

VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA CHEMICKÁ

CENTRUM MATERIÁLOVÉHO VÝZKUMU

FACULTY OF CHEMISTRY

MATERIALS RESEARCH CENTRE

VLIV HUMINOVÝCH KYSELIN NA MOBILITU IONTOVÝCH SLOUČENIN

EFFECT OF HUMIC ACIDS ON MOBILITY OF IONIC COMPOUNDS

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

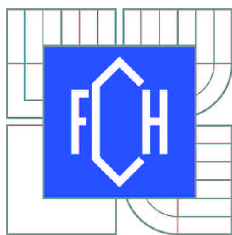
Bc. MILAN HERZOG

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. PETR SEDLÁČEK, Ph.D.

BRNO 2014



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

Zadání diplomové práce

Číslo diplomové práce:	FCH-DIP0710/2012	Akademický rok: 2013/2014
Ústav:	Centrum materiálového výzkumu	
Student(ka):	Bc. Milan Herzog	
Studijní program:	Spotřební chemie (N2806)	
Studijní obor:	Spotřební chemie (2806T002)	
Vedoucí práce	Ing. Petr Sedláček, Ph.D.	
Konzultanti:	Ing. Jiří Smilek	

Název diplomové práce:

Vliv huminových kyselin na mobilitu iontových sloučenin

Zadání diplomové práce:

- 1) Vypracovat literární rešerši na téma: interakce huminových kyselin s iontovými sloučeninami, metody jejich studia.
- 2) Navrhnou metodu experimentálního studia transportu iontových látek v systému s obsahem huminových kyselin.
- 3) Stanovit efekt huminových kyselin na difúzní charakteristiky zvolených iontových sloučenin.

Termín odevzdání diplomové práce: 9.5.2014

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

Bc. Milan Herzog
Student(ka)

Ing. Petr Sedláček, Ph.D.
Vedoucí práce

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
Ředitel ústavu

V Brně, dne 31.1.2013

prof. Ing. Jaromír Havlica, DrSc.
Děkan fakulty

ABSTRAKT

Náplní této diplomové práce je studium interakcí mezi huminovými kyselinami a modelovými iontovými polutanty (organická barviva, ionty těžkých kovů) prostřednictvím jednoduchých difúzních experimentů v difúzní cele. Hlavním cílem bylo zhodnotit vliv náboje difúzních sond (rozpuštěných látek) na interakci s huminovými kyselinami imobilizovanými v modelové hydrogelové fázi. Jako vhodné modelové polutanty byly zvoleny měďnaté ionty jako zástupce těžkých kovů a organická barviva (methylenová modř, rhodamin, fluorescein a chicago blue). Získané informace poslouží k prohloubení znalostí týkajících se přirozených bariérových vlastností huminových kyselin a dají se taktéž využít pro zavedení jednoduchých laboratorních difúzních technik pro zkoumání reaktivity biopolymerů obecně.

ABSTRACT

The content of this diploma thesis is study of interactions between humic acids and model probes (such as organic dyes and ions of heavy metals) by the simple diffusion experiments in diffusion cell. The main aim was to describe the influence of charge of different diffusion sonds (solved substances) on interactions with humic acids immobilized in model gel phase. As a appropriate model probe was chosen copper ions (as a representation of heavy metals) and organic dyes (methylene blue, rhodamine, fluorescein and chicago blue). Experimental results could be used to improve knowledge based on natural barrier properties of humic acids and to inovate simple diffusion laboratory techniques for characterization of reactivity of biopolymers in general.

KLÍČOVÁ SLOVA:

difúze; difúzní koeficient; huminové kyseliny; agaróza; studium interakcí; hydrogely

KEY WORDS:

diffusion; diffusion coefficient; humic acids; agarose; study of interaction; hydrogels

HERZOG, M. *Vliv huminových kyselin na mobilitu iontových sloučenin*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2014. 55 s. Vedoucí diplomové práce Ing. Petr Sedláček, Ph.D..

PROHLÁŠENÍ

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

.....
Bc. Milan Herzog

Na tomto místě bych rád poděkoval vedoucímu diplomové práce Ing. Petru Sedláčkovi, PhD. za veškerý jeho vynaložený čas, připomínky a celkově za veškerou motivaci, kterou mi poskytnul nejen během tvorby diplomové práce, ale i po celou dobu mého vysokoškolského studia. Dále bych rád poděkoval Ing. Jiřímu Smilkovi za veškerý čas, užitečné rady a pravidelné konzultace. Děkuji taktéž všem, kteří mi umožnili získat nové zkušenosti jak ve studijním, tak v osobním životě, jelikož jsou oba silně provázány.

OBSAH

1	Úvod.....	7
2	Cíl práce	8
3	Teoretická část.....	9
3.1	Difúze a difúzní koeficient.....	9
3.1.1	Fickovy zákony	9
3.1.2	Difúzní modely.....	10
3.2	Metody pro stanovení difúzního koeficientu	11
3.2.1	Metody volné difúze.....	11
3.2.2	Měření rychlosti průchodu porézní přepážkou.....	12
3.2.3	Stanovení difúzního koeficientu založené na měření kvazielastického rozptylu světla	13
3.2.4	Difúze v difúzní cele	13
3.3	Huminové látky	15
3.3.1	Obecná charakteristika a struktura huminových látek	15
3.3.2	Tvorba a využití huminových látek.....	16
3.3.3	Huminové kyseliny	18
3.3.4	Extrakce huminových kyselin z přírodních matric	18
3.3.5	Struktura huminových kyselin	19
3.4	Agaróza	21
3.4.1	Praktické aplikace agarózy.....	23
3.5	Gelové systémy	23
3.5.1	Disperzní soustavy	23
3.5.2	Využití gelů.....	25
3.5.3	Tvorba gelových systémů.....	25
3.5.4	Rozdělení gelových systémů.....	25
4	Současný stav řešení problematiky	27
4.1	Interakce HK s polutanty a dalšími látkami	27
4.2	Difúzní cela jako nástroj pro stanovení difúzního koeficientu	28
5	Experimentální část.....	30
5.1	Použité chemikálie	30
5.2	Přístroje a pomůcky.....	32
5.3	Pracovní postupy	35
5.3.1	Příprava roztoku huminové kyseliny.....	35
5.3.2	Příprava agarozového gelu	36
5.3.3	Příprava agarozového gelu s přidavkem huminových kyselin.....	36

5.3.4	Nastavení UV-VIS sondy Ocean Optics	37
5.3.5	Sestavení difúzní cely a spuštění experimentu.....	37
5.4	Stanovení difúzního koeficientu.....	38
5.4.1	Export dat	38
5.4.2	Výpočet difúzního koeficientu	38
6	Diskuze a Výsledky.....	40
6.1	Sestrojení kalibračních křivek	40
6.2	Vliv přídavku HK do agarozového gelu na čas průchodu	40
6.3	Difúzní koeficienty	43
6.4	Koncentrace barviva v gelové přepážce	44
7	Závěr.....	45
8	Seznam použitých zdrojů.....	46
9	Seznam použitých zkratk a symbolů	50
9.1	Použité zkratky	50
9.2	Použité symboly	50
10	Seznam příloh	51

1 ÚVOD

Transportní systémy a jevy jsou nedílnou součástí každodenního života. Vyskytují se a probíhají všude kolem nás a jsou i naší součástí, bez nich by neexistoval život, jak jej známe. Jedná se například o transport živin a vody v půdě, proudění vody v oceánech, tvorba ropy a podobně. I samotná existence živých organizmů je založena na výměně látek, interakcích a v neposlední řadě na difúzi.

Motivací k vypracování této diplomové práce bylo objasnění vlivu přídavku biopolymerních látek na difúzní procesy probíhající v hydrogelových transportních systémech.

Práce je zaměřena na vývoj a testování nové metodiky studia interakcí mezi reaktivním biopolymerem (v našem případě mezi huminovými kyselinami) a nízkomolekulární rozpuštěnou látkou, a to z hlediska hodnocení bariérových schopností biopolymeru – konkrétně byl studován vliv zmíněných interakcí na rychlost transportu iontových solutů v prostředí s obsahem huminových látek. Jako hlavní hodnotící parametry interakce iontových difúzních sond a huminových kyselin byly stanoveny efektivní hodnoty difúzních koeficientů a také čas průchodu difundující látky skrz bariérovou přepážku ve formě hydrogelu. Dalšími efekty, jejichž vliv byl studován, byl vliv charakteru solutu (byly studovány soluty různého náboje, různé velikosti molekul) a v neposlední řadě také koncentrace difundující látky v matrici hydrogelu. Metodika je testována na skupině difúzních sond, reprezentujících modelové polutanty, jejichž transport v ekosystému (např. v půdě), je výrazně ovlivněn právě přítomností huminových látek. Jako modelové difúzní sondy byla proto vybrána kationaktivní organická barviva (methylenová modř, rhodamin 6G) a to z toho důvodu, že pro tyto látky jsou očekávány přitažlivé elektrostatické interakce s anionaktivními huminovými kyselinami. Taktéž byly zkoumány interakce pro anionaktivní organická barviva fluorescein a chicao blue, kde se naopak dají předpokládat odpudivé interakce mezi tímto barvivem a huminovými kyselinami. Pro posouzení vlivu velikosti difundující látky byl zahrnut také chlorid měďnatý, který zároveň představuje modelový těžký kov, jehož transport v životním prostředí je pečlivě kontrolován.

Jak již bylo zmíněno, bariérové schopnosti huminových látek vůči uvedeným solutům jsou charakterizovány na základě určení vybraných difúzních parametrů. Pro tyto experimenty byla použita difúzní cela s gelovou přepážkou. Jelikož byly zkoumány elektrostatické interakce mezi negativně nabitou huminovou kyselinou a barevnými ionty kovů, respektive barviv, byla jako analytická metoda pro stanovení prošlého množství využita UV-VIS spektrofotometrie. Pro stanovení difúzního koeficientu ve vodě byla použita membrána Spi-pore s přesně definovanou velikostí pórů (2 μ m). Dále byly stanoveny difúzní koeficienty pro experimenty s použitím čistého agarozového gelu a s použitím agarozového gelu s huminovou kyselinou. Odlišnosti v difúzních parametrech, stanovených pro gely bez přídavku resp. s přídavkem huminových kyselin, jsou přisuzovány právě vlivu specifických interakcí mezi solutem a přídavkem huminových látek v hydrogelovém difúzním médiu.

2 CÍL PRÁCE

Cílem této práce je objasnění efektu probíhajících interakcí s huminovými kyselinami na transport iontových sloučenin, pomocí difúzních procesů sledované v difúzní cele. Sledováním a vyhodnocením probíhajících difúzních experimentů a použitím vhodných analytických metod tedy bylo možné popsat charakter a intenzitu těchto interakcí.

V případě těchto experimentů byly použity huminové kyseliny izolované z jihomoravského lignitu standardní metodou podle IHSS. Jako difúzní sondy (difundující nízkomolekulární látky) byly zvoleny chlorid měďnatý, methylenová modř, rhodamin, fluorescein, chicago blue a pro objektivní posouzení vlivu specifických interakcí mezi difundující látkou a difúzním médiem byly stanoveny vybrané transportní parametry (difúzní koeficient, čas přestupu, nasorbované množství).

3 TEORETICKÁ ČÁST

3.1 Difúze a difúzní koeficient

Difúzi si lze představit jako proces vyrovnávání koncentrací v prostředí, kde je koncentrační gradient. Jedná se tedy o samovolný pohyb molekul prostorem v navenek nehybném prostředí. Podstatou tohoto transportu je tepelný (tzv. *Brownův*) pohyb [33]. Obecně lze tedy říci, že tepelný pohyb molekul je zcela nahodilý, ovšem z makroskopického hlediska je možné pozorovat pohyb molekul do prostředí s nižší koncentrací z oblasti o vyšší koncentraci [34].

Hnací silou difúzních procesů je rozdíl koncentrací transportovaného média v různých bodech soustavy. Z termodynamického hlediska vyplývá, že při konstantním tlaku a teplotě je změna Gibbsovy energie rovna maximální práci (jiná než objemová) [34], kterou vykoná jeden mol látky při transportu z místa s chemickým potenciálem μ do místa s chemickým potenciálem $\mu+d\mu$.

Rychlost difúzních procesů je úměrná velikosti částic a nepřímo úměrná odporu prostředí (viskozita), ve kterém difúze probíhá. Difúze je taktéž závislá na teplotě a tlaku a její průběh lze popsat pomocí Fickových zákonů.

3.1.1 Fickovy zákony

Difúze, jak již bylo zníněno výše, je projevem Brownova pohybu. Hnací silou je rozdíl chemických potenciálů difundující látky (resp. při zjednodušeném pohledu rozdíl koncentrací, tj. koncentrační gradient) v různých částech soustavy. Stejně tak transport tepla kondukcí funguje na stejném principu jako difúze. Souvislost s těmito dvěma ději poprvé objevil německý fyzik Adolf Eugene Fick, který poprvé matematicky popsal proces difúze.

Směr difúze jde vždy proti směru gradientu – z prostředí o vyšší koncentraci do prostředí o nižší koncentraci se snahou vyrovnat koncentraci v celém objemu. Základní vztah pro rychlost přestupu hmoty ve směru difúze popisuje I. Fickův zákon [1]:

$$\frac{dn}{dt} = -SD \frac{dc}{dx}, \quad (1)$$

kde S je plocha kolmá na směr difúze, D je *difúzní koeficient*, někdy také označován jako *difuzivita* ($\text{m}^2 \text{s}^{-1}$), dn/dt je látkové množství difundující látky v čase a dc/dx je koncentrační gradient ve směru osy x . Difúzní koeficient jako takový je důležitý parametr pro porovnávání difúzních procesů.

Difúze je v podstatě zrcadlový děj – dochází-li k transportu složky jedním směrem (z koncentrovanějšího prostředí do méně koncentrovaného), musí zákonitě docházet k transportu jiné složky opačným směrem. Z předpokladu, že v soustavě budou obsaženy pouze 2 složky (difúzní médium a rozpouštědlo), je možné tyto procesy popsat jednou rovnicí. Pokud tedy existuje difúzní tok složky 1, způsobený jejím koncentračním gradientem, musí existovat i stejně velký difúzní tok složky 2, způsobený opačným koncentračním gradientem složky 2 oproti složce 1 [35].

K lepšímu porozumění difúzních procesů ovšem I. Fickův zákon není dostačující, jelikož popisuje změnu koncentrace pouze v jednom směru (stacionární difúze). K popisu

nestacionární difúze slouží II. Fickův zákon, který už zohledňuje změnu koncentrace v závislosti na čase [36]. Pokud platí nezávislost difúzního koeficientu na koncentraci, má II. Fickův zákon pro nestacionární difúzi tvar:

$$\frac{\partial c_1}{\partial t} = \text{div}(D_1 \cdot \text{grad } c_1) = D_1 \cdot \text{div grad } c_1. \quad (2)$$

Pokud difúze probíhá jen v jednom směru (například ve směru osy x), dá se výše uvedená rovnice pro II. Fickův zákon zjednodušit do podoby:

$$\frac{\partial c_1}{\partial t} = D \cdot \frac{\partial^2 c_1}{\partial x^2}, \quad (3)$$

kde je možné najít analogii s rovnicí pro vedení tepla, jak je uvedeno v referenci [37]. Proto je možné pozorovat analogii při studování difúzních procesů s problematikou vedení tepla.

V roce 1908 odvodí Einstein vztah mezi difúzním koeficientem, koeficientem tření a absolutní teplotou, zvaný později jako Einsteinova rovnice:

$$D = \frac{kT}{B}, \quad (4)$$

kde k je Boltzmanova konstanta a T je termodynamická teplota. Pro sféricky symetrickou částici o poloměru r pak pro koeficient tření B platí Stokesova rovnice:

$$B = 6\pi\eta r, \quad (5)$$

kde η představuje viskozitu prostředí. Ze Stokesovy rovnice je patrné, že proti difúzně pohybující se částici působí odpor prostředí [1].

3.1.2 Difúzní modely

Ačkoli by se mohlo zdát, že difúzní procesy nejsou příliš složité, skutečnost je zcela opačná. Z tohoto důvodu byl vytvořen souhrn jednotlivých analytických řešení Fickových rovnic pro rozličné počáteční a okrajové podmínky, které jsou využívány pro popis různých difúzních procesů. Na tomto souhrnu se značně podílel např. John Crank, který ve svých publikacích rozebírá tuto problematiku [38].

Jako dva nejjednodušší modely pro popis difúzních procesů se používá model *difúze skrz tenký film* a model *volné difúze*.

Difúze skrz tenký film

Tento model se vyznačuje tím, že předpokládá jednosměrnou difúzi ve směru osy x mezi dvěma dobře míchanými roztoky o koncentracích c_1 a c_2 skrze nekonečně tenkou bariéru. Dalším z parametrů, který je nutno dodržet, je dostatečně dlouhá doba difúze k tomu, aby se tok látky ustálil. Předpokládá se tedy, že difundující látka se nesorbuje ve struktuře bariéry a tok látky tedy není omezený – jedná se o tzv. *ustálenou* difúzi. II. Fickův zákon je poté možné následně přepsat do následující podoby:

$$0 = D \cdot \frac{\partial^2 c_1}{\partial x^2}, \quad (6)$$

přičemž difúzní koeficient D je konstantní [38]. Uvedený vztah se po zavedení okrajových podmínek $c_1 = c_{10}$ pro $x = 0$ a $c_1 = c_{1l}$ pro $x = 1$ přejde na modifikovaný tvar II. Fickova

zákona ve tvaru:

$$\frac{c_1 - c_{10}}{c_l - c_{10}} = \frac{x}{l}. \quad (7)$$

Z uvedené rovnice je patrné, že koncentrační profil uvnitř filmu je lineární a závisí pouze na okrajových koncentracích, okrajových podmínkách a tloušťce filmu l . Jelikož difúzní tok není závislý na čase, tak celkové množství látky, které projde skrze tenký film, roste s časem lineárně [52]. Rovnici lze taktéž upravit do tvaru pro difúzní tok tenkou difúzní bariérou. Rovnice bude mít poté tvar:

$$J_1 = -D_1 \frac{\partial c_1}{\partial x} (c_{10} - c_l). \quad (8)$$

Volná difúze

Tento proces si lze představit jako difúzní transport, při němž částice z rozhraní difundují do prostoru, který lze díky své délce považovat za nekonečný (ve sledovaném čase difundující částice nedosáhnou druhého okraje difúzního média).

Difúzní médium na počátku obsahuje konstantní koncentraci modelové látky. Při náhlém zvýšení její koncentrace na rozhraní se vytvoří lokální koncentrační gradient a látka začne difundovat hlouběji do média. Tato změna koncentrace na rozhraní tedy zapříčiní vznik časově poroměnného koncentračního profilu dané látky. Celý problém spočívá ve stanovení změny koncentračního profilu difundující látky v závislosti na změně její koncentrace na rozhraní a čase [52]. Rovnici lze odvodit z diferenciální rovnice (3) po dosažení příslušných okrajových podmínek. Po dalších úpravách Fickových zákonů lze získat následující rovnici:

$$\frac{c_1 - c_{10}}{c_{1\infty} - c_{10}} = \operatorname{erf} \frac{x}{\sqrt{4Dt}}. \quad (9)$$

Z rovnice (9) vyplývá, že difúzní tok charakterizující volnou difúzi je funkcí jak polohy, tak času. Dalšími úpravami předchozího vztahu dostaneme rovnici:

$$m_1 = \sqrt{\frac{4Dt_0}{\pi}} (c_{10} - c_{1\infty}). \quad (10)$$

Z této rovnice pak vyplývá, že celkové množství látky přenesené přes rozhraní je funkcí odmocniny z času. Čas, který dané místo potřebuje k dosažení určité koncentrace, je uměrný jeho vzdálenosti od rozhraní a převrácené hodnotě jeho difúzního koeficientu.

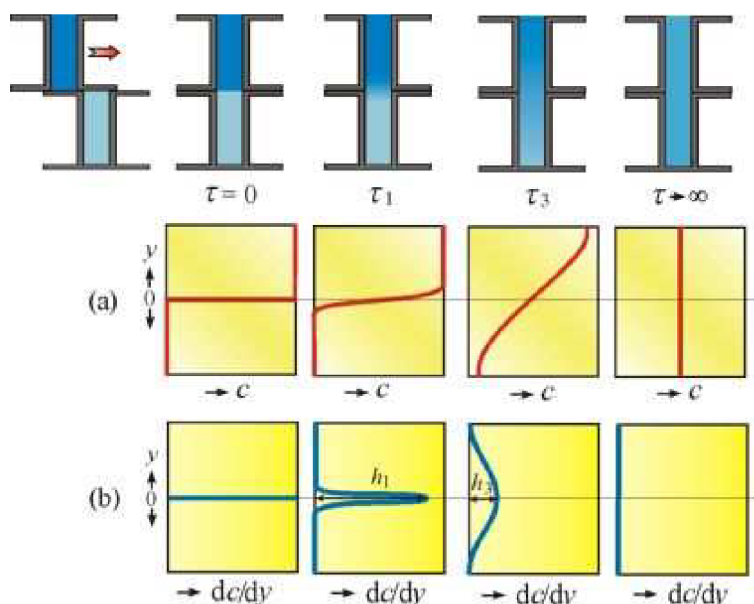
3.2 Metody pro stanovení difúzního koeficientu

Metody pro měření difúzního koeficientu se dají rozdělit do dvou hlavních skupin. Jedná se o metodu volné difúze a metody, při nichž se měří rychlost průchodu difundující látky porézní membránou. Novější metody, vhodné hlavně pro částice jakékoli velikosti a tvaru, jsou založeny na měření kvazielastického rozptylu světla [2].

3.2.1 Metody volné difúze

Roztok difundující látky se uvede do styku s rozpouštědlem tak, aby mezi nimi vzniklo dobře definované ostré koncentrační rozhraní. Soustava je pak po určitou dobu udržována

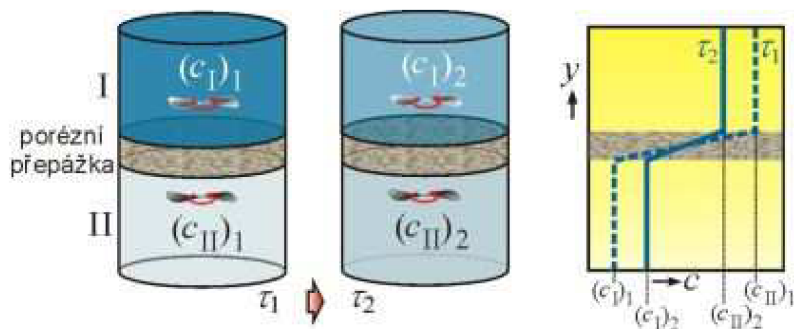
při konstantní teplotě, chráněna před otřesy a za takových podmínek, kdy je vyloučena konvekce. Původně ostré koncentrační rozhraní se v důsledku difúze rozplývá a vhodnou analytickou metodou (sledováním charakteristických změn barvy, absorpce světla nebo indexu lomu apod.) se zjišťuje rozdělení koncentrací s místem a časem. Difúzní koeficient se vyhodnocuje z integrovaného tvaru II. Fickova zákona (rovnice 2). Metoda není vhodná pro koloidní systémy, protože difúze zde probíhá tak pomalu, že doba pokusu by byla velmi dlouhá [2]. Schématické znázornění volné difúze je uvedeno na obrázku 1.



Obr. 1 Volná difúze [2]

3.2.2 Měření rychlosti průchodu porézní přepážkou

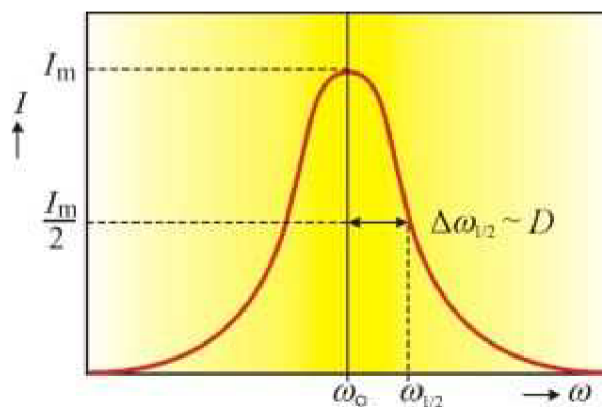
Měrná cela je porézní přepážkou rozdělena na dvě části, která se naplní nahoře koncentrovanějším, dole zředěnějším roztokem (popř. rozpouštědlem). Oba roztoky jsou během pokusu promíchávány z toho důvodu, aby nevznikaly lokální koncentrační gradienty. Z koncentrací c_1 , c_2 zjišťovaných v různých časových intervalech τ_1 , τ_2 , je možno stanovit prodifundované množství Δm a podle I. Fickova zákona vypočítat difúzní koeficient. Tento způsob měření je vhodnější pro sledování difúze nízkomolekulárních látek než pro koloidní systémy [2]. Tento typ měření je taktéž možné realizovat v horizontálním uspořádání (toto uspořádání bylo použito pro experimenty související s touto diplomovou prací), kdy je membrána, či gelová přepážka umístěna svisle. Výhoda takto uložené cely je v tom, že při případném vzniku bublin nedochází k jejich hromadění pod membránou, případně gelovou přepážkou. Snazší je i plnění cely roztoky, které jsou nalévány současně do obou komor. Další z výhod horizontálního uspořádání je možnost odebírání vzorků i během experimentu, jelikoz jsou obě komory shora přístupné. Taktéž je možné měření automatizovat pomocí vhodných sond ponořených do jedné z komor difúzní cely (zpravidla přijímací).



Obr. 2 Difúze porézní přepážkou [2]

3.2.3 Stanovení difúzního koeficientu založené na měření kvazielastického rozptylu světla

Dopadající a rozptýlené světlo nemá stejnou frekvenci, jako je tomu u elastického rozptylu světla. Rozptýlené světlo obsahuje spojité spektrum složek, které se svou vlnovou délkou poněkud liší od primárního paprsku. V důsledku nahodilého tepelného pohybu rozptylují částice, světlo se zvýšeným nebo sníženým kmitočtem, podle toho, pohybují-li se k nebo od detektoru záření. Spektrum rozptýleného světla je pak symetricky rozloženo kolem kmitočtu primárního paprsku. Šířka píku v polovině jeho výšky je přímo úměrná difúznímu koeficientu. Jako zdroje se používá laserového paprsku o přesně definované frekvenci [2]. Je využíván červený laser o vlnové délce 633 nm, tímto laserem je osvětlen vzorek. Částice, které se pohybují na základě Brownova pohybu, jsou zdrojem rozptýleného světla. Principem metody kvazielastického rozptylu světla je sledování časového vývoje fluktuací intenzity rozptýleného světla těmito částicemi [2].

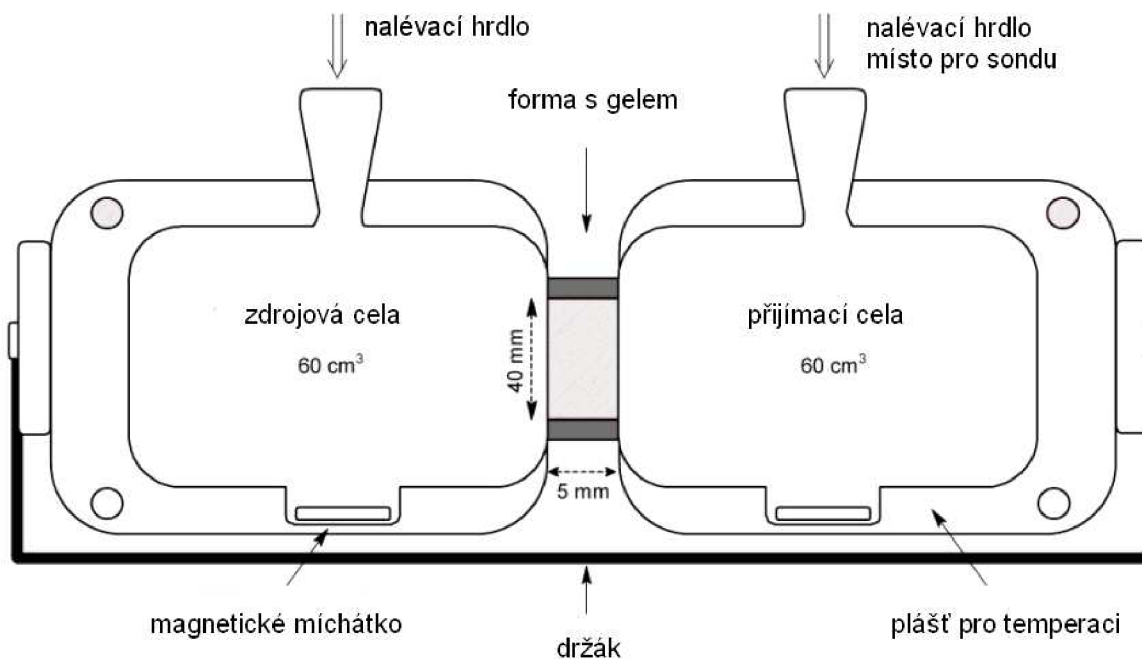


Obr. 3 Intenzita rozptýleného světla I v závislosti na jeho frekvenci ω
 I_m intenzita rozptýleného světla v maximu, ω_0 – frekvence primárního paprsku,
 $\omega_{1/2}$ – frekvence odpovídající polovině maximální intenzity [2]

3.2.4 Difúze v difúzní cele

Difúzní cela je drobné laboratorní vybavení, které primárně slouží ke studiu penetrace léčiva či aktivní látky skrz lidskou pokožku [58]. V našem případě byla difúzní cela optimalizována pro měření difúzních procesů skrz hydrogelové přepážky o definované

tloušťce a tvaru. Skládá se z dvou oddělitelných komor, mezi něž lze vložit porézní přepážku v podobě membrán nebo tuhých či polotuhých (např. hydrogelových) vzorků uchycených ve vhodné formě. Do každé z komor oddělených porézní přepážkou je nalit různě koncentrovaný roztok difúzní sondy (látky, jejíž difúze je v experimentu sledována) a vlivem gradientu koncentrace započne samotná difúze, která s rychlostí charakteristickou pro studovaný materiál vede k vyrovnávání koncentrací sondy v obou komorách difúzní cely [5]. Na následujícím obrázku je uvedeno jednoduché schéma horizontální difúzní cely, rozměry odpovídají rozměrům námi používané cely.



Obr. 4 .Schéma horizontální difúzní cely

Pro stanovení množství prošlé difundující látky se používá řada analytických metod, v závislosti na charakteru této látky. Pro stanovení koncentrace iontových sloučenin (zejména anorganických sloučenin těžkých kovů) je vhodné a jednoduché použití UV-VIS spektrofotometrických metod. Totéž platí pro organické iontové sloučeniny, např. barviva.

Difúzní koeficient pro experimenty v difúzní cele se dá stanovit pomocí následujícího vztahu [43]:

$$D = \frac{1}{\beta \cdot t} \ln \left[\frac{(c_{1,zdrojová} - c_{1,přijímací})_0}{(c_{1,zdrojová} - c_{1,přijímací})_t} \right], \quad (11)$$

kde symbol β vyjadřuje konstantu aparatury (v cm^{-2}) a lze stanovit pomocí následujícího vztahu [43]:

$$\beta = \frac{A \cdot \varepsilon}{l} \ln \left(\frac{1}{V_{zdrojová}} + \frac{1}{V_{přijímací}} \right), \quad (12)$$

kde A je plocha, přes kterou látka difunduje, ε reprezentuje rozdělovací koeficient na rozhraní, l je efektivní tloušťka membrány a V je celkový objem cely.

Z hlediska časové náročnosti experimentů (difúze přes gelové přepážky mohou probíhat i několik dní) je vhodné, pokud se alespoň část měření dá automatizovat. V těchto případech se dá využít vhodných UV-VIS sond spojených s počítačem, kde je možné nastavit vhodný interval mezi měřeními.

3.3 Huminové látky

3.3.1 Obecná charakteristika a struktura huminových látek

Huminové látky (HL) tvoří základ organické hmoty půdy [3]. Jedná se o přírodní látky (směs organické hmoty) obsažené v půdě a kaustobiolitech (rašelině, hnědém uhlí a lignitu). Jako důležitá složka půdy vznikají biochemickými přeměnami (tlením) organických (převážně rostlinných) zbytků a jsou součástí přírodního humusu. Jedná se o směs huminů, huminových kyselin a fulvinových kyselin [8]. Množství uhlíku, který se váže na huminové kyseliny půdy, rašeliny a uhlí, téměř čtyřikrát převyšuje množství uhlíku vázaného v organické složce všech rostlin a živočichů na celém světě [4]. Množství HL v přírodních matricích se pohybují od stopových množství (jíly, písky), přes jednotky (běžné zeminy), až po desítky procent (hnědé uhlí, lignit) [7]. Poslední zmiňované matrice tak jeví jako vhodné zdroje pro získávání huminových látek. Huminové látky jsou látky o velkém rozsahu molekulových hmotností, jejichž centrem je jádro aromatického charakteru, obsahující též kyslíkaté a dusíkaté heterocykly. Na toto jádro navazují řetězce alifatického charakteru s bohatým obsahem různých funkčních skupin. Jde o karboxylové a hydroxylové skupiny, ovšem celková struktura HL se ještě nepodařila zcela identifikovat [3].

Huminové látky se dají rozdělit do tří skupin vzhledem k jejich acidobazickým vlastnostem:

- *fulvinové kyseliny* (FK), které jsou rozpustné v kyselinách i zásadách
- *huminové kyseliny* (HK), které jsou nerozpustné v neutrálním a kyselém prostředí, následným okyselením humátu (roztok HK v hydroxidu) lze HK precipitovat z roztoku a tím pádem je získat ve formě hydrogelu [18]
- *huminy* (HU), které nejsou rozpustné jak v kyselinách, tak v zásadách.

Jednotlivé frakce je od sebe možné na první pohled rozeznat jejich zbarvením (FK jsou zbarveny do žluta, HK jsou šedé až hnědé a HU jsou zpravidla černé). I přes změnu barvy je chemické složení HL podobné, nicméně jejich fyzikální a chemické vlastnosti se značně liší, jak je uvedeno na obrázku 5 [8].

Huminové látky				
fulvinové kyseliny		huminové kyseliny		huminy
2 000	—————	nárůst molekulové hmotnosti	—————	30 000
45 %	—————	nárůst obsahu uhlíku	—————	62 %
48 %	—————	pokles obsahu kyslíku	—————	30 %
	—————▶	pokles kyselosti	—————▶	
	—————▶	pokles stupně rozpustnosti	—————▶	

Obr. 5 Základní vlastnosti huminových látek [39]

Co se týče dalšího rozdělení, je možné HL dělit dle jejich molekulové hmotnosti. FK disponují molekulovou hmotností okolo 2000 Da, z čehož plyne, že tato frakce má nejnižší molekulovou hmotnost z dané skupiny látek. Tato skutečnost je způsobena nižším počtem kondenzovaných aromatických cyklů a charakteristických funkčních skupin (především karboxylové a fenolické) v jejich struktuře. Z tohoto důvodu jsou huminové kyseliny nerozpustné v kyselých roztocích na rozdíl od FK, které mají větší obsah kyselých funkčních skupin (COOH, OH), a proto je možné rozpustit v širokém rozsahu *pH*. FK je tedy možné řadit mezi nízkomolekulární látky, zatímco HK a HU se oproti FK jeví jako látky vysokomolekulární. Z obrázku 5 dále vyplývá, že jednotlivé frakce HL se liší taktéž, co se týče zastoupení uhlíku a kyslíku v jejich struktuře. Je zřejmé, že obsah uhlíku bude vyšší u frakcí s větší molekulovou hmotností (roste od FK k HU). Přesně naopak je tomu v případě kyslíku, kde jeho obsah klesá od FK po HU. Tato skutečnost je způsobena vyšším počtem karboxylových skupin ve struktuře FK, které taktéž způsobují vyšší kyselost této frakce oproti ostatním.

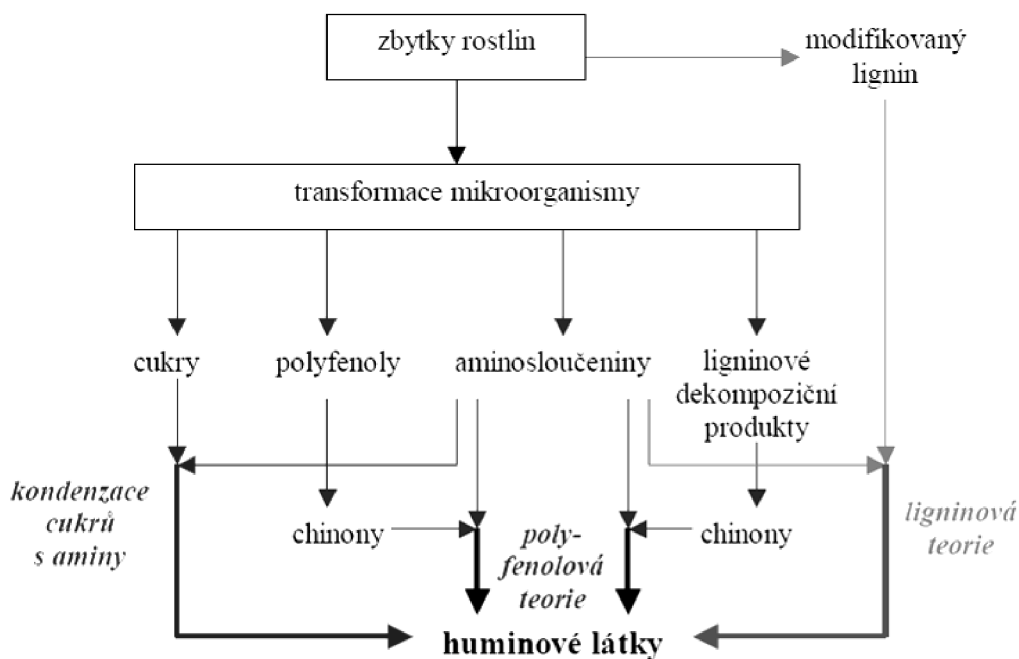
Co se týče rozpustnosti, jsou FK a HK rozpustné v alkalickém prostředí. Nerozpustnost HK v kyselém prostředí je způsobena faktem, že při nízkém *pH* je většina karboxylových a fenolických skupin naprotonizována – jsou tedy v nedisociované podobě. Při zvyšování *pH* dojde nejprve k disociaci karboxylových skupin a následně fenolických, což vede ke zvyšování rozpustnosti v daném roztoku [9].

3.3.2 Tvorba a využití huminových látek

Ačkoli se studiu huminových látek věnuje stále více vědeckých týmů, jejich přesná struktura zatím není zcela objasněna. Zmíněné je dáno tím, že se nejedná pouze o jednu konkrétní látku, ale o směs více látek, které je možné charakterizovat na základě jejich rozpustnosti v různém rozmezí *pH*. Z tohoto důvodu bylo nutné vytvořit jakousi standardizaci v procesu získávání HL dle norem IHSS [18]. Podobně je tomu i v případě popisu vzniku huminových látek v přírodě. Je zřejmé, že se jedná o složitý proces a existuje několik teorií tohoto vzniku, jedná se o takzvaný proces humifikace. V literatuře jsou nejčastěji uváděny tři

základní mechanismy humifikace. Jedna z nejstarších teorií vzniku HL tvrdí, že HL vznikají z lignifikovaných pletiv rostlinných zbytků degradačním způsobem (tzv. *lignitová teorie* [9]). Tato teorie byla zveřejněna v roce 1932 Waksmanem. Další z teorií o vzniku HL je *teorie polyfenolová* [9], která je dnes ve vědeckých kruzích nejčastěji skloňována. Za zmínku stojí také *teorie kondenzace sacharidů s aminy*, kde vznikají nejprve nízkomolekulární organické látky, z kterých jsou následnou oxidací, kondenzací a polymerací tvořeny samotné HL [9].

Jak již bylo zmíněno, popis konkrétních procesů není zcela jednoznačný a lze tedy říci, že každá z teorií alespoň z části odpovídá skutečnosti, proto se teorie často kombinují.



Obr. 6 Teorie vzniku huminových látek [22]

Humínové kyseliny společně s FU a HU jako takové jsou lidstvem využívány už od pradávna, ačkoli dříve lidé o jejich existenci neměli tušení. I tak zemědělci věděli, jak důležitý je podíl humusu na úrodnost půd bohatý právě na humínové látky. Další masovou aplikací, kde je možná se s HL setkat je průmysl energetický, kde se v tepelných elektrárnách využívá spalování uhlí. Lze říci, že čím je uhlí starší, tím menší podíl HL je v něm zastoupen a zároveň poskytuje větší výhřevnost. Z tohoto důvodu se HL extrahují z hnědého uhlí, případně z lignitu, kde podíl HL je ještě vyšší. Ekologické nároky jsou rok od roku přísnější a tak není divu, že se od spalování fosilních paliv upouští a hodnotné suroviny pak nalézají uplatnění i v jiných odvětvích a aplikacích. HL se tedy dají uplatnit především v zemědělství a průmyslu, ale i například v ochraně životního prostředí a farmacii. Dobré review, zabývající se konkrétními aplikacemi HK, obsahují reference [10][11].

V zemědělství je využíváno především pozitivního vlivu HL na strukturu půdy, obsah živin a v neposlední řadě na zadržování vody a vázání těžkých kovů. Konkrétně HK vytvářejí v půdě póry, napomáhají při transportu živin a taktéž stimulují růst mikroflóry. To je koneckonců důvod, proč se přidávají do řady používaných hnojiv. Ve spojení s rašelinou, vápenatými solemi HK a FK lze dosáhnout velice pozitivních výsledků při růstu rostlin,

kde se tato směs aplikuje přímo na listy. Dalším příkladem může být i kombinace humátů amonného se syntetickými polymery, kde byl dokázán taktéž příznivý vliv na růst rostlin [12]. Další aplikací, která je ve spojení se zemědělstvím, je živočišná výroba, kde bylo prokázáno zvýšení tělesné váhy dobytka při použití krmiv s HK [13].

V průmyslu se HK využívají například ve stavebnictví, kde se používají jako hydrofóbní plniva do cementů, kde je pomocí HK možné řídit proces vytvrzování a řídit taktéž smáčivost tvořících se povrchů. Obdobným způsobem se využívá vlivu HK i v keramickém průmyslu. Jako další příklad lze uvést využití HK ve výrobě brusných kapalin (jak na vodní, tak olejové bázi), kde ovlivňují viskozitu a slouží i jako emulgátor. V neposlední řadě jsou HK využívány v kožedělném a papírenském průmyslu, především pro svoje tmavé zabarvení.

V oblasti ochrany životního prostředí jsou HK využívány zejména pro jejich schopnost vázat těžké kovy, toxické látky jako například pesticidy, polycyklické sloučeniny, kyanidy, barviva, detergenty a další. Toto čištění je možné provádět jak v půdě, tak i v případě čištění vod. Odstraňováním fenolů z vody pomocí HK se věnuje práce [14]. Za zmínku také stojí testování humátů vápenatého jako iontově výměnného materiálu, který je schopný sorbovat radioaktivní látky z produktů elektrárenského průmyslu a taktéž je schopný vázat chemické bojové látky při likvidaci chemického arzenálu [15].

Pro farmaceutické a kosmetické využití jsou HK používány zejména pro svoje antivirové, protizánětlivé a chelatační účinky. Tohoto efektu je využíváno například při bahenních lázeňských procedurách. HK jsou používány i pro výrobu potravinových doplňků, kde je ovšem problém (stejně jako ve farmaceutickém průmyslu) s odstraněním nepůvabného zabarvení, aniž by došlo k odstranění jejich účinku. V poslední době je k HK nahlíženo také z důvodu jejich možného využití pro výrobu léčiv. Účinky HK jsou podobné jako v případě heparinu a estrogenu, dokonce byla v laboratorních podmínkách sledována účinnost při léčení rakoviny dělohy laboratorních zvířat. Byly ovšem pozorovány negativní účinky, především jde o fakt, že HK mohou způsobovat mutagenezi DNA [7]. Dobrý souhrn biomedicínských aplikací a výčet zdravotních rizik spojených s HK popisuje reference [11].

3.3.3 Huminové kyseliny

Jak již bylo uvedeno dříve, huminové kyseliny jsou přírodní látky vyskytující se převážně v půdě. HK jako jedna z frakcí HL se od ostatních frakcí liší složením, potažmo rozpustností, kdy se rozpouští v roztocích zásaditého charakteru a nerozpouští se v kyselinách. Z hlediska prvkového složení je v jejich struktuře obsažen uhlík, vodík, kyslík a dusík. Problematické je ovšem sestavení konkrétních strukturních vzorců. HK extrahované z různých přírodních matric se svojí strukturou liší a dá se říci, že se v podstatě jedná o směs různých struktur HK. Z tohoto důvodu se konkrétní vlastnosti jednotlivých HK z různých zdrojů mohou značně lišit, ačkoli základní struktura je stejná. Jedním ze způsobů, jak se dají HK charakterizovat, je zastoupení funkčních skupin v jejich struktuře, přičemž celková kyselost je nižší, než v případě FK.

3.3.4 Extrakce huminových kyselin z přírodních matric

Jak již bylo uvedeno výše, HK jsou součástí půdy a pro jejich použití je tedy nezbytně nutné je oddělit od ostatních složek, ve kterých se přirozeně vyskytují. Veškeré extrakční techniky by ovšem měly splňovat několik následujících kritérií – nesmí ovlivňovat fyzikální

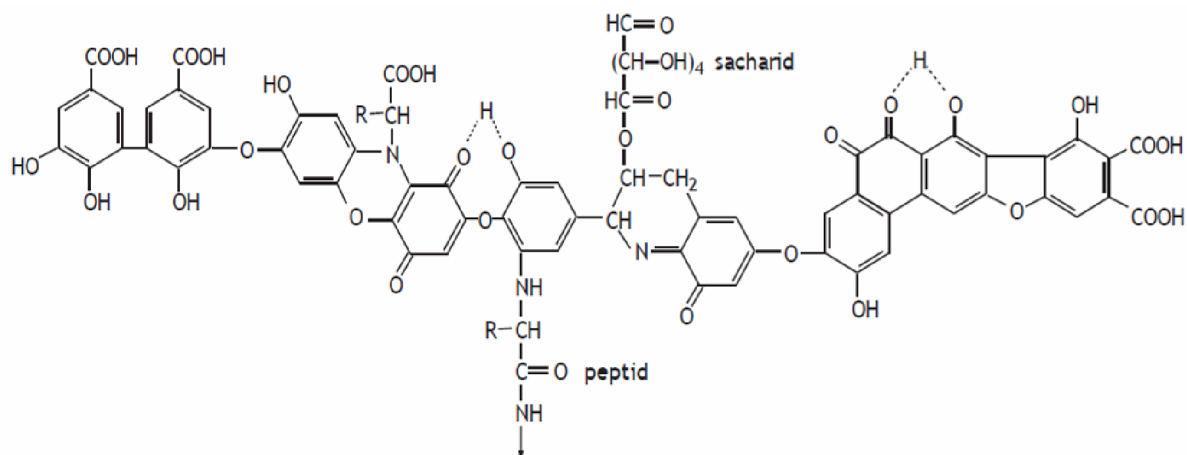
a chemické vlastnosti HK, vzniklé extrakty HK by neměly obsahovat anorganické příměsi, vzorek by měl obsahovat veškeré frakce HK přítomné ve výchozí matrici a zároveň by měla být extrakční metoda použitelná pro různé výchozí matrice (různé zdroje) [16]. Pro následné použití v různých odvětvích je také kladen důraz na čistotu a nepřítomnost bakterií a toxinů (např. pro použití ve farmacii a potravinovém průmyslu).

Samotné extrakce se dají rozdělit do několika skupin, toto rozdělení provedl Stevenson roku 1982, kdy klasifikoval extrakce na alkalické extrakce (výtěžnost až 80 % organické hmoty půdy), neutrální extrakce (výtěžnost do 30 %) a kyselé extrakce (výtěžnost zpravidla také do 30 %) [17]. Obecně jsou nejrozšířenější zmiňované alkalické titrace – z tohoto důvodu jsou tedy přesně definovány dle IHSS [18]. Při této metodě se jako extrakční činidlo používá směs hydroxidu sodného s pyrofosfátem sodným. Pro tuto metodu byla zkoumána i řada dalších extrakčních činidel, ovšem žádné další činidlo neposkytovalo takovou výtěžnost. V případě směsi s hydroxidem se dá dosáhnout až dvoutřetinové výtěžnosti z původní organické hmoty. Kyselina chlorovodíková je následně využívána jako srážecí činidlo. Za touto extrakcí následuje purifikace a poté následuje dialyzace (slouží k odstranění dalších nízkomolekulárních frakcí, jako jsou ionty a nízkomolekulární HK). Pro proces dialyzace se používá speciálních membrán s přesně definovanou velikostí pórů (tzv. *cut off*). Přes membránu mohou procházet nízkomolekulární látky, zatímco vysokomolekulární látky se usazují na povrchu membrány. Zmíněný dialyzační postup se opakuje, dokud roztok HK vykazuje přítomnost chloridových iontů. Přítomnost chloridových iontů se dá dokázat vznikem bílé sraženiny po přidání dusičnanu stříbrného (vzniká chlorid stříbrný). Takto připravené HK jsou následně lyofilizovány. K dosažení požadované čistoty (obsah popela) a vlhkosti je možné proces purifikace a lyofilizace možné několikrát opakovat. Přesný postup je možné najít na portálu ISSH [18].

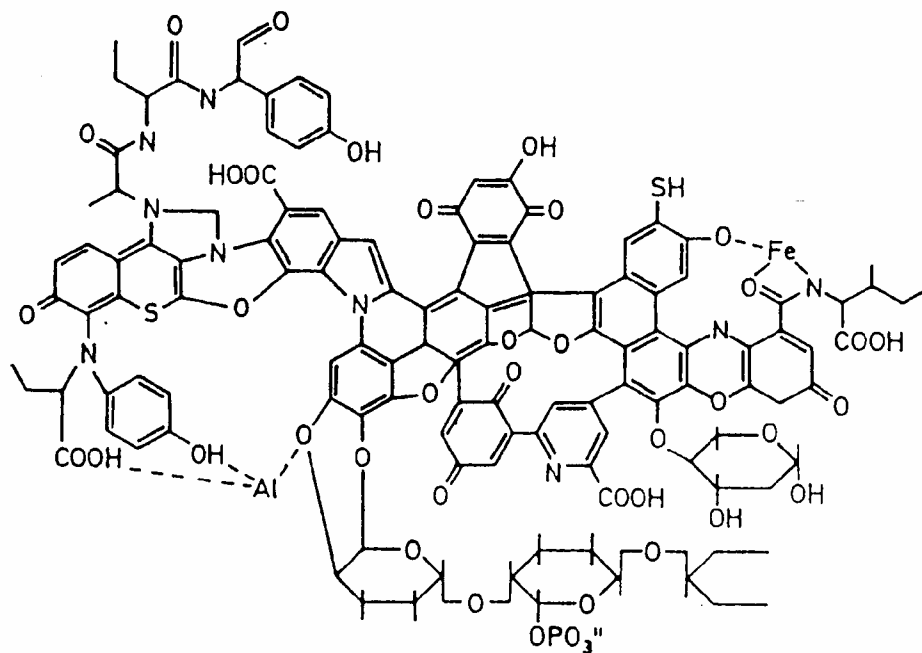
3.3.5 Struktura huminových kyselin

Jak již bylo v předchozích odstavcích uvedeno, struktura HK doposud není zcela objasněna. Výzkum struktury je tedy v současné době předmětem zájmu mnoha vědeckých skupin, přičemž se jedná o patrně nejsložitější oblast ve výzkumu týkající se půdní chemie [19]. I přes zmíněnou náročnost tohoto studia je nutné k dokonalému pochopení významu těchto látek znát jejich přesnou strukturu.

Studium struktury HK se vědci věnují již po několik desetiletí, přičemž vytvořili spousty různých teorií. Za zmínku stojí (dnes již z historického pohledu) hypotetický model struktury HK, který představil Stevenson, který pohlíží na HK jako na makromolekulární sloučeniny [17]. Další obecně uznávaný model (taktéž z dřívější doby) struktury je například model dle Kickutha, který vnímá strukturu HK jako polymerní [20]. Naznačení struktury HK dle Stevensonovy teorie je uvedeno na obrázku 7. Struktura HK dle Kickutha je uvedena na obrázku 8.

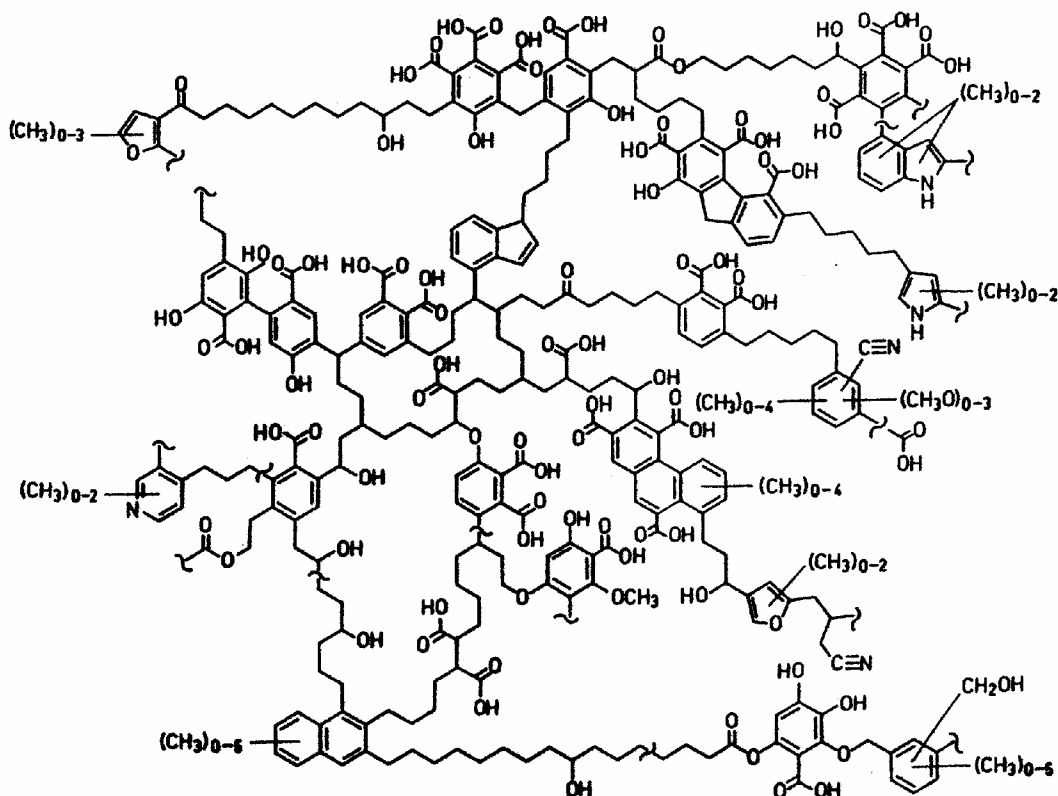


Obr. 7 *Struktura huminových kyselin podle Stevenson (1982) [17]*



Obr. 8 *Strukturní model HK dle Kickutha (1972) [40]*

Výše dva uvedené modely struktury HK jsou jen jedny z mnoha možností, jak se dá na strukturu HK nahlížet, existuje i celá řada dalších možných struktur. Například model dle Schnitzera a Schultena předpokládá mnohem složitější strukturu, jak je uvedeno na obrázku 9.



Obr. 9 Struktura HK dle Schnitzera a Schultena (1993) [41]

Výše zmíněné modely předpokládají, že HK se dají chápat jako ohebné polektrolyty, které v roztocích zaujmají konformaci náhodného klubka různého tvarů a velikosti v závislosti na různých parametrech, jako je například pH roztoku nebo náboj na řetězci a podobně. V zásaditém prostředí se tedy dá předpokládat protáhlý tvar, zatímco v případě kyselého prostředí HK zaujmají strukturu smršteného klubka, čímž se vysvětlují rozdíly v rozpustnosti v závislosti na pH , probírané výše. Předpokládá se, že karboxylové skupiny jsou při nízkém pH naprotonizovány a dochází ke koagulaci. S postupujícím časem a za použití nových analytických metod bylo ovšem prokázáno, že polymerní struktura HK neodpovídá skutečnosti [21]. Podle další přijímané teorie je možné HK definovat jako *supramolekulární agregáty nízkomolekulárních substancí*, které jsou vázány nekovalentními interakcemi, mezi které patří slabé fyzikální interakce a komplexace s vícemocnými ionty [22].

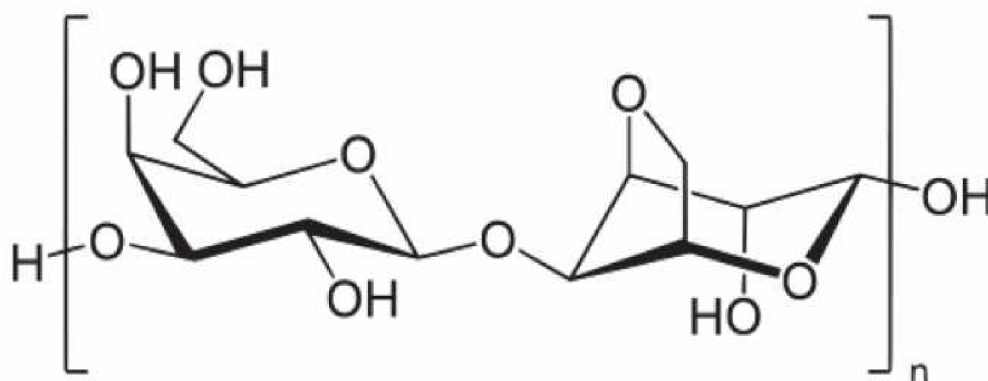
3.4 Agaróza

Agaróza je lineární polysacharid, který je tvořený opakujícími se jednotkami agarobiózy, přičemž agarobióza je disacharid tvořený střídajícími se galaktózovými a 3,6-anhydrogalaktózovými podjednotkami. Jedná se obecně o nenabíý polysacharid, který může obsahovat příměsy sulfátových a pyruvátových skupin. Surovinou pro získávání agarózy jsou mořské řasy typu Agarophyte, jedná se o specifický typ červené řasy, která ve své buněčné stěně vytváří hydrokoloidní formu agarózy [28].

Agaróza je využívána především pro svoje zajímavé termické vlastnosti. Jedná se

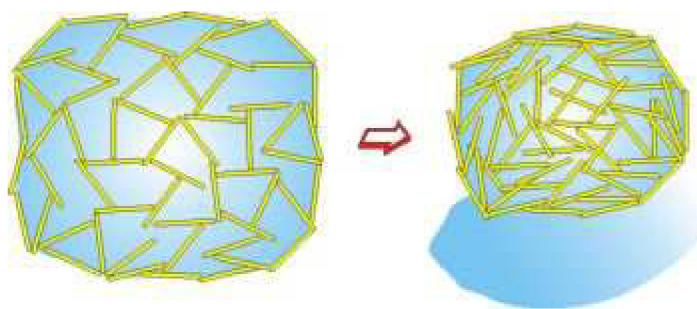
o takzvaný termoreverzibilní polysacharid, což se projevuje hystezí při změně teploty v určitém rozsahu. K termoreverzibilním gelům patří většina fyzikálně síťovaných gelů. Přejít z roztoku na gel a naopak není *termodynamicky* reverzibilní, nenastává při jediné, přesně určené teplotě, jako je tomu u krystalizace a tání čistých látek. Teplota, při níž koloidní roztok tuhne v gel - *teplota tuhnutí (bod gelace)* - je nižší než teplota, při níž gel při zahřívání přechází na sol - *teplota ztekutění*, a obě závisí na rychlosti chlazení nebo ohřívání. Rozdíl, který pro většinu gelů činí 10 až 20 °C, lze vysvětlit tím, že při ochlazení roztoku vznikají nejprve málo pevné vazby, které se postupně upevňují; aby tyto pevnější vazby byly při převedení gelu zpět na sol zrušeny, je zapotřebí zahřátí na vyšší teplotu. Obě teploty závisí také na koncentraci systému [47].

Agaróza je často využívána především v biomedicínských aplikacích díky svým termickým vlastnostem.



Obr. 10 Strukturální vzorec agarózy [28]

Agaróza je nerozpustná ve vodě při nízkých ale i poměrně vysokých teplotách, nicméně při zahřátí na teplotu 85 °C se rozpouští dobře. AG je schopná tvořit termoreverzibilní hydrogel, tedy při chlazení zahřátého roztoku dojde k vytvoření polotuhé gelové hmoty (30 – 40 °C) a při opětovném zahřátí se vrátí do stavu kapalného roztoku, ovšem vlastnosti nebudou zcela totožné [23] (bylo zmíněno výše). Hysterezní chování, které je pozorováno při teplotě tání korespondující gel-sol procesu a také hysterezní chování při teplotě tuhnutí odpovídající sol-gel procesu je funkcí chemické struktury [24]. Agaróza v pevném stavu zaujímá jednoduchou, nebo dvojitou helikální konformaci. Ke gelaci dochází při agregaci dvojtých helikálních struktur a to při teplotě, která souvisí počtu methoxylových a sulfátových skupin, které ovlivňují teplotu gelace agarózových gelů. Při gelaci dochází k vytvoření prostorové – třídimenzionální sítě, která je stabilizována prostřednictvím vodíkových můstků. Bližší informace o tvorbě třídimenzionální sítě agarózových gelů lze najít v referenci [25]. Jako spousta jiných gelových systémů i agaróza vykazuje jednu ze základních gelových vlastností – takzvanou synerezi [48]. Pojem synereze souvisí s procesem stárnutí gelu, kdy dochází ke smršťování prostorové sítě a dochází tak k vytlačování disperzního prostředí z objemu gelu. Tento jev se objevuje především u nových systémů, které ještě nedosáhly termodynamické rovnováhy. Během tohoto procesu se vytváří finální struktura hydrogelu, jsou formovány veškeré styčné body (uzly). Synereze se více projeví při zvyšování teploty, případně po přidání elektrolytu. Na obrázku 11 je naznačen proces stárnutí gelu.



Obr. 11 Proces synerese (stárnutí gelu) Praktické aplikace agarózy [48]

Agaróza je pro svoje unikátní vlastnosti využívána především v biochemických aplikacích, ale dále také například v potravinářském průmyslu. Přehled aplikací, kde se dá s agarózou setkat nabízí reference [26] a [27]. Kromě biomedicínských aplikací a potravinářství se tedy agaróza dále využívá například ve farmacii a pro svoje vlastnosti je využívána i v analytické chemii a sice v gelové permeační chromatografii (GPC). V analytické chemii se s agarózou dá setkat ještě v případě gelové elektroforézy, kde je agaróza využívána jako vhodný nosič pro elektricky nabitě molekuly, této vlastnosti je využíváno například pro separování jednotlivých nukleových kyselin ze struktury DNA.

Za zmínku stojí využití agarózy v medicínských aplikacích, kde se používá jako médium pro růst mikroorganismů. Ve srovnání například s potravinářskou sférou je v biomedicínských aplikacích využíváno vyšší koncentrace agarózy z důvodu vyšších nároků na mechanickou odolnost gelů. Z výše uvedených důvodů je agaróza využívána v tkáňovém inženýrství, v její struktuře je totiž možný růst tkáňových buněk a je tedy vhodná pro vytváření takzvaných *scaffoldů*.

3.5 Gelové systémy

3.5.1 Disperzní soustavy

Gelové systémy jako takové se dají zařadit do tzv. disperzních soustav. Disperzní soustava, jako taková, je vždy tvořena minimálně dvěma vzájemně nemísitelnými fázemi. Jedná z fází je tvořena disperzním prostředím (též *dispersens*), která zabírá většinu objemového podílu. Druhou částí je dispergovaná látka (*disperzum*, *disperzní podíl*), která může být v pevné, kapalné či plynné fázi a je rozptýlená v disperzním prostředí. Disperzní soustavy se dají dále dělit dle různých kritérií:

- počtu fází, tvořící disperzní soustavu na *homogenní* (tvoří jednu fázi) a *heterogenní* (fáze jsou odděleny mezifázovým rozhraním);
- velikosti částic disperzního podílu na *hrubodisperzní* (větší než 500 nm, někdy větší než 1000 nm), *koloidně disperzní* (v rozmezí 1 – 500, respektive 1000 nm) a *analytický disperzní* (částice o velikosti do 1 nm)
- tvaru částic na *globulárně disperzní* (částice ve všech směrech přibližně stejně velké), *laminárně disperzní* (dva rozměry přibližně stejně velké) a *fibrilárně disperzní* (jeden rozměr je výrazně menší než zbylé dva)

- struktury disperzního prostředí na systémy s *disperzním podílem ve formě částic* a systémy s *částicemi disperzního podílu tvořící prostorovou síť*, která prostupuje celým kapalným disperzním prostředím (gely)
- rozdělení počtu velikosti částic na *monodisperzní* (uniformní) – všechny částice jsou stejně velké, *paucidisperzní* – soustava obsahuje několik málo frakcí a *polydisperzní* – částice jsou různě velké
- skupenství disperzního prostředí, jak je znázorněno v následující tabulce

Tabulka 1 Rozdělení disperzních soustav podle skupenství disperzního prostředí [29].

disperzní prostředí	disperzní podíl	disperze	
		koloidní	hrubodisperzní
plynné	plynný	–	–
	kapalný	aerosoly (mlha)	děšť
	pevný	aerosoly (dým)	kouř
kapalné	plynný	pěny	bublina, pěna
	kapalný	emulze	emulze
	pevný	lyosoly	suspenze, gel
pevné	plynný	tuhé pěny	minerály s uzavřenými plyny
	kapalný	tuhé emulze	minerály s uzavřenými kapičkami
	pevný	tuhé soly	eutektika

Koloidní systémy se vyznačují velikostmi částic disperzního podílu o velikosti 1 – 500 (1000) nm. Heterogenní disperze se dá popsat jako systém, ve kterém jsou jednotlivé složky disperzního prostředí odděleny mezifázovým rozhraním, které výrazně ovlivňuje fyzikální vlastnosti celé soustavy. Jsou termodynamicky nestabilní a časem dochází k jejich zániku, jsou podobné hrubodisperzním soustavám, ale liší se velikostí částic. Připravují se buď disperzací, nebo kondenzací z pravých roztoků.

Jednotlivé částice koloidních roztoků nejsou viditelné běžným mikroskopem, ale ultramikroskopem a elektronovým mikroskopem ano. Je možné u nich pozorovat *Brownův pohyb*, který je základem difúzních procesů. Částice v prostoru vlivem teploty kmitají a pohybují se různými rychlostmi a směry, přičemž dochází k náhodným srážkám s okolními částicemi. Intenzita srážek je vyšší se zvyšující se teplotou a taktéž záleží na velikosti částic.

Jednotlivé částice jsou tak malé, že nesedimentují (charakteristické pro koloidní soustavy), nicméně prochází běžnými filtry. Přes některé typy membrán ovšem díky své velikosti neprocházejí (dají se tak oddělovat z roztoků – dialýza), záleží na *cut off*. Další jev, který se dá u koloidních systémů pozorovat je takzvaný *Tyndalův efekt*. Pokud světlo prochází takovýmto systémem, stávají se paprsky viditelnými v podobě kužele, díky tomu, že je světlo rozptýleno koloidními částicemi (např. prach v místnosti, mlha, atd.).

Koloidní systémy se dají taktéž rozdělit na lyofóbní a lyofilní. Lyofilní koloidní systémy jsou charakteristické tím, že mezi disperzním prostředím a dispergovanou látkou je určitá

afinita. Disperzní částice jsou solvatovány na povrchu disperzního prostředí. Z pravidla se jedná o reverzibilní (vratné) systémy, jako příklad se dají uvést mýdla, polysacharidy, bílkoviny, atd. Oproti tomu se lyofóbní systémy vyznačují tím, že dispergované částice nevykazují afinitu k disperznímu prostředí a jsou ireverzibilní (nevrátne). Vyznačují se taktéž tím, že jsou málo stabilní a například po přidání elektrolytu snadno koagulují.

3.5.2 Využití gelů

S gely, ať už uměle či přirozeně připravenými, se setkáváme každý den. Například lidský organizmus, který je tvořený více jak ze dvou třetin vody, je prakticky plný gelových systémů (sklivec oka, mezikloubní prostory, aj.)

Gely se dají klasifikovat jako disperze pevných částic v kapalném disperzním prostředí. Tyto částice tvoří trojrozměrnou síť, přičemž zpravidla jeden rozměr spadá do koloidní oblasti (1 – 500 nm). V případě hydrogelů je disperzním prostředím voda. Tím, že dojde k vytvoření rozsáhlé prostorové sítě, dojde ke snížení celkové pohyblivosti systému a celý systém je pak schopen vykonávat pouze vibrační pohyb [30]. Struktura hydrogelů je tvořena z větší části vodou, či vodným roztokem, disperzní částice tak zaujímají jen řádově jednotky procent celkové hmotnosti či objemu. Systém pak disponuje unikátními vlastnostmi, a proto jsou tyto soustavy nepostradatelné v oblasti hospodaření s vodou v živých organizmech, stejně jako v oblastech neživé přírody. Hydrogely se tak dále využívají v řadě průmyslových a environmentálních aplikacích, v kosmetickém a farmaceutickém průmyslu a jsou využívány i jako suprasorbenty pro použití ve zdravotnických textiliích. Review o těchto a dalších aplikacích hydrogelů nabízí reference [31].

3.5.3 Tvorba gelových systémů

Z hlediska vnitřní struktury tvoří gel nekonečnou trojrozměrnou síť, která prostupuje rovnoměrně celým objemem disperzního prostředí. Spojité je tak nejen disperzní prostředí, ale i disperzní podíl. Na rozdíl od kapalin nejsou disperzní částice schopny se volně pohybovat a mohou vykonávat pouze vibrační pohyb (bylo zmíněno výše). Síly, které poutají disperzní částice a disperzní prostředí, jsou nazývány jako *adhezní síly* a mohou být jak fyzikálního, tak chemického charakteru.

Proces tvorby gelů se nazývá *gelace*. Jedná se o proces, při kterém se spojováním koloidních částic disperzního podílu v souvislou strukturu vytváří a postupně zpevňuje prostorová síť – vzniká gel [29]. Proces gelace může být způsoben některým z následujících procesů: změnou fyzikálního stavu roztoku, vznikají tak fyzikálně síťované gely; chemickou reakcí, vznikají tak kovalentně síťované gely; botnáním reverzibilního xerogelu, čehož lze dosáhnout pouze v případě reverzibilního gelu přidáním disperzního prostředí.

Samotný gel vzniká v tzv. *bodu gelace* [32]. Bodem gelace je nazýván poměrně krátký časový úsek, při kterém je vytvořena nekonečná trojrozměrná síť, což lze charakterizovat tím, že rozměry nově vytvořené sítě jsou shodné s rozměry makroskopické gelové fáze.

3.5.4 Rozdělení gelových systémů

Nejčastěji se gelové systémy dělí podle jejich chování ve vysušeném stavu [31]. Odstraněním disperzního prostředí z gelu (sušení) přejde gel do stavu tzv. *xerogelu*. Jedná se tedy o pevný zbytek – sušinu. Dle chování této sušiny je pak možno soustavu charakterizovat

jako:

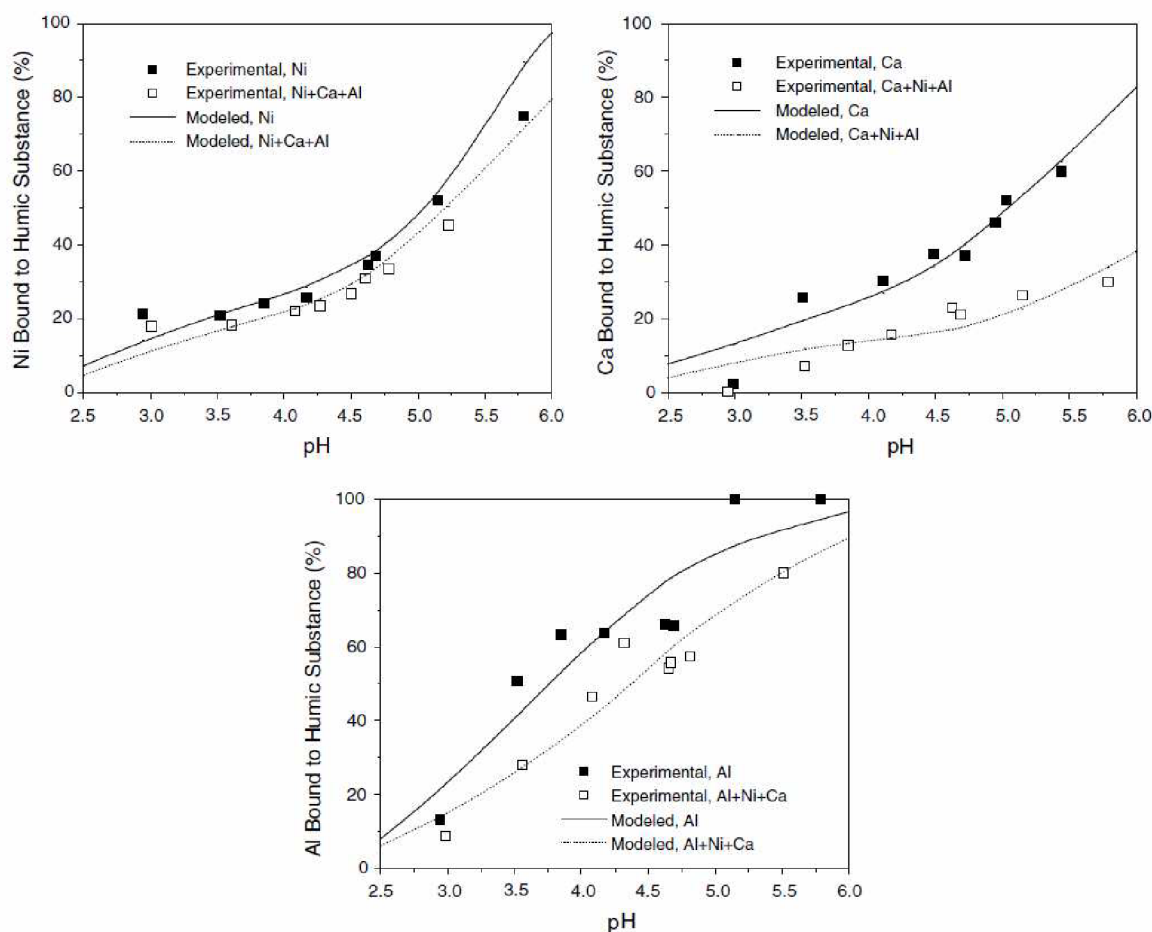
- reverzibilní gel – takovýto typ gelu při vysoušení zmenšuje svůj objem až do úplného vysušení (vznik xerogelu). Xerogel je možné převést zpět do stavu gelu opětovným přidáním disperzního prostředí. Tento proces se nazývá *botnání*.
- ireverzibilní gel – tento typ gelu je zajímavý tím, že při vysoušení zpravidla nemění svůj objem. Tento typ vzniká většinou gelací lyofobních solů. Xerogel je následovně schopen do své struktury přijmout jen omezené množství disperzního prostředí, ovšem není schopen se vrátit do původního stavu.

4 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

V následujících odstavcích jsou uvedeny dva hlavní směry, jak se na probíranou problematiku dá nahlížet. Prvním z nich jsou samotné interakce polutantů a dalších látek s HK. Výzkumy v tomto směru přináší nové poznatky, jak se dají HK využít například při ochraně životního prostředí, zemědělství, apod. Druhým hlediskem je pak využití difúzních cel jako vhodné metody pro stanovování difúzního koeficientu.

4.1 Interakce HK s polutanty a dalšími látkami

Autoři Zhou, Yan a Gu ve svém článku [53] publikují výzkum, který se týkal kompetitivní komplexace kovových iontů s huminovými látkami. Jejich hlavní zájem byl o inoty niklu, vápníku a hliníku, a současně zdůrazňují vliv pH na množství interakcí mezi kovy a HL. Autoři zmíněné interakce hodnotí dle poklesu vodivosti daného systému, ve kterém dochází k tvorbě elektrických dvojvrstev. Nezbytnou součástí jejich výzkumu je taktéž stanovení adsorpčních izoterem. Hlavním poznatkem této práce bylo, že afinita iontů k HL je ve směru $Ni > Ca > Al$. Současně bylo prokázáno, že komplexace je intenzivnější v případě vyššího pH , což je naznačeno na obrázku 12.



Obr. 12 Vliv pH na komplexaci kovů s HL [53]

Předmětem studia autorů práce [55] bylo testování sorpčních charakteristik hybridních materiálů na bázi oxidu křemičitého s obsahem huminových látek inkorporovaných imobilizací karboxylových, případně hydroxylových skupin. Tyto sorpční charakteristiky byly srovnány taktéž s materiálem na bázi oxidu křemičitého s imobilizovanými HK. Sorpční schopnosti byly posuzovány na základě stanovení sorpční kapacity vůči iontům (Pb^{2+} , Cd^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} a Mg^{2+}).

Kolektiv autorů práce [15] se věnoval studiu sorpce měďnatých iontů z vodných roztoků na HK imobilizované na zeolitech. Učinili závěr, že HK imobilizované na zeolity disponují vyšší sorpční kapacitou vůči měďnatým iontům než samotné zeolity. Efektivita adsorpce Cu^{2+} iontů se zvyšuje s rostoucím pH v rozmezí od 3 do 7. Adsorbované ionty byly analyzovány pomocí AAS.

4.2 Difúzní cela jako nástroj pro stanovení difúzního koeficientu

Autoři práce [6] se zabývali difúzí proteinů přes agarózový gel v difúzní cele. Tyto experimenty byly realizovány za různých hodnot pH a také s různou iontovou silou roztoku. Jako difúzní bariéra byl zvolen agarózový gel umístěný do vertikálně uspořádané difúzní cely. Jako vhodné proteiny autoři vybrali BSA (bovine serum albumin) a lysozym. Výsledky jejich experimentů ukazují, že zvyšování pH vede k nepatrnému snižování difúzního koeficientu, nicméně zvýšení iontové síly roztoku vede k poměrně velkému snížení difúzního koeficientu. Konkrétní dosažené výsledky jsou uvedeny v následující tabulce.

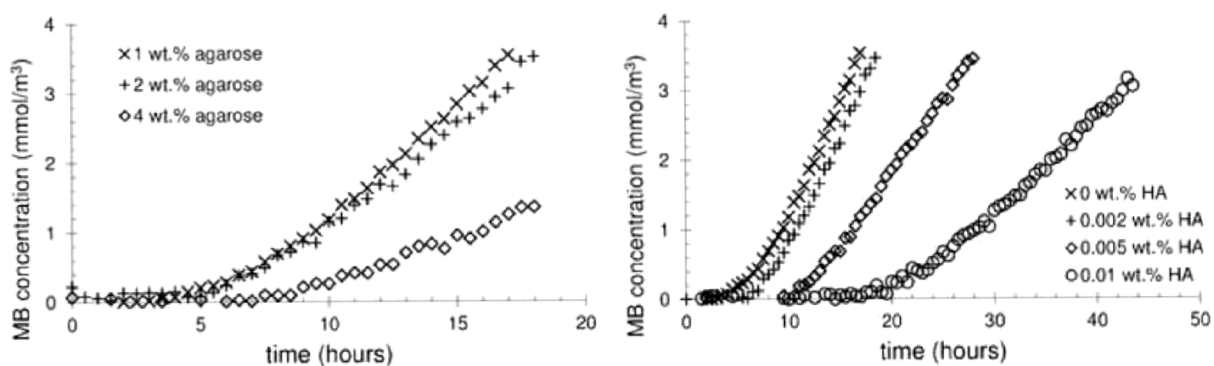
Tabulka 2 Efektivní hodnota difúzního koeficientu pro lysozym a BSA při různém pH a iontové síle [6]

Protein	Diffusion coefficient ($\times 10^{11}$) (m^2/s)		
	pH 4	pH 5.6	pH 11
Lysozyme: low ionic strength			
Experiment 1	22.3	22.4	9.1
Experiment 2	20.6	20.9	8.6
Lysozyme: with 0.1 M NaCl			
Experiment 1	10.4	10.4	9.6
Experiment 2	10.4	12.8	10.4
BSA: low ionic strength			
Experiment 1	4.8	6.5	4.7
Experiment 2	5.0	6.1	6.4
BSA: with 0.1 M NaCl			
Experiment 1	2.5	3.3	2.6
Experiment 2	2.4	3.4	2.3

Autoři rovněž poukazují na velkou časovou náročnost experimentů a navrhují, že by bylo vhodnější experimenty alespoň částečně automatizovat.

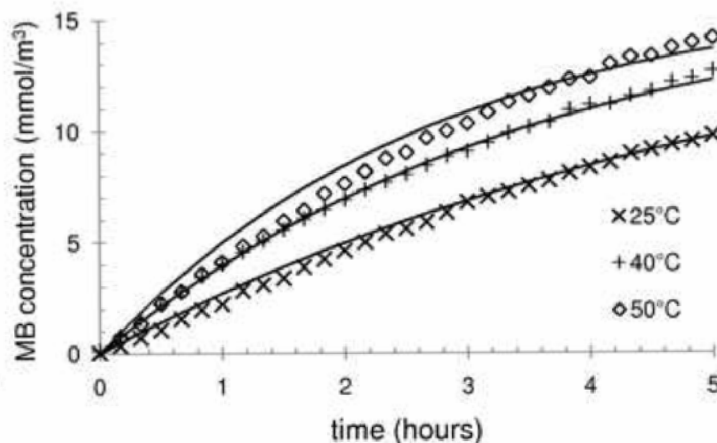
Za zmínku stojí také dosavadní rozsáhlý výzkum interakcí s HL přímo na Fakultě chemické VUT, jehož shrnutí lze najít v rozsáhlé práci [54]. Autoři zkoumají vliv huminových kyselin na změnu difúzního koeficientu při různých teplotách a pH . Jako difúzní

sonda byla použita methylenová modř a jako difúzní médium byl použit agarózový gel. Bylo potvrzeno dramatické snížení difúzního koeficientu při přidavku HK difúzního média. Taktéž bylo pozorováno prodloužení času potřebného k penetraci skrze gelovou přepážku s přidavkem HK. Na obrázku 13 je uvedena závislost prošlého množství methylenové modře na různých koncentracích agarózy, respektive huminových kyselin.



Obr. 13 Závislosti prošlého množství methylenové modře na čase pro různé koncentrace agarózy, respektive huminových kyselin [54]

Vliv teploty na difúzní koeficient je dobře patrný z obrázku 14.



Obr. 14 Vliv teploty na prošlé množství MM [54]

5 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

5.1 Použité chemikálie

hydroxid sodný, p.a. Penta Chrudim
kyselina chlorovodíková, 35 %, p.a., Lach-Ner s.r.o.
kyselina chlorovodíková, Penta 1 N c = 1 M
humínové kyseliny – popel 28,92 %, 2008
agaróza, Sigma Aldrich Co., for routine use
chlorid měďnatý, dihydrát, p.a. Lach-ner s.r.o.
methylenová modř, Lachema
rhodamin 6G, Sigma-Aldrich Co.
chicago blue 6B, Sigma-Aldrich Co.
fluorescein, Sigma-Aldrich Co.
destilovaná voda

Používané humínové kyseliny byly získány metodou alkalické extrakce z jihomoravského lignitu (důl Mírov, lokalita Mikulčice). Jedná se o upravenou metodu publikovanou autory Piccolem a Contem [42]; tato metoda byla použita v celé řadě předchozích experimentů ohledně fyzikálně-chemických vlastností HK [22], [39], [43], [44] a [45].

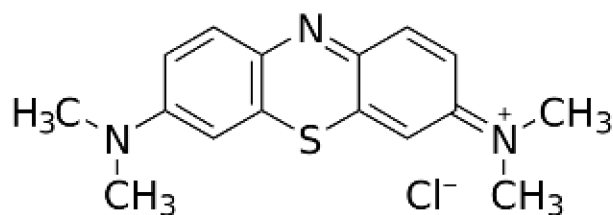
5.1.1 Chlorid měďnatý, dihydrát

Dihydrát chloridu měďnatého je anorganická sloučenina dobře rozpustná ve vodě, kterou obarvuje do modra. Po síranu měďnatém se jedná o nejrozšířenější měďnatou sloučeninu. Jedná se o sloučeninu těžkého kovu a proto je nebezpečná pro životní prostředí a toxická pro vodní organismy. Spolu s dalšími těžkými kovy se jedná o často se v přírodě vyskytující polutant, a proto byla tato sloučenina jako vhodné difúzní medium. Jelikož se nejedná o barvivo, bylo zapotřebí počítat s vyšší navázkou chloridu měďnatého k přípravě roztoku pro difúzní sondu (17 g/l). Lze předpokládat elektrostatické interakce mezi kationty mědi se záporně nabitými HK.

5.1.2 Methylenová modř

Methylenová modř (MM) je heterocyklická aromatická sloučenina se systematickým názvem 3,7-bis(dimethylamino)-feno-thiazin-5-ium-chlorid, využívaná především v chemických a biologických odvětvích. V chemických aplikacích se používá především jako redoxní indikátor a v biologii se využívá především v aplikacích spojených s výzkumem RNA a DNA [49].

Toto barvivo bylo vybráno jako difúzní sonda proto, že v roztoku tvoří kladně nabitou strukturu (díky kladnému náboji na dusíku) a dá se tedy předpokládat interakce se záporně nabitými HK. Dá se tedy rovněž předpokládat, že difúze bude zpomalena právě díky probíhajícím interakcím a taktéž se dá předpokládat, že část barviva zůstane vázána na HK přítomné v agarózovém gelu (viditelné pouhým okem – zabarvení gelu po provedení experimentu). Taktéž lze předpokládat, že difúze bude probíhat pomaleji než v případě CuCl_2 , protože molekula MM je výrazně větší.

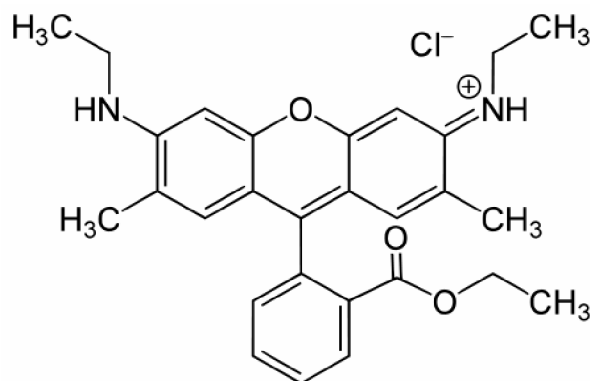


Obr. 15 *Strukturní vzorec methylenové modři [49]* **Chyba! Nenalezen zdroj odkazů.**

5.1.3 Rhodamin 6G

Barvivo rhodamin 6G patří do široké skupiny rhodaminů, známe především pro svoje fluorescenční vlastnosti. Často je využíváno k výzkumu proudění v kapalinách a je taktéž často využíván v biotechnologických aplikacích, například ve fluorescenční mikroskopii [51].

Pro difúzní experimenty byl vybrán proto, že v roztoku tvoří kladně nabitě částice a dá se tedy předpokládat, že budou probíhat elektrostatické interakce se záporně nabitými molekulami HK.

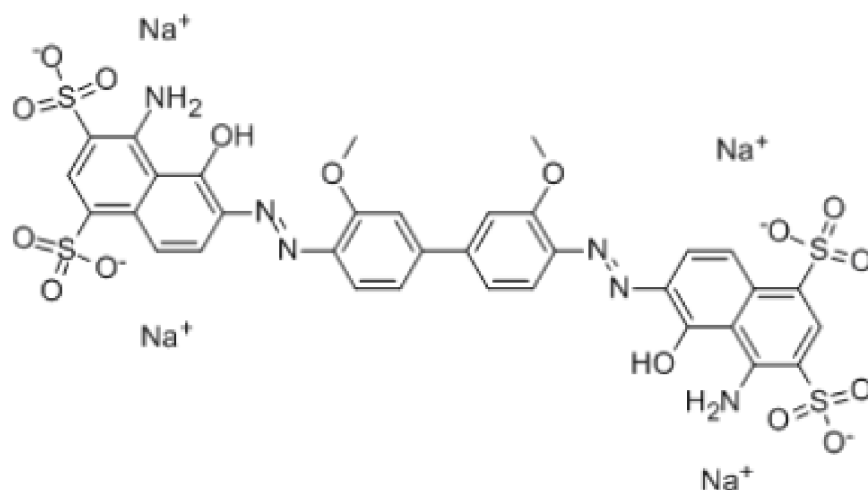


Obr. 16 *Strukturní vzorec rhodaminu 6G [51]*

5.1.4 Chicago blue 6B

Barvivo Chicago Blue patří mezi azobarviva (díky vazbám mezi atomy dusíku) a za normálních podmínek tvoří zelenomodrý prášek [50].

Toto barvivo bylo k difúzním experimentům vybráno proto, že ve vodném roztoku tvoří záporně nabitě částice. Jelikož HK jsou ve vodných roztocích také záporně nabitě, dá se předpokládat, že bude docházet k vzájemnému odpuzování těchto částic a difúzní koeficient bude tedy tímto faktorem ovlivněn. Strukturní vzorec barviva je uveden na obrázku 17.

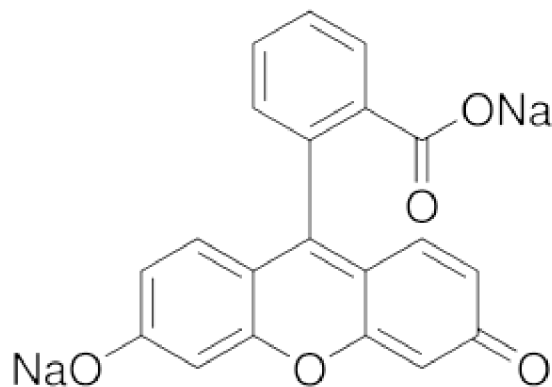


Obr. 17 *Strukturální vzorec barviva chicao blue* [50]

5.1.5 Fluorescein

Fluorescein, respektive jeho sodná sůl je za normálních podmínek červený prášek. Je dobře rozpustný ve vodě i v ethanolu. V roztoku tvoří při větších koncentracích červený roztok, při nižších je barva žlutozelená. Používá se především jako indikátor, ale i jako potravinářské barvivo – je netoxický [59].

V roztoku tvoří záporně nabitě částice, a proto se dají předpokládat odpudivé interakce mezi HK a fluoresceinem. Strukturální vzorec fluoresceinu je uveden na obrázku 18.



Obr. 18 *Strukturální vzorec sodné soli fluoresceinu* [60]

5.2 Přístroje a pomůcky

UV-VIS spektrometr Hitachi U-3300

analytické váhy Sealtec SBC 31

spektrofotometrické sondy TP-300-UV-VIS, optické kabely, zdroje světla LS-1-LL,

minispektrometr RedTide 650, vše od společnosti Ocean Optics

diafragmová difúzní cela, PermeGear, Inc.

přenosný teploměr GMM 175 Greisinger

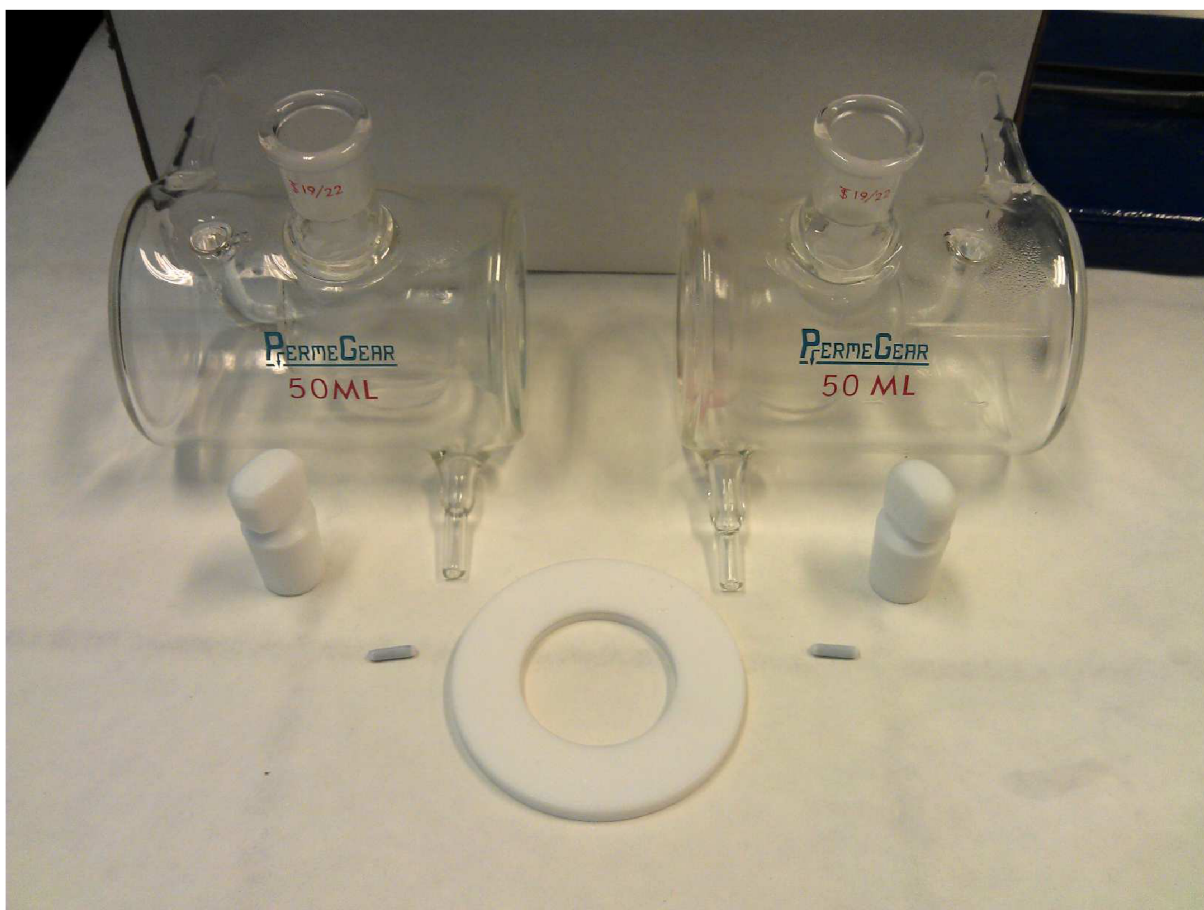
pH metr WTW pH 330

ultrazvuk UCC 1 Ultrasonic Compaq Cleaner powersonic
vícemístná magnetická míchačka Variomag Poly
membrány Spi-Pore, 47 mm, 2 μ m, spol. Spi Supplies
drobné laboratorní pomůcky jako váženky, mikropipety, lab. sklo, atd.

5.2.1 Difúzní cela

K prováděným experimentům byla použita diafragmová difúzní cela *PermeGear, Inc.* Jedná se dvouplášťovou difúzní celu vyrobenou ze skla. Opláštěvání slouží k temperaci sledovaných roztoků a za použití vhodného termostatu tak lze roztoky zahřívat, respektive chladit. Součástí aparatury je i držák difúzních cel, který obě komory tlačí směrem k sobě a tím pak nedochází k úniku roztoků z cel ven.

Objem každé z komor cely je 60 ml. V případě difúzí přes membránu se membrána umísťovala přímo mezi obě části cely (utěsněné pomocí těsnícího silikonu). Jednalo se o membránu od společnosti Spi-pore o průměru 40 mm a velikosti pórů 2 μ m. V případě difúzí přes membránu byla mezi komory umístěna přepážka s otvorem o průměru 4 cm a tloušťce 0,5 cm. Do této přepážky byl umísťován agarozový gel, respektive agarozový gel s přísadkou HK.



Obr. 19 Difúzní cela s formou pro gelovou přepážku

5.2.2 Automatický UV-VIS spektrofotometr Spectra Optics

Měřicí aparatura se skládá z několika samostatných částí. Základem je zdroj světla, ze kterého je veden světelný paprsek pomocí optických kabelů do sondy. U sondy je rozhodující optická dráha paprsku v měřeném prostředí, se kterou je možné manipulovat změnou hlavy samotné sondy. Pro koncentrovanější roztoky je vhodné použít sondu s kratší optickou dráhou, naopak pro málo koncentrované roztoky je vhodné použít sondu s optickou dráhou delší. Pro měření v rámci této diplomové práce byla použita sonda s optickou dráhou 1 cm. Paprsek z optického kabelu vystoupí z jednoho konce sondy, projde prostředím, odrazí se od zrcátka a vrací se zpět. Délka optického prostředí je tedy dvojnásobná oproti vzdálenosti výstupu a zrcátka.

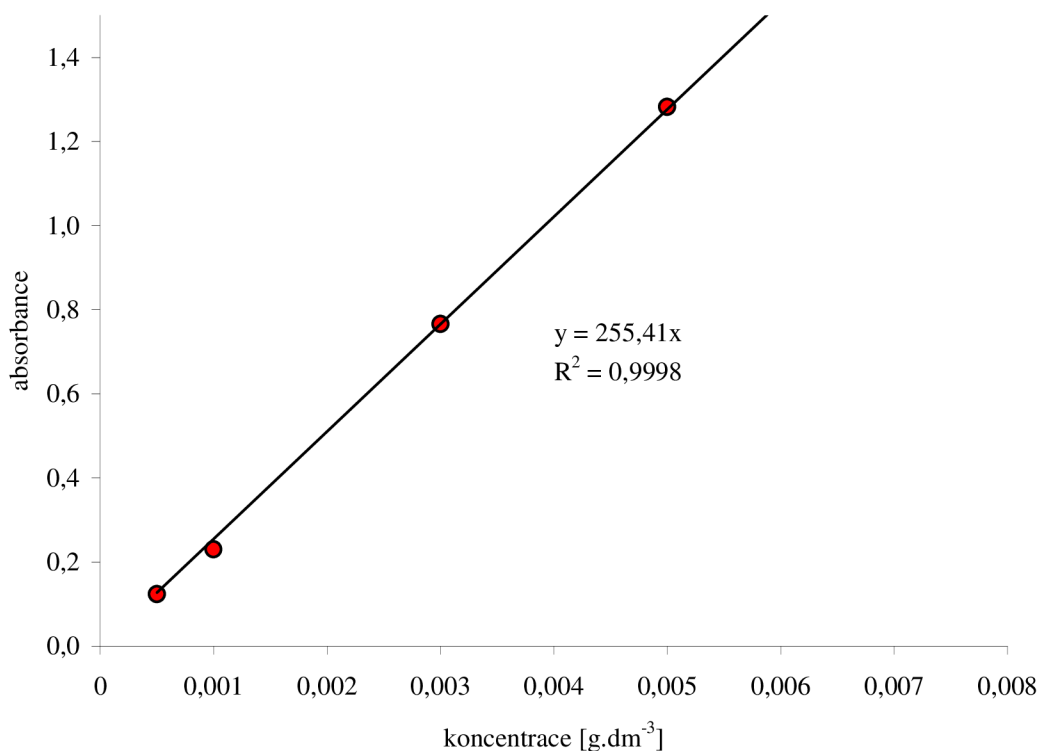
Paprsek odražený do zrcátka následně putuje optickým kabelem do detektoru, který je spojen s počítačem, vybaveným softwarem Spectra Suite. Tento program umožňuje nastavit různé měřicí parametry, jako je například rozsah měřeného spektra, citlivost, interval a formát ukládání dat a další. Program umožňuje současné měření více vzorků, které je limitováno počtem samotných sond.

Práce s aparaturou je jednoduchá a intuitivní a pomocí vhodně nastavených parametrů se dá měření téměř zcela automatizovat. Není potřeba stálá přítomnost obsluhy během měření, pouze pro spuštění a ukončení experimentu, případně občasná kontrola aparatury (například zdali se nevytvořila v sondě bublina).

5.2.3 UV-VIS spektrofotometr Hitachi

Dvoupaprskový UV-VIS spektrofotometr Hitachi byl použit pro měření absorpce vzorků, obsahující těžké kovy (chlorid měďnatý). Ionty těžkých kovů totiž leptají zrcátka v UV-VIS sondách Ocean Optics, a proto bylo nutné použít jiný přístroj. Hitachi měří absorpenci douprskovým způsobem, tedy kyvetu se vzorkem, oproti kyvetě s čistým rozpouštědlem. Použít se dají jak plastové, tak skleněné i křemenné kyvety. Pro měření týkající se této diplomové práce byly použity kyvety křemenné. Měření se zde ovšem nedá automatizovat, jako v případě použití sond a je tedy potřeba odebírat vzorky v pravidelných intervalech (dvouhodinových v případě difúze přes gel, 5 minutových v případě difúze přes membránu).

Na obrázku 20 je jako příklad vynesena závislost absorpance při 525 nm na koncentraci roztoků rhodaminu (kalibrační křivka) včetně směrnice a hodnoty spolehlivosti. Zbylé kalibrační křivky jsou uvedeny v přílohách na konci dokumentu.



Obr. 20 Závislost absorpce na koncentraci roztoků RH při 525 nm

Při měření byla vždy proměřena celé spektra (v rozsahu 300-900 nm), z nichž byly vybrány hodnoty absorpce v maximu (v případě rhodaminu 525 nm). Na základě vynesené závislosti bylo poté možné zvolit vhodnou koncentraci roztoků pro difúzní experimenty – tyto koncentraci jsou uvedeny dále v textu v tabulce 3.

5.3 Pracovní postupy

5.3.1 Příprava roztoku huminové kyseliny

Zásobní roztok HK o koncentraci 1 g/l byl připravován dále rozepsaným způsobem. Připravováno bylo vždy 100 ml roztoku, přičemž navážka HK do tohoto množství činí 0,1 g. Toto množství bylo kvantitativně převedeno do zásobní lahve s 30-40 ml 0,5 mol/l roztoku hydroxidu sodného. Do zásobní lahve bylo umístěno magnetické míchátko a uzavřená láhev byla ponechána na míchačce při 250 ot/min po dobu minimálně 24 hodin. Po 24 hodinách byl roztok za stálého míchání zneutralizován 1 mol/l kyselinou chlorovodíkovou. Kyselina chlorovodíková byla do roztoku přidávána po kapkách tak dlouho, dokud pH nebylo v rozmezí 6,8-7,2 (měřeno elektronickým pH-metrem WTW pH 330). Tento zneutralizovaný roztok byl kvantitativně převeden do 100 ml odměrné baňky a doplněn po rysku destilovanou vodou. Takto připravený roztok byl připraven k použití v experimentech, ovšem z hlediska degradovatelnosti HK byly roztoky používány maximálně týden. Roztoky NaOH a HCl byly připravovány z normalalů.



Obr. 21 Zásobní roztok huminové kyseliny

5.3.2 Příprava agarozového gelu

Agaróza je za normálních podmínek bílý prášek. Ve studené vodě se prakticky nerozpouští. Při zvýšení teploty suspenze přibližně na 85° C se agaróza začne ve vodě rozpouštět. Na následujících řádcích bude popsán postup pro přípravu agarozového gelu pro jednu formu (přepážku).

0,1 g agarózy bylo naváženo s přesností na tři desetinná místa. Toto množství bylo kvantitativně převedeno do 25 ml kádinky, kde již bylo připraveno 10 ml destilované vody. Kádinka byla poté umístěna na elektrický vařič a za stálého míchání byla suspenze zahřívána až na teplotu 85 °C, kdy došlo k úplnému rozpuštění agarózy. Kádinka s horkým roztokem byla poté umístěna do horké ultrazvukové lázně na jednu minutu, aby došlo k odstranění vzniklých vzduchových bublinek. Tento ještě horký roztok byl nalit do formy, která byla ze spodní strany přikryta sklíčkem. Roztok bylo třeba nalévat opatrně, aby se netvořily bublinky. Po nalití roztoku byla i horní část formy přikryta sklíčkem a celá soustava byla zajištěna pomocí svorek. Sklíčka slouží k vytvoření pravidelného hladkého povrchu z obou stran a zároveň zabraňují vypařování disperzního prostředí. Forma s gelem byla ponechána při laboratorní teplotě k chladnutí po dobu 45 minimálně minut. Po odstranění sklíček byla forma s gelem připravena k použití v difúzní cele.

5.3.3 Příprava agarozového gelu s přídavkem huminových kyselin

Příprava agarozového gelu s huminovou kyselinou probíhala obdobně jako v předchozím případě. 0,1 g agarózy bylo naváženo s přesností na tři desetinná místa. Tato navážka byla kvantitativně převedena do kádinky, kde bylo 9 ml deionizované vody 1 ml zásobního roztoku HK o koncentraci 1 g/l, výsledná koncentrace HK v gelu byla tedy 0,1 g/l. Tato suspenze byla zahřívána jako v předchozím případě na 85 °C a stejným způsobem byl vzniklý roztok ponechán v ultrazvukové lázni a následně převeden do formy. I v tomto případě

chladnutí na vzduchu trvalo minimálně 45 minut, poté byla forma připravena k použití v difúzní cele.

5.3.4 Nastavení UV-VIS sondy Ocean Optics

Před každým experimentem bylo nutné správně nastavit měřící aparaturu. V softwaru Spectra Suite bylo zvoleno měření absorbance. Poté bylo nutné vybrat příslušný detektor, kde byla následně automaticky nastaven integrační čas. Dalším krokem bylo proměření spektra čistého rozpouštědla (ve všech případech destilovaná voda, neboť byla používána k přípravě všech měřených roztoků). Následně bylo nutné změřit šum detektoru, čehož bylo docíleno tak, že se odpojil optický kabel od detektoru a byl nahrazen záslapkou (alternativa světelné pasti). Poté byla sonda připravena k měření.

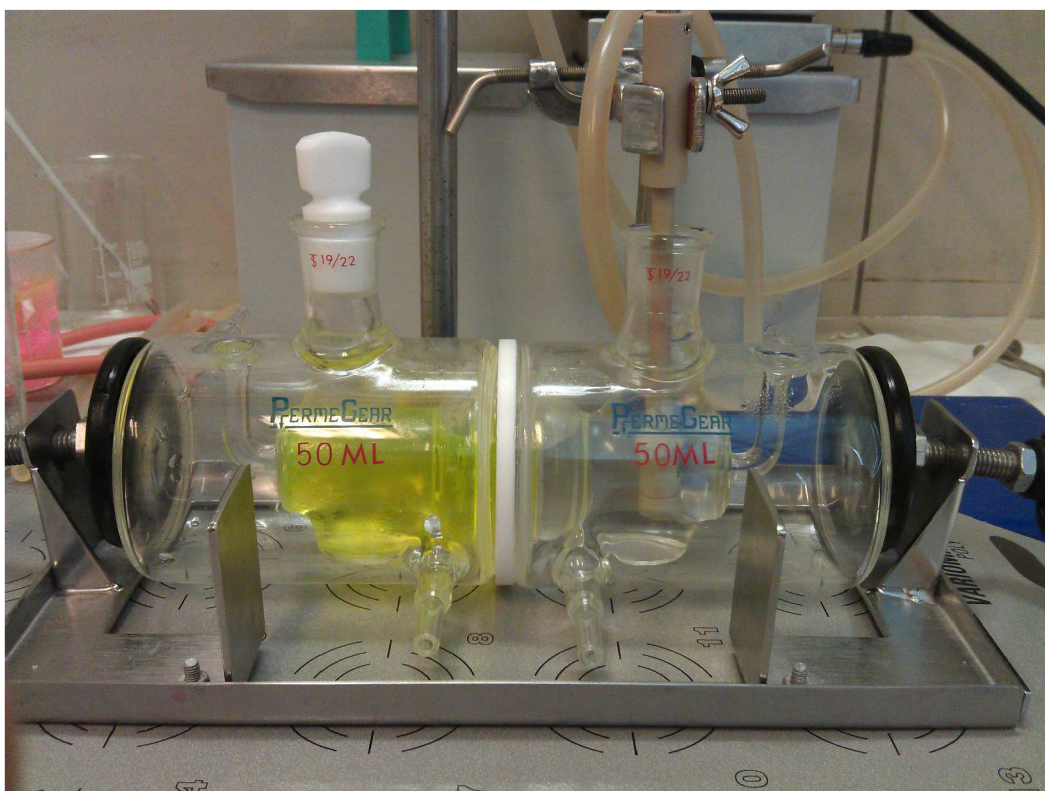
5.3.5 Sestavení difúzní cely a spuštění experimentu

Difúzní cela se skládá ze dvou komor a každá z komor má objem 60 ml. Bylo tedy připraveno jedna 60ml čistého rozpouštědla (destilovaná voda) a 60 ml vybraného roztoku difúzního média. Roztoky byly připravovány ze zásobních roztoků ředěním. Bylo nutné nalévat roztoky do obou komor současně za použití nálevek, aby nedošlo k vytlačení gelu z formy vlivem nerovnoměrného hydrostatického tlaku. Výchozí koncentrace difúzní sondy byla volena tak, aby absorbance roztoku zdrojové cely byla v rozmezí 1,5 – 2 a bylo tedy zaručeno dostatečného koncentračního spádu. Koncentrace roztoků do zdrojových cel jsou shrnuty v tabulce 3.

Tabulka 3 *Výchozí koncentrace roztoků do zdrojové cely a molární hmotnosti*

roztok	koncentrace (g/l)	molární hmotnost (g/mol)
chlorid měďnatý	17,00	170,48
methylenová modř	0,01	319,86
rhodamin 6G	0,01	479,02
chicago blue 6B	0,025	992,80
fluorescein	0,01	376,27

Po přípravě roztoků byla sestavena samotná difúzní cela. Forma se ztuhnutým gelem byla umístěna mezi obě komory difúzní cely a upevněna do držáku. Do každé z komor bylo umístěno malé magnetické míchátko a v tomto složení byla cela umístěna na vícemístnou magnetickou míchačku (nastaveno vždy 250 ot/min). Za použití nálevek pak byly oba připravené roztoky současně nality do příslušné komory difúzní cely. Následovalo umístění optické sondy do přijímací komory a nastavení měřících parametrů, především interval ukládání měřených spekter. Bylo taktéž zapotřebí překrýt hrdlo se sondou s parafilmem, aby se zamezilo odpařování rozpouštědla.



Obr. 22 Probíhající difúzní experiment s ponořenou UV-VIS sondou

5.4 Stanovení difúzního koeficientu

5.4.1 Export dat

Data získaná z prostřednictvím programu Spektra Suite byla exportována do textových souborů, přičemž každé uložení spektra znamenalo vytvoření nového textového souboru. Tyto soubory byly následně převedeny do programu MS Excel pomocí makrosouboru. Tato surová data bylo nutné vyhladit. Pro tento úkol byl použit program Origin851 do kterého byla nakopírována data z MS Excel a následným příkazem byly závislosti převedeny do vyhlazených křivek. Upravená data byla zkopírována na nový Excelovský list, kde bylo nutné vymazat každý druhý sloupec (data se opakovala) pomocí příslušného makrosouboru na mazání sloupců. Takto upravená data už bylo možné dále zpracovávat.

5.4.2 Výpočet difúzního koeficientu

Stanovení difúzních koeficientů bylo hlavní náplní této diplomové práce, přičemž samotné stanovení se dá rozdělit do dvou skupin. Jedna z nich je stanovení difúzního koeficientu při průchodu přes membránu a dále stanovení difúzního koeficientu při průchodu gelovou bariérou, respektive gelovou bariérou s HK. V obou případech je zapotřebí znát rovnici přímky prokládající oblast lineárního nárůstu koncentrace difúzního média v přijímací cele.

Pro stanovení difúzního koeficientu při průchodu přes membránu bylo použito následujícího vztahu:

$$\beta \cdot D \cdot t = -\ln\left(1 - 2 \frac{c_p}{c_{z0}}\right) = LN, \quad (13)$$

kde β je konstanta která charakterizuje použitou membránu, byla stanovena kalibrací cely za použití materiálu, který má známou hodnotu difúzního koeficientu [57].

Ve druhém případě, kdy se jednalo o difúzi přes gelovou bariéru (případně gel s HK), byl využit vztah:

$$D_{\text{eff}} = \left(\frac{dn}{dt}\right) \cdot \left(\frac{l}{\Delta C_{10}}\right), \quad (14)$$

přičemž, tento vztah bere v úvahu tloušťku bariéry l .

6 DISKUZE A VÝSLEDKY

6.1 Sestrojení kalibračních křivek

Pro přesné stanovení okamžité koncentrace vzorku bylo zapotřebí sestavit kalibrační křivky závislosti absorbance na koncentraci. Vzorky pro každou kalibrační křivku byly připraveny ze zásobních roztoků příslušných barviv a roztoků kovů ředěním. Tímto způsobem byly sestaveny kalibrační křivky pro všechny difúzní sondy, hodnoty směrnic těchto přímek lze taktéž chápat jako extinkční koeficient. Jejich hodnoty při dané vlnové délce jsou uvedeny v následující tabulce.

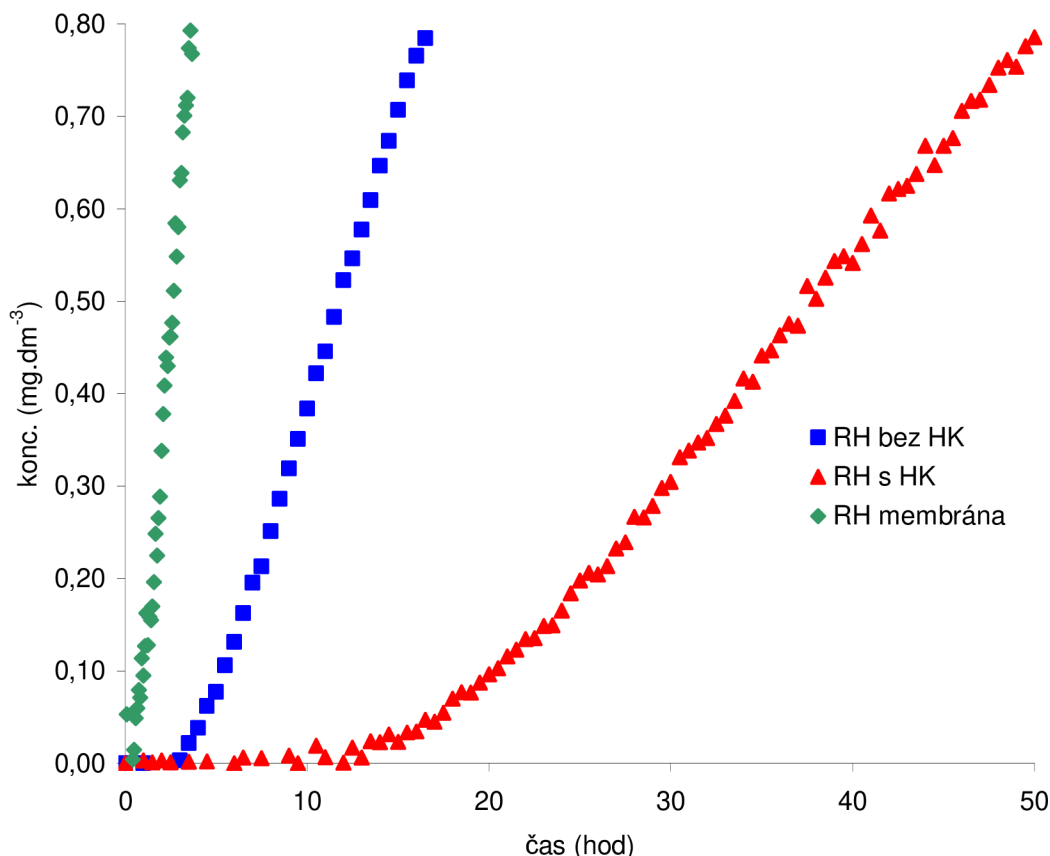
Tabulka 4 Naměřené extinkční koeficienty při dané vlnové délce

difúzní sonda	extinkční koeficient ε (mol.g ⁻¹ cm ⁻¹)	vlnová délka (nm)
chlorid měďnatý (dihydrát)	0,0787	825
methylenová modř	179,50	665
rhodamin 6G	255,41	525
chicago blue 6B	82,91	618
fluorescein	108,02	487

Tyto experimentálně stanovené hodnoty extinkčních koeficientů se liší od tabelovaných hodnot, ovšem jejich průběh je lineární, a proto relativně vztažené závislosti poskytují věrohodná data.

6.2 Vliv přídavku HK do agarozového gelu na čas průchodu

Z výsledků stanovených pro difúzi methylenové modři je patrné, že přídavek HK do gelové matrice zapříčiní jednak pokles efektivního difúzního koeficientu (nižší směrnice přímky prokládající oblast nárůstu koncentrace v přijímací cele) a také se tento přídavek projeví prodloužením času průchodu bariérou. Srovnání průběhu difúze rhodaminu skrz agarozový gel a agarozový gel s přídavkem HK je patrné na obrázku 23.



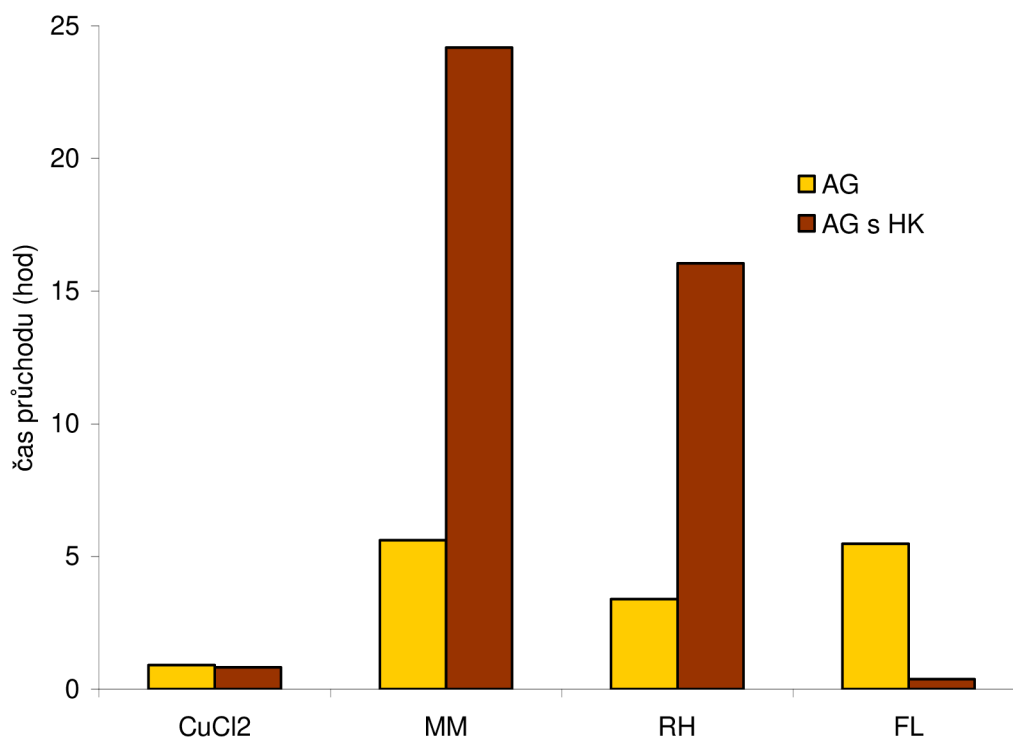
Obr. 23 *Nárůst koncentrace na čase ve zdrojové cele pro rhodamin přes membránu, agarózový gel a gel s přidavkem HK*

Na obrázku 23 je uvedena závislost prošlého množství rhodaminu na čase pro různá difúzní média, ostatní průběhy jsou uvedeny v přílohách na konci dokumentu.

Z grafu dobře patrné, že zpočátku nelze pozorovat nárůst koncentrace barviva v přijímací cele. Tento nárůst je patrný až po určitém čase (čas průchodu). Čas průchodu média přes čistý agarózový gel je nižší, než v případě s přidavkem HK do gelové matrice. Lze tedy usuzovat, že kladně nabitě částice barviva jsou zadržovány vlivem elektrostatických interakcí se záporně nabitými HK. Čas průchodu se dá matematicky stanovit proložením přímky v oblasti lineárního nárůstu koncentrace v přijímací cele – z rovnice této přímky se dá snadno spočítat průsečík s osou x , který reprezentuje čas průchodu.

V případě čistého agarózového gelu je prostup částic hnán koncentračním gradientem, ale bržděn sítí gelu, přičemž částice barviva s gelem neinteragují. V případě gelu s přidavkem HK roste množství přitažlivých interakcí. Lze předpokládat, že porozita i tortuozita gelu s HK je prakticky stejná, jako v případě čistého gelu, protože nízký přídavek HK (setinový co do hmotnostního obsahu ve srovnání s obsahem agarózy, tvořící základní strukturní motiv gelu). Částice se tedy při průchodu gelem váží na strukturu HK a neprochází pouze volnými póry. Pozvolnější nárůst koncentrace barviva v přijímací cele v případě přídávku s HK souvisí především se změnou hnací síly difúze, tj. koncentračního gradientu mezi zdrojovou a přijímací celou difúzní aparatury – může docházet k zakoncentrovávání barviva jak na

povrchu gelu (koncentrační skok na rozhraní gelu a roztoku je často pozorovaným zvláštním případem fázové rovnováhy, viz. [54]) , tak také v jeho objemu, což vede k přímému ovlivnění rychlosti transportu částic barviva skrz gel. Toto tvrzení koresponduje i s rozdíly spočítaného množství barviva v gelu bez respektive s přidavkem HK, uvedeným v tabulce 5 dále v textu. Změna času průchodu je uvedena na obrázku 24. Konkrétní hodnoty jsou uvedeny v příloze na konci dokumentu.



Obr. 24 Změna času průchodu při přidavku HK do gelové matrice

Z grafu vyplývá, že HK skutečně prodlužují dobu průchodu bariérou v případě kationaktivních barviv. V případě anionaktivního barviva fluorescein došlo naopak k poklesu času průchodu. Tento pokles je pravděpodobně způsoben odpudivými silami mezi fluoresceinem a HK, jev je potvrzen i zvýšením efektivního difúzního koeficientu (uvedené níže). Odpudivé síly mezi barvivem a pevnou sítí gelu pravděpodobně soustředí směr přestupu molekul barviva přímo do volných pórů, a tedy barvivo nemá tendenci prostupovat hlouběji do struktury gelu.

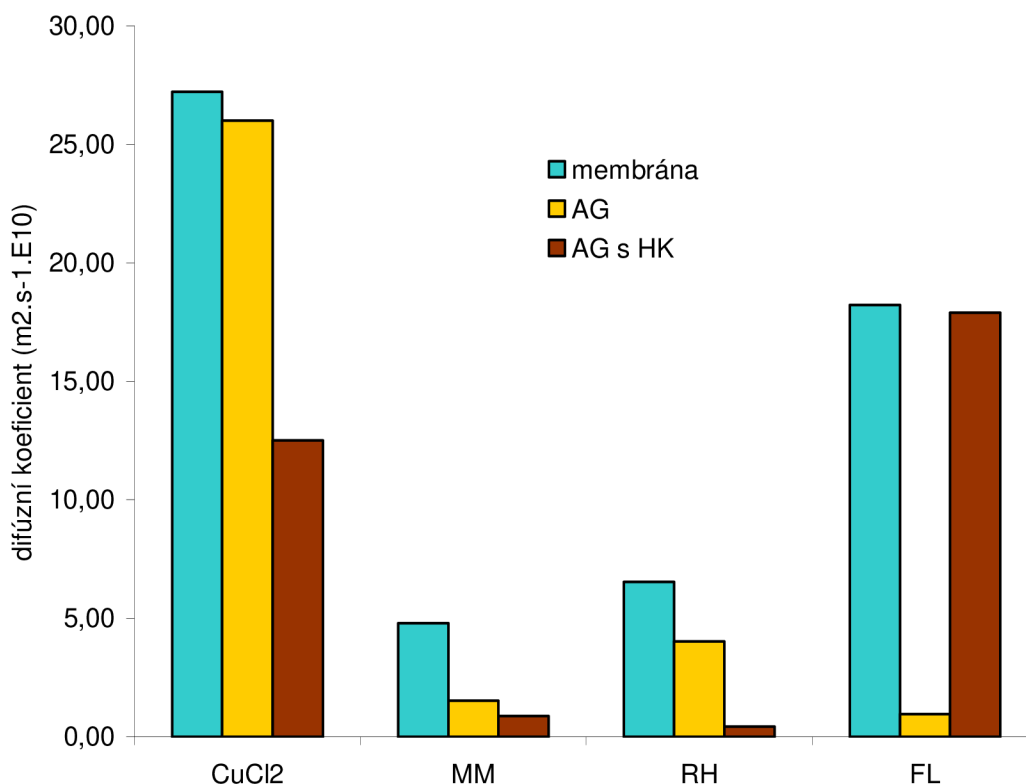
V grafu nejsou uvedeny výsledky pro chycenou modrou, jelikož toto barvivo prakticky vůbec neprostupovalo skrz gelovou přepážku (i po pěti dnech měření nedocházelo k měřitelnému nárůstu koncentrace barviva v přijímací cele), z tohoto důvodu nebylo možné data vyhodnotit. Chycenou modrou neprostupovalo jak přes čistý agarózový gel, tak přes gel s HK. Lze tedy předpokládat, že molekula tohoto barviva buď už je příliš velká na prostup skrz póry gelu nebo je přitažlivá interakce s agarózou, která tvoří disperzní podíl gelu, natolik silná, že je toto barvivo v gelu imobilizováno.

U chloridu měďnatého lze pozorovat poměrně malou dobu průchodu, která je navíc

prakticky stejná jak pro experimenty s přidavkem HK i bez. Tento jev se dá vysvětlit tím, že kationty Cu^{2+} jsou velice malé a nemají tak problém prostupovat přes trojrozměrnou gelovou síť. Mohlo by se sice jevit, že interakce neprobíhají, jelikož není vidět posun doby prostupu, ovšem hodnoty nasorbovaného množství při přidavku HK ukazují opak (tabulka 5). Jako další faktor se projevuje i počet částic Cu^{2+} , který je několikanásobně vyšší než v případě organických barviv. HK, které jsou v malé koncentraci, nestíhají interagovat se všemi částicemi a ty potom mohou snáze procházet gelem s HK. Tento jev by se sice dal částečně vyřešit snížením výchozí koncentrace chloridu měďnatého, ovšem problémem by bylo snížení hnací síly transportu. Hlavním problémem by však bylo snížení absorpce světla a muselo by se tedy přistoupit k jiným analytickým metodám, nebo alespoň k měření za použití optické sondy s větší optickou drahou.

6.3 Difúzní koeficienty

Difúzní koeficienty byly stanoveny pomocí vztahů uvedených výše. Srovnání naměřených difúzních koeficientů je shrnuto na obrázku 25, vypočítané hodnoty jsou uvedeny v příloze na konci dokumentu.



Obr. 25 Závislost hodnoty difúzního koeficientu na typu bariéry

Z grafu je patrný pokles difúzních koeficientů v případě kationaktivních částic, jako je CuCl_2 , rhodamin a methylenová modř, je vidět znatelný pokles difúzního koeficientu po přidavku HK. Z tohoto lze tedy usuzovat, že probíhají přitažlivé interakce a částice solutu

jsou tedy bržděny v prostupu molekulami částicemi HK. K největšímu poklesu difúzního koeficientu docházelo v případě rhodaminu 6G, což je patrně zapříčiněno velikostí molekuly barviva, která je větší než v případě ostatních.

U fluoresceinu je vidět nárůst difúzního koeficientu o celý řád, čímž se potvrdily poznatky z času prostupu a lze tedy říci, že převládající odpudivé interakce urychlují transport částic barviva ve směru koncentračního spádu.

6.4 Koncentrace barviva v gelové přepážce

V gelové přepážce (jak s přídavkem, tak bez přídavku HK) se sobovalo určité množství příslušných roztoků barviv, respektive měďnatých iontů.. Toto množství se dá stanovit jako rozdíl součtu koncentrací na konci experimentu ve zdrojové a přijímací cele odečteného od koncentrace výchozího roztoku. Konkrétní hodnoty jsou uvedeny v následující tabulce.

Tabulka 5 Koncentrace barviva v gelové přepážce po skončení experimentu

difúzní médium	koncentrace v gelu bez HK (mol.dm ⁻³)	koncentrace v gelu s HK (mol.dm ⁻³)
chlorid měďnatý	4,99E-02	1,48E-01
	6,14E-02	6,08E-02
methylenová modř	1,62E-06	2,44E-06
	2,34E-06	2,29E-06
rhodamin 6G	2,95E-06	3,46E-05
	3,09E-06	4,74E-05
fluorescein	7,47E-05	1,69E-05
	8,11E-05	1,04E-05

Z tabulky je patrné, že přídavek HK do gelové matrice způsobuje u kationaktivních barviv nárůst koncentrace uvnitř gelu. U fluoresceinu naopak dochází ke snížení koncentrace, čímž se opět potvrzují předpokládané odpudivé interakce mezi HK a fluoresceinem..

7 ZÁVĚR

Huminové kyseliny, jako jedna z frakcí huminových látek, se jeví jako velice dobré, dostupné a levné suroviny pro použití v různých odvětvích od zemědělství až po farmaceutický průmysl. V přírodě zastávají nenahraditelnou funkci právě díky svým schopnostem vázat polutanty, vodu, živiny a další látky.

Cílem této práce bylo zhodnotit vliv huminových kyselin na difúzní charakteristiky vhodně vybraných sloučenin. Jako difúzní médium byl vybrán agarózový hydrogel a difúzní parametry byly zkoumány metodou difúzní cely. Jako difúzní sonda byl vybrán chlorid měďnatý jako zástupce často se vyskytujících polutantů v přírodě a několik organických barviv. Tyto experimenty byly realizovány za laboratorní teploty, neutrálního pH a konstantního množství přidávaných HK do agarózové matrice. Bylo prokázáno, že HK snižují difúzní koeficient vybraných kationaktivních sond a také že ovlivňují dobu průchodu bariérou. V případě anionaktivních barviv docházelo k nárůstu difúzního koeficientu vlivem odpudivých sil mezi těmito barvivy a HK. Bylo taktéž zjištěno, že organická barviva s velkou molekulou nejsou schopna procházet přes agarózovou přepážku i přes silný koncentrační gradient.

Výsledky korelují s obecným tvrzením, že HK jsou na sebe schopny v přírodě vázat těžké kovy a další sloučeniny a že jsou schopny zpomalovat jejich transport v půdě.

Předmětem dalšího studia by mohl být výběr dalších sond, jako jsou anorganické anionty a prohloubit tak a rozvinout získané poznatky uvedené v této diplomové práci. Současně by bylo vhodné pokračovat ve vývoji dalších poloautomatických technik pro analýzu difúzních procesů, například vodivostní sondy, apod.

8 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- [1] KVÍTEK L., PANÁČEK A.: *Základy koloidní chemie*. Katedra fyzikální chemie – Univerzita Palackého Olomouc, 2007, 10 s.
- [2] BARTOVSKÁ L., ŠIŠKOVÁ M.: *Co je co v povrchové a koloidní chemii*. Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, [online], 2005. [cit. 2012-10-11] Dostupné z: http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid_es-001/hesla/mereni_difuzniho_koeficientu.html
- [3] Humatex, a.s. 2005-2009. Huminové látky. [online] Dostupné z: <http://www.humatex.cz/huminove-latky.html>
- [4] Amagro, s.r.o. 2008. Co jsou to huminové látky. [online] Dostupné z: <http://www.amagro.com/co-jsou-to-huminove-latky.html>
- [5] Stanovení difúzních koeficientů metodou difúzní cely. In: *Know-how* [online]. [cit. 2013-03-26]. Dostupné z: <http://www.chempoint.cz/stanoveni-difuznich-koeficientu-metodou-difuzni-cely>
- [6] GUTENWIK, J, B NILSSON a A AXELSSON. Determination of protein diffusion coefficients in agarose gel with diffusion cell. *Biochemical Engineering Journal* [online]. 2004 roč. 1, č. 19 [cit. 2013-08-02]. Dostupné z: www.sciencedirect.com
- [7] PICCOLO, A., Humus and Soil Conservation. In *Humic substances in terrestrial ecosystems*. Ed. A. Piccolo, Elsevier, Amsterdam, 1966. pp. 225-264
- [8] SCHNITZER, M., KHAN, S., U.: *Humic substances in the environment*. MARCEL DEKKER, INC., New York 1972.
- [9] WEBER, J.: *Definition of soil organic matter*, Humintech. [online]. Poslední úprava: 2004-10-24. Dostupné z <<http://www.humintech.com>>.
- [10] PENA – MÉNDEZ, E. M., HAVEL, J. a PATOČKA, J.: Humic substances – compounds of still unknown structure applications in agriculture, industry, environment and biomedicine. *J. Appl. Biomed.* 3 (2005), 13-24
- [11] KLÖCKING, R. a HELBIG, B.: Medical Aspects and Applications of Humic Substances. In *Biopolymers for Medical and Pharmaceutical Applications*. Ed. A. Steinbüchel a R. H. Marchessault, pp. 1-17, Wiley – VCH Verlag, Weinheim, 2005
- [12] LOTOSH, T. D.: Experimental bases and prospects for the use of humic acid preparations from peat in medicine and agricultural production. *Naucn. Dokl. Vyss Skoly. Biol. Nauki*, 1991, vol. 10, pp. 99 – 103.
- [13] KOCAMAGLI, N. a kol.: The effects of dietary humate supplementation on broiler growth and carcass yield. *Poult. Sci.* 2002, vol. 81, pp. 723 – 728.
- [14] OHLENBUSH, G. A kol.: Sorption of phenols to dissolved organic matter investigated by solid phase mikroextraction. *Sci. Total. Environ.*, 2000, vol. 253, no. 1, pp. 63-74
- [15] DAVIES, G. a GHABBOUR, E. A. (Ed.) *Humic substances, structures, properties and uses*. The RSC, Cambridge, 1999.
- [16] KALINA, M.: *Vužití průtokové coulometrie ve studiu transportu kovových iontů v huminových gelech*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2012.

69 s. Vedoucí diplomové práce doc. Ing. Martina Klučáková, Ph.D.

- [17] STEVENSON, F. J.: *Humus Chemistry: Genesis, Composition, Reactions*. New York, USA: Wiley – Interscience Publ., 1982. 496 s.
- [18] PERUDE, E. Michael *International humic substances society* [online]. 2003 [cit. 2013-03-03]. IHSS Welcome page. Dostupné z: <<http://www.ihss.gatech.edu/>>.
- [19] SKOKANOVÁ, M., DERCOVÁ, K.: Huminové kyseliny. Původ a struktúra. *Chemické listy*. 2008, č. 102, s. 262-265.
- [20] KICKUTH, R., SCHEFFER, F.: Constitutive and nutritive properties of the so-called pseudo-amide nitrogen from humic acids. *Agrochimica*. 1976, vol. 20, no. 4 – 5, pp. 373 – 386.
- [21] SUTTON, R., SPOSITO, G.: Molecular structure in soil substances: The new view. *Environmental science and Technology* [online]. 2005, 39, 23 [cit. 2013-05-04]. Dostupný z: <<http://nci.nlm.nih.gov/pubmed/16382919>>
- [22] SEDLÁČEK, p.: *Difúze kovových iontů v huminových gelech*. Brno, 2006, 70 s., Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická. Vedoucí diplomové práce doc. Ing. Martina Klučáková, Ph.D.
- [23] RENN, Donald W.: Agar and agarose: *Indispensable partners in biotechnology*. *Ind. Eng. Chem. Prod. Res. Dev.* 1984, č. 23, s. 5-7 Dostupné z: <<http://www.sciencedirect.com>>.
- [24] RINAUDO, M.: Main properties and current applications of some polysaccharides as biomaterials. *Polym. Int.* 2008, č. 57, s. 397 – 430. Dostupné z: <<http://www.sciencedirect.com>>.
- [25] FUJI, T., YANO, H., KUMAGAI a O. MIYAWAKI. Scaling analysis on elasticity of agarose gel near the sol-gel transition temperature. *Food hydrocolloids*. 2000, č. 14. Dostupné z: <<http://www.sciencedirect.com>>.
- [26] SELBY HH and WYNNE WH, Agar, in *Industrial Gums. Polysaccharides and Their Derivatives*, ed. by Whistler RL. Academic Press, New York/San Francisco/London, pp. 29-48 (1973).
- [27] SAND RE and GLICKMANS M, Seaweed extracts of potential economic importance, in *Industrial Gums. Polysaccharides and Their Derivatives*, ed. by Whistler RL. Academic Press, New York/San Francisco/London, pp. 147-194 (1973).
- [28] UNIVERSITY OF HAMBURG. Botany online: Cell walls of Alage [online]. 1. vyd. [cit. 2013-02-13]. Dostupné z: <<http://www.biologie.uni-hamburg.de/b-online/e26/26d.htm>>
- [29] <http://vydavatelství.vscht.cz>. *Vydavatelství VŠCHT* [online]. [cit. 2013-04-12]. Dostupné z: <http://vydavatelství.vscht.cz/knihy/uid_es-001/hesla/disperzni_system.html>
- [30] NOVÁK, J.: Fyzikální chemie – bakalářský a magisterský kurz. 1st ed. Praha: VŠCHT Praha, 2008. 978-80-7080-657-3..
- [31] POUCHLÝ, J.: Fyzikální chemie makromolekulárních a koloidních soustav. VŠCHT Praha, 2001. ISBN 80-7080-422-x.

- [32] SEDLÁČEK, P.: *Reologie gelů – stručný přehled*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2007. 34 s.
- [33] MASARO, L., ZHU X., X.: Physical models of diffusion for polymer solutions gels and solids. *Progress in polymer science*, č. 24, 1999. s. 731 – 755.
- [34] ABART, R. a PETRISCHEVA E. Mathematics of Diffusion Problems. In: [online]. Free University Berlin, 2006, [cit. 2013-03-01]. Dostupné z: <http://www.geo.fu-berlin.de/geol/fachrichtungen/geochemhydromin/mineralogie/pdf/Math_of_diffus.pdf>
- [35] DOJČANSKÝ, J., LONGAUER, J.: *Chemické inženýrstvo II*, 1. vydání. Bratislava 2000, PPA Bratislava. ISBN 80-967064-8-9.
- [36] BARTOVSKÁ, L., ŠIŠKOVÁ, M.: Fyzikální chemie povrchů a koloidních soustav. VŠCHT v Praze, 2002, p. 163 – 168. ISBN 80-70-80-475-0.
- [37] NOVÁK, J. P.: *Fyzikální chemie II*. Vysoká škola chemickotechnologická v Praze, 2001. ISBN 80-7080-436-x.
- [38] CRANK, J.: *The Mathematics of Diffusion*, 2nd ed. Oxford: Clarendon Press 1975.
- [39] SMILEK, J.: *Studium reaktivity biopolymerů v gelové fázi*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2010. 94 s. Vedoucí diplomové práce Ing. Petr Sedláček, Ph.D.
- [40] Natural humic acids in veterinary medicine. In: *Natural humic acids in veterinary medicine* [online]. [cit. 2013-03-26]. Dostupné z: <http://www.pharmawerkweinboehla.de/english/humine/humin2.html>
- [41] Trace metal speciation and bioavailability in natural waters. In: [online]. Acadia University [cit. 2013-02-26]. Dostupné z: <http://www.acadiau.ca/~jmurimbo/Research%20Interests%202.htm>
- [42] PICCOLO, A., CONTE, P., a kol.: Effects of mineral and monokarboxylic acids on the molecular association of dissolved humic substances. *Eur. J. Soil Sci.*, 1999, vol. 50, no 4, pp. 687-694.
- [43] SEDLÁČEK, P. *Hydrogely huminových kyselin – experimentální model i aplikační forma*. Ph.D. thesis. Brno: VUT v Brně, Fakulta chemická, 2009. 139 s.
- [44] SMILEK, J. *Reologie huminového gelu*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2010, 52 s. Vedoucí bakalářské práce doc. Ing. Martina Klučáková, Ph.D.
- [45] KLUČÁKOVÁ, M., PEKAŘ, M.: Study of Structure and Properties of Humic and Fulvic Acids. IV. Study of Interactions of Cu²⁺ Ions with Humic Gels and Final Comparison, *J. Polym. Mater.*, 2003, vol. 20, no. 2, pp. 155-162.
- [46] Využití dynamického rozptylu světla k měření viskozity. In: *Chempoint* [online]. 2012 [cit. 2014-04-29]. Dostupné z: <http://www.chempoint.cz/vyuziti-dynamickeho-rozptylu-svetla-k-mereni-viskozity>
- [47] Termoreverzibilní gel. In: *Vydavatelství VŠCHT Praha* [online]. 2005 [cit. 2014-04-29]. Dostupné z: http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid_es-001/hesla/synereze.html
- [48] Synereze. In: *Vydavatelství VŠCHT Praha* [online]. 2005 [cit. 2014-04-29].

- Dostupné z: http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid_es-001/hesla/synereze.html
- [49] Methylene Blue. In: *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2001-2014 [cit. 2014-04-29]. Dostupné z: http://en.wikipedia.org/wiki/Methylene_blue?oldid=454801102
- [50] CHICAGO SKY BLUE 6B. *Chemical Book* [online]. 2008 [cit. 2014-04-29]. Dostupné z: http://www.chemicalbook.com/ProductChemicalPropertiesCB2136938_EN.htm
- [51] Rhodamine 6G. In: *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2001-2014 [cit. 2014-04-29]. Dostupné z: http://en.wikipedia.org/wiki/Rhodamine_6G
- [52] CUSSLER, E.L. Diffusion: Mass Transfer in fluid systems, Cambridge University Press, Cambridge, 1984
- [53] PING, Zhou, Yan HUI a Gu BOAHOA. Competitive complexation of metal ions with humic substance. In: *Chemosphere*. 58. vyd., 2005, s. 1327-1337.
- [54] SEDLÁČEK, P., SMILEK, J., KLUČÁKOVÁ, M.: How interactions with polyelectrolytes affects mobility of low molecular ions – results from diffusion cells. Brno University of Technology, Faculty of Chemistry, Centre for Material Research. 2012
- [55] STAHI, Panagiota; DELIGIANNAKIS, Yianiss. Humic acid-inspired hybrid materials as heavy metal absorbers. *Journal of Colloid and Interface Science* [online]. 30.6.2010, 351 [cit. 2013-04-04]. Dostupné z: <www.sciencedirect.com>
- [56] LIN, Jianwei; ZHAN, Yanhui; ZHU, Zhiliang. Adsorption characteristics of copper (II) ions from aqueous solution onto humic acid-immobilized surfactant-modified zeolite. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* [online]. 29.3.2011, 384 [cit. 2013-04-04]. Dostupné z: <www.sciencedirect.com>
- [57] Stokes, R. Integral Diffusion of Potassium Chloride Solutions for Calibration of Diaphragm Cells. *Journal of American Chemical Society*. 1951, 73, s. 2327-3528
- [58] KOTINGOVÁ, Lenka, Lenka BROSKÁ a Zdeněk FIALA. Testování transdermální absorpce chemických látek in vitro. In: *Chemické listy*. 103. vyd., s. 533-539.
- [59] SUN, W. C.; GEE, K. R.; KLAUBERT, D. H.; HAUGLAND, R. P., Synthesis of Fluorinated Fluoresceins. *Journal of Organic Chemistry* 1997, 62, (19), 6469-6475
- [60] Fluorescein sodium salt. *Sigma-Aldrich* [online]. 2014 [cit. 2014-04-29]. Dostupné z: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sial/f6377?lang=en®ion=CZ>

9 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

9.1 Použité zkratky

AG	agarozový gel
HK	humínové kyseliny
FK	fulvínové kyseliny
HU	huminy
AAS	atomová absorpční spektroskopie
HL	humnové látky
MM	methylenová modř
IHSS	mezinárodní společnost pro humnové sloučeniny (internacional humic substance society)
FZ	Fickův zákon
RH	rhodamin
FL	fluorescein

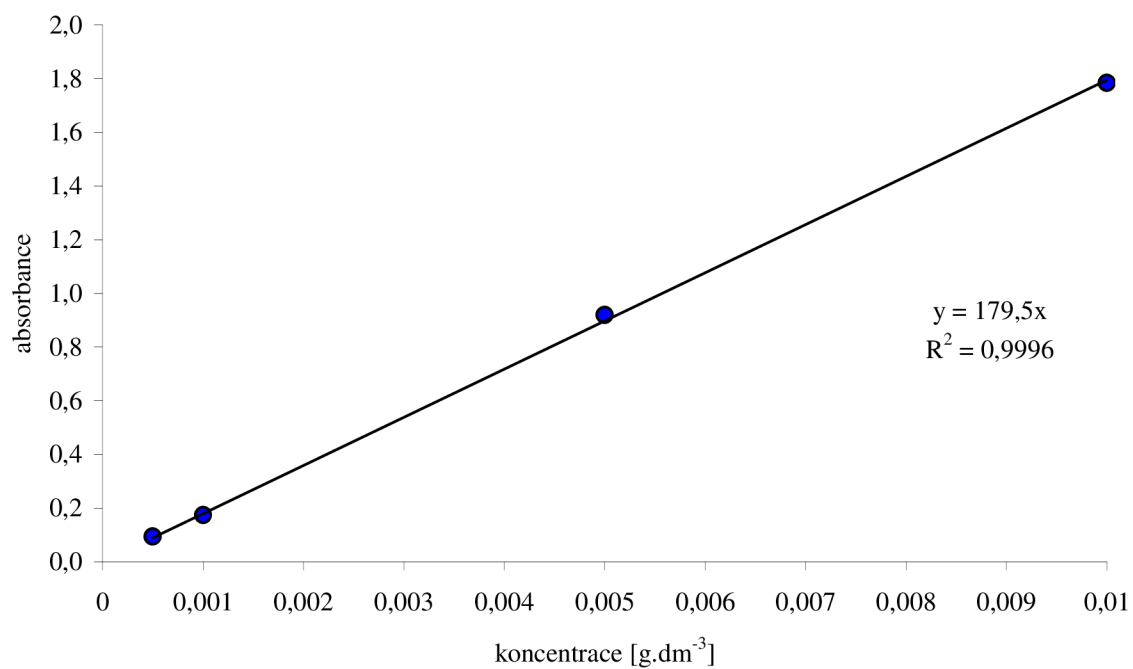
9.2 Použité symboly

D	difúzní koeficient
c	koncentrace
k	Boltzmanova konstanta
T	termodynamická teplota
r	poloměr
B	koeficient tření
η	viskozita
S	plocha
τ	čas

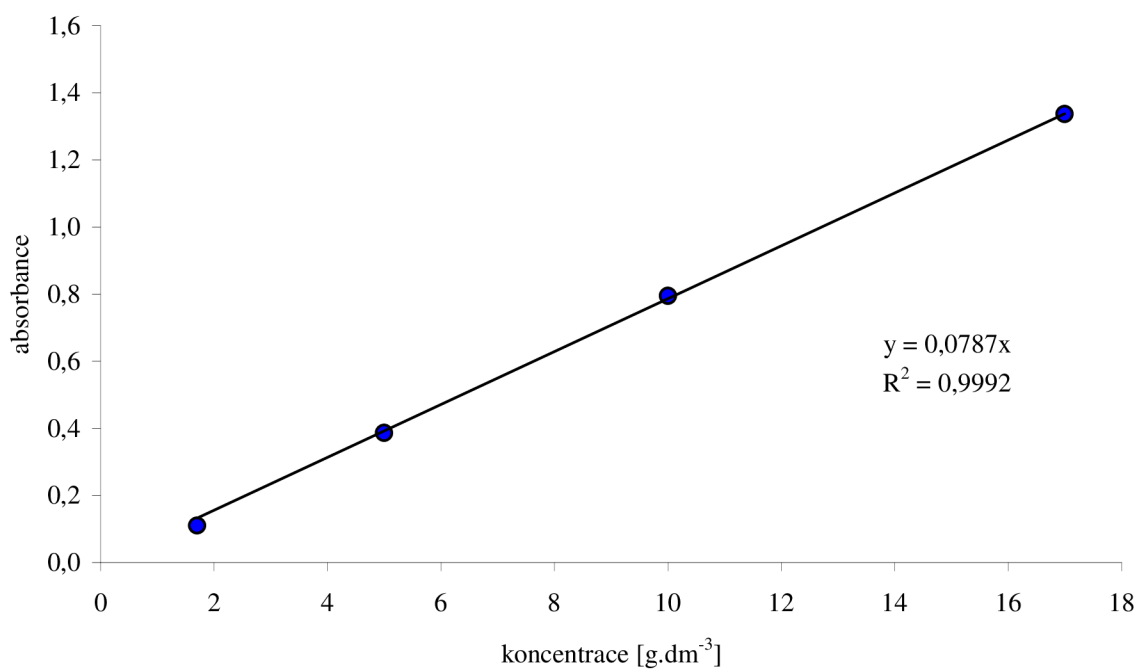
10 SEZNAM PŘÍLOH

PŘÍLOHA 1	Kalibrační křivka pro methylenovou modř
PŘÍLOHA 2	Kalibrační křivka pro chlorid měďnatý
PŘÍLOHA 3	Kalibrační křivka pro fluorescein
PŘÍLOHA 4	Průběhy difúzí pro methylenovou modř
PŘÍLOHA 5	Průběhy difúzí pro chlorid měďnatý
PŘÍLOHA 6	Průběhy difúzí pro fluorescein
PŘÍLOHA 7	Naměřené difúzní koeficienty
PŘÍLOHA 8	Naměřené časy prostupu

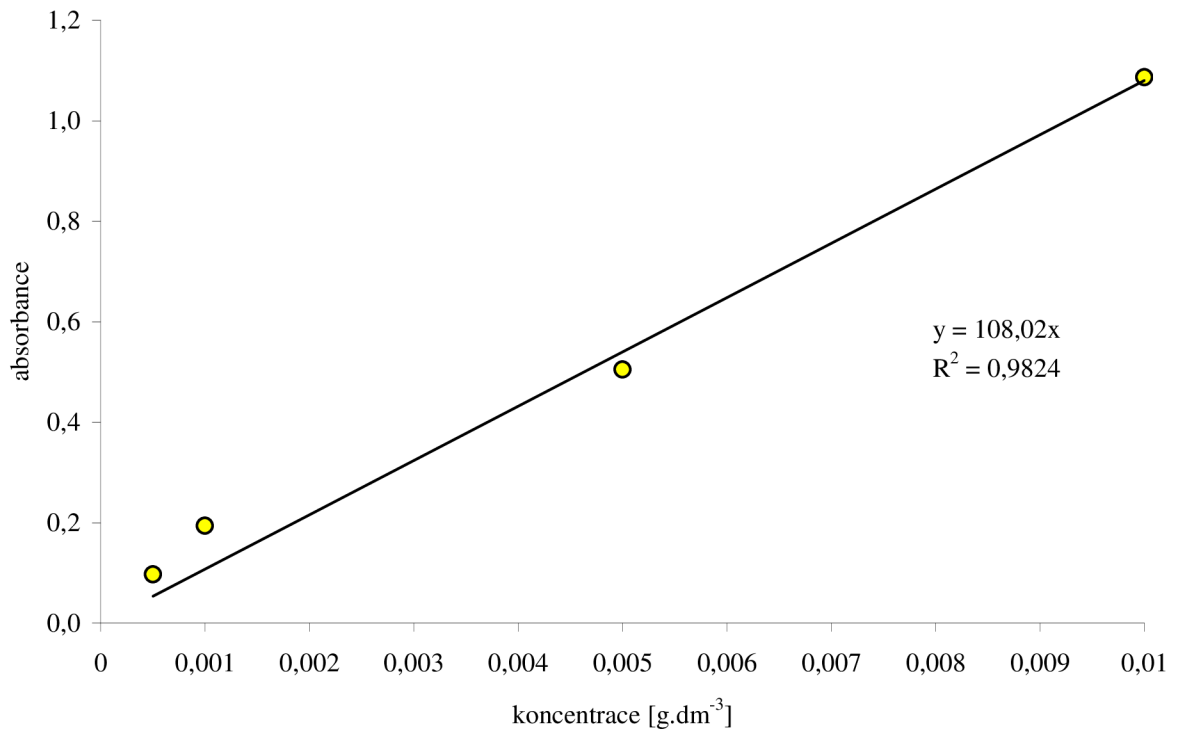
PŘÍLOHA 1



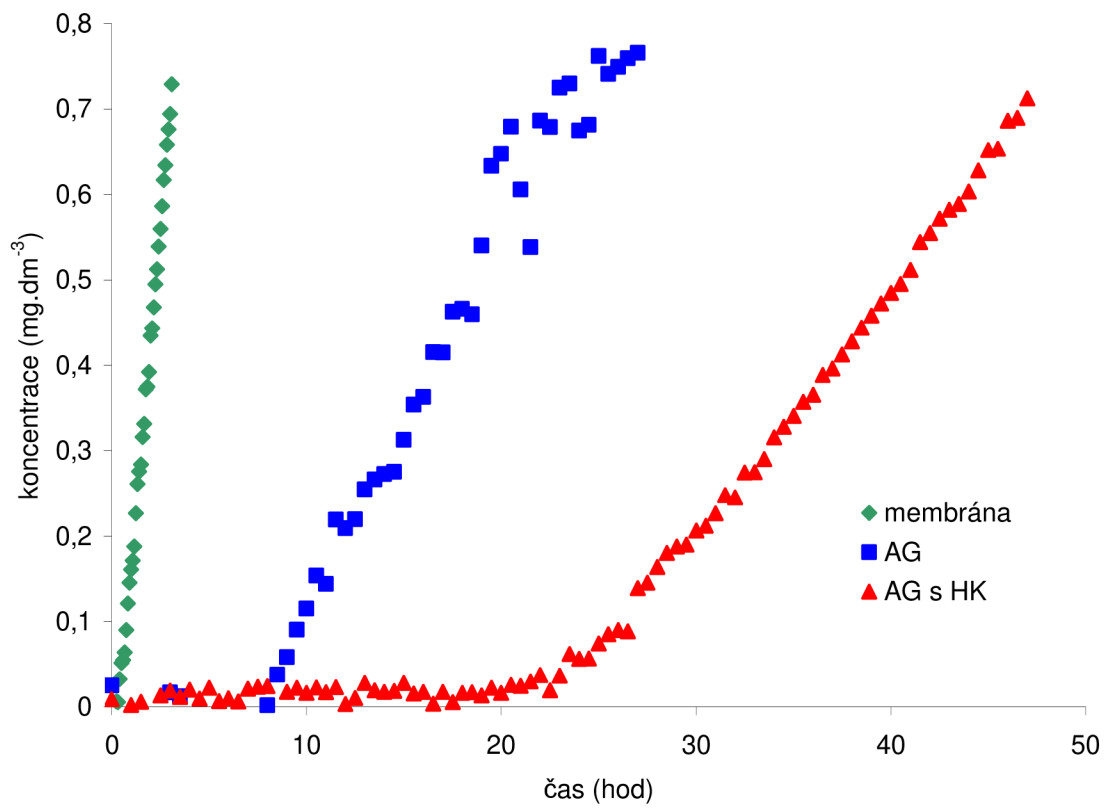
PŘÍLOHA 2



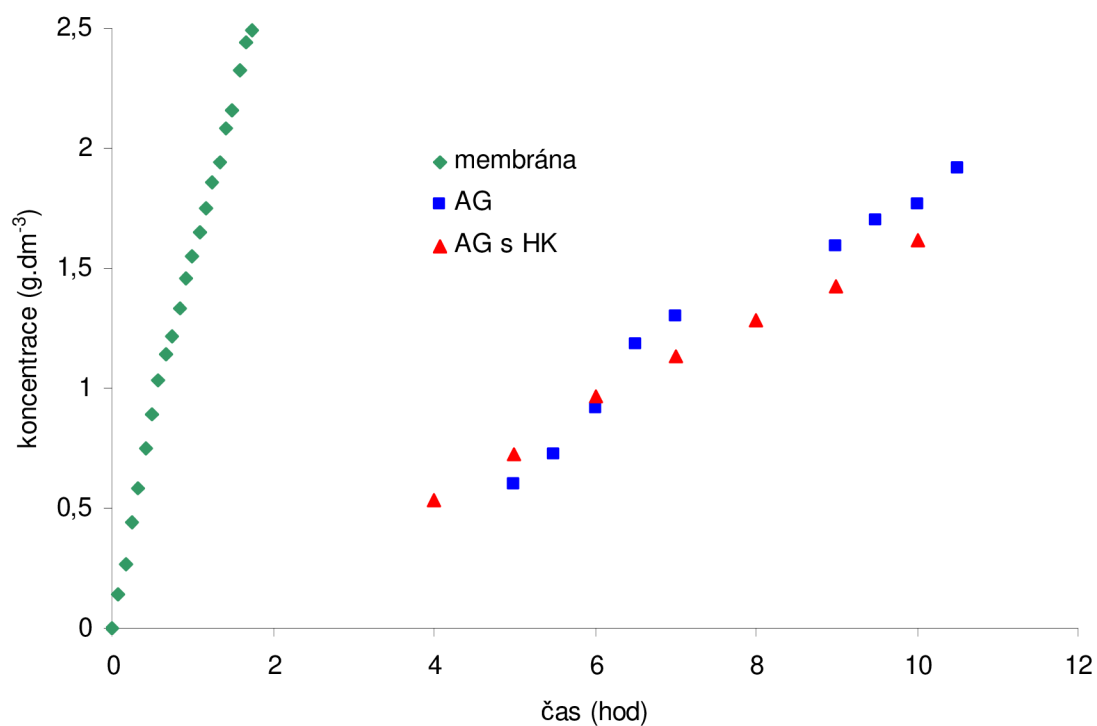
PŘÍLOHA 3



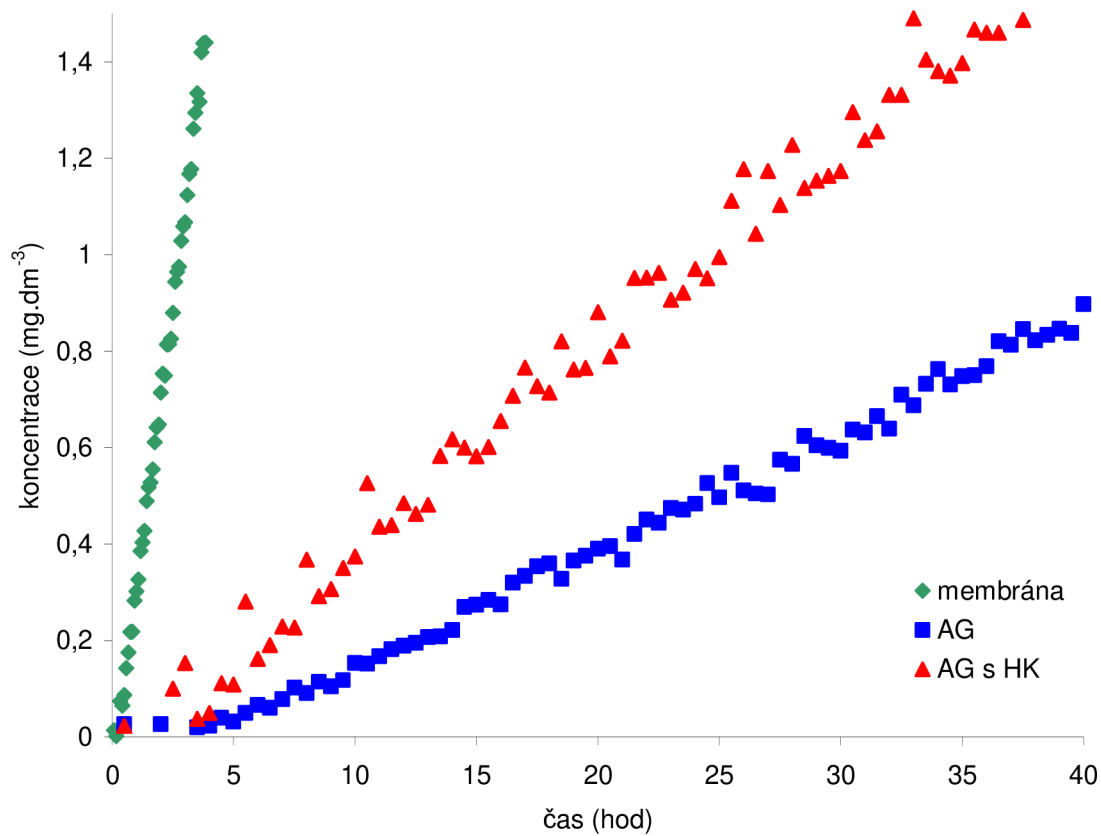
PŘÍLOHA 4



PŘÍLOHA 5



PŘÍLOHA 6



PŘÍLOHA 7

difúzní médium	difúzní koeficient membrána [m²·s⁻¹]	dif. koeficient AG [m²·s⁻¹]	dif. koeficient AG + HK [m²·s⁻¹]
chlorid měďnatý	9,19E-10	9,56E-10	2,26E-10
	8,56E-10	7,40E-10	5,90E-10
methylenová modř	2,03E-10	9,04E-11	3,26E-11
	2,18E-10	4,31E-11	4,39E-11
rhodamin 6G	1,42E-10	1,52E-10	1,89E-11
	3,58E-10	1,56E-10	1,43E-11
chicago blue 6B	1,89E-10	-	-
	1,21E-10	-	-
fluorescein	4,34E-10	2,11E-11	2,26E-10
	2,55E-10	1,52E-11	4,51E-10

PŘÍLOHA 8

difúzní sonda	čas průchodu přes AG (hod.)	čas průchodu přes AG s HK (hod.)
chlorid měďnatý	0,81	0,83
	1,00	0,81
methylenová modř	5,58	22,99
	5,65	25,37
rhodamin 6G	3,14	15,31
	3,64	16,80
fluorescein	4,21	0,61
	6,75	0,13