholů a polysacharidových jednotek tzn. celulózy a hemicelulózy, které jsou majoritními stavebními složkami buněčných stěn rostlin. Jak uvádí ve své práci Dercová a spol. [255], v případě půdních a rašeliništních HL je vyšší obsah *O*-alkylových a peptidických sloučenin pravděpodobně ukazatelem mikrobiální činnosti půdních a vodních mikroorganismů. Kromě toho poukázala na skutečnost, že nižší obsah *O*-alkylových sloučenin je většinou inherentní se stupněm humifikace resp. aromaticitou, kdy během humifikačního procesu dochází k postupné degradaci výše zmíněných kyslík obsahujících látek. Stanovené hodnoty procentuálního zastoupení uhlíkových atomů půdních HK (P1HK a P2HK) naznačují, že tyto vzorky jsou v porovnání se svou FK charakterizovány vyšším obsahem alifatických uhlíků mastných kyselin a vosků. Jak je patrné z výsledků uvedených v Tab. 8, FK izolovaná z lesní půdy *Humic Podzol* se vyznačovala relativně vyššími hodnotami signálů integrovaných v oblastech 45–106 ppm a 106–165 ppm, a tudíž můžeme říci, že tato půdní FK je oproti P1HK charakterizována vyšším obsahem *O*-alkylových, peptidických a aromatických sloučenin.

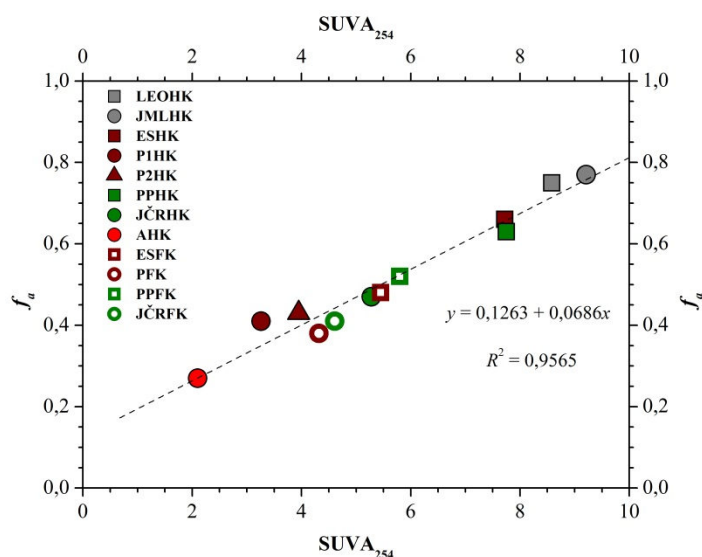
Spektrometrie nukleární magnetické resonance navíc odhalila, že vzorek P2HK obsahuje nejnížší množství karboxylových a karbonylových funkčních skupin, jejichž specifická absorpce nastává v rozmezí chemických posunů 165–220 ppm. Toto zjištění je ve velmi dobré shodě s výsledky obdrženy z elementární analýzy, *van Kreveleneho diagramu*, UV/Vis a FTIR spektrometrie. Obdobných závěrů bylo dosaženo i v případě HK izolované z jihočeské rašeliny. Rašeliništní HK se vyznačovala vyššími hodnotami procentuálního zastoupení uhlíkových atomů, které jsou zpravidla připisovány specifické absorpci *O*-alkylových, peptidových, aromatických, karboxylových a v neposlední řadě i karbonylových atomů ^{13}C . Z výše uvedeného faktu se můžeme domnívat, že tento vzorek je charakterizován vyšším stupněm humifikace, o kterém svědčí právě zmíněné hodnoty integrovaných oblastí ^{13}C NMR spektra. Jak je patrné z výsledků sumarizovaných v Tab. 8, FK izolovaná z jihočeské rašeliny (JČRFK) se oproti JČRHK vyznačovala nesrovnatelně vyšší hodnotou integrální oblasti 0–45 ppm, která je pokládána za oblast specifické absorpce alifatických atomů ^{13}C . Tyto závěry jsou ve velmi dobré shodě s výsledky prezentovanými v odborné publikaci Gondara a spol. [256], který se v této práci zabýval studiem a charakterizací HL izolovaných z různých hloubek ombrotrofického rašeliništního profilu. Naproti tomu, HK izolovaná z jihomoravského lignitu (JMLHK) se v porovnání s ostatními HL vyznačovala nižšími hodnotami procentuálního zastoupení uhlíkových atomů připadajících specifické absorpci alifatických, *O*-alkylových a peptidových sloučenin. Kromě toho, je na tomto místě nutné říci, že stanovený obsah aromatických a fenolických sloučenin byl v případě výše zmíněného vzorku nominálně nejvyšší, jehož hodnota v příslušné oblasti chemických posunů činila $\approx 61\%$. Tyto výsledky naznačují, že lignitická HK obsahuje oproti ostatním HL nejvyšší podíl aromatických struktur, které jsou substituovány polárními funkčními skupinami, o čemž svědčí i nejvyšší hodnota absorpčního koeficientu $E_{\text{ET}}/E_{\text{Bz}}$. Naproti tomu, si v Tab. 8 nelze nepovšimnout, že HK izolovaná z extraktu hnědé mořské řasy *Ascophyllum nodosum* (AHK) byla charakterizována nejvyšším obsahem alifatických struktur, jejichž specifická absorpce nastává v oblasti chemického posunu 0–45 ppm. Spektrometrie nukleární magnetické resonance mimo jiné ukázala, že tento vzorek je tvořen srovnatelným množstvím *O*-alkylových a peptidových sloučenin jako vzorek HK izolovaný z jihočeské rašeliny. Z výše uvedených výsledků se můžeme domnívat, že tento vzorek je převážně tvořen alifatickými řetězci a *O*-, *N*-alkylovými jednotkami, které jsou ukazateli mastných kyselin, vosků, proteinů a polysacharidů. Tyto závěry byly rovněž podpořeny výsledky z elementární analýzy, *van Kreveleneho diagramu*, FTIR a steady-state fluorescenční spektrometrie.

Z naměřených ^{13}C NMR spekter HL byly vypočteny strukturní parametry f_a , $H_{\text{fi}}/H_{\text{fo}}$ a BiA , jejichž hodnoty jsou dobrými ukazateli aromaticity, hydrofilnosti resp. hydrofobnosti a biologické účinnosti těchto unikátních “biokoloidních” sloučenin. Bližší informace o výpočtu výše zmíněných parametrů poskytují reference [166–172] a lze je i nalézt v odstavcích kapitoly 3.4 a 5.3.7 této disertační práce. Jak je patrné z výsledků uvedených v Tab. 8, studované vzorky vykazují obvyklé hodnoty strukturních parametrů HL izolovaných z uhelných, rašeliništních a půdních přírodních matric [166–167, 169, 170–172, 257–260]. V širším pohledu na prezentované výsledky indexu aromaticity f_a můžeme konstatovat, že HK vyjma vzorku izolovaného z extraktu hnědé mořské řasy *Ascophyllum nodosum* (AHK) jsou v porovnání s FK charakterizovány vyšším stupněm aromaticity. Naproti tomu, HK pocházející z extraktu hnědé mořské řasy byla charakterizována nejnížší hodnotou tohoto strukturního parametru, který v sobě zrcadlí informace o podílu aromatických struktur a mimo jiné i míry humifikace této “biokoloidní” sloučeniny. Jak je patrné z výsledků sumarizovaných v Tab. 8, HL

izolované z lesní půdy *Humic Podzol* (P1HK, P2HK a v neposlední řadě i PFK) se vyznačují nižšími hodnotami indexu aromaticity f_a , a tudíž se můžeme domnívat, že tyto půdní vzorky jsou charakterizovány nižším stupněm humifikace v porovnání s rašeliništními HL (JČRHK a JČRFK). Nejvyšší hodnota indexu aromaticity byla zjištěna u vzorku HK izolované z jihomoravského lignitu (JMLHK). Z výše uvedeného faktu lze tvrdit, že tato HK je tvořena nejvyšším obsahem aromatických struktur, které jsou v tomto případě převážně odvozeny od stavebních jednotek ligninu tzn. *p*-kumarylalkoholu, koniferylalkoholu a sinapylalkoholu. Z naměřeného ^{13}C NMR spektra HK izolované z jihomoravského lignitu (viz. Obr. 8aP) je zřejmé, že tento vzorek je převážně tvořen jednotkami koniferylalkoholu a *p*-kumarylalkoholu, jejichž specifická absorpce byla lokalizována v oblasti chemických posunů $\approx 125\text{--}135$ ppm a $\approx 145\text{--}148$ ppm. Naproti tomu byly HL izolované z lesní půdy *Humic Podzol* charakterizovány intenzivnějšími signály v oblastech chemického posunu při $\approx 105\text{--}111$ ppm, ≈ 118 ppm a $\approx 128\text{--}132$ ppm, které jsou zpravidla ukazateli sinapylalkoholových a koniferylových jednotek ligninu listnatých stromů. Naproti tomu, si v Tab. 8 nelze nepovšimnout, že HK izolovaná z extraktu hnědé mořské řasy *Ascophyllum nodosum* (AHK) byla charakterizována nejnížší hodnotou strukturního parametru f_a , jenž dává tušit, že tento vzorek HK je v porovnání s ostatními HL tvořen nízkým obsahem aromatických struktur a tudíž i nízkým stupněm humifikace. Jak již bylo diskutováno dříve (viz. kapitola 3.4), pokusy odvodit biologickou aktivitu HL přímo z jejich ^{13}C NMR spekter vedly k navržení parametru biologické účinnosti BiA , který je definován jako poměr obsahu biologicky účinných atomů uhlíku tzn. aromatických fragmentů HL a karboxylových funkčních skupin (106–230 ppm) k biologicky inaktivním tj. alifatické a *O*-alkylové funkční skupiny (0–106 ppm). Z naměřených ^{13}C NMR spekter studovaných HL byl vypočten výše zmíněný parametr biologické účinnosti BiA . Z globálního hlediska můžeme říci, že HK s výjimkou vzorků izolovaných z lesní půdy *Humic Podzol* (P2HK) a extraktu hnědé mořské řasy *Ascophyllum nodosum* (AHK) obsahují v porovnání s FK vyšší množství biologicky aktivních atomů ^{13}C , a proto jsou tyto “biokoloidní” sloučeniny charakterizovány vyšší hodnotou BiA , a tudíž i mírou biologické účinnosti. Naproti tomu byly FK použité v této disertační práci charakterizovány nižšími hodnotami strukturního parametru BiA , a tudíž se můžeme domnívat, že tyto vzorky se vyznačují nižší biologickou účinností, a tudíž i méně výraznou schopností interakce s různorodými látkami např. rostlinnými nutrienty. ^{13}C NMR analýza HK izolované z jihomoravského lignitu (JMLHK) ukázala, že tento vzorek je tvořen nejvyšším obsahem biologicky aktivních atomů ^{13}C . Z výše uvedeného faktu lze konstatovat, že lignitická HK se vyznačuje nejvyšší biologickou účinností, o které svědčí i poměrně vysoká hodnota tohoto strukturního parametru BiA . Tyto závěry jsou ve velmi dobré shodě s výsledky prezentovanými v odborné publikaci Davida a spol. [261], který se v této práci zabýval studiem a charakterizací nativních a regenerovaných HK izolovaných z jihomoravského lignitu pomocí fyzikálně-chemických metod a hodnot biologické aktivity. Naproti tomu, si v Tab. 8 nelze nepovšimnout, že HK izolovaná z extraktu hnědé mořské řasy *Ascophyllum nodosum* (AHK) byla charakterizována nejnížší hodnotou biologické účinnosti. Na základě těchto výsledků můžeme říci, že reaktivita této HK bude ovlivněna nejen výslednou hodnotou parametru BiA , ale i povahou chemického individua, který bude s touto HK v interakci. Jak je patrné z výsledků sumarizovaných v Tab. 8, studované HL se výrazně lišily svými vypočtenými hodnotami strukturního parametru H_{fi}/H_{fo} . Z globálního pohledu na dosažené výsledky můžeme říci, že HL izolované z lesní půdy *Humic Podzol* (P1HK a PFK) a jihočeské rašeliny (JČRHK) jsou v porovnání s ostatními “biokoloidními” sloučeninami

charakterizovány jako více hydrofilní. Naproti tomu, ostatní HL byly tvořeny vyšším obsahem alifatických a aromatických fragmentů, a tudíž i vypočtené hodnoty strukturního parametru H_{fi}/H_{fo} naznačují, že tyto “biokoloidní” sloučeniny se vyznačují převážně hydrofobnějším charakterem. Kromě toho je na tomto místě nutné říci, že tyto závěry byly ve velmi dobré shodě s výsledky obdržení pomocí časově rozlišené fluorescenční spektrometrie, kdy u vzorků P1HK, P2HK a JČRFK docházelo k bathochromnímu posunu fluorescenčního maxima v TRES spektrech. Na základě těchto výsledků můžeme konstatovat, že výše uvedené vzorky HL obsahují ve svých strukturách tzv. hydrofobní domény, které jsou tvořeny stavebními jednotkami nepolárního charakteru. Hydrofobní domény jsou orientovány v nitru supramolekulární struktury HL, zatímco polární funkční skupiny tvoří vnější obal těchto unikátních “biokoloidních” sloučenin [38–39].

Za účelem ověření spojitosti mezi navrženým parametrem specifické absorpce $SUVA_{254}$ a indexem aromaticity f_a byla v této části disertační práce rekonstruována grafická závislost mezi výše zmíněnými koeficienty, které jsou mnohými autory považovány za dobré ukazatele aromaticity HL resp. DOM. Na Obr. 27 je uvedena grafická závislost strukturního parametru f_a na specifických hodnotách absorpce $SUVA_{254}$ HL izolovaných z uhelných, rašeliništních, půdních a v neposlední řadě i rostlinných přírodních matic.



Obr. 27: Grafická závislost strukturního parametru f_a na specifických hodnotách absorpce $SUVA_{254}$ studovaných HL

Kromě toho je na tomto místě nutné říci, že strukturní parametr f_a byl v případě standardů HL vypočten na základě procentuálního zastoupení uhlíkových atomů, jejichž hodnoty jsou veřejně dostupné na webových stránkách mezinárodní společnosti IHSS [262]. Jak je z Obr. 27 zřejmé, lineární průběh grafické závislosti strukturního parametru f_a na absorpčním koeficientu $SUVA_{254}$ svědčí o velmi dobré korelaci mezi těmito koeficienty. Toto zjištění je velmi cenným výsledkem v oblasti studia a charakterizace HL, jelikož jsme schopni na základě absorpčního koeficientu $SUVA_{254}$ velmi dobře predikovat aromaticitu těchto “biokoloidních” sloučenin, aniž bychom znali kvantitativní zastoupení jednotlivých fragmentů tzn. alifatických řetězců, *O*-, *N*-alkylů a jakkoliv substituovaných aromátů. Výjimečnost tohoto závěru spočívá v tom, jestliže si uvědomíme, že strukturní parametr f_a je ukazatelem nejen obsahu aromatických sloučenin, ale především stupně aromaticity, který je definován jako podíl součtu aromatických a fenolických atomů uhlíku ke všem atomům ^{13}C s výjimkou

karboxylových a karbonylových funkčních skupin. Tyto závěry jsou ve velmi dobré shodě s výsledky prezentovanými v odborné publikaci Weishaara a spol. [95], kterému se podařilo ověřit linearitu mezi specifickou hodnotou absorpance $SUVA_{254}$ a obsahem aromatických uhlíků Ar (110–160 ppm) %.

7 ZÁVĚR

Předkládaná disertační práce se zaměřuje na studium fyzikálně-chemických vlastností huminových látek (HL) prostřednictvím moderních instrumentálních metod, které jsou až na některé výjimky dostupné na pracovišti Centra materiálového výzkumu fakulty chemické VUT v Brně. Jak již bylo diskutováno dříve, HL představují pozoruhodný přírodní materiál a třebaže jsou předmětem soustavného výzkumu již po mnoho desetiletí, tak některé otázky nejsou doposud ne zcela objasněné. Tato dychtivost po zodpovězení alespoň některých otázek se stala velmi silnou motivací v průběhu celého studia, jejímž výstupem je tato disertační práce, která se zabývá studiem těchto unikátních “biokoloidních” sloučenin. Tyto “biokoloidy” jsou spoluzodpovědné za úrodnost půdy, silnou mírou se podílejí na transportu živin ke kořenovému vlášení rostlin a mimo jiné jsou schopny imobilizovat širokou škálu hydrofilních a hydrofobních polutantů. Právě tyto unikátní vlastnosti předurčují výše zmíněné HL k širokému aplikačnímu potenciálu, jenž by měl být zcela jistě využit, a to v nejrůznějších oblastech lidské činnosti, ať už máme na mysli ochranu životního prostředí, zemědělství, průmysl či biomedicínské aplikace. Z výše uvedeného výčtu je nepochybně zřejmé, že pro budoucí aplikace je nezbytně nutná znalost struktury a s ní spojené reaktivity těchto unikátních “biokoloidních” sloučenin. Jeden z možných způsobů jak mohou být HL studovány představuje využití nedestruktivních tzn. spektrometrických instrumentálních technik. V rámci této disertační práce byly jako vhodné “biokoloidní” sloučeniny vybrány HL izolované z jihomoravského lignitu, jihočeské rašeliny, lesní půdy *Humic Podzol* a v neposlední řadě i vzorek HK pocházející z extraktu hnědé mořské řasy *Ascophyllum nodosum*. S ohledem na celistvost této disertační práce byly mimo jiné studovány i standardy HL, které jsou běžně k dostání od mezinárodní společnosti pro výzkum huminových látek (IHSS – *International Humic Substances Society*). Za tímto účelem byly vybrány standardy IHSS, které byly izolovány z obdobných terestriálních matric, jako výše zmíněné vzorky HL tzn. *Leonardite* HK, *Elliott Soil* HL a *Pahokee Peat* HL. Na základě takto uceleného souboru HL můžeme detailněji diskutovat jednotlivé diference, jež jsou ukazateli rozdílné struktury a reaktivity těchto “biokoloidních” sloučenin.

Experimentální část disertační práce se zaměřuje na studium fyzikálně-chemických vlastností HL s ohledem na poznání jejich původu resp. geneze, jednotlivých strukturních fragmentů, množství substituentů uplatňujících elektron-donorní a elektron akceptorní efekt, obsahu reaktivních funkčních skupin, heterogenity, aromaticity, stupně humifikace atd. Jak z profilace experimentální části vyplývá, tato disertační práce prezentuje inovativní přístup studia HL, a to především v oblasti infračervené a fluorescenční spektrometrie. Z naměřených DRIFTS spekter studovaných vzorků bylo zřejmé, že v oblasti “otisku palce” znesnadňují interpretaci infračervených spekter HL překrývající se absorpční pásy jednotlivých funkčních skupin. Tato nesnáze byla v této disertační práci vyřešena pomocí Fourierovy autodekonvoluce. Kromě toho je na tomto místě nutné říci, že po aplikaci Fourierovy autodekonvoluce došlo v naměřených infračervených spektrech k identifikaci specifických absorpčních pásů, které dozajista přispěly k detailnějšímu poznání struktury těchto “biokoloidních” sloučenin. Především se jednalo o strukturní jednotky, které obsahovaly etherové a esterové vazby přítomné v aromatických a alifatických sloučeninách. Tato metoda rovněž poukázala na přítomnost strukturních jednotek ligninu, kam zpravidla řadíme aromatické sloučeniny, které jsou odvozeny od *p*-kumarylalkoholu, koniferylalkoholu a sinapylalkoholu. Tyto závěry byly mimo jiné podpořeny i výsledky z ^{13}C NMR spektrometrie, která nám poskytla nové

informace o struktuře a obsahu jednotlivých funkčních skupin resp. strukturních jednotek. ^{13}C NMR spektrometrie jednoznačně ukázala, že navržené strukturní parametry jsou velmi dobrými ukazateli aromaticity, hydrofilnosti resp. hydrofobnosti a mimo jiné i biologické účinnosti těchto “biokoloidních” sloučenin. Navíc si v této disertační práci nelze nepovšimnout, že ^{13}C NMR spektrometrie se stala velmi dobrým nástrojem k potvrzení již vyřčených hypotéz a závěrů, ať už máme na mysli kvalitativní či fyzikálně-chemické vlastnosti použitých HL. Výsledky z elementární analýzy resp. *van Kreveleneho diagramu* naznačují, že tato instrumentální technika je vhodnou metodou k rychlé a snadné interpretaci některých fyzikálně-chemických vlastností, jako je obsah biogenních prvků, mechanismus humifikace, podíl aromatických resp. alifatických strukturních jednotek, odhad stupně (de)hydrogenace, oxidace a dekarboxylace. K dalším významným parametrům, které byly v této disertační práci diskutovány, a jež je třeba brát v potaz, patří absorpční koeficienty, hodnoty specifických absorbcí a fluorescenční indexy. Výsledky jasně poukázaly na zcela nepostradatelnou úlohu výše zmíněných koeficientů, jež jsou ukazateli střední molekulové hmotnosti, stupně humifikace, obsahu polárních funkčních skupin substituovaných na aromátech, původu aj. Z naměřených excitačně-emisních fluorescenčních spekter vyplývá, že HL izolované z terestriálních přírodních matric jsou principiálně charakterizovány dvěma fluorescenčními maximy, z nichž A (α') – *fulvic-like* fluorofor se nachází v oblasti vlnových délek ≈ 250 – $280/420$ – 525 nm v tzv. *UV-light* oblasti, kdežto fluorescenční pík C (α) – *humic-like* byl lokalizován v oblasti vyšších vlnových délek excitace ≈ 300 – $385/425$ – 520 nm. V EEM spektrech HK izolovaných z uhelných, rašeliništních a půdních přírodních matric byly namísto fluorescenčního maxima C (α) lokalizovány tzv. odvozené *humic-like* fluorofory, které se nacházejí v oblasti vyšších vlnových délek excitace a emise ≈ 440 – $460/520$ – 590 nm. Fluorescenční spektrometrie mimo jiné ukázala, že tato metoda je velmi vhodnou instrumentální technikou k identifikaci fluorescenčních maxim nehumínového charakteru. Aby bylo možné blíže diskutovat reaktivitu těchto “biokoloidních” sloučenin byly v této disertační práci provedeny jednoduché komplexační experimenty, které jednoznačně ukázaly, že nejstabilnějším a tedy i nejpevněji vázaným iontem je v případě půdních HL rtuťnatý kation. Klíčovou a mimo jiné i velmi inovativní kapitolou této disertační práce je využití časově rozlišené fluorescenční spektrometrie v oblasti studia a charakterizace HL. Poprvé je zde použita metoda měření časově rozlišených emisních spekter a z nich vypočtených časově rozlišených přes plochu normalizovaných spekter TRANES. Výsledky z časově rozlišených emisních spekter jasně ukázaly, že tato instrumentální technika je velmi vhodnou metodou studia relaxace rozpouštědla okolo excitovaných fluoroforů HL. Mimo jiné se podařilo zjistit, že za fluorescenci HL jsou spoluzodpovědné pouze a jenom tři na sobě nezávislé emisní jednotky resp. fluorescenční druhy. Za velmi cenný výsledek této disertační práce považujeme fakt, že se nám podařilo experimentálně dokázat přítomnost hydrofobních domén ve struktuře HL.

Během závěrečné diskuze bylo nalezeno několik oblastí, které mohou představovat startovní body dalšího navazujícího výzkumu. V první řadě by se jednalo o podrobnější studium HL pomocí časově rozlišené fluorescenční spektrometrie, a to z důvodu toho, že potenciálu, který tato instrumentální technika v sobě skrývá, nebylo doposud zcela využito. Získané výsledky ovšem neposkytly ani přesnou odpověď na otázku, jaké fragmenty HL jsou zodpovědné za přítomnost hydrofobních domén ve struktuře těchto “biokoloidních” sloučenin. Další oblast, kterou by mohl dále rozvést navazující výzkum je studium vlivu základních fyzikálně-chemických vlastností (koncentrace HL v roztoku, pH a iontová síla

prostředí...) na formaci supramolekulární struktury, jejichž centry jsou právě výše zmíněné hydrofobní domény. Velmi zajímavou oblastí výzkumu by dozajista představovala aplikace fluorescenční korelační spektrometrie, která nám obecně poskytuje mnoho cenných informací o studovaném systému. Další zajímavou oblast pro následný výzkum představuje využití zhášení fluorescence při studiu vazebných interakcí HL s organickými polutanty (povrchově aktivními látkami, hydrofobními sloučeninami, barvivy...).

Výsledky této disertační práce jasně ukazují, že HL jsou tvořeny širokou škálou stavebních jednotek, které jsou převážně nositeli fyzikálně-chemických vlastností těchto unikátních “*biokoloidních*” sloučenin.

8 LITERATURA

- [1] GHABBOUR, E. A. *Humic Substances: Versatile Components of Plants, Soil and Water*. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 341 p. ISBN 08-540-4855-3.
- [2] TAN, K. H. *Humic matter in soil and the environment: principles and controversies*. New York: Marcel Dekker, 2003, 386 p. ISBN 0-8247-4272-9.
- [3] SCHNITZER, M a KHAN, S. U. *Humic substances in the environment*. New York: M. Dekker, vii, 327 p. ISBN 08-247-1614-0.
- [4] JANSEN, S. A., MALATY, M., NWABARA, S., JOHNSON, E., GHABBOUR, E., DAVIES, G., VARNUM, J. M. Structural modeling in humic acids. *Materials Science and Engineering: C*. 1996, vol. 4, no. 3, p. 175–179.
- [5] KHAIRY, A. H. *Acta Medica Empirica*. 1981, vol. 11, p. 898.
- [6] RADWAN, A., DAVIES, G., FATAFTAH, A., GHABBOUR, E. A., JANSEN, S. A. Isolation of humic acid from the brown algae *Ascophyllum nodosum*, *Fucus vesiculosus*, *Laminaria saccharina* and the marine angiosperm *Zostera marina*. *Journal of Applied Phycology*. 1996, vol. 8, no. 6, p. 553–562.
- [7] GHABBOUR, E. A., KHAIRY, A. H., CHENEY, D. P., GROSS, V., DAVIES, G., GILBERT, T. R., ZHANG, X. Isolation of humic acid from the brown algae *Pilayella littoralis*. *Journal of Applied Phycology*. 1994, vol. 6, no. 5-6, p. 459–468.
- [8] PICCOLO, A. Humus and Soil Conservation. In. *Humic substances in terrestrial ecosystems*. Ed. A. Piccolo, Elsevier, Amsterdam, 1996, p. 225–264. ISBN 978-0-444-81516-3.
- [9] VESELÁ, L., KUBAL, M., KOZLER, J., INNEMANOVÁ, P. Struktura a vlastnosti přírodních huminových látek typu oxihumolitu. *Chemické listy*. 2005, vol. 99, p. 711–717.
- [10] DeBANO, L. F. Water repellency in soils: a historical overview. *Journal of Hydrology*. 2000, vol. 231–232, no. 29, p. 4–32.
- [11] STEVENSON, F. *Humus chemistry: genesis, composition, reactions*. 2nd Ed. New York: John Wiley and Sons, xiii, 496 p. ISBN 04-715-9474-1.
- [12] KLEBER, M. a JOHNSON, M. G. Advances in Understanding the Molecular Structure of Soil Organic Matter. In. *Advances in Agronomy*. Ed. L. Donald, London: Academic, 2010, p. 77–142. ISBN 978-012-3810-359.
- [13] HANSELL, D. A. a CARLSON, C. A. *Biogeochemistry of marine dissolved organic matter*. Amsterdam: Academic Press, 2002, xii, 774 p. ISBN 978-012-3238-412.
- [14] BALDOCK, J. A., a NELSON, P. N. Soil organic matter. In. *Handbook of soil science*. Ed. M. Sumner, Boca Raton, Fla: CRC Press, 1999, p. B25–B84. ISBN 08-493-3136-6.
- [15] WERSHAW, R. Model for Humus in Soils and Sediments. *Environmental Science*. 1993, vol. 27, no. 5, p. 814–816.
- [16] MATILAINEN, A. a SILLANPÄÄ, M. Removal of natural organic matter from drinking water by advanced oxidation processes. *Chemosphere*. 2010, vol. 80, no. 4, p. 351–365.
- [17] COBLE, P. G. Characterization of marine and terrestrial DOM in seawater using excitation-emission matrix spectroscopy. *Marine Chemistry*. 1996, vol. 51, no. 4, p. 325–346.
- [18] ŚWIETLIK, J. a SIKORSKA, E. Application of fluorescence spectroscopy in the studies of natural organic matter fractions reactivity with chlorine dioxide and ozone. *Water Research*. 2004, vol. 38, no. 17, p. 3791–3799.
- [19] COBLE, Paula G. Marine Optical Biogeochemistry: The Chemistry of Ocean Color. *Chemical Reviews*. 2007, vol. 107, no. 2, p. 402–418.
- [20] BURDIGE, D. J., KLINE, S. W., CHEN, W. Fluorescent dissolved organic matter in marine sediment pore waters. *Marine Chemistry*. 2004, vol. 89, no. 1–4, p. 289–311.
- [21] SIERRA, M. M. D., GIOVANELA, M., PARLANTI, E., SORIANO-SIERRA, E. J. Fluorescence fingerprint of fulvic and humic acids from varied origins as viewed by single-scan and excitation/emission matrix techniques. *Chemosphere*. 2005, vol. 58, no. 6, p. 715–733.

- [22] HENDERSON, R. K., BAKER, A., MURPHY, K. R., HAMBLY, A., STUETZ, R. M., KHAN, S. J. Fluorescence as a potential monitoring tool for recycled water systems: A review. *Water Research*. 2009, vol. 43, no 4, p. 863–881.
- [23] HOFRICHTER, M., a STEINBÜCHEL, A. *Biopolymers: Lignin, Humic Substances and Coal*. Weinheim: Wiley-VCH, 2001, 523 p. ISBN 978-3-527-30220-8.
- [24] HAYES, B. M. M. a HERBILLON, A. *Soil colloids and their associations in aggregates*. New York, c1990, xvii, 598 p. ISBN 03-064-3419-9.
- [25] FAĪZA BERGAYA, C. R. M. D. a THENG, B. *Formation and properties of clay-polymer complexes*. 2nd ed. Boston: Elsevier, 2012, xvi, 511 p. Developments in clay science. ISBN 04-445-3354-0.
- [26] PICCOLO, A. The supramolecular structure of humic substances: A novel understanding of humus chemistry and implications in soil science. *Soil Science*. 2001, vol. 166, no. 11, p. 57–134.
- [27] TAN, K. H. *Principles of soil chemistry*. 4th Ed. Boca Raton, Fla.: CRC Press, 2010, xxvii, 362 p. Books in soils, plants, and the environment. ISBN 978-143-9813-928.
- [28] CHERNYSHEVA, M., a BADUN, G. Tritium label in studying sorption of humic substances by carbon-based nanomaterials. *European Journal of Chemistry*. 2011, vol. 2, no. 1, p. 61–64.
- [29] SCHULTEN, H. R., a SCHNITZER, M. Three-dimensional models for humic acids and soil organic matter. *Naturwissenschaften*. 1995, vol. 82, no. 11, p. 487–498.
- [30] SWIFT, R. S. Macromolecular properties of soil humic substances: Fact, fiction, and opinion. *Soil Science*. 1999, vol. 164, no. 11, p. 790–802.
- [31] CAMERON, R. S., THORNTON, B. K., SWIFT, R. S., POSNER, A. M. Molecular weight and shape of humic acid from sedimentation and diffusion measurements on fractionated extracts. *Journal of Soil Science*. 1972, vol. 23, no. 4, p. 394–408.
- [32] PICCOLO, A., NARDI, S., CONCHERI, G. Micelle-like conformation of humic substances as revealed by size exclusion chromatography. *Chemosphere*. 1996, vol. 33, no. 4, p. 595–602.
- [33] SIMPSON, A. J. et al. Separation of structural components in soil organic matter by diffusion ordered spectroscopy. *Environmental Science*. 2001, vol. 35, no. 22, p. 4421–4425.
- [34] SUTTON, R. a SPOSITO, G. Molecular structure in soil humic substances: The New View. *Environmental Science*. 2005, vol. 39, no. 23, p. 9009–9015.
- [35] FAN, T. W. M. et al. Chemical characterization of a chelator-treated soil humate by solution-state multinuclear two-dimensional NMR with FTIR and pyrolysis-GCMS. *Environmental Science*. 2000, vol. 34, no. 9, p. 1636–1646.
- [36] GONZÁLEZ-VILA, F. J. et al. Comparison of the information gained by pyrolytic techniques and NMR spectroscopy on the structural features of aquatic humic substances. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*. 2001, vol. 58-59, p. 128–141.
- [37] SIMPSON, A. et al. Molecular structures and associations of humic substances in the terrestrial environment. *Naturwissenschaften*. 2002, vol. 89, no. 2, p. 84–88.
- [38] SCHAUMANN, G. E. Soil organic matter beyond molecular structure Part I: Macromolecular and supramolecular characteristics. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*. 2006, vol. 169, no. 2, p. 145–156.
- [39] VON WANDRUSZKA, Ray. Humic acids: Their detergent qualities and potential uses in pollution remediation. *Geochemical Transactions*. 2000, vol. 1, no. 2, p. 10–15.
- [40] ÓLAFUR, A. *Soils of volcanic regions in Europe*. Berlin: Springer, 2007. ISBN 978-3-540-48711-1.
- [41] WEBER, J. Definition of soil organic matter: Humic substances complexes with mineral components. In: *Humintech*[®] [online]. [cit. 2014-03-04].
- [42] SCHNITZER, M. I. a MONREAL, C. M. "Quo vadis Soil Organic Matter Research ? A Biological Link to the Chemistry of Humification." In. *Advances in Agronomy*. Ed. D. Sparks, Oxford: Academic, 2011, p. 143–217. ISBN 978-0-12-386473-4.
- [43] TIPPING, E. *Cation binding by humic substances*. 1st ed. Cambridge: Cambridge University Press, 2002, p. 434. ISBN 05-216-2146-1.

- [44] SIGLEO, A. C. a MEANS, J. C. Organic and Inorganic Components in Estuarine Colloids: Implications for Sorption and Transport of Pollutants. In. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology Continuation of Residue Reviews*. Ed. G. W. Ware, New York, NY: Springer New York, 1990, p. 123–147. ISBN 978-146-1233-428.
- [45] SENESI, N. Binding mechanisms of pesticides to soil humic substances. *Science of The Total Environment*. 1992, vol. 123–124, no. 12, p. 63–76.
- [46] THORN, K. A., PETTIGREW, P. J., GOLDENBERG, W. S., WEBER, E. J. Covalent Binding of Aniline to Humic Substances. 2. ^{15}N NMR Studies of Nucleophilic Addition Reactions. *Environmental Science*. 1996, vol. 30, no. 9, p. 2764–2775.
- [47] PENA-MENDEZ, M., HAVEL, J., POTOČKA, J. Humic substances - compounds of still unknown structure: applications in agriculture, industry, environment, and biomedicine. *Journal of applied biomedicine*. 2005, vol. 3, no. 1, p. 13–24. ISSN 1214-0287.
- [48] GHABBOUR, E. A. *Humic Substances: Versatile Components of Plants, Soil and Water*. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 2000, 341 p. ISBN 9780854048557.
- [49] BURDICK, E. M. Commercial humates for agriculture and the fertilizer industry. *Economic Botany*. 1965, vol. 19, no 2, p. 152–156.
- [50] MO, Ch., SHU-QUAN, Z., HUA-MIN, L., ZHAN-BIN, H., SHU-QIN, L. Synthesis of poly(acrylic acid)/sodium humate superabsorbent composite for agricultural use. *Journal of Applied Polymer Science*. 2006, vol. 102, no. 6, p. 5137–5143.
- [51] RAM, L. C., SRIVASTAVA, N. K., JHA, S. K., SINHA, A. K., MASTO, R. E., SELVI, V. A. Management of Lignite Fly Ash for Improving Soil Fertility and Crop Productivity. *Environmental Management*. 2007, vol. 40, no. 3, p. 438–452.
- [52] SCHMEIDE, K., POMPE, S., BUBNER, M., HEISE, K. H., BERNHARD, B., NITSCHKE, H. Uranium(VI) sorption onto phyllite and selected minerals in the presence of humic acid. *Radiochimica Acta*. 2000, vol. 88, no. 9-11, p. 723–729.
- [53] KOPINKE, F. D., POERSCHMANN, J., STOTTMEISTER, U. Sorption of Organic Pollutants on Anthropogenic Humic Matter. *Environmental Science*. 1995, vol. 29, no. 4, p. 941–950.
- [54] MURPHY, E. M. a ZACHARA, J. M. The role of sorbed humic substances on the distribution of organic and inorganic contaminants in groundwater. *Geoderma*. 1995, vol. 67, no. 1-2, p. 103–124.
- [55] SENESI, N. Binding mechanisms of pesticides to soil humic substances. *Science of The Total Environment*. 1992, vol. 123–124, no. 12, p. 63–76.
- [56] KERNDORFF, H. a SCHNITZER, M. Sorption of metals on humic acid. *Geochimica et Cosmochimica Acta*. 1980, vol. 44, no. 11, p. 1701-1708.
- [57] BENEDETTI, M. F., MILNE, Ch. J., KINNIBURGH, D. G., VAN RIEMSDIJK, W. H. KOOPAL, L. K. Metal Ion Binding to Humic Substances: Application of the Non-Ideal Competitive Adsorption Model. *Environmental Science*. 1995, vol. 29, no. 2, p. 446–457.
- [58] BRÜMMER, G. W. Heavy Metal Species, Mobility and Availability in Soils. In. *The Importance of Chemical "Speciation" in Environmental Processes*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 1986, p. 169.
- [59] CHEFETZ, B. a XING, B. Relative Role of Aliphatic and Aromatic Moieties as Sorption Domains for Organic Compounds: A Review. *Environmental Science*. 2009, vol. 43, no. 6, p. 1680–1688.
- [60] KLÖCKING, R. a HELBIG, B. Medical aspects and applications of humic substances. In. *Biopolymers for medical and pharmaceutical applications*. Ed. Alexander Steinbüchel, R. H. Marchessault. Weinheim: Wiley-VCH, 2005, p. 3–16. ISBN 35-273-1154-8.
- [61] SHARMA, A. a SCHULMAN, S. G. *Introduction to fluorescence spectroscopy*. New York: Wiley, c1999, xiv, 173 p. ISBN 04-711-1098-1.
- [62] GUILBAULT, G. *Practical fluorescence*. 2nd ed., rev. and expanded. New York: M. Dekker, c1990, x, 812 p. ISBN 08-247-8350-6.
- [63] BERBERAN-SANTOS, M. N. a VALEUR, B. *Molecular fluorescence: principles and applications*. 2nd ed. Weinheim: Wiley-VCH, 2012, 500 p. ISBN 978-352-7650-026.

- [64] LAKOWICZ, J. R. *Principles of fluorescence spectroscopy*. 3rd ed. New York: Springer, 2006, 980 p. ISBN 978-038-7463-124.
- [65] MOBED, J. J., HEMMINGSEN, S. L., AUTRY, J. L., MCGOWN, L. B. Fluorescence Characterization of IHSS Humic Substances: Total Luminescence Spectra with Absorbance Correction. *Environmental Science*. 1996, vol. 30, no. 10, p. 3061–3065.
- [66] BECKER, W. *Advanced time-correlated single photon counting techniques*. New York: Springer, c2005, xix, 401 p. Springer series in chemical physics, v. 81. ISBN 978-354-0260-479.
- [67] O'CONNOR, D. V. a PHILLIPS, D. *Time-correlated single photon counting*. Orlando: Academic Press, 1984, viii, 288 p. ISBN 01-252-4140-2.
- [68] PHILLIPS, D., DRAKE, R. C., O'CONNOR, D. V., CHRISTENSEN, R. L. Time Correlated Single-Photon Counting (Tcspc) Using Laser Excitation. *Instrumentation Science*. 1985, vol. 14, no. 3–4, p. 267–292.
- [69] GRINVALD, A a STEINBERG, I. Z. On the analysis of fluorescence decay kinetics by the method of least-squares. *Analytical Biochemistry*. 1974, vol. 59, no. 2, p. 583–598.
- [70] WARE, W. R., DOEMENY, L. J., NEMZEK, T. L. Deconvolution of fluorescence and phosphorescence decay curves. Least-squares method. *The Journal of Physical Chemistry*. 1973, vol. 77, no. 17, p. 2038–2048.
- [71] SILLEN, A. a ENGELBORGH, Y. The Correct Use of "Average" Fluorescence Parameters. *Photochemistry and Photobiology*. 1998, vol. 67, no. 5, p. 475–486.
- [72] *DAS6: Fluorescence decay analysis software*. 3880 Park Avenue, Edison: HORIBA Jobin Yvon Inc.
- [73] GOLETZ, Ch., WAGNER, M., GRÜBEL, A., SCHMIDT, W., KORF, N., WERNER, P. Standardization of fluorescence excitation–emission-matrices in aquatic milieu. *Talanta*. 2011, vol. 85, no. 1, p. 650–656.
- [74] GAUTHIER, T. D., SHANE, E. C., GUERIN, W. F., SEITZ, W. R., GRANT, C. L. Fluorescence quenching method for determining equilibrium constants for polycyclic aromatic hydrocarbons binding to dissolved humic materials. *Environmental Science*. 1986, vol. 20, no. 11, p. 1162–1166.
- [75] LARSSON, T., WEDBORG, M., TURNER, D. Correction of inner-filter effect in fluorescence excitation-emission matrix spectrometry using Raman scatter. *Analytica Chimica Acta*. 2007, vol. 583, no. 2, p. 357–363.
- [76] MENDONÇA, A., ROCHA, A. C., DUARTE, A. C., SANTOS, E. B. H. The inner filter effects and their correction in fluorescence spectra of salt marsh humic matter. *Analytica Chimica Acta*. 2013, vol. 788, no. 25, p. 99–107.
- [77] GARCIA, J. R., GEHLEN, M. H., de OLIVEIRA, H. P. M., NART, F. C. Time resolved emission spectroscopy of poly(2,5-dicyano-p-phenylene-vinylene) films. *Journal of the Brazilian Chemical Society*. 2008, vol. 19, no. 7, p. 1306–1310.
- [78] KOTI, A. S. R., KRISHNA, M. M. G., PERIASAMY, N. Time-Resolved Area-Normalized Emission Spectroscopy (TRANES): A Novel Method for Confirming Emission from Two Excited States. *The Journal of Physical Chemistry A*. 2001, vol. 105, no. 10, p. 1767–1771.
- [79] LOEFROTH, J. E. Time-resolved emission spectra, decay-associated spectra, and species-associated spectra. *The Journal of Physical Chemistry*. 1986, vol. 90, no. 6, p. 1160–1168.
- [80] IRA, Y., KOTI, A. S. R., KRISHNAMOORTHY, G. PERIASAMY, N. TRANES Spectra of Fluorescence Probes in Lipid Bilayer Membranes: An Assessment of Population Heterogeneity and Dynamics. *Journal of Fluorescence*. 2003, vol. 13, no. 1, p. 95–103.
- [81] KOTI, A. S. R. a PERIASAMY. Application of time resolved area normalized emission spectroscopy to multicomponent systems. *The Journal of Chemical Physics*. 2001, vol. 115, no. 15, p. 7094–7099.
- [82] PERIASAMY, N. a KOTI, A. S. R. Time Resolved Fluorescence Spectroscopy: TRES and TRANES. *Proceedings of the Indian National Science Academy*. 2003, vol. 69, no. 1, p. 41–48.
- [83] CHEN, Y., SENESI, N., SCHNITZER, M. Information Provided on Humic Substances by E4/E6 Ratios. *Soil Science Society of America Journal*. 1977, vol. 41, no. 2, p. 352–358.
- [84] CHEN, J., GU, B., LEBOEUF, E. J., PAN, H., DAI, S. Spectroscopic characterization of the structural and functional properties of natural organic matter fractions. *Chemosphere*. 2002, vol. 48, no. 1, p. 59–68.
- [85] KUMADA, K. *Chemistry of soil organic matter*. New York: Elsevier, 1987, xi, 241 p. ISBN 04-449-8936-6.

- [86] BARANČÍKOVÁ, G., SENESI, N., BRUNETTI, G. Chemical and spectroscopic characterization of humic acids isolated from different Slovak soil types. *Geoderma*. 1997, vol. 78, no. 3–4, p. 251–266.
- [87] PEURAVUORI, J. a PIHLAJA, K. Molecular size distribution and spectroscopic properties of aquatic humic substances. *Analytica Chimica Acta*. 1997, vol. 337, no. 2, p. 133–149.
- [88] HAUTALA, K., PEURAVUORI, J., PIHLAJA, K. Measurement of aquatic humus content by spectroscopic analyses. *Water Research*. 2000, vol. 34, no. 1, p. 246–258.
- [89] BAKER, A. a SPENCER, R. B. G. Characterization of dissolved organic matter from source to sea using fluorescence and absorbance spectroscopy. *Science of The Total Environment*. 2004, vol. 333, no. 1–3, p. 217–232.
- [90] ANDERSEN, D. O., ALBERTS, J. J., TAKÁCS, M. Nature of natural organic matter (NOM) in acidified and limed surface waters. *Water Research*. 2000, vol. 34, no. 1, p. 266–278.
- [91] KORSHIN, G. V., LI, Ch. W., BENJAMIN, M. M. Monitoring the properties of natural organic matter through UV spectroscopy: A consistent theory. *Water Research*. 1997, vol. 31, no. 7, p. 1787–1795.
- [92] FUENTES, M., GONZÁLEZ-GAITANO G., GARCÍA-MINA, J. M. The usefulness of UV–visible and fluorescence spectroscopies to study the chemical nature of humic substances from soils and composts. *Organic Geochemistry*. 2006, vol. 37, no. 12, p. 1949–1959.
- [93] CHIN, Y. P., AIKEN, G., O'LOUGHLIN, E. Molecular Weight, Polydispersity, and Spectroscopic Properties of Aquatic Humic Substances. *Environmental Science*. 1994, vol. 28, no 11, p. 1853–1858.
- [94] KALBITZ, K., GEYER, W., GEYER, S. Spectroscopic properties of dissolved humic substances – a reflection of land use history in a fen area. *Biogeochemistry*. 1999, vol. 47, no. 2, p. 219–238.
- [95] WEISHAAR, J. L., AIKEN, G. R., BERGAMASCHI, B. A., FRAM, M. S., FUJII, R., MOPPER, K. Evaluation of Specific Ultraviolet Absorbance as an Indicator of the Chemical Composition and Reactivity of Dissolved Organic Carbon. *Environmental Science*. 2003, vol. 37, no. 20, p. 4702–4708.
- [96] HAY, M. B. a MYNENI, S. C. B. Structural environments of carboxyl groups in natural organic molecules from terrestrial systems. Part 1: Infrared spectroscopy. *Geochimica et Cosmochimica Acta*. 2007, vol. 71, no. 14, p. 3518–3532.
- [97] GEYER, W., HEMIDI, F. A. H., BRÜGGEMANN, L., HANSCHMANN, G. Investigation of soil humic substances from different environments using TG–FTIR and multivariate data analysis. *Thermochimica Acta*. 2000, vol. 361, no. 1–2, p. 139–146.
- [98] GIOVANELA, M., PARLANTI, E., SORIANO-SIERRA, E. J., SOLDI, M. S., SIERRA, M. M. D., SENESI, N., MIANO, T. M., PROVENZANO, M. R. Elemental compositions, FT-IR spectra and thermal behavior of sedimentary fulvic and humic acids from aquatic and terrestrial environments. *Geochemical Journal*. 2004, vol. 38, no. 3, p. 63–73.
- [99] KUCKUK, R., HILL, W., BURBA, P. Pyrolysis-GC-FTIR for structural elucidation of aquatic humic substances. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*. 1994, vol. 350, no. 7–9, p. 528–532.
- [100] ABBT-BRAUN, G., LANKES, U., FRIMMEL, F. H. Structural characterization of aquatic humic substances – The need for a multiple method approach. *Aquatic Sciences - Research Across Boundaries*. 2004, vol. 66, no. 2, p. 151–170.
- [101] VERGNOUX, A., GUILIANO, M., DI ROCCO, R., DOMEIZEL, M., THÉRAULAZ, F., DOUMENQ, P. Quantitative and mid-infrared changes of humic substances from burned soils. *Environmental Research*. 2011, vol. 111, no. 2, p. 205–214.
- [102] SANTOS, E. B. H. a DUARTE, A. C. The influence of pulp and paper mill effluents on the composition of the humic fraction of aquatic organic matter. *Water Research*. 1998, vol. 32, no. 3, p. 597–608.
- [103] IBARRA, J. V., MUÑOZ, E., MOLINER, R. FTIR study of the evolution of coal structure during the coalification process. *Organic Geochemistry*. 1996, vol. 24, no. 6–7, p. 725–735.
- [104] PAINTER, P. C., SNYDER, R. W., STARSINIC, M., COLEMAN, M. M., KUEHN, D. W., DAVIS, A., COLEMAN, M. M., VARNELL, D. F., RUNT, J. P. Concerning the Application of FT-IR to the Study of Coal: A Critical Assessment of Band Assignments and the Application of Spectral Analysis Programs. *Applied Spectroscopy*. 1981, vol. 35, no. 5, p. 59–70.

- [105] SANTOS, P. S. M., OTERO, M., DUARTE, R. B. B. O., DUARTE, A. C. Spectroscopic characterization of dissolved organic matter isolated from rainwater. *Chemosphere*. 2009, vol. 74, no. 8, p. 1053–1061.
- [106] ARTZ, R. R. E., CHAPMAN, S. J., ROBERTSON, A. H. J., POTTS, J. M., LAGGOUN-DÉFARGE, F., GOGO, S., COMONT, L., DISNAR, J. R., FRANCEZ, A. J. FTIR spectroscopy can be used as a screening tool for organic matter quality in regenerating cutover peatlands. *Soil Biology and Biochemistry*. 2008, vol. 40, no. 2, p. 515–527.
- [107] BAES, A. U. a BLOOM, P. R. Diffuse Reflectance and Transmission Fourier Transform Infrared (DRIFT) Spectroscopy of Humic and Fulvic Acids. *Soil Science Society of America Journal*. 1989, vol. 53, no. 3, p. 695–700.
- [108] FRANCIOSO, O., SÀNCHEZ-CORTÉS, S., TUGNOLI, V., MARZADORI, C., CIAVATTA, C. Spectroscopic study (DRIFT, SERS and ¹H NMR) of peat, leonardite and lignite humic substances. *Journal of Molecular Structure*. 2001, no. 565–566, p. 481–485.
- [109] GRIFFITHS, P. R. *Fourier transform infrared spectrometry*. 2nd ed. Hoboken, N. J: Wiley-Interscience, 2007, 704 p. ISBN 978-047-0106-297.
- [110] ESTEVES, V. I., OTERO, M., DUARTE, A. C. Comparative characterization of humic substances from the open ocean, estuarine water and fresh water. *Organic Geochemistry*. 2009, vol. 40, no. 9, p. 942–950.
- [111] TERKHI, M. C., TALEB, F., GOSSART, P., SEMMOUD, A., ADDOU, A. Fourier transform infrared study of mercury interaction with carboxyl groups in humic acids. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*. 2008, vol. 198, no. 2–3, p. 205–214.
- [112] MARTYNIUK, H. a WIĘCKOWSKA, J. Adsorption of metal ions on humic acids extracted from brown coals. *Fuel Processing Technology*. 2003, vol. 84, no. 1–3, s. 23–36.
- [113] PICCOLO, A. a STEVENSON, F. J. Infrared spectra of Cu²⁺ Pb²⁺ and Ca²⁺ complexes of soil humic substances. *Geoderma*. 1982, vol. 27, no. 3, p. 195–208.
- [114] WOOD, S. A. The role of humic substances in the transport and fixation of metals of economic interest (Au, Pt, Pd, U, V). *Ore Geology Reviews*. 1996, vol. 11, no. 1–3, p. 1–31.
- [115] FU, F. a WANG, Q. Removal of heavy metal ions from wastewaters: A review. *Journal of Environmental Management*. 2011, vol. 92, no. 3, p. 407–418.
- [116] GARDEA-TORRESDEY, J. L., TANG, L., SALVADOR, J. M. Copper adsorption by esterified and unesterified fractions of Sphagnum peat moss and its different humic substances. *Journal of Hazardous Materials*. 1996, vol. 48, no. 1–3, p. 191–206.
- [117] ALBERTS, J. J. a TAKÁCS, M. Total luminescence spectra of IHSS standard and reference fulvic acids, humic acids and natural organic matter: comparison of aquatic and terrestrial source terms. *Organic Geochemistry*. 2004, vol. 35, no. 3, p. 243–256.
- [118] MCGOWN, L. B., HEMMINGSEN, S. L., SHAVER J. M., GENG, L. Total Lifetime Distribution Analysis for Fluorescence Fingerprinting and Characterization. *Applied Spectroscopy*. 1995, vol. 49, no. 1, p. 60–66.
- [119] SENESI, N. Molecular and quantitative aspects of the chemistry of fulvic acid and its interactions with metal ions and organic chemicals. *Analytica Chimica Acta*. 1990, vol. 232, no. 1, p. 77–106.
- [120] PARLANTI, E., WÖRZ, K., GEOFFROY, L., LAMOTTE, M. Dissolved organic matter fluorescence spectroscopy as a tool to estimate biological activity in a coastal zone submitted to anthropogenic inputs. *Organic Geochemistry*. 2000, vol. 31, no. 12, p. 1765–1781.
- [121] PEIRIS, R. H., BUDMAN, H., MORESOLI, C., LEGGE, R. L. Identification of humic acid-like and fulvic acid-like natural organic matter in river water using fluorescence spectroscopy. *Water Science*. 2011, vol. 63, no. 10, p. 2427–2433.
- [122] HUDSON, N., BAKER, A., WARD, D., REYNOLDS, D. M., BRUNSDON, Ch., CARLIELL-MARQUET, C., BROWNING, S. Can fluorescence spectrometry be used as a surrogate for the Biochemical Oxygen Demand (BOD) test in water quality assessment ? An example from South West England. *Science of The Total Environment*. 2008, vol. 391, no. 1, p. 149–158.
- [123] HUDSON, N., BAKER, A., REYNOLDS, D. Fluorescence analysis of dissolved organic matter in natural, waste and polluted waters – a review. *River Research and Applications*. 2007, vol. 23, no. 6, p. 631–649.

- [124] MCKNIGHT, D. M., BOYER, E. W., WESTERHOFF, P. K., DORAN, P. T., KULBE, T., ANDERSEN, D. T. Spectrofluorometric characterization of dissolved organic matter for indication of precursor organic material and aromaticity. *Limnology and Oceanography*. 2001, vol. 46, no. 1, p. 38–48.
- [125] HUGUET, A., VACHER, L., RELEXANS, S., SAUBUSSE, S., FROIDEFOND, J. M., PARLANTI, E. Properties of fluorescent dissolved organic matter in the Gironde Estuary. *Organic Geochemistry*. 2009, vol. 40, no. 6, p. 706–719.
- [126] ZSOLNAY, A., BAIGAR, E., JIMENEZ, M., STEINWEG, B., SACCOMANDI, F. Differentiating with fluorescence spectroscopy the sources of dissolved organic matter in soils subjected to drying. *Chemosphere*. 1999, vol. 38, no. 1, p. 45–50.
- [127] MILORI, D. M. B. P., MARTIN-NETO, L., BAYER, C., MIELNICZUK, J., BAGNATO, V. S. Humification degree of soil humic acids determined by fluorescence spectroscopy. *Soil Science*. 2002, vol. 167, no. 11, p. 739–749.
- [128] HER, N., AMY, G., MCKNIGHT, D., SOHN, J., YOON, Y. Characterization of DOM as a function of MW by fluorescence EEM and HPLC-SEC using UVA, DOC, and fluorescence detection. *Water Research*. 2003, vol. 37, no. 17, p. 4295–4303.
- [129] CABANISS, S. E., ZHOU, Q., MAURICE, P. A., CHIN, Y. P., AIKEN, G. R. A Log-Normal Distribution Model for the Molecular Weight of Aquatic Fulvic Acids. *Environmental Science*. 2000, vol. 34, no. 6, p. 1103–1109.
- [130] ALBERTS, J. J. a TAKÁCS, M. Comparison of the natural fluorescence distribution among size fractions of terrestrial fulvic and humic acids and aquatic natural organic matter. *Organic Geochemistry*. 2004, vol. 35, no. 10, p. 1141–1149.
- [131] STEDMON, C. A., MARKAGER, S., BRO, R. Tracing dissolved organic matter in aquatic environments using a new approach to fluorescence spectroscopy. *Marine Chemistry*. 2003, vol. 82, no. 3–4, p. 239–254.
- [132] HAO, R., REN, H., LI, J., MA, Z., WAN, H., ZHENG, X., CHENG, S. Use of three-dimensional excitation and emission matrix fluorescence spectroscopy for predicting the disinfection by-product formation potential of reclaimed water. *Water Research*. 2012, vol. 46, no. 17, p. 5765–5776.
- [133] LIU, T., CHEN, Z. L., YU, W. Z., YOU, S. J. Characterization of organic membrane foulants in a submerged membrane bioreactor with pre-ozonation using three-dimensional excitation–emission matrix fluorescence spectroscopy. *Water Research*. 2011, vol. 45, no. 5, p. 2111–2121.
- [134] GARCÍA-GIL, J. C., PLAZA, C., FERNÁNDEZ, J. M., SENESI, N., POLO, A. Soil fulvic acid characteristics and proton binding behavior as affected by long-term municipal waste compost amendment under semi-arid environment. *Geoderma*. 2008, vol. 146, no. 1–2, p. 363–369.
- [135] PLAZA, C., SENESI, N., GARCÍA-GIL, J. C., BRUNETTI, G., D'ORAZIO, V., POLO, A. Effects of Pig Slurry Application on Soils and Soil Humic Acids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2002, vol. 50, no. 17, p. 4867–4874.
- [136] BRUNETTI, G., POLO, A., GARCÍA-GIL, J. C., PLAZA, C., SENESI, N. Effects of sewage sludge amendment on humic acids and microbiological properties of a semiarid Mediterranean soil. *Biology and Fertility of Soils*. 2004, vol. 39, no. 5, p. 320–328.
- [137] PEDRA, F., PLAZA, C., FERNÁNDEZ, J. M., GARCÍA-GIL, J. C., POLO, A. Effects of municipal solid waste compost and sewage sludge on chemical and spectroscopic properties of humic acids from a sandy Haplic Podzol and a clay loam Calcic Vertisol in Portugal. *Waste Management*. 2008, vol. 28, no. 11, p. 2183–2191.
- [138] SENESI, N. a BRUNETTI, G. Chemical and Physico-Chemical Parameters for Quality Evaluation of Humic Substances Produced during Composting. In: *The Science of Composting*. Dordrecht: Springer Netherlands, 1996, p. 195–212. ISBN 978-94-009-1569-5.
- [139] ZHAO, J. a NELSON, D. J. Fluorescence study of the interaction of Suwannee River fulvic acid with metal ions and Al³⁺ – metal ion competition. *Journal of Inorganic Biochemistry*. 2005, vol. 99, no. 2, p. 383–396.
- [140] ZHANG, D., PAN, X., MOSTOFA, K. M. G., CHEN, X., MU, G., WU, F., LIU, J., SONG, W., YANG, J., LIU, Y., FU, Q. Complexation between Hg(II) and biofilm extracellular polymeric substances: An application of fluorescence spectroscopy. *Journal of Hazardous Materials*. 2010, vol. 175, no. 1–3, p. 359–365.

- [141] ESTEVES DA SILVA, J., MACHADO, A. A. S. C., OLIVEIRA, C. J. S., PINTO, M. S. S. D. S. Fluorescence quenching of anthropogenic fulvic acids by Cu(II), Fe(III) and UO₂. *Talanta*. 1998, vol. 45, no. 6, p. 1155–1165.
- [142] PLAZA, C., BRUNETTI, G., SENESI, N., POLO, A. Molecular and Quantitative Analysis of Metal Ion Binding to Humic Acids from Sewage Sludge and Sludge-Amended Soils by Fluorescence Spectroscopy. *Environmental Science*. 2006, vol. 40, no. 3, p. 917–923.
- [143] SENESI, N. a LOFFREDO, E. Metal Ion Complexation by Soil Humic Substances. In. *Chemical Processes in Soils*. Ed. M. A. Tabatabai, D. L. Sparks, Madison, Soil Science Society of America, 2005, p. 563–617. ISBN 978-0-89118-892-6.
- [144] ELKINS, K. M. a NELSON, D. J. Spectroscopic approaches to the study of the interaction of aluminum with humic substances. *Coordination Chemistry Reviews*. 2002, vol. 228, no. 2, p. 205–225.
- [145] SENESI, N. Molecular and quantitative aspects of the chemistry of fulvic acid and its interactions with metal ions and organic chemicals. *Analytica Chimica Acta*. 1990, vol. 232, p. 77–106.
- [146] HERNÁNDEZ, D., PLAZA, C., SENESI, N., POLO, A. Detection of Copper(II) and zinc(II) binding to humic acids from pig slurry and amended soils by fluorescence spectroscopy. *Environmental Pollution*. 2006, vol. 143, no. 2, p. 212–220.
- [147] PLAZA, C., D'ORAZIO, V., SENESI, N. Copper(II) complexation of humic acids from the first generation of EUROSOLS by total luminescence spectroscopy. *Geoderma*. 2005, vol. 125, no. 1–2, p. 177–186.
- [148] RYAN, D. K. a WEBER, J. H. Fluorescence quenching titration for determination of complexing capacities and stability constants of fulvic acid. *Analytical Chemistry*. 1982, vol. 54, no. 6, p. 986–990.
- [149] ANTUNES, M. C. G., PEREIRA, C. C. C., ESTEVES DA SILVA, J. C. G. MCR of the quenching of the EEM of fluorescence of dissolved organic matter by metal ions. *Analytica Chimica Acta*. 2007, vol. 595, no. 1–2, p. 9–18.
- [150] MERDY, P., TARCHOUNA GHARBI, L., MILORI, D. M. P., RIBEIRO, R. A. S., LUCAS, Y. A new method using laser induced fluorescence quenching for studying metal complexes in the solid state applied to Cr(III), Cu(II) and Pb(II) in sandy soils. *Geoderma*. 2009, vol. 150, no. 1–2, p. 179–187.
- [151] LU, X. Interaction between Hg(II) and natural dissolved organic matter: a fluorescence spectroscopy based study. *Water Research*. vol. 35, no. 7, p. 1793–1803.
- [152] SUBBIAH, D. a MISHRA, A. K. Humic acid-cetyltrimethylammonium bromide interaction: a fluorimetric study. *Luminescence*. 2009, vol. 24, no. 2, p. 84–89.
- [153] KUMKE, M. U., TISEANU, C., ABBT-BRAUN, G., FRIMMEL, F. H. Fluorescence Decay of Natural Organic Matter (NOM) – Influence of Fractionation, Oxidation, and Metal Ion Complexation. *Journal of Fluorescence*. vol. 8, no. 4, p. 309–318.
- [154] KUMKE, M. U., ABBT-BRAUN, G., FRIMMEL, F. H., MILNE, P. J., ODUM, D. S., ZIKA, R. G. Time-resolved Fluorescence Measurements of Aquatic Natural Organic Matter (NOM). *Acta hydrochimica et hydrobiologica*. 1998, vol. 26, no. 2, p. 73–81.
- [155] KUMKE, M. U., ZWIENER, C., ABBT-BRAUN, G., FRIMMEL, F. H. Spectroscopic Characterization of Fulvic Acid Fractions of a Contaminated Groundwater. *Acta hydrochimica et hydrobiologica*. 1999, vol. 27, no. 6, p. 409–415.
- [156] FRIMMEL, F. a ABBT-BRAUN, G. Basic characterization of reference NOM from Central Europe – Similarities and differences. *Environment International*. 1999, vol. 25, no. 2–3, p. 191–207.
- [157] BIRDWELL, J. E. a ENGEL, A. S. Characterization of dissolved organic matter in cave and spring waters using UV–Vis absorbance and fluorescence spectroscopy. *Organic Geochemistry*. 2010, vol. 41, no. 3, p. 270–280.
- [158] TISEANU, C., KUMKE, M. U., PARVULESCU, V. I., KOTI, A. S. R., GAGEA, B. C., MARTENS, J. A. Time-resolved photoluminescence of terbium-doped microporous–mesoporous Zeotile-1 materials. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*. 2007, vol. 187, no. 2–3, p. 299–304.
- [159] PICCOLO, A., CAMPANELLA L., PETRONIO B. M. Carbon-13 Nuclear Magnetic Resonance Spectra of Soil Humic Substances Extracted by Different Mechanisms. *Soil Science Society of America Journal*. 1990, vol. 54, no. 3, p. 750–756.

- [160] MOPPER, K., STUBBINS, A., RITCHIE, J. D., BIALK, H. M., HATCHER, P. G. Advanced Instrumental Approaches for Characterization of Marine Dissolved Organic Matter: Extraction Techniques, Mass Spectrometry, and Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. *Chemical Reviews*. 2007, vol. 107, no. 2, p. 419–442.
- [161] NOVÁK, F., ŠESTAUBEROVÁ M., HRABAL, R. Structural features of lignohumic acids. *Journal of Molecular Structure*. 2015, vol. 1093, p. 179–185.
- [162] ALBERS, C. N., BANTA, G. T., JACOBSEN, O. S., HANSEN, P. E. Characterization and structural modelling of humic substances in field soil displaying significant differences from previously proposed structures. *European Journal of Soil Science*. 2008, vol. 59, no. 4, p. 693–705.
- [163] SIMPSON, A. J., MCNALLY, D. J., SIMPSON, M. J. NMR spectroscopy in environmental research: From molecular interactions to global processes. *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*. 2011, vol. 58, no. 3–4, p. 97–175.
- [164] D'ANDRILLI, J., FOREMAN, C. M., MARSHALL, A. G., MCKNIGHT, D. M. Characterization of IHSS Pony Lake fulvic acid dissolved organic matter by electrospray ionization Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry and fluorescence spectroscopy. *Organic Geochemistry*. 2013, vol. 65, p. 19–28.
- [165] MAO, J., OLK, D. C., FANG, X., HE, Z., SCHMIDT-ROHR, K. Influence of animal manure application on the chemical structures of soil organic matter as investigated by advanced solid-state NMR and FT-IR spectroscopy. *Geoderma*. 2008, vol. 146, no. 1–2, p. 353–362.
- [166] HATCHER, P. G., SCHNITZER, M., DENNIS, L. W., MACIEL, G. E. Aromaticity of Humic Substances in Soils. *Soil Science Society of America Journal*. 1981, vol. 45, no. 6, p. 1089–1094.
- [167] PICCOLO, A., NARDI, S., CONCHERI, G. Structural characteristics of humic substances as related to nitrate uptake and growth regulation in plant systems. *Soil Biology and Biochemistry*. 1992, vol. 24, no. 4, p. 373–380.
- [168] CANELLAS, L. P., DOBBSS, L. B., OLIVEIRA, A. L., CHAGAS, J. G., AGUIAR, N. O., RUMJANEK, V. M., NOVOTNY, E. H., OLIVARES, F. L., SPACCINI, R., PICCOLO, A. Chemical properties of humic matter as related to induction of plant lateral roots. *European Journal of Soil Science*. 2012, vol. 63, no. 3, p. 315–324.
- [169] NOVÁK, F. a HRABAL, R. Kvantitativní ^{13}C NMR spektroskopie huminových látek. *Chemické listy*. 2011, vol. 105, no. 10, p. 752–760.
- [170] AGUIAR, N. O., NOVOTNY, E. H., OLIVEIRA, A. L., RUMJANEK, V. M., OLIVARES, F. L., CANELLAS, L. P. Prediction of humic acids bioactivity using spectroscopy and multivariate analysis. *Journal of Geochemical Exploration*. 2013, vol. 129, p. 95–102.
- [171] PANE, C., SPACCINI, R., PICCOLO, A., SCALA, F., BONANOMI, G. Compost amendments enhance peat suppressiveness to *Pythium ultimum*, *Rhizoctonia solani* and *Sclerotinia minor*. *Biological Control*. 2011, vol. 56, no. 2, p. 115–124.
- [172] DOBBSS, L. B., PASQUALOTO CANELLAS, L., LOPES OLIVARES, F., OLIVEIRA AGUIAR, N., PERES, L. E. P., AZEVEDO, M., SPACCINI, R., PICCOLO, A., FAÇANHA, A. R. Bioactivity of Chemically Transformed Humic Matter from Vermicompost on Plant Root Growth. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2010, vol. 58, no. 6, p. 3681–3688.
- [173] MERINO, A., FERREIRO, A., SALGADO, J., FONTÚRBEL, M. T., BARROS, N., FERNÁNDEZ, C., VEGA, J. A. Use of thermal analysis and solid-state ^{13}C CP-MAS NMR spectroscopy to diagnose organic matter quality in relation to burn severity in Atlantic soils. *Geoderma*. 2014, 226–227, p. 376–386.
- [174] HATCHER, P. G., ROWAN, R., MATTINGLY, M. A. ^1H and ^{13}C NMR of marine humic acids. *Organic Geochemistry*. 1980, vol. 2, no. 2, p. 77–85.
- [175] WILSON, M. A., BARRON, P. F., GILLAM, A. H. The structure of freshwater humic substances as revealed by ^{13}C -NMR spectroscopy. *Geochimica et Cosmochimica Acta*. 1981, vol. 45, no. 10, p. 1743–1750.
- [176] MCKNIGHT, D. M., AIKEN, G. R. Sources and Age of Aquatic Humus. *Aquatic Humic Substances*. 1998, vol. 133, p. 9–39.
- [177] REPETA, D. J., QUAN, T. M., ALUWIHARE, L. I., ACCARDI, A. M. Chemical characterization of high molecular weight dissolved organic matter in fresh and marine waters. *Geochimica et Cosmochimica Acta*. 2002, vol. 66, no. 6, p. 955–962.

- [178] Chemical Composition and Physical Properties of Humic Substances. FLAIG, W., BEUTELSPACHER, H., RIETZ, E. *Soil Components*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 1975, p. 1–211. ISBN 978-3-540-06861-7.
- [179] Source Materials for IHSS Samples: Standard Samples. PERDUE, M. *International Humic Substances Society: Natural Organic Matter Research* [online]. 1. Denver, Colorado, USA: IHSS, © 2015, 14.03.2015 [cit. 2015-09-13]. Available from: <http://www.humicsubstances.org/sources.html>
- [180] HOBLEY, E., WILLGOOSE, G. R., FRISIA, S., JACOBSEN, G. Vertical distribution of charcoal in a sandy soil: evidence from DRIFT spectra and field emission scanning electron microscopy. *European Journal of Soil Science*. 2014, vol. 65, no. 5, p. 751–762.
- [181] CAVOSKI, I., D'ORAZIO, V., MIANO, T. Interactions between rotenone and humic acids by means of FT-IR and fluorescence spectroscopies. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2009, vol. 395, no. 4, p. 1145–1158.
- [182] VERGNOUX, A., GUILIANO, M., DI ROCCO, R., DOMEIZEL, M., THÉRAULAZ, M., DOUMENQ, P. Quantitative and mid-infrared changes of humic substances from burned soils. *Environmental Research*. 2011, vol. 111, no. 2, p. 205–214.
- [183] PROVENZANO, M. R., MALERBA, D. A., BUSCAROLI, A., ZANNONI, D., SENESI, N. Anaerobic digestion of municipal solid waste and sewage sludge under mesophilic and thermophilic conditions. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*. 2013, vol. 111, no. 3, p. 1861–1870.
- [184] GUO, X., ZHU, N., CHEN, L., YUAN, D., HE, L. Characterizing the fluorescent properties and copper complexation of dissolved organic matter in saline-alkali soils using fluorescence excitation-emission matrix and parallel factor analysis. *Journal of Soils and Sediments*. 2015, vol. 15, no. 7, p. 1473–1482.
- [185] PENG, N., WANG, K., LIU, G., LI, F., YAO, K., LV, W. Quantifying interactions between propranolol and dissolved organic matter (DOM) from different sources using fluorescence spectroscopy. *Environmental Science and Pollution Research*. 2014, vol. 21, no. 7, p. 5217–5226.
- [186] ZHANG, X., YANG, G., DONG, Y., ZHAO, Y., SUN, X., CHEN, L., CHEN, H. Studies on the binding of fulvic acid with transferrin by spectroscopic analysis. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 2015, vol. 137, p. 1280–1285.
- [187] KOTI, A. S. R. a PERIASAMY, N. Time resolved area normalized emission spectroscopy (TRANES) of DMABN confirms emission from two states. *Research on Chemical Intermediates*. 2002, vol. 28, no. 7, p. 831–836.
- [188] MARTINEZ-BALMORI, D., SPACCINI, R., AGUIAR, N. O., NOVOTNY, E. H., OLIVARES, F. L., CANELLAS, L. P. Molecular Characteristics of Humic Acids Isolated from Vermicomposts and Their Relationship to Bioactivity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2014, vol. 62, no. 47, p. 11412–11419.
- [189] RICE, J. A. a MACCARTHY, P. Statistical evaluation of the elemental composition of humic substances. *Organic Geochemistry*. 1991, vol. 17, no. 5, p. 635–648.
- [190] AIKEN, G. R., McKNIGHT, D. M., THORN, K. A., THURMAN, E. M. Isolation of hydrophilic organic acids from water using nonionic macroporous resins. *Organic Geochemistry*. 1992, vol. 18, no. 4, p. 567–573.
- [191] KLAVINS, M. a PURMALIS, O. Properties and structure of raised bog peat humic acids. *Journal of Molecular Structure*. 2013, vol. 1050, p. 103–113.
- [192] KLAVINS, M., PURMALIS, O., RODINOV, V. Peat humic acid properties and factors influencing their variability in a temperate bog ecosystem. *Estonian Journal of Ecology*. 2013, vol. 62, no. 1, p. 35–52.
- [193] YONEBAYASHI, K. a HATTORI, T. Chemical and biological studies on environmental humic acids. *Soil Science and Plant Nutrition*. 1988, vol. 34, no. 4, p. 571–584.
- [194] VALENCIA, S., MARÍN, J., VELÁSQUEZ, J., RESTREPO, G., FRIMMEL, F. H. Study of pH effects on the evolution of properties of brown-water natural organic matter as revealed by size-exclusion chromatography during photocatalytic degradation. *Water Research*. 2012, vol. 46, no. 4, p. 1198–1206.
- [195] KLUČÁKOVÁ, M. a PEKAŘ, M. Solubility and dissociation of lignitic humic acids in water suspension. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 2005, vol. 252, no. 2–3, p. 157–163.
- [196] PEACOCK, M., EVANS, C. D., FENNER, N., FREEMAN, C., GOUGH, R., JONES, T. G., LEBRON, I. UV-visible absorbance spectroscopy as a proxy for peatland dissolved organic carbon (DOC) quantity and

- quality: considerations on wavelength and absorbance degradation. *Environmental Science: Processes*. 2014, vol. 16, no. 6, p. 1445–1461.
- [197] SIRE, J., KLAVINS, M., PURMALIS, O., MELECIS, V. Experimental Study of Peat Humification Indicators. *Proceedings of the Latvian Academy of Sciences. Section B. Natural, Exact, and Applied Sciences*. 2008, vol. 62, no. 1–6, p. 18–26.
- [198] KYUMA, K. A fractional precipitation technique applied to soil humic substances. *Soil Science and Plant Nutrition*. 1964, vol. 10, no. 1, p. 33–35.
- [199] ARTIN, D., SRIVASTAVA, P. C., GHOSH, D., ZECH, W. Characteristics of humic substances in cultivated and natural forest soils of Sikkim. *Geoderma*. 1998, vol. 84, no. 4, p. 345–362.
- [200] TINOCO, P., ALMENDROS, G., GONZÁLEZ-VILA, F. J., SANZ, J., GONZÁLEZ-PÉREZ, J. A. Revisiting molecular characteristics responsive for the aromaticity of soil humic acids. *Journal of Soils and Sediments*. 2015, vol. 15, no. 4, p. 781–791.
- [201] PURMALIS, O. a KLAVINS, M. Comparative Study of Peat Humic Acids by Using UV spectroscopy. *European Scientific Journal*. 2013, no. 3, p. 857–866.
- [202] O'DONNELL, J. A., AIKEN, G. R., WALVOORD, M. A., BUTLER, K. D. Dissolved organic matter composition of winter flow in the Yukon River basin: Implications of permafrost thaw and increased groundwater discharge. *Global Biogeochemical Cycles*. 2012, vol. 26, no. 4, p. 1–18.
- [203] MATILAINEN, A., GJESSING, E. T., LAHTINEN, T., HED, L., BHATNAGAR, A., SILLANPÄÄ, M. An overview of the methods used in the characterisation of natural organic matter (NOM) in relation to drinking water treatment. *Chemosphere*. 2011, vol. 83, no. 11, p. 1431–1442.
- [204] UYGUNER, C. S., BEKBOLET, M. Evaluation of humic acid photocatalytic degradation by UV–vis and fluorescence spectroscopy. *Catalysis Today*. 2005, vol. 101, no. 3–4, p. 267–274.
- [205] HUR, J., LEE, D-H., SHIN, H-S. Comparison of the structural, spectroscopic and phenanthrene binding characteristics of humic acids from soils and lake sediments. *Organic Geochemistry*. 2009, vol. 40, no. 10, p. 1091–1099.
- [206] CHIN, Y-P, AIKEN, G. R., DANIELSEN, K. M. Binding of Pyrene to Aquatic and Commercial Humic Substances: The Role of Molecular Weight and Aromaticity. *Environmental Science*. 1997, vol. 31, no. 6, p. 1630–1635.
- [207] PERMINOVA, I. V., GRECHISHCHEVA, N. Y., PETROSYAN, V. S. Relationships between Structure and Binding Affinity of Humic Substances for Polycyclic Aromatic Hydrocarbons: Relevance of Molecular Descriptors. *Environmental Science*. 1999, vol. 33, no. 21, p. 3781–3787.
- [208] SCHNITZER, M. a KHAN, S. U. *Soil organic matter*. Amsterdam: Elsevier Scientific Pub. Co, 1978, p. 318. ISBN 00-808-6975-0.
- [209] MALCOLM, R. L. a MACCARTHY, P. Limitations in the use of commercial humic acids in water and soil research. *Environmental Science*. 1986, vol. 20, no. 9, p. 904–911.
- [210] CHANG, R. R., MYLOTTE, R., HAYES, M. H. B., MCLNERNEY, R., TZOU, Y. M. A comparison of the compositional differences between humic fractions isolated by the IHSS and exhaustive extraction procedures. *Naturwissenschaften*. 2014, vol. 101, no. 3, p. 197–209.
- [211] SIMONETTI, G., FRANCIOSO, O., NARDI, S., BERTI, A., BRUGNOLI, E., FRANCESCO MORARI, E. L. Characterization of Humic Carbon in Soil Aggregates in a Long-term Experiment with Manure and Mineral Fertilization. *Soil Science Society of America Journal*. 2012, vol. 76, no. 3, p. 880–890.
- [212] BAIGORRI, R., FUENTES, M., GONZÁLEZ-GAITANO, G., GARCÍA-MINA, J. M., ALMENDROS, G., GONZÁLEZ-VILA, F. J. 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, vol. 57, no. 8, p. 3266–3272.
- [213] DING, G., LIU, X., HERBERT, S., NOVAK, J., AMARASIRIWARDENA, D., XING, B. Effect of cover crop management on soil organic matter. *Geoderma*. 2006, vol. 130, no. 3–4, p. 229–239.
- [214] COATES, J. Interpretation of Infrared Spectra, A Practical Approach. In. *Encyclopedia of Analytical Chemistry*. Ed. R. A. Meyers, Chichester, UK: John Wiley, 2006, p. 10815–10837. ISBN: 978-0-47-002731-8.

- [215] TADINI, A. M., CONSTANTINO, I. C., NUZZO, A., SPACCINI, R., PICCOLO, A., MOREIRA, A. B., BISINOTI, M. C. Characterization of typical aquatic humic substances in areas of sugarcane cultivation in Brazil using tetramethylammonium hydroxide thermochemolysis. *Science of the Total Environment*. 2015, no. 518–519, p. 201–208.
- [216] PEURAVUORI, J., ŽBÁNKOVÁ, P., PIHLAJA, K. Aspects of structural features in lignite and lignite humic acids. *Fuel Processing Technology*. 2006, vol. 87, no. 9, p. 829–839.
- [217] KARIM, S., OKUYAMA, Y., AOYAMA, M. Separation and characterization of the constituents of compost and soil humic acids by two-dimensional electrophoresis. *Soil Science and Plant Nutrition*. 2013, vol. 59, no. 2, p. 130–141.
- [218] LUMSDON, D. G. a FRASER, A. R. Infrared Spectroscopic Evidence Supporting Heterogeneous Site Binding Models for Humic Substances. *Environmental Science*. 2005, vol. 39, no. 17, p. 6624–6631.
- [219] STUART, B. *Infrared spectroscopy: Fundamentals and applications*. Hoboken, NJ: J. Wiley, c2004, xv, 224 p. ISBN 978-04-708-5428-6.
- [220] MOHAN, J. *Organic spectroscopy: Principles and applications*. 2nd Ed. Harrow: Alpha Science International, CRC Press, 2004, p. 548. ISBN 978-084-9339-523.
- [221] GUIGNARD, C., LEMÉE L., AMBLÈS, A. Lipid constituents of peat humic acids and humin. Distinction from directly extractable bitumen components using TMAH and TEAAc thermochemolysis. *Organic Geochemistry*. 2005, vol. 36, no. 2, p. 287–297.
- [222] D'ORAZIO, V., TRAVERSA, A., SENESI, N. Forest soil organic carbon dynamics as affected by plant species and their corresponding litters: a fluorescence spectroscopy approach. *Plant and Soil*. 2014, vol. 374, no. 1–2, p. 473–484.
- [223] MURPHY, K. R., STEDMON, C. A., WAITE, T. D., RUIZ, G. M. Distinguishing between terrestrial and autochthonous organic matter sources in marine environments using fluorescence spectroscopy. *Marine Chemistry*. 2008, vol. 108, no. 1–2, p. 40–58.
- [224] RODRÍGUEZ, F. J., SCHLENGER, P., GARCÍA-VALVERDE, M. A comprehensive structural evaluation of humic substances using several fluorescence techniques before and after ozonation. Part I: Structural characterization of humic substances. *Science of the Total Environment*. 2014, no. 476–477, p. 718–730.
- [225] SANTOS, C. H., NICOLODELLI, G. ROMANO, R. A., TADINI, A. M., VILLAS-BOAS, P. R., MONTES, C. R., MOUNIER, S., MILORI, D. M. B. P. Structure of Humic Substances from Some Regions of the Amazon Assessed Coupling 3D Fluorescence Spectroscopy and CP/PARAFAC. *Journal of the Brazilian Chemical Society*. 2015, vol. 6, no. 26, p. 1136–1142.
- [226] ZHI, E., YU, H., DUAN, L., HAN, L., LIU, L., SONG, Y. Characterization of the composition of water DOM in a surface flow constructed wetland using fluorescence spectroscopy coupled with derivative and PARAFAC. *Environmental Earth Sciences*. 2015, vol. 73, no. 9, p. 5153–5161.
- [227] GUO, X. J., HE, L. S., LI, Q., YUAN, D. H., DENG, Y. Investigating the spatial variability of dissolved organic matter quantity and composition in Lake Wuliangshuai. *Ecological Engineering*. 2014, vol. 62, 93–101.
- [228] DOSKOČIL, L., GRASSET, L., ENEV, V., KALINA, L., PEKAŘ, M. Study of water-extractable fractions from South Moravian lignite. *Environmental Earth Sciences*. 2015, vol. 73, no. 7, p. 3873–3885.
- [229] YU, C., ZHANG, Y., QUAN, X., CHEN, S., HAN, J., OU, X., ZHAO, J. Photochemical Effect of Humic Acid Components Separated Using Molecular Imprinting Method Applying Porphyrin-like Substances as Templates in Aqueous Solution. *Environmental Science*. 2010, vol. 44, no. 15, p. 5812–5817.
- [230] GIRARDELLO, F., GUÉGAN, R., ESTEVES, V. I., BAUMVOL, I. J. R., SIERRA, M. M. D., CRESPO, J. S., FERNANDES, A. N., GIOVANELA, M. Characterization of Brazilian Peat Samples by Applying a Multimethod Approach. *Spectroscopy Letters*. 2013, vol. 46, no. 3, p. 201–210.
- [231] TFAILY, M. M., HAMDAN, R., CORBETT, J. E., CHANTON, J. P., GLASER, P. H., COOPER, W. T. Investigating dissolved organic matter decomposition in northern peatlands using complimentary analytical techniques. *Geochimica et Cosmochimica Acta*. 2013, vol. 112, p. 116–129.
- [232] LI, L., GUO, H., SHAO, C., YU, S., YIN, D., GAO, N., LU, N. Effect of algal organic matter (AOM) extracted from *Microcystis aeruginosa* on photo-degradation of Diuron. *Chemical Engineering Journal*. 2015, vol. 281, p. 265–271.

- [233] SCHATUP, A. T., NDU, U., BALCOM, P. H., MASON, R. P., SUNDERLAND, E. M. Contrasting Effects of Marine and Terrestrially Derived Dissolved Organic Matter on Mercury Speciation and Bioavailability in Seawater. *Environmental Science*. 2015, vol. 49, no. 10, p. 5965–5972.
- [234] VILLACORTE, L. O., EKOWATI, Y., NEU, T. R., KLEIJN, J. M., WINTERS, H., AMY, G., SCHIPPERS, J. C., KENNEDY, M. D. Characterisation of algal organic matter produced by bloom-forming marine and freshwater algae. *Water Research*. 2015, vol. 73, 216–230.
- [235] HER, N., AMY, G., PARK, H-R. SONG, M. Characterizing algogenic organic matter (AOM) and evaluating associated NF membrane fouling. *Water Research*. 2004, vol. 38, no. 6, p. 1427–1438.
- [236] GANDOIS, L., COBB, A. R., HEI, I. C., LIM, L. B. L., SALIM, K. A., HARVEY, C. F. Impact of deforestation on solid and dissolved organic matter characteristics of tropical peat forests: implications for carbon release. *Biogeochemistry*. 2013, vol. 114, no. 1–3, p. 183–199.
- [237] YAMASHITA, Y. a TANOUE, E. Chemical characterization of protein-like fluorophores in DOM in relation to aromatic amino acids. *Marine Chemistry*. 2003, vol. 82, no. 3–4, p. 255–271.
- [238] TFAILY, M. M., CORBETT, J. E., WILSON, R., CHANTON, J. P., GLASER, P. H., CAWLEY, K. M., JAFFÉ, R., COOPER, W. T. Utilization of PARAFAC-Modeled Excitation-Emission Matrix (EEM) Fluorescence Spectroscopy to Identify Biogeochemical Processing of Dissolved Organic Matter in a Northern Peatland. *Photochemistry and Photobiology*. 2015, vol. 91, no. 3, p. 684–695.
- [239] KILLOPS, S. D. a KILLOPS, V. J. *Introduction to Organic Geochemistry*. 2nd Edition. Blackwell: Wiley, 2005, p. 408. ISBN 978-1-118-69720-7.
- [240] CORVASCE, M., ZSOLNAY, A., D’ORAZIO, V., LOPEZ, R., MIANO, T. M. Characterization of water extractable organic matter in a deep soil profile. *Chemosphere*. 2006, vol. 62, no. 10, p. 1583–1590.
- [241] COBLE, P. *Aquatic organic matter fluorescence*. New York: Cambridge University Press, 2014, p. 418. ISBN 978-052-1152-594.
- [242] CHEN, W., HABIBUL, N., LIU, X-Y., SHENG, G-P., YU, H-Q. FTIR and Synchronous Fluorescence Heterospectral Two-Dimensional Correlation Analyses on the Binding Characteristics of Copper onto Dissolved Organic Matter. *Environmental Science*. 2015, vol. 49, no. 4, p. 2052–2058.
- [243] XI, B., GENG, C., ZHAO, Y., WEI, Z., HE, X. Interaction of phenanthrene with dissolved organic matter and its fractions from leachate of different landfill ages. *Environmental Earth Sciences*. 2012, vol. 67, no. 7, p. 1861–1867.
- [244] HAFUKA, A., DING, Q., YAMAMURA, H., YAMADA, K., SATOH, H. Interactions of dissolved humic substances with oppositely charged fluorescent dyes for tracer techniques. *Water Research*. 2015, vol. 85, p. 193–198.
- [245] WU, J., ZHANG, H., YAO, Q-S., SHAO, L-M., HE, P-J. Toward understanding the role of individual fluorescent components in DOM-metal binding. *Journal of Hazardous Materials*. 2012, vol. 215–216, p. 294–301.
- [246] ORSETTI, S., MARCO-BROWN, J. L., ANDRADE, E. M., MOLINA, F. V. Pb(II) Binding to Humic Substances: An Equilibrium and Spectroscopic Study. *Environmental Science*. 2013, vol. 47, no. 15, p. 8325–8333.
- [247] XU, H., YU, G., YANG, L., JIANG, H. Combination of two-dimensional correlation spectroscopy and parallel factor analysis to characterize the binding of heavy metals with DOM in lake sediments. *Journal of Hazardous Materials*. 2013, vol. 263, p. 412–421.
- [248] STEVENSON, F. J. Stability Constants of Cu²⁺, Pb²⁺, and Cd²⁺ Complexes with Humic Acids1. *Soil Science Society of America Journal*. 1976, vol. 40, no. 5, p. 665–672.
- [249] CHAKRABORTY, P., YAO, K. M., CHENNURI, K., VUDAMALA, K., RAGHUNADH BABU, P. V. Interactions of mercury with different molecular weight fractions of humic substances in aquatic systems. *Environmental Earth Sciences*. 2014, vol. 72, no. 3, p. 931–939.
- [250] BEKBOLET, M. a SEN-KAVURMACI, S. The effect of photocatalytic oxidation on molecular size distribution profiles of humic acid. *Photochemical and Photobiological Sciences*. 2015, vol. 14, no. 3, p. 576–582.
- [251] MAZZEI, P. a PICCOLO, A. Interactions between natural organic matter and organic pollutants as revealed by NMR spectroscopy. *Magnetic Resonance in Chemistry*. 2015, vol. 53, no. 9, p. 667–678.

- [252] CONTE, P., SPACCINI, R., ŠMEJKALOVÁ, D., NEBBIOSO, A., PICCOLO, A. Spectroscopic and conformational properties of size-fractions separated from a lignite humic acid. *Chemosphere*. 2007, vol. 69, no. 7, p. 1032–1039.
- [253] TADINI, A. M., PANTANO, G., DE TOFFOLI, A. L., FONTAINE, B., SPACCINI, R. PICCOLO, A., MOREIRA, A. B., BISINOTI, M. C. Off-line TMAH-GC/MS and NMR characterization of humic substances extracted from river sediments of northwestern São Paulo under different soil uses. *Science of the Total Environment*. 2015, 506-507, 234–240.
- [254] GENEST, S. C., SIMPSON, M. J., SIMPSON, A. J., SOONG, R., MCNALLY, D. J. Analysis of soil organic matter at the solid–water interface by nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Environmental Chemistry*. 2014, vol. 11, no. 4, 472–482.
- [255] DERCOVÁ, K., SEJÁKOVÁ, Z., SKOKANOVÁ, M., BARANČÍKOVÁ, G., MAKOVNÍKOVÁ, J. Bioremediation of soil contaminated with pentachlorophenol (PCP) using humic acids bound on zeolite. *Chemosphere*. 2007, vol. 66, no. 5, p. 783–790.
- [256] GONDAR, D., LOPEZ, R., FIOL, S., ANTELO, J. M., ARCE, F. Characterization and acid–base properties of fulvic and humic acids isolated from two horizons of an ombrotrophic peat bog. *Geoderma*. 2005, vol. 126, no. 3–4, p. 367–374.
- [257] KANG, S. a XING, B. Phenanthrene Sorption to Sequentially Extracted Soil Humic Acids and Humins. *Environmental Science*. 2005, vol. 39, no. 1, p. 134–140.
- [258] FUJITAKE, N. a KAWAHIGASHI, M. ¹³C NMR spectra and elemental composition of fractions with different particle sizes from an andosol humic acid. *Soil Science and Plant Nutrition*. 1999, vol. 45, no. 2, p. 359–366.
- [259] MAHIEU, N., RANDALL, E. W., POWLSON, D. S. Statistical Analysis of Published Carbon-13 CPMAS NMR Spectra of Soil Organic Matter. *Soil Science Society of America Journal*. 1999, vol. 63, issue 2, p. 307–319.
- [260] WATANABE, A. a FUJITAKE, N. Comparability of composition of carbon functional groups in humic acids between inverse-gated decoupling and cross polarization/magic angle spinning ¹³C nuclear magnetic resonance techniques. *Analytica Chimica Acta*. 2008, vol. 618, no. 1, p. 110–115.
- [261] DAVID, J., ŠMEJKALOVÁ, D., HUDECOVÁ, Š., ZMEŠKAL, O., VON WANDRUSZKA, R., GREGOR, T., KUČERÍK, J. The physico-chemical properties and biostimulative activities of humic substances regenerated from lignite. *SpringerPlus*. 2014, vol. 3, no. 1, p. 156–172.
- [262] ¹³C NMR Estimates of Carbon Distribution in IHSS Samples. PERDUE, M. *International Humic Substances Society: Natural Organic Matter Research* [online]. 1. Denver, Colorado, USA: IHSS, © 2015, 14.03.2015 [cit. 2015-11-14]. Available from: <http://www.humicsubstances.org/sources.html>

9 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

^{13}C NMR	^{13}C spektrometrie nukleární magnetické resonance
^{13}C NMR LS	liquid-state ^{13}C spektrometrie nukleární magnetické resonance
ADC	<i>Analog-to-Digital Converter</i>
Ara.	arabinóza
Arg.	arginin
Asp.	kyselina asparágová
ATR	zeslabená úplná reflektance (<i>Attenuated Total Reflection</i>)
BiA	parametr biologické účinnosti
BIX	autochtonní/biologický index
CFD	<i>Constant Function Discriminator</i>
CTAB	cetyltrimethylammonium bromid
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DOC	rozpuštěný organický uhlík (<i>Dissolved Organic Carbon</i>)
DOM	rozpuštěná organická hmota (<i>Dissolved Organic Matter</i>)
DRIFTS	difuzní reflektance
EA	elementární analýza
EEM	excitačně-emisní matice (spektra)
ESM	metoda exponenciální série (<i>Exponential Series Method</i>)
ET	<i>Electron-Transfer</i>
FI	fluorescenční index
FK	fulvinová kyselina
FSD	Fourierova autodekonvoluce (<i>Fourier Self-Deconvolution</i>)
FTIR	infračervená spektrometrie s Fourierovou transformací
Fuk.	fukóza
Gal.	galaktóza
Glu.	glutamin
Gluc.	glukóza
Gly.	glycin
His.	histidin
HIX	humifikační index
HK	huminová kyselina
HL	huminové látky

HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
HU	humín
IČ	infračervená oblast elektromagnetického záření
IFE	vnitřní filtrační efekt (<i>Inner Filter Effect</i>)
IHSS	mezinárodní společnost pro výzkum huminových látek
Ile.	isoleucin
IR	infračervená oblast elektromagnetického záření (<i>Infrared</i>)
IRF	<i>Instrument Response Function</i>
KM	Kubelka-Munk
LC	kapalinová chromatografie
Leu.	leucin
Man.	manóza
MEM	metoda maximální entropie (<i>Maximum Entropy Method</i>)
MP	mezi-systémový přechod
MS	hmotnostní spektrometrie
NOM	přírodní organická hmota (<i>Natural Organic Matter</i>)
OD	optická hustota (<i>Optical Density</i>)
OM	organická hmota (<i>Organic Matter</i>)
PAL	povrchově aktivní látka
PAU	polyaromatické uhlovodíky
PGA	<i>Programmable Gain Amplifier</i>
PVC	poly(vinyl) chlorid
Py/GC	pyrolyzní plynová chromatografie
Rha.	rhamnóza
Rib.	ribóza
RPM	počet otáček za minutu (<i>Revolutions Per Minute</i>)
SDS	dodecylsulfát
SEC	velikostně-vylučovací chromatografie (<i>Size-Exclusion Chro.</i>)
SOM	půdní organická hmota (<i>Soil Organic Matter</i>)
SS	<i>Steady-State</i>
TAC	<i>Time-to-Amplitude Convertor</i>
TCSPC	<i>Time-Correlated-Single-Photon-Counting</i>
TGA	termogravimetrická analýza

Thr.	threonin
TOC	celkový organický uhlík (<i>Total Organic Carbon</i>)
TRES	časově rozlišená emisní spektra
Tyr.	tyrosin
UV	ultrafialová oblast
UV/Vis	ultrafialová a viditelná oblast elektromagnetického záření
UVB	středněvlnná oblast ultrafialového záření
UVC	krátkovlnná oblast ultrafialového záření
VK	vnitřní konverze
VR	vibrační relaxace
WD	<i>Window Discriminator</i>
Xyl.	xylóza

10 SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ

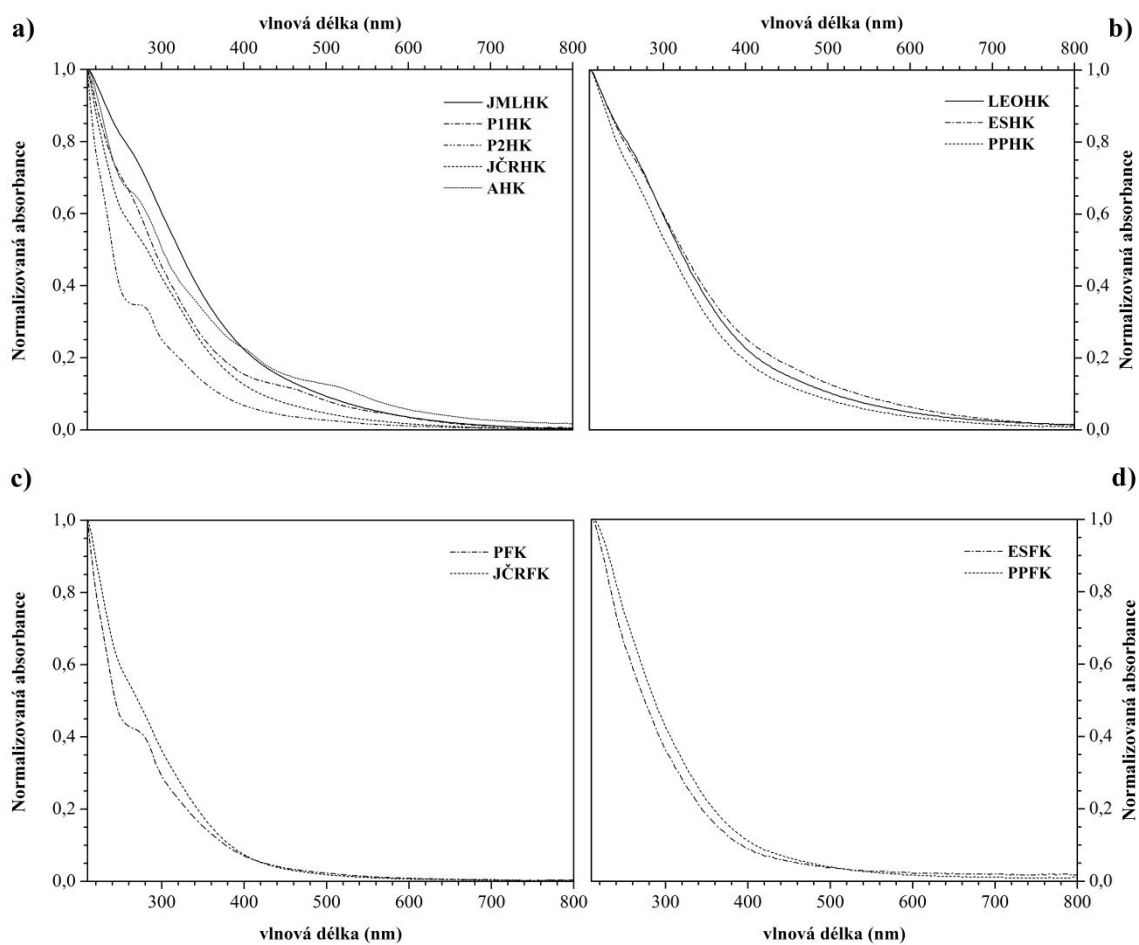
\overline{M}_w	střední molekulová hmotnost huminových látek	[Da]
$\sin^2\theta$	úhel dopadu IR záření na fázové rozhraní krystalu a vzorku	[°]
χ_R^2	hodnota redukované správnosti proložení	[a.u.]
[M]	koncentrace fluoroforu	[mol·dm ⁻³]
[M] ₀	celková koncentrace fluoroforů	[mol·dm ⁻³]
[MQ]	koncentrace nefluoreskujícího komplexu	[mol·dm ⁻³]
[Q]	koncentrace zhášedce (<i>quencheru</i>)	[mol·dm ⁻³]
A	fitovací parametr	[-]
A, B a Rp	rozdělení půdních huminových kyselin dle Kumady [85–86]	[-]
A, α'	fluorescenční pík odpovídající fluoroforům <i>fulvic-like</i>	[-]
A ₁	integrál v rozmezí vlnových délek emise 300–345 nm	[a.u.]
A ₂₈₀	specifická hodnota absorpance při vlnové délce 280 nm	[-]
A ₄	integrál v rozmezí vlnových délek emise 435–480 nm	[a.u.]
A ₄₄₀	<i>Milori index</i> (plošný integrál přes celé emisní spektrum)	[a.u.]
A _{em}	absorbance při emisní vlnové délce	[-]
A _{ex}	absorbance při excitační vlnové délce	[-]
atom. %	elementární složení v atomových procentech	[%]
B	před-exponenciální faktor	[-]
B, γ	fluorescenční pík odpovídající fluoroforům <i>tyrosin-like</i>	[-]
B ₁ , B ₂ , B ₃ a B ₄	relativní amplitudy příslušných dob života HL	[%]
C, α	fluorescenční pík odpovídající fluoroforům <i>humic-like</i>	[-]
Da	Dalton (<i>unifikovaná atomová hmotnostní jednotka</i>)	[u]
DOC	rozpuštěný organický uhlík	[mg·g _{HL} ⁻¹]
d _p	hloubka průniku záření do vzorku	[nm]
E ₂ /E ₃	poměr absorpací při vlnových délkách 250 a 365 nm	[-]
E ₂ /E ₄	poměr absorpací při vlnových délkách 265 a 465 nm	[-]
E ₂₅₄ /E ₄₁₀	poměr absorpací při vlnových délkách 254 a 410 nm	[-]
E ₄ /E ₆	poměr absorpací při vlnových délkách 465 a 665 nm	[-]
E _{ET} /E _{Bz}	poměr absorpací při vlnových délkách 253 a 220 nm	[-]
F, φ	fluorescenční pík odpovídající fluoroforům <i>fenylalanin-like</i>	[-]
F	intenzita fluorescence s přítomností zhášedce	[a.u.]
F ₀	intenzita fluorescence bez přítomnosti zhášedce	[a.u.]

f_a	část I_F , která je schopna podlehnout statickému zhášení	[%]
F_{corr}	korigovaná intenzita fluorescence	[a.u.]
F_{obs}	experimentálně získaná intenzita fluorescence	[a.u.]
H_{fi}	obsah hydrofilních atomů uhlíku ^{13}C	[%]
H_{fo}	obsah hydrofobních atomů uhlíku ^{13}C	[%]
$hm. \%$	koncentrace v hmotnostních procentech	[%]
$I(\lambda, t)$	intenzita fluorescence v určitém t a λ_{em}	[a.u.]
I_{0-106}	obsah alifatických a <i>O</i> -alkylových funkčních skupin	[%]
I_{0-165}	obsah všech atomů uhlíku vyjma $-\text{COOH}$ a $\text{C}=\text{O}$	[%]
I_{0-45}	obsah alifatických atomů uhlíku	[%]
$I_{106-165}$	obsah aromatických a fenolických atomů uhlíku	[%]
$I_{106-230}$	obsah aromatických, fenolických a karboxylových atomů ^{13}C	[%]
$I_{165-220}$	obsah karboxylových a karbonylových atomů uhlíku	[%]
I_{45-106}	obsah <i>O</i> -alkylových a peptidových atomů uhlíku	[%]
$I_F (max.)$	I_F v maximu emisního a excitačního píku HL	[CPS]
I_F	ustálená intenzita fluorescence	[a.u. resp. CPS]
$I_N(\lambda, t)$	normalizovaná intenzita fluorescence v určitém t a λ_{em}	[a.u.]
$I_{SS}(\lambda)$	ustálená intenzita fluorescence při dané λ_{em}	[a.u.]
I_{SS}	intenzita ustálené fluorescence	[a.u.]
K_a	konstanta stability komplexu $[\text{HL}-\text{Me}^{\text{X}+}]$	[a.u.]
K_S	konstanta stability	[-]
l	optická dráha vzorku (tloušťka kyvety)	[cm]
M, β	fluorescenční pík odpovídající fluoroforům <i>marine humic-like</i>	[-]
n	základní elektronový stav orbitalu s nevazebnými elektrony	[-]
n_k	index lomu ATR krystalu	[-]
n_v	index lomu vzorku	[-]
$obj. \%$	koncentrace v objemových procentech	[%]
S_0	plocha pod křivkou v čase $t = 0$	[-]
S_0	základní elektronový stav	[-]
S_{1-n}	excitovaný singletový elektronový stav	[-]
S_t	plocha pod křivkou v čase $t = t$	[-]
$SUVA_{254}$	specifická hodnota absorpance A_{254} nm	$[\text{g}_{\text{HL}} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{m}^{-1}]$
t	čas	[s]

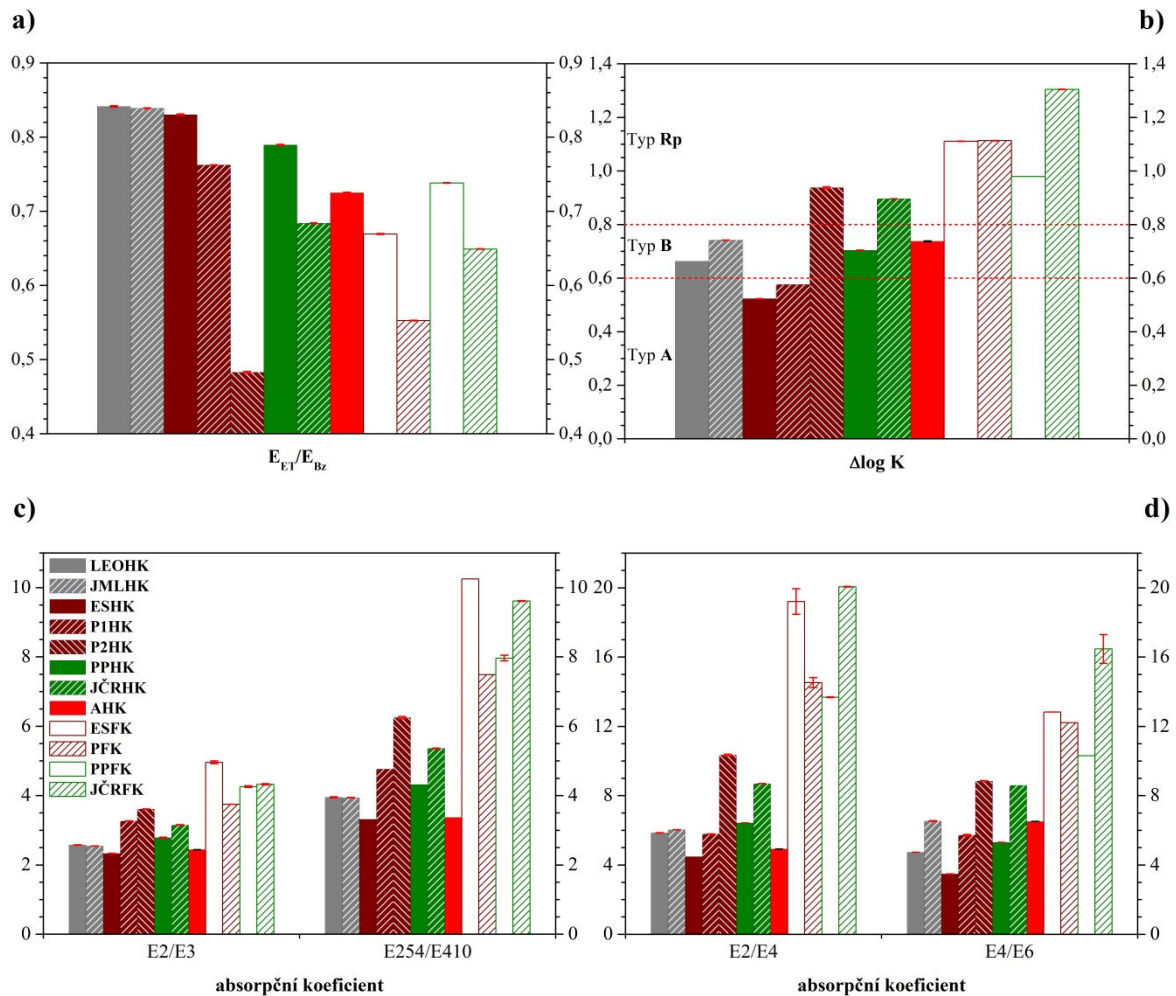
T	teplota	[K resp. °C]
T, δ	fluorescenční pík odpovídající fluoroforům <i>tryptofan-like</i>	[-]
T, τ	doba života excitovaného stavu	[ns]
T_{1-n}	excitovaný tripletový elektronový stav	[-]
t_c	čas centrifugace	[min.]
α, f_a	index aromaticity	[a.u.]
ΔF	rozdíl intenzit fluorescence F_0 a F	[a.u.]
$\Delta \log K$	rozdíl logaritmičeských hodnot absorbancí při 400 a 600 nm	[-]
θ_C	kritický úhel	[°]
λ	vlnová délka elektromagnetického záření	[nm]
$\lambda_{em (max.)}$	vlnová délka emisního maxima HL	[nm]
λ_{em}	vlnová délka emise	[nm]
$\lambda_{ex (max.)}$	vlnová délka excitačního maxima HL	[nm]
λ_{ex}	vlnová délka excitace	[nm]
π	základní elektronový stav orbitalu s dvojnými vazbami	[-]
π^*	excitovaný elektronový stav orbitalu s dvojnými vazbami	[-]
τ_1, τ_2, τ_3 a τ_4	doby života excitovaných stavů HL	[ns]

11 PŘÍLOHY

11.1 UV/Vis spektrometrie huminových látek

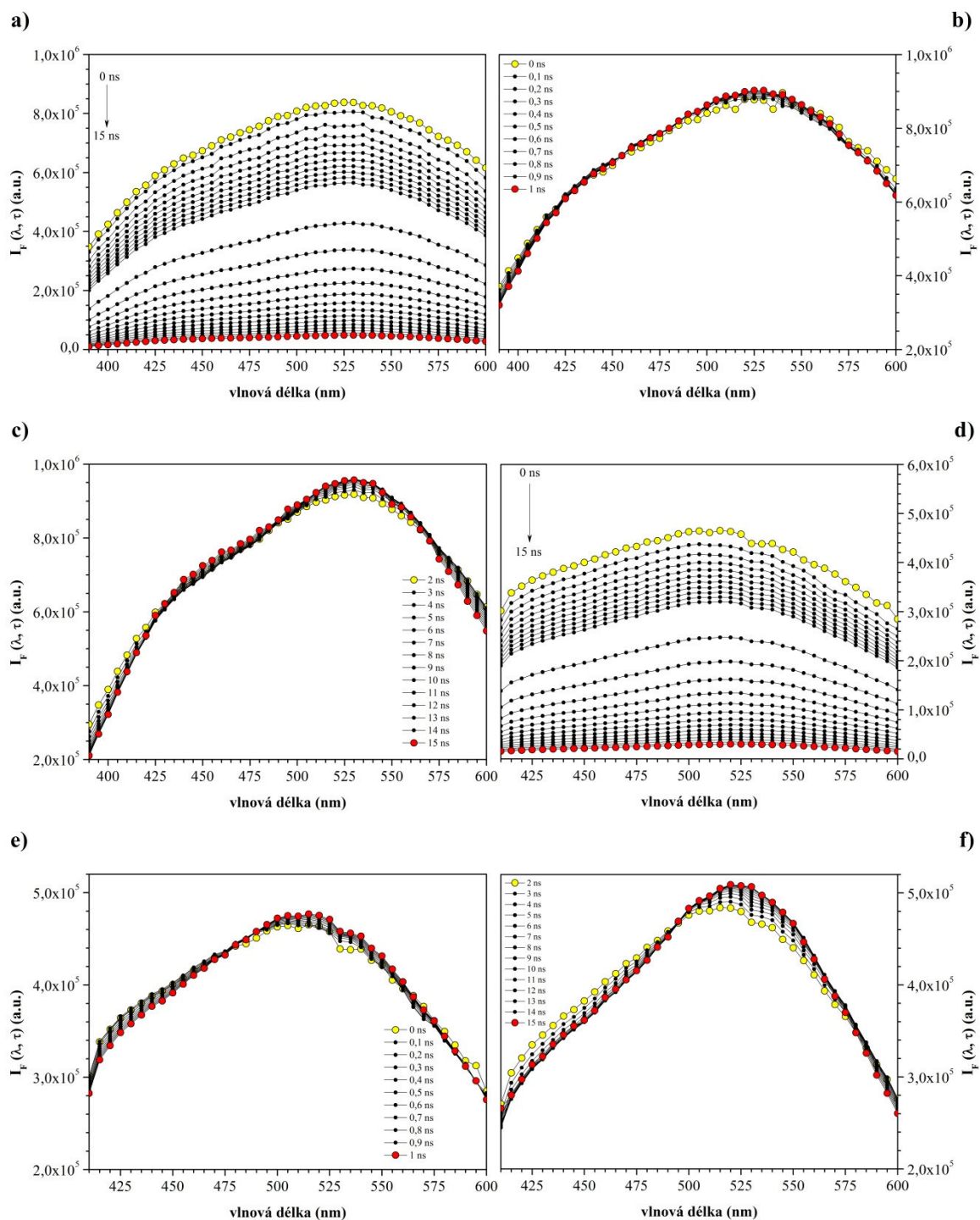


Obr. 1P: Normalizovaná UV/Vis spektra studovaných HL; **a)** HK izolované z terestriálních a nižších rostlinných (autotrofních) přírodních matric; **b)** standardy HK *Leonardite*, *Elliott Soil* a *Pahokee Peat*; **c)** FK izolované z lesní půdy *Humic Podzol* a jihočeské rašeliny; **d)** standardy FK *Elliott Soil* a *Pahokee Peat*

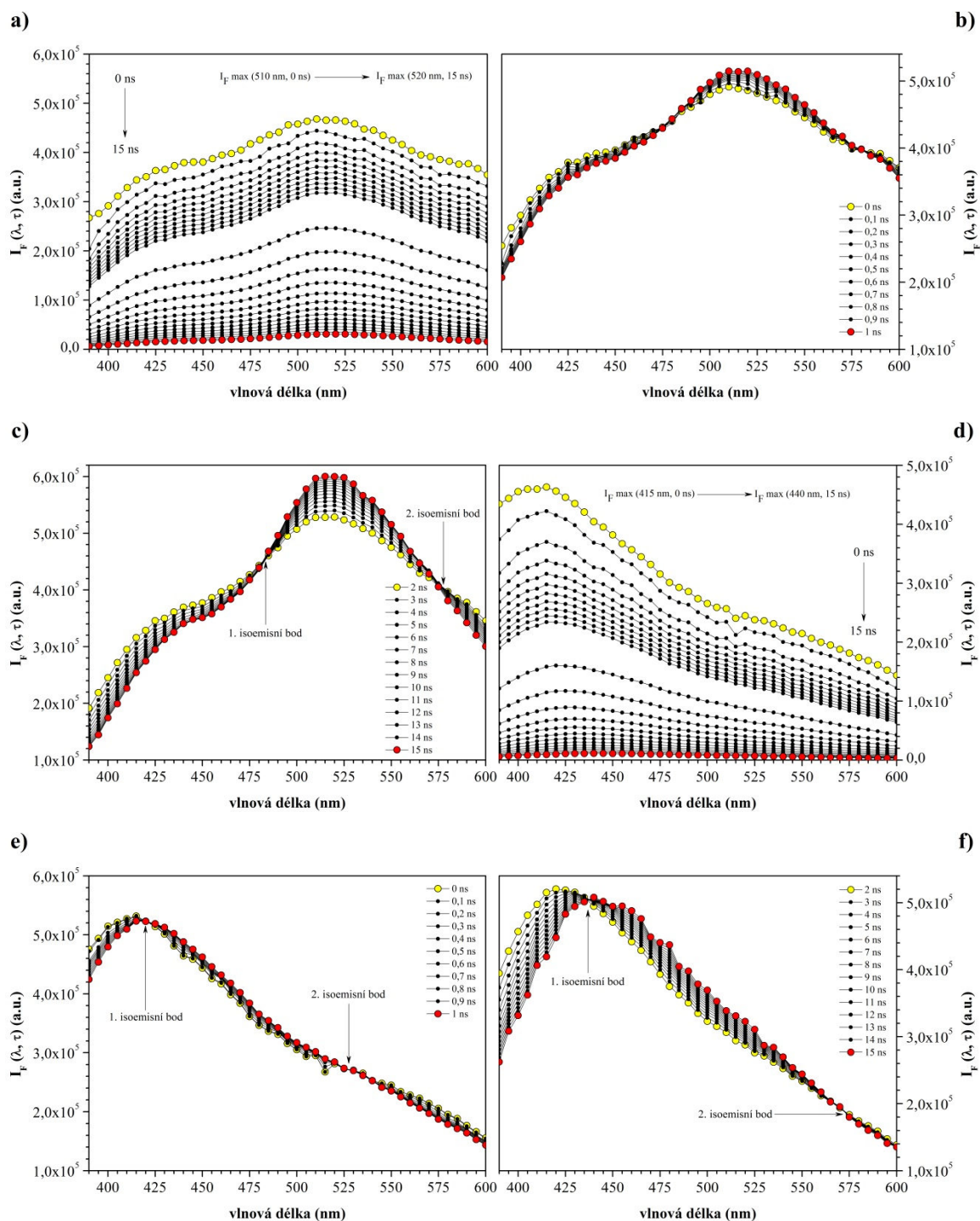


Obr. 2P: Grafické znázornění vypočtených hodnot absorpčních koeficientů studovaných HL; **a)** absorpční koeficient E_{ET}/E_{Bz} ; **b)** absorpční koeficient $\Delta \log K$; **c)** absorpční koeficienty E_2/E_3 a E_{254}/E_{410} ; **d)** absorpční koeficienty E_2/E_4 a E_4/E_6 (tzv. humifikační index); (*) pro všechny absorpční koeficienty je legenda vzorků HL uvedena v Obr. 2P (c)

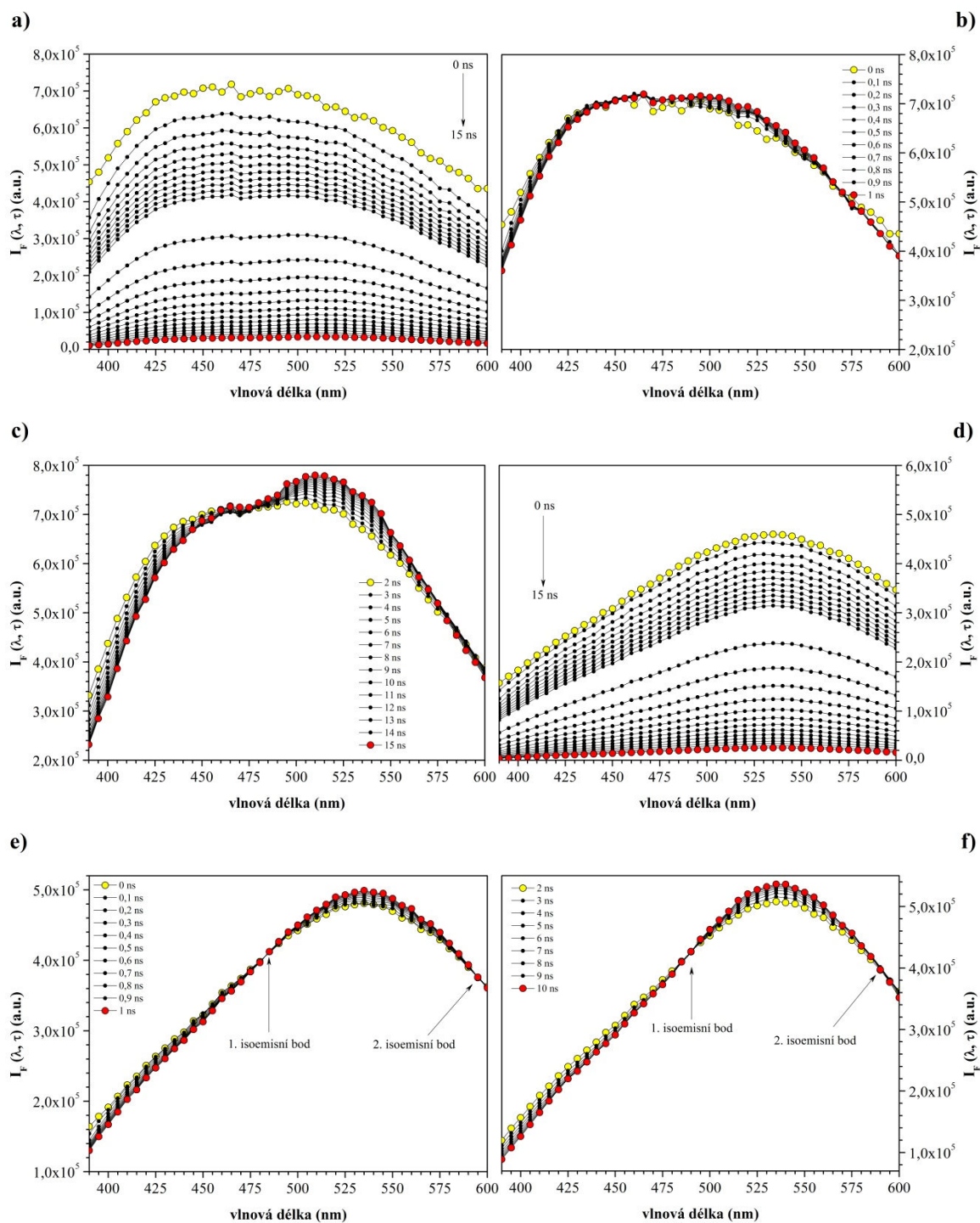
11.2 Časově rozlišená fluorescenční spektrometrie huminových látek



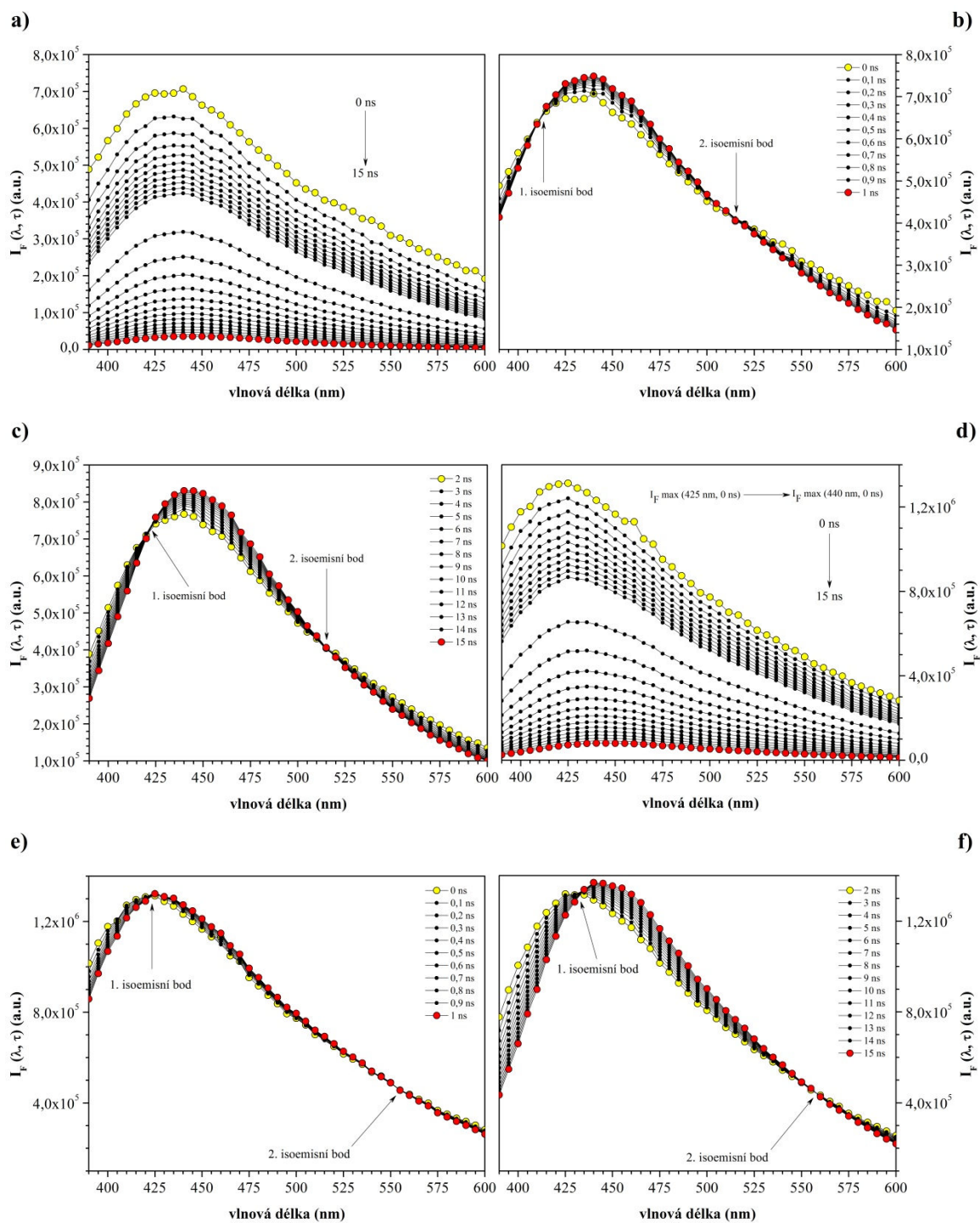
Obr. 3P: TRES a TRANES spektra uhelných HK; **a, d**) časově rozlišená emisní spektra (TRES) HK izolované z jihomoravského lignitu (**a**) a standardu HK *Leonardite* (**d**); **b, c, e, f**) časově rozlišená přes plochu normalizovaná emisní spektra (TRANES) HK izolované z jihomoravského lignitu (**b, c**) a standardu HK *Leonardite* (**e, f**) v pozorovacích časech 0–1 ns a 2–15 ns



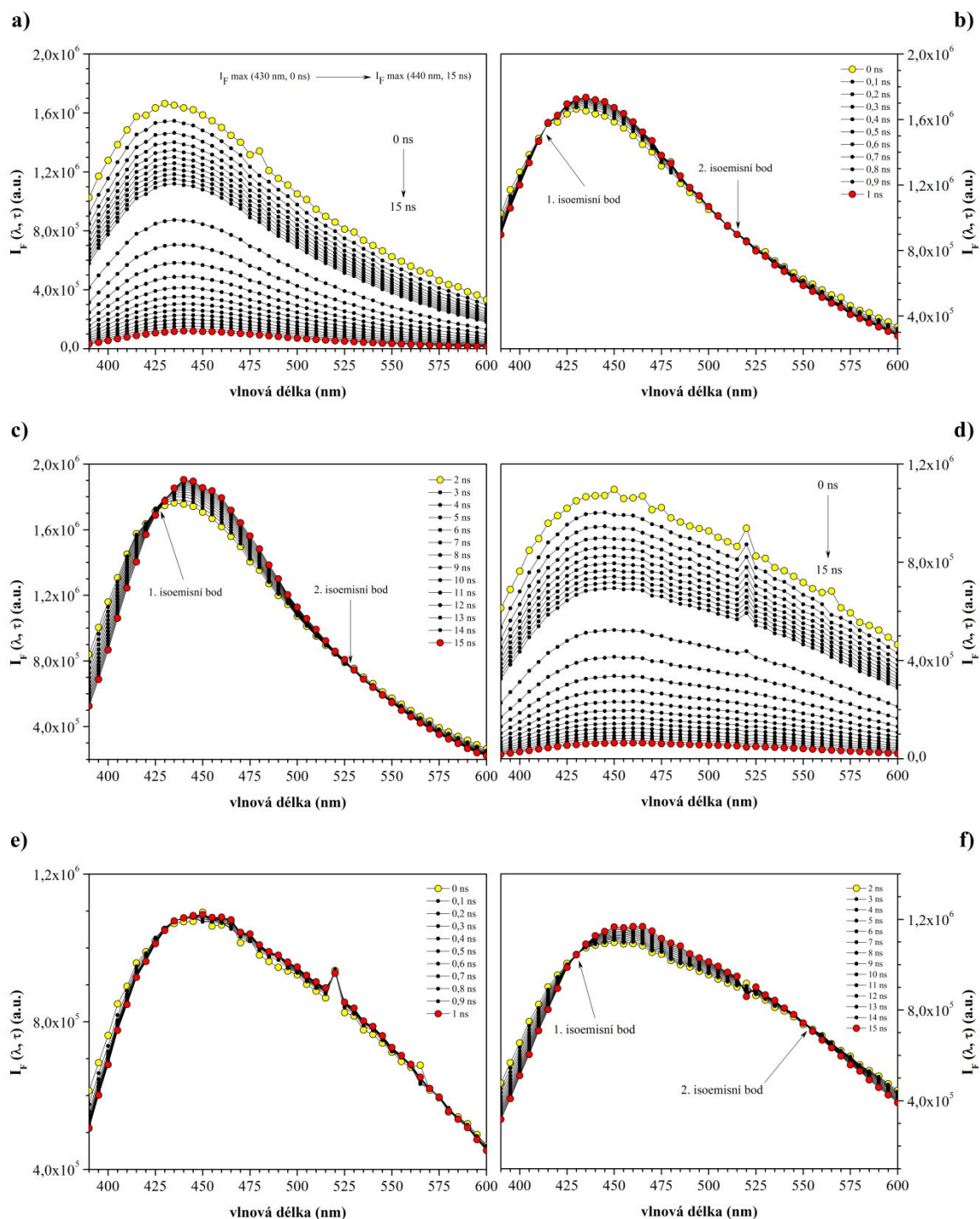
Obr. 4P: TRES a TRANES spektra půdních HK; **a, d**) časově rozlišená emisní spektra (TRES) HK izolovaných z lesní půdy *Humic Podzol* P1HK (**a**) a P2HK (**d**); **b, c, e, f**) časově rozlišená přes plochu normalizovaná emisní spektra (TRANES) HK izolovaných z lesní půdy *Humic Podzol* P1HK (**b, c**) a P2HK (**e, f**) v pozorovacích časech 0–1 ns a 2–15 ns



Obr. 5P: TRES a TRANES spektra rašeliništních HK; **a, d**) časově rozlišená emisní spektra (TRES) HK izolované z jihočeské rašeliny (**a**) a standardu HK *Pahoee Peat* (**d**); **b, c, e, f**) časově rozlišená přes plochu normalizovaná emisní spektra (TRANES) HK izolované z jihočeské rašeliny (**b, c**) a standardu HK *Pahoee Peat* (**e, f**) v pozorovacích časech 0–1 ns, 2–15 ns a 2–10 ns

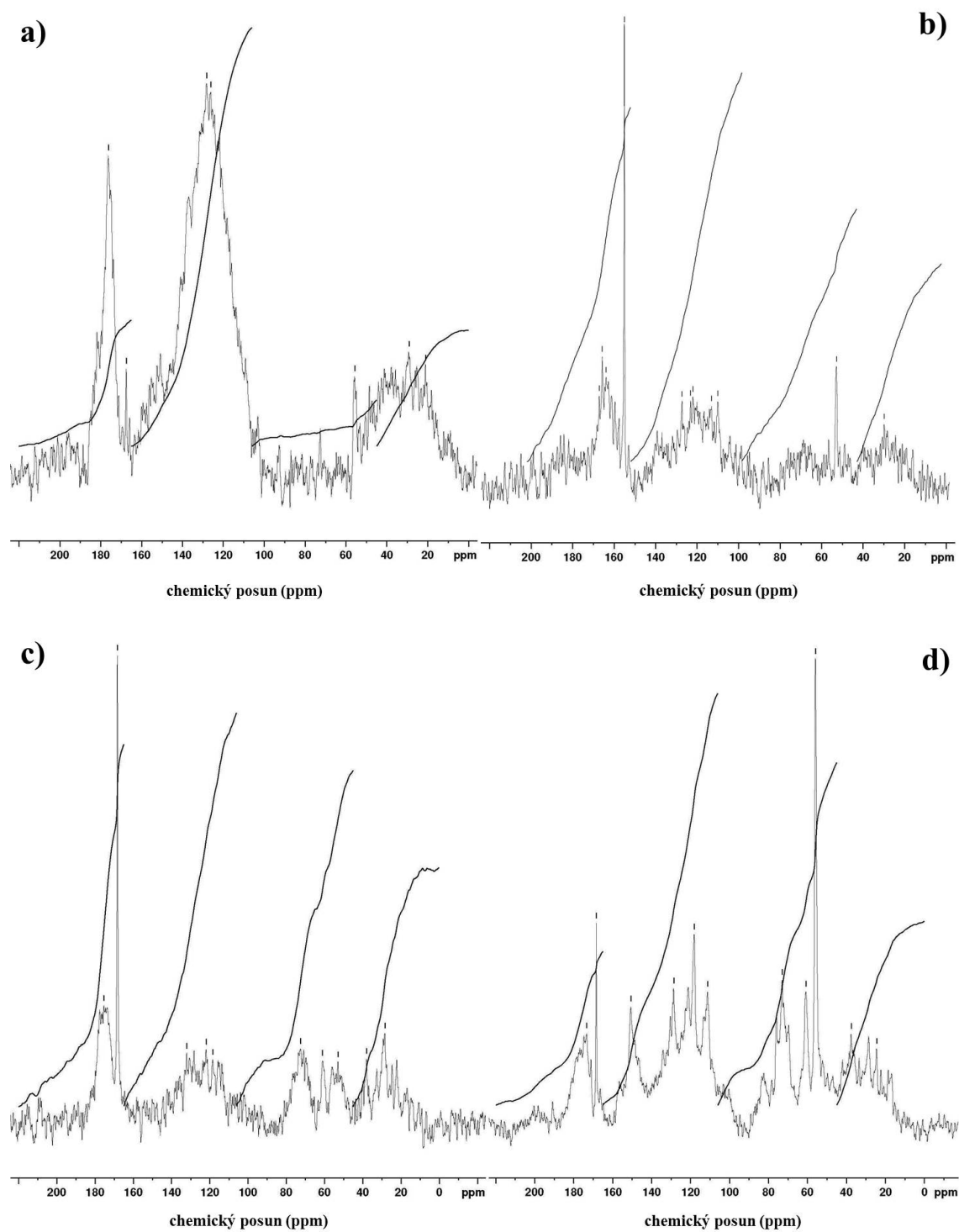


Obr. 6P: TRES a TRANES spektra půdních FK; **a, d**) časově rozlišená emisní spektra (TRES) FK izolované z lesní půdy *Humic Podzol* (**a**) a standardu FK *Elliott Soil* (**d**); **b, c, e, f**) časově rozlišená přes plochu normalizovaná emisní spektra (TRANES) FK izolované z lesní půdy *Humic Podzol* (**b, c**) a standardu FK *Elliott Soil* (**e, f**) v pozorovacích časech 0–1 ns a 2–15 ns

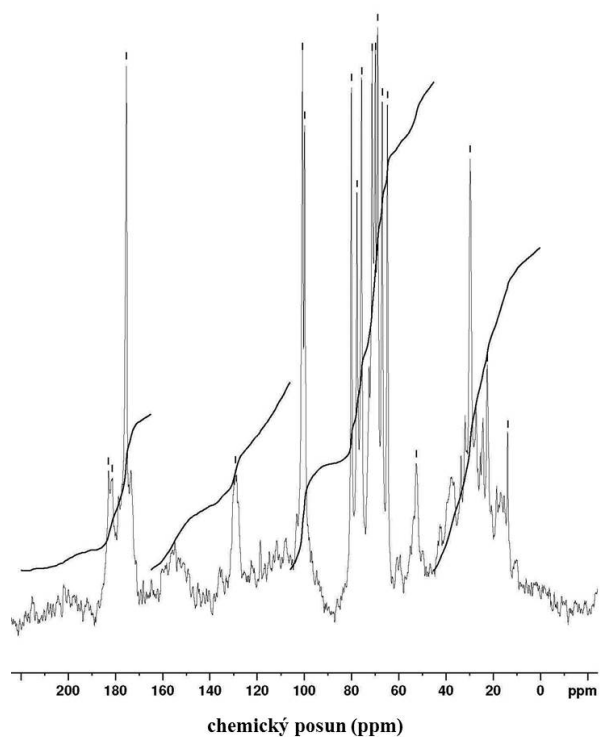


Obr. 7P: TRES a TRANES spektra rašeliništních FK; **a, d**) časově rozlišená emisní spektra (TRES) FK izolované z jihočeské rašeliny (**a**) a standardu FK *Pahokee Peat* (**d**); **b, c, e, f**) časově rozlišená přes plochu normalizovaná emisní spektra (TRANES) FK izolované z jihočeské rašeliny (**b, c**) a standardu FK *Pahokee Peat* (**e, f**) v pozorovacích časech 0–1 ns a 2–15 ns

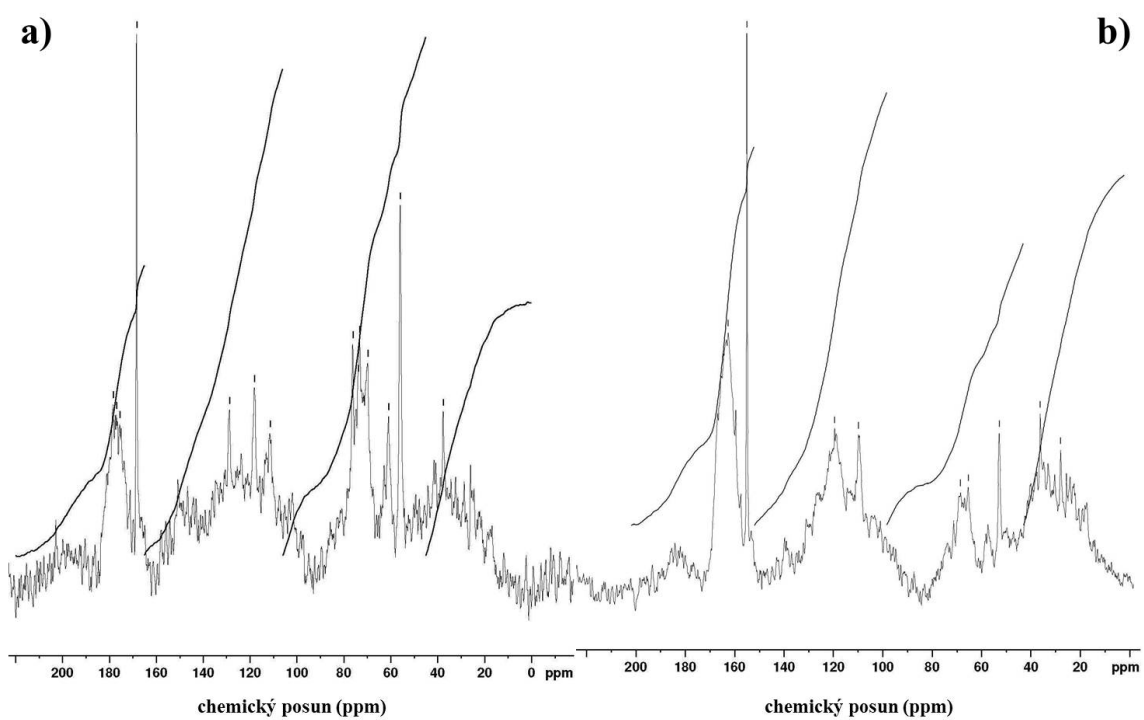
11.3 Liquid-state ^{13}C NMR spektrometrie huminových látek



Obr. 8P: ^{13}C NMR spektra terestriálních HK; **a)** HK izolovaná z jihomoravského lignitu; **b)** HK izolovaná z jihočeské rašeliny; **c, d)** HK izolované z lesní půdy *Humic Podzol*



Obr. 9P: ^{13}C NMR spektrum HK izolované z extraktu hnědé mořské řasy *Ascophyllum nodosum*



Obr. 10P: ^{13}C NMR spektra terestriálních FK; a) FK izolovaná z lesní půdy *Humic Podzol*; b) FK izolovaná z jihočeské rašeliny

12 VĚDECKÁ A PUBLIKAČNÍ ČINNOST AUTORA

12.1 Články v impaktovaném časopise

DOSKOČIL, L., GRASSET, L., ENEV, V., KALINA, L., PEKAŘ, M. Study of water - extractable fractions from South Moravian lignite. *ENVIRON EARTH SCI.* 2015, vol. 73, no. 7, p. 3873–3885. ISSN 1866-6280

ENEV, V., POSPÍŠILOVÁ, L., KLUČÁKOVÁ, M., LIPTAJ, T., DOSKOČIL, L. Spectral Characterization of Selected Natural Humic Substances. *Soil and Water Research.* 2014, vol. 9, no. 1, p. 9–17. ISSN 1801-5395

YADAV, R., HAVLICA, J., HNATKO, M., ŠAJGALÍK, P., CIGÁŇ, A., PALOU, M., BARTONÍČKOVÁ, E., BOHÁČ, M., FRAJKOROVÁ, F., MÁSILKO, J., ZMRZLÝ, M., KALINA, L., HAJDÚCHOVÁ, M., ENEV, V. Magnetic properties of $\text{Co}_{1-x}\text{Zn}_x\text{Fe}_2\text{O}_4$ spinel ferrite nanoparticles synthesized by starch-assisted sol-gel auto-combustion method and its ball milling. *J. Magnetism Magn. Mat.* 2014, vol. 378, p. 190–199. ISSN 0304-8853

YADAV, R., HAVLICA, J., KUŘITKA, I., KOŽÁKOVÁ, Z., BARTONÍČKOVÁ, E., MÁSILKO, J., KALINA, L., WASSERBAUER, J., HAJDÚCHOVÁ, M., ENEV, V. Structural and Magnetic Properties of $\text{CoFe}_{2-x}\text{Gd}_x\text{O}_4$ ($x = 0.0\text{--}0.1$) Spinel Ferrite Nanoparticles synthesized by Starch-Assisted Sol-Gel Auto-combustion Method. *Journal of Superconductivity and Novel Magnetism.* 2015, vol. 28, p. 1797–1806. ISSN 1557-1947

YADAV, R., HAVLICA, J., KUŘITKA, I., KOŽÁKOVÁ, Z., MÁSILKO, J., HAJDÚCHOVÁ, M., ENEV, V., WASSERBAUER, J. Effect of Pr^{3+} Substitution on Structural and Magnetic Properties of CoFe_2O_4 Spinel Ferrite Nanoparticles. *Journal of Superconductivity and Novel Magnetism.* 2014, vol. 28, p. 241–248. ISSN 1557-1947

YADAV, R., HAVLICA, J., KUŘITKA, I., KOŽÁKOVÁ, Z., PALOU, M., BARTONÍČKOVÁ, E., BOHÁČ, M., FRAJKOROVÁ, F., MÁSILKO, J., KALINA, L., HAJDÚCHOVÁ, M., ENEV, V., WASSERBAUER, J. Magnetic Properties of Dysprosium-Doped Cobalt Ferrite Nanoparticles Synthesized by Starch-Assisted Sol-Gel Auto-Combustion Method. *Journal of Superconductivity and Novel Magnetism.* 2015, vol. 28, p. 2097–2107. ISSN 1557-1947

YADAV, R., HAVLICA, J., KUŘITKA, I., KOŽÁKOVÁ, Z., PALOU, M., BARTONÍČKOVÁ, E., BOHÁČ, M., FRAJKOROVÁ, F., MÁSILKO, J., HAJDÚCHOVÁ, M., ENEV, V., WASSERBAUER, J. Magnetic Properties of ZnFe_2O_4 Nanoparticles Synthesized by Starch-Assisted Sol-Gel Auto-combustion Method. *Journal of Superconductivity and Novel Magnetism.* 2014, vol. 28, p. 1417–1423. ISSN 1557-1947

YADAV, R., HAVLICA, J., MÁSILKO, J., KALINA, L., HAJDÚCHOVÁ, M., ENEV, V., WASSERBAUER, J., KUŘITKA, I., KOŽÁKOVÁ, Z. Structural, Cation Distribution, and Magnetic Properties of CoFe_2O_4 Spinel Ferrite Nanoparticles Synthesized Using a Starch-Assisted Sol-Gel Auto-Combustion Method. *Journal of Superconductivity and Novel Magnetism.* 2015, vol. 28, p. 1851–1861. ISSN 1557-1947

YADAV, R., HAVLICA, J., PTÁČEK, P., KUŘITKA, I., KOŽÁKOVÁ, Z., PALOU, M., BARTONÍČKOVÁ, E., BOHÁČ, M., FRAJKOROVÁ, F., MÁSILKO, J., ZMRZLÝ, M., HAJDÚCHOVÁ, M., ENEV, V. Structural and Magnetic Properties of CoFe_2O_4 Nanoparticles Synthesized by Starch-Assisted Sol-Gel Auto-Combustion Method in Air, Argon, Nitrogen and Vacuum Atmospheres. *Journal of Superconductivity and Novel Magnetism.* 2014, vol. 28, p. 249–258. ISSN 1557-1947

12.2 Články v recenzovaném časopise

POSPÍŠILOVÁ, L.; DRÁPELOVÁ, I.; ENEV, V. Characterization of Compost and Soil Humic Substances by Fluorescence Spectroscopy. *Journal of Life Sciences*. 2014, vol. 8, no. 4, p. 364–372. ISSN 1934-7391

12.3 Konferenční příspěvky indexované v databázi Web of Science

TÜRKEOVÁ, I., ENEV, V., KLUČÁKOVÁ, M. Thermodynamic analysis of Cu(II) and Pb(II) ion binding to humic acids isolated from different origins and structural characterization using FTIR and ¹³C NMR spectroscopy. In *NANOCON 2015, proceedings of abstracts*. První. Ostrava, TANGER Ltd. 2015, p. 96–101. ISBN 978-80-87294-59-8

12.4 Příspěvky na mezinárodních konferencích

DOSKOČIL, L., ENEV, V., PEKAŘ, M. *Spectroscopic characterization of water-extractable fractions from lignite*. Organic Geochemistry I-II: Trends for the 21st Century. Costa Adeje, Tenerife - Spain, European Association of organic Geochemists. 2013, p. 249–250.

DOSKOČIL, L., SZEWIECZKOVÁ, J., ENEV, V., PEKAŘ, M. *The analytical centrifuge LUMiSizer as a useful tool for the characterization of nanoparticles*. *Frontiers in material and life sciences*. 2014, p. 113–113. ISBN 978-80-210-7159-9

DOSKOČIL, L., SZEWIECZKOVÁ, J., ENEV, V., WASSERBAUER, J. *Determination of Mean Diameters and Particle Size Distributions Using Analytical Centrifuge*. Brno. 2015, p. 67–67.

ENEV, V., KLUČÁKOVÁ, M. *Elementární a spektrometrická charakterizace půdních huminových kyselin izolovaných z odlišných půdních matric*. Časové změny půdních vlastností a jejich predikce. Brno, Mendelova univerzita v Brně. 2013, p. 36–36. ISBN 978-80-7375-796-0.

ENEV, V., KLUČÁKOVÁ, M. *Stationary and Time-Resolved Fluorescence Spectroscopy of Humic Acids*. Organic Geochemistry: Trends for the 21st Century. Costa Adeje, Tenerife, Spain, European Association of Organic Geochemists. 2013, p. 199–200.

ENEV, V., KLUČÁKOVÁ, M. *Study of lignite humic acids by modern spectroscopic methods*. Olomouc, *Chemické listy*. 2012, vol. 106, no. 6, p. 535–535. ISSN 0009-2770

ENEV, V., KLUČÁKOVÁ, M., DOSKOČIL, L. *Time-Resolved Fluorescence Spectra of Different Soil Humic Acids and Standard IHSS Elliott Soil*. Conference Proceedings, 6th International Conference November 5th–7th 2014, Hotel Voronez 1, Brno, Czech Republic, EU. AMOS repro Ltd., Čs. Legií 8, 702 00 Ostrava, Česká republika, EU, TANGER Ltd., Keltičkova 62, 710 00, Ostrava, Česká republika, EU. 2014, p. 168–169. ISBN 978-80-87294-55-0

ENEV, V., KLUČÁKOVÁ, M., SMILEK, J., DOSKOČIL, L. *Methylation of humic acids – the impact on the reactivity, chemical composition and properties of HAs studied by spectrometric techniques*. 15th European Student Colloid Conference – Book of abstract. Kraków, Poland, EU, European Colloid & Interface Society. 2015, p. 111–111.

ENEV, V., NOVÁK, F., KLUČÁKOVÁ, M. *Chemical and Spectroscopic Characterization of Humic Substances Isolated from South-Bohemian Peat*. Book of Abstracts: Natural Organic Matter: Structure-Dynamics Innovative Applications. Ioannina, Greece, Printing Office, University of Ioannina. 2014, p. 226–227.

ENEV, V., NOVÁK, F., KLUČÁKOVÁ, M. *Elemental analysis, FTIR and ¹³C NMR of humic substances isolated from forest soil*. CEITEC PHD RETREAT, Valtice 23-24 April 2015, Book of abstracts. Brno, Masaryk University. 2015, p. 40–40. ISBN 978-80-210-7825-3

ENEV, V., NOVÁK, F., KLUČÁKOVÁ, M., DOSKOČIL, L. *Physicochemical and Spectroscopic Characterization of Humic and Fulvic Acids Isolated from South-Bohemian Peat*. Book of Abstract: CEITEC Annual Conference "Frontiers in Material and Life Sciences". Masarykova univerzita, Brno, Česká republika, Masarykova univerzita. 2014, p. 121–121. ISBN 978-80-210-7159-9

ENEV, V., NOVÁK, F., TÜRKEOVÁ, I., KLUČÁKOVÁ, M. Humic substances from typical Czech forest soil Humic Podzol: Chemical and spectroscopic characterisation. In *Proceedings of the 14th International Conference on Environmental Science And Technology, CEST2015, Proceedings of the International Conference on Environmental Science and Technology*. First. Rhodos, Greece, Global Network for Environmental Science and Technology (Global-NEST), University of the Aegean. 2015, p. 1–5. ISBN 978-960-7475-52-7. ISSN 1106-5516.

ENEV, V., TÜRKEOVÁ, I., SZEWIECZKOVÁ, J., DOSKOČIL, L., KLUČÁKOVÁ, M. *Fluorescence analysis of Cu(II), Pb(II) and Hg(II) ion binding to humic and fulvic acids*. Chemistry & Life 2015, Brno University of Technology, Faculty of Chemistry, September 2–4, 2015, Book of Abstracts. Brno, Czech Republic, Brno University of Technology, Faculty of Chemistry, Purkyňova 464/118, CZ-61200, Brno. 2015, p. 61–62. ISBN 978-80-214-5228-2

KALINA, M., KLUČÁKOVÁ, M., ENEV, V. *Influence of Different Sources of Humic Acids, Applied Pre-treatment and Modifications on Their Behaviour in Aqueous Solutions*. Natural Organic Matter: Structure-Dynamics Inovative Application. Ioannina, Greece. 2014, p. 275–276.

KLUČÁKOVÁ, M., ENEV, V., POSPÍŠILOVÁ, L. *Effect of Compost Application on Properties of Soil Humic Acids*. *Chemické listy*. Brno, Czech Chemical Society. 2011, vol. 105, no. 18, p. 897–897. ISSN 0009-2770

MONDEK, J., DOSKOČIL, L., SZEWIECZKOVÁ, J., ENEV, V., WASSERBAUER, J. *Using the analytical centrifuge to characterize of magnetic particles*. CEITEC PHD RETREAT. 2015, p. 105–105. ISBN 978-80-210-7825-3

SZEWIECZKOVÁ, J., DOSKOČIL, L., ENEV, V., WASSERBAUER, J., PEKAŘ, M. *Comparison of Particle Size Distributions Measured Using Different Techniques*. Brno. 2015, p. 165–165.

TÜRKEOVÁ, I., ENEV, V., KLUČÁKOVÁ, M., KROUSKÁ, J., LAŠTŮVKOVÁ, M. *Thermodynamics of Metal Ion Interaction with Humic Acids*. Chemistry and life 2015. Brno, Czech republic, Brno University of Technology, Faculty of Chemistry. 2015, p. 60–61. ISBN 978-80-214-5228-2

TÜRKEOVÁ, I., KLUČÁKOVÁ, M., ENEV, V. *Isothermal titration calorimetry measurement for metal/humic acid interactions*. Mainz, Německo, IACIS 2015 . 2015, p. 87–87

12.5 Příspěvky na tuzemských a studentských konferencích

DOSKOČIL, L., ENEV, V., PEKAŘ, M. Effect of Bitumen on Sorption Properties of Lignite. In *XIV. Pracovní setkání fyzikálních chemiků a elektrochemiků, sborník příspěvků*. Brno, Masarykova univerzita. 2014, p. 28–31. ISBN 978-80-210-6842-1

ENEV, V., KLUČÁKOVÁ, M. Effects of industrial compost on chemical and spectroscopic properties of soil humic substances from Luvi-Haplic Chernozem. In *Studentská konference Chemie je život - Sborník abstraktů*. Brno, Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Purkyňova 464/118, 612 00 Brno. 2012, p. 276–281. ISBN 978-80-214-4425-6

ENEV, V., KLUČÁKOVÁ, M., DOSKOČIL, L. Study of structure and chemical composition of different soil humic acids. In *Studentská konference Chemie je život*. Purkyňova 464/118, 612 00 Brno, Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Purkyňova 464/118, 612 00 Brno. 2013, p. 243–248. ISBN 978-80-214-4822-3

ENEV, V., KLUČÁKOVÁ, M., NOVÁK, F. Spectroscopic and Structural Analysis of Humic Substances Isolated from Forest Soil Humic Podzol-Locality Krkonoše, Czech Republic. In *Studentská odborná konference: Chemie je život 2014, Sborník příspěvků*. Brno, Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Purkyňova 464/118, 612 00 Brno. 2014, p. 216–222. ISBN 978-80-214-5077-6

ENEV, V., KLUČÁKOVÁ, M., NOVÁK, F. Study of structure and chemical composition of soil humic substances isolated from Humic Podzol. In *Sborník příspěvků – XIV. Pracovní setkání fyzikálních chemiků a elektrochemiků*. Brno, Masarykova univerzita, Brno. 2014, p. 23–27. ISBN 978-80-210-6842-1

ENEV, V.; KLUČÁKOVÁ, M. Study of chemical composition and structure of different humic acids. In *XIII. pracovní setkání fyzikálních chemiků a elektrochemiků*. Brno, Mendelova univerzita v Brně. 2013, p. 163–164. ISBN 978-80-7375-757-1

SMILEK, J., SEDLÁČEK, P., KLUČÁKOVÁ, M., KALINA, M., ENEV, V. Methylation of humic acids - the impact on the reactivity studied by diffusion techniques. In *XIV. pracovní setkání fyzikálních chemiků a elektrochemiků - Sborník příspěvků*. Brno, Masarykova univerzita. 2014, p. 137–141. ISBN 978-80-210-6842-1

12.6 Souhrnné výzkumné zprávy

SEDLÁČEK, P., ENEV, V., KOLAJOVÁ, R., KLUČÁKOVÁ, M., KALINA, M. *Strukturní analýza produktů chemické oxidace lignosulfonanu*. 2014, p. 1–19.

SEDLÁČEK, P., ENEV, V., KOLAJOVÁ, R., KLUČÁKOVÁ, M., KALINA, M. *Výzkum a vývoj nových aplikačních produktů na bázi Lignohumátu - závěrečná zpráva etapy 2*. 2014, p. 1–19.

SEDLÁČEK, P., ENEV, V., OBRUČA, S., KLUČÁKOVÁ, M. *Výzkum využitelnosti vody BQ-2 (Bzenec) pro léčivé účely*. 2015, p. 1–19.

Příloha č. 2 – odborný článek v impaktovaném časopise *Soil and Water Research*

ENEV, V., POSPÍŠILOVÁ, L., KLUČÁKOVÁ, M., LIPTAJ, T., DOSKOČIL, L. Spectral Characterization of Selected Humic Substances. *Soil and Water Research*. 2014, vol. 9, no. 1, p. 9–17. ISSN: 1805–9384

Spectral Characterization of Selected Humic Substances

VOJTĚCH ENEV¹, LUBICA POSPÍŠILOVÁ², MARTINA KLUČÁKOVÁ¹,
TIBOR LIPTAJ³ and LEOŠ DOSKOČIL¹

¹Materials Research Centre, Faculty of Chemistry, Brno University of Technology, Brno, Czech Republic; ²Department of Agrochemistry, Soil Science, Microbiology and Plant Nutrition, Faculty of Agronomy, Mendel University in Brno, Brno, Czech Republic;

³Department of NMR Spectroscopy and Mass Spectroscopy, Faculty of Chemical and Food Technology, Slovak University of Technology, Bratislava, Slovak Republic

Abstract

ENEV V., POSPÍŠILOVÁ L., KLUČÁKOVÁ M., LIPTAJ T., DOSKOČIL L. (2014): **Spectral characterization of selected humic substances**. *Soil & Water Res.*, **9**: 9–17.

Current concern for soil quality has stimulated research on soil organic matter (OM). Humic substances (HS) of different origin were compared applying ultraviolet-visible spectroscopy, Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR), “steady-state” fluorescence spectroscopy, and ¹³C nuclear magnetic resonance (¹³C NMR). Sodium humates samples were isolated from soil (Gleyic Luvisol), compost, and South-Moravian lignite from the mine Mír in Mikulčice. Sodium humates (SH) were extracted by a conventional procedure recommended by the International Humic Substances Society (IHSS). Results showed that the presence of O-containing functional groups (carbonyl in aldehydes and ketones, carboxyl in carboxylic acids, ester and ether groups) are in the order of compost > soil > lignohumate > lignite. Further, results of FTIR, fluorescence spectroscopy, and ¹³C NMR suggested that samples of sodium humates isolated from soil, compost, and lignite were a more polycondensed, oxidized, unsaturated, humified, and aromatic structure. On the other hand, commercial lignohumate (LH) had very simple structural components and wide molecular heterogeneity. Furthermore, a small molecular size and weight, low degree of aromatic polycondensation, low level of conjugated chromophores and fluorophores, and low humification degree were characteristic for commercial LH. It should be noted that the sample of commercial LH was characterized by ¹³C NMR analysis with a slightly higher value of aromaticity α in comparison with the sample of compost. The application of non-destructive analytical methods such as UV-VIS, FTIR, ¹³C NMR, and fluorescence spectroscopy help us to provide main characteristics of selected humic substances.

Keywords: ¹³C NMR spectroscopy; Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR); humates; lignohumate; steady-state fluorescence spectroscopy; UV-VIS

Humic substances (HS) are present in many natural materials, such as soil, water, peat, compost, and brown and brown-black coal. They are intimately associated with soil fertility and quality, dynamics of nutrients, pollutants and contaminants, and the global carbon sequestration in soil. They have high complexation potential and are precursors of many carcinogenic compounds, causing their elimination or immobilization in the environment (PLAZA *et al.* 2006). Transformation processes of anthropogenic chemicals are not still clearly understood because

of wide heterogeneity, spatial arrangement, and chemical composition of soil HS. Humic acids (HAs), the main component of HS, are regarded as highly functionalized carbon-rich biopolymers, micellar or supramolecular substances, and nanotube membrane substances (HEDGES 1988; WERSHAW 1999; PICOLLO 2002; SUTTON & SPOSITO 2005; ARISTILDE & SPOSITO 2013). According to the biopolymer concept of HEDGES (1988) plant residues are subjected to condensation and bio-polymerization reactions producing the HS. WERSHAW (1999) and SUTTON and

SPOSITO (2005) pay attention to the great amount of small broken decomposed fragments of plant residues which aggregate in solution to form micelles. TAN (2013) distinguished several types of carbon nanotubes, nanofibres, nanotube micelles, and membranes. His scanning electron microscopic investigations are explaining the principles of nanochemistry. He also showed that plant biopolymers are de-polymerized in the process and a lot of nanoparticles are capable of self-assembling and another part in a presence of peptides and other amphiphilic form nanofibres. Nano-size materials are hydrated and have large surface areas, and appear to control soil chemical properties, dissolved inorganic and organic species, moisture retention, pesticide retention, and availability for nutrients (THENG & YUAN 2008; TAN 2013). Observation made by MONREAL *et al.* (2010) indicated that HS consist of the carbonaceous network of single strains linking cluster of humic material and minerals. They are in assemblies of peptide amphiphiles, carbohydrates, *N*-heterocyclics, and alkyl-aromatics. Clay fraction contains mostly phenols, lignin, lipids, and fatty acids. Their stability depends strongly on their origin and age. The main functional groups in HAs molecule are carboxylic, phenolic, and alcoholic as well as some other minor groups such as hydroxy, methoxy, and thiol, etc.

NOVÁK *et al.* (2001) and MADRONOVÁ (2011) gave characterization of alkali humates and HAs isolated from raw materials of the Czech Republic (coal, oxyhumolite, lignite, and peat), which are frequently used in agriculture for soil improvement and remediation. Coal-derived HAs could differ significantly in the mineral components (aluminosilicate) content, water content, and amount of functional groups. Data also showed differences in stability, reactivity, and affinity to water. A higher content of phenolic groups was observed in lignite and peat to compare with coal-derived HA.

The present work focused mainly on the structural characteristics and functional groups content in soil humates. Comparison on the basis of their chemical and optical properties is given between soil humates and humates isolated from the other natural sources. The application of non-destructive analytical spectroscopy methods helps us to provide synergetic data explaining main characteristics of selected terrestrial HS.

MATERIAL AND METHODS

The objects of our study were three different samples of sodium humate (SH) and one sample of commercial lignohumate (LH). Humates were isolated

from brown soil (from Ap horizon) of Gleyic Luvisol type (locality Lesonice, Czech Republic), compost from ZERA s.r.o., and South-Moravian lignite from the mine Mír in Mikulčice, Czech Republic by a conventional procedure recommended by the International Humic Substances Society (IHSS) (SCHNITZER 1982; NOBILI *et al.* 1990). All sodium humates (SH) were prepared from humic acids samples by titration to pH = 7.

UV-VIS spectra were measured by Hitachi U-3900 (Hitachi, Tokyo, Japan) in the wavelength range of 200–900 nm. Absorption coefficients (E_2/E_3 , E_4/E_6 , and $\Delta\log K$) of humates and lignohumate were calculated from the absorbances of SH and LH in UV-VIS spectral range (CHEN *et al.* 1977; KUMADA 1987; PEURAVUORI & PIHLAJA 1997).

FTIR spectra of SH and LH were recorded over the range of 4000–400 cm^{-1} on pellets. FTIR spectrophotometer operating with a peak resolution of 4 cm^{-1} , and 128 scans were performed on each acquisition (MACCARTHY & RICE 1985).

Fluorescence spectra were recorded in aqueous solutions (Mili-Q water) of 60 mg/l SH and LH after overnight equilibration at room temperature, using Aminco Bowman Series 2 (AB2) luminescence spectrophotometer (Thermo Spectronic, Rochester, USA). Basic (one-dimensional) emission spectra were recorded over the range of 380–600 nm at a constant excitation wavelength of 360 nm. Excitation spectra were recorded over the range of 300–480 nm at a fixed emission wavelength of 520 nm. Synchronous-scan excitation spectra were measured by simultaneously scanning both the excitation and the emission wavelength (from 200 to 600 nm), while maintaining a constant, optimized wavelength difference $\Delta\lambda = \lambda_{\text{em}} - \lambda_{\text{ex}} = 20$ nm, and for LH $\Delta\lambda = 60$ (SENESI *et al.* 1996; PLAZA *et al.* 2006; PEDRA *et al.* 2008). The Total Luminescence (TL) spectra were obtained in the form of excitation/emission matrix (EEM) by scanning the wavelength emission over the range of 300–600 nm, also the excitation wavelength was in 5 nm steps from 300 to 600 nm (ALBERTS & TAKÁCS 2004; PALAZZO *et al.* 2008; FERNÁNDEZ *et al.* 2009).

Inner filter effect correction method. Inner filter effects need to be corrected since they deplete the fluorescence signal affecting the desired linear relationship between concentration of fluorophore and fluorescence intensity (LARSSON *et al.* 2007; GOLETZ *et al.* 2011).

The fluorescence intensity (I_f) values (in arbitrary units – a.u.) of samples were corrected using the method of LAKOWICZ (2006). The correction method of Lakowicz uses:

$$F_{\text{corr}} = F_{\text{obs}} \times 10^{\left[\frac{(A_{\text{em}} + A_{\text{ex}})}{2} \right]} \quad (1)$$

where:

$F_{\text{corr}}, F_{\text{obs}}$ – corrected and uncorrected fluorescence intensities

$A_{\text{ex}}, A_{\text{em}}$ – absorbance values at the current excitation and emission wavelengths

The path of the exciting light is assumed to be equal to the path of the emitted light. Primary inner filter effects are corrected as well as secondary inner filter effects.

^{13}C NMR spectroscopy was performed by Varian INOVA 600 (Varian, Inc., Palo Alto, USA). For experiments 100 mg of isolated HS samples were dissolved in 2.5 ml of 0.5 mol/l NaOH in deuterated water. After 24 h of intensive stirring 0.5 ml of HS sample was put in 5 mm NMR cell. All ^{13}C NMR experiments were run at 23°C on a Varian Unity-INOVA 600 MHz spectrometer using basic one-pulse experiment with the following set of the acquisition parameters: spectrometer frequency 242.803 MHz, relaxation delay 1 s, acquisition time 1.6 s, excitation pulse flip angle 45°, spectral width 50 000 Hz, and a continuous broadband decoupling of the protons. Prior Fourier transformation accumulated data were fitted with exponential function (line broadening 10 Hz). Subdivision of the spectrum was made by the commonly used scheme of MALCOLM (1990). The degree of aromaticity of HS (α) was calculated by the procedure of HATCHER *et al.* (1981). Aggregability of HS was assessed according to BEYER *et al.* 1993.

RESULTS AND DISCUSSION

UV-VIS spectroscopy. The values of the different indexes calculated from the UV-VIS spectra (E_2/E_3 , E_4/E_6 , and $\Delta\log K$) of SH and LH samples and elemental composition are presented in Table 1. All these absorption indexes give information about aromaticity of humic substances. E_2/E_3 is the ratio of absorbance at 250 nm to at 365 nm and often used as

an indicator for humification and molecular weight of humic substances (PEURAVUORI & PIHLAJA 1997; DUARTE *et al.* 2003; UYGUNER & BEKBOLET 2005; LI *et al.* 2009). The lower values of E_2/E_3 ratio of SH, which were isolated from brown soil, compost, and lignite may be indicative of the presence of structures with higher molecular weight, aromaticity, and humification degree. Calculated value of E_2/E_3 ratio was higher for LH, which shows on “light brown” HA with lower molecular mass and humification degree. E_4/E_6 is the ratio of absorbance at 465 nm to at 665 nm (CHEN *et al.* 1977). The value of the E_4/E_6 ratio, the so called index of humification, correlates also with the average molecular weight and size and with the oxygen content of humic materials. The low value of humification index for SH isolated from lignite confirmed the presence of HS with higher molecular weight and humification degree. The higher values of E_4/E_6 ratio of SH (isolated from brown soil and compost) and LH may be indicative of the presence of O-containing functional groups (hydroxyl, carbonyl, carboxyl, and ester groups). Optical parameter ($\Delta\log K$) recommended by Kumada, which includes the absorbance coefficient E for 1% HS solution at 600 nm ($E_6^{1\%}$) and at 400 nm ($E_4^{1\%}$) and $\Delta\log K = (\log E_4^{1\%} - \log E_6^{1\%})$ are adopted in this work (KUMADA 1987; BARANČÍKOVÁ *et al.* 1997). The $\Delta\log K$ of samples shows that the degree of humification decreases significantly in the order: SH_lignite > LH > SH_compost > SH_brown soil. Sodium humate isolated from lignite appears to be characterized by high condensation of the aromatic structure and low in aliphatic chain content. All absorption indexes of SH and LH are in good agreement with results of FTIR, ^{13}C NMR, and fluorescence spectroscopy.

FTIR spectroscopy. The FTIR spectra of SH isolated from the brown soil, compost, and lignite and commercial LH are shown in Figure 1. The main absorption bands and corresponding assignments are summarized in Table 2. All spectra feature common and distinctive absorption bands, with some differences in their relative intensity. The main characteristics

Table 1. Elemental composition (weight %) and absorption coefficients (E_2/E_3 , E_4/E_6 , and $\Delta\log K$) of sodium humates (SH) and commercial lignohumate (LH)

Samples	C	H	N	Ash	E_2/E_3	E_4/E_6	$\Delta\log K$
Brown soil	44.57 ± 0.06	5.39 ± 0.04	4.28 ± 0.01	4.6 ± 0.1	2.80 ± 0.02	6.75 ± 0.39	0.94 ± 0.02
Compost	44.71 ± 0.04	4.16 ± 0.07	5.09 ± 0.02	10.31 ± 0.1	2.33 ± 0.02	6.46 ± 0.07	0.85 ± 0
Lignite	55.22	4.75	1.25	22.6	2.32 ± 0.03	4.03 ± 0.39	0.67 ± 0.03
Lignohumate	30.82 ± 0.04	3.08 ± 0.16	0.15 ± 0.01	39.15 ± 0.13	3.38 ± 0.02	5.05 ± 0.11	0.82 ± 0.02

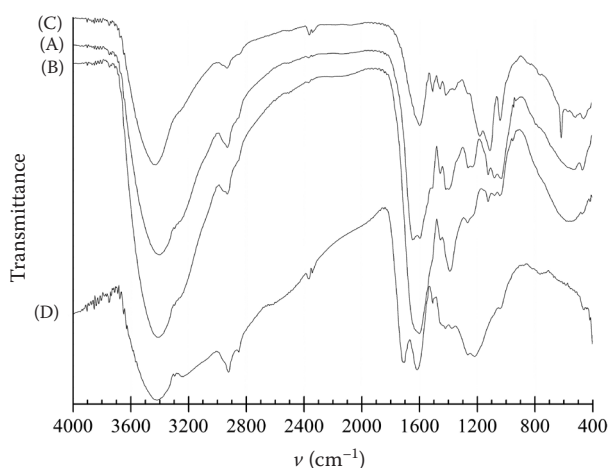


Figure 1. Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) spectra of sodium humates (SH) and commercial lignohumate (LH): (A) SH – brown soil, (B) SH – compost, (C) commercial lignohumate, (D) SH – lignite

of these spectra are the following: about 3400 cm^{-1} (OH stretching and, secondarily, N–H stretching of various functional groups); about $2935\text{--}2925$ and 2850 cm^{-1} (asymmetric and symmetric C–H stretching or of CH_2 groups); about 1716 cm^{-1} (C=O stretching of COOH and other carbonyl groups), whose relative intensity was determined only for SH from lignite; about $1640\text{--}1600\text{ cm}^{-1}$ (aromatic C=C skeletal vibrations, C=O stretching of quinone and amide groups (amide I band), C=O of H-bonded con-

jugated ketones; about $1512\text{--}1508\text{ cm}^{-1}$ (preferentially ascribed to N–H deformation and C=N stretching of amides (amide II band)); about $1458\text{--}1454\text{ cm}^{-1}$ (C–H bending of CH_3 groups); about $1419\text{--}1416\text{ cm}^{-1}$ (O–H deformation and C–O stretching of phenolic OH); about $1388\text{--}1376\text{ cm}^{-1}$ (C–H deformation of CH_2 and CH_3 groups, and/or antisymmetric stretching of COO^- groups); about $1269\text{--}1261\text{ cm}^{-1}$ (C=O stretching of aryl esters); about 1219 cm^{-1} (C–O stretching of aryl ethers and phenols), whose relative intensity was only for SH from lignite; about 1126 cm^{-1} (C–O stretching of secondary alcohols and/or ethers); and, finally, about $1045\text{--}1041\text{ cm}^{-1}$ (C–O stretching of polysaccharides or polysaccharide-like substances, and/or Si–O of silicate impurities) (STEVENSON 1994; SENESI *et al.* 2003).

The additional band at 1184 cm^{-1} (C–O–C stretching skeletal vibration) might suggest the existence of cellulose residues in the sample of LH (ERTANI *et al.* 2011). Further, the band appearing at $660\text{--}620\text{ cm}^{-1}$ is assigned to the sulfonic groups (S–O stretching vibration) formed from the reaction of sodium sulfite with the secondary OH of the aliphatic side chain of lignins. In FTIR spectrum of SH from brown soil band at 1032 cm^{-1} was localized which suggests the presence of hardwood lignin residues (RODRÍGUEZ-LUCENA *et al.* 2009).

Fluorescence spectroscopy. Fluorescence spectroscopy has been used as a technique for classifying and

Table 2. Major Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) absorption bands and assignments for sodium humates (SH) and commercial lignohumate (LH)

Wavenumber (cm^{-1})	Assignment
3400–3300	O–H stretching, N–H stretching (minor), hydrogen-bonded OH
2935–2925, 2850	asymmetric and symmetric C–H stretching of CH_2 group
1725–1710	C=O stretching of COOH
1640–1600	aromatic C=C skeletal vibrations, C=O stretching of amide groups (amide I band), C=O of quinone and/or H-bonded conjugated ketones
1512–1506	N–H deformation and C=N stretching (amide II band), aromatic C=C stretching
1460–1450	C–H asymmetric bending of CH_3 groups
1420–1415	O–H deformation and C–O stretching of phenolic OH
1380	C–H bending of CH_2 and CH_3 groups, COO^- anti-symmetric stretching
1270–1260	C–O stretching of aryl esters
1220	C–O stretching of aryl ethers and phenols
1184	C–O–C stretching (skeletal vibration) of cellulose residues
1130–1110	C–O stretching of secondary alcohols and/or ethers
1045–1035	C–O stretching of polysaccharides or polysaccharides-like substances and/or Si–O of silicate impurities
660–620	S–O stretching vibration sulfonic groups

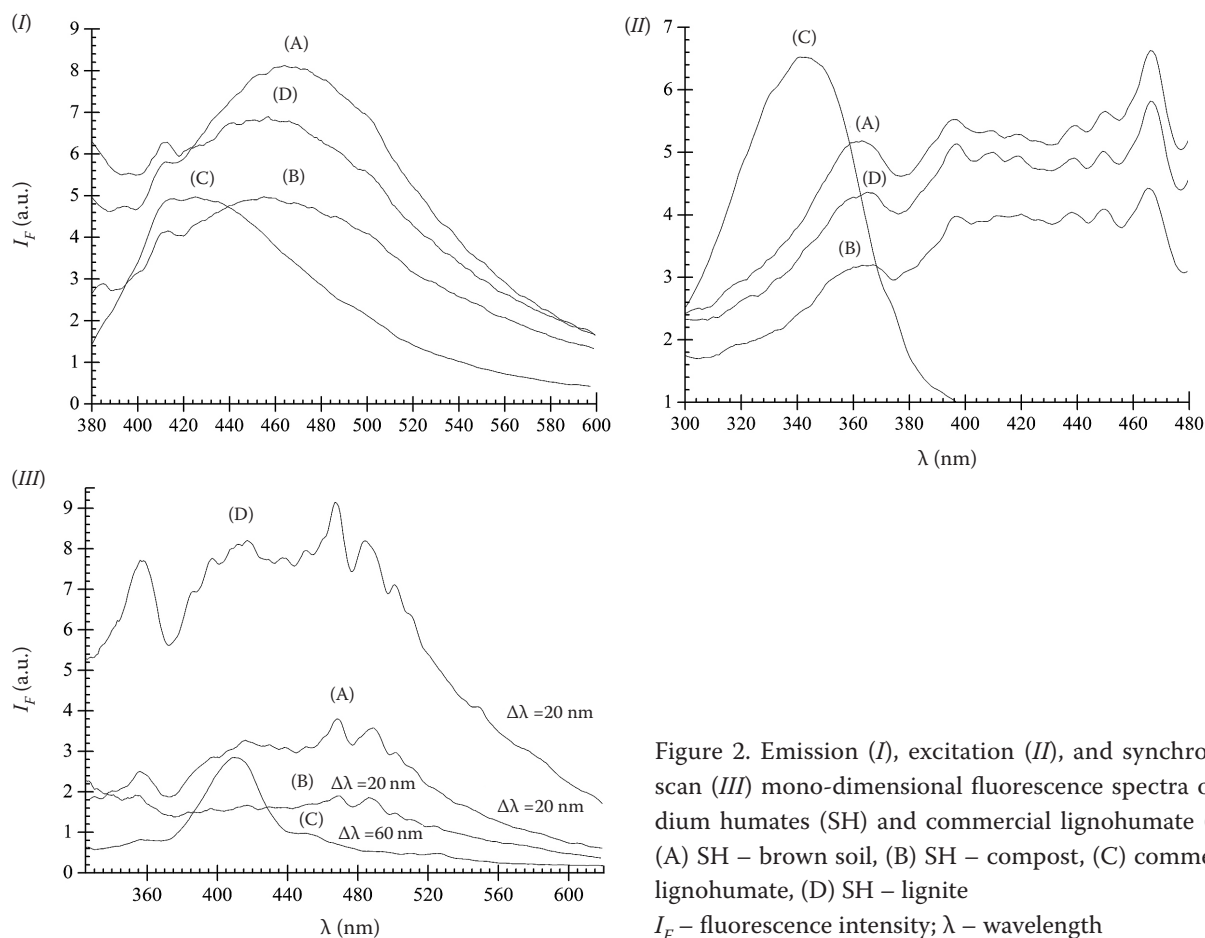


Figure 2. Emission (I), excitation (II), and synchronous scan (III) mono-dimensional fluorescence spectra of sodium humates (SH) and commercial lignohumate (LH): (A) SH – brown soil, (B) SH – compost, (C) commercial lignohumate, (D) SH – lignite
 I_F – fluorescence intensity; λ – wavelength

distinguishing between humic substances of different origins and natures (CHEN *et al.* 2002). The fluorescence emission spectra of SH and LH are shown in Figure 2. The values of the fluorescence intensity (in arbitrary units – a.u.) and fluorescence maxima are presented in Table 3. The long wavelength for the fluorescence peaks of SH indicate the presence of condensed aromatic ring and other unsaturated bond systems, a high degree of conjugation, and electron-withdrawing groups such as carbonyl and carboxyl groups. The short wavelength of the main fluorescence peak of the sample LH suggest the presence of simple structural components of wide molecular heterogeneity and small molecular size, low degree of aromatic polycondensation, low level of conjugated fluorophores, and low humification degree (SENESI 1990; PEDRA *et al.* 2008).

The fluorescence excitation spectra of SH and LH are shown in Figure 2. The excitation spectra of SH were characterized by two major peaks at 466–467 and 449–450 nm and two less intense peaks at 395–397 and 360–366 nm. The excitation spectrum of LH featured one intense peak at 341 nm.

The synchronous spectra of SH and LH are shown in Figure 2. The synchronous scan spectra of SH were

characterized by two prominent peaks at 467–469 and 487–488 nm and two less intense peaks at 418–419 and 501–502 nm. The LH spectrum exhibited sharp peak at a shorter wavelength around 410 nm and one minor fluorescence maximum at 451 nm. The spectra of SH showed higher intensity and longer wavelength maxima than the LH spectrum, suggesting that SH contains higher amounts of conjugated aromatic π -electron systems with electron-withdrawing functional groups, which are responsible for the fluorescence shift to lower energy levels

Table 3. Emission fluorescence maxima and fluorescence intensity of sodium humates (SH) and commercial lignohumate (LH)

Samples	Main fluorescence maximum (peak)	
	λ_{em} (nm)	I_F (a.u.)
Brown soil	461	8.23
Compost	457	5.11
Lignite	457	6.99
Lignohumate	424	5.07

I_F – fluorescence intensity (arbitrary units); λ_{em} – emission wavelength

or longer wavelengths. Synchronous fluorescence can provide better sensitivity and improved peak resolution compared to the conventional emission fluorescence technique, and possibly allows differentiation of the fluorescence spectra of samples of different origins (SENESI *et al.* 1996; CHEN *et al.* 2002, 2003; FERNÁNDEZ *et al.* 2009).

The fluorescence EEM spectra of SH and LH are shown as a contour map in Figure 3. The values of the fluorescence intensity and excitation-emission wavelength pair of the main peaks in the EEM spectra of SH and LH are presented in Table 4. The long wavelength and large fluorescence intensity of the major peak of SH may be ascribed to the presence of an extended, linearly-condensed aromatic ring network, and other unsaturated bond systems capable of a great degree of conjugation in large molecular size and extensively humified “macromolecules”. On the contrary, the prevalence of fluorescence bands and peaks with high relative intensity at short wavelengths, such as those measured for the peak of LH, is associated with the presence of simple structural components of wide molecular heterogeneity and small molecular weight, small degree of aromatic condensation,

small level of conjugated fluorophores, and small humification degree (MOBED *et al.* 1996; CHEN *et al.* 2003; PEDRA *et al.* 2008; FERNÁNDEZ *et al.* 2009). The main molecular components that contribute to fluorescence in this range of excitation/emission wavelength may be chromone derivatives (excitation/emission wavelength pair 320–346/409–490 nm) and flavones and isoflavones (excitation/emission wavelength pair 313–365/415–475 nm) (SENESI *et al.* 1991; PEDRA *et al.* 2008).

¹³C NMR spectroscopy. Carbon type relative abundance was calculated from signal intensity in given region and results showed that it was connected with samples origin. The values of the carbon distribution and aromaticity degree (α) are presented in Table 5. ¹³C NMR analysis showed that SH from compost contained the lowest amount of aromatic carbon (106–157 ppm) and had the lowest aromaticity degree ($\alpha = 36.6\%$). Soil humates (locality Lesonice) had higher aromaticity degree ($\alpha = 38.8\%$), more aromatic compounds, middle oxidation ability, and high aggregability (BEYER *et al.* 1993). Also higher content of sp^3 carbon (C–O and C–H) at 87–43 ppm and olefinic groups at 106–143 ppm is evident. PRESTON (1991,

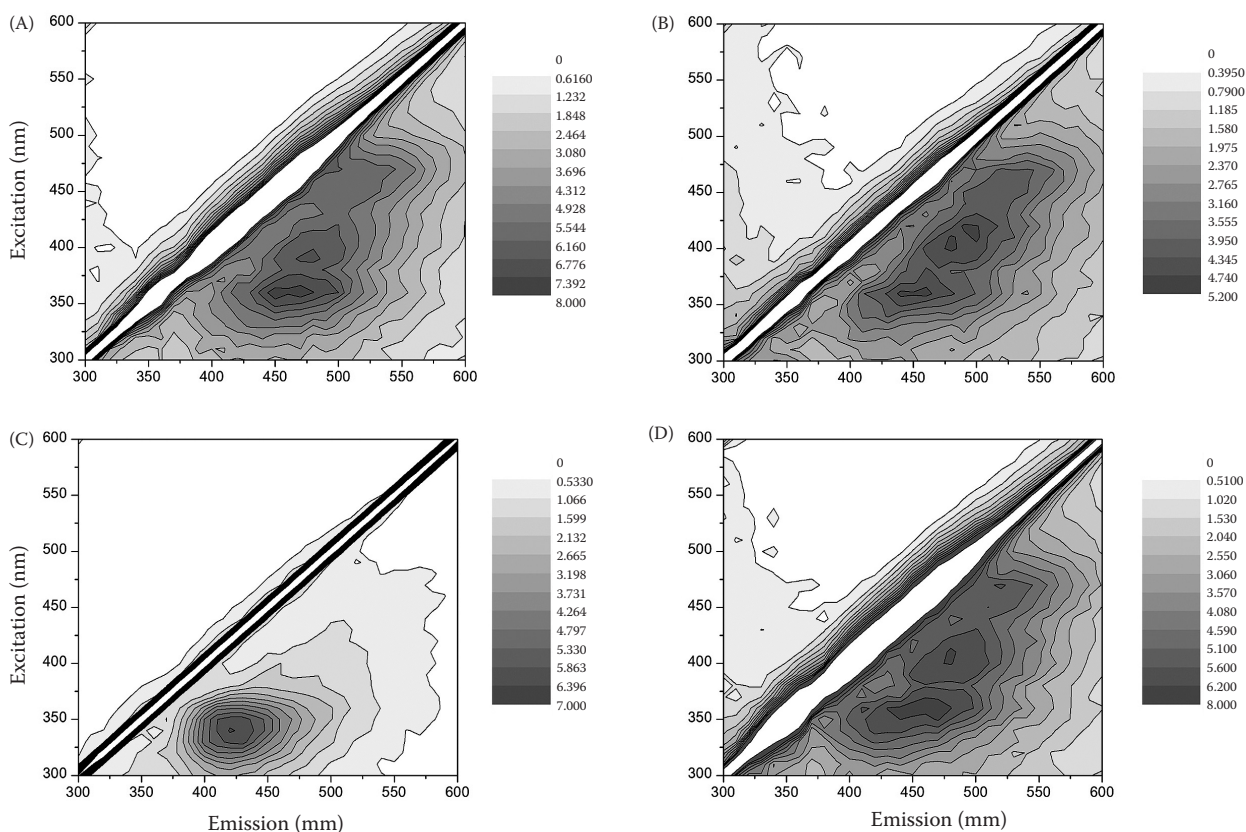


Figure 3. Fluorescence EEM spectra of sodium humates (SH) and commercial lignohumate (LH) isolated from brown soil (A), compost (B), commercial lignohumate (C), lignite (D)

Table 4. Excitation/Emission Wavelength Pair (EEWP) and fluorescence intensity (I_F , arbitrary units) of the main peaks in the excitation/emission matrix (EEM) spectra of sodium humates (SH) and commercial lignohumate (LH)

Samples	1 st maximum (peak)		2 nd maximum (peak)		3 rd maximum (peak)	
	EEWP (nm)	I_F (a.u.)	EEWP (nm)	I_F (a.u.)	EEWP (nm)	I_F (a.u.)
Brown soil	360/450	7.86	390/480	6.99		
Compost	360/460	4.94	410/500	4.88		
Lignite	360/453	6.95	410/480	6.37	465/520	5.98
Lignohumate	340/421	6.69				

Table 5. Aromaticity degree (α) and carbon distribution (^{13}C NMR spectroscopy) of sodium humates (SH) and commercial lignohumate (LH)

Samples	$sp^3\text{C}$	$C_{\text{alif.}}$	$C_{\text{arom.}}$	α (%)
Brown soil	38.0	47.0	33.0	38.8
Compost	37.0	44.9	30.0	36.6
Lignite	36.0	48.0	39.0	46.4
Lignohumate	40.4	44.0	34.2	40.0

1996) identified at 15–43 ppm presence of long alkyl groups ($-\text{CH}_2-$). LH had the lowest content of long alkyl groups. The last was also confirmed by FTIR spectroscopy. Aromatic carbon content at 43–106 ppm was in LH similar to soil humates, but lower than in lignite–SH. From this reason high aromaticity degree ($\alpha = 40.0\%$) in LH was determined. Lignite–SH contained the highest amount of aromatic and olefinic carbon. Content of aliphatic carbon was lower and aromaticity degree was high ($\alpha = 46.4\%$). Similar results were published by LAWSON and STEWART (1989), HIGHASI *et al.* (1998), and BARANČÍKOVÁ *et al.* (2003). They confirmed that lignite–SH contained more aromatic C=C and C=O groups.

CONCLUSION

Structural and functional properties of three samples of SH (isolated from brown soil, compost, and lignite) and LH were systematically characterized by a range of spectroscopic techniques. Results suggest that the presence of O-containing functional groups (carbonyl in aldehydes and ketones, carboxyl, ester, and ether groups) are in the order of compost–SH > brown soil–SH > lignohumate > lignite–SH. Further, results of the fluorescence and ^{13}C NMR suggest that samples of SH isolated from brown soil, compost, and lignite are a more poly-condensed, oxidized, unsaturated, humified, and aromatic structure. On the contrary, the sample of LH was characterized by

the presence of simple structural components of wide molecular heterogeneity and small molecular size and weight, low degree of aromatic poly-condensation, low level of conjugated chromophores and fluorophores, and low humification degree.

Acknowledgements. Supported by the Brno University of Technology, Faculty of Chemistry, Centre for Materials Research, Project No. CZ.1.05/2.1.00/01.0012 from ERDF, and by the Ministry of Agriculture of the Czech Republic, Projects No. QH81200 and QJ1210263.

References

- ALBERTS J.J., TAKÁCS M. (2004): Total luminescence spectra of IHSS standard and reference fulvic acids, humic acids and natural organic matter: comparison of aquatic and terrestrial source terms. *Organic Geochemistry*, **35**: 243–256.
- ARISTILDE L., SPOSITO G. (2013): Complexes of the antimicrobial ciprofloxacin with soil, peat, and aquatic humic substances. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **32**: 1467–1478.
- BARANČÍKOVÁ G., SENESI N., BRUNETTI G. (1997): Chemical and spectroscopic characterization of humic acids isolated from different Slovak soil. *Geoderma*, **78**: 251–266.
- BARANČÍKOVÁ G., KLUČÁKOVÁ M., MADARAS M., MAKOVNÍKOVÁ J., PEKAŘ M. (2003): Chemical structure of humic acids isolated from various soil types and lignite. *Humic Substances in the Environment*, **3**: 3–8.

- BEYER L., SCHULTEN H.R., FRUND R., IRMLER U. (1993): Formation and properties of organic matter in forest soils, as revealed by its biological activity, wet chemical analysis, CP-MAS ^{13}C NMR spectroscopy and pyrolysis – field ionization mass spectrometry. *Soil Biology and Biochemistry*, **25**: 587–596.
- CHEN J., GU B., LEBOEUF E.J., PAN H., DAI S. (2002): Spectroscopic characterization of the structural and functional properties of natural organic matter fractions. *Chemosphere*, **48**: 59–68.
- CHEN J., LEBOEUF E.J., DAI S., GU B. (2003): Fluorescence spectroscopic studies of natural organic matter fractions. *Chemosphere*, **50**: 639–647.
- CHEN Y., SENESI N., SCHNITZER M. (1977): Information provided on humic substances by E_4/E_6 ratios. *Soil Science Society of American Journal*, **41**: 352–358.
- DUARTE R.M.B.O., SANTOS E.B.H., DUARTE A.C. (2003): Spectroscopic characteristics of ultrafiltration fractions of fulvic and humic acids isolated from an eucalyptus bleached Kraft pulp mill effluent. *Water Research*, **37**: 4073–4080.
- ERTANI A., FRANCIOSO O., TUGNOLI V., RIGHI V., NARDI S. (2011): Effect of commercial lignosulfonate-humate on *Zea mays* L. metabolism. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **59**: 11940–11948.
- FERNÁNDEZ J.M., SENESI N., PLAZA C., BRUNETTI G., POLO A. (2009): Effects of composted and thermally dried sewage sludges on soil and soil humic acids properties. *Pedosphere*, **19**: 281–291.
- GOLETZ C., WAGNER M., GRÜBEL A., SCHMIDT W., KORF N., WERNER P. (2011): Standardization of fluorescence excitation-emission-matrices in aquatic milieu. *Talanta*, **85**: 650–656.
- HATCHER P.G., SCHNITZER M., DENNIS L.W., MACIEL E.M. (1981): Aromaticity of humic substances in soils. *Soil Science Society of America Journal*, **45**: 1089–1094.
- HEDGES J.I. (1988): Polymerization of humic substances in natural environments. In: FRIMMEL F.H., CHAPMAN R.F. (eds): *Humic Substances and their Role in the Environment*. S. Bernhard, Dahlem Konferenzen. John Wiley & Sons, New York, 45–48.
- HIGHASI R., FAN M.T., LANE W.M., ANDREW N. (1998). Association of desferrioxamine with humic substances and their interaction with cadmium(II) as studied by pyrolysis-gas chromatography-mass spectrometry and nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Analyst*, **123**: 911–918.
- KUMADA K. (1987): *Chemistry of Soil Organic Matter*. Elsevier, Tokyo, 17–30.
- LAKOWICZ J.R. (2006): *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. Springer, Baltimore.
- LARSSON T., WEDBORG M., TURNER D. (2007): Correction of inner-filter effect in fluorescence excitation-emission matrix spectrometry using Raman scatter. *Analytica Chimica Acta*, **583**: 357–363.
- LAWSON G.J., STEWART D. (1989): Coal humic acids. In: HAYES B.H.M., MACCARTHY P., MALCOLM R.L., SWIFT R.S. (eds): *Humic Substances II, Search of Structure*. John Wiley & Sons Ltd., Chichester, 642–686.
- LI A., HU J., LI W., ZHANG W., WANG X. (2009): Polarity based fractionation of fulvic acids. *Chemosphere*, **77**: 1419–1426.
- MACCARTHY P., RICE J.A. (1985): Analytical methodology for elemental analysis of humic substances. In: AIKEN J.R., MCKNIGHT D.M., WERSHAW R. L., MACCARTHY P. (eds): *Humic Substances in Soil, Sediment and Water: Geochemistry, Isolation and Characterization*. Wiley-Interscience, New York, 433–455.
- MADRONOVÁ L. (2011): *Humic acids from raw material of the Czech Republic*. Nova Science Publishers, Inc., New York.
- MALCOLM R.L. (1990): The uniqueness of humic substances in each of soil, stream and marine environments. *Analytica Chimica Acta*, **232**: 19–30.
- MOBED J.J., HEMMINGSEN S.L., AUTRY J.L., MCGOWN L.B. (1996): Fluorescence characterization of IHSS humic substances: Total luminescence spectra with absorbance correction. *Environmental Science Technology*, **30**: 3061–3065.
- MONREAL C.M., SULTAN Y., SCHNITZER M. (2010): Soil organic matter in nano-scale structures of a cultivated Black Chernozem. *Geoderma*, **159**: 237–242.
- NOBILI M. DE, BRAGATO G., ALCANIZ J.M., PUIGBO A., COMELLAS L. (1990): Characterization of electrophoretic fractions of humic substances with different electrofocusing behavior. *Soil Science*, **150**: 763–770.
- NOVÁK J., KOZLER J., JANOŠ P., ČEŽÍKOVÁ J., TOKAROVÁ V., MADRONOVÁ L. (2001): Humic acids from coals of the North-Bohemian coal field. I. Preparation and characterization. *Reactive & Functional Polymers*, **47**: 101–109.
- PALAZZO A.J., CLAPP C.E., SENESI N., HAYES M. H.B., CARY T.J., MAO J-D., BASHORE T.L. (2008): Isolation and characterization of humic acids in Idaho Slickspot soils. *Soil Science*, **173**: 375–386.
- PEDRA F., PLAZA C., FERNÁNDEZ J.M., GARCÍA-GIL J.C., POLO A. (2008): Effects of municipal solid waste compost and sewage sludge on chemical and spectroscopic properties of humic acids from a sandy Haplic Podzol and a clay loam Calcic Vertisol in Portugal. *Waste Management*, **28**: 2183–2191.
- PEURAVUORI J., PIHLAJA K. (1997): Molecular size distribution and spectroscopic properties of aquatic humic substances. *Analytica Chimica Acta*, **337**: 133–149.
- PICCOLO A. (2002): The supra-molecular structure of humic substances. A novel understanding of humus chemistry

- and application in Soil Science. *Advances in Agronomy*, **75**: 57–133.
- PLAZA C., BRUNETTI G., SENESI N., POLO A. (2006): Molecular and quantitative analysis of metal ion binding to humic acids from sewage sludge and sludge-amended soils by fluorescence spectroscopy. *Environmental Science Technology*, **40**: 917–923.
- PRESTON C.M. (1991): Using NMR to characterize the development of soil organic matter with varying climate and vegetation. In: *Proc. Int. Symp. Use of Stable Isotopes in Plant Nutrition, Soil Fertility and Environmental Studies*. International Atomic Agency, Vienna, 27–36.
- PRESTON C.M. (1996): Applications of NMR to soil organic matter analysis: History and prospects. *Soil Science*, **161**: 144–166.
- RODRÍGUEZ-LUCENA P., LUCENA J.J., HERNÁNDEZ-APAOLAZA L. (2009): Relationship between the structure of Fe-Lignosulfonate complexes determined by FTIR spectroscopy and their reduction by the leaf Fe reductase. In: *Proc. 15th Int. Plant Nutrition Colloquium*, UC Davis, Sacramento.
- SCHNITZER M. (1982): Organic matter characterization. In: *PAGE B.L., MILLER R.H. (eds): Methods of Soil Analysis. Part 2. Chemical and Microbiological Properties*. Agronomy Monograph. American Society of Agronomy, Madison, 581–594.
- SENESE N. (1990): Fluorescence spectroscopy applied to the study of humic substances from soil and soil related systems: A review. In: *199th American Chemistry Society Meeting*, Boston, Division of Environmental Chemistry. A.C.S., Boston, 79–82.
- SENESE N., MIANO T. M., PROVENZANO M. R., BRUNETTI G. (1991): Characterization, differentiation, and classification of humic substances by fluorescence spectroscopy. *Soil Science*, **152**: 259–271.
- SENESE N., MIANO T.M., BRUNETTI G. (1996): Humic-like substances in organic amendments and effects on native soil humic substances. In: *PICCOLO A. (eds): Humic Substances in Terrestrial Ecosystems*. Elsevier, New York, 531–593.
- SENESE N., D’ORAZIO V., RICCA G. (2003): Humic acids in the first generation of Eurosoils. *Geoderma*, **116**: 325–344.
- STEVENSON F.J. (1994): *Humus Chemistry: Genesis, Composition, Reactions*. Wiley-Interscience, New York.
- SUTTON R., SPOSITO G. (2005): Molecular structure in soil humic substances. The new view. *Environmental Science and Technology*, **39**: 9009–9015.
- TAN K.H. (2013): Humo-nanotube membrane relation with biopolymers. *Soil Science Web Site – Dr. Kim H. Tan*. Available at <http://drkhtan.weebly.com/articles.html>
- THENG B.K.G., YUAN G. (2008): Nanoparticles in the soil environment. *Elements*, **4**: 395–399.
- UYGUNER C.S., BEKBOLET M. (2005): Implementation of spectroscopic parameters for practical monitoring of natural organic matter. *Desalination*, **176**: 47–55.
- WERSHAW R.L. (1999): Molecular aggregation of humic substances. *Soil Science*, **164**: 803–813.

Received for publication June 28, 2013
Accepted after corrections October 2, 2013

Corresponding author:

Ing. VOJTĚCH ENEV, Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Centrum materiálového výzkumu, Purkyňova 118, 612 00 Brno, Česká republika; e-mail: xcenev@fch.vutbr.cz

Příloha č. 3 – odborný článek v impaktovaném časopise *Environmental Earth Sciences*

DOSKOČIL, L., GRASSET, L., ENEV, V., KALINA, L., PEKAŘ, M. Study of water-extractable fractions from South Moravian lignite. *Environmental Earth Sciences*. 2015, vol. 73, no. 7, p. 3873–3885. ISSN: 1866–6299

Study of water-extractable fractions from South Moravian lignite

Leoš Doskočil · Laurent Grasset · Vojtěch Enev ·
Lukáš Kalina · Miloslav Pekař

Received: 13 November 2013 / Accepted: 2 September 2014
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2014

Abstract Lignite can be applied directly in natural form on agricultural fields as a soil conditioner. However, there is little information on leaching of risky compounds by its interaction with water. South Moravian lignite was therefore extracted with water at 25 °C and 2.3 % of water-soluble fractions were obtained from lignite corresponding to 0.3 % of total organic carbon. All ten fractions form aromatic and aliphatic structures with oxygen-containing functional groups such as carboxyl groups, alcohols, ethers, esters, can be characterized as fulvic-like and humic-like substances. According to the XPS spectra, the fractions contain two nitrogen forms, one of which is ascribed to pyrroles and the second is related to protonated amines or quaternary nitrogen. Analysis at molecular level showed that the fractions contain compounds such as benzene carboxylic acids and their derivatives, small aliphatic diacids, fatty acids and polyols. Most of the identified molecules reflect clearly the presence of microbial remains in the lignite structure since microbial activity during coalification is well known. The differences between the

individual fractions are negligible, especially after 21 days of extraction. From environmental point of view, it seems that the identified compounds do not represent a toxic risk.

Keywords Lignite · Water-soluble fractions · Fulvic acid · Humic acid · Organic matter

Introduction

Lignite is a low-rank coal which is formed from original phytomass by peatification, followed by coalification, and is considered as intermediate form between peat and bituminous coal. Lignite is mainly used for energy production but its disadvantages are low caloric value and high water content. In this regard, non-energy or non-fuel applications can represent more interesting use of this valuable raw material [e.g., a production of small acids by chemical treatments (Doskočil et al. 2014)].

Probably the most attractive way is the use of lignite as sources for humic acids in agriculture (Kučerík et al. 2003) or for the production of organic, organomineral fertilizers (generally coal-based fertilizers) and soil conditioners (Chassapis et al. 2009; Song and Schobert 1996; Pehlivan and Arslan 2007). The simplest and cheapest way is the direct application of natural lignite after milling to suitable particle sizes by spreading or ploughing. For example, a product from South Moravian lignite called Terra Clean acts as an effective soil conditioner and it is exported to some Arab countries (Honěk et al. 2009). One drawback of these applications can be related to the release of inorganic and organic components into the soil, surface and underground water as a consequence of the interaction of lignite with water (Chassapis et al. 2009). The available literature pays sufficient attention to inorganic materials (especially

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s12665-014-3671-1) contains supplementary material, which is available to authorized users.

L. Doskočil (✉) · V. Enev · M. Pekař
Institute of Physical and Applied Chemistry, Brno University
of Technology, Purkyňova 118, 612 00 Brno, Czech Republic
e-mail: xcdoskocil@fch.vutbr.cz

L. Doskočil · V. Enev · L. Kalina · M. Pekař
Materials Research Centre, Faculty of Chemistry,
Brno University of Technology, Purkyňova 118, 612 00 Brno,
Czech Republic

L. Grasset
Université de Poitiers, CNRS, UMR 6514, 40 Avenue du
Recteur Pineau, 86022 Poitiers, France

toxic elements such as lead, arsenic, copper, cadmium, etc.) leached out from coals due to their potential environmental pollution problem for ecosystems (Petrotou et al. 2012; Wongyai et al. 2013), whereas organic components are of rather marginal interest.

Besides agriculture, lignite has also a potential application as a low-cost and effective sorbent (mainly heavy metals) for the treatment of wastewater (Doskočil and Pekař 2012). On the other hand, studies do not deal with water quality after sorption treatment of wastewater, although the contact of lignite with water always results in the release of organic matter and water yellowing. It has been proven that coals themselves are not mutagenic, but water-soluble organic matter from lignite produced an appreciable mutagenicity when the treatment was performed by chlorine sterilization (Nakajima et al. 2008). Some works have reported (McElmurry and Voice 2004; Maharaj et al. 2014; Orem et al. 1999; Finkelman et al. 2002) that groundwater can leach organic matter from Pliocene lignite and they can be hazardous to human health (e.g., urinary tract cancer, tubulointerstitial nephropathies). Long-term exposure to low concentrations of organic compounds leached from Pliocene lignite is probably one of factors in the etiology of the disease so-called Balkan endemic nephropathy (Maharaj et al. 2014).

The importance of water-extractable organic matter from lignite does not involve only the above-mentioned areas, but there are many other cases in which coal is exposed to water, e.g., coal washing processes, storage piles exposed to rain and/or water spray, transport in coal-water slurry, and disposal of coal (Nakajima et al. 2005).

Extraction studies of coal were previously performed using hot, sub- and supercritical water, but experimental conditions cannot reflect a situation occurring in nature (Vieth et al. 2008; Nakajima et al. 2005; Kashimura et al. 2004; Cheng et al. 2004).

In other previous studies, organic compounds such as phenols, polycyclic aromatic hydrocarbons, and humic substances have been detected in coal washing wastewater (Berrueta et al. 1991), coal slurry transport wastewater (Reid et al. 1988) and simulated coal slurry pipelines (Godwin and Manahan 1979). But very few works deal with the water extraction of organic matter from coals at environmental temperatures and when lignite is exposed to contact with water in a batch method (Berrueta et al. 1991; Peuravuori et al. 2006).

Peuravuori et al. (2006) leached lignite with pure water and classified water-soluble organic compounds into six structural categories: (1) aliphatic acids, alcohol and ester derivatives with long carbon chains; 2) aromatic carboxylic acid and phenol derivatives; (3) aromatic condensed

PAH-type derivatives; (4) lignin signal compounds; (5) carbohydrate signal compounds (furans); and (6) N-containing compounds (aromatic amines and nitrogen heterocycles). Unfortunately, they did not detect specific compounds at the molecular level. On the other hand, compounds analyzed by Fabiańska et al. (2013) do not agree with the classification proposed by Peuravuori et al. (2006). Water-washing of Polish lignite resulted in decreased bitumen yield from the original matter due to the removal of short-chain *n*-alkanes (*n*-C₁₂–*n*-C₁₉), the removal of some more polar compounds such as quinoline derivatives, and lower concentrations of naphthalene and alkylnaphthalenes (sometimes with naphthalene absent in the extracts) in bitumen (Fabiańska et al. 2013). Study of Maharaj et al. (2014) showed that aqueous leaching of Pliocene lignite from the countries of the former Yugoslavia yielded aliphatic compounds, phthalate esters, phenols, benzenes, heterocycles, polycyclic aromatic hydrocarbon and lignin degradation compounds that depended on the experimental conditions.

In order to predict the potential impact of interactions between coal and water that might occur in soil systems during the agricultural application of lignite, or in the waste water during sorption treatment, it is necessary to have more information on the composition of nature lignite water-soluble fractions. In this study, South Moravian lignite was subjected to water sequential extraction at 25 °C, and water-soluble fractions were characterized using a set of analytical techniques, i.e., spectrometric methods, thermochemolysis and GC–MS analysis. The combination of various techniques assures better characterization of water-soluble fractions.

Experimental

Material

The sample of lignite used in this study was obtained from the locality Mikulčice, Czech Republic, the mine Mír belonging to the Dubňany seam in the South Moravian Lignite Coalfield that forms northern part of the Vienna basin. This was a representative sample of standard product from this mine; its detailed characteristic, including geochemical and petrographic description, has been published elsewhere (Kučerík et al. 2003; Havelcová et al. 2012; Jelínek et al. 2011). The lignite was used after drying at 105 °C for 24 h and then let to equilibrate with ambient laboratory atmosphere at about 25 °C which resulted in the final equilibrium moisture content of about 7 % by weight. Then lignite milled was sieved to the size fraction less than 0.2 mm.

Extractions of lignite with water

Ten grams of ground lignite and 150 ml of ultrapure water were put into a 200-ml glass flask. Nitrogen was bubbled through a lignite suspension and the content of the flask was closed under a nitrogen atmosphere. The extraction was carried out by means of a rotary shaker at temperature 25 °C for 7 days.

Every 7 days, the extract was separated from lignite by centrifugation for 10 min at 4,000 rpm and at 25 °C. After centrifugation the supernatant was filtered through a 0.45- μm membrane filter (MS[®]MCE). The filtrate was freeze-dried, the solid product was kept in the dark before it was analyzed as described below (see also Fig. S1 in Online Resource).

To the solid residue of coal, 150 ml of ultrapure water was again added and the extraction continued. The exchange of water was carried out nine times and all extractions were performed in quadruplicate. Letters marked the individual fractions in alphabetical order and subscripts indicated the number of days of extraction (that is the first fraction as fraction A₇, the second fraction as fraction B₁₄... and the last fraction as fraction J₇₀). Extraction procedure is illustrated in detail in Fig. S2 in Online Resource.

Total organic carbon (TOC) was determined by accredited testing laboratory Povodí Moravy using a Shimadzu TOC 5000A analyzer according to Czech technical standard SOP 300-ČSN 75 7515.

UV–Vis spectrometry

UV–Vis spectra were obtained on a Hitachi U-3900H UV/VIS spectrophotometer in the range of 200–700 nm. Freeze-dried fractions were dissolved and measured in a 10-mm quartz cuvette against ultrapure water as blank.

FTIR spectrometry

The FTIR spectra were recorded on pellets prepared by pressing a mixture of 1.5 mg of the individual fractions and 400 mg of dried spectrometry grade KBr using a Nicolet iS50. Spectra were recorded in the range 4,000–400 cm^{-1} with a 4 cm^{-1} resolution and 256 scans were performed on each sample.

XPS analysis

The samples of fractions were ground in an agate mortar and molded into a disc with a diameter of 10 mm. XPS spectra were measured with a Kratos AXIS Ultra DLD spectrometer using a monochromatic Al K α source operating at 150 W (10 mA, 15 kV). High-resolution spectra

were obtained using an analysis area of $\sim 300 \times 700 \mu\text{m}$ and 20 eV pass energy with the step size 0.1 eV. The analyzer chamber pressure was less than 2×10^{-7} Pa. The Kratos charge neutralizer system was used for all analyses. The spectra were corrected using the adventitious hydrocarbon peak at 284.6 eV.

Fluorescence spectrometry

For fluorescence measurements, solutions of 10 mg L⁻¹ of organic carbon were prepared from freeze-dried fractions in phosphate buffer (NaH₂PO₄, Na₂HPO₄). All spectra were performed on a fluorescence spectrophotometer Fluorolog, with a scan speed of 600 nm min⁻¹, using excitation and emission slit bandwidths of 5 nm. The following spectroscopical indexes were obtained:

Zsolnay index: Emission spectra were collected between 350 and 650 nm, with an excitation wavelength of 240 nm, using the method proposed by Zsolnay et al. (1999).

Milori index: Emission spectra were recorded over a range of 460–650 nm using an excitation wavelength of 440 nm, and the total area under these spectra was also calculated (Milori et al. 2002).

Emission spectra were obtained over a range of 380–550 nm using an excitation wavelength of 360 nm and excitation spectra were collected over a range of 300–500 nm applying an emission wavelength of 520 nm.

The excitation–emission matrix (EEM) spectra were obtained by scanning the emission and excitation wavelengths over the range 300–600 nm, and the excitation wavelength increment was set at 5 nm.

The primary and secondary inner filter effects were corrected. The fluorescence intensity (IF) values (in CPS/MicroAmplitude) of samples were corrected using method of Lakowicz (2006).

Tetramethylammonium hydroxide thermochemolysis

The thermochemolysis procedure was based on the off-line procedure developed by Grasset and Ambler (1998). The individual freeze-dried fractions from lignite were mixed together. The resulting sample (about 350 mg) was placed in a ceramic boat and thoroughly soaked with 2 ml of a 50 % w/w solution of tetramethylammonium hydroxide (TMAH; Acros Organics, New Jersey, USA) in methanol. After 1 h of impregnation, the sample was transferred to a 60 \times 3 cm i.d. Pyrex tube and heated at 400 °C (30 min isothermal). Thermochemolysis products were swept using N₂ (flow rate at 100 ml min⁻¹) to a trap containing dichloromethane in the ice-water bath. When pyrolysis was completed, the dichloromethane was removed using a rotary evaporator.

Derivatization of chloroform extract from freeze-dried fractions

The individual freeze-dried fractions were collected together, dissolved and the aqueous sample solution was several times extracted with chloroform. The extracts were combined, dried over MgSO_4 and silylated with a mixture of BSTFA (N,O-bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide) and TMCS (trimethylchlorosilane) at 60 °C for 15 min.

Gas chromatography–mass spectrometry

The products of thermochemolysis and the chloroform extract were analyzed by capillary GC using a Hewlett–Packard 6890 GC (split injector, 250 °C; Flame Ionization Detector (FID), 300 °C) with a fused silica capillary column (SGE BPX 5, 30 m length, 0.25 mm i.d., 0.25 μm film thickness) and helium as a carrier gas. The GC was temperature programmed from 60 to 300 °C at 5 °C min^{-1} isothermal for 20 min final time. The GC–MS analyses were performed on a Trace GC Thermo Finnigan coupled to a Thermo Finnigan Automass (with the same GC conditions). The MS was operated in the electron impact mode with a 70 eV ion source energy and the ion separation was operated in a quadrupole filter. The various products were identified on the basis of their GC retention times, their mass spectra (comparison with standards) and literature data. Quantification was done with *n*-nonadecane as an internal standard.

Results and discussion

Yields

The water extract obtained from the South Moravian lignite was yellow in color. After the freeze-drying process the first fraction A₇ was white in color unlike the others which were light brown. The difference in color may be explained by a higher content of salts in the first fraction. Yields of extracts gradually decreased as can be seen in Table 1. Fraction J₇₀ contained an insignificant amount of solids and therefore further extractions were not performed. Thus, about 2.7 % of material from lignite can be released into water. Organic part of the water-soluble fraction represented about 0.3 % of TOC from the original lignite. Peuravuori et al. (2006) reported that the total amount of water-soluble organic compounds from lignite accounted for about 0.38 %. Lower values of TOC in fractions A₇ and B₁₄ indicate a higher salt content and there was no big change of TOC from fraction C₂₁ to fraction J₇₀. Inorganic and organic species whose presence was registered by FTIR analysis, were responsible for the conductivity of

water-extractable fractions. Table 1 clearly shows that the conductivity greatly decreased from fraction A₇ to fraction B₁₄, subsequently slightly decreased, reaching about 15 $\mu\text{S}/\text{cm}$ from fraction G₄₉. Extracts were weakly acid and the fraction A₇ was the most acidic. The results indicate that initially fractions rich in salts were released followed by a predominance of fractions containing organic compounds which were gradually released from the complex coal structure.

UV–Vis spectroscopy

UV–Vis absorbance spectra of water extract from lignite were featureless and characterized by the absence of recognizable maxima and/or minima with a decreasing absorbance with increasing acquisition wavelength (not shown). This spectral behavior is typical for fulvic acid and humic acid (Baes and Bloom 1990; Li et al. 2009).

Fractions absorbed light significantly at wavelengths between 200 and 400 nm. It indicates the vast majority of the chromophores including aromatic groups with various degrees and types of substitution such as monosubstituted and polysubstituted phenols and different aromatics acids (Korshin et al. 1997). The lower $E_{\text{ET}/\text{Bz}}$ ratio (the ratio of absorbance at 253 nm to at 203 nm) indicates aromatic rings substituted predominantly with aliphatic functional groups or a scarce substitution in the aromatic rings, whereas higher $E_{\text{ET}/\text{Bz}}$ ratio is associated with the presence of aromatic rings substituted with carbonyl, carboxyl and (especially) ester carboxylic groups (Korshin et al. 1997; Fuentes et al. 2006). Table 2 shows an increase in $E_{\text{ET}/\text{Bz}}$ ratios ranging from 0.55 in fraction A₇ to 0.61 in fractions from E₃₅ to J₇₀. These results show that the aromatic structures in fractions (especially up to fraction E₃₅) have a higher degree of substitution with oxygen-containing functional groups with ascending order of fractions, although the differences of values are minimal from the fraction C₂₁. The degree of substitution in aromatic rings does not alter from the fraction E₃₅ because consecutive values of $E_{\text{ET}/\text{Bz}}$ ratios were identical.

The quotient $E_{250/365}$ (the ratio of absorbance at 250 nm to at 365 nm) is used as an indicator of aromaticity and molecular size (Peuravuori and Pihlaja 1997). In general, if the ratio $E_{250/365}$ increases the aromaticity and molecular size decrease. The results listed in Table 2 indicate that basically the aromaticity and molecular size increase slightly for individual fractions in ascending order, although the increase can be considered as negligible starting from the fraction C₂₁.

SUVA₂₅₄ (specific UV absorbance) is defined as the UV absorbance of a water-soluble sample at 254 nm normalized for TOC concentration (Weishaar et al. 2003). It is a useful parameter for estimating the dissolved aromatic

Table 1 Chemical characteristics of water-extractable fractions from lignite

Extract	Fractions									
	A ₇	B ₁₄	C ₂₁	D ₂₈	E ₃₅	F ₄₂	G ₄₉	H ₅₆	I ₆₃	J ₇₀
Yields (mg)	193.7	21.1	20.4	7.2	10.1	8.1	3.3	2.7	2.9	1.1
pH	5.16	5.67	5.79	5.63	5.63	5.96	5.54	5.79	5.44	5.39
Conductivity (μS/cm)	1143.0	137.4	59.1	27.8	31.3	26.8	14.5	14.6	15.0	14.9
TOC (g/kg)	41	170	346	363	347	380	316	345	323	–

Table 2 Spectroscopic data of water-extractable fractions from lignite

Fraction	UV–Vis parameter			Fluorescence parameter	
	E _{ET} /E _{Bz}	E _{250/220}	SUVA ₂₅₄	Milori (10 ⁸)	Zsolnay
A ₇	0.55	4.62	0.32	0.61	0.19
B ₁₄	0.56	5.78	0.43	1.31	0.19
C ₂₁	0.59	4.49	0.45	2.41	0.22
D ₂₈	0.59	4.14	0.43	3.16	0.25
E ₃₅	0.61	3.99	0.54	4.13	0.35
F ₄₂	0.61	4.07	0.35	3.26	0.28
G ₄₉	0.61	3.47	0.45	3.49	0.38
H ₅₆	0.61	3.57	0.37	4.13	0.34
I ₆₃	0.61	3.49	0.39	3.51	0.35
J ₇₀	0.61	3.68	0.40	–	–

carbon content in aquatic systems (Weishaar et al. 2003). The lowest value of SUVA₂₅₄ was observed in the fraction A₇. Other fractions displayed more or less higher values of SUVA₂₅₄ with minimal variation.

Porous structure of South Moravian lignite (Pekář 2009) is known to consist mainly of macropores (95 %). It therefore seems that initially molecules freely entrapped in pores or weakly attached to the outer surface were released. Subsequently, molecules adsorbed on the pore or outer surface could be released due to swelling and opening of the lignite structure. It should be noted that the size of molecules and aromatic substituents with oxygen-containing functional groups did not change significantly among fractions (from the fraction C₂₁ to the fraction J₇₀).

Absorbance above 550 nm in the UV–Vis spectra was minimal or equal to zero. Hence, we can suppose that fractions did not comprise extended conjugation in aliphatic or polyaromatic structures as well as to the absence of metal complexes and/or inter-, or intramolecular donor–acceptor complexes (Fuentes et al. 2006).

FTIR

The FTIR spectra of the fractions show mainly the existence of oxygen-containing functional groups, though the appearance of gypsum and kaolinite made the

interpretation of the FTIR spectra difficult. The differences between FTIR spectra of the individual fractions were insignificant. Gypsum was revealed by the bands at 3,543, 671 and 603 cm⁻¹ (Painter et al. 1978) and it was the most pronounced in the fraction A₇. Kaolinite was related to bands at 3,696, 3,620, 534 and 470 cm⁻¹ (Iordanidis et al. 2012). The interference of gypsum gradually declined in accordance with results of conductivity and TOC (see Table 1).

Interpretation of the absorption bands was done as described in the literature (Milata and Segla 2007). The presence of aliphatic chains was revealed by the bands at 2,925 and 2,852 cm⁻¹ which were attributed to asymmetric and symmetric C–H stretching in methylene groups. The deformation vibrations of methylene and methyl groups occurred in the spectrum at 1,451 and 1,369 cm⁻¹. The band at around 3,400 cm⁻¹ was attributed to OH groups. The appearance of C=C aromatic stretching at 1,510 cm⁻¹ (and probably at 1,611 cm⁻¹) pointed out aromatic molecules. The bands at 1,265 and 1,220 cm⁻¹ were related to C–O and O–H vibrations from phenols, carboxyl groups and aryl ethers. Carboxylic groups were responsible to the band at 1,710 cm⁻¹. The band at 1,120 cm⁻¹ was ascribed to the C–O stretching of secondary alcohols, ethers and inorganic matter; and the band at 1,033 cm⁻¹ was attributed to C–O stretching of primary alcohols and Si–O bonds. These results are consistent with that from UV–Vis spectra.

XPS analysis

The XPS analysis was used to obtain qualitative information about the chemical states of carbon, nitrogen and sulphur in the lignite fractions.

Figure 1 shows example of XPS carbon C 1 s spectra of the fraction F₄₂. For all fractions, the results indicate that three different structural groups occurred at 284.6, 286.3, and 288.4 eV. The 284.6 eV peak represents contributions from both aromatic and aliphatic carbon (C–C, C=C, C–H). The 286.3 eV peak represents carbon bound to oxygen by a single bond (e.g., C–O, C–OH, etc.), but it can also include carbon bound to nitrogen or sulphur (C–N, C–S). The

Fig. 1 Example XPS carbon (C 1 s) spectrum for the fraction F₄₂

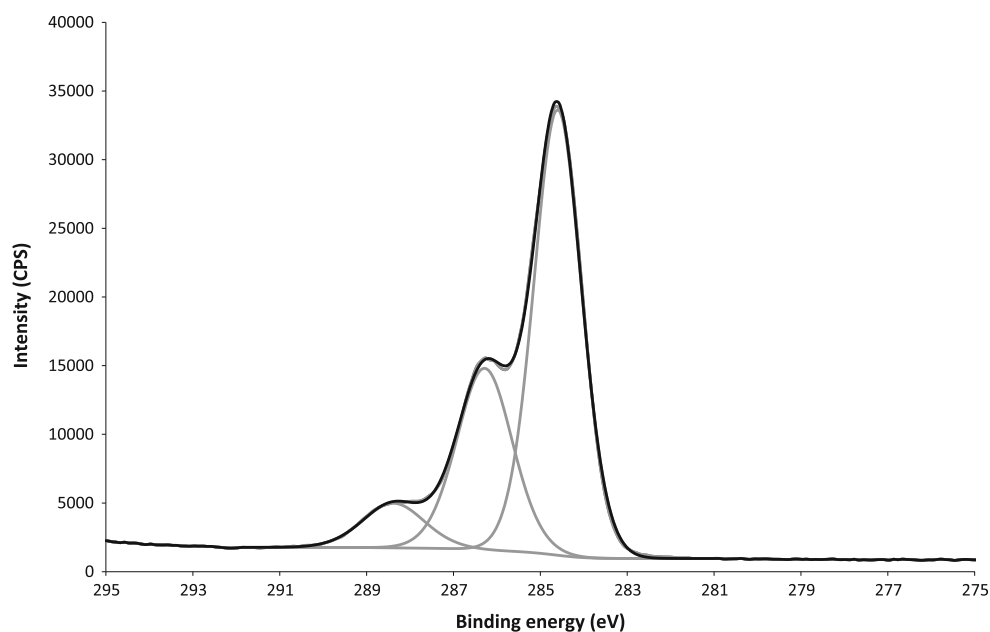
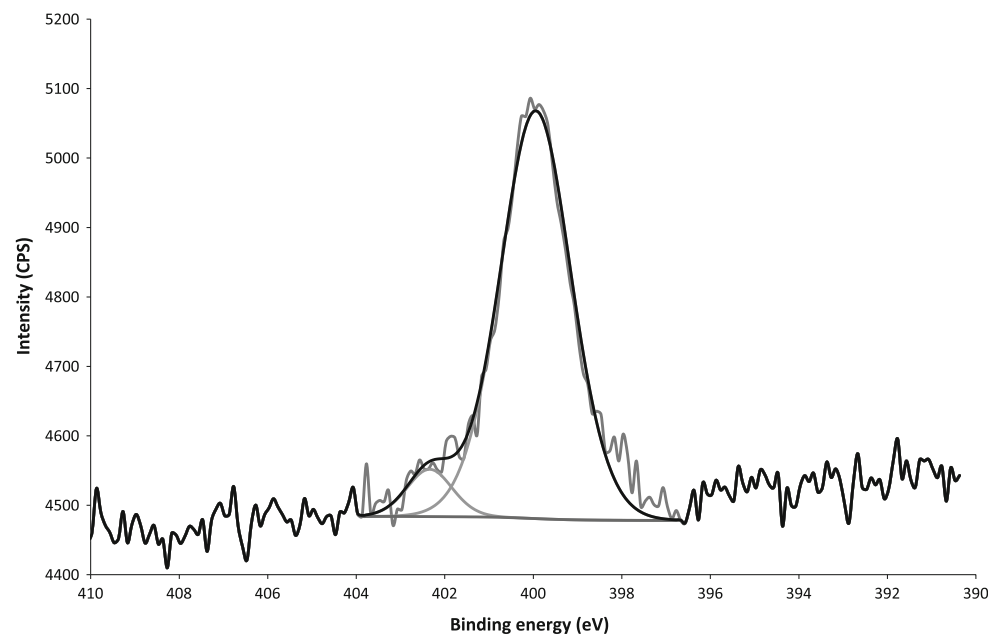


Fig. 2 Example XPS nitrogen (N 1 s) spectrum for the fraction F₄₂



288.4 eV peak corresponds mainly to carbon bound to oxygen by three bonds such as carboxyl and ester functional group (O=C–O).

For the nitrogen N 1 s signal, two peaks were applied to curve fitting as shown in Fig. 2. The 400.0 eV peak can be assigned to pyrroles, pyridones, amides, secondary and tertiary amines and imides. Although these species cannot be unequivocally distinguished with each other due to very close binding energies (Kelemen et al. 1999, 2006; Zhu et al. 1997), based on several published statements

(Cagniant et al. 1998; Gorbaty et al. 1990; Kelemen et al. 1994) the peak at 400.0 eV was considered predominantly as pyrrolic. The 402.3 eV peak can be related to protonated amines, quaternary N and oxidized nitrogen (N–O) (Templier et al. 2012; Straka et al. 2000). Quaternary nitrogen arises from the interaction (protonation) of pyridinic nitrogen and adjacent phenolic groups (Kelemen et al. 1994). We are inclined rather to the opinion that the 402.1 eV peak is involved in protonated amines, or quaternary nitrogen. Amino containing functional groups were

Fig. 3 Example XPS sulphur (S 2p) spectrum for the fraction C₂₁

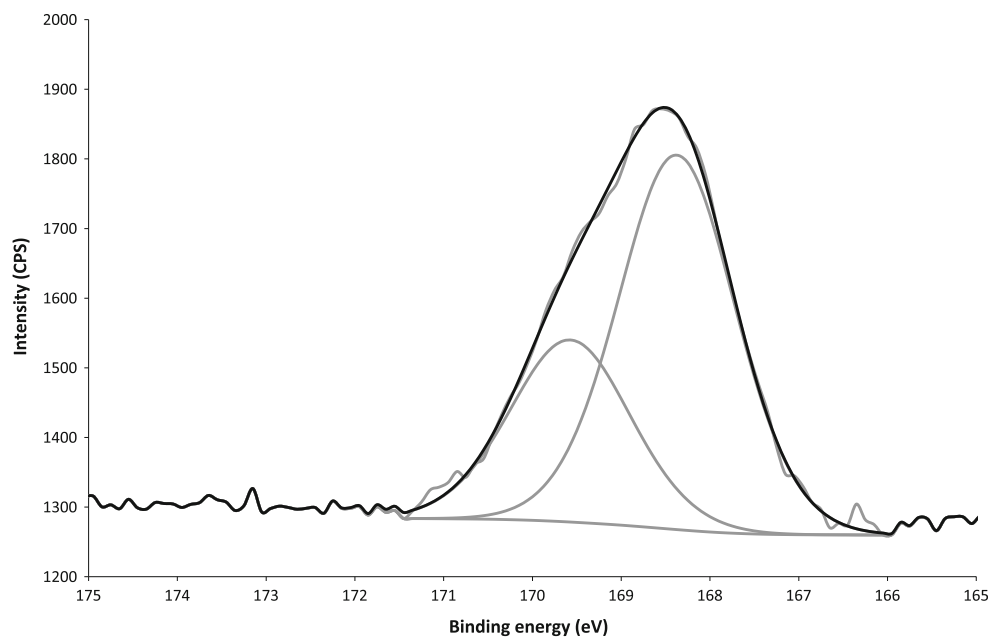
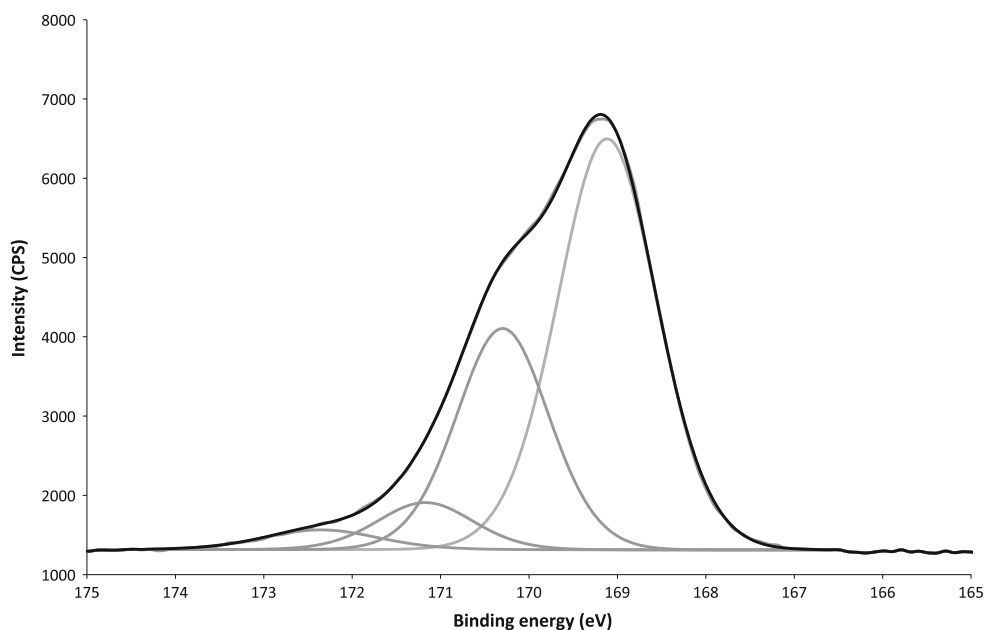


Fig. 4 XPS sulphur (S 2p) spectrum of the fraction A₇



also observed in the work of Finkelman et al. (2002) in the aqueous leachate from lignite. The same results were observed in all fractions.

Typical sulphur XPS spectrum is shown in Fig. 3 and contains peak at 169.1 eV (S 2p_{3/2}) belonging to sulfate group and can be attributed to gypsum which was also detected by means of FTIR. In the case of fraction A₇, sulphur was determined in two chemical states (Fig. 4). The second peak obtained at 171.2 eV cannot be unambiguously ascribed to given binding energy.

Fluorescence spectroscopy

Emission spectra (Fig. 5) are characterized by a broad band with the maximum centered at a wavelength (equal to 459 nm) that was identical for all fractions. The shoulder at 410–415 nm in the spectra is due to the Raman band of water. The values of the maximum are in the range typical for fulvic acids (Senesi et al. 1991; Plaza et al. 2003).

Excitation spectra of all fractions (Fig. 5) are less clearly resolved than emission spectra, and are

Fig. 5 Fluorescence emission (*dashed line*) and excitation (*solid line*) spectrum of the fraction E₃₅

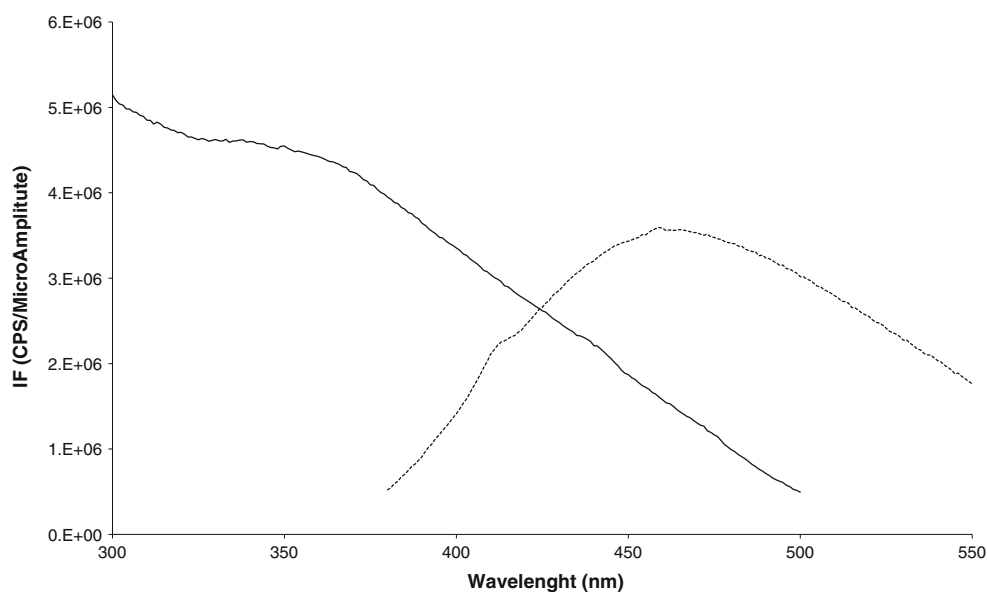
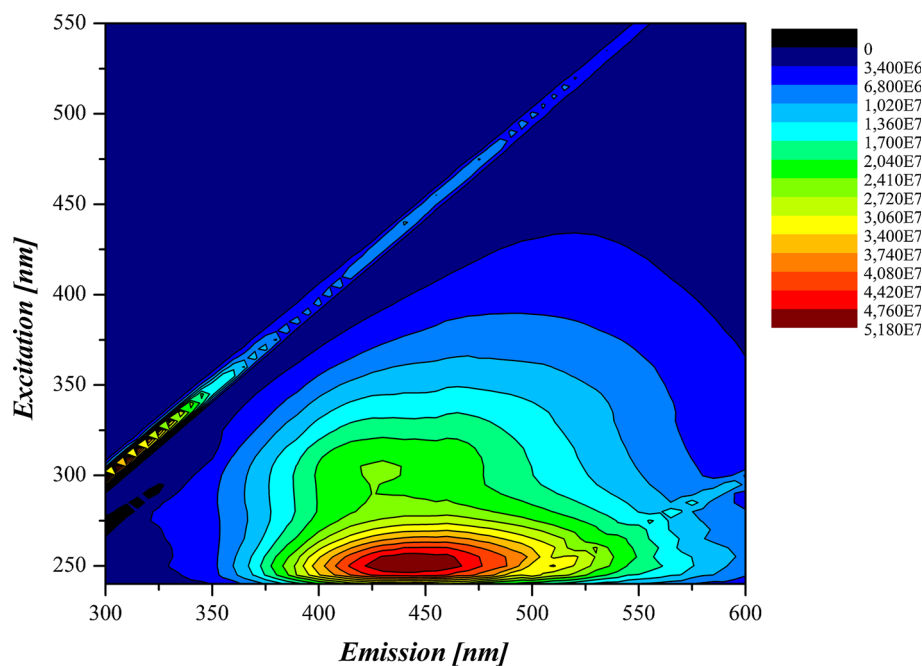


Fig. 6 Example of EEM spectrum of the fraction C₂₁



characterized with unclear maximum values. Excitation spectra are closely paralleling the absorbance spectra, see above.

The fluorescence EEM spectrum of water-extractable fractions is presented in Fig. 6. The spectra of all fractions were characterized by the persistence of two fluorescent centers situated at distinctive positions which are marked as peak A and peak C. Both fluorescence peaks (A and C), centered at the excitation/emission wavelength pair of about 250/440 nm and about 300/425 nm, respectively, were detected in all the fractions. According to previous

studies (Chen et al. 2003; Rodríguez et al. 2014), peak A and C are located in fluorescent regions attributed to humic-like substances with the former assigned to fulvic and fulvic-like structures, while the latter is attributed to humic-like materials. Fluorescence intensity (IF) in the individual fractions shows higher values for fulvic-like structures than in the case of humic-like structures. Higher intensity associated with fulvic-like materials may be indicative of simpler structures with less condensed aromatic rings or conjugation in aliphatic chains (Senesi et al. 1991; Fuentes et al. 2006). The position of peak C in the

region of excitation wavelengths suggests that carboxylic groups predominate over phenolic groups (Rodríguez et al. 2014).

To determine the degree of aromaticity in the individual fractions by means of fluorescence spectroscopy, Milori and Zsolnay indexes were utilized. The smallest degree of aromaticity was determined for the fraction A₇, B₁₄ (eventually in the fraction C₂₁), see Table 2. In other fractions, differences in the values of indices were relatively small.

We consider that aromaticity of individual fractions compared with one another, both for the Milori index and the Zsolnay index, were not significantly varied. With respect to the results of SUVA₂₅₄ and E_{250/365}, we can conclude that the aromaticity increased slightly for fractions in ascending order, although the increase can be considered to be negligible from the fraction C₂₁. This may be explained by concluding that the first fractions (up to the fraction C₂₁) formed smaller molecules with aliphatic structures, and low aromaticity moieties, which were dissolved in preference.

Fulvic acids can form the soluble chelates/complex with nutrients which can then move by diffusion and mass flow to plant roots (Tan 2003). On the other hand, fulvic acids (generally water-soluble organic fractions) in free form and/or in form of complexes with nutrients might be washed up into bottom layers of soil or might pollute the groundwater. Thus, loss of nutrients from topsoils and groundwater contaminations cannot be utterly excluded if lignite is applied as the fertilizer or the soil conditioners.

Tetramethylammonium hydroxide thermochemolysis

The products of thermochemolysis were characterized by the predominance of aromatic compounds (77 % of the total identified molecules), i.e., benzene carboxylic acids and their derivatives (appearing as methyl esters), especially methoxybenzoic acids, and further to a lesser extent, methoxybenzenes. A smaller contribution (23 % of the total identified molecules) corresponded to aliphatic compounds, consisting of short-chain diacids, fatty acids and polyols. The identified compounds are listed in Table 3.

The most abundant compounds were the methyl esters of 3,4-dimethoxy-, 3,4,5-trimethoxy- and 4-methoxybenzoic acids. They may be considered as the end products from oxidation of side chains during microbial degradation of lignin, and as pristine components of the humic structure (Lehtonen et al. 2000). However, it must be stated that the origin of many benzene carboxylic acid methyl esters can also be partly explained on the basis of secondary reactions induced by TMAH as it has been reported (Tanczos et al. 1999). The methoxybenzenes, which were detected in lower amounts, have an uncertain origin. Molecules of

Table 3 List of assigned compounds and their abundance in the mixture of fractions after thermochemolysis

Identified compounds	Abundance (nmol/g sample)
Succinic acid, dimethyl ester	7.8
Methyl succinic acid, dimethyl ester	3.7
Glutaric acid, dimethyl ester	4.8
1,2-Dimethoxybenzene	2.2
Adipic acid, dimethyl ester	2.0
1,2,6-Trimethoxyhexane	8.7
1,2,3-Trimethoxybenzene	2.3
3-Methoxybenzoic acid, methyl ester	7.7
1,2,4-Trimethoxybenzene	3.0
4-Methoxybenzoic acid, methyl ester	16.0
Trimethyl propan-1,2,3-tricarboxylate	8.3
3-Methoxy-4-methylbenzoic acid, methyl ester	2.6
4-Methoxybenzeneacetic acid, methyl ester	2.1
Dulcitol, hexamethyl ether	8.5
3-Hydroxymandelic acid, dimethyl ether, methyl ester	5.4
3,5-Dimethoxybenzoic acid, methyl ester	2.5
Veratric acid, methyl ester	82.9
3,4-Dimethoxybenzeneacetic acid, methyl ester	5.0
3,4,5-trimethoxybenzoic acid, methyl ester	16.1
Tetradecanoic acid, methyl ester	1.4
3,4-Dihydroxymandelic acid, dimethyl ether, methyl ester	13.9
Hexadecanoic acid, methyl ester	2.6

1,2-dimethoxybenzene and 1,2,3-trimethoxybenzene are not obligatory specific only to lignin but they can also be derived from other biopolymers such as carbohydrates (including 1,2,4-trimethoxybenzene) and tannins (Frazier et al. 2003).

The aliphatic diacids released after thermochemolysis consisted of succinic acid, glutaric acid, methylsuccinic acid and adipic acid. Tricarboxylic acid (propan-1,2,3-tricarboxylic acid) was also detected. The occurrence of such acids was previously reported by other authors utilizing various methods as alkaline hydrolysis, oxidation processes or thermochemolysis of humic substances (Doskočil et al. 2014; Hänninen and Niemelä 1992; Estournel-Pelardy et al. 2013). They are considered as cross-linkages between aromatic structures of humic substances (Doskočil et al. 2014). It is known that methyl succinic acid can arise from cleavage of an aromatic ring (Joll et al. 2003). The regular aliphatic diacids, particularly succinic, glutaric and adipic acids, could be more probably considered as products of biological degradations. These acids are very common among natural compounds as they are direct (succinic acid) or secondary products of the intermediate metabolism (citric acid cycle or glyoxylate cycle) of animal, vegetable

and microbial cells (Templier et al. 2005). Glutaric and adipic acids are produced during methanogenic fermentation of aromatic substrates that form phenol or benzoate as an intermediate (Nanny and Ratasuk 2002).

Fatty acids, as methyl ester, were observed in minor portion among thermochemolysis products and they consist of *n*-C₁₄ and *n*-C₁₆. These short-chain *n*-fatty acids (< C₂₀) are ubiquitous in living kingdom (Zelles 1999) and they were probably released by scission of ester moieties in humic substances. Two polyols, dulcitol and 1,2,6-tri-hydroxyhexane (appearing as methyl ether), were found among products and carbohydrates reduced during the diagenesis can be considered as the precursors of these polyols (Vlčková et al. 2009).

Analysis of chloroform extract from freeze-dried fractions

Table 4 shows the results of GC–MS analysis of the chloroform extract from freeze-dried fractions. The data revealed the presence of aromatic compounds (72 % of the total identified molecules), including benzoic acids and 3-vanilpropanol, and aliphatic compounds (28 % of the total identified molecules), including fatty acids and glycerol.

The benzoic acids may represent free products resulting from microbial degradation of lignin which were adsorbed on lignite and/or trapped in the lignite structure. The same acids (excluding benzoic acid) were detected in thermochemolysis products as methyl esters. In this regard, benzoic acids can occur in free form and bound via ester/ether linkages to bigger molecules. The aromatic compounds can

be divided into the three types of lignin monomers units: guaiacyl (isovanillic acid, 3-vanilpropanol), *p*-hydroxyphenyl (4-hydroxybenzoic acid) and syringyl lignin (syringic acid). The quantitative and qualitative predominance of guaiacyl units indicates the presence of gymnosperm lignin. Benzoic acid may be derived from various sources because it is a common intermediate in the anaerobic degradation of aromatic compounds (Nanny and Ratasuk 2002). 3-vanilpropanol represents microbially degraded guaiacyl lignin with the preserved side chain greater than a 2-carbon unit. The major aliphatic products comprised of fatty acids, ranging from *n*-C₉ to *n*-C₁₈, of which *n*-C₉, *n*-C₁₆ and *n*-C₁₈ were the most prominent. From the fatty acids, *n*-C₁₄ and *n*-C₁₆ were observed during thermochemolysis as mentioned above. Thus, besides the fatty acids bound via ester to the low-molecular-weight humic substances, free fatty acids were also detected in the fractions, which were released from lignite during the extraction with water, even though fatty acids are hydrophobic molecules and are not readily soluble in water. These results are in accordance with the observations of Fabiańska and Kurkiewicz (2013), who recorded that water-washing of lignite results in the removal of several groups of compounds (such as aliphatic hydrocarbons, naphthalene, alkylnaphthalenes, slightly polarity compounds and others) or a change in their distribution. Only one unsaturated fatty acid, palmitoleic acid, was found. Glycerol was detected in extract as well which may be related to products of biological degradations.

It seems that the identified compounds do not represent an environmental or a health risk with respect to acute toxicity (Peuravuori et al. 2006) when lignite would be applied as the soil conditioner. However, long time exposure and/or accumulation could potentially lead to risks like kidney damage, the development of urothelial carcinomas (Maharaj et al. 2014; Orem et al. 1999).

Unlike the results of the XPS analysis, no nitrogen-containing compounds were observed in the thermochemolysate and the chloroform extract. This fact may be explained by the absence of free nitrogen-containing compounds in fractions from lignite, or conversely by the presence nitrogen-containing compounds in the form of large molecules that do not undergo a scission of bonds under conditions used during the thermochemolysis.

The compounds identified from the thermochemolysis and the chloroform extract qualitatively indicate that they can be related to the constituents of humic substances (Reid et al. 1988; Lehtonen et al. 2000, 2004; Estournel-Pelardy et al. 2013) in accordance with the results of the fluorescence EEM spectra. Several of these identified molecules may act as metal-binding ligands. For example, succinic acid type structures bound within the molecules may participate in multidentate coordination with metals. In this

Table 4 List of assigned compounds and their abundance in the chloroform extract from the GC–MS analysis

Compounds	Abundance (nmol)
Benzoic acid	10.1
Glycerol	2.4
Nonanoic acid	8.4
Decanoic acid	4.9
4-Hydroxybenzoic acid	16.4
Dodecanoic acid	4.5
3-Hydroxy-4-methoxybenzoic acid (isovanillic acid)	37.1
3-Vanilpropanol	4.4
Tetradecanoic acid	5.2
4-Hydroxy-3,5-dimethoxybenzoic acid (syringic acid)	3.8
Palmitelaidic acid	3.4
Palmitic acid	7.8
Stearic acid	7.6

regard, water-soluble organic fractions can serve as complexing agents of nutrients for plants or the fractions can cause the depletion of nutrients.

Conclusions

South Moravian lignite contains about 2.7 % water-extractable fractions and in those fractions about 0.3 % of original TOC is released. First, inorganic salts such as gypsum, kaolinite (especially the fraction A₇) and smaller molecules containing probably aliphatic moieties and structures with low aromaticity, are particularly dissolved (the fractions A₇, B₁₄). Then, slightly larger molecules are predominantly released (from the fractions C₂₁ to the fraction J₇₀) whose aromaticity, molecular size and degree of substitution of aromatic rings with oxygen-containing functional groups are identical in principle. Thus after 14 days of extractions the fractions may be collectively characterized the parameters such as TOC (316–380 g/kg), pH (5.39–5.96), E_{ET/Bz} (0.59–0.61), E_{250/220} (3.47–4.49), SUVA₂₅₄ (0.37–0.54), Milori index (2.41–4.13·10⁸) and Zsolnay index (0.22–0.38). Moreover, it should be noted that overall variances among the fractions are minimal. All fractions are characterized by the presence of fulvic acids and low-molecular weight humic-like acids. Likewise, all fractions include nitrogen-containing compounds. Analysis at molecular level showed that the fractions contain compounds such as benzene carboxylic acids and their derivatives, short-chain aliphatic diacids, fatty acids and polyols. Most of the identified molecules reflect clearly the presence of microbial remains in the lignite structure since microbial activity during coalification is well known. In the water-extractable fractions, the fatty acids are found to be both free and bound via ester to the low-molecular weight humic substances.

Water-extractable fractions form compounds which may act as complexing agents and sources of nutrients for plants. On the other hand, the fractions might also take away nutrients from topsoils into bottom layers of soil or might pollute the groundwater. It seems that the identified compounds do not represent an acute toxic risk from an environmental viewpoint. However, nitrogen-containing compounds can raise concerns and further study is needed to focus on this. Applications of lignite as a soil conditioner will also call for a study on the penetration of compounds leached from lignite into plants and food.

Acknowledgments This work was supported by project Nr. LO1211, Materials Research Centre at FCH BUT-Sustainability and Development (National Programme for Sustainability I, Ministry of Education, Youth and Sports).

References

- Baes AU, Bloom PR (1990) Fulvic acid ultraviolet-visible spectra: influence of solvent and pH. *Soil Sci Soc Am J* 54:1248–1254
- Berrueta LA, Fernández LA, Vicente F (1991) Fluorescence study of the solubilization of benzo[a]pyrene: application to its detection in coal washing waters. *Anal Chim Acta* 243:115–119
- Cagniant D, Gruber R, Boudou JP, Bilem C, Bimer J, Salbut PD (1998) Structural characterization of nitrogen-enriched coals. *Energy Fuel* 12:672–681
- Chassapis K, Roulia M, Tsigirigi D (2009) Chemistry of metal–humic complexes contained in Megalopolis lignite and potential application in modern organomineral fertilization. *Int J Coal Geol* 78:288–295
- Chen J, LeBoeuf EJ, Dai S, Gu B (2003) Fluorescence spectroscopic studies of natural organic matter fractions. *Chemosphere* 50:639–647
- Cheng L, Zhang R, Bi J (2004) Pyrolysis of a low-rank coal in sub- and supercritical water. *Fuel Process Technol* 85:921–932
- Doskočil L, Pekař M (2012) Removal of metal ions from multi-component mixture using natural lignite. *Fuel Process Technol* 101:29–34
- Doskočil L, Grasset L, Válková D, Pekař M (2014) Hydrogen peroxide oxidation of humic acids and lignite. *Fuel* 134:406–413
- Estournel-Pelardy C, El-Mufleh Al Husseini A, Doskočil L, Grasset L (2013) A two-step thermochemolysis for soil organic matter analysis. Application to lipid-free organic fraction and humic substances from an ombrotrophic peatland. *J Anal Appl Pyrol* 104:103–110
- Fabiańska MJ, Kurkiewicz S (2013) Biomarkers, aromatic hydrocarbons and polar compounds in the Neogenelignites and gangue sediments of the Konin and Turoszów Brown Coal Basins (Poland). *Int J Coal Geol* 107:24–44
- Finkelmann RB, Orem W, Castranova V, Tatu CA, Belkin HE, Zheng B, Lerch HE, Maharaj SV, Bates AL (2002) Health impacts of coal and coal use: possible solutions. *Int J Coal Geol* 50:425–443
- Frazier SW, Nowack KO, Goins KM, Cannon FS, Kaplan LA, Hatcher PG (2003) Characterization of organic matter from natural waters using tetramethylammonium hydroxide thermochemolysis GC-MS. *J Anal Appl Pyrol* 70:99–128
- Fuentes M, González-Gaitano G, García-Mina JM (2006) The usefulness of UV–visible and fluorescence spectroscopies to study the chemical nature of humic substances from soils and composts. *Org Geochem* 37:1949–1959
- Godwin J, Manahan SE (1979) Interchange of metals and organic matter between water and subbituminous coal or lignite under simulated coal slurry pipeline conditions. *Environ Sci Technol* 13:1100–1104
- Gorbaty ML, George GN, Kelemen SR (1990) Chemistry of organically bound sulphur forms during the mild oxidation of coal. *Fuel* 69:1065–1067
- Grasset L, Amblès A (1998) Structural study of soil humic acids and humin using a new preparative thermochemolysis technique. *J Anal Appl Pyrol* 47:1–12
- Hänninen K, Niemelä K (1992) Alkaline degradation of peat humic acids. Part II. Identification of hydrophilic products. *Acta Chem Scand* 46:459–463
- Havelcová M, Sýkorová I, Trejtnarová H, Šulc A (2012) Identification of organic matter in lignite samples from basins in the Czech Republic: geochemical and petrographic properties in relation to lithotype. *Fuel* 99:129–142
- Honěk J, Staněk F, Hoňková K, Jelínek J (2009) Coal seams in the South Moravia Lignite Coalfield. *Acta Montan Slovaca* 14:43–54 (in Czech)

- Jordanidis A, Schwarzbauer J, Georgakopoulos A, van Lagen B (2012) Organic geochemistry of amynteo lignite deposit, northern Greece: a multi-analytical approach. *Geochem Int* 50:159–178
- Jelínek J, Staněk F, Vizi L, Honěk J (2011) Evolution of lignite seams within the South Moravian Lignite Coalfield based on certain qualitative data. *Int J Coal Geol* 87:237–252
- Joll CA, Huynh T, Heitz A (2003) Off-line tetramethylammonium hydroxide thermochemolysis of model compound aliphatic and aromatic carboxylic acids: decarboxylation of some ortho- and/or para-substituted aromatic carboxylic acids. *J Anal Appl Pyrol* 70:151–167
- Kashimura N, Hayashi J, Chiba T (2004) Degradation of a Victorian brown coal in sub-critical water. *Fuel* 83:353–358
- Kelemen SR, Gorbaty ML, Kwiatek PJ (1994) Quantification of nitrogen forms in argonne premium. *Energy Fuel* 8:896–906
- Kelemen SR, Freund H, Gorbaty ML, Kwiatek PJ (1999) Thermal chemistry of nitrogen in kerogen and low-rank coal. *Energy Fuel* 13:529–538
- Kelemen SR, Afeworki M, Gorbaty ML, Kwiatek PJ, Sansone M, Walters CC, Cohen AD (2006) Thermal transformations of nitrogen and sulfur forms in peat related to coalification. *Energy Fuel* 20:635–652
- Korshin GV, Li C, Benjamin MM (1997) Monitoring the properties of natural organic matter through UV spectroscopy: a consistent theory. *Water Res* 31:1787–1795
- Kučerík J, Pekař M, Klučáková M (2003) South-Moravian Lignite—potential source of humic substances. *Pet Coal* 45:58–62
- Lakowicz JR (2006) Principles of fluorescence spectroscopy. Springer, Baltimore
- Lehtonen T, Peuravuori J, Pihlaja K (2000) Characterisation of lake-aquatic humic matter isolated with two different sorbing solid techniques: tetramethylammonium hydroxide treatment and pyrolysis-gas chromatography/mass spectrometry. *Anal Chim Acta* 424:91–103
- Lehtonen T, Peuravuori J, Pihlaja K (2004) Degradative analysis of aquatic fulvic acid: CuO oxidation versus pyrolysis after tetramethylammonium hydroxide treatments in air and helium atmospheres. *Anal Chim Acta* 511:349–356
- Li A, Hu J, Li W, Zhang W, Wang X (2009) Polarity based fractionation of fulvic acids. *Chemosphere* 77:1419–1426
- Maharaj SVM, Orem WH, Tatu CA, Lerch HE III, Szilagyi DN (2014) Organic compounds in water extracts of coal: links to Balkan endemic nephropathy. *Environ Geochem Health* 36:1–17
- McElmurry SP, Voice TC (2004) Screening methodology for coal-derived organic contaminants in water. *Intern J Environ Anal Chem* 84:277–287
- Milata V, Segla P (2007) Vybrané kapitoly molekulovej spektroskopie. Slovenská technická univerzita, Bratislava
- Milori DMBP, Martin-Neto L, Bayer C (2002) Humification degree of soil humic acids determined by fluorescence spectroscopy. *Soil Sci* 167:739–749
- Nakajima T, Kanda T, Fukuda T, Takanashi H, Ohki A (2005) Characterization of eluent by hot water extraction of coals in terms of total organic carbon and environmental impacts. *Fuel* 84:783–789
- Nakajima T, Hasegawa H, Nakamata S, Takanashi H, Ohki A (2008) Mutagenicity of eluent by hot water extraction of various coals: effect of chlorination. *Fuel* 87:3132–3136
- Nanny MA, Ratasuk N (2002) Characterization and comparison of hydrophobic neutral and hydrophobic acid dissolved organic carbon isolated from three municipal landfill leachates. *Water Res* 36:1572–1584
- Orem WH, Feder GL, Finkelman RB (1999) A possible link between Balkan endemic nephropathy and the leaching of toxic organic compounds from Pliocene lignite by groundwater: preliminary investigation. *Int J Coal Geol* 40:237–252
- Painter PC, Coleman MM, Jenkins RG, Whang PW, Walker PL (1978) Fourier transform infrared study of mineral matter in coal. A novel method for quantitative mineralogical analysis. *Fuel* 57:337–344
- Pehlivan E, Arslan G (2007) Removal of metal ions using lignite in aqueous solution—Low cost biosorbents. *Fuel Process Technol* 88:99–106
- Pekař (2009) Fluoride anion binding by natural lignite (South Moravian Deposit of Vienna Basin). *Water Air Soil Poll* 197:303–312
- Petrotou A, Skordas K, Papastergios G, Filippidis A (2012) Factors affecting the distribution of potentially toxic elements in surface soils around an industrialized area of northwestern Greece. *Environ Earth Sci* 65:823–833
- Peuravuori J, Pihlaja K (1997) Molecular size distribution and spectroscopic properties of aquatic humic substances. *Anal Chim Acta* 337:133–149
- Peuravuori J, Žbáňková P, Pihlaja K (2006) Aspect of structural features in lignite humic acids. *Fuel Process Technol* 87:829–839
- Plaza C, Senesi N, Polo A, Brunetti G, García-Gil JC, D’Orazio V (2003) Soil fulvic acid properties as a means to assess the use of pig slurry amendment. *Soil Tillage* 74:179–190
- Reid MC, Davis JW, Minear RA, Sayler GS (1988) Fulvic acid constituents of coal slurry transport wastewater. *Water Res* 22:127–131
- Rodríguez JF, Schlenger P, García-Valverde M (2014) A comprehensive structural evaluation of humic substances using several fluorescence techniques before and after ozonation. Part I: structural characterization of humic substances. *Sci Total Environ* 476–477:718–730
- Senesi N, Miano TM, Provenzano MR, Brunetti G (1991) Characterization, differentiation, and classification of humic substances by fluorescence spectroscopy. *Soil Sci* 152:259–271
- Song Ch, Schobert HH (1996) Non-fuel uses of coals and synthesis of chemicals and materials. *Fuel* 75:724–736
- Straka P, Marinov S, Tyuliev G (2000) X-ray photoelectron spectroscopy of nitrogen and sulfur functionalities in organic substance of coal. *Acta Montana, B* 10:36–44
- Tan KH (2003) Humic matter in soil and the environment. Dekker, New York
- Tanczos I, Rendl K, Schmidt H (1999) The behavior of aldehydes—produced as primary pyrolysis products—in the thermochemolysis with tetramethylammonium hydroxide. *J Anal Appl Pyrol* 49:319–327
- Templier J, Derenne S, Croué JP, Largeau C (2005) Comparative study of two fractions of riverine dissolved organic matter using various analytical pyrolytic methods and a ¹³C CP/MAS NMR approach. *Org Geochem* 36:1418–1442
- Templier J, Miserque F, Barré N, Mercier F, Croué JP, Derenne S (2012) Is nitrogen functionality responsible for contrasted responses of riverine dissolved organic matter in pyrolysis? *J Anal Appl Pyrol* 97:62–72
- Vieth A, Mangelsdorf K, Sykes R, Horsfield B (2008) Water extraction of coals – potential for estimating low molecular weight organic acids as carbon feedstock for the deep terrestrial biosphere. *Geochem* 39:985–991
- Vlčková Z, Grasset L, Antošová B, Pekař M, Kučerík J (2009) Lignite pre-treatment and its effect on bio-stimulative properties of respective lignite humic acids. *Soil Biol Biochem* 41:1894–1901
- Weishaar JL, Aiken GR, Bergamaschi BA, Fram MS, Fujii R, Mopper K (2003) Evaluation of specific ultraviolet absorbance as an indicator of the chemical composition and reactivity of dissolved organic carbon. *Environ Sci Technol* 37:4702–4708

- Wongyai K, Garivait S, Donald O (2013) A geochemistry study of arsenic speciation in overburden from Mae Moh Lignite Mine, Lampang, Thailand. *Environ Earth Sci* 70:2047–2053
- Zelles L (1999) Fatty acid patterns of phospholipids and lipopolysaccharides in the characterisation of microbial communities in soil: a review. *Biol Fert Soils* 29:111–129
- Zhu Q, Money SL, Russell AE, Thomas KM (1997) Determination of the fate of nitrogen functionality in carbonaceous materials during pyrolysis and combustion using X-ray absorption near edge structure spectroscopy. *Langmuir* 13:2149–2157
- Zsolnay A, Baigar E, Jimenez M, Steinweg B, Saccomandi F (1999) Differentiating with fluorescence spectroscopy the sources of dissolved organic matter in soils subjected to drying. *Chemosphere* 38:45–50

Příloha č. 4 – odborný článek v impaktovaném časopise *Organic Geochemistry* (peer-review)

DOSKOČIL, L., ENEV, V., PEKAŘ, M., WASSERBAUER, J. The spectrometric characterization of lipids extracted from lignite samples from various coal basins. *Organic Geochemistry*. 2016, vol. (–), no. (–), p. 1–38.
ISSN: 0146–6380

Manuscript Number: OG-2943R1

Title: The spectrometric characterization of lipids extracted from lignite samples from various coal basins

Article Type: Research Paper

Keywords: lipid; lignite; humic substances; excitation-emission matrix; fluorophore

Corresponding Author: Dr. Leoš Doskočil,

Corresponding Author's Institution: Brno University of Technology

First Author: Leoš Doskočil

Order of Authors: Leoš Doskočil; Vojtěch Enev; Miloslav Pekař; Jaromír Wasserbauer

Abstract: Lipids were extracted from seven different lignite samples and subsequently characterized using spectrometric methods. Excitation-emission matrix (EEM) or total luminescence spectrometry was here used for the first time to study lipids extracted from lignites more extensively. Spectrometric characterization showed that lipids differ from each other depending on the origin of the lignite in which they occur. EEM spectra can be used as fingerprints not only for distinguishing between lipids but also lignites. Lipids contain fluorophores, which participate in the total fluorescence of lignites; some of these also participate in the fluorescence of humic substances. The typical maxima (260-275/370-440 nm) of EEM lipid spectra lie within the A' region, which can be ascribed to aromatic ring systems and steroids. Lipids from South Moravian lignite also contain maxima in the H (255/305 nm) and V (430/475 nm) regions, in contrast to other samples. The first could be related to single aromatic systems and substituents such as carboxyl and carbonyl and the latter is probably the result of intramolecular charge-transfer states.

FTIR and elemental analysis demonstrate the strong aliphatic character of lipids.

Lipids are of rather low molecular weight and exhibit low oxygen content.

Lipids participate in the fluorescence of lignites and humic substances.

EEM lipid spectra have the character of fingerprints.

The typical maxima of lipid fluorophores lie in the range 260–275/370–440 nm.

1 The spectrometric characterization of lipids extracted from lignite samples from various coal
2 basins

3

4 Leoš Doskočil*, Vojtěch Enev, Miloslav Pekař, Jaromír Wasserbauer

5

6 Materials Research Centre, Faculty of Chemistry, Brno University of Technology, Purkyňova

7 118, Brno, 612 00, Czech Republic

8

9 *Corresponding author. E-mail address: doskocil@fch.vutbr.cz (L. Doskočil), tel.

10 +420 541 149 330, fax. 541 149 398

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

25

26 Abstract

27 Lipids were extracted from seven different lignite samples and subsequently characterized
28 using spectrometric methods. Excitation-emission matrix (EEM) or total luminescence
29 spectrometry was here used for the first time to study lipids extracted from lignites more
30 extensively. Spectrometric characterization showed that lipids differ from each other
31 depending on the origin of the lignite in which they occur. EEM spectra can be used as
32 fingerprints not only for distinguishing between lipids but also lignites. Lipids contain
33 fluorophores, which participate in the total fluorescence of lignites; some of these also
34 participate in the fluorescence of humic substances. The typical maxima (260–275/370–440
35 nm) of EEM lipid spectra lie within the A' region, which can be ascribed to aromatic ring
36 systems and steroids. Lipids from South Moravian lignite also contain maxima in the H
37 (255/305 nm) and V (430/475 nm) regions, in contrast to other samples. The first could be
38 related to single aromatic systems and substituents such as carboxyl and carbonyl and the
39 latter is probably the result of intramolecular charge-transfer states.

40

41

42 Keywords

43 lipid, lignite, humic substances, excitation-emission matrix, fluorophore

44

45

46

47

48

49

50

51 1. Introduction

52

53 Lignites are low-rank coals which are formed from original phytomass by peatification
54 followed by coalification and are considered as intermediate forms between peat and
55 bituminous coal. According to one model, coal may be considered a three-dimensional cross-
56 linked macromolecular structure in which relatively lower molecular weight compounds are
57 trapped. These small molecules have been defined as the mobile component in coals and are
58 extractable using organic solvents (Iino, 2000). Another model assumes that coal consists
59 only of coal molecules forming huge associates through non-covalent interactions. An
60 extraction yield of more than 50 % can be achieved by using a suitable solvent mixture
61 including an additive for some bituminous coals. It seems that the structure of lignite is better
62 described by the first-mentioned model (often called a two-phase model) (Iino, 2000). With
63 respect to non-energy applications, lignites have been studied mainly as raw materials for the
64 sorption of toxic elements (Doskočil and Pekař, 2012), for the production of small compounds
65 (Doskočil et al., 2014), and for agricultural purposes (Doskočil et al., 2015, Chassapis et al.,
66 2009).

67 A considerable part of lignite is formed by humic substances (traditionally divided into humic
68 acid, fulvic acid, and humin), of which humic acids predominate (Doskočil and Pekař 2012).
69 Humic substances are naturally occurring biomolecules ubiquitous not only in sediments
70 (peat, coal, leonardite) but also in water and soil and are the subject of intense research.

71 In contrast to humic substances, lipids represent only a minor component of coals. They can
72 be defined as organic substances that are effectively insoluble in water but extractable with
73 non-polar solvents such as chloroform, hexane, benzene, and toluene. Clearly, this broad
74 definition encompasses a wide variety of compound classes (such as fatty acids and their
75 derivatives, waxes, terpenes, steroids etc.). It should be noted that geochemists sometimes use

76 the term bitumen as a synonym for lipid (Lesueur, 2009). Lipids or bitumens are commonly
77 extracted from coals by a variety of different methods including Soxhlet extraction
78 (Papanicolau et al., 2000), accelerated solvent extraction (Životić et al., 2008), and extraction
79 in an ultrasonic bath (Fabiańska, 2004), using a solvent or solvent mixtures such as
80 dichlormethane, chloroform, isohexane/acetone, and dichlormethane/ethanol. Most coals
81 commonly have lipid contents ranging from 2 to 10 wt.% of the coal (Fabiańska and
82 Kurkiewicz, 2013; Havelcová et al., 2012; Stefanova et al., 2011; Papanicolaou et al., 2000).
83 The extracts comprise a complex mixture of nonpolar compounds with potential contributions
84 from compounds produced by living organisms as well as the degradation products of those
85 compounds. The characterization of these extracts on the molecular level by means of gas
86 chromatography coupled to mass spectrometry largely reveals the presence of *n*-alkanes, fatty
87 acids, sesquiterpenoids, diterpenoids, non-hopanoid triterpenoids, hopanoids, and steroids
88 (Stojanović and Životić 2013; Havelcová et al., 2012; Stefanova et al., 2011, 2002; Životić et
89 al., 2008; Fabiańska, 2004).

90 Ultraviolet-visible (UV-Vis) and Fourier transform infrared (FTIR) spectrometry are the most
91 frequently used tools in spectrometric characterization and can be very useful in the study of
92 organic matter (Fuentes, 2006). A similarly reliable technique is fluorescence spectrometry,
93 which provides important information on the structural nature of organic substances (e.g.
94 functional groups, polycondensation, aromaticity) based on variances in the positions, shifts
95 and intensities of fluorescence peaks. In addition, it is a simple, rapid, sensitive and non-
96 destructive method requiring only a small volume of sample at a low concentration. In the
97 literature, several fluorescence techniques have been applied to the study of coal extracts –
98 from conventional emission spectrometry (emission scan fluorescence) to more recent and
99 comprehensive methods such as synchronous fluorescence spectrometry and total
100 luminescence spectrometry (or excitation-emission matrix, EEM) (Kashimura et al., 2004;

101 Mille et al., 1988; von der Dick and Kalkreuth, 1986). Of these fluorescence techniques,
102 synchronous fluorescence spectrometry is probably the most widely used in the study of
103 extracts of raw coals and modified coals (preheating, oxidation, demineralization etc.), coal
104 liquefaction, and tar (Kashimura et al., 2004; Kister and Pieri 1996; Mille et al. 1988; von der
105 Dick and Kalkreuth, 1986). This technique has been successfully applied in the determination
106 of polyaromatic hydrocarbon families or certain polyaromatic hydrocarbons (Matuszewska
107 and Czaja, 2000; Kister and Pieri, 1996).

108 In their study of extracts, Mille et al. (1988) reported that it is possible to show clearly the
109 differences among coals of different ranks using fluorescence spectrometry. However, it is not
110 clear whether fluorescence spectrometry can also be used to fingerprint extracts (such as
111 lipids) from various lignites, as experimental data are missing. The utilization of total
112 luminescence spectrometry for the analysis of coal extracts is of a marginal interest (von der
113 Dick et al., 1986), in spite of the fact that EEM provides a global and complete view of
114 fluorescence spectra from substances in the form of three-dimensional contour plots of
115 fluorescence intensity as a function of excitation and emission wavelengths (Rodríguez et al.,
116 2013).

117 The goal of this work was to extract and characterize lipids from different lignites and to
118 reveal differences among them by means of rapid and relatively simple spectrometric
119 methods. In the present work, excitation-emission matrix (EEM) spectrometry was used for
120 the first time to study lipids extracted from lignites more extensively and shown to be a
121 valuable source of new knowledge relating not only to lipids but also to lignites and their
122 major components (i.e. humic acids).

123

124

125

126 2. Materials and Methods

127

128 Seven lignite samples from different coal basins were selected for the extraction of lipids. The
129 selected basins were Chucurovo and Maritza East (Bulgaria), Krepoljin and Kostolac (Serbia),
130 Konin (Poland), and the South Moravian Coalfield (the northern part of the Vienna basin in
131 the Czech Republic). Two lignites from the Kazimierz (code sample K1) and Lubstów (code
132 sample L2) mines belonging to the Konin basin were also subject to extraction; the codes
133 correspond to the designation used in Fabiańska and Kurkiewicz, 2013. Detailed
134 characteristics of all the abovementioned lignites, including their geochemical and
135 petrographic descriptions, have been published elsewhere (Doskočil et al., 2015; Stojanović
136 and Životić 2013; Fabiańska and Kurkiewicz, 2013; Havelcová et al., 2012; Stefanova et al.,
137 1995, 2002, 2005).

138 The lignite samples were finely milled (to a grain size of under 0.2 mm) and Soxhlet extracted
139 for 36 h using trichloromethane as a solvent. The samples (ca. 40 g) were then placed in a
140 cellulose thimble. The lipids isolated from the lignites were collected and concentrated by a
141 rotary evaporator. The resulting dark brown extracts were dried in a desiccator with Na₂SO₄.
142 The data in Table 1 represent mean values from two replicates.

143 The elemental composition was determined by a CHNS-O EA 3000 Elemental Analyzer. The
144 % oxygen content was calculated as the difference $[100 - (C + H + N)\%]$, and the data
145 obtained were corrected for moisture and ash content.

146 UV-Vis spectra were obtained on a Hitachi U-3900H UV/Vis spectrophotometer by recording
147 the absorption spectra between 200 nm and 900 nm. Samples were measured in a 10 mm
148 quartz cuvette and were blanked against chloroform.

149 FTIR spectra from lipids were obtained in Attenuated Total Reflection (ATR) mode using a
150 Nicolet iS50 spectrometer. Samples were dissolved in chloroform at a concentration of ca.

151 120 mg·L⁻¹. All spectra were recorded over the range 4000–400 cm⁻¹ at 4 cm⁻¹ resolutions
152 and were the averages of 128 scans. The spectrum for air on a clean dry ATR diamond crystal
153 was used as the background for infrared measurement. Thermo Scientific Omnic spectroscopy
154 software was used to obtain the spectra and Advanced ATR algorithm corrections were
155 applied to band intensity distortion, peak shifts, and non-polarization effects.

156 For fluorescence measurements, lipids were dissolved in chloroform at a concentration of 75
157 mg·L⁻¹. All spectra were performed on a Fluorolog fluorescence spectrophotometer with a
158 scan speed of 600 nm·min⁻¹, using excitation and emission slit bandwidths of 5 nm. The
159 excitation-emission matrix (EEM) spectra were obtained by scanning the emission and
160 excitation wavelengths over the range 250–600 nm, with the emission and excitation
161 increment set at 5 nm. The sample cell with lipid solution was kept at a temperature of 20 °C
162 during each measurement. Primary and secondary inner filter effects were corrected. The
163 fluorescence intensity values of samples (in counts per second, CPS) were corrected using the
164 method devised by Lakowicz (2006).

165

166

167 3. Results and discussion

168

169 3.1. Yields and elemental analysis

170

171 The lipid extraction yields obtained from Soxhlet extraction with chloroform are shown in
172 Table 1. The content of free lipids in lignites ranged from 1% to 9% in dependence on the
173 origin of the lignite. The highest extraction yields (9.0% and 7.8%) were achieved for lipids
174 isolated from Chucurovo and Maritza East lignites from Bulgaria. In contrast, the lowest
175 yields (1.0% and 2.1%) were observed for lipids extracted from Kostolac lignite and South

176 Moravian lignite. The observed lipid content was consistent with the literature for coals
177 (Stojanović and Životić, 2013; Havelcová et al., 2012; Stefanova et al., 2011, Papanicolaou et
178 al., 2000). Fabiańska and Kurkiewicz (2013) reported that there is no clear relationship
179 between lignite lithotype/maceral composition and extraction yield, nor between a particular
180 brown coal mine and lignite extraction yield. It should be noted that the procedure we used
181 only extracts free lipids.

182 The elemental composition in atomic percentages and the H/C and O/C atomic ratios of lipids
183 isolated from lignites are reported in Table 1. The lipids studied in this work were mainly
184 composed of hydrogen (about 59 at.%), carbon (about 36 at.%), and a smaller amount of
185 oxygen (about 6 at.%). Nitrogen is either absent or represents a minority component of lipids.
186 Thus, it appears that nitrogen compounds are poorly extractable with chloroform or form an
187 integral part of lignite structure. The calculated H/C ratios indicate the prevailing aliphatic
188 character of lipids. Lipid isolated from K1 lignite exhibited the strongest aliphatic character,
189 while the greatest degree of aromaticity was observed for lipid extracted from Chucurovo
190 lignite. Values of O/C ratios represent the amounts of oxygen functional groups in lipids.
191 Table 1 shows that the amount of oxygen functional groups in lipids is low. The highest O/C
192 ratio was found for lipid isolated from Maritza East lignite.

193

194 3.2. UV-Vis spectrometry

195

196 The UV–Vis absorbance spectra of chloroform extracts from lignites are shown in Fig. 1. The
197 spectra (except those for lipids extracted from K1 and L2 lignites) are featureless and
198 characterized by the absence of maxima and/or minima; absorbance decreases with increasing
199 acquisition wavelength. These spectra contain only generally recognizable shoulders. In the
200 spectrum of lipid from South Moravian lignite, a pronounced shoulder is visible in the range

201 from 325 nm to 365 nm, which is centred at around 330 nm and 350 nm. The shoulder at
202 around 330 nm is also present in the spectra of lipids from K1, L2 and Maritza East lignites.
203 Lipids from K1 and L2 lignites have two obvious absorption maxima, the first located at 265
204 nm and the second at 275 nm. These maxima can be related to two or more different
205 chromophores occurring in these lipids. First-order derivatives of the absorption spectra
206 revealed that other lipids also absorb at 275 nm. However, in their case, the absorption
207 appears as a shoulder due to the effects of other chromophores. Thus, the identical absorption
208 values for shoulders and peaks indicate that lipids contain structural units of the same
209 chemical origin. Absorbance above 500 nm in UV-Vis spectra is minimal or equal to zero.
210 Hence, we can suppose that extracts do not comprise extended conjugations in aliphatic or
211 polyaromatic structures (Fuentes et al., 2006).

212

213 3.3. FTIR spectrometry

214

215 The ATR-FTIR spectra of lipid samples are shown in Fig. 2. Although the examined samples
216 were extracted from lignites with variable deposits and from different basins, strong
217 similarities among the ATR-FTIR spectra of lipids were observed. Interpretation of the
218 absorption bands was performed as described in the literature (Milata and Segl'a, 2007).
219 Spectra of lipids are mainly characterized by bands of aliphatic groups. Very pronounced
220 bands at 2918 cm^{-1} and 2849 cm^{-1} were ascribed to asymmetric and symmetric C-H
221 stretching in methylene groups. Bands of asymmetric (2955 cm^{-1}) and symmetric (2868 cm^{-1})
222 stretching in methyl groups were only observed for lipids extracted from Chucurovo and
223 Kostolac lignites; in other cases, they occur as shoulders. The presence of long carbon chains
224 with four atoms, or more than four atoms (e.g fatty acids), was revealed by the band at 720
225 cm^{-1} , which is absent in the case of lipid from Chucurovo lignite. Thus, the results suggest

226 that methyl groups predominate over methylene groups in the lipid from Chucurovo lignite,
227 which tends to form a greater number of shorter carbon chains. Such an interpretation is
228 supported by the $I_{\text{CH}_2/\text{CH}_3}$ ratio (the intensity at 2918 cm^{-1} to the intensity at 2955 cm^{-1}),
229 which was used to estimate the length and degree of branching of aliphatic chains (Guo and
230 Bustin, 1998). The intensity ratio (Table 1) showed that longer and less branched aliphatic
231 chains were found in lipid from K1 lignite compared with lipids from other samples.
232 Deformation vibrations of methylene and methyl groups were also present in all spectra at
233 1463 cm^{-1} and 1377 cm^{-1} .

234 The bands at 1610 cm^{-1} and 1510 cm^{-1} are assigned to stretching C=C groups in the aromatic
235 ring and the most intense bands are observed for lipid from Chucurovo lignite. Three out-of-
236 plane C-H deformation bands are found in the $900\text{--}700\text{ cm}^{-1}$ region. These bands are assigned
237 to aromatic structures with isolated aromatic hydrogens (891 cm^{-1}), two adjacent hydrogens
238 per ring (833 cm^{-1}), and four adjacent hydrogens (756 cm^{-1}). The first two bands are missing
239 in the spectra of lipids from K1 and L2 lignites. Of all the spectra, the band at 756 cm^{-1} had
240 the highest intensity for lipids isolated from Chucurovo and South Moravian lignites,
241 reflecting the occurrence of di-substituted aromatic rings. The degree of aromaticity was
242 determined using the $I_{\text{Ar}}/I_{\text{Al}}$ ratio (the intensity at 1510 cm^{-1} to the intensity at 2918 cm^{-1}).
243 With respect to all samples, the aromaticity was the highest for lipid extracted from
244 Chucurovo lignite and the lowest for lipid extracted from K1 lignite. These results are in good
245 agreement with the elemental analysis (H/C ratios); see Table 1.

246 Lipids have a lower oxygen content, which is reflected by the lower intensities of the bands of
247 OH groups (occurring at around 3363 cm^{-1}) in the spectra. The presence of esters was
248 confirmed by the band at 1736 cm^{-1} in all spectra (except the spectrum for lipid from
249 Chucurovo lignite). Carboxylic groups are responsible for the band at 1710 cm^{-1} . The
250 shoulder at around 1653 cm^{-1} can be ascribed to conjugated carbonyl groups. Several bands

251 are situated in the range 1300–1000 cm^{-1} , which can be attributed to other oxygen functional
252 groups. In this zone, the two most intense bands at 1172 cm^{-1} and 1220 cm^{-1} are related to the
253 C-O stretching of phenols and ethers, and the C-O stretching and O-H bending of carboxylic
254 acids, phenoxy structures, and ethers. The band at 1267 cm^{-1} is attributed to C-O stretching in
255 aryl ethers. The appearance of bands at 1116 cm^{-1} and 1038 cm^{-1} indicates the presence of
256 alcohols (secondary and primary) and aliphatic ethers.

257

258 3.4. Fluorescence spectrometry

259

260 The fluorescence spectra or EEM contour maps of the lipids (see Fig. 3) were not corrected
261 for Rayleigh scattering peaks, appearing in the form of diagonal bands; first order and second
262 order Rayleigh scattering peaks occur at the same wavelength as the excitation light and twice
263 this wavelength, respectively.

264 The first notable fact derived from the EEM spectra is that lipids contain fluorophores which
265 ultimately participate in the fluorescence of lignites. Individual EEM spectra are characterized
266 by peaks of maximum intensity which differ in their number and position. These maxima
267 correspond to specific fluorophores or fluorophore families. The values of the fluorescence
268 intensities and excitation-emission wavelength pairs of the main peaks in the EEM spectra are
269 presented in Table 2. For lipids from lignites, the maxima are mainly located at excitation
270 wavelengths in the ultraviolet region (around 260 nm). In the visible region (at an excitation
271 wavelength 430 nm) only one maximum was observed for all EEM spectra (i.e. the spectrum
272 for lipid extracted from South Moravian lignite). In the literature, several fluorescence peaks
273 have been reported, such as peak A at 240–260/400–460 nm (excitation/emission wavelength
274 pair), peak C at 320–360/420–460 nm, peak M at 290–310/370–410 nm, peak B at 270–
275 280/300–315 nm, and peak T at 270–280/345–360 nm (Birdwell and Engel, 2010).

276 From the described domains, Fig. 3 shows that the fluorescence of lipids lies predominantly in
277 the region of peak A, which is characteristic of humic substances (Enev et al., 2014;
278 Rodríguez et al., 2013). Because lipids have, in most cases, lower emission wavelengths
279 compared to humic substances (440 nm and less), we chose the designation A' for all maxima
280 located in the ultraviolet region (except for the maximum at 255/305 nm). A certain degree of
281 similarity between the positions of the peak A and peak A' regions in the EEM spectra evokes
282 the idea that some lipids can contribute their fluorophores to the total fluorescence of humic
283 substances in the ultraviolet region of peak A. Unfortunately, no attention has so far been paid
284 to lipids extracted from humic acids in the context of spectrometric characterization, although
285 lipids have recently been the subject of relatively intensive study (Chilom et al., 2009; Kohl
286 and Rice, 1999). The maximum at 255/305 nm for lipid from South Moravian lignite
287 represents essentially an isolated fluorophore (or fluorophores) in the ultraviolet region;
288 therefore, we denote the maximum of this fluorescent domain as peak H.

289 Likewise, the appearance of the maximum for lipid from the South Moravian lignite in the
290 visible region has no analogy among the other EEM lipid spectra. Coble (1996) introduced the
291 terminology peak C for EEM spectra of humic substances if their maximum is situated in the
292 visible region at excitation wavelengths in the range of 300–400 nm. However, there are
293 maxima having excitation wavelengths higher than 400 nm (including those for lipids as well
294 as humic acids isolated from lignites) (Tamamura et al., 2015; Enev et al., 2014.). It is evident
295 that the origin of these peaks is different to the origin of peaks in the case of peak C (Enev et
296 al., 2014). Therefore, we propose the designation V for this region ($\lambda_{\text{ex}} \geq 400$ nm, $\lambda_{\text{em}} \geq 470$
297 nm), based on excitation in the violet region of the visible spectrum. The comparison of EEM
298 spectra of lipid from South Moravian lignite with EEM spectra of humic acids isolated from
299 the same lignite (made in a previous study, see Enev et al., 2014) suggests that lipids may
300 also participate in the fluorescence of humic acids in the region with excitation wavelengths

301 higher than 400 nm. On the other hand, the presence of maxima with an emission wavelength
302 greater than 470 nm is in accord with previous studies that suggest that such maxima originate
303 from intramolecular charge-transfer states, rather than from independent fluorophores in lipids
304 and humic substances (Boyle et al., 2009; Vecchio and Blough, 2004). This suggestion is also
305 supported by the results of our experiments involving UV-Vis spectrometry.

306 A more detailed view of the EEM spectra and their fluorescence maxima reveals that they
307 differ from each other in contour plots and the values of their excitation/emission wavelength
308 pairs. Hence, EEM spectra have the character of a fingerprint and can also be used to rapidly
309 distinguish between lipids of different lignite origin, as well as between lignite samples
310 themselves. So far, published literature has only reported that it is possible to distinguish coal
311 extracts of different rank (Mille et al., 1988). Subtle variations in EEM spectra are observed
312 mainly in the case of lipids from the Chucurovo, Maritza East, and Krepoljin lignites. These
313 lipids are characterized by significant spectral overlapping and peak broadening due to their
314 multicomponent nature. By contrast, this is not observed in the case of lipids extracted from
315 K1 and L2 lignites, in accordance with the results of the UV-Vis spectrometry experiments.
316 Thus, we suppose that lipids from K1 and L2 lignites are formed by a very small number of
317 individual fluorophores.

318 For lipids, typical maxima lie within the A' region and are thus restricted to wavelengths in
319 the range 260–275/370–440 nm, indicating the similarity between lipids with respect to their
320 components and structures.

321 Some maxima for different lipids occur at the same excitation/emission positions (primarily
322 260/440 nm), implying that fluorophores in these lipids are either the same or from the same
323 fluorophore family.

324 With respect to the variable effects of wavelength and fluorescence intensity, various
325 structural units in the lipids can be found. At nearly the same excitation wavelength, the peaks

326 in region A' shift toward a longer emission wavelength while the fluorescence intensity
327 decreases. The shorter emission wavelengths (in this work, 350–400 nm) and higher
328 fluorescence intensities measured in the EEM spectra can be associated with low aromatic
329 content, low molecular weight components, and electron-donating groups such as hydroxyls
330 and alkoxy groups. By contrast, the longer emission wavelengths (in this work, 400–450 nm) and
331 lower intensities measured for the fluorescence peaks of lipids can indicate the presence of
332 condensed aromatic rings and electron-withdrawing groups such as carboxyl and carbonyl
333 groups. It is well-known that polycyclic aromatic hydrocarbons fluoresce at wavelengths
334 ranging from 310 to >400 nm when subject to excitation at 245–280 nm (Bugden et al.,
335 2008). According to previous studies, aromatic ring systems may be interpreted such that
336 lower emission wavelengths between 350 and 400 nm (centered at approximately 380 nm)
337 could be associated with three-ring aromatic structures, whereas higher emission wavelengths
338 between 400 and 450 nm (centered at approximately 440 nm) could be associated with four-
339 ring aromatic structures (Wang et al., 2012; Bugden et al., 2008; Kashimura et al., 2004;
340 Koster and Pieri, 1996). The GC-MS analysis of some lipids has revealed that they can be
341 comprised of compounds with different numbers of aromatic rings (one to five), such as
342 aromatic sesquiterpenoids (e.g. cuparane, cadalene), aromatic diterpenoids (e.g. simonellite,
343 retene), and other aromatic hydrocarbons (naphthalene, phenanthrene, dibenzofurans, pyrene,
344 fluoranthene, chrysene, perylene) (Stojanović and Životić, 2013; Fabiańska and Kurkiewicz,
345 2013; Havelcová et al., 2012; Stefanova et al., 2011; Životić et al., 2008).

346 Peak H (255/305 nm), occurring only in lipid from South Moravian lignite, exhibited the
347 lowest emission wavelength of all EEM spectra and a lower fluorescence intensity than the
348 peaks in region A' of this lipid. Therefore, the maximum position could be related to single
349 aromatic systems and substituents such as carboxyl and carbonyl.

350 Peak V had the lowest fluorescence intensity of all maxima observed in the EEM spectrum of
351 lipid from South Moravian lignite and the highest emission wavelength compared with other
352 lipids. As mentioned earlier, the origin of peak V is given by intramolecular charge-transfer
353 states, rather than by independent fluorophores. Some authors (e.g. Peuravuori et al., 2002)
354 have suggested that fluorescence at long wavelengths with low intensity could be related to
355 the presence of linearly condensed aromatic rings.

356 Earlier works attribute maxima only to aromatic ring systems; however, on the basis of
357 published literature, various model organic compounds may also be proposed as possible
358 fluorophores responsible for the fluorescence of lipids. Equilenin, 5 α -pregnan-3-ol-2-one,
359 mescaline, cannabinal, and 5 α -androstane-3-one with maxima centred at 250/370 nm, 268/406
360 nm, 273/315, 356 nm, 280/318, and 288/413 nm, respectively, could represent classes of
361 fluorophores linked to region A' (Ma and Green, 2008; Ichinose et al., 1991; Wolfbeis, 1985).
362 They comprise a structure comprising both substituted aromatic compounds and steroids. The
363 above list is intended to demonstrate the diversity of mixtures which could contribute to lipid
364 fluorescence. Certainly, other fluorophores may have EEM spectra in these spectral regions.
365 In addition, lipid fluorescence is complex because the sum of fluorescences of individual
366 components in a mixture is not necessarily equivalent to the fluorescence of the whole.
367 Specifically, overlapping excitation/emission peaks of various components can result in
368 energy transfer, charge migration, structural reorganization, or some combination of these,
369 which can quench the fluorescence of the donor and produce fluorescence in the acceptor (Ma
370 and Green, 2008).

371

372

373 4. Conclusions

374

375 In this study, different yields of lipids ranging from 1% to 9% were extracted from lignites of
376 different origin. Lipids have a predominantly aliphatic character, which was most and least
377 evident for lipids isolated from K1 and Chucurovo lignites, respectively. The oxygen content
378 of lipids was low and included oxygen functional groups such as carboxyls, hydroxyls
379 (including phenols), esters, ethers, and conjugated carbonyls. Lipid from Chucurovo lignite
380 tends to form a greater number of shorter carbon chains compared with other samples. Lipids
381 contain fluorophores, which participate in the total fluorescence of lignites. The EEM spectra
382 show that fluorophores occur predominantly in region A' (the ultraviolet region of the
383 excitation wavelength) and typical maxima are in the range 260–275/370–440 nm. The
384 exception among the studied lipids was that isolated from South Moravian lignite, which also
385 contained maxima in the H (255/305 nm) and V (430/475 nm) regions, unlike other samples.
386 Some maxima were at the same, or very similar excitation/emission positions, which implies
387 that the fluorophores were of the same form, or from very similar fluorophore families. The
388 EEM spectra of lipids can be used as fingerprints to distinguish between lipids extracted from
389 different lignites and between lignites themselves. Lipids from the K1 and L2 lignites are
390 probably formed by a very small number of individual fluorophores, while other lipids are
391 mainly characterized by the mutual effects of other fluorophores. It seems that region A' is
392 chiefly rich in aromatic ring systems with three to four rings. In contrast, region H is mainly
393 formed by simple molecules, while region V can be related either to linearly condensed
394 aromatic rings or more probably to intramolecular charge-transfer states. With respect to
395 model compounds, region A' can be ascribed not only to aromatic systems but also to steroids.
396 The results suggest that lipids participate in the fluorescence of humic substances in region A
397 and probably also to some degree in region V.
398 Spectrometric characterization is a useful and relatively quick way of obtaining new
399 knowledge, especially the application of the EEM method.

400
401
402
403
404
405
406
407
408
409
410
411
412
413
414
415
416
417
418
419
420
421
422
423
424

Acknowledgments

The authors would like to thank Prof. M. Stefanova, Prof. D. Životić, and Prof. M. Fabiańska for supplying the lignite samples. This work was supported by project Nr. LO1211, Materials Research Centre at FCH BUT- Sustainability and Development (National Programme for Sustainability I, Ministry of Education, Youth and Sports).

425 References

426

427 Birdwell, J.E., Engel, A.S., 2010. Characterization of dissolved organic matter in cave and
428 spring waters using UV–Vis absorbance and fluorescence spectroscopy. *Org. Geochem.*
429 41(3), 270-280. doi: 10.1016/j.orggeochem.2009.11.002.

430

431 Chassapis, K., Roulia, M., Tsirigoti, D., 2009. Chemistry of metal–humic complexes
432 contained in Megalopolis lignite and potential application in modern organomineral
433 fertilization. *Int. J. Coal. Geol.* 78 (4), 288–295. doi: 10.1016/j.coal.2009.03.004.

434

435 Chilom, G., Bruns, A.S., Rice, J.A., 2009. Aggregation of humic acid in solution:
436 Contributions of different fractions. *Org. Geochem.* 40(4), 455-460. doi:
437 10.1016/j.orggeochem.2009.01.010.

438

439 Coble, P.G., Mastalerz, M., Brassell, S.C., et al., 1996. Characterization of marine and
440 terrestrial DOM in seawater using excitation-emission matrix spectroscopy. *Mar. Chem.* 51
441 (4), 325-346. doi: 10.1016/0304-4203(95)00062-3.

442

443 Doskočil, L., Grasset, L., Enev, V., et al., 2015. Study of water-extractable fractions from
444 South Moravian lignite. *Environ. Earth Sci.* 73 (7), 3873-3885. doi: 10.1007/s12665-014-
445 3671-1.

446

447 Doskočil, L., Grasset, L., Válková, D., Pekař, M., 2014. Hydrogen peroxide oxidation of
448 humic acids and lignite. *Fuel* 134, 406-413. doi: 10.1016/j.fuel.2014.06.011.

449

450 Doskočil, L., Pekař, M., 2012. Removal of metal ions from multi-component mixture using
451 natural lignite. *Fuel Process. Technol.* 101, 29-34. doi: 10.1016/j.fuproc.2012.02.010.
452

453 Enev, V., Pospíšilová, L., Klučáková, M., et al., 2014. Spectral characterization of selected
454 humic substances. *Soil Water. Res.* 9 (1), 9-17.
455

456 Fabiańska, M.J., Kurkiewicz, S., Velinova, D., et al., 2013. Biomarkers, aromatic
457 hydrocarbons and polar compounds in the Neogene lignites and gangue sediments of the
458 Konin and Turoszów Brown Coal Basins (Poland). *Int. J. Coal Geol.* 107, 24-44. doi:
459 10.1016/j.coal.2012.11.008.
460

461 Fabiańska, J.M., Magnier, C., Velinova, D., et al., 2004. GC–MS investigation of distribution
462 of fatty acids in selected Polish brown coals. *Chemometr. Intell. Lab.* 72 (2), 241-244. doi:
463 10.1016/j.chemolab.2004.01.019.
464

465 Furmann, A., Mastalerz, M., Brassell, S.C., et al., 2013. Extractability of biomarkers from
466 high- and low-vitrinite coals and its effect on the porosity of coal. *Inter. J. Coal Geol.* 107,
467 141-151. doi: 10.1016/j.coal.2012.09.010.
468

469 Havelcová, M., Sýkorová, I., Trejtnarová, H., Šulc, A., 2012. Identification of organic matter
470 in lignite samples from basins in the Czech Republic: Geochemical and petrographic
471 properties in relation to lithotype. *Fuel* 99, 129-142. doi: 10.1016/j.fuel.2012.03.025.
472

473 Ichinose, N., et al., 1991. *Fluorometric Analysis in Biomedical Chemistry: Trends and*
474 *Techniques Including HPLC Applications*, John Wiley and Sons, New York.

475

476 Iino, M., 2000. Network structure of coals and association behavior of coal-derived materials.
477 Fuel Process. Technol. 62 (2-3), 89-101. doi: 10.1016/S0378-3820(99)00120-4.

478

479 Kashimura, N., Hayashi, J-ichiro, Li, C-Z., et al., 2004. Evidence of poly-condensed aromatic
480 rings in a Victorian brown coal. Fuel 83 (1), 97-107. doi: 10.1016/S0016-2361(03)00243-6.

481

482 Kister, J., Pieri, N., Alvarez, R., et al., 1996. Effects of Preheating and Oxidation on Two
483 Bituminous Coals Assessed by Synchronous UV Fluorescence and FTIR Spectroscopy.
484 Energ. Fuel. 10 (4), 9458-957. doi: 10.1021/ef950159a.

485

486 Kohl, S.D., Rice, J.A., 1999. Contribution of lipids to the nonlinear sorption of polycyclic
487 aromatic hydrocarbons to soil organic matter. Org. Geochem. 30 (8), 929-936. doi:
488 10.1016/S0146-6380(99)00076-5.

489

490 Lakowicz, J.R., 2006. Principles of fluorescence spectroscopy. Springer, Baltimore.

491

492 Lesueur, D., 2009. The colloidal structure of bitumen: Consequences on the rheology and on
493 the mechanisms of bitumen modification. Adv. Colloid Interfac. 145 (1-2), 42-82. doi:
494 10.1016/j.cis.2008.08.011.

495

496 Ma, X., Green, S.A., García-Valverde, M., 2008. Fractionation and spectroscopic properties
497 of fulvic acid and its extract: Structural characterization of humic substances. Chemosphere
498 72 (10), 1425-1434. doi: 10.1016/j.chemosphere.2008.05.029.

499

500 Matuszewska, A., Pieri, N., Alvarez, R., et al., 1996. Aromatic compounds in molecular phase
501 of Baltic amber—synchronous luminescence analysis. *Talanta* 56 (6) 1049-1059. doi:
502 10.1016/S0039-9140(01)00610-5.

503

504 Mille, G., Guiliano, M., Kister, J., et al., 1988. Analysis and evolution of coals: UV
505 fluorescence spectroscopy study (demineralized coals-oxidized coals). *Org. Geochem.* 13 (4-
506 6), 947-952. doi: 10.1016/0146-6380(88)90276-8.

507

508 Papanicolaou, C., Dehmer, J., Fowler, M., et al., 2000. Petrological and organic geochemical
509 characteristics of coal samples from Florina, Lava, Moschopotamos and Kalavryta coal fields,
510 Greece. *Inter. J. Coal Geol.* 44 (3-4), 267-292. doi: 10.1016/S0166-5162(00)00014-8.

511

512 Peuravuori, J., Koivikko, R., Pihlaja, K., 2002. Characterization, differentiation and
513 classification of aquatic humic matter separated with different sorbents: synchronous scanning
514 fluorescence spectroscopy. *Water Res.* 36 (18), 4552-4562. doi: 10.1016/S0043-
515 1354(02)00172-0.

516

517 Rodríguez, F.J., Schlenger, P., García-Valverde, M., 2014. A comprehensive structural
518 evaluation of humic substances using several fluorescence techniques before and after
519 ozonation. Part I: Structural characterization of humic substances. *Sci Total Environ.* 476-477,
520 718-730. doi: 10.1016/j.scitotenv.2013.11.150.

521

522 Stefanova, M., Ivanov, D.A., Utescher, T., et al., 2011. Geochemical appraisal of
523 palaeovegetation and climate oscillation in the Late Miocene of Western Bulgaria. *Org.*
524 *Geochem.* 42 (11), 1363-1374. doi: 10.1016/j.orggeochem.2011.08.015.

525

526 Stefanova, M., Markova, K., Marinov, S., Simoneit, B.R.T., 2005. Molecular indicators for
527 coal-forming vegetation of the Miocene Chukurovo lignite, Bulgaria. *Fuel* 84 (14-15), 1830-
528 1838. doi: 10.1016/j.fuel.2005.04.009.

529

530 Stefanova, M., Oros, D.R., Otto, A., et al., 2002. Polar aromatic biomarkers in the Miocene
531 Maritza-East lignite, Bulgaria. *Org. Geochem.* 33 (9), 1079-1091. doi: 10.1016/S0146-
532 6380(02)00084-0.

533

534 Stefanova, M., Magnier, C., Velinova, D., et al., 1995. Biomarker assemblage of some
535 Miocene-aged Bulgarian lignite lithotypes. *Org. Geochem.* 23 (11-12), 1067-1084. doi:
536 10.1016/0146-6380(95)00080-1.

537

538 Stojanović, K., Životić, D., 2013. Comparative study of Serbian Miocene coals — Insights
539 from biomarker composition. *Inter. J. Coal Geol.* 107, 3-23. doi: 10.1016/j.coal.2012.09.009.

540

541 Von Der Dick, H., Kalkreuth, W., 1986. Synchronous excitation and three-dimensional
542 fluorescence spectroscopy applied to organic geochemistry. *Org. Geochem.* 10 (1-3), 633-
543 639. doi: 10.1016/0146-6380(86)90060-4.

544

545 Wang, Z., Wei, C., Shui, H., et al., 2012. Synchronous fluorimetric characterization of heavy
546 intermediates of coal direct liquefaction. *Fuel* 98, 67-72. doi: 10.1016/j.fuel.2012.03.046.

547

548 Wolfbeis, O.S., 1985. The fluorescence of organic natural products, in: Schulman, S.G. (Ed.),
549 *Molecular luminescence spectroscopy, Part 1.* John Wiley, New York, pp 160-370.

550

551 Životić, D., Wehner, H., Cvetković, O., et al., 2008. Petrological, organic geochemical and
552 geochemical characteristics of coal from the Soko mine, Serbia. *Inter. J. Coal Geol.* 73 (3-4),
553 285-306. doi: 10.1016/j.coal.2007.07.001.

554

555

556

557

558

559

560

561

562

563

564

565

566

567

568

569

570

571

572

573

574

575 Table captions

576

577 Table 1. Lipid yields, results of elemental analysis, and calculated ratios.

578

579 Table 2. Positions of excitation-emission wavelength pairs for fluorescence peaks and values
580 of fluorescence intensities for lipids isolated from different lignites.

581

582

583

584

585

586

587

588

589

590

591

592

593

594

595

596

597

598

599

600 Figure captions

601

602 Fig. 1. UV-Vis spectra of lipids extracted from various lignite samples. The spectra are only
603 displayed in the 250–600 nm range.

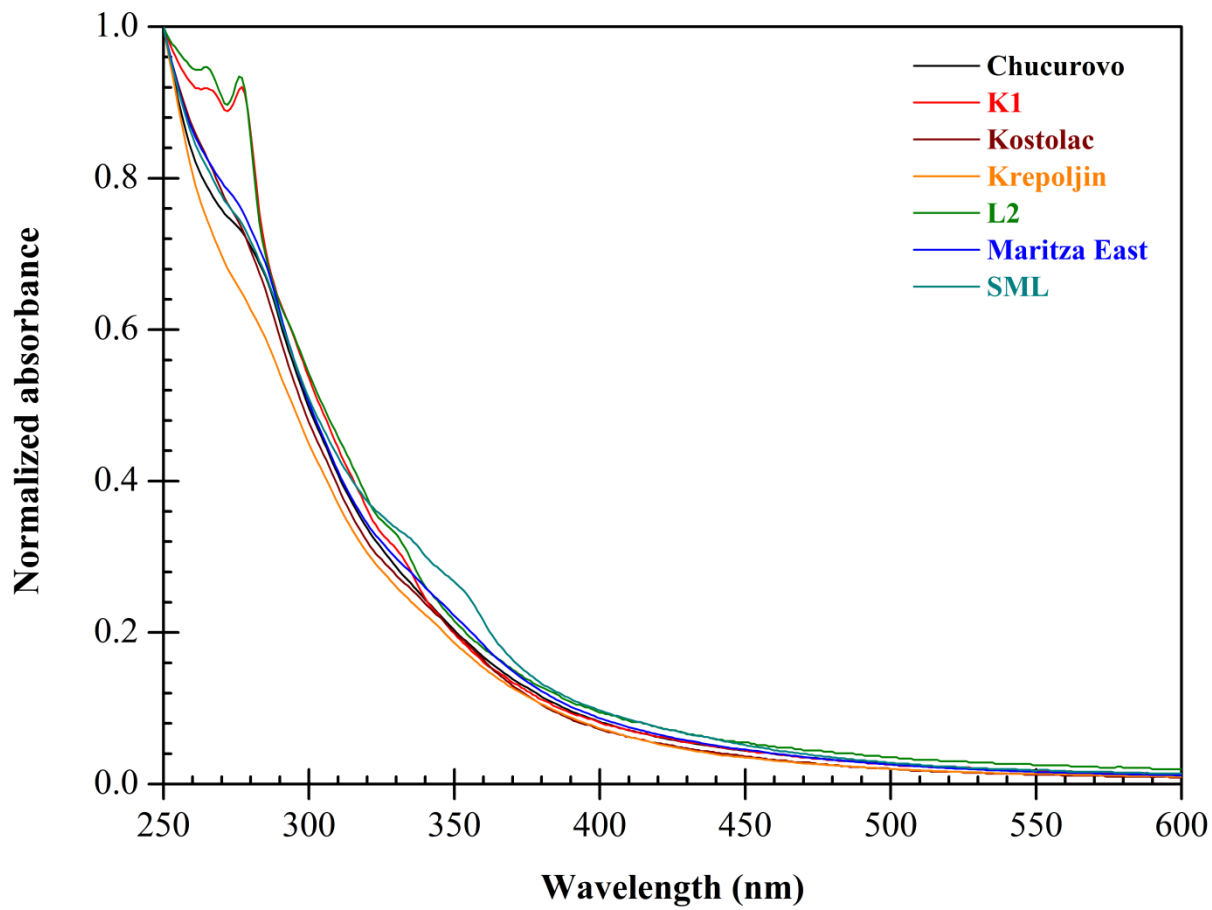
604

605 Fig. 2. FTIR spectra of lipids extracted from various lignite samples.

606

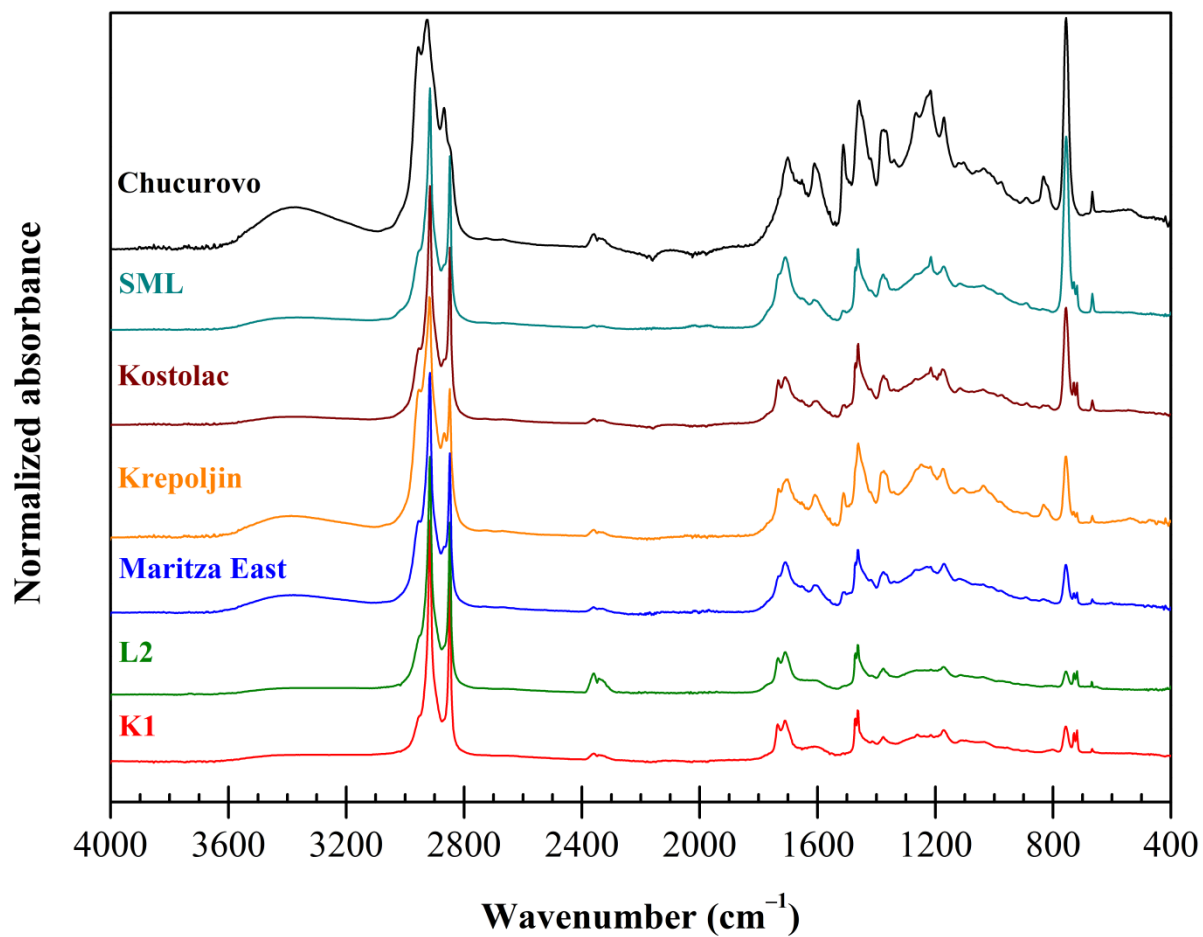
607 Fig. 3. EEM spectra of lipids extracted from various lignite samples.

608



609

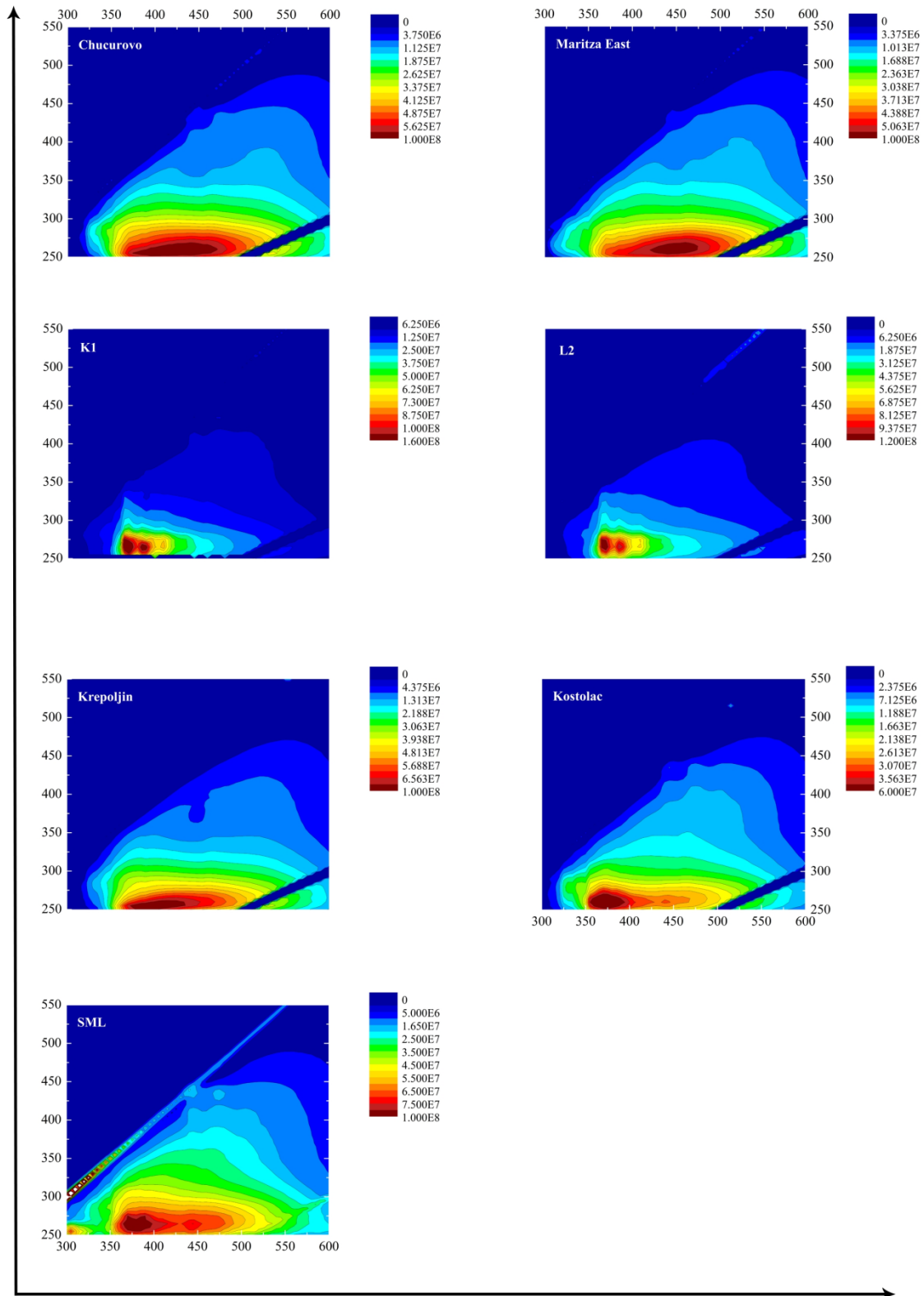
610



611

612

Excitation (nm)



Emission (nm)

Origin of lipid	Lipid yield (wt.%)	Elemental analysis (at.%)				Atomic ratios		FTIR intensity ratios	
		H	C	O ^{diff}	N	H/C	O/C	I _{CH2/CH3} ^a	I _{Ar} /I _{Al} ^b
SML ^c	2.1	58.4	37.0	4.6	0.00	1.58	0.12	2.11	0.12
Chucurovo	9.0	54.0	39.3	6.8	0.00	1.37	0.17	1.47	0.55
Maritza East	7.8	56.7	35.1	8.1	0.04	1.62	0.23	2.52	0.10
Kostolac	1.0	62.1	33.7	4.1	0.03	1.84	0.12	3.06	0.09
Krepoljin	3.4	54.7	37.6	7.8	0.00	1.46	0.21	1.60	0.20
K1	2.3	62.9	33.1	4.0	0.01	1.90	0.12	5.19	0.05
L2	3.8	61.1	35.2	3.7	0.01	1.74	0.11	3.83	0.06

^aFTIR ratio calculated as ratio of intensity at 2918 cm⁻¹ to intensity at 2955 cm⁻¹.

^bFTIR ratio calculated as ratio of intensity at 1510 cm⁻¹ to intensity at 2918 cm⁻¹.

^cSML, the abbreviation for South Moravian lignite.

Origin of lipid	Fluorescence peak region					
	H		A'		V	
	Ex/Em (nm)	I _F (CPS) ^b	Ex/Em (nm)	I _F (CPS) ^b	Ex/Em (nm)	I _F (CPS) ^b
SML ^c	255/305	0.692	260/380	0.850	430/475	0.175
Chucurovo			260/440	0.741		
			260/420 ^a	0.652		
Maritza East Kostolac			260/440	0.659		
			260/440	0.573		
Krepoljin K1			260/370	0.479		
			260/440	0.311		
L2			260/410	0.724		
			265/370	1.408		
			265/385	1.152		
			265/410	0.761		
			265/370	1.116		
			265/385	1.004		
			265/410	0.634		
			275/410	0.630		

^aThe maximum is overlaid with the neighboring maximum 260/440 nm.

^bI_F × 10⁸ CPS (counts per second) of fluorescence peaks.

^cSML, the abbreviation for South Moravian lignite.

Příloha č. 5 – článek v recenzovaném časopise *Materials Science Forum* indexovaném v databázi *Web of Science* (accepted)

ENEV, V., TÜRKEOVÁ, I., SZEWIECZKOVÁ, J., DOSKOČIL, L., KLUČÁKOVÁ, M. Fluorescence analysis of Cu(II), Pb(II) and Hg(II) ion binding to humic and fulvic acids. *Materials Science Forum*. 2016, vol. (–), no. (–), p. 1–6. ISSN: 1662–9752

Fluorescence analysis of Cu(II), Pb(II) and Hg(II) ion binding to humic and fulvic acids

Vojtěch Enev^{1,a*}, Irena Türkeová^{1,b}, Jana Szewieczková^{1,c}, Leoš Doskočil^{1,d}
and Martina Klučáková^{1,e}

¹Institute of Physical and Applied Chemistry, Materials Research Centre, Faculty of Chemistry, Brno University of Technology, Purkyňova 118, Brno, 612 00, Czech Republic

^axcenev@fch.vutbr.cz, ^bxcturkeovai@fch.vutbr.cz, ^cxcszewieczkovaj@fch.vutbr.cz,
^ddoskocil@fch.vutbr.cz, ^eklucakova@fch.vutbr.cz

Keywords: humic substances, titration, steady-state fluorescence spectroscopy, Stern-Volmer equation, fluorescence quenching

Abstract. The aim of this work was to study molecular and quantitative aspects of metal ion binding to humic substances (HS). The object of our study was characterization of two standards of humic substances (Elliott Soil standard HA 1S102H and Elliott Soil standard FA 2S102F). All samples of IHSS standards HS were characterized by elemental analysis (EA), ultraviolet-visible spectroscopy (UV/Vis), Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) and steady-state fluorescence spectroscopy. Chemical parameters on the complexation of Cu (II), Pb(II) and Hg(II), including the conditional stability constants and the percentage of fluorophores participating in the complexation, were estimated by the modified Stern–Volmer equation. The stability constants ($\log K_a$) of Me(II)–ESHS complexes range from 3.70 to 5.15 in the order: Hg–ESHA>Cu–ESHA>Pb–ESHA>Cu–ESFA>Pb–ESFA. With respect to the ESHA, ESFA, which showed the smallest contents of O-containing functional groups (e.g. hydroxyl, carbonyl, ester, especially carboxyl groups on the aromatic ring) and the lowest humification degree, the ESFA was characterized by much smaller stability constants. Our findings suggest that soil HS belongs to class of important organic ligands for complexation with heavy metal ions and may significantly affect the chemical forms, mobility, bioavailability and ecotoxicity of heavy metals in the soil environment.

Introduction

Humic substances (HS) are the organic compounds that remain after dead plant tissue, dead organisms and the excrements of organisms. Soil organic matter (SOM), and especially its humified fractions (humic substances) of which humic acids (HAs) is a major component, exerts an important role in several environmental and geochemical processes. Humic material, including the humic substances, are of current environmental importance, in part, because they have long been known to serve as complexing agents for metal ions leached in the soil ecosystem [1]. Bioavailability, mobility and transport of many toxic metal ions in soils and environmental waters are strongly influenced by binding reactions with HS, especially humic acids. The mechanism and extent of interaction depend on several factors including the medium conditions (such as pH and ionic strength), and the nature and origin of HS.

Various methods and techniques i.e., FTIR spectroscopy, XPS (X-ray Photoelectron Spectroscopy) and DLS (Dynamic Light Scattering) have been used for studying HS binding to metal ions, among which steady-state fluorescence spectroscopy has proven to be one of the most promising and productive [2]. Monitoring the changes of fluorescence spectra of HS upon titration with Cu(II), Pb(II) and Hg(II) can provide useful qualitative and quantitative information about the solution equilibrium of these ions. In particular, the stability constants of HS for Cu(II), Pb(II) and Hg(II) ions and the f_a parameters of Cu(II), Pb(II) and Hg(II) complexes with HS are of considerable value in predicting the behaviour and performances of Cu(II) Pb(II) and Hg(II) in soils. These parameters can be determined using the fluorescence titration technique combined with

the mathematical approach introduced by modified Stern-Volmer equation. This method is based on the existence of a linear relationship between the fraction of the total ligand bound and fluorescence intensity, and on the assumption of a simple 1:1 stoichiometry for the metal ion–ligand binding [3].

The objectives of this work were to determine and discuss the Cu(II), Pb(II) and Hg(II) stability constants and f_a parameters of Cu(II), Pb(II) and Hg(II) complexes of HS. Further, humic substances and HS-metal complexes were characterized using elemental analysis (EA), ultraviolet-visible spectroscopy (UV/Vis), Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) and steady-state fluorescence spectroscopy.

Materials and methods

Materials. The soil HS (humic acid – 1S102H and fulvic acid –2S102F) used in the present study was a standard sample obtained from the Elliott soil of the Joliet Army Ammunition Plant near Joliet, Illinois and purchased from the International Humic Substances Society (IHSS).

Humic acids analyses. Humic substances were burned at a heating rate of $10\text{ }^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ from room temperature to $900\text{ }^\circ\text{C}$ under air atmosphere. The weight loss occurring at $105\text{ }^\circ\text{C}$ was measured as the moisture content. The final residue after the heating to $900\text{ }^\circ\text{C}$ was measured as the ash content. The elemental composition was determined by a CHNS-O Elemental Analyser 3000 Series. The oxygen content was calculated as the difference: $[100 - (\text{C} + \text{H} + \text{N} + \text{S}) \text{ \%}]$, and the data obtained were corrected for moisture and ash content.

UV/Vis spectra of aqueous solutions were measured by a Hitachi U-3900 spectrophotometer in the wavelength range of 200–900 nm. The absorption coefficients of HS were calculated from the absorbance [4, 5].

The Fourier transform infrared (FTIR) spectra of HS were recorded over the range $4000\text{--}400\text{ cm}^{-1}$ on pellets obtained by pressing under reduced pressure a mixture of 1 mg of HS and 400 mg of dried KBr, spectrometry grade. A Nicolet iS50 spectrophotometer operating with a peak resolution of 4 cm^{-1} , and Omnic 9.0 software were used to obtain spectra.

Fluorescence quenching titrations. A stock solution was prepared for each HS by dissolving 30 mg of standard HS in 100 ml of 1 M KOH. The mixture was stirred for 30 min under N_2 gas, and then 100 ml of 1 M HNO_3 were added. Subsequently, the solution was brought to a volume of 950 ml with deionized distilled water, the pH was adjusted to a value of approximately 6 by addition of 0.1 M KOH, and the volume was finally brought to 1000 ml with deionized distilled water. Aliquots of 50 ml of the stock solution of HS were mixed with 50 ml of solutions of $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$, $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ and $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$ in 0.1 M KNO_3 (ionic strength of 0.1 M) at 17 concentrations varying from 0 to 350 μM . Therefore, 17 solutions with increasing Cu(II), Pb(II) and Hg(II) concentration from 0 to 175 μM and fixed HS concentration of $15\text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ were obtained for each HS.

Fluorescence spectra were obtained in 1 cm quartz fluorescence cells at room temperature (20°C), using a FluoroLog luminescence spectrophotometer. For these measurements, slit widths were set at 5 nm for emission and excitation monochromator. Fluorescence emission spectra were obtained at wavelengths ranging from 380 to 600 nm with an excitation wavelength of 360 nm.

Fluorescence quenching titrations were performed to characterize binding properties of the HS samples with Cu(II), Pb(II) and Hg(II). For a 1:1 stoichiometric model of Me(II) complexation by HS, the modified Stern–Volmer equation was used to evaluate the complexing parameters, i.e. conditional stability constants and binding capacities [6]:

$$\frac{F_0}{\Delta F} = \frac{F_0}{(F_0 - F)} = \frac{1}{f_a K_a [\text{Me}(\text{II})]} + \frac{1}{f_a} \quad (1)$$

where K_a is the Stern–Volmer quenching constant of the accessible fraction, f_a represents the fraction of the initial fluorescence, which is accessible to quencher, and $[\text{Me}(\text{II})]$ is the concentration of Me(II). The parameters f_a and K_a can be obtained from Eq. (1).

Results and discussion

Elemental composition, ash and atomic ratios. The elemental composition, ash content and atomic ratios of soil HS are listed in Table 1. The Elliott Soil HA (ESHA) has higher C, N contents. In general, Elliott Soil FA (ESFA) has higher ash, H, S and O contents and O/C, H/C and C/H atomic ratios.

Table 1 Ash content, elemental composition / wt. [%] and atomic ratios of HS

Sample	C [%]	H [%]	N [%]	S [%]	O [%]	Ash [%]	O/C	H/C	C/N
ESHA	58.41	3.52	4.46	0.30	33.31	2.30	0.57	0.06	13.10
ESFA	49.56	4.42	3.63	0.70	41.69	1.78	0.84	0.09	13.65

UV-visible spectroscopy. UV/Vis absorbance spectra of HS were featureless and characteristic with the absence of identifiable maxima and/or minima with decreasing absorbance at increasing acquisition wavelength (not shown). The same trend may be observed in various humic substances. The samples of soil HS absorbed light at the wavelengths ranging between 200 and 800 nm. HS generally show strong absorbance in the UV/Vis range, particularly in the UV region, because of the presence of chromophores containing aromatic groups with various degrees and types of substitution such as mono- and/or polysubstituted phenols and different aromatic acids. The values of different indexes calculated from the UV/Vis spectra are presented in Table 2. The E_{ET}/E_{Bz} ratio (the ratio of absorbance at 253 nm to that at 203 nm) is low for compounds in which the aromatic rings are substituted largely with aliphatic functional groups, whereas higher E_{ET}/E_{Bz} ratios will be associated with the presence of O-containing functional groups e.g. hydroxyl, carbonyl, ester, especially carboxyl groups on the aromatic ring. The fact that ESFA exhibited lower E_{ET}/E_{Bz} ratio than ESHA indicates that the aromatic structures in ESFA probably have been substituted by a greater degree with aliphatic functional groups. These results show that the aromatic structures in ESHA have higher degree of substitution with O-containing functional groups.

The E_4/E_6 ratio of ESHA is lower than that of ESFA. Higher value of E_4/E_6 ratio of ESFA maybe indicates the presence of structures with lower molecular weight and degree of humification. According to [4] the E_4/E_6 ratio of HS is mainly governed by average molecular weight, particle size and oxygen content and is correlated positively with total acidity.

Table 2 Absorption indexes (E_{ET}/E_{Bz} and E_4/E_6) of HS

Sample	E_{ET}/E_{Bz}	E_4/E_6
ESHA	0.83	3.49
ESFA	0.67	12.83

FTIR spectroscopy. The FTIR spectra of ESHS samples are not shown and FTIR spectra of Me(II)-ESHs samples are shown in Fig. 1. Interpretation of the absorption bands was done as described in the literature [7]. All spectra of HS and Me(II)-HS complex are characterized particularly by bands of aliphatic groups. Bands at 2940–2926 cm^{-1} are ascribed to asymmetric C-H stretching in methylene groups. Bands of symmetric (2860 cm^{-1}) stretching in methylene groups are only observed for ESHA and Me(II)-ESHA complex.

Bands at 3087 cm^{-1} are assigned to stretching C-H groups in aromatic ring. Bands at 1620 cm^{-1} are assigned to stretching C=C groups in aromatic ring whereas the most intense peak is observed for ESHA. Two out-of-plane C-H deformation bands are found in the 900–700 cm^{-1} region. Band at 1716 cm^{-1} , corresponding to carboxylic groups, is only observed for ESHA and ESFA of which ESFA has the most intensity peak observed for ESFA. This peak is, however, absent from the spectra of Me(II)-ESHA and Me(II)-ESFA because the hydrogen atoms of the COOH groups have been substituted by divalent cations producing COO^- groups that exhibit a characteristic peak at around 1580 cm^{-1} . Bands of asymmetric (1580 cm^{-1}) and symmetric (1380 cm^{-1}) stretching in Me(II)-benzoate groups are observed for Me(II)-ESHA and Me(II)-ESFA complexes. The band at

1405 cm^{-1} is attributed to O–H bending in phenols. In the range of 1300–1000 cm^{-1} , several bands is situated which can be attributed to other oxygen functional groups. In the zone, the most intensity band at 1230 cm^{-1} is related to C–O stretching of phenols and ethers. The appearance of bands at 1131 cm^{-1} , 1075 cm^{-1} and 1045 cm^{-1} points out to alcohols (primary and secondary), aliphatic ethers and C–O groups in polysaccharides.

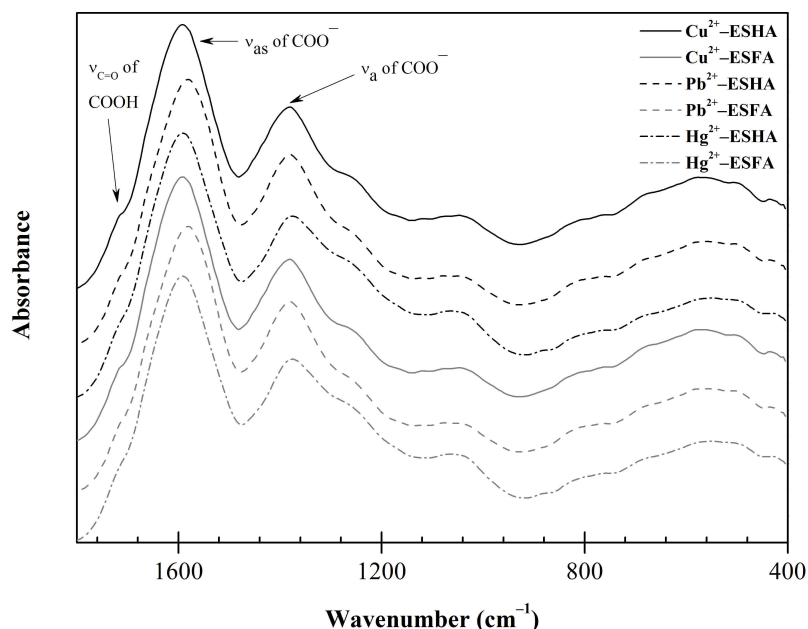


Fig. 1 FTIR spectra of Me(II)–ESHS complex

Complexation of Cu(II), Pb(II) and Hg(II) by HS. The titration data of HS with Cu(II), Pb(II) and Hg(II) were fitted to the modified Stern–Volmer equation, linear correlations were obtained. Fig. 2 and Fig. 3 show a typical plots of $\Delta F/F_0$ vs. $1/[Me(II)]$, suggesting that fluorophores in these HS samples participate in the complexing reaction well in the range of Cu(II), Pb(II) and Hg(II) concentration added. The corresponding fitting parameters for each HS, i.e., the Cu(II), Pb(II) and Hg(II) the stability constant ($\log K_a$) of Me(II)–ESHS complexes and the binding fraction of initial fluorophores (f_a) are listed in Table 3. The highest values found for the correlation coefficients (R^2) indicate that the Stern–Volmer model fits very well to the experimental data sets for HS examined, as it was previously demonstrated in other works on similar systems. The values of $\log K_a$ of Me(II)–ESHS complexes vary in a wide range (from 3.70 to 5.15) in the order: Hg–ESHA > Cu–ESHA > Pb–ESHA > Cu–ESFA > Pb–ESFA. The stability constants ($\log K_a$) of Me(II)–ESHA complexes are in any case much larger than those of Me(II)–ESFA complexes. The high stability constants found for Me(II)–ESHA may be related to the high content of acidic functional groups and other O-containing ligands groups, and the marked aromatic character and high humification degree typical of native soil HAs. Two adjacent aromatic carboxyl groups (i.e., a phthalic acid-like binding site) and an aromatic carboxyl group and adjacent phenolic OH group (i.e., a salicylic acid-like binding site), in the HA structure are known to form highly stable bidentate complexes with metal ions [8]. The stability constant of Hg–ESHA is in any case much larger than stability constants of Cu–ESHA and Pb–ESHA. The relatively small stability constants of Me(II)–ESFA may be ascribed to its ascertained typical aliphatic character and small degree of aromatic polycondensation and humification [9].

Table 3 Stability constants ($\log K_a$) of Me(II)–ESHS complexes and the binding fraction of initial fluorophores (f_a)

Sample	$\log K_a$	f_a [%]	R^2
Cu–ESHA	4.85	90	0.99
Pb–ESHA	4.50	69	0.99
Hg–ESHA	5.15	89	0.98
Cu–ESFA	4.45	69	1.00
Pb–ESFA	3.70	59	0.99
Hg–ESFA	–	–	–

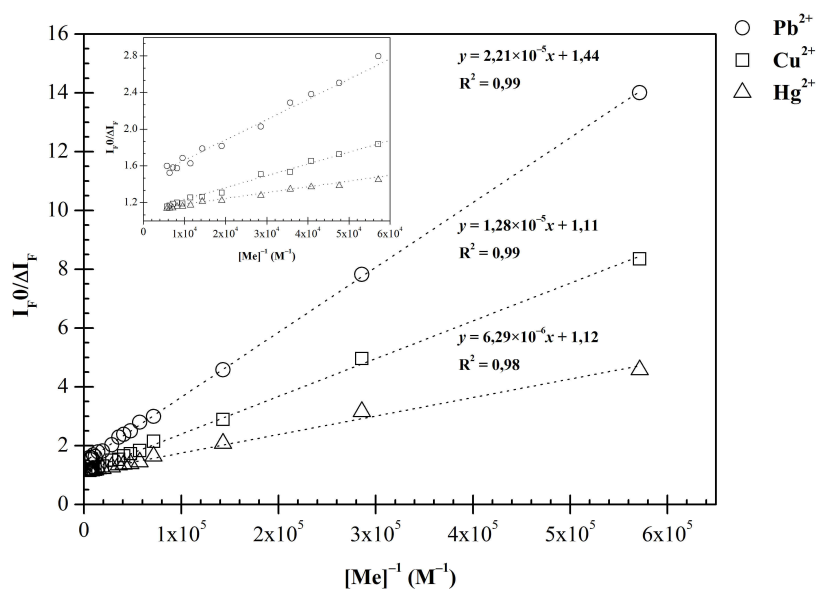


Fig. 2 Modified Stern–Volmer plots for the Cu(II)–ESHA, Pb(II)–ESHA and Hg(II)–ESHA

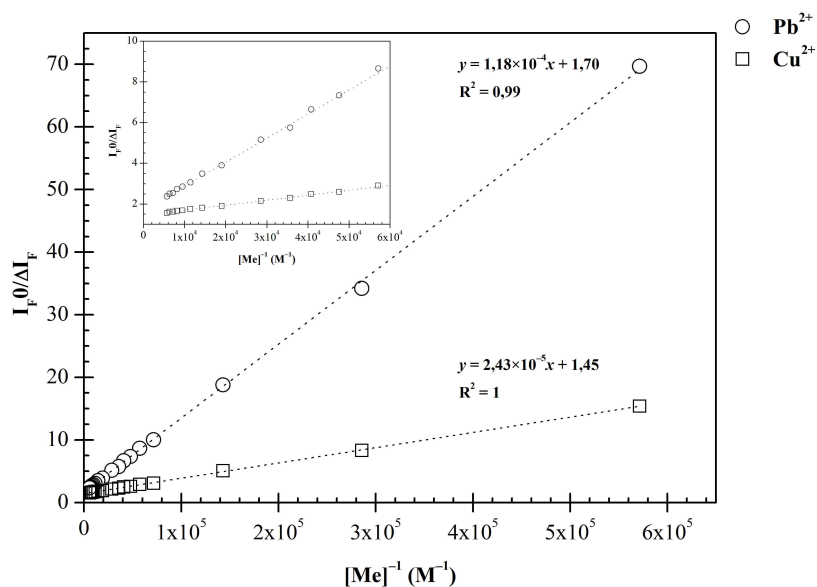


Fig. 3 Modified Stern–Volmer plots for the Cu(II)–ESFA and Pb(II)–ESFA

Conclusion

The binding of heavy metal ions to HS generally reduces their bioavailability, mobilization, and transport in soil. Results from steady-state fluorescence measurements indicate strong binding between Cu(II), Pb(II), Hg(II) and ESHS. The fluorescence quenching titration method provides quantitative information on the complexation. The stability constants ($\log K_a$) of Me(II)–ESHs complexes range from 3.70 to 5.15 in the order: Hg–ESHA>Cu–ESHA>Pb–ESHA>Cu–ESFA>Pb–ESFA. Substantial differences were found between ESHA and ESFA in binding Cu(II), Pb(II) and Hg(II) ions. In particular, the stability constants of Me(II)–ESHA complexes of HA are in any case much larger than the corresponding values for FA. With respect to ESHA, ESFA is characterized by small stability constants.

These results suggest that some combination of chemical and physicochemical parameters and/or steric hindrance effects may play an important role in the interaction of HS with Cu(II), Pb(II) and Hg(II) ions, which is worth of further investigation.

Acknowledgements

This work was supported by project Nr. LO1211, Materials Research Centre at FCH BUT–Sustainability and Development (National Programme for Sustainability I, Ministry of Education, Youth and Sports).

References

- [1] C. Plaza, V. D’Orazio, N. Senesi, Copper(II) complexation of humic acids from the first generation of EUROSOLS by total luminescence spectroscopy, *Geoderma*. 125 (2005) 177-186.
- [2] D. Hernández, C. Plaza, N. Senesi, A. Polo, Detection of Copper(II) and zinc(II) binding to humic acids from pig slurry and amended soils by fluorescence spectroscopy, *Environ. Pollut.* 143 (2006) 212-220.
- [3] Q. Fu, X. Pan, D. Zhang, B. Zhou, Effects of heat treatment on fluorescence properties of humic substances from sandy soil in arid land and their Hg(II) binding behaviors, *Environ. Earth Sci.* 66 (2012) 2273-2279.
- [4] Y. Chen, N. Senesi, M. Schnitzer, Information Provided on Humic Substances by E4/E6 Ratios, *Soil Sci. Soc. Am. J.* 41 (1977) 352-358.
- [5] G. V. Korshin, C. W. Li, M. M. Benjamin, Monitoring the properties of natural organic matter through UV spectroscopy: A consistent theory, *Water Res.* 31 (1997) 1787-1795.
- [6] X. Lu, R. Jaffe, Interaction between Hg(II) and natural dissolved organic matter: a fluorescence spectroscopy based study, *Water Res.* 35 (2001) 1793-1803.
- [7] M. C. Terkhia, F. Taleba, P. Gossartb, A. Semmoudb, A. Addou, Fourier transform infrared study of mercury interaction with carboxyl groups in humic acids, *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.* 198 (2008) 205-214.
- [8] C. Plaza, G. Brunetti, N. Senesi, A. Polo, Molecular and Quantitative Analysis of Metal Ion Binding to Humic Acids from Sewage Sludge and Sludge-Amended Soils by Fluorescence Spectroscopy, *Environ. Sci. Technol.* 40 (2006) 917-923.
- [9] J. C. García-Gil, C. Plaza, N. Senesi, G. Brunetti, A. Polo, Effects of sewage sludge amendment on humic acids and microbiological properties of a semiarid Mediterranean soil, *Biol. Fertil. Soils* 39 (2004) 320-328.