

VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ
ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE

FACULTY OF CHEMISTRY
INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

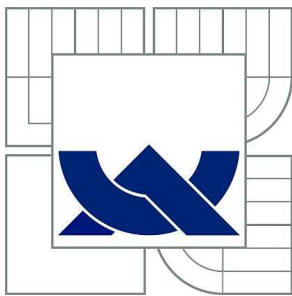
KONFORMACE A MOLEKULÁRNÍ ORGANIZACE HUMINOVÝCH
KYSELIN VE VODNÝCH ROZTOCÍCH

DIPLOMOVÁ PRÁCE
MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE
AUTHOR

Bc. KATEŘINA VĚŽNÍKOVÁ

BRNO 2012



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA CHEMICKÁ

ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE

FACULTY OF CHEMISTRY

INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

KONFORMACE A MOLEKULÁRNÍ ORGANIZACE HUMINOVÝCH KYSELIN VE VODNÝCH ROZTOCÍCH

CONFORMATION AND MOLECULAR ORGANIZATION OF HUMIC ACIDS IN AQUEOUS SOLUTIONS

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. KATEŘINA VĚŽNÍKOVÁ

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

doc. Ing. MARTINA KLUČÁKOVÁ,
Ph.D.

BRNO 2012



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

Zadání diplomové práce

Číslo diplomové práce:	FCH-DIP0630/2011	Akademický rok: 2011/2012
Ústav:	Ústav fyzikální a spotřební chemie	
Student(ka):	Bc. Kateřina Věžníková	
Studijní program:	Spotřební chemie (N2806)	
Studijní obor:	Spotřební chemie (2806T002)	
Vedoucí práce	doc. Ing. Martina Klučáková, Ph.D.	
Konzultanti:		

Název diplomové práce:

Konformace a molekulární organizace huminových kyselin ve vodných roztocích

Zadání diplomové práce:

Cílem práce je prostudovat změny konformace a molekulární organizace huminových kyselin v závislosti na jejich koncentraci a způsobu a podmínkách přípravy jejich roztoků

Termín odevzdání diplomové práce: 11.5.2012

Diplomová práce se odevzdává ve třech exemplářích na sekretariát ústavu a v elektronické formě vedoucímu diplomové práce. Toto zadání je přílohou diplomové práce.

Bc. Kateřina Věžníková
Student(ka)

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

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
Ředitel ústavu

V Brně, dne 16.1.2012

prof. Ing. Jaromír Havlica, DrSc.
Děkan fakulty

ABSTRAKT

Tato diplomová práce se zabývá studiem konformace a molekulární organizace huminových kyselin ve vodných roztocích. Huminové látky mají heterogenní a polydisperzní povahu, proto nebyla doposud zcela objasněna jejich sekundární struktura stejně jako jejich konformační uspořádání. Konformace huminových látek v roztocích jsou převážně stabilizovány slabými disperzními silami, jako jsou Van der Waalsovy, π - π , CH- π interakce a vodíkové vazby. Huminové látky v roztocích mají tendenci tvořit agregáty, které jsou drženy pohromadě především intermolekulárními hydrofobními interakcemi. Byly připraveny koncentrační řady huminových kyselin ve třech různých prostředích se stejnou iontovou silou: NaOH a NaCl (připravený buď neutralizací NaOH pomocí HCl, nebo přímým ředěním roztokem NaCl). Pro stanovení konformace a molekulární organizace huminových kyselin ve vodných roztocích byly použity následující analytické metody: potenciometrické stanovení pH, přímá konduktometrie, ultrafialová a viditelná spektrometrie, měření hustoty, dynamický rozptyl světla, laserová Dopplerova velocimetrie a vysoce rozlišovací ultrazvuková spektrometrie. Bylo potvrzeno, že konformace a molekulární organizace huminových kyselin ve vodných roztocích závisí nejen na pH prostředí, ale i na jeho chemické povaze a koncentraci při stejném pH. Výsledky ukázaly, že hydrodynamický průměr částic se výrazně zvyšuje v prostředí NaCl připraveném neutralizací NaOH pomocí HCl zvláště při nízkých koncentracích huminových kyselin, čemuž odpovídají i vyšší hodnoty zjištěného zeta potenciálu. Koncentrační závislosti ultrazvukové rychlosti a stlačitelnosti roztoků huminových kyselin v daných prostředích rovněž ukazují na změny konformace a molekulární organizace korespondující s výsledky ostatních použitých metod.

KLÍČOVÁ SLOVA

Huminové látky, huminové kyseliny, konformace, molekulární organizace, dynamický rozptyl světla, vysoce rozlišovací ultrazvuková spektrometrie

ABSTRACT

This diploma thesis deals with the conformation and molecular organization of humic acids in aqueous solutions. Humic substances have heterogeneous and polydisperse nature, therefore their secondary chemical structure has not yet been defined properly, neither has their conformational arrangement. The conformation of humic substances in the solutions is mainly stabilized by weak disperse forces, such as Van der Waals, π - π , CH- π interactions and hydrogen bonds. Humic substances in the solutions tend to form aggregates that are held together mostly by the intermolecular hydrophobic interactions. Concentration series of humic acids were prepared in three different mediums of constant ionic strength: NaOH and NaCl (prepared either by neutralization NaOH by HCl or direct dilution by solution of NaCl). Several analytical methods have been used to determine conformation and molecular organization of humic acids: potentiometric determination of pH, direct conductometry, ultraviolet and visible spectroscopy, density measurement, dynamic light scattering, laser Doppler velocimetry and high resolution ultrasound spectrometry. It was confirmed that the conformation and molecular organization of humic acids in aqueous solutions depend not only on pH of medium, but they also depend on chemical nature and concentration with the same pH. Results showed that hydrodynamic diameter of particles is significantly increasing in NaCl medium prepared by neutralization NaOH by HCl, particularly at low concentrations, which corresponds to higher values of zeta potential obtained. Concentration dependencies of ultrasonic velocity and compressibility also indicate the changes in conformation and molecular organization corresponding with results from other methods used.

KEY WORDS

Humic substances, humic acids, conformation, molecular organization, dynamic light scattering, high resolution ultrasound spectrometry

VĚŽNÍKOVÁ, K. *Konformace a molekulární organizace huminových kyselin ve vodných roztocích*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2012. 60 s. Vedoucí diplomové práce doc. Ing. Martina Klučáková, Ph.D..

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citovala. 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.

.....
podpis studenta

Poděkování:

Na tomto místě bych velice ráda poděkovala vedoucí mé diplomové práce doc. Ing. Martině Klučákové, Ph.D. za vynikající vedení, cenné rady a především za energii a čas, který mi při vypracování diplomové práce věnovala.

Ráda bych také poděkovala Ing. Michalu Kalinovi a Ing. Andreji Kargerové za předání cenných zkušeností při osvojování experimentálních technik.

Zvláštní poděkování patří mým přátelům a rodině za podporu a toleranci během celého studia na vysoké škole.

Tato práce byla podpořena projektem č. CZ.1.05/2.1.00/01.0012 (ERDF).

OBSAH

1	ÚVOD	8
2	CÍL PRÁCE	9
3	SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	10
3.1	Huminové látky	10
3.2	Dělení huminových látek.....	11
3.3	Huminové kyseliny.....	13
3.3.1	Vznik a výskyt huminových kyselin	13
3.3.2	Vlastnosti a struktura huminových kyselin	17
3.4	Metody pro studium konformace a molekulární organizace huminových kyselin	20
3.4.1	Gelová permeační chromatografie	21
3.4.2	NMR spektrometrie	24
3.4.3	Dynamický rozptyl světla.....	25
3.4.4	Vysoce rozlišovací ultrazvuková spektrometrie.....	26
3.4.5	Další metody.....	26
4	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	28
4.1	Použité chemikálie.....	28
4.2	Použité přístroje.....	28
4.3	Příprava odměrných roztoků a vzorků	28
4.3.1	Příprava huminových kyselin.....	28
4.3.2	Příprava odměrných roztoků 0,1 M NaOH, 0,1 M HCl a 0,1 M NaCl	29
4.4	Pracovní postup	29
4.4.1	Charakterizace huminových kyselin	29
4.4.2	Příprava vzorků huminových kyselin pro měření	29
4.4.3	Měření pomocí použitých analytických metod	30
4.5	Použitá instrumentální metodika	30
4.5.1	Potenciometrické stanovení pH.....	30

4.5.2	Přímá konduktometrie	31
4.5.3	Ultrafialová a viditelná spektrometrie	31
4.5.4	Měření hustoty	31
4.5.5	Dynamický rozptyl světla	32
4.5.6	Laserová Dopplerova velocimetrie	32
4.5.7	Vysoce rozlišovací ultrazvuková spektrometrie	33
5	VÝSLEDKY A DISKUZE	36
5.1	Charakterizace huminových kyselin	36
5.2	Potenciometrické stanovení pH	37
5.3	Přímá konduktometrie	38
5.4	Měření hustoty	39
5.5	Ultrafialová a viditelná spektrometrie	40
5.6	Dynamický rozptyl světla	43
5.7	Laserová Dopplerova velocimetrie	50
5.8	Vysoce rozlišovací ultrazvuková spektrometrie	50
6	ZÁVĚR	53
7	SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ	55
8	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK	59

1 ÚVOD

Huminové látky jsou směsí mnoha různých sloučenin s unikátními vlastnostmi. Vyskytují se ve všech půdách, vodách a sedimentech ekosféry. Podílí se na transportu rostlinných živin a imisí, upravují hodnotu pH, jsou regulátory mnoha chemických a biochemických procesů, dokážou zadržet vodu a mají mnoho aplikací například v medicíně, zemědělství a průmyslu.

Mechanismus vzniku huminových kyselin je velice složitý a je neustále zkoumán. Také jejich strukturou se vědci zabývají již několik desítek let. Huminové látky mají heterogenní a polydisperzní povahu, a proto není stále zcela objasněna jejich sekundární struktura stejně jako konformační uspořádání. Konformace huminových látek v roztocích jsou převážně stabilizovány slabými disperzními silami, jako jsou Van der Waalsovy, π - π , CH- π interakce a vodíkové vazby. Huminové látky v roztocích mají tendenci tvořit agregáty, které jsou drženy pohromadě především intermolekulárními hydrofobními interakcemi. Konformace a molekulární organizace je tedy silně závislá na charakteru prostředí a změnou podmínek v roztoku tak dochází ke změnám v uspořádání a velikosti částic huminových kyselin. Na základě tohoto byly zkoumány změny konformace a molekulární organizace huminových kyselin ve vodných roztocích. Byla vybrána tři různá prostředí pro rozpuštění huminových kyselin: NaOH a NaCl (připravený buď neutralizací NaOH pomocí HCl, nebo přímým ředěním roztokem NaCl).

Pro studium konformace a molekulární organizace huminových kyselin ve vodných roztocích byly vybrány následující analytické metody: potenciometrické stanovení pH, přímá konduktometrie, ultrafialová a viditelná spektrometrie, měření hustoty, dynamický rozptyl světla, laserová Dopplerova velocimetrie a vysoce rozlišovací ultrazvuková spektrometrie.

2 CÍL PRÁCE

Cílem této diplomové práce bylo prostudovat změny konformace a molekulární organizace huminových kyselin ve vodných roztocích v závislosti na jejich koncentraci a způsobu a podmínkách přípravy. Zjistit jejich chování ve třech různých prostředích o konstantní iontové síle.

3 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

3.1 Huminové látky

Rozkladnými a syntetickými pochody se z odumřelé rostlinné a živočišné hmoty v půdě tvoří tzv. humus, tmavě zbarvená amorfnní organická složka půdy. Humifikuje se zhruba polovina primární organické hmoty, zbytek se mineralizuje. Odlišuje se půdní a vodní humus, které se svým složením poněkud liší. Vodní humus je méně stabilizován než půdní humus.

Humus se hromadí v půdě, rašeliništích a dnových sedimentech, odkud rozpustné podíly humusu přecházejí do povrchových nebo podzemních vod. Nejvíce humusu obsahuje rašelina (40 hm. % až 50 hm. %). Při humifikačních pochodech vznikají zpočátku ve vodě částečně rozpustné huminové látky (HL), které mají tmavohnědou až žlutohnědou barvu, a nakonec nerozpustné huminy, jež jsou černohnědé.

HL patří mezi převážně cyklické sloučeniny aromatického charakteru, jež jsou tmavě hnědé. Projevují se svou barvou a kyselostí. Patří do skupiny polyfenolů a polykarboxylových kyselin. Jsou to amorfnní látky, vzniklé rozkladem organické substance, které tvoří polydisperzní systém s velkým rozsahem molekulových hmotností od několika stovek do statisíců. Významnou vlastností HL je jejich chemická i biochemická stabilita, schopnost vázat na sebe těžké kovy jak procesy komplexačními, tak i sorpčními.

Z fyzikálně chemického hlediska se HL rozpustné ve vodě chovají jako hydrofilní koloidy s různým stupněm disperzity. Koloidní částice mají v přírodních vodách záporný náboj a izoelektrický bod leží v kyselé oblasti. V silněji alkalickém prostředí tvoří převážně pravé roztoky. Okyselením roztoků dochází k asociaci jednotlivých molekul a ke vzniku agregátů s různým obsahem primárních částic huminových kyselin (HK). Fulvinové kyseliny (FK) se okyselením roztoku až do hodnoty pH 1 nesrážejí [1].

Tab. 1 Elementární složení huminových a fulvinových kyselin [2]

Prvek	Obsah (hm. %)	
	HK	FK
C	50–60	40–50
O	30–35	44–50
H	4–6	4–6
N	2–6	1–3
S	0–2	0–2

HL biologicky stimulují růst rostlin urychlením buněčného dělení, což urychluje rozvoj kořenových systémů a zvyšuje výnos sušiny. HL také aktivují činnost mikroorganismů, stimulují enzymy rostlin a zvyšují jejich produkci, vystupují jako organické katalyzátory v mnoha biologických procesech, stimulují růst kořenů, zlepšují příjem živin a zvyšují kořenovou respiraci. Podporují klíčení a životaschopnost semen. Z důvodu velmi častého využívání půdy, kdy dochází k odstraňování minerálních živin a HL, které jsou důležitým zdrojem výživných substancí a prostředkem pro vazbu živin a zlepšování půd, jsou HL využívány jako součásti hnojiv.

HL jsou efektivním prostředkem v boji s půdní korozí prostřednictvím vzniku koloidních agregátů a podpory kořenového systému rostlin. Pomáhají řešit problém přesolených půd tím, že snižují vysoký obsah solí v půdě, který vzniká v důsledku nadměrného používání minerálních hnojiv. Další výhodou HL je redukce toxických látek v půdě [3].

Díky jejich schopnosti vázat těžké kovy se HL využívají při čištění odpadních vod. U přípravy pitné vody mají HL negativní vliv na jakost vody. Jejich komplexotvorné schopnosti jsou důvodem zvýšené koncentrace v huminových vodách. Zvyšují kyselost a intenzitu zbarvení vody. Při úpravě vody na vodu pitnou však vadí tím, že nízkomolekulární HL (FK) nejsou odstranitelné koagulací a při chloraci vody jsou prekurzorem zdravotně závadných trihalogenmethanů. HL mají schopnost sorbovat se na aktivním uhlí, tím však snižují jeho sorpční kapacitu pro jiné organické látky, což nepříznivě ovlivňuje účinnost aplikace aktivního uhlí např. pro odstranění pesticidů z vody. Z těchto důvodů jsou HL v pitných, užitkových a provozních vodách nežádoucí [1].

Proces vzniku HL je nejméně probádanou oblastí chemie humusu. Existuje mnoho hypotéz o původu a vzniku těchto sloučenin. Když shrneme všechny teorie o vzniku HL, dospějeme k tomu, že vznikají v přírodě za spolupůsobení mikroorganismů nejspíše z ligninu, bílkovin, tříslovin a celulózy.

3.2 Dělení huminových látek

HK a FK patří do široké skupiny organických sloučenin, které vznikají v průběhu rozkladu organické hmoty živočišného nebo rostlinného původu. V důsledku velkého počtu různých organických sloučenin přítomných v živém organismu vedou jejich rozkladné a rekombinační procesy k téměř nekonečnému počtu molekul, které se vyznačují širokým rozsahem vlastností.

HL rozpustné ve vodě se dělí podle rozpustnosti v kyselém a alkalickém prostředí na HK a FK. Hranice mezi těmito dvěma skupinami je značně variabilní a lze je dělit na další frakce podle chemických a fyzikálně-chemických vlastností. HK obsahují v průměru 50–60 hm. % organického uhlíku, následuje kyslík, který je zastoupen okolo 30–35 hm. % FK mají nižší obsah uhlíku, ale obsahují více kyslíku. Dále HL obsahují další elementární prvky jako je vodík, dusík a síra. Jejich procentuální zastoupení je uvedeno v Tab. 1. Elementární složení huminu je podobné HK.

Podle rozpustnosti ve vodě se HL dělí na:

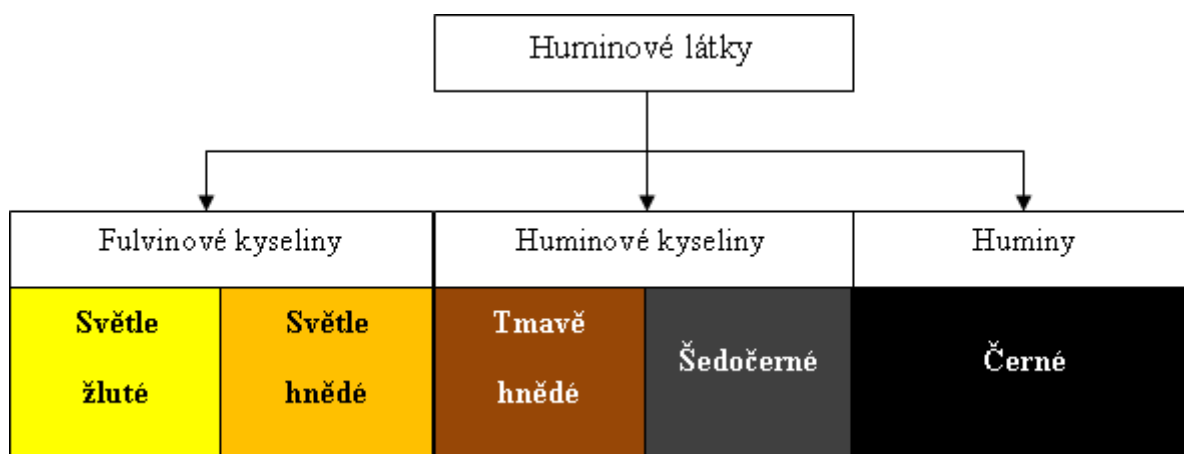
- Huminy (nerozpustné);
- Huminové látky rozpustné ve vodě
 - Fulvinové kyseliny,
 - Huminové kyseliny (částečně rozpustné).

Huminy jsou černohnědé látky, které jsou nerozpustné ve vodě, alkoholech a zásaditých a kyselých roztocích. Mají nejvyšší molekulovou hmotnost z HL. Svou chemickou strukturou a vlastnostmi jsou velice podobné HK [4].

HL rozpustné ve vodných roztocích se dále dle rozpustnosti v alkalickém nebo kyselém prostředí dělí na HK, jež jsou rozpustné v alkalickém prostředí, částečně ve vodě a kyselých roztocích, a FK, které jsou rozpustné jak v alkalickém, tak i kyselém prostředí.

HK jsou nerozpustné v kyselém prostředí ($\text{pH} < 2$), ale v prostředí z vyšší hodnotou pH se částečně rozpouští. Jsou rozpustné v zásadách a v kyselinách se sráží. Nerozpustnými se stávají při nízkých hodnotách pH , kdy dochází k protonaci karboxylových skupin. Mají vysokou sorpční schopnost.

FK se od HK liší v mnoha faktorech. Všeobecně mají FK nižší molekulové hmotnosti. Mají více kyslíku díky tomu, že obsahují více kyselých funkčních skupin než HK a HL, obsahují více karboxylových, fenolických a karbonylových skupin, což je příčinou vyšší rozpustnosti FK ve vodných roztocích při všech hodnotách pH . FK mají méně výrazný aromatický charakter a jsou kyselejší než HK. Mají žluté až světlehnědé zbarvení na rozdíl od hnědého zbarvení HK. Kvůli mineralizaci je obsah FK nižší v půdách, kde je vysoká biologická aktivita.



Obr. 1 Rozdělení huminových látek podle zbarvení (Stevenson 1982) [5]

HK můžeme podle rozpustnosti v alkoholech dále dělit na:

- *Hymatomalanové kyseliny*, které jsou v alkoholu rozpustné, zbarvením jsou čokoládově hnědé;
- *Humusové kyseliny*, které jsou v alkoholu nerozpustné.

Simon dále řadí k HK také *humoligninové kyseliny*, které jsou podobné ligninu. Liší se pouze svou nerozpustností v NaF a jsou přechodem mezi ligninem a HK [6].

Poměr HK a FK v půdě je různý a závisí na typu půdy. Nejvyšší poměr HK a FK v půdě je v oblastech s černozemí a nejnižší je v tundře. Humus s nejvyšším obsahem HK tedy nalezneme v oblastech, kde se nachází běžná černozem a humus, který pochází z oblasti půd tundry a půd podzolových se vyznačuje vyšším obsahem FK [4].

3.3 Huminové kyseliny

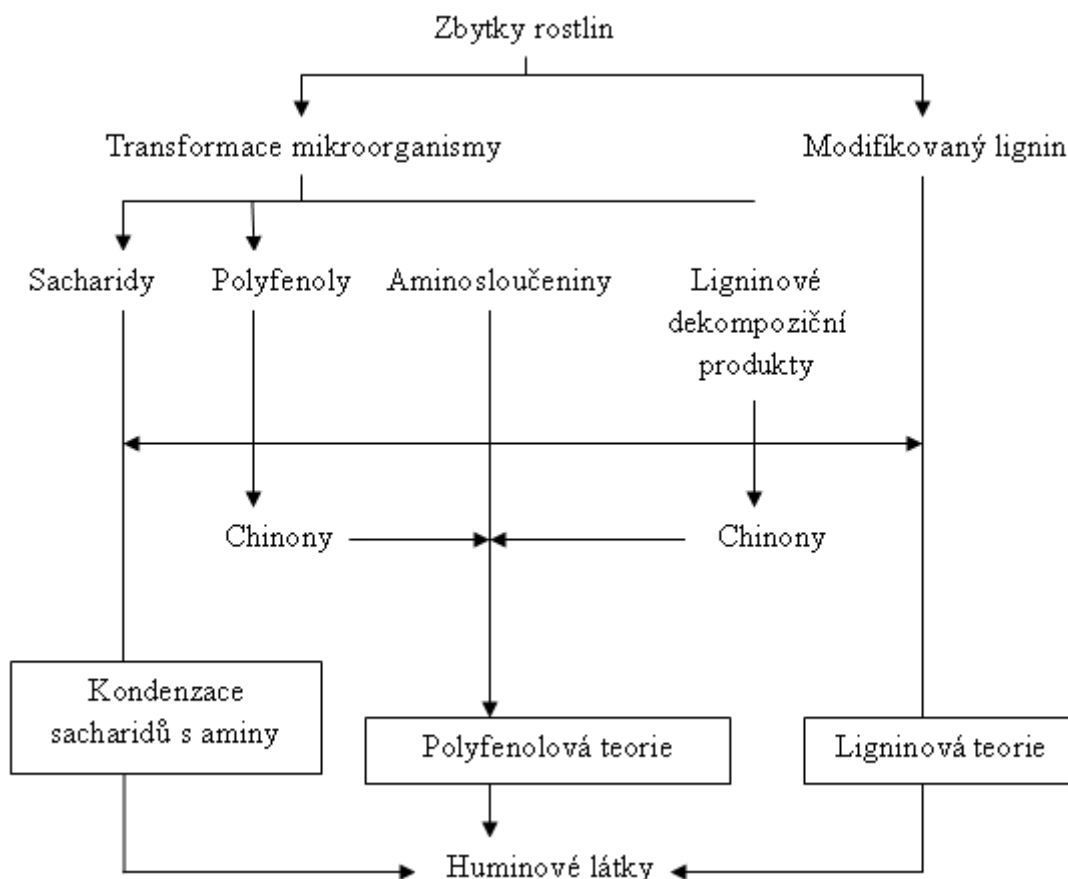
3.3.1 Vznik a výskyt huminových kyselin

HL se vyskytují ve všech půdách, vodách a sedimentech ekosféry, kde vznikly rozkladem rostlinných a živočišných tkání. HK jsou hlavní součástí rašeliny, hnědého uhlí, v menší míře se vyskytují i v černém uhlí. Jsou ve volné nebo vázané formě na různé kovy.

HL jsou tvořeny spojením různých komponent, které jsou součástí humifikačního procesu, jako jsou aminokyseliny, ligniny, pektiny nebo sacharidy. Tyto látky jsou spojeny intermolekulárními silami (donor-akceptorovými, iontovými, hydrofilními a hydrofobními). Je evidentní, že mechanismus vzniku HL může být nepatrně odlišný, závisící na zeměpisných, klimatických, fyzikálních a biologických podmínkách [7].

Při zvažování původu HL je třeba zdůraznit, že zcela uspokojivá teorie pro vysvětlení povahy a výskytu HK a FK v různých prostředích dosud nebyla vyvinuta. Tyto následující způsoby vzniku mohou působit ve všech půdách, ale ne ve stejném rozsahu nebo ve stejném pořadí důležitosti.

Biochemie vzniku HL je jedním z nejméně pochopitelných aspektů chemie humusu a také jedním z nejzajímavějších. Existuje několik způsobů vzniku HL při rozkladu rostlin a živočišných zbytků. V dnešní době jsou známy tři teorie o vzniku HL, a to ligninová teorie, polyfenolová teorie a vznik HL kondenzací aminosloučenin s redukujícími sacharidy [4].



Obr. 2 Teorie vzniku huminových látek (Stevenson 1982) [4]

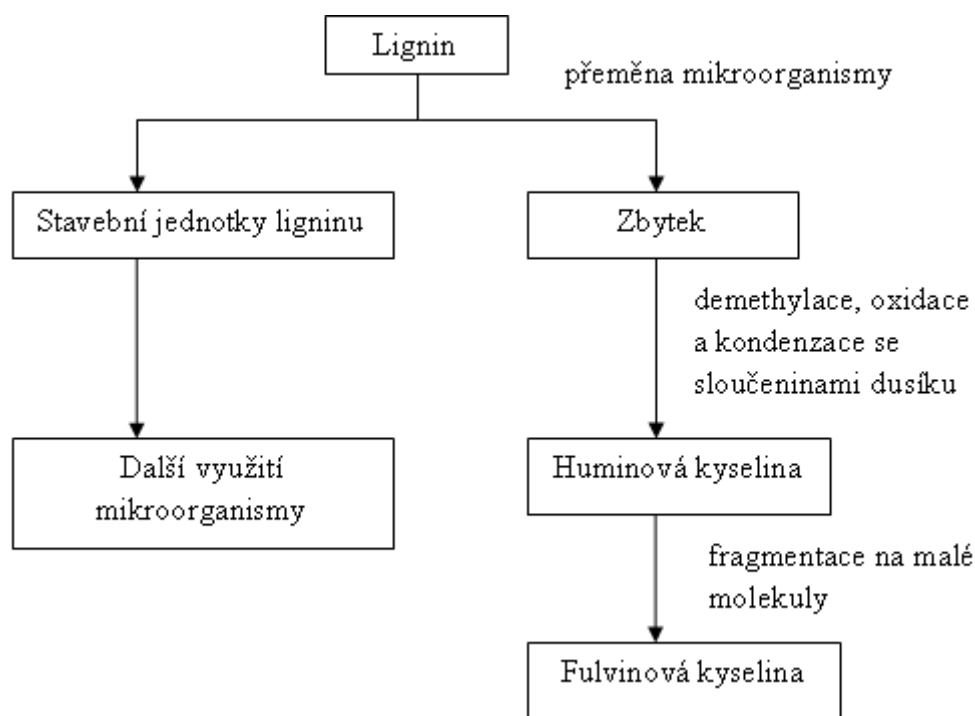
3.3.1.1 Ligninová teorie

Mnoho let se předpokládalo, že HL jsou odvozeny od ligninu. Podle této teorie je lignin neúplně přeměněn mikroorganismy a zbytek z něj se stává částí půdního humusu. Změny v ligninu zahrnují ztrátu methoxylových skupin (OCH_3), která je spojena s tvorbou ortho-hydroxyfenolů a oxidací alifatických postraních řetězců, která vede k vytvoření karboxylových skupin (COOH). Upravený materiál je předmětem dalších neznámých přeměn, které poskytují první HK a poté FK. Tento způsob je doložen Waksmanovou ligninovou teorií. Za předpokladu, že HL představují systém polymerů, výchozím produktem by byly HK, další oxidací a fragmentací by vznikly FK [4].

Pro podporu formace HK dle ligninové teorie podal Waksman několik následujících důkazů:

- lignin i HK jsou se značnými problémy rozkládány velkou většinou hub a bakterií,
- lignin i HK jsou částečně rozpustné v alkoholu a pyridinu,
- lignin i HK jsou rozpustné v zásadách a srážejí se v přítomnosti kyselin,
- lignin i HK obsahují OCH_3 skupiny,
- lignin i HK mají kyselý charakter,
- pokud se ligniny zahřejí v alkalickém prostředí, přemění se na HK obsahující OCH_3 skupiny,
- HK mají podobné vlastnosti jako oxidované ligniny.

Ačkoli je lignin méně snadno rozložitelný mikroorganismy než jiné rostlinné složky, existují v přírodě mechanismy pro jeho úplný aerobní rozklad. Jinak by se nerozložené zbytky rostlin hromadily na půdním povrchu a obsah organických látek v půdě by se postupně zvyšoval, dokud by se nevyčerpal veškerý CO_2 z atmosféry. V normálně aerobních půdách může být lignin rozložen na produkty o nízké molekulové hmotnosti před syntézou humusu. Na druhou stranu houby, které rozkládají lignin, se běžně nenacházejí v nadměrně vlhkých sedimentech. Proto ligninová teorie vzniku HL může převládat při tvorbě humusu z rašeliny, jezerních sedimentů, špatně odvodněných půd a mokrých sedimentů (bažiny atd.) [5].



Obr. 3 Ligninová teorie (Waksman 1932) [5]

3.3.1.2 Polyfenolová teorie

V tomto způsobu vzniku HL hraje lignin stále důležitou roli v humusové syntéze. V tomto případě fenolické aldehydy a kyseliny uvolněné z ligninu působením mikroorganismů projdou enzymatickou přeměnou na chinony. Chinony jsou sloučeniny, které mají porušený aromatický kruh a vznikají oxidací fenolů. Polymerizují v přítomnosti aminosloučenin, ale i bez nich, za tvorby huminových makromolekul.

Do polyfenolové teorie také patří způsob vzniku HL, kdy jsou polyfenoly syntetizovány mikroorganismy z neligninových zdrojů uhlíku (např. celulózy). Poté jsou polyfenoly enzymaticky oxidovány na chinony a ty posléze přeměněny na HL. Podle současných konceptů jsou chinony syntetizované z ligninu a pomocí mikroorganismů považovány za základní stavební kameny, ze kterých vznikají HL [4].

Tvorba látek hnědé barvy reakcemi zahrnujícími chinony je velice známým jevem, který se uskutečňuje při tvorbě melaninu, jako např. v mechanicky poškozené dužině zralého ovoce a zeleniny a při tvorbě osemení.

Mezi potencionální zdroje fenolů pro syntézu humusu patří lignin, mikroorganismy, elementární fenoly v rostlinách a třísloviny. Z výše jmenovaných jsou nejdůležitější první dva zdroje.

Flaigův koncept vzniku humusu je:

- 1) Lignin, uvolněný z celulózy při rozkladu rostlinných zbytků, je oxidačně štěpen za vzniku primárních strukturních jednotek (deriváty fenylypropanu).
- 2) Vedlejší řetězce stavebních jednotek ligninu jsou oxidovány, dochází k demethylaci a výsledné polyfenoly jsou přeměněny na chinony pomocí enzymů polyfenoloxidázy.

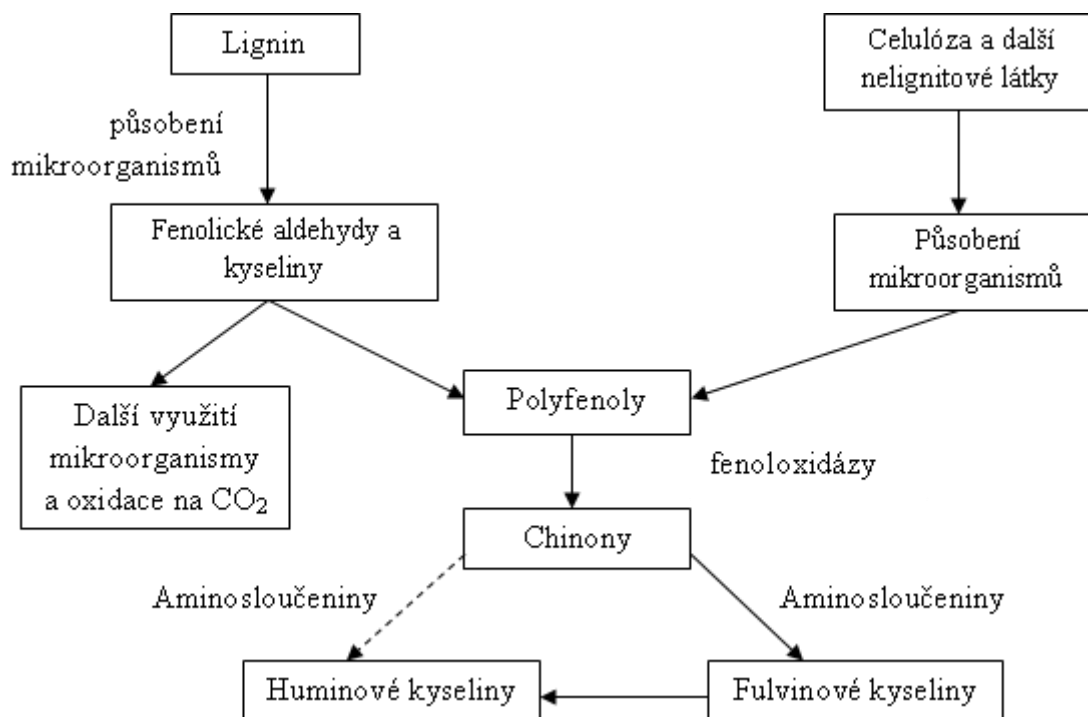
- 3) Chinony, vznikající z ligninu (a jiných zdrojů), reagují se sloučeninami obsahujícími dusík a vytvářejí tak tmavě zbarvené polymery.

Úloha mikroorganismů jako zdroje polyfenolů byla uvedena Konovovou. Došla k závěru, že HL byly vytvořeny myxobakterií, která rozkládá celulózu, před rozkladem ligninu.

Etapy, které vedou ke vzniku HL, jsou následující:

- 1) Houby rozkládají jednoduché sacharidy, části proteinu a celulózy např. v kůře zbytků rostlin.
- 2) Celulóza z xylému je rozkládána aerobními myxobakteriemi. Polyfenoly syntetizované myxobakteriemi oxidují na chinony pomocí enzymů polyfenoloxidázy. Chinony následně reagují se sloučeninami obsahujícími dusík za vzniku hnědých HL.
- 3) Lignin je rozložen. Fenoly uvolněné při rozkladu také slouží jako výchozí materiál pro syntézu humusu [5].

U polyfenolové teorie na rozdíl od ligninové teorie výchozí materiál sestává z nízkomolekulárních organických sloučenin, z nichž jsou velké molekuly tvořeny kondenzací a polymerací. Tato teorie vzniku HL může převládat v některých lesních půdách [4].



Obr. 4 Polyfenolová teorie (Stevenson 1982) [5]

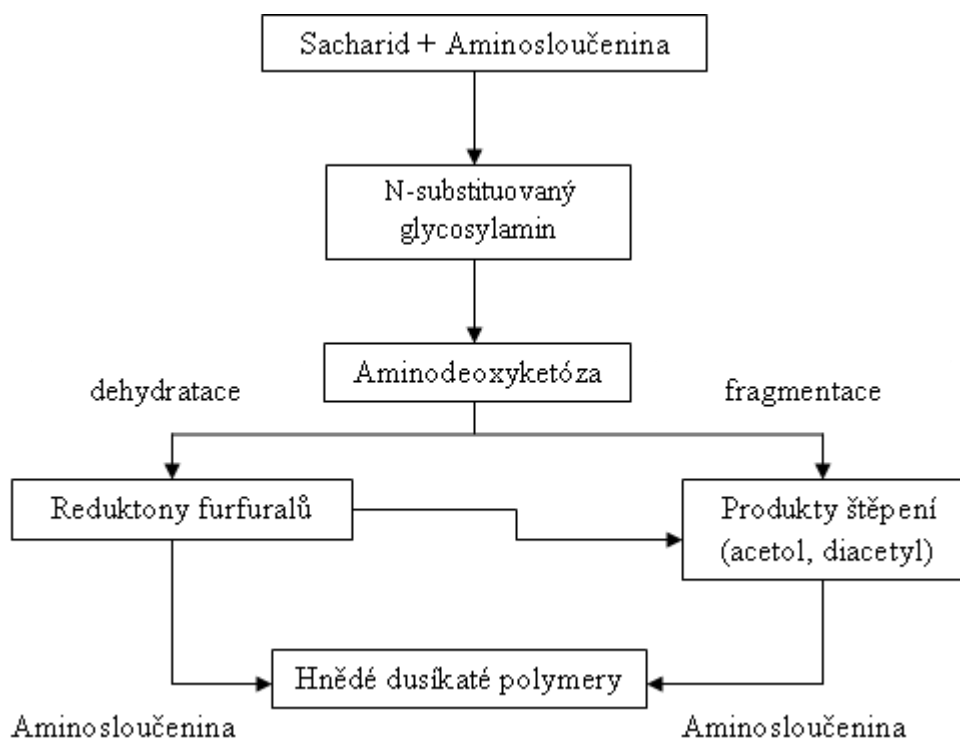
3.3.1.3 Kondenzace sacharidů s aminy

Představa, že humus je tvořen ze sacharidů se datuje zpátky do počátků chemie humusu. Další možností je tedy vznik HL kondenzací aminosloučenin s redukujícími sacharidy. Redukující sacharidy a aminy neenzymaticky polymerizují a výsledkem jsou hnědé dusíkaté polymery.

Důležitým je předpoklad vzniku HL ze zdrojů, které jako vedlejší produkty mikrobiálního metabolismu vznikají v půdě ve velmi hojném počtu [4].

Hlavním argumentem proti této teorii je, že reakce probíhá poměrně pomalu při teplotách za normálních půdních podmínek. Nicméně, drastické a časté změny v půdním prostředí (mrznutí a tání, vlhko a sucho), společně s mísením reaktantů s minerálním materiálem, má katalytické vlastnosti, které mohou usnadnit kondenzaci. Pozitivní stránkou této teorie je, že reaktanty (sacharidy, aminokyseliny, atd.) jsou syntetizovány ve velkém množství prostřednictvím mikroorganismů.

První reakce kondenzace sacharidů s aminy zahrnuje adici aminu na aldehydickou skupinu sacharidu za vzniku N-substituovaného glykosylaminu. Glykosylamin se následně rozkládá za tvorby N-substituované 1-aminodeoxy-2-ketosy. To je podmíněno: fragmentací a vznikem 3-uhlíkového řetězce aldehydů a ketonů, jako acetolu a diacetylů atd., dehydratací a formací reduktonů a hydroxymethyl furfuralů. Všechny tyto sloučeniny jsou velmi reaktivní a v přítomnosti aminosloučenin snadno polymerují za vzniku hnědě zbarvených produktů [5].



Obr. 5 Kondenzace sacharidů s aminy (Stevenson 1982) [5]

3.3.2 Vlastnosti a struktura huminových kyselin

HK nejsou chemickými individui, ale směsí látek s různým složením a strukturou. Jsou to amorfní látky, které se dále mohou dělit na složky lišící se velikostí částic a elementárním složením. V etanolu jsou nerozpustné a z roztoků se srážejí kyselinami jako černohnědé sraženiny. Jsou to slabě disociované vícesytné organické kyseliny, které mají hodnoty disociačních konstant řádově v rozmezí 10^{-3} až 10^{-5} , a to díky poměrně silnému charakteru karboxylových skupin.

HK mohou být charakterizovány jako kyselé aromatické polymery obsahující karboxylové, fenolové a hydroxylové skupiny ve své struktuře. HK obsahují více vodíku, uhlíku, dusíku a síry než FK. HK také mají vyšší molekulové hmotnosti než FK. HK se chovají jako micelární koloidy. Koloidní částice mají záporný náboj a izoelektrický bod leží v kyselé oblasti. V silně alkalickém prostředí tvoří převážně pravé roztoky. Ke koagulaci může docházet již v přírodních vodách s velkou koncentrací vápníku a hořčíku. Proto bývá v těchto vodách koncentrace HL velmi nízká. K agregaci dochází v kyselém prostředí.

Přítomnost HL ve vodě se projevuje jejím zbarvením a případně i pachutí. HL zbarvují vodu žlutě až hnědě. Barevný odstín závisí na koncentraci HL a na hodnotě pH vody. Čím vyšší je hodnota pH, tím je barva tmavší. Díky přítomnosti většího počtu karboxylových a fenolových skupin získávají HK schopnost tvořit komplexy, které jsou příčinou větších koncentrací kovů v huminových vodách. Kovy jsou pak snáze vyluhovatelné z půd a sedimentů [1].

Charakteristickou vlastností HL je heterogenost, podmíněná přítomností složek v různém stupni humifikace humusotvorného materiálu s nesterjým chemickým složením. Heterogenost určuje kolísání vlastností HL, a proto i možnost jejich rozdělení na více složek a frakcí, které sice mají shodnou stavbu, ale odlišují se prvkovým složením, stupněm disperzity, rozpustností, pohyblivostí a funkcí v půdě [8].

Protože obsahují jak hydrofilní tak hydrofobní oblasti, mohou být absorbovány na povrchu mnoha částic a ovlivňovat procesy jako jsou rozklad, koagulace a růst krystalů. Mají acido-bazické vlastnosti v široké škále hodnot pH. Jejich schopnost agregace, konformačních změn a povrchově aktivní chování jsou jejich charakteristické fyzikální vlastnosti.

Jejich alkyaromatické útvary jsou spojeny přes kyslíkové a dusíkové skupiny s různými alifatickými, peptidickými a lipidickými řetězci a chemicky aktivními funkčními skupinami. FK jsou méně polydisperzní a více hydrofilní ve srovnání s HK [9].

Jak již bylo uvedeno, HK jsou složeny převážně z uhlíku a kyslíku, tyto dva prvky mají dominantní zastoupení ve struktuře HK. Dále jsou v jejich strukturách obsaženy vodík, dusík, síra a také nepatrné množství fosforu.

Základní strukturní jednotkou HK a FK jsou z větší části polycyklické aromatické sloučeniny s bočními alifatickými řetězci a hydrofilními skupinami, které jsou vázány jak na jádru, tak i v postranních řetězcích. Kromě aromatických jader obsahují též chinoidní struktury. Chinoidní struktury společně s hydroxyskupinami jsou příčinou jejich oxidačně-redukčních vlastností. Dále byly zjištěny dusíkaté heterocyklické sloučeniny [1].

HK mění své složení v závislosti na jejich původu, výskytu a metodě extrakce. Základními strukturními jednotkami HK jsou tedy aromatické cykly bifenolického nebo trifenolického typu, na které se vážou skupiny: $-\text{COOH}$, $-\text{O}-$, $-\text{NH}-$, $-\text{CH}_2-$, $=\text{N}-$, $-\text{S}-$ a obvykle obsahují dvě volné hydroxylové skupiny.

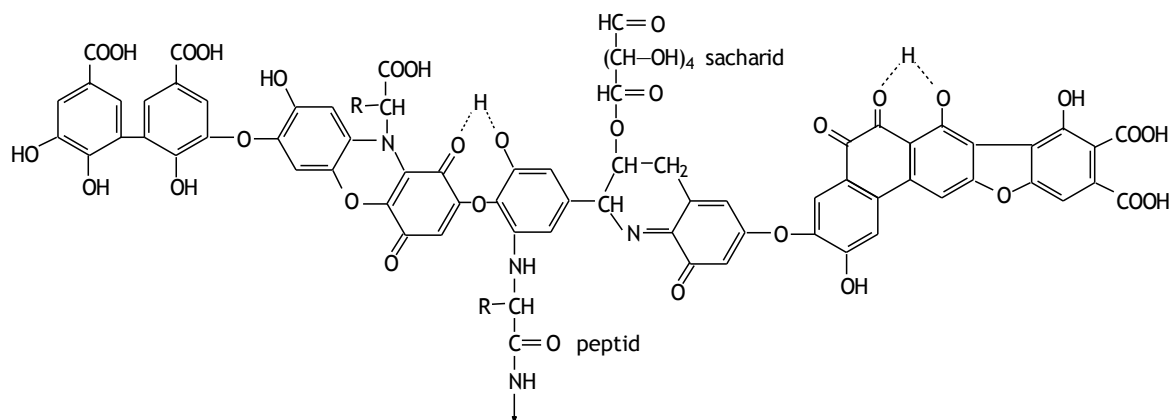
Charakteristická je zejména karboxylová a hydroxylová funkční skupina, a to zejména fenolová. Obvykle se udává, že v molekule HK je 4 až 5 karboxylových skupin a 3 až 4 fenolové skupiny. Tyto funkční skupiny dominují a jsou příčinou nejen polárního charakteru HK, ale i kyselosti, komplexační a sorpční kapacity HK [10][11].

K analýze funkčních skupin HK lze použít instrumentálních metod: infračervené spektrometrie s Fourierovou transformací, nukleární magnetické rezonance, elektronové paramagnetické rezonance, plynové chromatografie, hmotnostní spektrometrie a potenciometrické titrace [12].

Předpokládaná struktura HK obsahuje mnoho intramolekulárních a intermolekulárních vazeb, které způsobují zvýšení jejich stability a umožňují tvorbu sekundárních a terciárních struktur.

Názory na strukturu HK se ubírají dvěma základními směry:

- Prvním starším názorem je typ *polymerní struktury*, kterou bychom mohli popsat jako strukturu izolovaných aromatických jader, spojených navzájem alifatickými řetězci nebo strukturu polycyklických aromatických jader s bočními fenolickými a alifatickými řetězci.
- Druhým novějším směrem je předpoklad *supramolekulární struktury*, jež je tvořena relativně malými molekulami vázanými mezi sebou vodíkovými můstky. FK a HK jsou připisovány různé hypotetické vzorce, protože jde o směs mnoha látek, které se ještě zcela nepovedlo identifikovat [13].



Obr. 6 Model struktury huminové kyseliny [4]

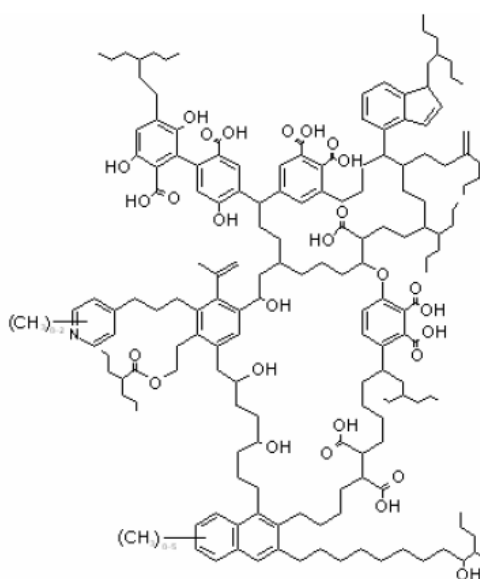
Tyto vzorce se snaží vystihnout zejména postavení karboxylových a hydroxylových skupin v molekule, které do značné míry ovlivňují chování HK.

Jde o:

- aromatické monokarboxylové kyseliny,
- aromatické dikarboxylové kyseliny v poloze ortho nebo i meta,
- fenoly nebo difenoly v poloze ortho,
- aromatické hydroxykyseliny v poloze ortho (typ kyseliny salicylové),
- chinoidní struktury,
- alifatické a cyklické hydroxykyseliny a ketokyseliny [1].

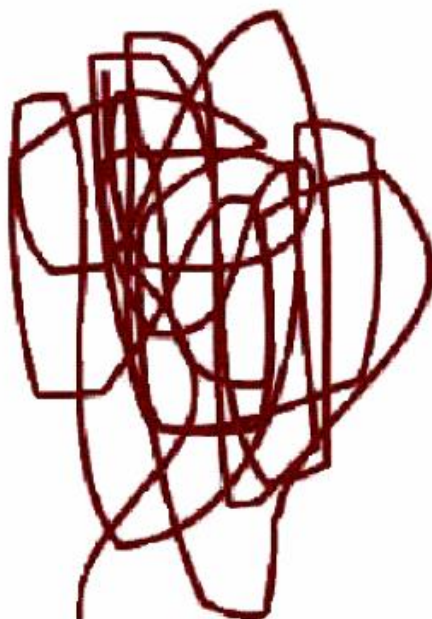
3.4 Metody pro studium konformace a molekulární organizace huminových kyselin

HL jsou přírodní, organické sloučeniny všudypřítomné ve vodách, půdách a sedimentech. Jsou významné pro transport nepolárních organických sloučenin v přírodě. Základem pro pochopení environmentálního významu HL jsou jejich chemické interakce. HL mají heterogenní a polydisperzní povahu, a proto není jejich sekundární struktura stále definována, tudíž ani jejich konformační uspořádání. Mnoho metod bylo použito pro studium základní chemické struktury HL. Pro zkoumání konformace a molekulární organizace HK ve vodných roztocích není dostačující pouze jedna metoda. Ve většině studií vědci použili kombinace několika technik. Mnoho vědců se snažilo objasnit strukturu HL po mnoho desetiletí. Bylo navrženo mnoho modelů HK, například Stevensonem (Obr. 6), Schultnem a Schnitzerem (Obr. 7) a mnoha dalšími.



Obr. 7 Část struktury HK podle Schultena a Schnitzera [14]

Byl představen koncept rigidních globulárních částic s ohledem na makromolekulární strukturu HL, jako je například molekulová velikost, tvar, a hmotnost [15]. Také byla přisouzena huminovému materiálu (HM) více flexibilní povaha a elipsoidní tvar [16] stejně jako náhodně stočená polymerní konformace [17] (Obr. 8). Pozdější experimenty vysvětlily makromolekulární strukturu kolísající mezi sféroidním a vláknitým tvarem podle koncentrace, pH a iontové síly rozpouštědla [18]. Současně se předpokládalo, že HL nejsou jen samostatné molekuly, ale asociace molekul odlišného přírodního původu [19]. Nová transmisní elektronová mikroskopie ukázala, že se vzrůstajícím pH nebo koncentrací HL počáteční jemně tkaná síť prodloužených vláken splývá do struktury skládaného listu, která je perforována dutinami různých velikostí. Do těchto dutin mohou být zachyceny organické a anorganické složky [20]. Alternativní popis makromolekulární struktury předpokládá, že HL v roztoku vytvářejí smíšené agregáty nebo micely. Tyto agregáty jsou drženy pohromadě slabými vazebnými mechanismy, jako jsou vodíkové vazby, π vazby a hydrofobní interakce [21]. Barak a Chen (1992) potvrdili micelární model, ve kterém jsou hydrofilní ionizované skupiny lokalizovány na rozhraní HL s roztokem, zatímco hydrofobní části molekuly jsou pravděpodobně uspořádány uvnitř makromolekuly [22].



Obr. 8 Tradiční koncept HK jako náhodně stočených makromolekul [23]

3.4.1 Gelová permeační chromatografie

V gelové permeační chromatografii (*Gel Permeation Chromatography* – GPC) jsou molekuly separovány podle své velikosti. Dochází k rozdělování látek mezi pohyblivou část mobilní fáze, která se nachází mezi jednotlivými zrny gelu (volný objem kolony V_0), a nepohyblivou část mobilní fáze (stacionární fáze), nacházející se uvnitř pórů gelu (objem pórů gelu V_i). Při průchodu kolonou jsou molekuly složek zdržovány v důsledku svého pronikání (permeace) do rozpouštědlem naplněných pórů. Malé molekuly pronikají hlouběji, a mají tudíž vyšší hodnoty retenčních objemů než větší molekuly. Interakce molekul analytů se stacionární fází nenastává. U GPC předpokládáme mechanismus separace nejenom podle molekulové hmotnosti, ale uvažujeme i další mechanismy, například dělicí a adsorpční.

Gel se volí podle vlastností separovaných látek. Pro látky ve vodě rozpustné se používají hydrofilní gely, například *Sephadex* (dextran zesítený epichlorhydrinem). Mobilní fází je voda s případným přídatkem organického rozpouštědla. Pro látky nerozpustné ve vodě se používají hydrofobní gely. Patří mezi ně kopolymery styrenu a divinylbenzenu (*Styragel*). Mobilními fázemi mohou být aromatické, chlorované a některé heterocyklické uhlovodíky. Univerzální gely na bázi silikagelu a porézních skel jsou vhodné pro separaci hydrofobních i hydrofilních látek.

Vylučovací chromatografie (*Size Exclusion Chromatography* – SEC) patří pod GPC. Mechanismus separace probíhá pouze na základě molekulové hmotnosti. Může probíhat za zvýšeného (*High Pressure Size Exclusion Chromatography* – HPSEC) i sníženého (*Low Pressure Size Exclusion Chromatography* – LPSEC) tlaku [24].

Studie Piccola a spol. (1996) řeší otázku makromolekulárního chování HL, které byly upravovány jednoduchými organickými sloučeninami. Byla pozorována změna v distribuci velikosti molekul. U monokarboxylových, dikarboxylových a trikarboxylových kyselin byl zaznamenán posun v huminových absorbancích od vysokomolekulárních

k nízkomolekulárním frakcím. Minerální kyseliny, fenoly a alkoholy nebyly schopny vykazat stejný posun. Jejich celková absorbance v objemu mobilní fáze byla stejná jako pro HL samostatně. Výsledky této studie jsou důkazem micelárního chování HL v roztoku a jsou důležité z hlediska hydrofobních vazeb, které drží huminové molekuly pohromadě. Organické kyseliny jsou schopny proniknout dovnitř huminové micely a pozměnit stereochemické hydrofobní uspořádání. V alkalických podmínkách vzniklé negativní náboje rozrušují zřejmou vysokomolekulární konfiguraci a rozptylují HM do malých micel. Tato práce má velký význam pro pochopení biologické aktivity a celkového environmentálního chování HL [25].

Piccolo a Conte (1999) se zabývali studiem konformačních změn HK a FK, které měly odlišný chemický původ. Nejprve byly HK a FK rozpuštěny v mobilních fázích, které se lišily složením, ale měly stejnou iontovou sílu. Zmenšování velikosti molekul bylo zaznamenáno zvyšujícím se elučním objemem. Výsledky této studie ukazují, že se HL v roztocích chovají jako volně vázané samovolné asociace relativně malých molekul a že intermolekulární hydrofobní interakce jsou převládajícími vazebnými silami. Stabilita takovéto konformace v roztoku je přičítána tendenci vyloučit molekuly vody z huminových sdružení, a tím snížit celkovou energii molekuly. Tento model rozpuštěných HL, který je založený na vratném samovolném shluknutí malých molekul spíše než na náhodném stočení makromolekul, reprezentuje nové porozumění, které by mělo přispět k odhadnutí chování kontaminantů v asociaci s přírodní organickou hmotou v životním prostředí [26].

Řada vědců zastává názor Piccola, který navrhl supramolekulární strukturu HK. Piccolo (2002) ve své z dalších studií zkoumal HK pomocí HPSEC a LPSEC. Získané výsledky ukázaly, že vysokomolekulární frakce HK jsou jen zdánlivě zřejmé a měly by být považovány za samovolné supramolekulární asociace heterogenních molekul. Konformace HK v roztocích jsou převážně stabilizovány slabými disperzními silami, jako jsou van der Waalsovy, π - π , CH- π interakce a vodíkové vazby. Takovéto huminové asociace vykazují jen nepatrně vysoký molekulový rozměr, který může být vratně rozrušen úpravou huminových roztoků pomocí minerálních a monokarboxylových kyselin o nízkých koncentracích nebo nepatrnou změnou složení mobilní fáze při konstantní iontové síle [27].

Studie Nebbiosa a Piccola (2002) pojednává o konformačních změnách HL, které byly pozorovány se zvyšující se koncentrací huminového roztoku. Ve zředěných huminových roztocích převažují hydrofobní interakce, které následně vedou ke zjevnému zvětšení velikosti molekul se zvyšující se koncentrací. Elektrostatická repulze je dominantní u koncentrovaných roztoků a velikost molekul se snižuje. Takovéto chování je v souladu s modelem, který popisuje HL jako supramolekulární asociace, jež vznikly samovolným seskupením malých molekul, spíše než s modelem popisujícím HL jako makromolekulární polymery nebo pravidelné micely [28].

Nebbioso a Piccolo (2012) publikovali další práci, která se zabývá izolací a identifikací huminových molekulárních komponent v oddělených velikostních frakcích pomocí HPSEC. HK a její tři velikostní frakce byly chemicky odděleny, aby byly získány sloučeniny rozpustné v organických rozpouštědlech s nekovalentními vazbami, sloučeniny rozpustné v organických rozpouštědlech a rozpustné ve vodě se slabými esterovými vazbami, sloučeniny rozpustné v organických rozpouštědlech se silnými esterovými vazbami, a nakonec neoddělitelné zbytky. V souladu se supramolekulární strukturou HL objevili, že

hydrofobní sloučeniny byly především přítomny v největší velikostní frakci, zatímco hydrofilní složky byly vyloučeny v nejmenší velikostní frakci. Mimoto sloučeniny s lineárními řetězci nebo aromatickými kruhy asociovaly do pravidelných struktur a byly častější v největší velikostní frakci, zatímco sloučeniny nepravidelného tvaru, které brání spojování do větších celků, byly většinou nalezeny v nejmenší velikostní frakci. Proto strukturní charakteristiky jednotlivých huminových molekul určují jejich vzájemné asociace v huminových suprastrukturách, stejně jako jejich konformační pevnost a tvar. Jejich výsledky ukazují, že HL jsou složeny z heterogenních molekul, které se náhodně slučují podle velikosti, tvaru, chemické afinity a hydrofobicity. Strukturní charakterizace jednotlivých molekul je omezena silnými intermolekulárními interakcemi, které stabilizují supramolekulární asociace [29].

Maia a spol. (2008) zkoumali konformační změny ve struktuře HK extrahovaných z kompostu s různým stupněm zralosti pomocí HPSEC. Distribuce velikosti molekul HK byla porovnávána v roztocích obsahujících sodné nebo amonné protiionty při pH 7 a 4,5. Výsledky ukazují, že velikost molekul humátů nezávisí pouze na druhu protiiontů, ale také na jejich koncentraci v roztoku. Při nízkých koncentracích humátů produkují sodné protiionty menší velikosti molekul, než ty, které byly zjištěny pro více hydratované amonné protiionty. Naopak, při vyšších koncentracích humátů kompaktnější konformace sodných humátů produkují větší velikosti molekul, než ty u amonných humátů, díky agregaci více hydrofobních povrchů v sodných humátech. Kompostování vedlo k degradaci nestálých mikrobiálních komponent s akumulací hydrofobních složek. To způsobilo samovolné sdružení hydrofobních sloučenin do huminových suprastruktur velkých molekul v průběhu kompostování. Při nízkých hodnotách pH byly změny v konformační stabilitě při přidavku kyseliny octové do humátových roztoků vysvětleny supramolekulárním modelem humifikovaného organického materiálu [30].

Studie Puglisiho a spol. (2010) pojednává o konformačních změnách rozpuštěných organických látek, které byly získány z kompostu opakovanou extrakcí vodou. Tři komerční komposty byly extrahovány čtyřikrát za sebou stejným množstvím vody a následně byly kvantifikovány pomocí HPSEC. Celkový obsah organického uhlíku každého vzorku s rozpuštěnými organickými látkami byl analyzován použitím metody pro stanovení chemické spotřeby kyslíku a konformační velikostní distribuce byla stanovena pomocí HPSEC. Výsledky ukázaly, že opakovanou extrakcí pomocí vody kompost uvolňuje značná množství rozpuštěných organických látek. Důsledkem další extrakce rozpuštěných organických látek je více hydrofobní organická látka se vzrůstajícími molekulárními rozměry. Tyto závěry mohou být důležité pro půdní procesy a funkce, jako jsou dynamika organických látek a transport znečišťujících látek [31].

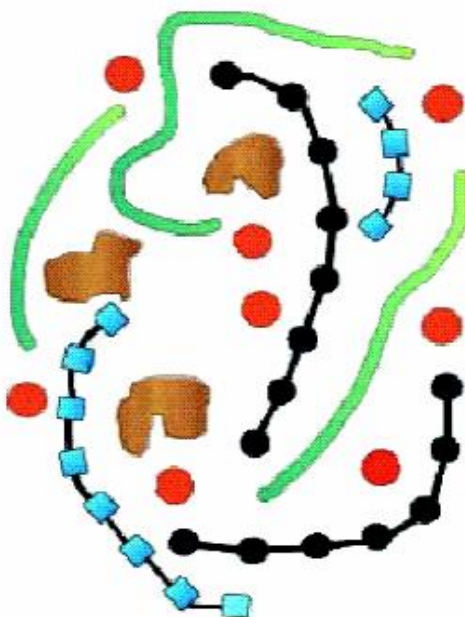
Další studie zabývající se HK extrahovanými z kompostu, u které bylo opět využito HPSEC, byla publikována Canellasem a spol. (2010). Cílem této studie bylo oddělit HM různých molekulárních rozměrů a posoudit vztah mezi chemickými vlastnostmi velikostních frakcí a jejich působení na růst kořenů rostlin. Molekulární rozměry složek huminových velikostních frakcí byly zkoumány pomocí NMR založené na difúzních koeficientech (DOSY-NMR) a distribuce uhlíku pomocí ^{13}C NMR v pevném skupenství. Byly použity sazenice dvou rostlin, které byly upravovány odlišnými koncentracemi velikostních frakcí, aby mohl být posouzen růst kořenů. Bylo získáno šest různých velikostních frakcí a jejich

obsah sacharidů a délka alkylového řetězce klesala se zmenšující se velikostí molekul. Postupná redukce aromatického uhlíku byla také pozorována s klesající velikostí molekul separovaných frakcí. NMR spektra ukázaly, že velikostní frakce se skládaly z komplexních směsí alifatických, aromatických a sacharidových složek, které mohou být odděleny na základě difúze. Všechny velikostní frakce podporovaly růst kořenů u obou rostlin, avšak záleželo na velikosti molekul a druhu rostliny. Bylo naznačeno, že fyziologický vliv separovaných velikostních frakcí na růst kořenů a stavbu byl spíše efektem jejich obsahu specifických bioaktivních molekul než jejich velikosti, což bylo pozorováno snížením huminové heterogenity jednotlivých frakcí. Tyto molekuly mohou být uvolněny z huminových suprastruktur a mohou být bioaktivní, pokud je menší stabilita huminové konformace než ta, která byla získána v separovaných velikostních frakcích [32].

3.4.2 NMR spektrometrie

Princip nukleární magnetické rezonance spočívá v interakci elektromagnetického záření v oblasti krátkých rádiových vln s atomovými jádry měřené látky. Při interakci absorbovaná energie způsobuje přechody nenulových magnetických momentů na vyšší energetické stavy. Ve spektrech NMR se projevují magnetické momenty jaderných spinů. Jádra prvků a jejich izotopů mají tzv. vnitřní moment hybnosti, označovaný častěji jako spin. U těch jader, která mají nenulový spin (^{13}C , ^{19}F , ^{31}P , ^{17}O , ^2H , ^1H a další) je vzbuzováno magnetické pole. Z prvků, které se vyskytují v organických sloučeninách, se nejčastěji měří NMR spektra u ^1H , ^{13}C a ^{19}F . Ostatní běžně se vyskytující elementy (^{12}C , ^{16}O a ^{32}S) jsou nemagnetické (mají nulový spin). Základem této metody je, že běžně přítomné atomy uhlíku (^{12}C) neinterferují ve spektrech a tím je podstatně zjednodušují [24].

Simpson a spol. (2002) využili rozdílných technik nukleární magnetické rezonance (NMR) pro výzkum struktury HL. HM jsou komplexní směsi mnoha komponent, které se liší poměrem a strukturou původu vzorku a jeho přípravou. Agregáty jsou pravděpodobně drženy pohromadě komplexem kombinací hydrofobních interakcí, interakcí mezi náboji, vodíkovými vazbami a kovovými vazbami. Výsledky této práce poskytují první přímý důkaz o hlavních strukturních komponentech, poměrných velikostech a separaci HL. Tyto objevy potvrzují koncept molekulární agregace směsí, který vysvětluje koloidní vlastnosti HL. Mechanismus tohoto konceptu je založen na podněcování procesu agregace kovovým kationtem. Výsledky této studie jsou důležité kvůli kovovým iontům, které jsou rozhodující pro formaci agregátů a jejich stabilitu [23].



Obr. 9 Nový koncept struktury HL, hlavní komponenty HL mají relativně malé molekulové hmotnosti a agregují v přítomnosti kovů (červené oblasti představují kationty kovů, modré polypeptidy, zelené alifatické řetězce, černé polysacharidy a hnědé jednotky aromatické ligninové fragmenty) [23]

V další publikaci Sutton a Sposito (2005) využili NMR spektrometrie a dalších metod, jako například hmotnostní spektrometrie nebo rentgenové absorpční spektrometrie, pro získání nového pohledu na molekulární strukturu půdních HK. Podle jejich výzkumu jsou HL směsí rozmanitých, relativně nízkomolekulárních složek, které asociují a jsou stabilizovány hydrofobními interakcemi a vodíkovými vazbami. Tyto shluky jsou schopné se sdružovat do micelární struktury ve vhodném vodném prostředí. Huminové složky vykazují kontrastní pohybové chování na molekulární úrovni a mohou být prostorově segregovány na stupnici nanometrů. V rámci tohoto nového strukturálního kontextu zahrnují tyto komponenty všechny molekuly spojené s HL, takže nemohou být efektivně odděleny chemickými nebo fyzikálními metodami [33].

3.4.3 Dynamický rozptyl světla

Metoda dynamického rozptylu světla (*Dynamic light scattering* – DLS) je určena ke stanovení velikosti částic v suspenzi pomocí měření jejich difúzního koeficientu, jehož hodnota závisí na třech veličinách, a to na teplotě kapaliny, na její viskozitě a na velikosti suspendovaných částic. Pokud známe teplotu a viskozitu, můžeme tak zjistit velikost částic [34].

Ve studii Pinheira a spol. (1996) se zabývali stanovením difúzního koeficientu pomocí metody DLS pro dvě různé HK. Výsledky měření ukázaly, že HM v roztoku agreguje do relativně velkých částic (>30 nm). Velké agregáty byly objeveny u obou vzorků HK a jejich velikost závisela na původu anebo přípravě vzorku stejně jako na experimentálních podmínkách pH a iontové síly. Byl prozkoumán vliv iontové síly na difúzní koeficient. Pro vyšší iontové síly než 0,1 M může dojít k agregaci vedoucí k nárůstu velikosti molekul. Vliv pH na difúzní koeficient ukázal jednu populaci tvořenou velkými agregáty (185 nm průměr) při pH=5 bez přidané soli. Pokud bylo pH snižováno pod 2,5, došlo ihned ke koagulaci, která

následně vedla k vysrážení HK. Nevratná disagregace (120 nm průměr) byla podpořena zvýšením pH až do hodnoty 10. Vzorky, které byly nejprve nastaveny na pH 10 a poté upraveny na pH mezi 3 až 5, měly jiné vlastnosti než vzorky, které byly nastaveny přímo na požadované pH, což zdůrazňuje vliv metody přípravy na konečné vlastnosti vzorku [35].

Palmer a Wandruszka (2001) v této práci studovali změny ve velikosti agregátů vodných HM jako funkci vlastností roztoků pomocí DLS. HK a FK byly rozpuštěny na relativně nízké koncentrace ($15\text{--}30\text{ mg}\cdot\text{dm}^{-3}$) v roztocích s odlišnou teplotou, obsahem kationtu a etanolu, a pH. Výsledky byly vysvětleny na základě intramolekulární kontrakce a intermolekulární agregace huminových polymerů. Intramolekulární kontrakce převládala v půdních HK, takže méně byla ve vodných HK a FK. Zvyšující se teplota huminového roztoku většinou vedla ke zvětšení velikosti částic, což bylo připisováno efektu podobnému zakalení tenzidu. Přídavek kationtů vedl buď ke kontrakci, nebo k expanzi, což záviselo na náboji a koncentraci iontu, a na povaze HM. Snižování pH zpočátku způsobilo kontrakci, která byla doprovázena růstem a vysrážením ve velmi kyselém prostředí [36].

3.4.4 Vysoce rozlišovací ultrazvuková spektrometrie

Podstata ultrazvukové spektrometrie je velmi blízká principu běžně známých spektrometrických metod, jako jsou například nukleární magnetická rezonanční (NMR) spektrometrie a UV-VIS spektrometrie. Tyto klasické metody jsou založeny na sledování interakce elektromagnetického záření se zkoumaným vzorkem. Ultrazvuková spektrometrie využívá jiný druh vlnění, a to ultrazvukové. Zvuk obecně je podélným vlněním, šířícím se lokálním stlačováním materiálu. Ultrazvuk označuje zvukové vlnění o vysokých frekvencích (nad 20 až 100 kHz). V ultrazvukové spektrometrii tedy sledujeme změny charakteristik ultrazvuku po jeho průchodu studovaným vzorkem [37].

Vysoce rozlišovací ultrazvukové spektrometrie bylo využito ve studii Klučákové a spol. (2011), kde se zabývali konformačními změnami HK ve dvou různých prostředích (NaOH a NaCl). Konformační změny jsou zde stanoveny hustotou a elasticitou vzorku, které jsou silně ovlivněny molekulárním uspřádáním. Minimum ultrazvukové rychlosti bylo pozorováno pro koncentraci $1\text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$ pro lignitovou HK a $0,5\text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$ pro IHSS Leonardite standard. Vypočítané hodnoty stlačitelnosti byly prakticky konstantní až do obsahu huminu odpovídajícímu minimu ultrazvukové rychlosti, a poté klesaly se zvyšující se koncentrací. Ukázalo se, že organizace huminových částic ve zředěných a koncentrovaných huminových solech je odlišná. Pokles stlačitelnosti ukázal na vznik více rigidní struktury, která může způsobit pokles huminových vazebných schopností. Bylo potvrzeno, že tato metoda je velice citlivá a může být využita jako indikátor konformačních změn HK v roztocích o různých koncentracích [38].

3.4.5 Další metody

Zara a spol. (2006) se zabývali studií strukturální konformace vodných roztoků HK. Pomocí UV-VIS spektrometrie zjistili, že makromolekula vodné HK může být klasifikována jako flexibilní polyelektrolyt. Strukturální konformace tohoto polyelektrolytu závisí na pH, koncentraci vodné HK a koncentraci elektrolytu. Navíc se ukázalo, že delší doba komplexace podporuje kondenzační konformaci makromolekuly. Tato konformace je způsobena snížením nestálosti kovových iontů, které jsou v komplexu s vodnými roztoky HK [39].

Další technika, která byla využita pro studium molekulární konformace rozpuštěné organické hmoty, byla fluorescenční spektrometrie. Mei a spol. (2009) zkoumali dvě různé HK. Studovali efekty iontové síly, pH a koncentrace rozpuštěné organické hmoty. Výsledkem jejich studie je, že intenzita fluorescence rostla a polarizace fluorescence klesala se zvyšující se koncentrací, a červený posun se synchronně objevil v oblastech delších vlnových délek. Žádné zásadní vlivy na iontovou sílu nebyly pozorovány. Intenzita fluorescence rostla a polarizace fluorescence klesala pro obě HK se snižujícím se pH, a modrý posun se objevil v oblasti kratších vlnových délek pro škálu hodnot pH v rozmezí 11 až 4. Podle pozorování bylo zjištěno, že se konformace těchto dvou HK stočila v kyselých podmínkách díky neutralizaci náboje a následující agregaci [40].

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Použité chemikálie

Kyselina chlorovodíková (Normanal ®), Lach – Ner, s. r. o.

Hydroxid sodný (Normex), Carlo Erba Reagents Group

Chlorid sodný, p. a., Lach – Ner, s. r. o.

Huminové kyseliny

4.2 Použité přístroje

pH metr (Mettler Toledo)

konduktometr (Mettler Toledo)

UV-VIS spektrometr (Cary 50 Probe)

hustoměr s oscilační U-trubicí (Anton Paar DMA 4500)

Zetasizer Nano Series (Malvern)

HR-US 102 spektrometr (Ultrasonic Scientific)

4.3 Příprava odměrných roztoků a vzorků

4.3.1 Příprava huminových kyselin

60 g lignitu bylo zalito 2 dm³ extrakčního roztoku (0,5 M NaOH + 0,1 M Na₄P₂O₇). Extrakce probíhala přes noc za stálého protřepávání suspenze. Následující den byl roztok zfiltrován přes hustou tkaninu a tuhý zbytek po filtraci byl znovu extrahován stejným činidlem, tentokrát pouze 60 minut. Poté byla opět provedena filtrace. Oba filtráty byly spojeny a okyseleny 20% HCl do pH = 1. Roztok byl ponechán v lednici přes noc. Druhého dne byla odsáta kapalina nad usazeninou, zbytek byl 10 minut odstředován v centrifuze při 4000 otáčkách za minutu a termostatu nastaveném na 10 °C. Usazenina byla třikrát promyta kyselinou chlorovodíkovou o koncentraci 0,2 M (pH < 1) a jednou destilovanou vodou. Nakonec byly získané HK vysušeny při 50 °C.

Vysušené HK byly dále přečištěny směsí HCl a HF (10 cm³ konc. HCl + 20 cm³ konc. HF + 1970 cm³ H₂O). Tento roztok byl ponechán 24 hodin třepat a následně byl odstředěn. Po dekantaci byla usazenina znovu zalita zředěným roztokem HCl+HF a 24 hodin protřepávána. Roztok byl znovu slit a usazenina promývána vodou, dokud nebyla zkouška AgNO₃ na Cl⁻ negativní. Poté byly získané HK vysušeny při 50 °C.

Pro vlastní měření byly HK použity ve formě tří různých vodných roztoků. První koncentrační řada byla připravena rozpuštěním HK v NaOH. Přesně navážené množství bylo kvantitativně převedeno do kádinky s 0,1 M NaOH a mícháno přes noc, poté byl tento roztok

převeden do odměrné baňky a doplněn po rysku NaOH. Navážka byla volena tak, aby měl nejkoncentrovanější roztok $10 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$. Následným ředěním z tohoto roztoku byla připravena koncentrační řada HK v NaOH o koncentracích $0,01\text{--}10 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$. Druhá koncentrační řada byla připravena neutralizací připravených roztoků HK v NaOH z první řady pomocí $0,1 \text{ M HCl}$ ($1 : 1$), kdy bylo pomocí pipety odebráno přesné množství HK v NaOH a doplněno stejným množstvím $0,1 \text{ M HCl}$ (od všech vzorků z první koncentrační řady). Třetí koncentrační řada byla připravena postupným rozředěním roztoku HK v NaOH neutralizovaného HCl s nejvyšší koncentrací ($10 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$) ze druhé řady pomocí $0,1 \text{ M}$ roztoku NaCl. Vzorky připravené ve druhé i třetí řadě jsou tedy roztoky HK v $0,1 \text{ M NaCl}$ ale s rozdílným způsobem přípravy. Všechny tři koncentrační řady byly namíchány tak, aby koncentrace HK byly ve všech stejné.

4.3.2 Příprava odměrných roztoků $0,1 \text{ M NaOH}$, $0,1 \text{ M HCl}$ a $0,1 \text{ M NaCl}$

Odměrné roztoky $0,1 \text{ M NaOH}$ a $0,1 \text{ M HCl}$ byly připraveny z normalů. Normaly byly kvantitativně převedeny do odměrných baněk o objemech 1 dm^3 a doplněny milliQ vodou po rysku. Odměrný roztok $0,1 \text{ M NaCl}$ byl připraven přesně naváženým množstvím NaCl, které bylo kvantitativně převedeno do odměrné baňky o objemu 1 dm^3 a doplněné milliQ vodou po rysku.

4.4 Pracovní postup

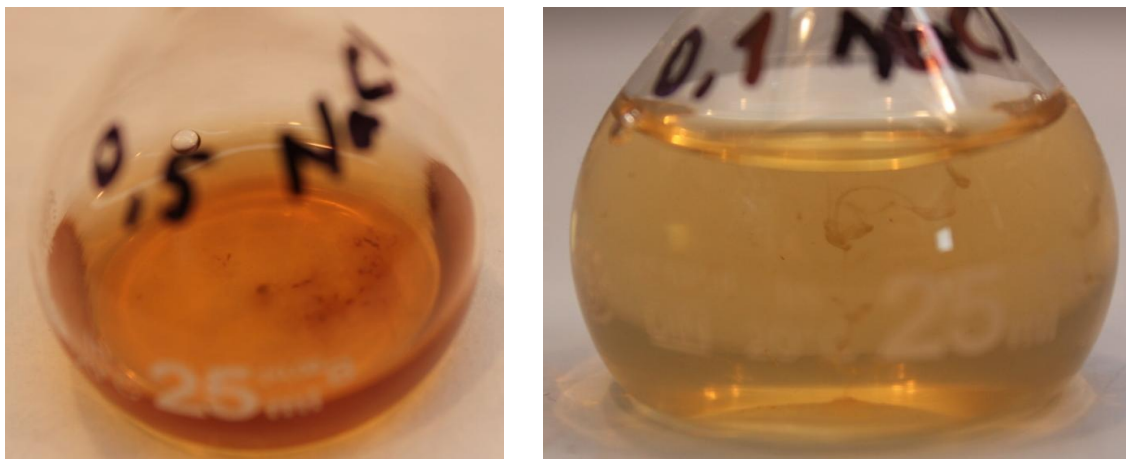
4.4.1 Charakterizace huminových kyselin

Elementární analýza byla provedena na Ústavu struktury a mechaniky hornin AVČR v Praze (CHNSO mikroanalyzátor Carlo Erba).

Celková kyselost byla stanovena na základě potenciometrické a konduktometrické titrace suspenze HK ve vodě ($20 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$) odměrným roztokem 1 M NaOH .

4.4.2 Příprava vzorků huminových kyselin pro měření

Pro jednotlivá měření bylo potřeba přefiltrovat roztoky HK (viz Obr. 10). Pro přefiltrování byl použit filtr 5 mikronů. Pro měření hustot a pro měření pomocí vysoce rozlišovací ultrazvukové spektrometrie bylo potřeba vzorky ještě odplynit. Pro odplynění vzorků byl použit ultrazvukový čistič, kde byly vzorky ponechány 30 minut před měřením.



Obr. 10 Agregáty HK v roztocích NaCl

4.4.3 Měření pomocí použitých analytických metod

Do kádinky o objemu 25 cm³ bylo odpipetováno 10 cm³ roztoku HK. Do roztoku byla ponořena elektroda a byla naměřena hodnota dané veličiny (pH nebo měrná vodivost), která byla po ustálení zaznamenána. Měření bylo opakováno třikrát pro každý roztok. Před samotným měřením byla prováděna kalibrace pH metru pomocí kalibračních roztoků o přesném pH.

U měření pomocí ultrafialové a viditelné spektrometrie byla nejprve provedena korekce na baseline pomocí milliQ vody. Do křemenné kyvety byl odlit 1 cm³ vzorku. Kyveta byla vložena do přístroje a bylo naměřeno spektrum.

Hustota byla měřena pomocí hustoměru s oscilační U-trubicí. Měřicí cela byla pomocí injekční stříkačky naplněna odplyněnou milliQ vodou a byla provedena kalibrace přístroje. Poté byl aplikován roztok HK do měřicí cely a byla změřena hustota. Měření bylo prováděno celkem třikrát.

Pomocí přístroje Zetasires Nano Series byla měřena velikost částic a zeta potenciál. Pro měření velikosti částic byl odlit 1 cm³ vzorku HK do křemenné kyvety. Po změření velikosti částic byla do kyvety se vzorkem vložena Dip cela pro stanovení zeta potenciálu.

Měření pomocí vysoce rozlišovací ultrazvukové spektrometrie bylo provedeno tak, že obě cely byly naplněny 1 cm³ odplyněné milliQ vody. Poté byla jedna cela naplněna roztokem HK, v druhé byla ponechána voda.

Měření byla provedena pro všechny tři koncentrační řady HK ve vodných roztocích, a to v NaOH a NaCl (připravený buď neutralizací NaOH pomocí HCl, nebo přímým ředěním roztokem NaCl). U všech měření byla změřena také prostředí, ve kterých byly HK rozpuštěny.

4.5 Použitá instrumentální metodika

Potenciometrické stanovení pH

Přímá konduktometrie

Ultrafialová a viditelná spektrometrie (UV-VIS spektrometrie)

Měření hustoty

Dynamický rozptyl světla (*Dynamic light scattering* – DLS)

Laserová Dopplerova velocimetrie (*Laser Doppler velocimetry* – LDV)

Vysoce rozlišovací ultrazvuková spektrometrie (*High resolution ultrasound spectrometry* – HRUS)

4.5.1 Potenciometrické stanovení pH

V potenciometrii se měří potenciál vhodné indikační elektrody v měrném článku se srovnávací (referenční) elektrodou o konstantním potenciálu, v závislosti na aktivitě

solvatovaných protonů, kovových a nekovových iontů, redukovadel, oxidovadel, anionů, aj. Elektrody jsou nepolarizované a měří se v bezproudovém stavu, respektive při nepatrném proudu, jehož hodnota je velmi blízká nula. Potenciál měrné elektrody závisí na koncentraci sledované látky, zatímco potenciál srovnávací elektrody je konstantní. Rovnovážné napětí, které je rozdílem těchto dvou potenciálů, je mírou koncentrace sledované látky. Při potenciometrickém způsobu měření pH se nejvíce využívá skleněná elektroda, která patří do souboru elektrod iontově-selektivních. Skleněná elektroda je konstruována jako samostatná nebo kombinovaná, kdy v jednom těle je zabudována měrná i vnější referenční elektroda [24][41].

4.5.2 Přímá konduktometrie

Konduktometrie patří mezi elektroanalytické metody založené na pohyblivosti iontů. Elektrická vodivost pochází z migrace iontů k opačně nabitým inertním elektrodám a je určována aktivitami (koncentracemi) všech iontů v roztoku a velikostí náboje, který nesou. Elektrická vodivost souvisí s iontovou pohyblivostí u_k , u_a v prostoru mezi elektrodami v elektrickém poli jednotkové intenzity. Migrace iontů je brzděna odporem okolní kapaliny a její viskozitou. Přímá konduktometrie je neselektivní, použitelná pouze při stanovení koncentrace jednosložkových roztoků (detekce nečistot v destilované vodě, rozpuštěných solí v neutrálních roztocích). Vodivost roztoku roste s teplotou, mění se s viskozitou a permitivitou rozpouštědla [24][41].

4.5.3 Ultrafialová a viditelná spektrometrie

Podstatou ultrafialové a viditelné spektrometrie je absorbance ultrafialového a viditelného záření, tedy oblasti 200 až 800 nm, zředěnými roztoky. Absorpce ultrafialového a viditelného záření souvisí s přechodem elektronu mezi dvěma i více energetickými hladinami v molekule. Excitovaná molekula přechází zpět do základního stavu bez radiace, zářivá energie se mění v tepelnou energii, zvyšuje se kinetická energie molekul. Jen v některých případech může být molekulou emitováno nové záření, zpravidla o nižší energii (fluorescence, fosforescence podle přechodu elektronu ze singletové nebo tripletové vzbuzené hladiny). Absorbované záření v UV-VIS může být také doprovázeno rozptylem záření na koloidních micelách, částicích nebo makromolekulách. Pro spolehlivé spektrometrické měření a vyhodnocení je žádoucí, aby difúzní rozptyl, reflexe a vznik luminiscence byly zanedbatelné [24].

4.5.4 Měření hustoty

Měření hustoty pomocí oscilační U-trubice se používá pro stanovení hustoty kapalin a plynů. Metoda je založena na elektronickém měření frekvence oscilace, ze které je počítána hodnota hustoty. Měřicí cela s kapacitou oscilace je naplněna vzorkem. Vlastní frekvence měřicí cely je ovlivněna hmotností vzorku. Tato měřicí cela s kapacitou oscilace je dutá, skleněná trubice ve tvaru U (oscilační U-trubice), která je elektronicky vybuzená netlumenou oscilací (při nejnižší možné amplitudě). Směr oscilace je normální na úrovni dvou větví. Vlastní frekvence oscilátoru je ovlivněna pouze částí vzorku, která se skutečně podílí na oscilaci. Objem vyžadovaný pro oscilaci je omezen stacionárními uzly oscilace na nosných bodech oscilátoru. Pokud je oscilátor naplněn alespoň po nosné body, stejný přesně definovaný objem se vždy podílí na oscilaci, proto může být naměřená hodnota hmotnosti vzorku použita pro výpočet jeho hustoty [42].

4.5.5 Dynamický rozptyl světla

Principem metody dynamického rozptylu světla (DLS) je měření světla rozptýleného molekulami ve vzorku v průběhu času. Při rozptylu světla molekulou se rozptýlí část dopadajícího světla. Kdyby byla molekula stacionární, množství rozptýleného světla by bylo konstantní, ale jelikož všechny molekuly v roztoku difundují Brownovým pohybem vzhledem k detektoru, existují interference (pozitivní nebo negativní), které způsobují změnu intenzity. Brownův pohyb je náhodný pohyb částic, jež je způsoben bombardováním molekulami rozpouštědla, které je obklopují. DLS měří Brownův pohyb, který souvisí s velikostí částic. Normálně se DLS zabývá měřením částic suspendovaných v kapalině [43].

Čím je částice větší, tím je Brownův pohyb pomalejší. Menší částice jsou odráženy molekulami rozpouštědla dále a pohybují se rychleji. Pro DLS je nezbytná přesná teplota, neboť je požadována znalost viskozity (viskozita kapaliny souvisí s teplotou). Teplota musí být stálá, jinak by konvekční proudy ve vzorku způsobily nenáhodné pohyby, které ovlivní určení velikosti částic.

Rychlost Brownova pohybu je definována veličinou známou jako difúzní koeficient (D). Velikost částic je počítána z tohoto koeficientu pomocí Stokes-Einsteinovy rovnice:

$$d = \frac{k_B T}{3\pi\eta D}, \quad (1)$$

kde d je hydrodynamický průměr, D je difúzní koeficient, k_B je Boltzmannova konstanta, T je absolutní teplota a η je viskozita.

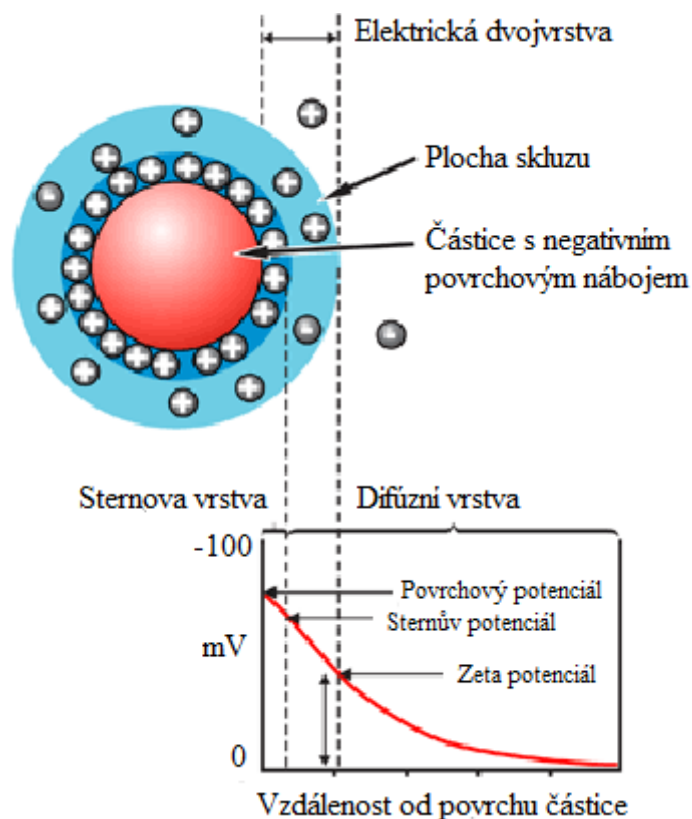
Průměr, který je měřen v DLS, je hodnota, která udává, jak částice difunduje v kapalině, proto je pojmenován jako hydrodynamický průměr. Průměr, který je pomocí této metody získán, je průměr koule, která má stejný difúzní koeficient jako částice. Difúzní koeficient závisí nejen na velikosti jádra částice, ale také na jakékoli struktuře povrchu, stejně jako na koncentraci a druhu iontů v prostředí [44].

4.5.6 Laserová Dopplerova velocimetrie

Metodou LDV, která se také jinak označuje jako laserová Dopplerova anemometrie, stanovujeme zeta potenciál. Měření zeta potenciálu je používáno ke stanovení stability náboje disperzního systému a k formulaci stability produktů. Většina částic rozptýlených ve vodných systémech získá povrchový náboj, hlavně buď ionizací povrchových skupin, nebo adsorpcí nabitých částic. Tyto povrchové náboje upravují rozložení okolních iontů, což vede k vytvoření vrstvy kolem částice, která se liší od „středu“ roztoku (část roztoku, která je uprostřed, částice se ovlivňují pouze samy navzájem). Pokud se částice pohybuje, například Brownovým pohybem, tato vrstva se pohybuje jako součást částice. Zeta potenciál je potenciál v bodě této vrstvy, která se nazývá plocha skluzu. Náboj v této ploše je velmi citlivý na koncentraci a druh iontů v roztoku.

Zeta potenciál je jednou z hlavních sil, která zprostředkovává interakce mezi částicemi. Částice s vysokým zeta potenciálem a stejným znaménkem náboje, ať už kladným nebo záporným, se navzájem odpuzují. Obvykle vysoká hodnota zeta potenciálu může být vysoká v kladném i záporném slova smyslu, například -30 mV i $+30$ mV může být považováno za

vysokou hodnotu zeta potenciálu. Pro částice a molekuly, které jsou dostatečně malé a mají nízké hustoty, aby zůstaly v suspenzi, bude vysoký zeta potenciál udělovat stabilitu. To znamená, že bude bránit roztoku nebo disperzi v agregaci.



Obr. 11 Schematické znázornění zeta potenciálu [44]

Zeta potenciál je měřen aplikací elektrického pole přes disperzi. Částice v disperzi se zeta potenciálem přejdou k elektrodě s opačným nábojem rychlostí úměrnou velikosti zeta potenciálu. Tato rychlost je měřena pomocí laserové Dopplerovy anemometrie. Posun frekvence nebo fázový posun dopadajícího laserového paprsku způsobeného těmito pohybujícími se částicemi se měří jako mobilita částic. Mobilita je převedena na zeta potenciál zadáním viskozity disperzního prostředí a použitím Smoluchovského nebo Hückelovy teorie [44].

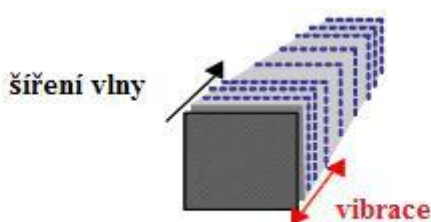
4.5.7 Vysoce rozlišovací ultrazvuková spektrometrie

Ultrazvuková spektrometrie pracuje se dvěma charakteristikami, a to rychlostí ultrazvuku a jeho amplitudou. Rychlost šíření ultrazvuku je určena dvěma vlastnostmi prostředí, jimiž se šíří. Tyto vlastnosti jsou hustota a elasticita, kde elasticita obvykle dominuje. Rychlost šíření ultrazvuku klesá v pořadí tuhé látky > kapaliny > plyny. Stručně řečeno, tužším prostředím se toto vlnění šíří rychleji. Elasticita je extrémně citlivá na lokální uspořádání molekul a intermolekulární interakce. Měření rychlosti proto zprostředkovává informace o těchto vlastnostech vzorku.

Amplituda ultrazvuku bývá po průchodu nějakým vzorkem zmenšena, proto se běžně mluví o měření zeslabení. Zeslabení je důsledkem ztráty energie ultrazvuku v prostředí. V heterogenních prostředích je hlavní příčinou rozptyl vlnění na částicích (heterogenitách).

Měření zeslabení je proto základem pro stanovení velikosti koloidních částic a její distribuce. V homogenních prostředích si lze příčinu zeslabení znázornit jako oscilační narušování rovnováhy chemické reakce $A + B \leftrightarrow AB$. V kompresní fázi průchodu vlnění jsou reaktanty jako by stlačeny ve směru vzniku produktů, v dekompresní fázi dochází k relaxaci do rovnováhy, při které dochází k absorpci energie vlnění. V těchto případech tak měření zeslabení umožňuje sledovat kinetiku rychlých chemických procesů [37].

Vysoce rozlišovací ultrazvukový spektrometr umožňuje měření ultrazvukové rychlosti a ultrazvukového zeslabení v analyzovaném vzorku, popisující šíření ultrazvukové vlny. Ultrazvuková vlna je vlna podélných deformací, kde se komprese a dekomprese vyskytují ve směru šíření vlny.



Obr. 12 Ultrazvuková vlna [45]

Ultrazvuková rychlost (u) je rychlost této vlny a je spojena s vlnovou délkou (λ), a frekvencí oscilace deformace (f):

$$u = \frac{\lambda}{f}. \quad (2)$$

Ultrazvukové zeslabení (α) popisuje rozklad amplitudy ultrazvukové vlny procházející přes vzdálenost x :

$$A = A_0 \cdot e^{-\alpha x}, \quad (3)$$

kde A_0 je amplituda ultrazvukové vlny vstupující do vzorku a A je amplituda vlny procházející vzorkem přes vzdálenost x .

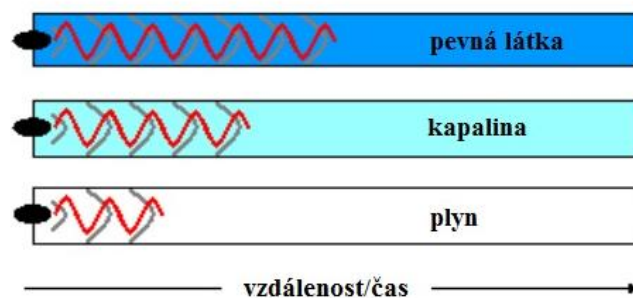
Ultrazvuková rychlost a zeslabení v kapalinách

V kapalinách je ultrazvuková rychlost (u) popsána hlavně stlačitelností:

$$u = \frac{1}{\sqrt{\beta_S \cdot \rho}}, \quad (4)$$

$$\beta_S = -\frac{1}{V} \left(\frac{\delta V}{\delta P} \right)_S, \quad (5)$$

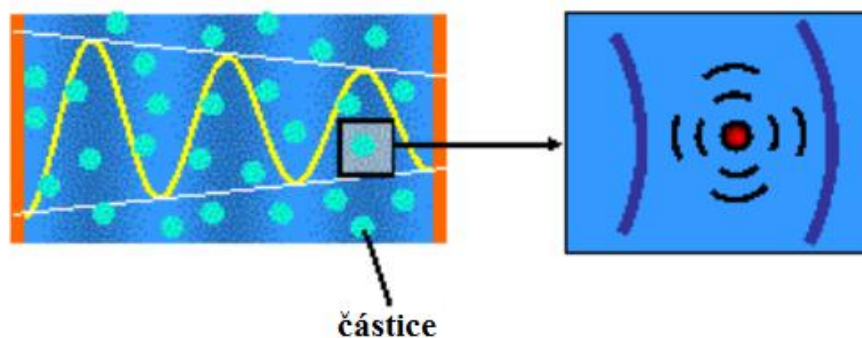
kde ρ je hustota kapaliny a β_S je adiabatická stlačitelnost, která představuje relativní změnu objemu V za jednotku aplikovaného tlaku P při konstantní entropii S .



Obr. 13 Průchod ultrazvukové vlny různými skupenstvími [45]

Při vysoké ultrazvukové rychlosti je malá stlačitelnost, což znamená, že v materiálu působí rigidní, silné intermolekulární síly. Zatímco při nízké rychlosti je stlačitelnost vysoká, a proto jsou intermolekulární síly slabé.

V kapalinách je ultrazvukové zeslabení (α) především určeno rozptylovými efekty a rychlou chemickou relaxací [45].



Obr. 14 Chemická relaxace částice v kapalině [45]

5 VÝSLEDKY A DISKUZE

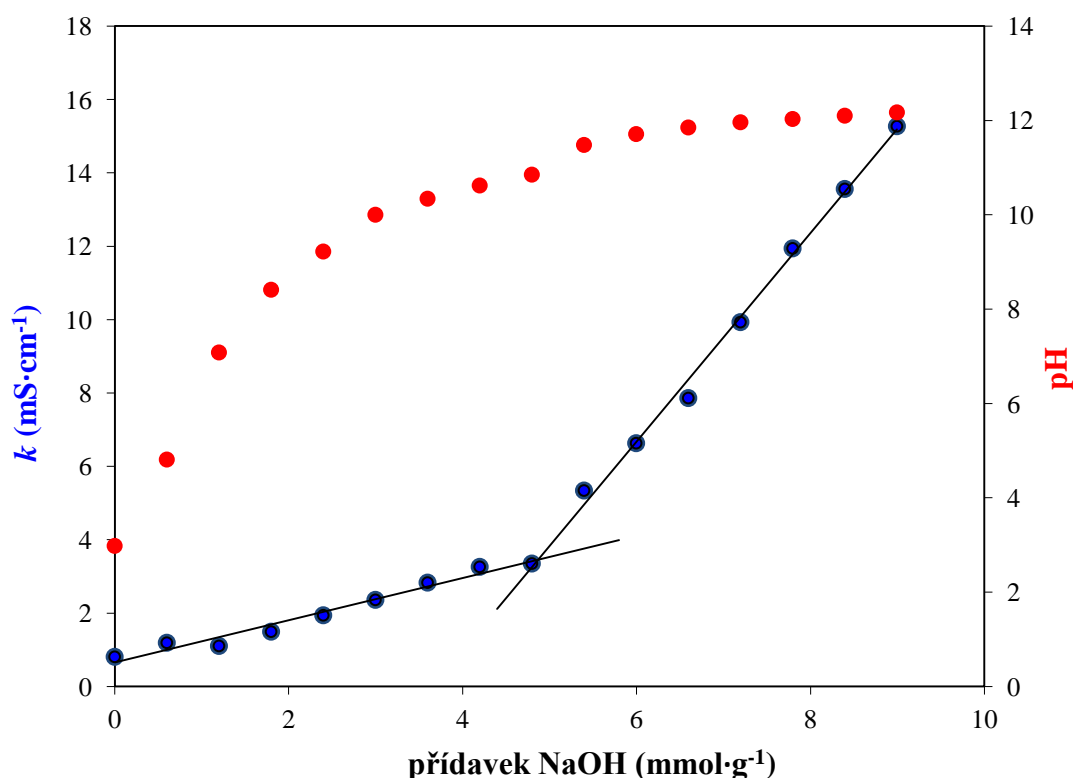
5.1 Charakterizace huminových kyselin

HK použité v rámci této diplomové práce byly charakterizovány pomocí elementární analýzy (viz Tab. 2). Obsah popela byl 1,98 % hm.

Tab. 2 Elementární složení HK (atomová % jsou vztažena na vzorek bez vlhkosti a popela)

atomová %				
C	H	O	N	S
43,9	40,2	15,0	0,7	0,2

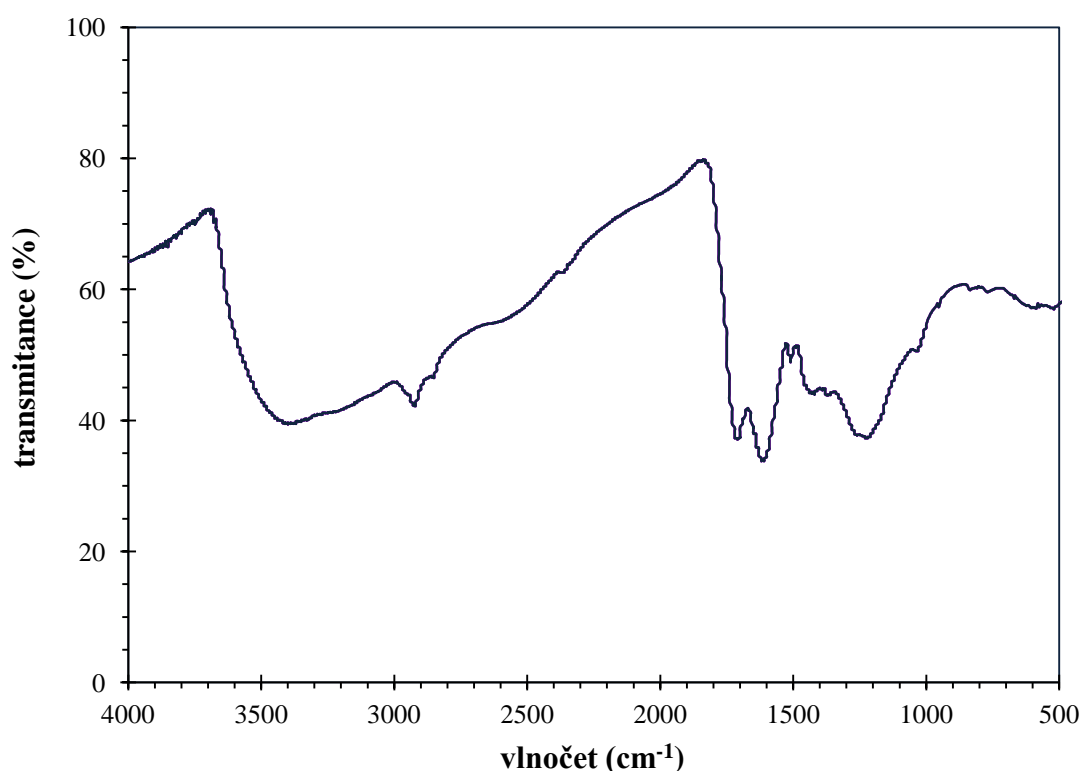
Celková kyselost, vyjádřená jako celkové látkové množství H^+ iontů v kyselých funkčních skupinách jednoho gramu vzorku, byla stanovena pomocí konduktometrické titrace suspenze HK ($1\text{ g} : 50\text{ dm}^3$) 1 M roztokem NaOH z průsečíku dvou lineárních větví závislosti měrné vodivosti na přídávku NaOH (viz Obr. 15). Obsah kyselých funkčních skupin vzorku HK činil $4,94\text{ mmol}\cdot\text{g}^{-1}$. HK izolované z lignitu včetně jejich agregačního chování a rozpustnosti ve vodě byly dále podrobně charakterizovány v několika pracích [46] [47].



Obr. 15 Závislost měrné vodivosti a pH na přídávku NaOH při titraci vodné suspenze HK

V rozmezí vlnočtů 3600 až 3000 cm^{-1} se nachází široký pás, který je charakteristický pro valenční vibrace $-OH$ skupin spojených vodíkovými můstky, oblast pásů 3000 až 2800 cm^{-1} náleží symetrickým a antisymetrickým valenčním vibracím skupin $-CH_2-$ a $-CH_3$. Intenzita těchto pásů je ale nízká, protože jsou částečně překryty pásem $-OH$ vibrací. Absorpční pásy

v oblasti 1800 až 1600 cm^{-1} přísluší valenčním vibracím karbonylové skupiny karboxylů a esterů a deformačním vibracím $-\text{NH}_2$ skupin ve struktuře aminokyselin. Valenční vibrace $-\text{NH}_2$ skupin v oblasti 3250 až 3450 cm^{-1} jsou překryty širokým pásem skupin hydroxylových. V oblasti pásů 1500 až 1350 cm^{-1} se projevují deformační vibrace $-\text{CH}_2$ skupin, deštníková vibrace koncových $-\text{CH}_3$ skupin, také kruhové a polokruhové módy aromatických struktur. Objevují se zde i spřažené valenční vibrace C–O vazeb s deformačními vibracemi O–H vazeb, které náleží karboxylům. Absorpce v rozmezí vlnočtu 350 až 1200 cm^{-1} vykazuje přítomnost ketonických a esterových struktur, jedná se o deformační vibrace C–CO–C a valenční vibrace COC vazeb. V oblasti 1260 cm^{-1} se nachází také pás odpovídající vibracím fenolových skupin. Pás vyskytující se kolem 1050 cm^{-1} je charakteristický pro C–O–C vazby v anhydridech a esterech. Získané spektrum odpovídá vzorkům HK izolovaným z podobných zdrojů [4].

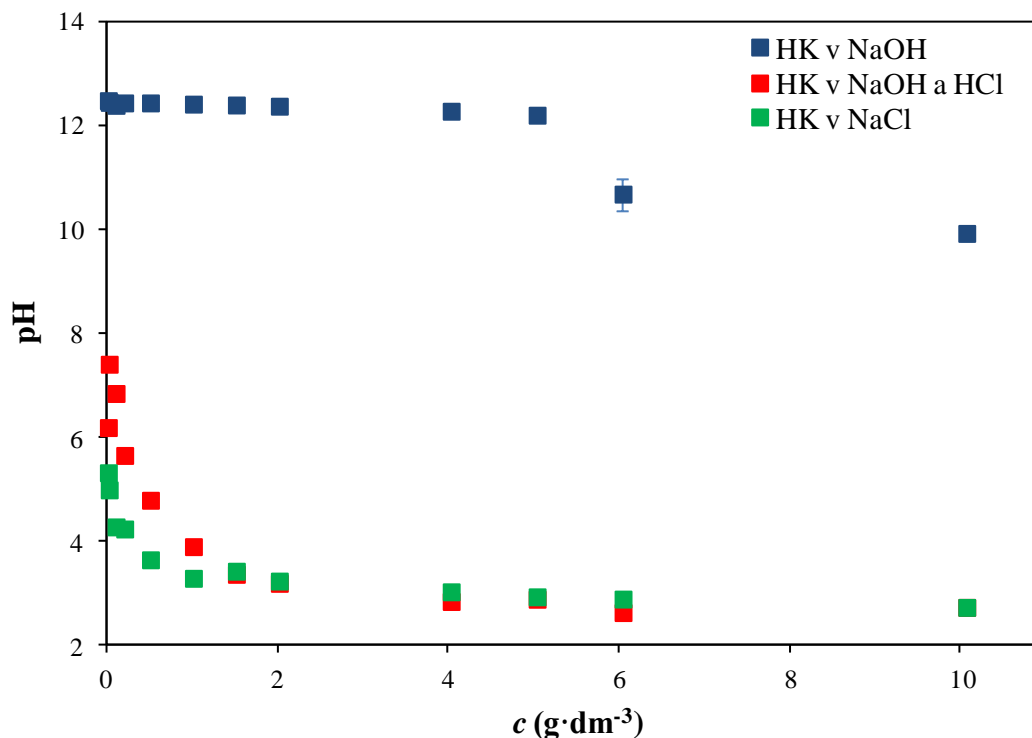


Obr. 16 FT-IR spektrum vzorku HK

5.2 Potenciometrické stanovení pH

U první koncentrační řady (HK v NaOH) bylo pH poměrně konstantní u zředěných roztoků, se zvyšující se koncentrací (od 6 $\text{g}\cdot\text{dm}^{-3}$) byl zaznamenán pokles. To je zřejmě důsledek toho, že silně alkalické prostředí podporuje disociaci HK, takže při vyšších koncentracích produkce H^+ iontů již dokáže ovlivnit celkové pH roztoku. U koncentračních řad HK v prostředí NaCl byla pozorována tendence pH přibližně exponenciálně klesat. Hodnoty pH u vzorků připravených neutralizací HK v NaOH pomocí HCl jsou nepatrně vyšší než u řady připravené přímým ředěním NaCl. Tento trend platí pouze pro nízké koncentrace, od určité koncentrace (1,5 $\text{g}\cdot\text{dm}^{-3}$) jsou hodnoty pH víceméně stejné pro obě řady při dané koncentraci. Rozdíly jsou

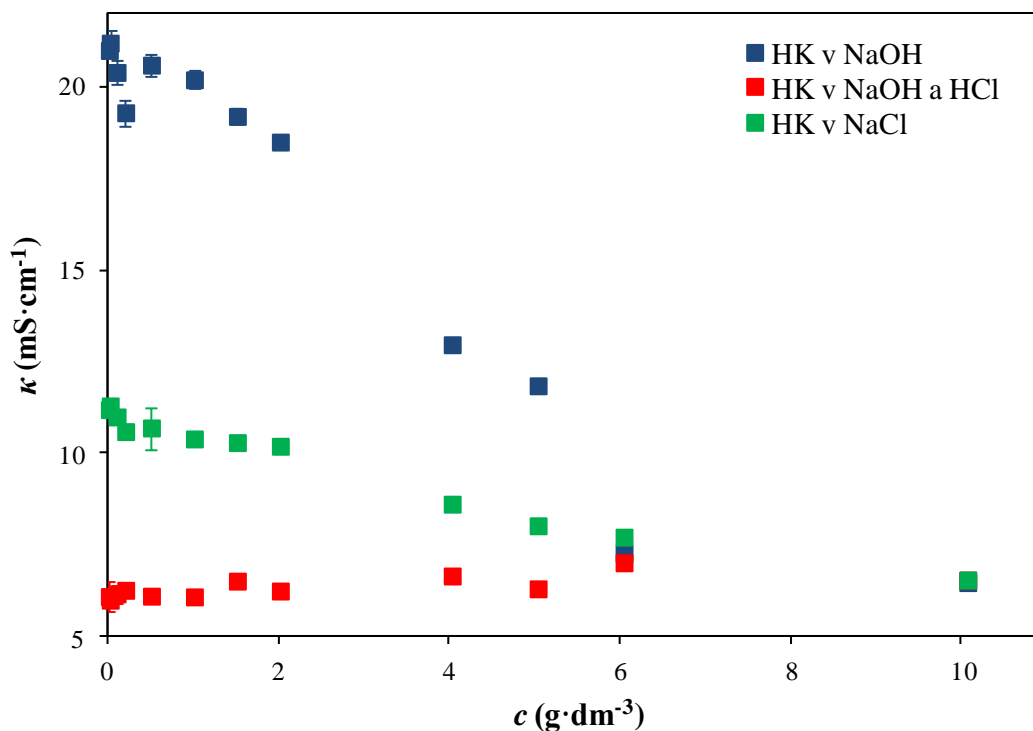
způsobeny odlišnou přípravou obou koncentračních řad. Nejvýše koncentrovaný roztok ($10 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$) je společný pro obě řady. Ve druhé řadě byl každý z roztoků o různých koncentracích připraven zvlášť neutralizací, před níž byly HK vždy v prostředí NaOH, což ovlivnilo jejich disociaci a strukturní uspořádání. U třetí řady ale byl výsledný neutrální roztok jen dále ředěn $0,1 \text{ M NaCl}$.



Obr. 17 Závislost pH na koncentraci HK pro všechny koncentrační řady

5.3 Přímá konduktometrie

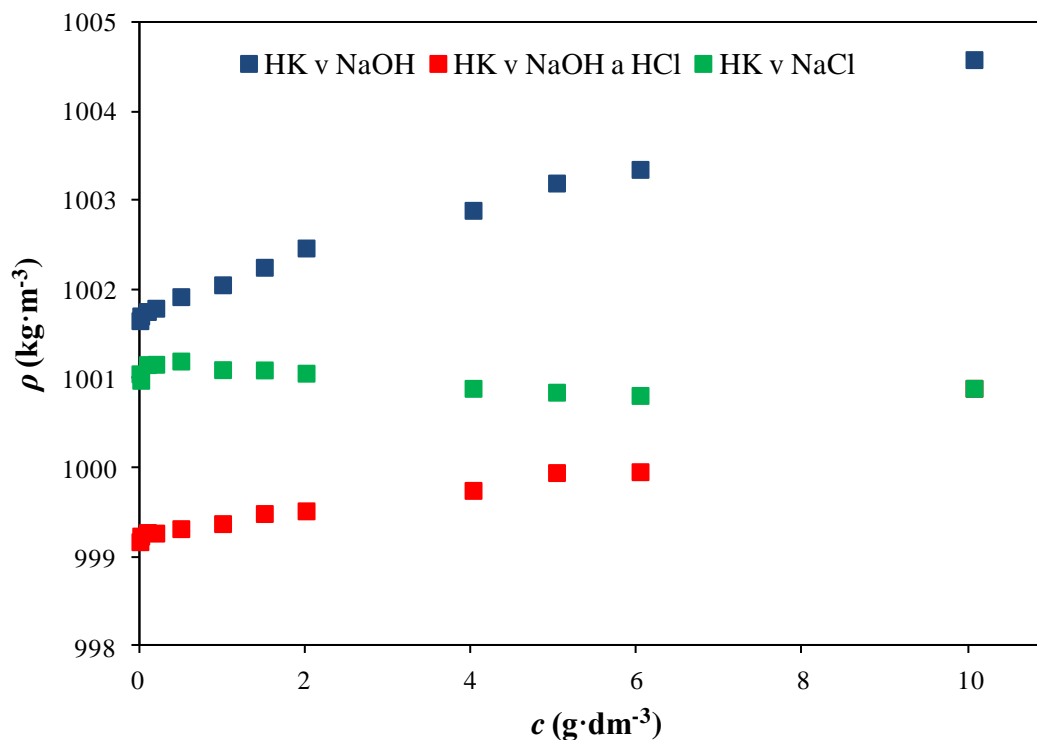
Nejvyšší hodnoty měrné vodivosti byly zaznamenány pro HK v NaOH. U této koncentrační řady vodivost klesala se zvyšující se koncentrací. U obou koncentračních řad HK v prostředí NaCl byly hodnoty naměřených vodivostí prakticky konstantní, přičemž nejnižší hodnoty měrné vodivosti byly zaznamenány u řady připravené neutralizací HK v NaOH pomocí HCl. Na rozdíl od měření pH, které nám dává informace pouze o obsahu H^+ (OH^-) iontů v roztoku, výsledky měření vodivosti v sobě zahrnují vliv všech přítomných iontů. Záleží pak na pohyblivosti jednotlivých typů iontů a jejich koncentračních poměrech. V silně zásaditých prostředích, jako je např. $0,1 \text{ M NaOH}$, převažuje vliv OH^- iontů. Jejich pohyblivost je v porovnání Na^+ a Cl^- nižší, což se projevilo právě vyšší konduktivitou roztoků této řady. Postupným zvyšováním koncentrace HK dochází k jejich částečné neutralizaci a vliv ostatních iontů se tím zvyšuje. Rozdíl mezi vodivostmi roztoků druhé a třetí řady je způsoben podobně jako u výsledků měření pH odlišnou přípravou, pouze se zde projevily i ostatní přítomné ionty, jak je uvedeno výše.



Obr. 18 Závislost měrné vodivosti na koncentraci HK pro všechny koncentrační řady

5.4 Měření hustoty

U koncentrační řady HK v NaOH hustoty stoupaly se zvyšující se koncentrací. Stejně tomu bylo u koncentrační řady HK v NaCl připravení z NaOH neutralizací pomocí HCl. Odlišná závislost byla pozorována u HK v NaCl, kdy hustota zpočátku rostla až do určité koncentrace ($0,5 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$) a poté byl zaznamenán pozvolný pokles. Jak již bylo zjištěno [38][48][49], molekulární organizace roztoků HK se prudce mění kolem $0,5\text{--}1 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$, což může být důvod tohoto zjištěného lokálního maxima. Opět se zde potvrdil silný vliv pH prostředí a způsobu přípravy roztoků. V silně alkalickém prostředí jsou řetězce HK více rozvinuty, což v kombinaci s vyšším obsahem negativně nabitých huminových částic rezultovalo v nejvyšší hodnoty hustot. U druhé koncentrační řady bylo uspořádání HK v roztoku vždy obdobné stejné koncentraci v první řadě, neboť šlo o roztoky v NaOH. Teprve neutralizací pomocí HCl došlo k prudké změně pH a tím i afinity huminových částic k okolnímu prostředí. Rostoucí trend hustoty s koncentrací zde zůstal tedy zachován. Při ředění pomocí NaCl byl způsob přípravy jiný a ke změnám pH docházelo pouze v souvislosti se změnou koncentrace HK. Změny hustoty jsou tedy mnohem menší v porovnání s ostatními dvěma řadami a odlišná příprava se navíc projevila již zmíněným lokálním maximem.



Obr. 19 Závislost hustoty na koncentraci HK pro všechny koncentrační řady

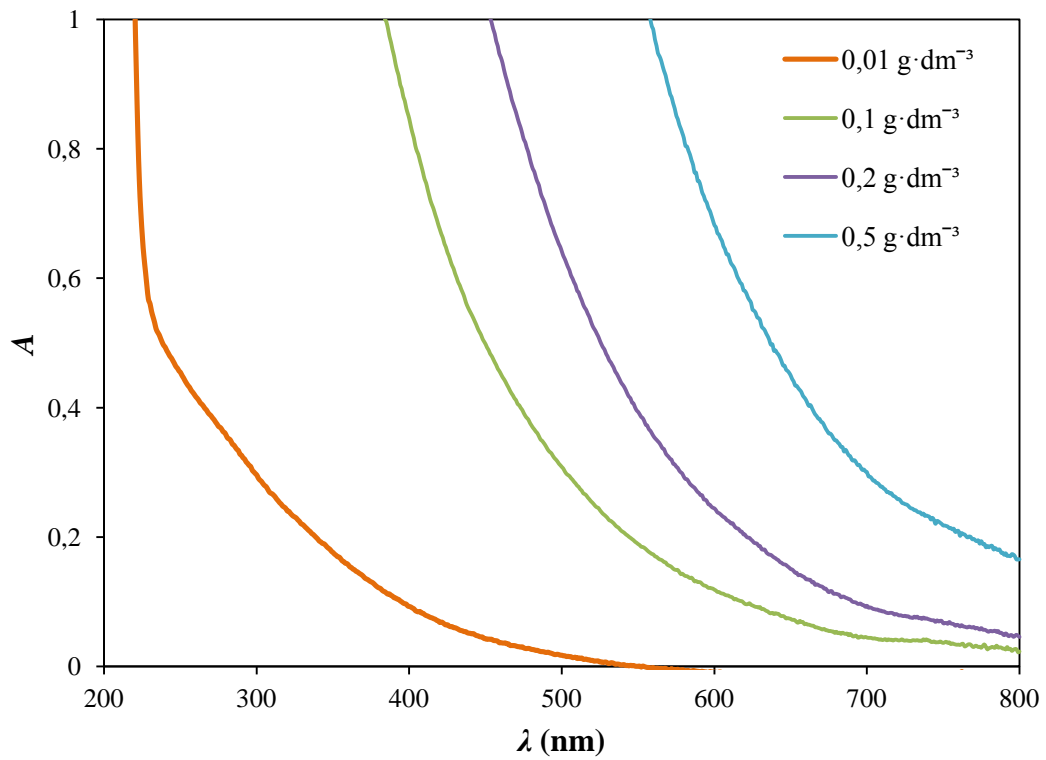
5.5 Ultrafialová a viditelná spektrometrie

Z grafů UV-VIS spekter vyplývá, že se zvyšující se koncentrací HK se jednotlivá spektra posouvají k vyšším absorbancím, a to u všech prostředí. U koncentrační řady HK v NaCl pro koncentrace 0,2 a 1,5 $\text{g}\cdot\text{dm}^{-3}$ byl pozorován vznik nového pásu ve spektrech (viz Obr. 23), což je zapotřebí dále prozkoumat.

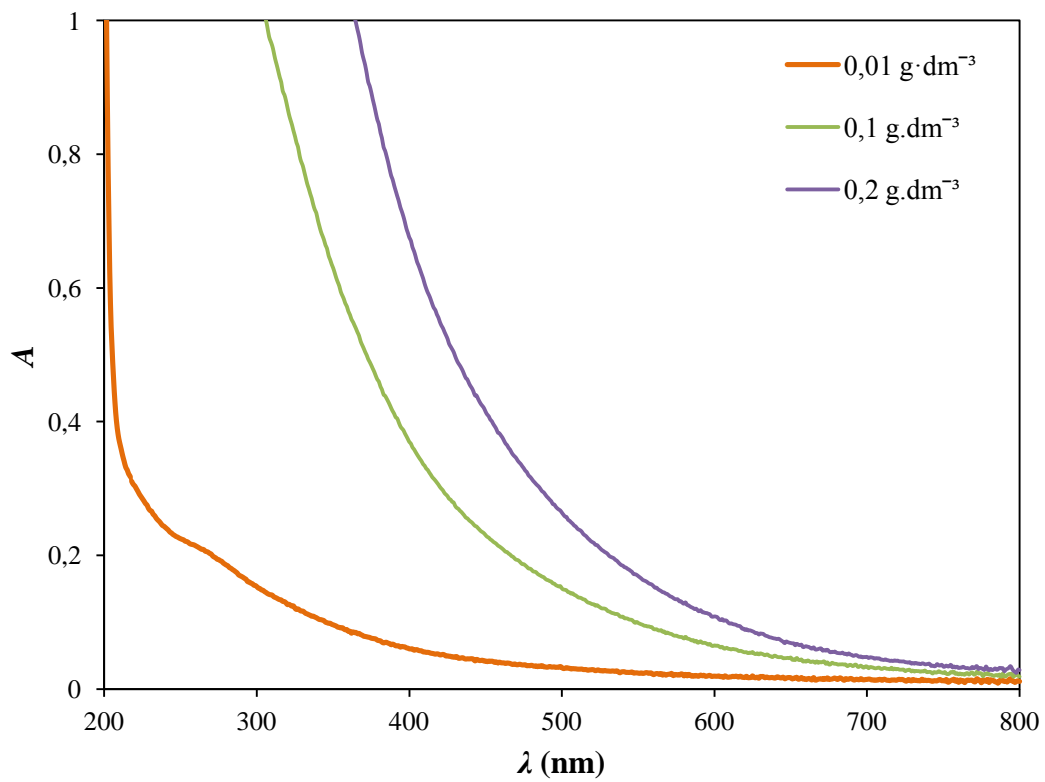
Absorpční poměr A_{280}/A_{465} je poměr absorbancí vzorku při 280 a 465 nm. Udává poměr mezi ligninovými strukturami odolnými vůči humifikaci a množstvím „mladých“ HK (v prvním stupni humifikace). Poměr A_{465}/A_{665} (označován jako E_4/E_6) je nejčastěji používán jako tzv. humifikační index. Obvykle je pro HK menší než 5,0 a snižuje se s rostoucí molekulovou hmotností a stupněm disperzity. Nízký poměr může znamenat relativně vysoký podíl aromatických částic a naopak vysoký poměr ukazuje na nízký obsah aromatických částic a relativně větší obsah alifatických struktur. HM s nejvyšším koeficientem E_4/E_6 má nejnižší odolnost, více humifikované a více kondenzované (aromatické) substance jsou tedy staršího původu [50].

Tab. 3 Absorpční poměry pro koncentrace 0,1–0,2 $\text{g}\cdot\text{dm}^{-3}$ pro všechna prostředí

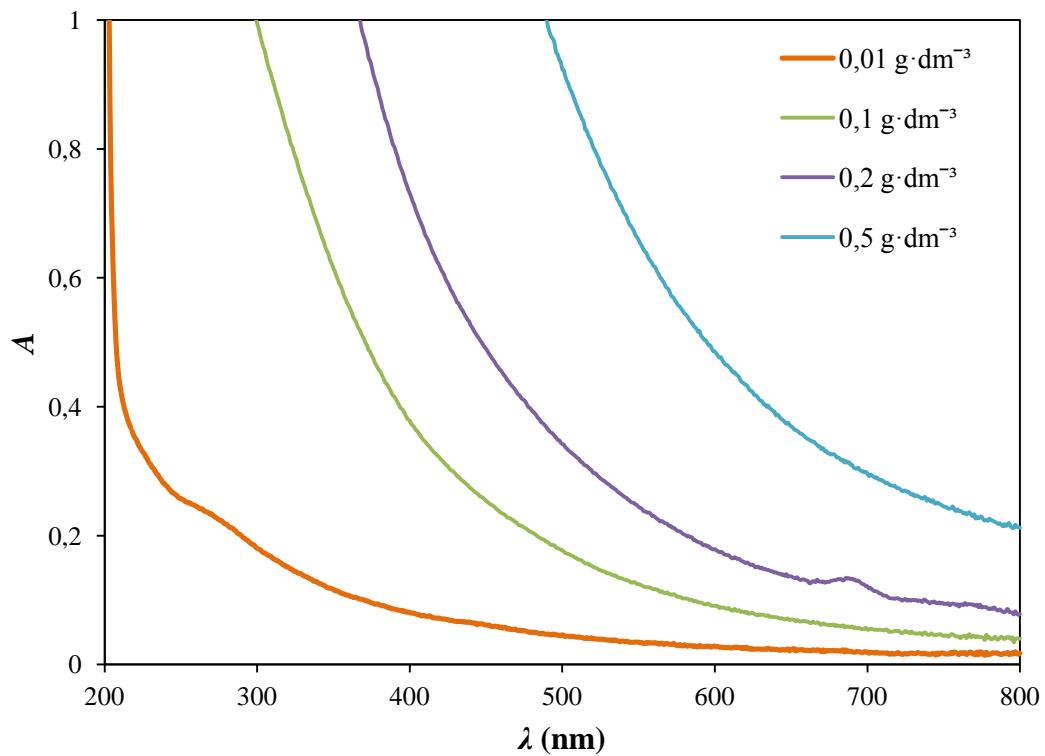
HK v NaOH		HK v NaOH a HCl		HK v NaCl	
0,1–0,2 $\text{g}\cdot\text{dm}^{-3}$		0,1–0,2 $\text{g}\cdot\text{dm}^{-3}$		0,1–0,2 $\text{g}\cdot\text{dm}^{-3}$	
A_{280}/A_{465}	A_{465}/A_{665}	A_{280}/A_{465}	A_{465}/A_{665}	A_{280}/A_{465}	A_{465}/A_{665}
5,06	6,87	5,06	6,87	5,24	3,44



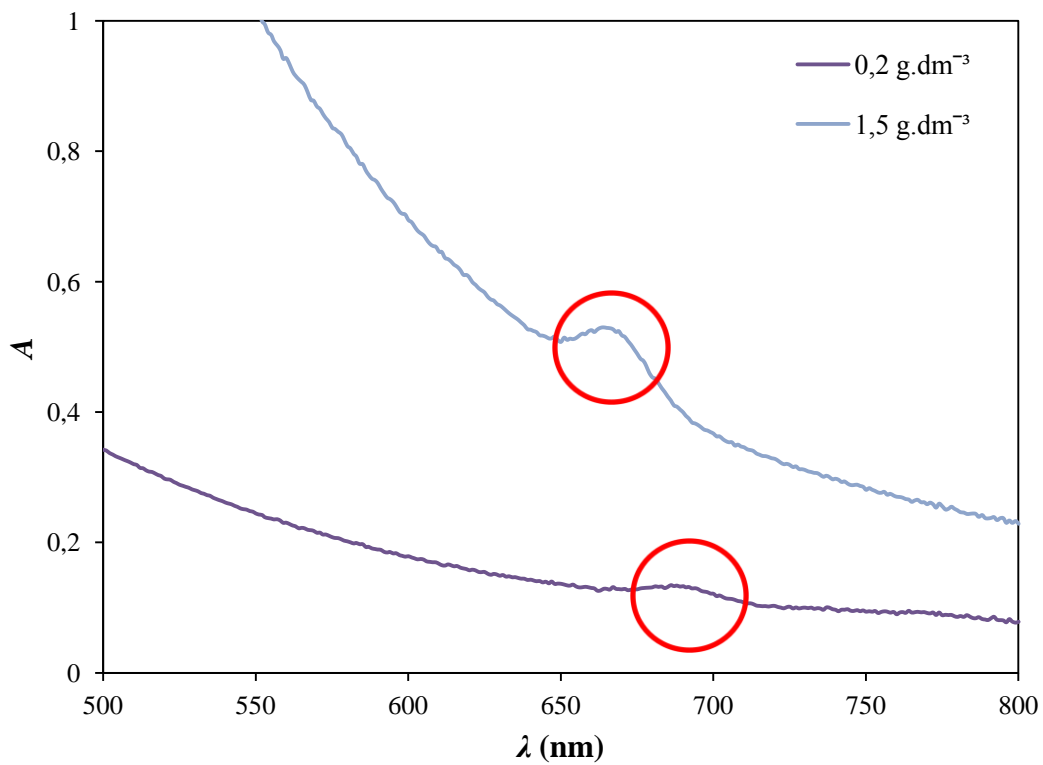
Obr. 20 UV-VIS spektra HK v NaOH pro vybrané koncentrace



Obr. 21 UV-VIS spektra HK v NaOH a HCl pro vybrané koncentrace



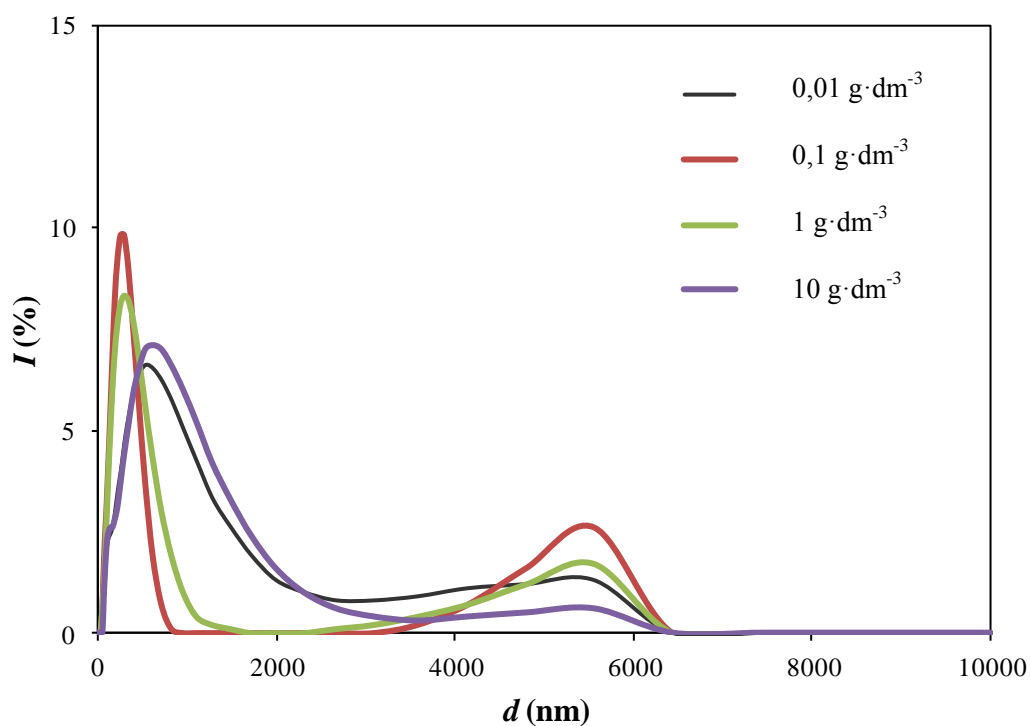
Obr. 22 UV-VIS spektra HK v NaCl pro vybrané koncentrace



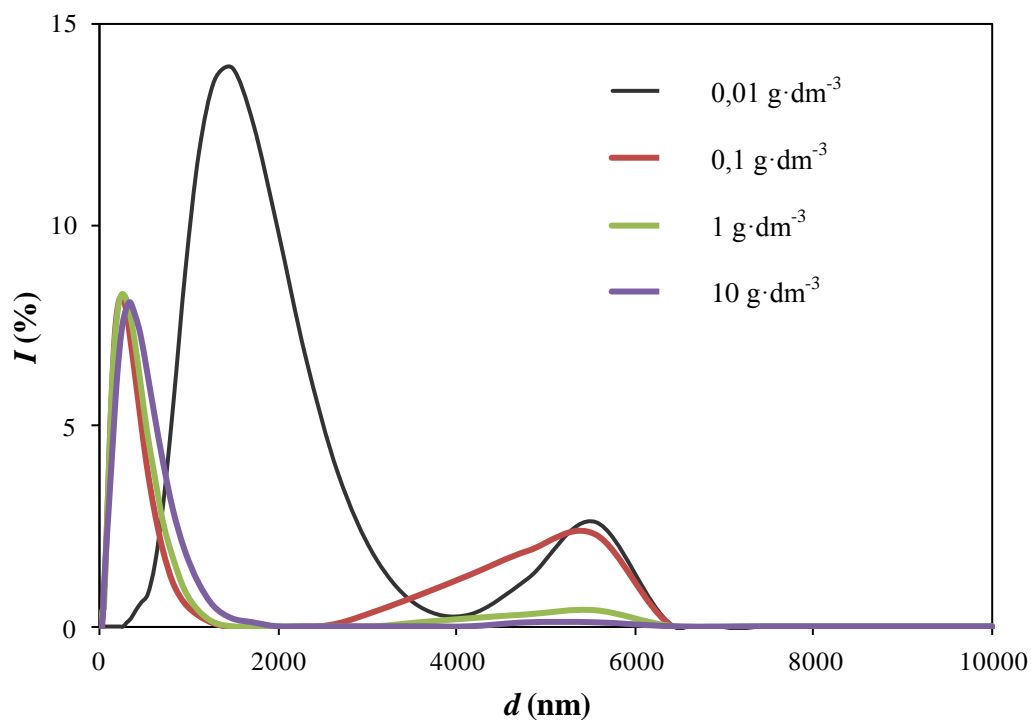
Obr. 23 Maxima v UV-VIS spektrech HK v NaCl pro koncentrace 0,2 g·dm⁻³ a 1,5 g·dm⁻³

5.6 Dynamický rozptyl světla

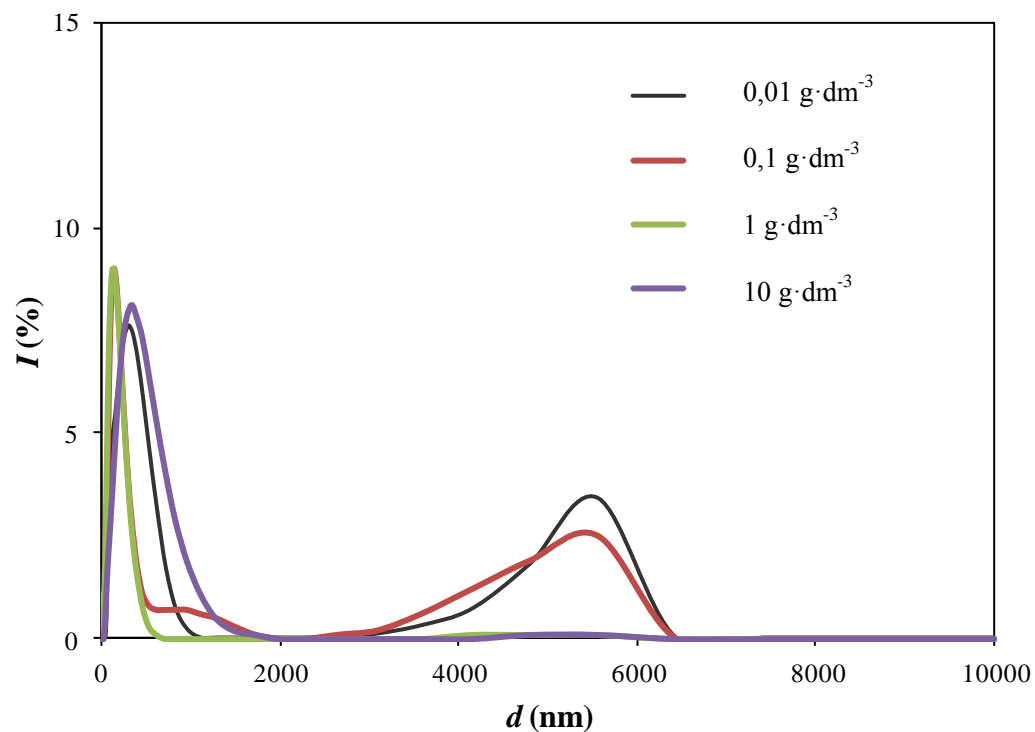
Na Obr. 24–26 jsou uvedeny příklady závislosti intenzity rozptýleného světla částicemi jednotlivých velikostí. Jako příklady byly vybrány z každé řady koncentrace měnící se o jeden řád. Z uvedených příkladů vyplývá, že v roztocích se vždy vyskytují dvě hlavní frakce velikosti částic a jejich zastoupení se mění s jejich koncentrací. V naměřených závislostech dochází k posunu maxim i zjištěné intenzitě. U všech koncentračních řad jsou nejvíce zastoupeny částice o průměru menším než 2000 nm (frakce 1). Výskyt větších částic s průměrem o velikosti 4000–6000 nm (frakce 2) byl mnohem menší a u některých koncentrací tyto částice nebyly vůbec zaznamenány, např. vyšší koncentrace HK v NaCl u třetí koncentrační řady (viz též Tab. 4). Při přípravě roztoků neutralizací HK v NaOH pomocí HCl byl u nejnižší koncentrace zaznamenán výrazný posun maxima téměř k průměru 2000 nm spojený s nárůstem intenzity. Zastoupení částic větších rozměrů (5560 nm) v tomto případě zůstalo prakticky stejné jako u o řád vyšší koncentrace.



Obr. 24 Závislost intenzity rozptýleného světla částicemi jednotlivých velikostí pro vybrané koncentrace HK v NaOH

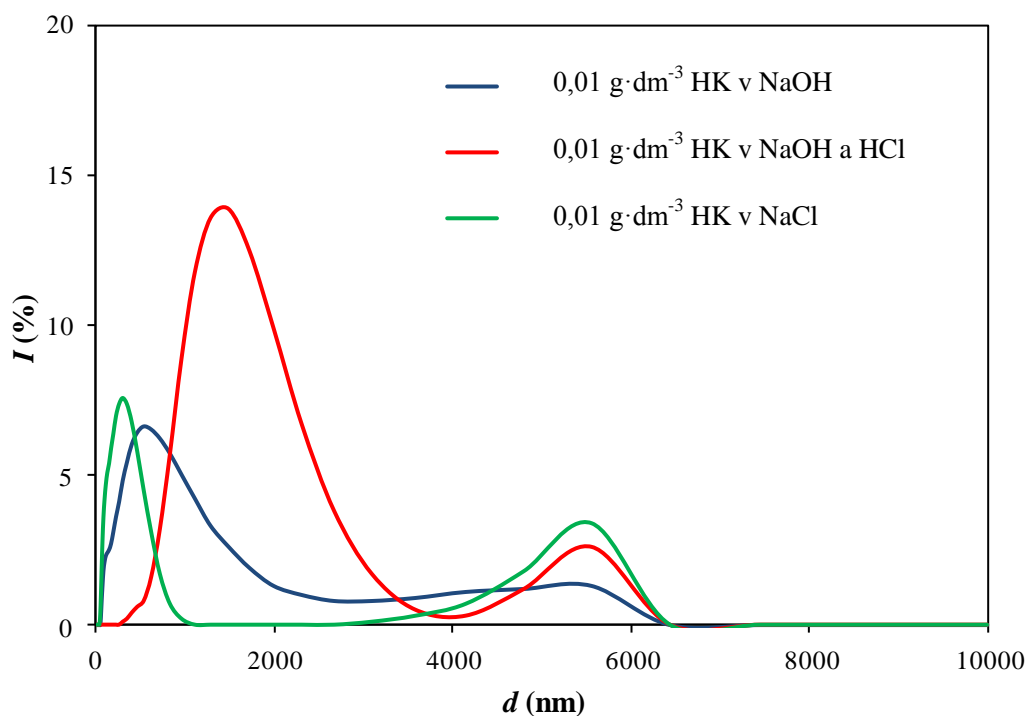


Obr. 25 Závislost intenzity rozptýleného světla částicemi jednotlivých velikostí pro vybrané koncentrace HK v NaOH a HCl

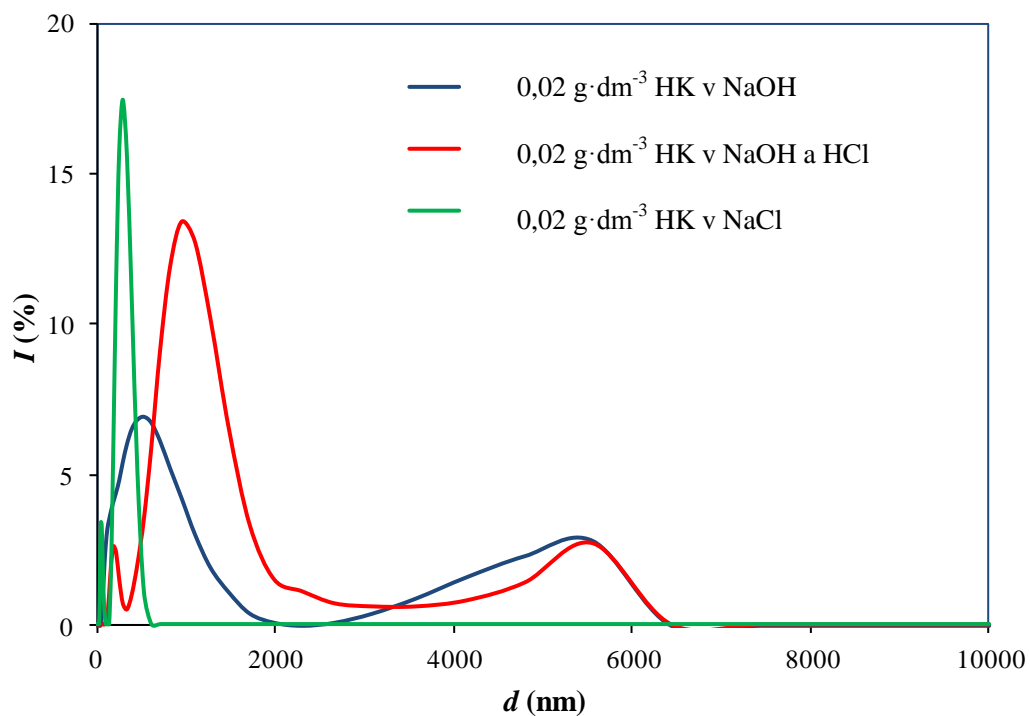


Obr. 26 Závislost intenzity rozptýleného světla částicemi jednotlivých velikostí pro vybrané koncentrace HK v NaCl

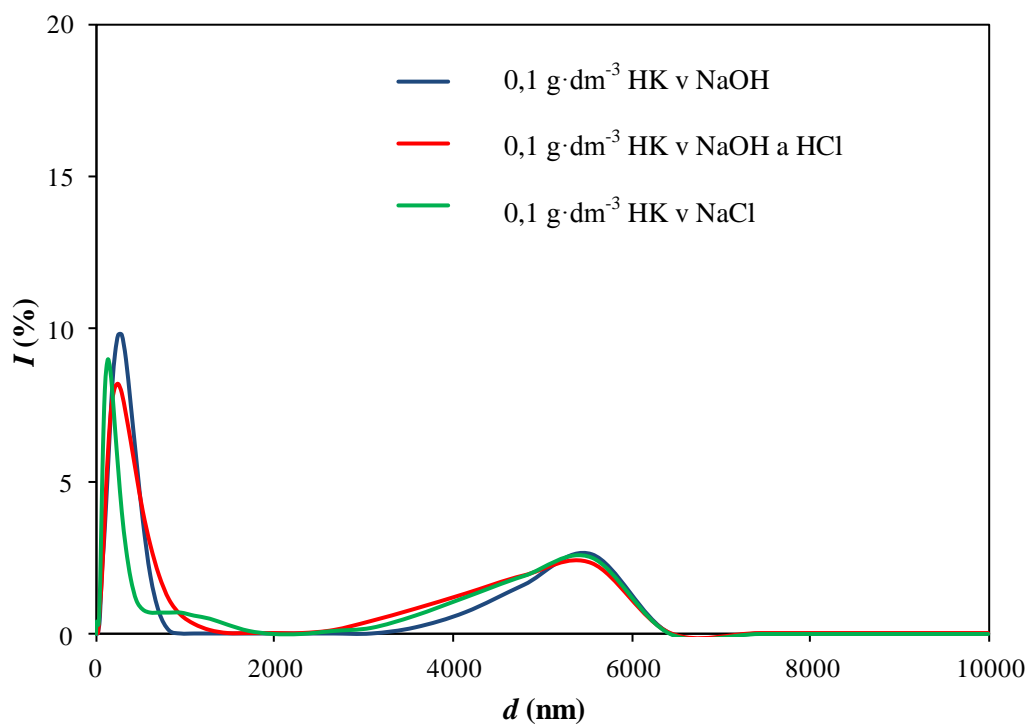
Grafické závislosti intenzity rozptýleného světla částicemi jednotlivých velikostí pro HK o stejné koncentraci v různých prostředích ukazují, že se vzrůstající koncentrací se zužuje a posouvá pás k nižším velikostem částic pro HK v NaCl připraveném neutralizací NaOH pomocí HCl (Obr. 27–29). Současně bylo zjištěno, že u koncentrace HK $0,02 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$ ve třetí řadě (NaCl připravený přímým ředěním) prudce stoupl zastoupení malých částic ($\sim 300 \text{ nm}$) a velké částice prakticky vymizely.



Obr. 27 Závislost intenzity rozptýleného světla částicemi jednotlivých velikostí pro HK o $c=0,01 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$ v různých prostředích



Obr. 28 Závislost intenzity rozptýleného světla částicemi jednotlivých velikostí pro HK o $c=0,02 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$ v různých prostředích

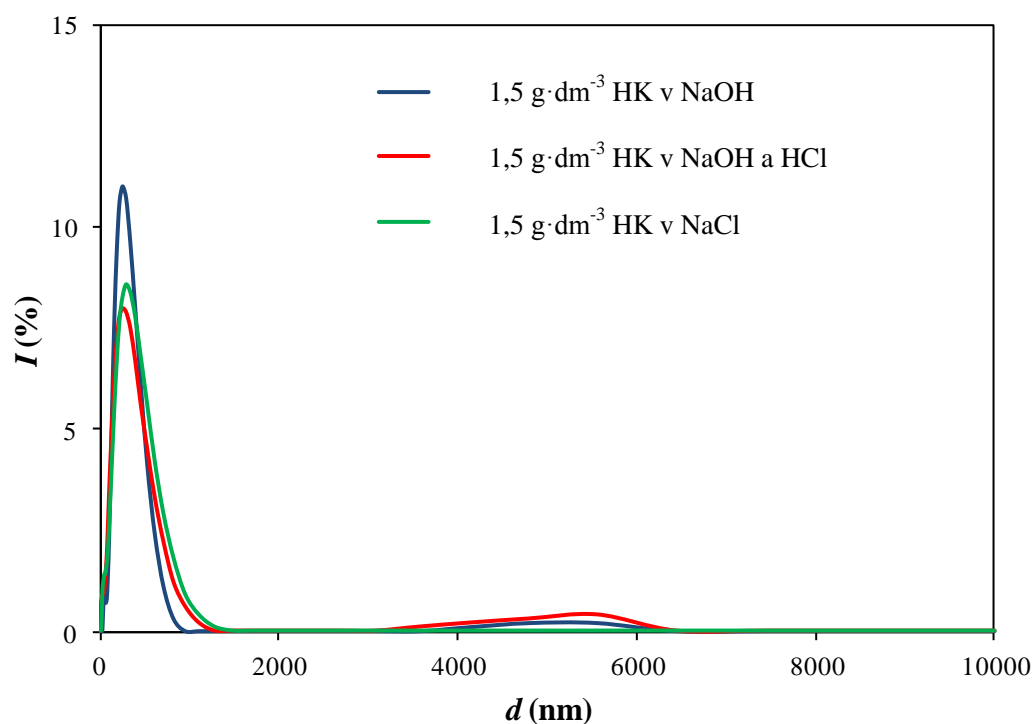


Obr. 29 Závislost intenzity rozptýleného světla částicemi jednotlivých velikostí pro HK o $c=0,1 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$ v různých prostředích

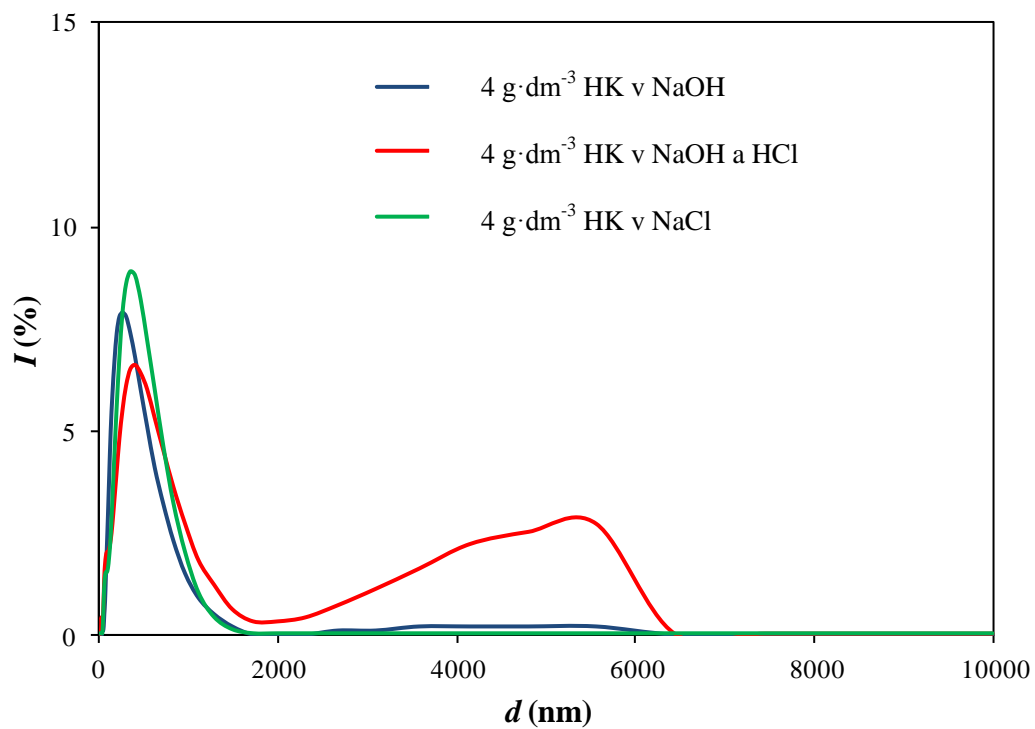
Tab. 4 Naměřená maxima velikosti částic frakce 2 pro všechna prostředí

c ($\text{g}\cdot\text{dm}^{-3}$)	HK v NaOH		HK v NaOH a HCl		HK v NaCl	
	d_2 (nm)	I (%)	d_2 (nm)	I (%)	d_2 (nm)	I (%)
0,01	5560	1,3	5560	2,6	5560	3,4
0,02	5560	2,8	5560	2,7	-	-
0,1	5560	2,6	5560	2,3	5560	2,5
0,2	5560	2	5560	1,6	5560	1,6
0,5	5560	1,7	5560	1,1	5560	0,1
1	5560	1,7	5560	0,4	5560	0,1
1,5	5560	0,2	5560	0,4	-	-
2	5560	0,9	5560	0,3	5560	0,3
4	4801	0,2	4801	2,7	-	-
5	5560	5,5	5560	0,1	5560	0,2
6	5560	0,8	5560	0,4	-	-
10	5560	0,6	5560	0,6	5560	0,1

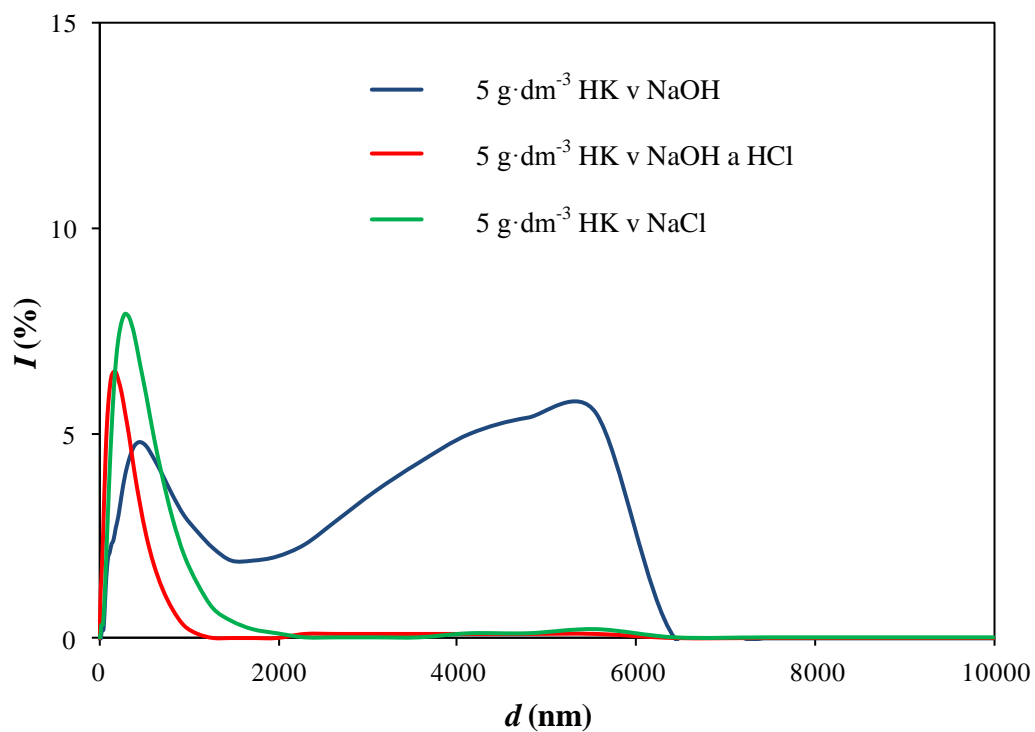
Další zvyšování koncentrace vedlo k postupnému snižování obsahu velkých částic až na minimum (viz Obr. 30). Pro prostředí NaCl připraveného neutralizací NaOH pomocí HCl bylo dosaženo vysokého podílu velkých částic u koncentrace $4 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$ (Obr. 31) stejně jako pro prostředí NaOH u koncentrace $5 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$ (Obr. 32).



Obr. 30 Závislost intenzity rozptýleného světla částicemi jednotlivých velikostí pro HK o $c = 1,5 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$

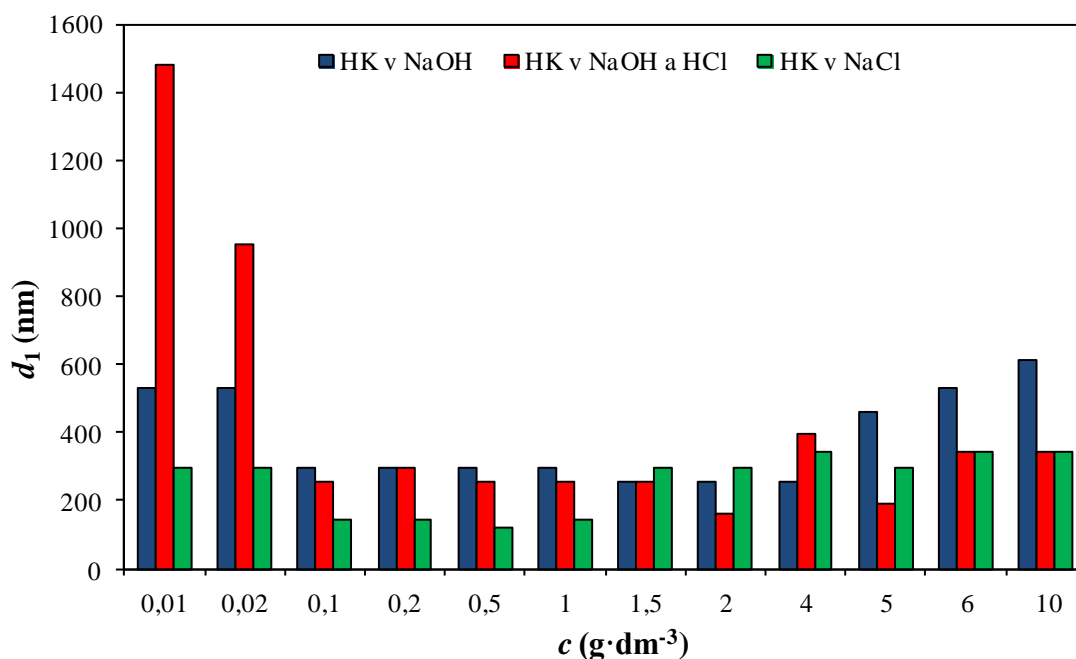


Obr. 31 Závislost intenzity rozptýleného světla částicemi jednotlivých velikostí pro HK o $c = 4 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$

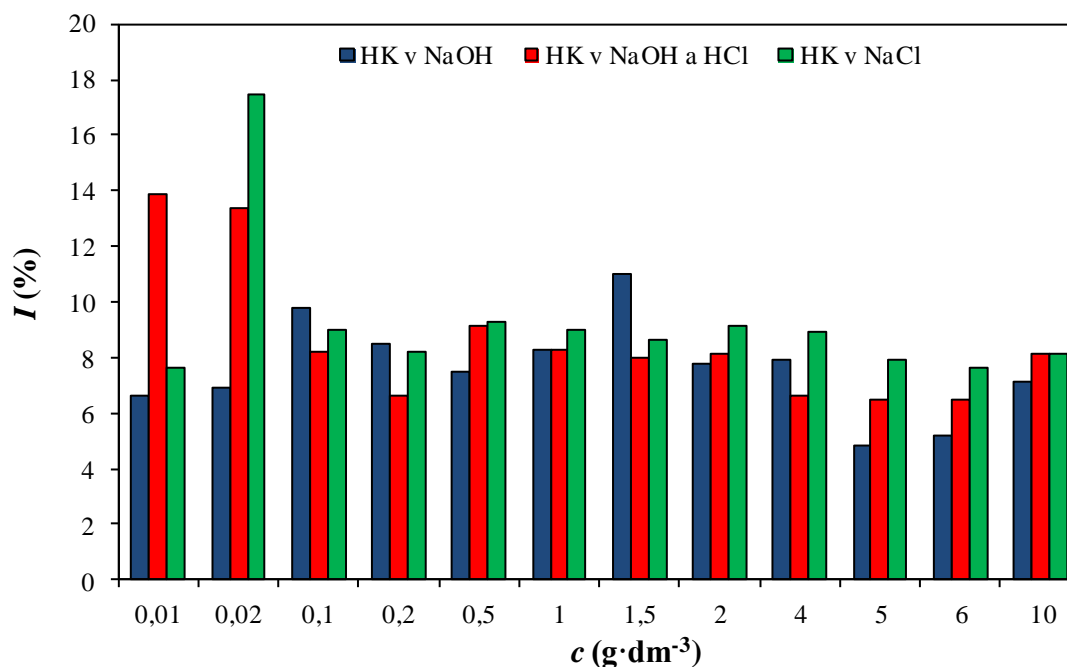


Obr. 32 Závislost intenzity rozptýleného světla částicemi jednotlivých velikostí pro HK o $c = 4 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$

Polohy prvního maxima (frakce 1 s menším průměrem částic) a intenzity rozptýleného světla částicemi jednotlivých velikostí jsou pro všechny roztoky uvedeny v následujících sloupcových grafech (Obr. 33 a Obr. 34).



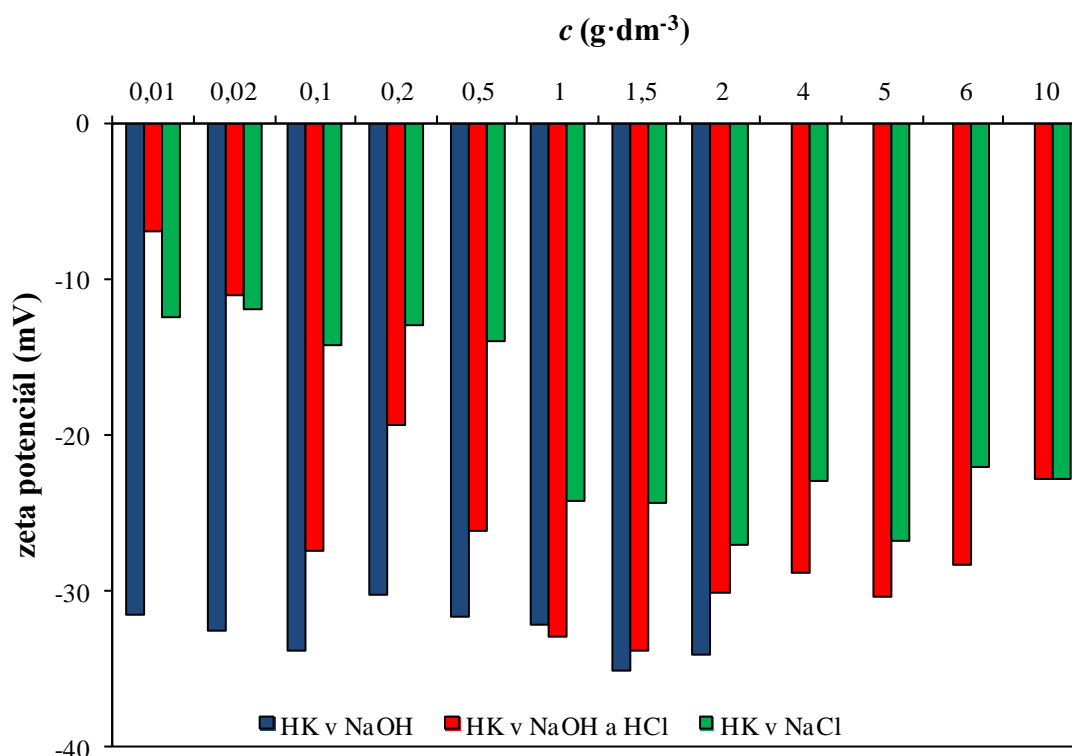
Obr. 33 Závislost průměru částic na koncentraci HK pro všechna prostředí



Obr. 34 Závislost intenzity rozptýleného světla částicemi na koncentraci HK pro všechna prostředí

5.7 Laserová Dopplerova velocimetrie

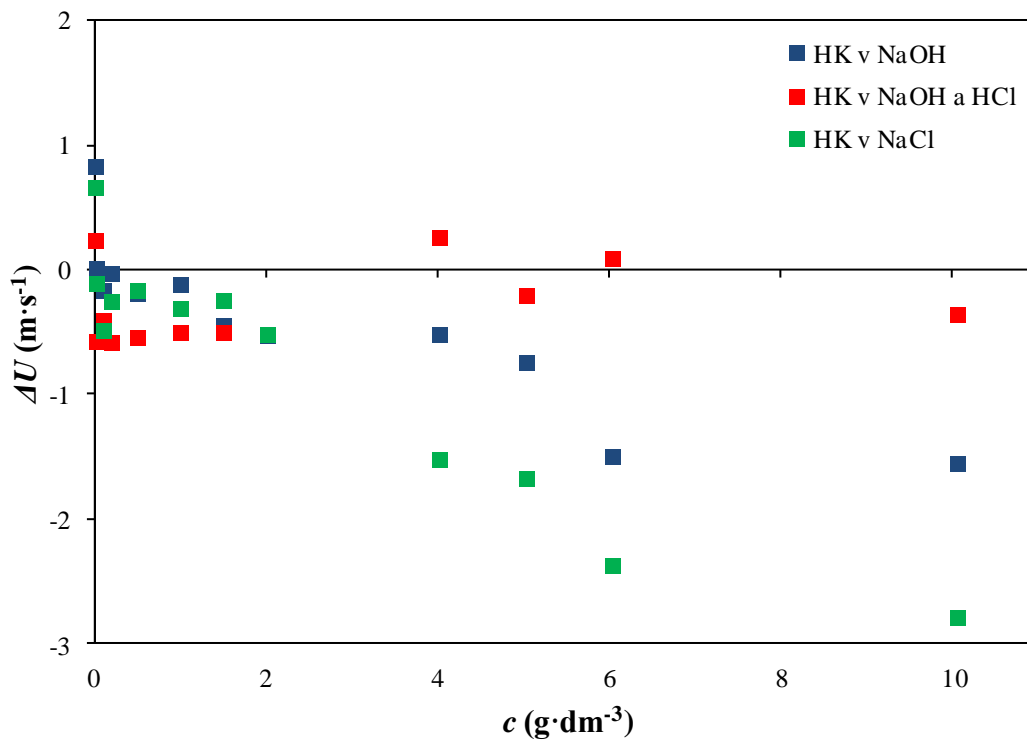
Zeta potenciál se zvyšující koncentrací se nemění u HK v prostředí NaOH. Hodnoty zeta potenciálu nebylo možné naměřit pro koncentrace $4 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$ až $10 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$, neboť barva roztoků byla tmavá natolik, že je nebylo možné prosvítit laserem. Koncentrační řada HK v NaCl připraveném neutralizací NaOH pomocí HCl má minimum při koncentraci HK mezi $1 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$ a $2 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$. U koncentrační řady HK v NaCl připraveném přímým ředěním NaCl byl zaznamenán prudký pokles zeta potenciálu pro koncentraci $1 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$ a dál se neměnil, což opět koresponduje se změnou molekulární organizace HK v roztoku při koncentracích kolem $1 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$ [38][48][49].



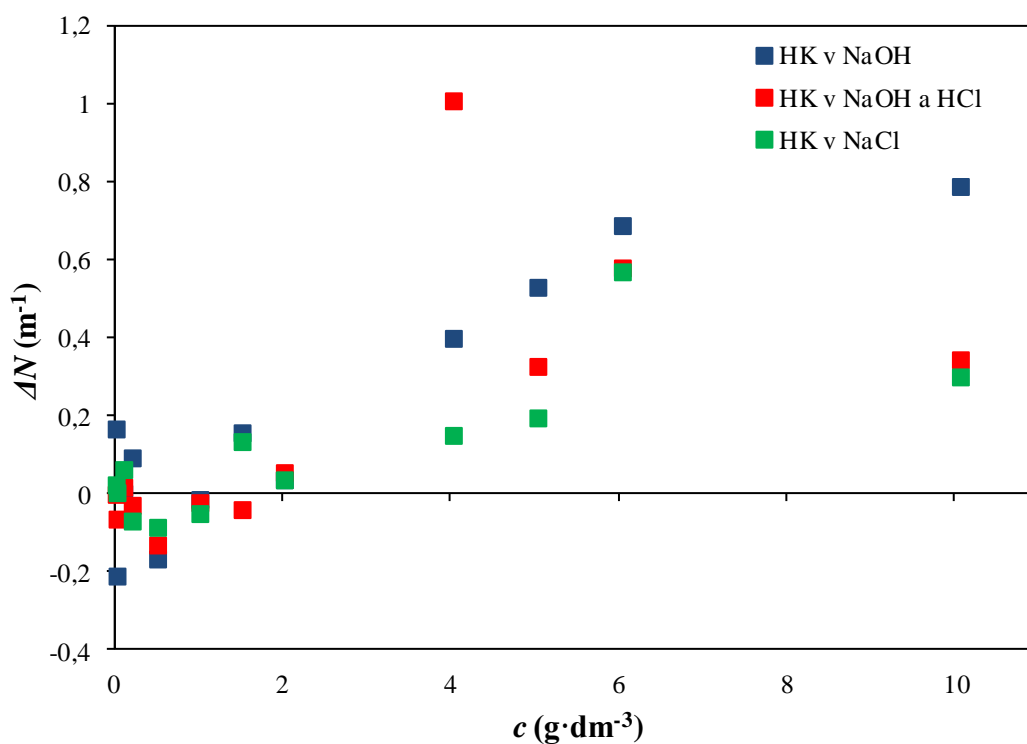
Obr. 35 Závislost zeta potenciálu na koncentraci HK pro všechna prostředí

5.8 Vysoce rozlišovací ultrazvuková spektrometrie

Ultrazvuková rychlost i zeslabení byly měřeny při frekvenci 12 150 kHz. Se vzrůstající koncentrací HK klesala ultrazvuková rychlost pro prostředí NaOH a NaCl připravené přímým ředěním NaCl. Ultrazvuková rychlost u koncentrační řady HK v NaCl připraveném neutralizací NaOH pomocí HCl byla až do koncentrace $2 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$ poměrně konstantní. U koncentrace $4 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$ bylo dosaženo maxima a poté byl zaznamenán pokles (viz Obr. 36).



Obr. 36 Závislost šíření rychlosti ultrazvuku na koncentraci HK pro všechna prostředí



Obr. 37 Závislost ultrazvukového zeslabení na koncentraci HK pro všechna prostředí

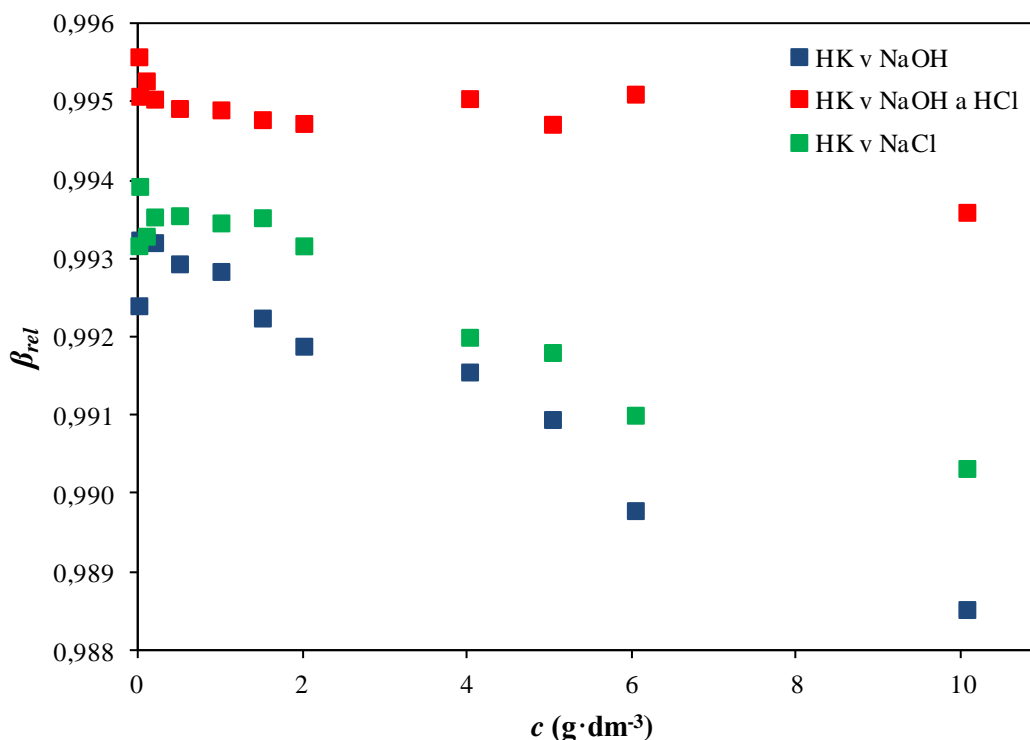
Opět bylo potvrzeno, že trend v závislostech je stejný u prvních dvou řad, kdy se vycházelo z roztoků NaOH (viz kap. 5.2) Ultrazvukové zeslabení se vzrůstající koncentrací rostlo pro všechna prostředí (viz Obr. 37).

Z ultrazvukové rychlosti byla vypočítána stlačitelnost pomocí rovnice (4). Stlačitelnost byla přepočítána na relativní stlačitelnost vzhledem ke stlačitelnosti vody pomocí vztahu:

$$\beta_{rel} = \frac{\beta_S}{\beta_0}, \quad (6)$$

kde β_{rel} je relativní stlačitelnost, β_S je adiabatická stlačitelnost a β_0 je stlačitelnost vody ($4,47736 \cdot 10^{-10} \text{ Pa}^{-1}$).

Relativní stlačitelnost klesala se zvyšující se koncentrací pro HK v NaOH. U HK v NaCl připraveném přímým ředěním pomocí NaCl byla relativní stlačitelnost zpočátku poměrně konstantní a od koncentrace $1,5 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ začala postupně klesat. U koncentrační řady HK v NaCl připraveném neutralizací NaOH pomocí HCl byla relativní stlačitelnost přibližně konstantní. Pokles relativní stlačitelnosti se zvyšující se koncentrací je dán uvolňováním molekul vody z hydratačního obalu aktivního místa HK do objemu rozpouštědla a vznikem flexibilnějšího útvaru. Voda v hydratačním obalu je totiž méně stlačitelná než voda objemová. Jakmile dojde k uvolnění veškeré vody z hydratačního obalu, relativní stlačitelnost zůstává konstantní [37].



Obr. 38 Závislost relativní stlačitelnosti na koncentraci HK pro všechna prostředí

6 ZÁVĚR

Předložená diplomová práce se zabývá studiem změn konformace a molekulární organizace HK ve vodných roztocích v závislosti na jejich koncentraci a způsobu a podmínkách přípravy. Byly připraveny koncentrační řady HK ve třech různých prostředích, a to v NaOH a NaCl (připraveném buď neutralizací NaOH pomocí HCl, nebo přímým ředěním NaCl). Pro zkoumání chování HK ve vodných roztocích byly vybrány následující analytické metody: potenciometrické stanovení pH, přímá konduktometrie, ultrafialová a viditelná spektrometrie, měření hustoty, dynamický rozptyl světla, laserová Dopplerova velocimetrie a vysoce rozlišovací ultrazvuková spektrometrie.

Výsledky z potenciometrického stanovení pH nám ukazují, že hodnoty pH pro HK v NaOH jsou poměrně konstantní se zvyšující se koncentrací. Závislost pH na koncentraci HK pro prostředí NaCl (u obou způsobů přípravy) vykazuje přibližně exponenciální pokles hodnot pH.

Vodivost je citlivá na obsah a vzájemné zastoupení všech iontů v roztoku. Vodivost je nejvíce ovlivněna H^+ a OH^- ionty, které mají oproti ostatním mnohem větší pohyblivost. Grafické závislosti měrné vodivosti na koncentraci HK poukazují na to, že se zvyšující koncentrací měrná vodivost klesala pro HK v prostředí NaOH. V silně alkalických prostředích, jako je např. 0,1 M NaOH, převažuje vliv OH^- iontů. Jejich pohyblivost je v porovnání Na^+ a Cl^- nižší, což způsobilo vyšší konduktivitu roztoků této řady. Rovnoměrným zvyšováním koncentrace HK dochází k jejich částečné neutralizaci a vliv ostatních iontů se tím zvyšuje. U obou prostředí NaCl byly naměřeny poměrně konstantní hodnoty měrné vodivosti pro všechny koncentrace. Rozdíl mezi vodivostmi těchto dvou řad je způsoben odlišnou přípravou, pouze se zde projevil vliv i ostatních přítomných iontů. Nejnižší hodnoty byly zaznamenány pro prostředí NaCl, připraveném neutralizací NaOH pomocí HCl. U neutralizační přípravy NaCl je vodivost podstatně menší než u ostatních dvou prostředí, neboť produktem reakce je voda, která má zanedbatelnou vodivost. U ostatních koncentračních řad je zastoupení iontů v roztoku vyšší, a tudíž i měrná vodivost.

V silně zásaditém prostředí NaOH jsou řetězce HK více rozvinuty, což společně s vyšším obsahem negativně nabitých huminových částic vedlo k nejvyšším hodnotám hustot. U druhé koncentrační řady bylo uspořádání HK v roztoku vždy obdobné stejné koncentraci v první řadě, neboť šlo o roztoky v NaOH. Až neutralizací pomocí roztoku HCl došlo k výrazné změně pH a tím i afinity huminových částic k okolnímu prostředí. Rostoucí trend hustoty s koncentrací zde zůstal tedy zachován. Při ředění pomocí roztoku NaCl byl způsob přípravy jiný a ke změnám pH docházelo pouze v souvislosti se změnou koncentrace HK. Změny hustoty jsou tedy mnohem menší v porovnání s ostatními dvěma řadami a odlišná příprava se kromě toho projevila výše zmíněným lokálním maximem.

Naměřená UV-VIS spektra ukázala, že se zvyšující se koncentrací HK se jednotlivá spektra posouvají k vyšším absorbancím. U koncentrační řady HK v NaCl (připraveném přímým ředěním NaCl) byl pozorován vznik maxim ve spektrech pro koncentrace $0,2 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$ a $1,5 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$. Hodnoty humifikačního indexu E_4/E_6 byly u prvních dvou řad velmi podobné, zatímco u NaCl jeho hodnota klesla téměř o 50 %.

Výsledky získané metodou DLS potvrdily, že velikost částic a jejich distribuce silně závisí jak na způsobu přípravy, tak na koncentraci HK, a plně korespondují s předpokladem změn v konformaci a molekulární organizaci kolem koncentrace $1 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$ [38][48][49].

Hodnoty zeta potenciálu se pohybovaly kolem -30 mV pro HK v NaOH, což vypovídá o stabilitě systému. Pro tyto koncentrační řady nebyly naměřeny hodnoty zeta potenciálu od koncentrace $4 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$ kvůli zabarvení roztoků. Roztoky byly natolik tmavé, že nebylo možné prosvítit laserem. Koncentrační řada HK v NaCl připraveném neutralizací NaOH pomocí HCl má minimum při koncentraci HK mezi $1 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$ a $2 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$ (pod -30 mV), kdy byl systém nejstabilnější. U koncentrační řady HK v NaCl připraveném přímým ředěním NaCl byl zaznamenán prudký pokles zeta potenciálu pro koncentraci $1 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$ a dál se neměnil. U této koncentrační řady byly hodnoty zeta potenciálu nad -30 mV , což vypovídá o nestabilitě systému, v roztocích se tvořily agregáty.

Se vzrůstající koncentrací HK klesala ultrazvuková rychlost pro prostředí NaOH a NaCl připraveném přímým ředěním NaCl, což je důkazem tvorby agregátů v roztoku. Ultrazvuková rychlost u koncentrační řady HK v NaCl připraveném neutralizací NaOH pomocí HCl byla až do koncentrace $2 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$ poměrně konstantní. U koncentrace $4 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$ bylo dosaženo maxima a poté byl zaznamenán pokles. Ultrazvukové zeslabení se vzrůstající koncentrací rostlo pro všechna prostředí. Relativní stlačitelnost klesala se zvyšující se koncentrací pro HK v NaOH. U HK v NaCl připraveném přímým ředěním NaCl byla relativní stlačitelnost zpočátku poměrně konstantní a od koncentrace $1,5 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$ začala postupně klesat. U těchto dvou prostředí klesající tendence relativní stlačitelnosti je výsledkem tvorby agregátů roztoku. U koncentrační řady HK v NaCl připraveném neutralizací NaOH pomocí HCl byla relativní stlačitelnost konstantní, což poukazuje na nepřítomnost agregátů v roztoku. Pokles relativní stlačitelnosti se zvyšující se koncentrací je dán uvolňováním molekul vody z hydratačního obalu aktivního místa HK do objemu rozpouštědla a vznikem flexibilnějšího útvaru. Voda v hydratačním obalu je totiž méně stlačitelná než voda objemová. Jakmile dojde k uvolnění veškeré vody z hydratačního obalu, relativní stlačitelnost zůstává konstantní [37].

Všechny metody ukazují na to, že prostředí NaOH má u prvních dvou řad (jak HK v NaOH, tak HK v NaCl připraveném neutralizací NaOH pomocí HCl) podobné trendy. Roztoky HK připravené ředěním pomocí NaCl se chovají odlišně, což je způsobeno rozdílným postupem přípravy. Při určité koncentraci HK v různých prostředích dochází ke změnám ve strukturním uspořádání huminových částic v roztoku.

7 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- [1] PITTER, P. *Hydrochemie*. Praha: VŠCHT, 1999, s. 327–333. ISBN 80-7080-340-1.
- [2] ŽÁČEK, L. *Hydrochemie*. Brno: VUTIUM, 1998, s. 51. ISBN 80-214.1167-8.
- [3] HUMINTECH. *Server o humusu*. [online]. [cit. 2011-10-10]. Dostupné z: <<http://www.humintech.com>>.
- [4] STEVENSON, F. J. *Humus chemistry. Genesis, Composition, Reactions*. New York: J. Willey, 1982, s. 26–221.
- [5] SOIL HUMIC SUBSTANCES. *The formation of humic substances*. [online]. [cit. 2012-04-16]. Dostupné z: <<http://karnet.up.wroc.pl/~weber/powstaw2.htm>>.
- [6] HUBÁČEK, J. et al. *Chemie uhlí*, Praha: SNTL, 1962.
- [7] PEÑA-MENDÉZ, E. M.; HAVEL, J. a PATOČKA, J. Humic substances – compounds of still unknown structure: applications in agriculture, industry, environment and biomedicine. *Journal of Applied Biomedicine*. 2005, roč. 3, s. 13–24. ISSN 1214-0287.
- [8] KANG, K. H.; SHIN, H. S. a PARK, H. Characterization of humic substances present in landfill leaches with different landfill ages and its implications. *Water Research*. 2002, roč. 36, s. 4023–4032.
- [9] KLUČÁKOVÁ, M. et al. Structure and Properties of Humic and Fulvic Acids. I. Properties and Reactivity of Humic Acids and Fulvic Acids.. *Journale of Polymer Materials*. 2000, roč. 17, s. 337–356.
- [10] SCHNITZER, M. a KAHN, S. U. *Humic substances in the environment*. New York: Marcel Dekker, 1972. Characterization of Humic Substances by Chemical Methods, s. 41–45. ISBN 9780824716141.
- [11] LUBAL, P. et al. The acidobasic and complexation properties of humic acids. Study of complexation of Czech humic acids with metal ions. *Talanta*. 1998, roč. 47, s. 401–412.
- [12] GAFFNEY, J. S.; MARLEY, N. A. a CLARK, S. B. Humic and Fulvic Acids. Isolation, Structure and Environmental Role. *American Chemical Society*. 1996.
- [13] DOLEJŠ, P. *Procesy úpravy pitné vody z povrchových zdrojů obsahujících huminové látky – interakce teorie a praxe*. Brno, 2002. Habilitační práce na Chemické fakultě Vysokého učení technického v Brně.
- [14] SCHNITZER, M. a SCHULTEN, H. R. Three-Dimensional Models for Humic Acids and Soil Organic Matter. *Naturwissenschaften*, 1995, roč. 82, s. 487–498.

- [15] VISSER, S. A. A physico-chemical study of the properties of humic acids and their changes during humification. *Journal of Soil Science*. 1964, roč. 15, s. 202–207.
- [16] ORLOV, D. S.; AMMOŠOVA, Ya. M. a GLEBOVA, G. I. Molecular parameters of humic acids. *Geoderma*. 1975, roč. 13, s. 211–219.
- [17] CAMERON, R. S. et al. Molecular weight and shape of humic acid from sedimentation and diffusion measurements on fractionated extracts. *Journal of Soil Science*. 1972, roč. 23, s. 395–408.
- [18] GHOSH, K. a SCHNITZER, M. Macromolecular structure of humic substances. *Journal of Soil Science*. 1980, roč. 129, s. 266–276.
- [19] SCHNITZER, M. a KAHN, S. U. *Soil organic matter*. New York: Elsevier, 1978, s. 1–78.
- [20] SCHNITZER, M. *Humic Substances in the Global Environment and Implications on Human Health*. Amsterdam: Elsevier, 1994, s. 57–63.
- [21] WERSHAW, R. L. A new model for humic materials and their interactions with hydrophobic organic chemicals in soil-water or sediment-water systems. *Journal of Contaminant Hydrology*. 1986, roč. 1, s. 29–45.
- [22] BARAK, P. a CHEN, Y. Equivalent Radii of Humic Macromolecules From Acid-Base Titration. *Journal of Soil Science*. 1992, roč. 154, s. 184–195.
- [23] SIMPSON, A. J. et al. Molecular structures and associations of humic substances in the terrestrial environment. *Naturwissenschaften*, 2002, roč. 89, s. 88. DOI: 10.1007/s00114-001-0293-8.
- [24] KLOUDA, P. *Moderní analytické metody*. Ostrava: Pavel Klouda, 2003. 132 s. ISBN 80-86369-07-2, s. 31–122.
- [25] PICCOLO, A., S. NARDI a G. CONCHERI. Micelle-like conformation of humic substances as revealed by size exclusion chromatography. *Chemosphere*. 1996, roč. 33, č. 4, s. 595–602.
- [26] CONTE, P. a PICCOLO, A. Conformational Arrangement of Dissolved Humic Substances. Influence of Solution Composition on Association of Humic Molecules. *Environmental Science & Technology*, 1999, roč. 33, č. 10, s. 1682–1690.
- [27] PICCOLO, A. The Supramolecular structure of Humic Substances: A Novel Understanding of Humus Chemistry and Implications in Soil Science. *Advances in Agronomy*, 2002, roč. 75, s. 57–134.
- [28] CONTE, P. a PICCOLO, A. Effect of Concentration on the Self-assembling of dissolved humic substances. *Soil Science*. 2002, roč. 28A, s. 409–416.

- [29] NEBBIOSO, A. a PICCOLO, A. Advances in humeomics: Enhanced structural identification of humic molecules after size fractionation of a soil humic acid. *Analytica Chimica Acta*. 2012, roč. 720, s. 77–90.
- [30] MAIA, C. M. B. F; PICCOLO, A. a MANGRICH, A. S. Molecular size distribution of compost-derived humates as a function of concentration and different counterions. *Chemosphere*. 2008, roč. 73, s. 1162–1166.
- [31] PUGLISI, E. et al. Conformational Distribution of Dissolved Organic Matter Released from Compost by Repeated Water Extractions. *Compost Science & Utilization*, 2010, roč. 18, č. 2, s. 105–110.
- [32] CANELLAS, L. P. et al. Chemical composition and bioactivity properties of size-fractions separated from a vermicompost humic acid, *Chemosphere*, 2010, roč. 78, s. 457–466.
- [33] SUTTON, R. a SPOSITO, G. Molecular Structure in Soil Humic Substances: The New View. *Environmental Science & Technology*, 2005, roč. 39, č. 23, s. 9009–9015.
- [34] COULTER CORPORATION. *Coulter® N4 Plus Submicron Particle Sizer Reference Manual*. 1995, 198 s, Miami, FL.
- [35] PINHEIRO, J. P. et al. Dynamic properties of humic matter by dynamic light scattering and voltammetry. *Analytica Chimica Acta*. 1996, roč. 329, s. 15–24.
- [36] PALMER, N. E. a WANDRUSZKA, R. Dynamic light scattering measurements of particle size development in aqueous humic materials. *Fresenius J Anal Chem*. 2001, roč. 371, s. 951–954.
- [37] PEKAŘ, M.; KUČEŘÍK, J. a ŠMEJKALOVÁ, D. Nové možnosti ultrazvukové spektroskopie v koloidní chemii. *CHEMagazín*. 2005, roč. XV, č. 1, s. 12–14.
- [38] KLUČÁKOVÁ, M.; KARGEROVÁ, A. a NOVÁČKOVÁ, K. Conformational Changes In Aqueous Solutions of Humic Acids. *Chemistry & Life*. 2011. V tisku
- [39] ZARA, L. F. et al. A Structural Conformation Study of Aquatic Humic Acid. *J. Braz. Chem. Soc.*, 2006, roč. 17, č. 5, s. 1014–1019.
- [40] MEI, Y. a WANG, L. a WU, F. Effects of water chemistry and concentrations of dissolved organic matter on its fluorescence characteristics and molecular conformation. *Chin. J. Geochem.*, 2009, roč. 28, s. 413–420.
- [41] SOMMER, L. *Teoretické základy analytické metody III*. Brno: FCH VUT v Brně, 1995, 102 s. ISBN 80-214-0660-7, s. 4–18.
- [42] STABINGER, H. *Density Measurement using modern oscillating transducers*. South Yorkshire Trading Standards Unit, Sheffield 1994.
- [43] JACKSON, K. Dynamický rozptyl světla – co, jak a proč?. *CHEMagazín*. 2007, roč. XVII, s. 12.

- [44] MALVERN. [online]. [cit. 2012-03-21]. Dostupné z: <<http://www.malvern.com/>>.
- [45] ULTRASONIC SCIENTIFIC. [online]. [cit. 2011-12-21]. Dostupné z: <<http://www.ultrasonic-scientific.com/>>.
- [46] KLUČÁKOVÁ, M. a PEKAŘ, M. Behaviour of partially soluble humic acids in aqueous suspension. *Colloids and Surface A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 2008, roč. 318, č. 1, s. 106–110. ISSN 0927-7757.
- [47] KLUČÁKOVÁ, M.; KUČEŘÍK, J. a PEKAŘ, M. Modelling of Complexation of Heavy Metals with Utilization of High Resolution Ultrasound Spectroscopy.. *Chemické listy*. 2008, roč. 102, č. S, s. 1152–1153. ISSN 1213-7103.
- [48] FICHT, A.; STEVENSON, F. J. a CHEN, Y. Complexation of Cu(II) with a soil humic acid: Response characteristics of Cu(II) ion-selective electrode and ligand concentration effects. *Organic Geochemistry*. 1986, roč. 9, č. 3, s. 109–116.
- [49] CHRISTL, I. et al. Effect of humic and fulvic acid concentrations and ionic strength on copper and lead binding. *Environmental Science & Technology*. 2005, roč. 33, č. 14, s. 5319–5326.
- [50] MACIEJEWSKA, A. a KWIATKOWSKA, J. Fractional composition of humic acids and some physico–chemical properties of soil as a result of addition of brown coal fertilizer. In: *Humic Substances in Ecosystems 5*. GONET S. S.; ZAUJEC A. a DEBSKA B. Duszniki Zdrój: Polish Humic Substances Society, 2003. ISBN 83-919331-0-5.

8 SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

HL	humínové látky
HK	humínové kyseliny
FK	fulvínové kyseliny
HM	humínové materiály
GPC	gelová permeační chromatografie
SEC	vylučovací chromatografie
HPSEC	vylučovací chromatografie za zvýšeného tlaku
LPSEC	vylučovací chromatografie za sníženého tlaku
NMR	nukleární magnetická rezonanční spektrometrie
UV-VIS	ultrafialová a viditelná spektrofotometrie
DLS	dynamický rozptyl světla
LDV	laserová Dopplerova velocimetrie
HR-US	vysoce rozlišovací ultrazvuková spektrometrie
d	hydrodynamický průměr
D	difúzní koeficient
k_B	Boltzmannova konstanta
T	absolutní teplota
π	Ludolfovo číslo
η	viskozita
u	ultrazvuková rychlost
λ	vlnová délka
f	frekvence oscilace deformace
α	ultrazvukové zeslabení
A	amplituda vlny procházející vzorkem
A_0	amplituda vlny vstupující do vzorku
x	vzdálenost, kterou urazí vlna ve vzorku
β_s	adiabatická stlačitelnost

ρ	hustota
V	objem
P	tlak
S	entropie
A_{280}	absorbance při vlnové délce 280 nm
A_{465}	absorbance při vlnové délce 465 nm
A_{665}	absorbance při vlnové délce 665 nm
E_4/E_6	humifikační index
β_{rel}	relativní stlačitelnost
β_0	stlačitelnost vody