



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE

INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

STUDIUM INTERAKCE HUMINOVÝCH LÁTEK S POVRCHOVĚ AKTIVNÍMI LÁTKAMI

STUDY ON INTERACTION OF HUMIC SUBSTANCES WITH SURFACE ACTIVE AGENTS

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Anna Bělušová

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. Jiří Smilek, Ph.D.

BRNO 2019

Zadání bakalářské práce

Číslo práce: FCH-BAK1372/2018 Akademický rok: 2018/19
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie
Studentka: **Anna Bělušová**
Studijní program: Chemie a chemické technologie
Studijní obor: Chemie pro medicínské aplikace
Vedoucí práce: **Ing. Jiří Smilek, Ph.D.**

Název bakalářské práce:

Studium interakce huminových látek s povrchově aktivními látkami

Zadání bakalářské práce:

- 1) Prostudovat současný stav řešené problematiky a na základě toho vypracovat literární rešerši.
- 2) Optimalizovat techniku stanovení koncentrace kladně i záporně nabitých povrchově aktivních látek ve směsi s huminovými látkami.
- 3) Prostudovat vliv modifikace huminových kyselin na interakci s povrchově aktivními látkami pomocí difúzních a dialyzačních technik.
- 4) Diskutovat naměřené výsledky a vyvozovat logické závěry.

Termín odevzdání bakalářské práce: 24.5.2019:

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

Anna Bělušová
student(ka)

Ing. Jiří Smilek, Ph.D.
vedoucí práce

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2019

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

Abstrakt

Předložená bakalářská práce se zabývá studiem interakcí mezi huminovými kyselinami (HK), coby hlavní komponentou půdní organické hmoty, a modelovými polutanty v podobě povrchově aktivních látek (tenzidů) prostřednictvím nekonvenčního a originálního spojení dialyzačních a difúzních technik. Protože dialyzační techniky jsou z hlediska studia interakce huminových látek s tenzidy zřídka používány, bylo nutné před vlastními experimenty optimalizovat metody stanovení ionických tenzidů (jako zástupci vybráni kationický Septonex a anionický Dodecylsírán sodný), k čemuž byla použita metoda založená na principu vytvoření barevného iontového páru mezi tenzidem a opačně nabitým barvivem a následná extrakce tohoto páru do organického rozpouštědla. Dialyzační experimenty v difúzních celách byly prováděny s kationaktivním tenzidem Septonexem, u něhož byla očekávána pozitivní interakce s huminovými kyselinami vzhledem k jeho náboji. Jako zástupci huminových kyselin byly vybrány standardy těchto látek poskytnuté od Mezinárodní společnosti pro huminové látky (IHSS), konkrétně se jednalo o huminové kyseliny (IHSS HK) izolované z Leonarditu (1S104H). Jedním z dílčích cílů předložené bakalářské práce bylo ověření vlivu karboxylových funkčních kyselin na reaktivitu a bariérové schopnosti huminových kyselin. Z tohoto důvodu byly zmíněné standardy modifikovány selektivní methylovací karboxylových skupin, které se již nadále nemohou podílet na interakci s tenzidy. Již z prvních experimentů byl patrný pokles koncentrace Septonexu v čase – tedy jeho přechod přes dialyzační membránu za huminovými kyselinami, což svědčí o pozitivní afinitě huminových kyselin vůči Septonexu. Míra těchto interakcí byla posuzována skrze zdánlivý parametr interakcí δ_{app} , jehož prostřednictvím byl ověřen předpoklad, že IHSS HK reagují se Septonexem více než jejich methylovaná forma MIHSS HK.

Klíčová slova

transportní procesy, difúzní cely a komory, interakce, huminové kyseliny, tenzidy

Abstract

This bachelor thesis deals with the study of interactions between humic acids (HK), as the main component of soil organic matter, and model pollutants in the form of surfactants through unconventional and original combination of dialysis and diffusion techniques. Since dialysis techniques are rarely used for the interaction of humic substances with surfactants study, it was necessary to optimize methods for determining of ionic surfactants (cationic Septonex and anionic sodium dodecylsulfate were selected as representatives) prior to beginning of own experiments, using a method based on the color ion pair creation between a surfactant and a counter-charged dye, followed by this pair extraction into an organic solvent. Diffusion cell dialysis experiments were performed with cationic surfactant Septonex, which was expected to interact positively with humic acids relative to its charge. As humic acids representatives, the standards of these substances provided by the International Society for Humic Substances (IHSS) were selected, namely humic acids (IHSS HK) isolated from Leonardite (1S104H). One of this bachelor thesis aims was to verify the effect of carboxylic functional acids on reactivity and barrier abilities of humic acids. For this reason, these standards have been modified by the selective methylation of carboxyl groups which no longer participate in the interaction with surfactants. Already from the first experiments there was a noticeable decrease in the concentration of Septonex over time – it means its transition through the dialysis membrane to humic acids, which indicates a positive affinity of humic acids to Septonex. The extent of these interactions was assessed through the apparent interactions parameter δ_{app} through which the assumption that IHSS HK reacted with Septonex more than their methylated form of MIHSS HK was verified.

Keywords

transport processes, diffusion cells and chambers, interaction, humic acids, surfactants

BĚLUŠOVÁ, A. *Studium interakce huminových látek s povrchově aktivními látkami*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2019, 47 s. Vedoucí bakalářské práce Ing. Jiří Smilek, Ph.D..

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citovala. Bakalářská práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího bakalářské práce a děkana VUT.

.....

Anna Bělušová

Na tomto místě bych ráda poděkovala vedoucímu mé bakalářské práce Ing. Jiřímu Smilkovi, Ph.D., za jeho přístup, vedení a cenné rady poskytnuté při řešení této práce a provádění experimentů. Dále patří poděkování mé rodině a přátelům za jejich trvalou podporu během celého mého studia.

OBSAH

1	ÚVOD	7
2	TEORETICKÁ ČÁST	8
2.1	Charakteristika huminových látek.....	8
2.2	Struktura a reaktivita huminových látek	9
2.3	Předpokládané vazebné možnosti huminových kyselin.....	10
2.3.1	Iontová vazba	10
2.3.2	Koordinační vazba.....	11
2.3.3	Kovalentní vazba.....	11
2.3.4	Vodíkové můstky	11
2.3.5	Hydrofobní interakce.....	11
2.4	Vliv funkčních skupin na reaktivitu huminových kyselin	11
2.5	Povrchově aktivní látky – tenzidy	13
2.5.1	Struktura a vlastnosti tenzidů	13
2.5.2	Dělení tenzidů	14
2.5.3	Kationaktivní tenzidy	14
2.5.4	Anionaktivní tenzidy	15
2.6	Difúze	16
2.7	Dialýza	17
2.8	Zdánlivá rovnovážná konstanta K_{app}	17
2.9	Zdánlivý parametr interakcí δ_{app}	19
3	SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	20
3.1	Možné metody pro stanovení tenzidů	20
3.1.1	Fotometrické metody.....	20
3.1.2	Skupinové metody stanovení	21
3.1.3	Titrační metody	21
3.1.4	Mobilní analytika (se spektrofotometrickým stanovením)	22
3.1.5	Měření vodivosti	22
3.1.6	Měření změny povrchového napětí	22
3.2	Metody stanovení anionaktivních tenzidů.....	23
3.3	Metody stanovení kationaktivních tenzidů	23
3.4	Studium interakcí huminových látek s tenzidy	24
4	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	26
4.1	Použité pomůcky a přístroje.....	26
4.2	Použité chemikálie	26
4.3	Dialyzační experimenty.....	26
4.3.1	Příprava roztoků pro dialyzační experimenty	27
4.3.2	Příprava difúzních cel a vzorků k měření.....	28
4.3.3	Zdůvodnění volby dialyzační membrány o velikosti pórů 0,5 kDa	28
4.4	Stanovení koncentrace kationaktivních tenzidů s disulfínovou modří.....	29
4.4.1	Princip	29

4.4.2	Použití.....	29
4.4.3	Příprava roztoků.....	30
4.4.4	Postup stanovení.....	30
4.4.5	Rušivé vlivy.....	31
4.4.6	Kalibrace.....	31
4.5	Stanovení koncentrace anionaktivních tenzidů s methylenovou modří.....	32
4.5.1	Princip.....	32
4.5.2	Použití.....	33
4.5.3	Příprava roztoků.....	33
4.5.4	Postup stanovení.....	33
4.5.5	Rušivé vlivy.....	34
4.5.6	Kalibrace.....	34
5	VÝSLEDKY A DISKUZE	36
5.1	Charakterizace huminových kyselin.....	36
5.1.1	Elementární analýza a termogravimetrie.....	36
5.1.2	Infračervená spektrofotometrie s Fourierovou transformací (FT-IR).....	36
5.2	Dialyzační a difúzní experimenty.....	37
5.3	Zdánlivý parametr interakcí δ_{app}	41
6	ZÁVĚR	43
7	SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ	45

1 ÚVOD

Již od pradávna se využívá blahodárných účinků huminových látek ve formě rašelinových zábalů či koupelí k léčbě pohybového aparátu. Hojně jsou huminové látky využívány i v zemědělství jako součást hnojiv, kde zvyšují úrodnost půdy a podporují transport minerálů do rostlin.

V současné době velmi rozšířeného používání tenzidů (povrchově aktivních látek), nejen v zemědělství, je jejich následná přítomnost ve vodách a půdě značně škodlivá a úkol eliminovat tenzidy z nich naléhavý. Zde mohou zastat huminové látky významnou roli, neboť se nabízí využít jejich sorpčních a komplexačních vlastností při čištění odpadních vod i kontaminované půdy a odstraňování těžkých kovů z nich.

V poslední době se aktivity výzkumu zaměřují na porozumění interakcí huminových látek s polutanty v půdě a vodě, kde se ony přirozeně vyskytují. Vše je směřováno k přirozenému řešení zmíněného problému.

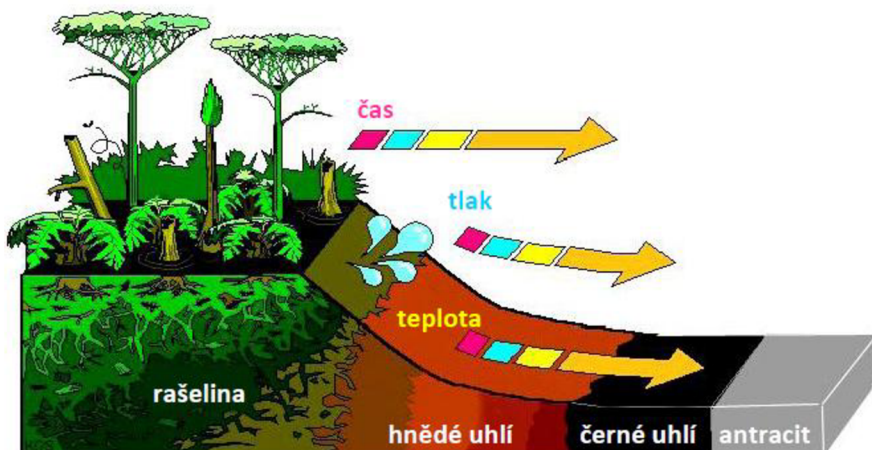
Výsledky studia tenzidů a jejich chování ve vztahu k huminovým látkám lze považovat i za modelový příklad použitelný v budoucnu, jak nakládat s nežádoucím nahromaděním léčiv v odpadních vodách, případně i v půdě.

V této práci se budeme snažit více porozumět interakcím mezi huminovými kyselinami a tenzidy prostřednictvím dialyzačních a difúzních experimentů.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Charakteristika huminových látek

Huminové látky jsou přírodní organické látky převážně cyklického charakteru. Vyskytují se od jednotek procent v půdě, přes dvacet až třicet procent v lignitu a hnědém uhlí, až k nejbohatšímu osmdesátiprocentnímu zastoupení v rašelině. Proces s faktory její postupné přeměny v uhlí ukazuje Obrázek 1 [1, 2, 3].



Obrázek 1: Schéma postupné přeměny rašeliny v uhlí [1]

Huminové látky vznikají tlením (rozkladem), především rostlinných těl, a syntetickou činností mikroorganismů; zbytek se mineralizuje. Takto vzniklý humus se hromadí v půdě, rašeliništích a dnových sedimentech. Při kontaktu s vodou do ní uvolňuje své rozpustné části – tedy huminové kyseliny a fulvokyseliny. Při rozkladných procesech se nejprve tvoří ve vodě částečně rozpustné tmavohnědé až šedé huminové kyseliny (rozpustné ve vodě při $\text{pH} > 2$, v kyselějším prostředí se srážejí) a žluté až žlutohnědé fulvokyseliny (rozpustné ve vodě nezávisle na hodnotě pH) a nakonec nerozpustné černé huminy. Chemické vlastnosti všech těchto podskupin jsou uvedeny v Tabulce 1 [2, 3].

Tabulka 1: Chemické vlastnosti huminových látek [1]

Parametr	Fulvokyseliny	Huminové kyseliny	Huminy
zbarvení	žluté	šedé	černé
obsah uhlíku [hm.%]	45	55	> 60
obsah kyslíku [hm.%]	48	37	–
obsah dusíku [hm.%]	1,2	2	–
sorpce živin	vysoká	vysoká	nízká
<p>→</p> <p>zvyšování molekulové hmotnosti snižování stupně rozpustnosti snižování výměnné kyselosti nárůst obsahu uhlíku pokles obsahu kyslíku</p>			

2.2 Struktura a reaktivita huminových látek

Huminové látky jsou sloučeniny se složitou strukturou. V minulosti se považovaly za vysokomolekulární látky. V současné době však spíše převažuje názor, že huminové kyseliny jsou supramolekuly spojené Van der Waalsovými silami, vodíkovými můstky či π - π interakcemi [4]. Údaje o jejich molekulové hmotnosti se tak dosti liší. Záleží totiž na způsobu jejího stanovení: od asi $200 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ až do $300 \text{ kg}\cdot\text{mol}^{-1}$.

Patří do skupiny polyfenolů a aromatických polykarboxylových kyselin. V jejich centru leží především aromatické jádro obsahující dusíkaté a kyslíkaté heterocykly s bočními alifatickými řetězci. Na jádře i na bočních řetězcích jsou navázány hydrofilní i hydrofobní skupiny, což hraje významnou roli při utváření micelárních útvarů. Huminové látky tak mohou přilnout na povrch některých částic a ovlivnit jejich srážení nebo rozpustnost. Vedle aromatických jader huminové látky obsahují i chinoidní struktury, které společně s hydroxyskupinami jsou příčinou jejich oxidačně-redukčních vlastností. Mohou obsahovat i celou škálu funkčních skupin. Zřejmě nejdůležitějšími jsou skupiny karboxylové, hydroxylové a zejména fenolové, které společně s alkoholickými vedou ke kyselosti, komplexačním a sorpčním vlastnostem huminových látek a k jejich polárnímu charakteru (viz $\text{pH} = 3,55$ až $4,14$ rašelinišť z okolí Slavkovského lesa). Schopnost tvorby komplexů a z toho plynoucí sorpce nejen kationtů těžkých kovů (například: Pb^{2+} , Cd^{2+} , Mn^{2+} , Hg^{2+}) z vod i z lidského těla je jejich obzvlášť ceněnou vlastností. Shrnutí a zastoupení nejdůležitějších funkčních skupin v huminových kyselinách a fulvokyselinách udává Tabulka 2 [2, 4, 5].

Tabulka 2: Zastoupení funkčních skupin v huminových látkách [2]

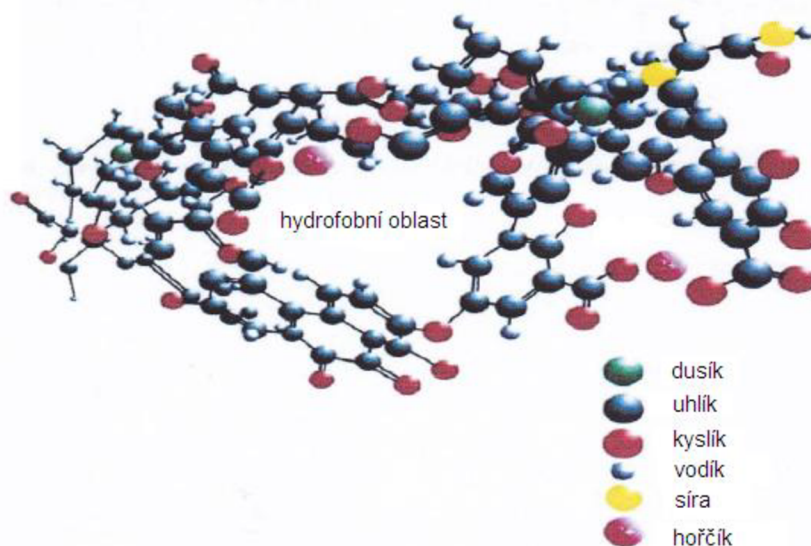
Funkční skupina	Huminové kyseliny [$\text{mmol}\cdot\text{g}^{-1}$]	Fulvokyseliny [$\text{mmol}\cdot\text{g}^{-1}$]
-COOH	4,4	2,1
-OH	3,3	3,9
-OH (-R)	1,9	4,0
-C=O	1,2	1,4
-O-CH ₃	0,3	0,4

Již zmíněnou vlastností huminových látek je jejich rozpustnost ve vodě. Fulvokyseliny na rozdíl od huminových kyselin ve vodě převažují. Fulvokyseliny obsahují více kyslíku, což (společně s karboxylovými a hydroxylovými skupinami) způsobuje jejich větší kyselost a rozpustnost.

Obtížná je otázka strukturního vzorce huminových látek. Nejde ji v podstatě přesně definovat: podíl zastoupení huminových kyselin a fulvokyselin se v různých vzorcích liší, rozhodující je místo odběru vzorku a tím i možné příměsi mnoha „cizích“ látek, doba tlení a množství dalších faktorů. Proto se setkáváme spíše se vztahováním vlastností huminových látek na hmotnost či na molární procenta organického uhlíku v nich obsažených, nikoli na hmotnost celkovou.

Z dnešních poznatků a již zmíněného rozmanitého obsahu funkčních skupin v huminových látkách vyplývá, že při jejich interakci s cizorodými látkami (jako jsou například těžké kovy, kovové ionty, tenzidy) mohou vznikat různé druhy vazeb. Vznik iontové vazby je zapříčiněn

iontoměničovým charakterem huminových látek, koordinační vazba vzniká díky přítomnosti karboxylových a fenolických skupin a kovalentní vazbou se kontaminanty stabilně navážou do struktury huminových látek. Jiné funkční skupiny jsou zodpovědné za možnost vzniku vodíkových můstků. Pro představu je jeden z možných modelů huminových kyselin uveden na Obrázku 2 [2, 6].



Obrázek 2: Model huminové kyseliny jako supramolekuly podle Piccola [4]

2.3 Předpokládané vazebné možnosti huminových kyselin

Dle informací z kapitoly 2.2 lze předpokládat několik základních typů vazebných možností huminových kyselin. Velkou roli hrají iontově výměnné vlastnosti a jejich využití coby sorbentů při čištění odpadních vod s následným odstraňováním těžkých kovů. Iontové výměnné vlastnosti oxihumolitů (typ mladého měkkého uhlí s vysokým obsahem snadno extrahovatelných huminových kyselin) lze vylepšit například oxidací vzdušným kyslíkem za tepla a promytím minerálními kyselinami, čímž se odblokují funkční skupiny obsazené převážně ionty Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} atd., a sulfonací, která vede ke zvýšení výměnné kapacity. Předčištění vybranou kyselinou vede k vyšší selektivitě sorpce některých kovových iontů. Tyto látky jsou navíc schopné hydrofobních interakcí s různými hydrofobními a amfipatickými látkami, díky kterým kontaminanty ztrácejí svoji účinnost; tímto způsobem jdou výrazně zlepšit podmínky mikrobiální degradace. Následující výčet vazeb je předpokládán pro huminové kyseliny s cizorodými látkami nacházejícími se v zemině [7].

2.3.1 Iontová vazba

Iontová vazba se uplatňuje působením elektrostatických sil mezi náboji funkčních skupin huminových kyselin a mezi ionty přítomnými v roztoku. Proto lze o huminových kyselinách hovořit jako o měničích iontů. Vznik elektrostatické vazby u huminových kyselin je možný s alkalickými kovy a amoniakem [8].

2.3.2 Koordinační vazba

Díky možnosti imobilizace iontů těžkých kovů se jedná zřejmě o nejdůležitější typ vazebné interakce huminových kyselin. Koordinační vazba vzniká mezi makromolekulárními maticemi huminových kyselin a ionty vazebně schopných kovů. Potenciál ke vzniku koordinační vazby je dán především hojným podílem karboxylových a fenolických skupin ve struktuře huminových kyselin. Významným faktorem je i vliv pH spojený s mírou disociace těchto funkčních skupin. Při slabě kyselém prostředí určují vazbu karboxylové skupiny a s rostoucím pH nad 7 se díky disociaci protonu fenolického hydroxidu přidávají i tyto funkční skupiny. Obecně stabilita vznikajících komplexů roste společně s pH, a to především u iontů typu Cu^{2+} tvořících silné karboxylát-fenolické komplexy [9].

2.3.3 Kovalentní vazba

Vlivem kovalentní vazby může dojít k trvalé fixaci kontaminantů do struktur huminových kyselin. Příkladem z praxe je připoutání anthracenu kovalentní vazbou na huminové kyseliny ze zeminy znečištěné polyaromatickými uhlovodíky. Pokud by proces vedoucí ke vzniku kovalentní vazby byl reversibilní, dalo by se uvažovat o regeneraci huminových kyselin. V případě ireversibilního vzniku vazby by například bylo možné odstranit polutant ze sítě huminových kyselin biologickým způsobem, což je zatím stále otázkou výzkumu [10, 11, 12].

2.3.4 Vodíkové můstky

Vznik vodíkové vazby lze předpokládat na základě přítomnosti některých funkčních skupin (jako amidová či nitrilová). I přes to, že jsou tyto vazby poměrně slabé, se mohou významně podílet na vazebných schopnostech huminových kyselin s kontaminanty. Zastoupení vodíkových můstků již bylo prokázáno například pro iminoskupiny přítomné v molekulách herbicidů [13].

2.3.5 Hydrofobní interakce

Vznikají při kontaktu nepolárních (například alkylových) skupin obsažených v molekulách vodného roztoku huminových kyselin díky působení van der Waalových sil či přesunu π elektronů. Jedná se o nejčastěji uvažované reakce při interakci huminových kyselin s hydrofobními a alifatickými kontaminanty. Touto skutečností bylo odůvodněno snížení toxicity insekticidu parathionu v přítomnosti huminových kyselin, či imobilizace atrazinu a hydroxyatrazinu [13, 14].

2.4 Vliv funkčních skupin na reaktivitu huminových kyselin

Jak už bylo zmíněno v kapitole 2.2, zřejmě mezi nejdůležitější a nejvíce zastoupené funkční skupiny v huminových kyselinách patří skupiny karboxylové a hydroxylové, zejména pak fenolové. Proto lze usuzovat, že převážný vliv na reaktivitu budou mít právě ony.

Za účelem zlepšení kvality pitné vody byla sledována interakce funkčních skupin přírodní organické hmoty (NOM = natural organic matter) s hydroxidem hlinitým. Právě zmíněná NOM ve vodovodních systémech způsobovala vznik nežádoucích vedlejších produktů dezinfekce. Předpokládaným hlavním mechanismem pro její odstranění v procesu zvýšené koagulace za použití hliníku nebo železité soli jako koagulantu je adsorpce na povrch

hydroxidových vložek. Dosavadní výzkum ukázal, že organické sloučeniny s alespoň dvěma funkčními skupinami (COOH nebo OH) v poloze ortho jsou přednostně odstraněny adsorpcí na povrch vložek. Pro větší pochopení tohoto mechanismu byla namísto NOM zvolena kyselina dihydroxybenzoová a pozorována její reakce s řadou aromatických karboxylových kyselin, jejichž funkční skupiny jsou typické pro huminové kyseliny. Díky infračervené spektroskopii se dospělo k závěru, že zásadité pH a OH skupiny v poloze ortho jsou příznačnější pro interakce s fenolovými funkčními skupinami, zatímco pro kyselé pH a OH skupiny v jiném rozmístění převažoval vliv skupin karboxylových. Z této studie vyplynulo, že fenolické skupiny mohou mít významnější vliv na chemickou adsorpci NOM než skupiny karboxylové [15].

Pomocí infračervené spektroskopie s Fourierovou transformací se též zkoumala interakce karboxylových skupin huminových kyselin s ionty Hg^{2+} . Jednoduchým modelem zastupujícím funkční skupiny huminových kyselin byla kyselina benzoová, respektive kyselina salicylová. Ze studie vyplynulo, že COOH skupiny huminových kyselin ve formě solí interagují s Hg^{2+} odlišným způsobem, než ve formě kyselé. Roli tu hraje přímá výměna mezi Na^+ a Ca^{2+} ionty a Hg^{2+} , kde v kyselé formě je tato reakce snížena. Studie ukázala pokles absorbance vibračních COOH pásů s nárůstem koncentrace iontů Hg^{2+} , zatímco současně narůstaly vibrační pásy COO^- . Stejně výsledky byly dosaženy při změnách pH. Tato studie tedy poukazuje na fakt, že huminové kyseliny reagují odlišně v závislosti na jejich chemickém a strukturním stavu [16].

Huminové kyseliny též usnadňují vyšší difúzi Fe^{3+} skrze vrstvy půdy, což ovlivňuje vyšší výnos plodin. Proto se využívají jako součást hnojiv. Z tohoto důvodu se zkoumala jejich komplexace s ionty Fe^{3+} při různém pH. Výsledky ukázaly, že karboxylové a fenolické hydroxylové skupiny byly dostupné jako vazebná místa pro Fe^{3+} [17].

Také byly pozorovány interakce karboxylových skupin huminových kyselin s ionty Cd^{2+} . Vliv karboxylových skupin na interakci s kationty kadmia se zkoumal jejich selektivním blokováním thionylchloridem a methanolem, kde rozdíly mezi komplexačními vlastnostmi huminových kyselin se přiřazovaly právě karboxylovým skupinám. Infračervená spektroskopická analýza a potenciometrická titrace potvrdily, že ionty Cd^{2+} se přednostně vážaly na nemodifikované huminové kyseliny, které měly oproti těm modifikovaným i větší stabilitu. Tato studie se prokázala, že karboxylové skupiny se zde výrazně účastnily na reakci [18].

Důležitost ostatních funkčních skupin huminových kyselin se potvrdila při sledování role karboxylových skupin během interakcí s nabitými organickými látkami. Zajímavý byl fakt, že v případě těchto reakcí se uplatňovaly původní i modifikované huminové kyseliny relativně stejně. Dospělo se k závěru, že na samotné interakci se musely podílet i jiné funkční skupiny, poněvadž karboxylové funkční skupiny přispěly k celkovému chemickému potenciálu mnohem méně, než se původně očekávalo [19].

Mezi další důležité vazebné možnosti huminových látek patří již výše zmíněné hydrofobní interakce. Vliv hydrofobnosti se studoval na elektroforetické pohyblivosti huminových látek

v přítomnosti hydrofobních monovalentních kationtů – tetrafenylfosfonia (TPP^+). Výsledky ukázaly, že všechny huminové látky s různým obsahem aromatických uhlíků vykazovaly změnu izoelektrického bodu, čímž byla potvrzena silná hydrofobní interakce zejména u Leonarditové huminové kyseliny s TPP^+ . Také byla pozorována tvorba velkých viditelných agregátů všech huminových látek a TPP^+ při nižším pH [20].

Dále bylo pozorováno i koagulační chování huminových kyselin s ionty Cs^+ , Sr^{2+} a Eu^{3+} při různých hodnotách pH. Dynamický rozptyl světla v kombinaci se spektroskopickou analýzou prokázaly, že ke koagulaci u trojvazného Eu^{3+} docházelo při mnohem nižší koncentraci, než u dvojvazného Sr^{2+} a jednovazného Cs^+ . Spektroskopickou analýzou byla též prokázána již dříve zmíněná role karboxylových a fenolových skupin na komplexaci mezi nuklidy a huminovými kyselinami, což hrálo roli v koagulaci. Ze studie molekulární dynamiky vyplynulo, že ionty Sr^{2+} a Eu^{3+} zvyšovaly koagulační proces tvorbou intramolekulárních nebo intermolekulárních mostů mezi negativně nabitými molekulami huminových kyselin, zatímco u Cs^+ se výskyt intermolekulárních mostů nepotvrdil [21].

V jiné studii se zkoumal mechanismus stabilní disperze nanočástic TiO_2 (TNP) s huminovými kyselinami při různých hodnotách pH. Výsledky ukázaly, že stabilní disperze TNP a huminových kyselin při všech hodnotách pH lze dosáhnout pouze pomocí ultrazvuku. Mechanismy podílející se na disperzi TNP v huminových kyselinách zahrnovaly elektrostatickou odpudivost, sterickou bariéru a hydrofobní interakci. Bylo zjištěno, že elektrostatické odpuzování je dominantním mechanismem [22].

2.5 Povrchově aktivní látky – tenzidy

Jelikož je cílem této práce studium interakce huminových látek s povrchově aktivními látkami, pro ucelený pohled na věc následuje výčet důležitých vlastností tenzidů. Povrchově aktivní látka (PAL), se vyznačuje schopností snižovat povrchové napětí na fázových rozhraních. Tenzid je organická sloučenina, přírodního původu či uměle připravená, schopná se již při nízkých koncentracích hromadit na fázovém rozhraní, kde významně snižuje povrchové napětí. Snižování povrchového napětí rozpouštědel usnadňuje smáčení povrchu a odstraňování nečistot [23].

2.5.1 Struktura a vlastnosti tenzidů

Mezi nejpodstatnější vlastnosti tenzidů patří jejich povrchová aktivita, která způsobuje pění vody za turbulentního proudění. Další vlastnosti (jako je amfifilní struktura tenzidů) ovlivňují sorpční schopnost tenzidů, tedy schopnost hromadit se v čistírenských kalech a sedimentech, a také jejich toxicitu [2].

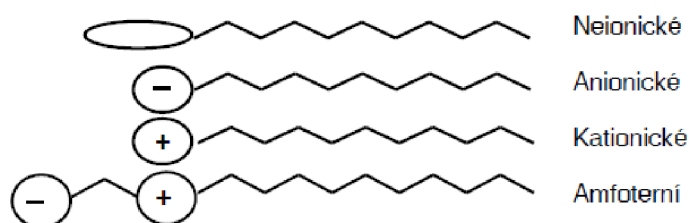
Tenzidy jsou charakteristické tzv. amfifilní strukturou, což je podstata jejich povrchové aktivity. Obsahují ve své molekule hydrofilní a hydrofobní část. Pokud je rozpouštědlem voda, pak je k ní hydrofilní část přitahována, naopak druhá hydrofobní část zaujímá uspořádání, které s ní co nejvíce omezuje kontakt. Hydrofilní částí je nejčastěji polární skupina, a hydrofobní část je často tvořena uhlovodíkovým zbytkem s lineární nebo rozvětvenou strukturou (nejčastěji z dvanácti až osmnácti uhlíkových atomů). Existují také

tenzidy obsahující ve své molekule dvě hydrofilní a jednu hydrofobní část nebo jednu hydrofilní skupinu mezi dvěma hydrofobními částmi [23, 24].

Bohužel je závažnou vlastností, zejména kationaktivních tenzidů, jejich toxicita. Při mytí přichází lidská pokožka do přímého styku s tenzidem obsaženým v mýdle či v jiných čistících prostředcích. Po umytí tento tenzid přechází do odpadní vody. Zde má značně negativní vliv na vodní organismy, protože při průniku do buněk napadá biomembránu a poškozuje její biologickou funkci. Lipidy v membráně obsahují stejně jako tenzidy hydrofilní a hydrofobní část, čímž je umožněna jejich vzájemná interakce vedoucí ke zhroucení molekulární struktury biomembrány. Tenzidy usazené v půdě také značně ovlivňují její kvalitu. Vedle vlastní toxicity tenzidy způsobují také pění, které má za následek snížení koncentrace kyslíku ve vodě [25].

2.5.2 Dělení tenzidů

Nejčastěji jsou tenzidy členěny podle charakteru hydrofilní složky, respektive podle její schopnosti disociovat na ionty. Podle tohoto kritéria se tenzidy klasifikují na neionické a ionické, přičemž tyto se dále dělí na anionické, kationické a amfoterní, viz Obrázek 3. Ionické tenzidy obsahují funkční hydrofilní skupiny, které jsou schopny ve vodě disociovat, přičemž vzniklé ionty jsou nositeli povrchové aktivity. Neionické tenzidy nemají náboj a ve vodním prostředí nedisociují [23].



Obrázek 3: Dělení tenzidů dle jejich hydrofilní části [23]

2.5.3 Kationaktivní tenzidy

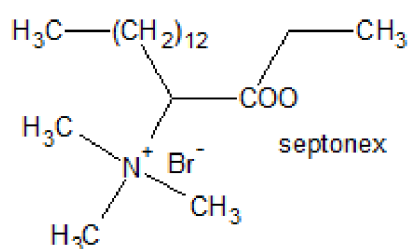
Kationické tenzidy obsahují jednu či více funkčních skupin, které ve vodním roztoku disociují na povrchově aktivní kladně nabitě organické ionty. Bývají silně adsorbovány na většinu pevných povrchů (půdy, skla tkanin a jiných látek), které mají obvykle záporný náboj, a uděluje jim hydrofobní charakter. Význam kationaktivních tenzidů spočívá především v jejich germicidních účincích, díky čemuž jsou hojně aplikovány v lékařské praxi do léčebných masť a dezinfekčních přípravků jako antiseptika (Ajatin, Septonex, Septosan). Jsou také známy pro své antistatické a změkčovací účinky, z tohoto důvodu nacházejí uplatnění v textilním průmyslu jako součást avivážních prostředků. Nevýhodou kationaktivních tenzidů je jejich horší biologická rozložitelnost a také vyšší cena oproti tenzidům anionaktivním [23].

Z kationaktivních tenzidů mají největší význam **kvartérní amoniové a pyridinové soli** (chloridy, bromidy nebo methosulfáty), mající v molekule alespoň jeden dlouhý hydrofobní řetězec. U kvartérní amoniových solí má uhlovodíkový řetězec dvanáct až osmnáct uhlíků, zbývající tři řetězce jsou buď methylované nebo ethylové skupiny. Protiontem bývá obvykle halogenidový aniont. Nejznámějším zástupcem této skupiny je hexadecyltrimethylamonium

bromid, neboli CTAB ($C_{16}H_{33}(CH_3)N^+Br^-$) a hexadecyltrimethylammonium chlorid, neboli CTAC ($C_{16}H_{33}(CH_3)N^+Cl^-$) [23, 26].

Struktura vybraného kationaktivního tenzidu (Septonex)

Jako modelový zástupce kationaktivních tenzidů pro tuto práci byl vybrán Septonex, neboli N-(α -karbethoxypentadecyl)trimethyl ammonium bromid, jenž nejlépe vyhovoval pro optimalizaci metody ke stanovení koncentrace kationaktivních tenzidů s disulfínovou modří, viz kapitola 4.4. V minulosti již byl Septonex použit pro experimentální účely s huminovými kyselinami (na pracovišti fakulty chemické v Brně se studovaly interakce Septonexu s polysacharidy). Není toxický a byl vyhovující díky své dostupnosti a molekulové hmotnosti, která je důležitá z hlediska průchodu přes dialyzační membránu v experimentech této práce. Strukturu Septonexu znázorňuje Obrázek 4 [27].



Obrázek 4: N-(α -karboethoxypentadecyl)trimethyl ammonium bromid [27]

2.5.4 Anionaktivní tenzidy

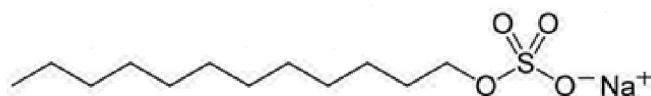
Tyto tenzidy ve vodném prostředí disociují na záporně nabitý organický anion, který je nositelem povrchové aktivity a neaktivní kation. Anionaktivní tenzidy patří stále mezi nejrozšířenější látky s nejučinnějšími detergenčními vlastnostmi. Nejvyšší aktivitu vykazují v mírně alkalickém prostředí, v kyselém jsou obecně nestálé [23].

Zřejmě nejstarší skupinu tvoří **solí karboxylových kyselin** (mýdla). Obecně mezi jejich hlavní výhody patří snadná biologická odbouratelnost a nízká toxicita. V prostředí tvrdé vody jsou nestálé a v kyselém prostředí nefunkční – v něm jsou tvořeny málo disociovanými a málo rozpustnými kyselinami.

Mezi další důležitou skupinu patří **alkylsulfáty**, neboli **alkylsírany**. Ty se vyznačují vysokou povrchovou aktivitou i v kyselém prostředí. Pokud tyto látky navíc obsahují lineární alkyly, jsou poměrně dobře biologicky rozložitelné. Sodné soli alkylsulfátů se používají jako prací prostředky a změkčovadla [23].

Struktura vybraného anionaktivního tenzidu (SDS)

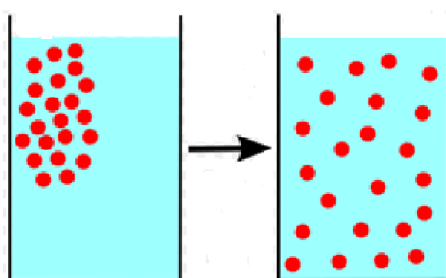
Jako modelový zástupce anionaktivních tenzidů pro tuto práci byl zvolen dodecylsírán sodný, neboli SDS, jenž nejlépe vyhovoval pro optimalizaci metody ke stanovení koncentrace anionaktivních tenzidů s methylenovou modří, viz kapitola 4.5. Strukturu SDS znázorňuje Obrázek 5 [23].



Obrázek 5: Dodecylsírán sodný [23]

2.6 Difúze

Přirozenou vlastností látek je, že difundují – tedy, pokud se jejich částice mohou pohybovat, tak se rozptylují do celého dosažitelného prostoru a postupně ve všech jeho částech vyrovnávají svoji koncentraci. Podstatou difúze je neuspořádaný tepelný pohyb (Brownův pohyb) částic látky, který umožňuje docílit její nejvyšší možnou míru entropie. Během difúze se energie nespotebovává, je to děj spontánní, nevratný a tepelně aktivovaný. Tento jev zachycuje Obrázek 6 [28, 29].



Obrázek 6: Difúze [28, 29]

Rychlost šíření částic je vedle teploty ovlivněna velikostí částic i vlastnostmi prostředí. Matematicky popisují difúzi **Fickovy zákony**, popisující vztah mezi koncentračním gradientem a množstvím prodifundované látky a také i změnu koncentračního gradientu s časem u nestacionární difúze [30].

1. Fickův zákon popisuje směr a hustotu difúzního toku J^{dif} – jedná se o vektorovou veličinu a je definovaný jako látkové množství difundující složky i , které za jednotku času projde jednotkovou plochou kolmou ke směru difúze, úměrnou koncentračnímu gradientu. Tuto závislost popisuje rovnice (1) [30]:

$$J_i^{dif} = -D \cdot \frac{dc_i}{dx} \quad (1)$$

D je difúzní koeficient, závisující na vlastnostech difundujících částic a prostředí. Koncentrační gradient dc_i/dx vyjadřuje změnu koncentrace difundující složky i se vzdáleností (v ose x) – v libovolném bodě se při stacionární difúzi nemění s časem.

2. Fickův zákon popisuje nestacionární difúzi, při níž se koncentrační gradient s časem mění a difúzní tok se mění s polohou, jak popisují rovnice (2) a (3) [30]:

$$\frac{dJ_i^{dif}}{dx} = -\frac{dc_i}{d\tau} \quad (2)$$

$$\frac{dc_i}{d\tau} = D \cdot \frac{d^2c_i}{dx^2} \quad (3)$$

V koloidních systémech je difúze řádově pomalejší než v analytických disperzích, klesá s rostoucí velikostí částice a roste se stoupající teplotou. Praktické využití difúze v této práci bude zmíněno v kapitole 4.3 experimentální části v souvislosti s difúzními celami [30].

2.7 Dialýza

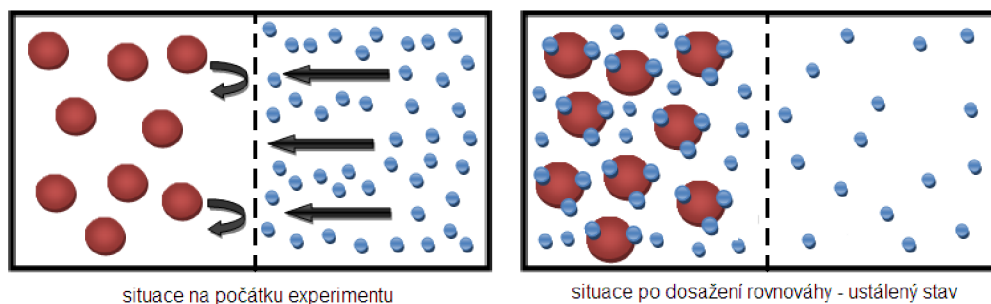
Spadá do separačních membránových procesů, jejichž hnací silou je rozdíl chemických potenciálů. Využívá přirozených či umělých semipermeabilních membrán, které dovolují volný vstup malým molekulám (zde tenzidy), zatímco velké molekuly (zde huminové kyseliny) skrze tuto membránu neprojdou. Malé molekuly difundují, dokud se nevyrovná jejich koncentrace na obou stranách membrány. Systém se tak dostane do ustáleného stavu, kdy molekuly přes membránu pozorovatelně neprostupují, tedy rychlost difúze oběma směry je shodná. Pro urychlení procesu dialýzy musí být po celou její dobu udržen dostatečný koncentrační spád. Buď použitím velkého množství dialyzačního roztoku, nebo jeho častou výměnou. Rychlost dialýzy je také závislá na ploše dialyzační membrány: čím větší je plocha, tím rychleji mohou malé molekuly projít skrze ni.

Charakteristickým parametrem každé membrány je tzv. cut-off hodnota (MWCO = molecular weight cut-off), což je limitní velikost molekul, které je membrána schopna propustit. Větší molekuly by měly být membránou zadrženy. Místo „cut-off hodnoty membrány“ se často používá ekvivalentního pojmu „velikost pórů membrány“ a obojí se udává v Daltonech (Da), např. 0,5 kDa.

Důležitým příkladem využití dialýzy v praxi je hemodialýza, tedy metoda v klinické medicíně užívaná pro čištění krve při špatné funkci, respektive selhání ledvin. V oblasti chemie je dialýza využívána i při přečišťování biopolymerů od nízkomolekulárních iontů. Velikost iontů, které se mají z roztoku biopolymerů odstranit, regulujeme právě pomocí zmíněného parametru membrány tzv. hodnoty cut-off (MWCO) [31].

2.8 Zdánlivá rovnovážná konstanta K_{app}

V případě, že máme k dispozici dvě komory oddělené semipermeabilní membránou (u nás dvě stejné difúzní komory oddělené vhodnou dialyzační membránou, tzv. difúzní celu), jednu se supramolekulami (v našem případě s roztokem huminových kyselin, tzv. přijímací komoru) a druhou s membránovým permeantem (v našem případě s roztokem kationaktivního tenzidu Septonexu, tzv. zdrojovou komoru), dochází dle předpokladů k následující situaci, zachycené na Obrázku 7:



Obrázek 7: Schéma interakce v difúzní cele (HK znázorněny červenohnědě, Septonex modře)

Membránový permeant se šíří přes semipermeabilní membránu ze zdrojové komory do přijímací komory, protože díky malé velikosti svých molekul není membránou v pohybu nijak omezen.

Pokud by difundující Septonex v přijímací komoře nebyl ovlivněn (neinteragoval by s) huminovými kyselinami (HK), došlo by po čase pouze k vyrovnání jeho koncentrace v obou komorách, nic víc, protože přítomné supramolekuly huminových kyselin jsou na průchod membránou příliš velké a zůstávají v původní komoře.

Při reálně probíhající interakci (jedná se tedy o difúzi s chemickou reakcí) mezi huminovými kyselinami (HK) a Septonexem, kdy supramolekuly huminových kyselin vážou na sebe část molekul permenantu (Septonexu), dochází v obou celách k vyrovnávání koncentrací pouze volného permeantu. V okamžiku dosažení rovnovážného stavu bude množství permeantu v komoře na straně supramolekul vyšší o permeant vázaný. Tento rozdíl lze využít pro stanovení rovnovážných a vazebných konstant.

Z právě popsaného lze vycházet při **stanovení zdánlivé rovnovážné konstanty K_{app}** , která udává míru interakcí – v našem případě mezi huminovými kyselinami a Septonexem skrze poměr koncentrace tenzidu vázaného na huminové kyseliny vůči koncentraci volného tenzidu v komorách **pro systém v rovnováze**. Platí tedy rovnice (4):

$$K_{app} = \frac{[\text{tenzid vázaný}]}{[\text{tenzid volný}]} \quad (4)$$

Pokud konstanta K_{app} nabývá hodnoty vyšší než 1, indikuje posun rovnováhy sorpčních procesů směrem k produktům. Naopak hodnoty nižší než 1 naznačují slabší tendenci Septonexu a huminových kyselin interagovat, tedy posun rovnováhy sorpčních procesů směrem k výchozím látkám. Při $K_{app} = 0$ k interakcím nedochází.

Pro konstantu se užívá označení „zdánlivá“, jelikož závisí jen na molárních koncentracích tenzidu a neuvažuje vliv koncentrace vazebných skupin huminových kyselin na posun interakční rovnováhy.

K odvození použitelného vztahu pro stanovení konstanty K_{app} je třeba vydefinovat podmínky jeho platnosti:

Protože objem roztoků je stejný a neměnný v obou užitých komorách (tedy ve zdrojové se Septonexem i přijímací s huminovými kyselinami) a zvolená membrána tenzid nesorbuje, platí, že výchozí koncentrace tenzidu c_0 na počátku experimentu je dána součtem tří příspěvků – viz rovnice (5), která platí po celou dobu difúzního procesu:

$$c_0 = c_{\text{vázaná na HK}} + c_{\text{volná, zdroj. komora}} + c_{\text{volná, příj. komora}} \quad (5)$$

c_0 je koncentrace tenzidu ve zdrojové komoře na počátku experimentu,
 $c_{\text{vázaná na HK}}$ je koncentrace tenzidu navázaného na huminové kyseliny (HK),
 $c_{\text{volná, zdroj. komora}}$ je koncentrace volného tenzidu ve zdrojové komoře,
 $c_{\text{volná, příj. komora}}$ je koncentrace volného tenzidu v přijímací komoře.

Naší snahou je určit vázanou koncentraci tenzidu $c_{\text{vázaná na HK}}$, kterou vyjádříme z předchozí rovnice (5). Tím dojdeme k rovnici (6):

$$c_{\text{vázaná na HK}} = c_0 - c_{\text{volná, zdroj. komora}} - c_{\text{volná, příj. komora}} \quad (6)$$

Ve stavu rovnováhy platí vztah (7):

$$c_{\text{volná, zdroj. komora}} = c_{\text{volná, příj. komora}} \quad (7)$$

Jeho využitím se rovnice (6) změní na rovnici (8):

$$c_{\text{vázaná na HK}} = c_0 - 2 \cdot c_{\text{volná, zdroj. komora}} \quad (8)$$

Definiční vztah (4) pro zdánlivou rovnovážnou konstantu K_{app} tím získá tvar rovnice (9):

$$K_{app} = \frac{c_0 - 2 \cdot c_{\text{volná, zdroj. komora}}}{c_{\text{volná, zdroj. komora}}} \quad (9)$$

Po úpravě dostaneme její konečnou podobu, viz rovnice (10):

$$K_{app} = \frac{c_0}{c_{\text{volná, zdroj. komora}}} - 2 \quad (10)$$

2.9 Zdánlivý parametr interakcí δ_{app}

Jelikož v difúzní cele s huminovými kyselinami a Septonexem **nebylo dosaženo rovnováhy** ani po dlouhých 144 hodinách, pro hodnocení výsledků experimentu nemůže být použita zdánlivá rovnovážná konstanta K_{app} . V tomto případě slouží ke stejnému účelu **zdánlivý parametr interakcí δ_{app}** .

Veškerý prodifundovaný tenzid se v uvedené nerovnovážné fázi difúzního děje díky své afinitě k huminovým kyselinám nachází ve formě vázané na huminové kyseliny. Výchozí koncentrace tenzidu c_0 se v tomto případě skládá pouze ze dvou příspěvků a z obecné rovnice (5) se tak dostaneme k rovnici (11). Z ní úpravou k rovnici (12):

$$c_0 = c_{\text{vázaná na HK}} + c_{\text{volná, zdroj. komora}} \quad (11)$$

$$c_{\text{vázaná na HK}} = c_0 - c_{\text{volná, zdroj. komora}} \quad (12)$$

Výsledný vztah pro zdánlivý parametr interakcí δ_{app} , jež dává do poměru koncentrace tenzidu vázaného a volného v nerovnovážném stavu difúze pak dostává podobu rovnice (13):

$$\delta_{app} = \frac{c_0 - c_{\text{volná, zdroj. komora}}}{c_{\text{volná, zdroj. komora}}} \quad (13)$$

Po úpravě dostaneme jeho konečnou podobu, viz rovnice (14):

$$\delta_{app} = \frac{c_0}{c_{\text{volná, zdroj. komora}}} - 1 \quad (14)$$

3 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

3.1 Možné metody pro stanovení tenzidů

Cílem této práce je blíže prozkoumat interakce huminových látek s povrchově aktivními látkami – tenzidy. Proto následuje výčet možných přístupů ke stanovení tenzidů, včetně výhod i nevýhod těchto přístupů. Metody vybrané pro optimalizaci kationaktivních (zde Septonex) a anionaktivních tenzidů (zde SDS) jsou popsány v experimentální části, v kapitolách 4.4 a 4.5.

Stanovení tenzidů ve vodách se často provádí skupinovým stanovením všech druhů tenzidů a výsledky se uvádějí jako hmotnostní koncentrace zvoleného standardu v $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$, výsledky jsou však závislé na zvoleném standardu. Jednotlivé tenzidy totiž vykazují různou citlivost k danému činidlu. Nejčastější metodou pro stanovení všech skupin tenzidů je metoda spektrofotometrická, založená na tvorbě barevného komplexu mezi tenzidem a opačně nabitým barvivem a jeho následná extrakce do organického rozpouštědla. Intenzita zbarvení organického extraktu je při tom závislá na množství tenzidu v roztoku [32].

3.1.1 Fotometrické metody

Často je při stanoveních využíván způsob, kdy se analyzované látky (zde čirý roztok tenzidu) po přidavku vhodného činidla (opačně nabitého než daný ionický tenzid) převedou na barevný elektroneutrální komplex, který jde vytřepat do organického rozpouštědla a fotometricky stanovit. Fotometrické stanovení je vhodné především pro ionické tenzidy. Pro neionické tenzidy je postup extrakce složitější (viz Stanovení neiontových tenzidů s tetrathiokyanatokobaltnatanem amonným), jelikož jejich hydrofilní část molekuly je výborně rozpustná ve vodě [23].

Stanovení aniontových tenzidů methylenovou modří – rozhodčí metoda

Rozhodčí metoda patří mezi nejdéle používané. Jejím principem je reakce aniontového tenzidu s methylenovou modří (kationické barvivo) za tvorby modře zbarveného iontového páru extrahovatelného do trichlormethanu (neboli chloroformu). Sulfatované a sulfonované aniontové tenzidy (například SDS) tvoří s kationtovým barvivem ve vodném prostředí iontový asociál s poměrem molekul 1:1. Základem pro fotometrické stanovení je stálost barevného modrého komplexu a jeho snadná extrahovatelnost do organického rozpouštědla. Absorbance se měří při 650 nm na spektrofotometru [33].

Stanovení kationtových tenzidů s bromfenolovou modří

Metoda je založená na tvorbě barevných iontových párů s aniontovým barvivem (bromfenolovou modří). Při výskytu aniontových tenzidů společně s kationtovými je nejprve třeba izolovat kationtové tenzidy ze vzorku (k separaci se využívají měniče iontů), aby bylo možné stanovit kationtové tenzidy spektrofotometricky. Kationtové tenzidy tvoří v kyselém vodném prostředí barevný iontový pár s aniontovým barvivem bromfenolovou modří. Tento žlutě zbarvený komplex je snadno extrahovatelný do trichlormethanu, zatímco nezreagované barvivo zůstává rozpuštěno ve vodném roztoku. Intenzita zbarvení trichlormethanového

extraktu je přímo úměrná koncentraci stanovovaného kationtového tenzidu. Absorbance se měří na spektrofotometru při 416 nm proti trichlormethanu [32, 34].

Stanovení kationtových tenzidů s disulfinovou modří

Metoda odpovídá stanovení bromfenolovou modří s použitím disulfinové modře jako standardu. Kationtové tenzidy tvoří s disulfinovou modří modře zbarvený komplex měřitelný při vlnové délce 625 nm. Oproti stanovení tenzidů s bromfenolovou modří je tato metoda lépe reprodukovatelná a má větší citlivost. Ve srovnání s výše uvedenými metodami má tato technika větší koncentrační rozsah tenzidu, který lze stanovit. Bohužel je také více citlivá na rušivé vlivy kationtových tenzidů [32, 34].

Stanovení neiontových tenzidů s tetrathiokyanatokobaltnatanem amonným

Metoda založená na tvorbě barevného komplexu tenzidu s barvivem. Neiontové tenzidy se v přítomnosti thiokyanatanu amonného a dusičnanu kobaltnatého srážejí se vzniklým anionem $[\text{Co}(\text{CNS})_4]^{2-}$ za vzniku modrého komplexu, který je snadno extrahovatelný do organického rozpouštědla. Po rozpuštění barevného komplexu tenzid-rozpouštědlo je měřena jeho absorbance při vhodné vlnové délce (1,2-dichlorethan 620 nm, UV 318 nm – menší citlivost) [23].

3.1.2 Skupinové metody stanovení

Nejčastěji se využívají pro analýzu neiontogenních tenzidů (pokud je počet ethoxylových jednotek menší než tři, metoda stanovení není citlivá). Tyto metody jsou založeny na reakci polyethylenoxidového řetězce tenzidů (čím větší počet jednotek v řetězci, tím větší citlivost stanovení). V řetězci etherově vázané atomy kyslíku reagují jako polyoxoniové sloučeniny, jež mají za daných podmínek zásaditý charakter. Při reakci dochází k protonaci atomu kyslíku ve vazbě $-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2-$ a vytvoří se oxoniová sůl, která podléhá nukleofilní substituci za vzniku komplexní sloučeniny s vhodným anionem. Tvorba polyoxoniové struktury je podmíněna přítomností elektrolytu a volné kyseliny v roztoku, jako oxoniační elektrolyt se používají soli, nejčastěji BaCl_2 . Ke srážení vzniklých komplexů se používají buď heteropolykyseliny (wolframatofosforečná, molybdatofosforečná, wolframatokřemičitá) nebo soli. Vzniklý komplex je nutno izolovat ze vzorku a stanovit gravimetricky nebo fotometricky [35].

Metody neposkytují informace o struktuře tenzidů, ani o délce řetězce analyzované sloučeniny. Výsledky všech přítomných tenzidů se uvádějí jako hmotnostní koncentrace zvoleného standardu v $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ [35].

3.1.3 Titrační metody

Jde o odměrné stanovení tenzidů ve vodách. Pro neiontové tenzidy následuje titrační metoda po úpravě. Iontové tenzidy se touto metodou dají stanovit bez předchozích úprav. Titrace probíhají dvoufázově – v prostředí vody a organického rozpouštědla [23].

Pro stanovení vyšší koncentrace aniontových tenzidů se využívá odměrná metoda dvoufázové titrace. Metoda je založena na interakci iontového tenzidu obsaženého ve vzorku vody s iontovým tenzidem, který se používá jako titrační činidlo. Titrace probíhá

ve dvoufázovém prostředí (systém voda a málo polární organické rozpouštědlo), navíc nezbytnou podmínkou je, aby tenzid odměrného roztoku měl opačný náboj než stanovovaný tenzid ve vzorku vody. Produktem titrace je sloučenina, která nenese náboj, ale má přesné stechiometrické složení a je velmi málo rozpustná ve vodě [36, 37].

3.1.4 Mobilní analytika (se spektrofotometrickým stanovením)

Principem je chemická reakce mezi sledovanou látkou – tenzidem a chemickým činidlem (jeho přesné složení je obchodním tajemstvím), která vede ke vzniku barevné sloučeniny. Stupeň vybarvení lze vyhodnotit a určit tak koncentraci výchozí látky obsažené ve vzorku. Pro stanovení všech typů tenzidů se uplatňují fotometrické SpectroquantR kyvetové testy. Lze zakoupit celou sadu obsahující návody na stanovení tenzidů s veškerým potřebným příslušenstvím (přístroj se spektrofotometrickou koncovkou, speciální kyvety i chemikálie) [36, 37].

Kationtové tenzidy na bázi kvartérních amoniových solí tvoří s anionaktivním barvivem disulfínovou modří iontové páry, extrahovatelné do organického rozpouštědla, modré zbarvení organické fáze se stanoví spektrofotometricky, metoda se používá pro stanovení koncentrací 0,05 až 1,5 mg·l⁻¹ [36, 37].

Aniontové tenzidy sulfonátového a sulfátového typu s bazickým barvivem methylenovou modří tvoří iontové páry extrahovatelné chloroformem, vhodné ke spektrofotometrickému stanovení. Metoda se používá pro stanovení koncentrací od 0,05 až 2,0 mg·l⁻¹ [36, 37].

Neiontové tenzidy reagují s indikátorem TBPE (tetrabromofenolftalein-ethyl-ester, sodná sůl) za vzniku komplexu extrahovatelného do dichlormethanu, zelené zbarvení organické fáze je měřeno spektrofotometricky. Metoda se používá pro stanovení koncentrací od 0,1 až 7,5 mg·l⁻¹ [36, 37].

3.1.5 Měření vodivosti

Měření vodivosti se dá využít pouze u ionických tenzidů. Stanovení je dále omezeno přítomností elektrolytů. Při vyšších koncentracích elektrolytů se snižuje citlivost stanovení. Při zvyšování koncentrace tenzidu v roztoku je vodivost dána disociací jednotlivých molekul ionického tenzidu. V okamžiku vzniku micel (kritické micelární koncentrace) se vodivost systému snižuje. Provádí se metodou konduktometrické titrace – do kádinky s destilovanou vodou je mikropipetou přidáváno vypočtené množství tenzidů a po promíchání a ustálení je zapsána změna vodivosti [38, 39].

3.1.6 Měření změny povrchového napětí

Tento způsob je jednou z nejuniverzálnějších metod. Měření je prováděno pomocí tenziometru. Do kádinky se napipetuje známé množství tenzidu a doplní destilovanou vodou, po promíchání a ustálení se odečte povrchové napětí; je to možné pouze do dosažení hodnoty kritické micelární koncentrace [38, 39].

3.2 Metody stanovení anionaktivních tenzidů

Pro kvantitativní stanovení anionaktivních tenzidů ve vodných roztocích byla použita metoda založená na tvorbě zeleně zbarveného iontového asociátu mezi dodecylbenzensulfonátem sodným (SDBS) a kationtovým barvivem Brilliant Green (BG) v kyselém prostředí. Spektrální změny barviva po přidání dodecylbenzensulfonátu sodného byly studovány viditelnou spektrofotometrií při fixní vlnové délce 627 nm, odpovídající absorpčnímu maximu. Přidání SDBS ve větších koncentracích, nežli byla kritická micelární, modifikovalo spektrum vodných roztoků kationtového barviva Brilliant Green. Bylo zaznamenáno snížení absorpce kationtového barviva, což ukazovalo na tvorbu iontového páru. Interakce a micelární vlastnosti tenzidu a kationtového barviva se také zkoumaly metodou povrchového napětí. Zjistilo se, že mezi hlavní parametry ovlivňující vznik iontového páru, patřily: hodnota pH, molární poměr [barvivo] / [tenzid] a doba protřepávání roztoků. Měření povrchového napětí spolu se studií používající metodiku povrchové odezvy potvrdily tvorbu komplexu skrze elektrostatické a hydrofobní interakce mezi kationtovým barvivem a tenzidem. Uvedená studie jednoznačně poukazuje na použitelnost této optimalizované metody, která poprvé určila míru znečištění odpadních vod v Alžírském zálivu aniontovými povrchově aktivními látkami bez extrakce kapalina-kapalina [40].

Pro detekci a stanovení aniontových tenzidů sulfonátových a sulfátových typů byla také popsána jednostupňová spektrofotometrická metoda s jedním reakčním činidlem. Obě aplikace jsou založeny na přeměně bezbarvých leukopolymerů trifenylmethanovým barvivem (Brilliant Green a methyl violet) na barevné (chinoidní) formy aniontovými povrchově aktivními látkami. Kvantitativní metoda v režimech absorpce a odrazivosti je použitelná pro aniontové povrchově aktivní látky v rozsahu 0 až 1500 ppm [41].

Dále byla studována jednoduchá metoda pro spektrofotometrické stanovení aniontové povrchově aktivní látky dodecylbenzensulfátu sodného ($0-15 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$). Iontový asociát vzniklý mezi dodecylsulfátem sodným (SDS) a Rhodaminem 6G byl adsorbován na stěnu nádoby z PTFE (polytetrafluorethylenu) intenzivním protřepáváním. Po odstranění výsledného roztoku byl iontový asociát rozpuštěn v methylcelosolu a jeho absorpce byla měřena při 534 nm. Tato nová metoda je citlivá, snadno proveditelná a nevyžaduje použití toxických rozpouštědel při stanovení aniontových tenzidů [42].

3.3 Metody stanovení kationaktivních tenzidů

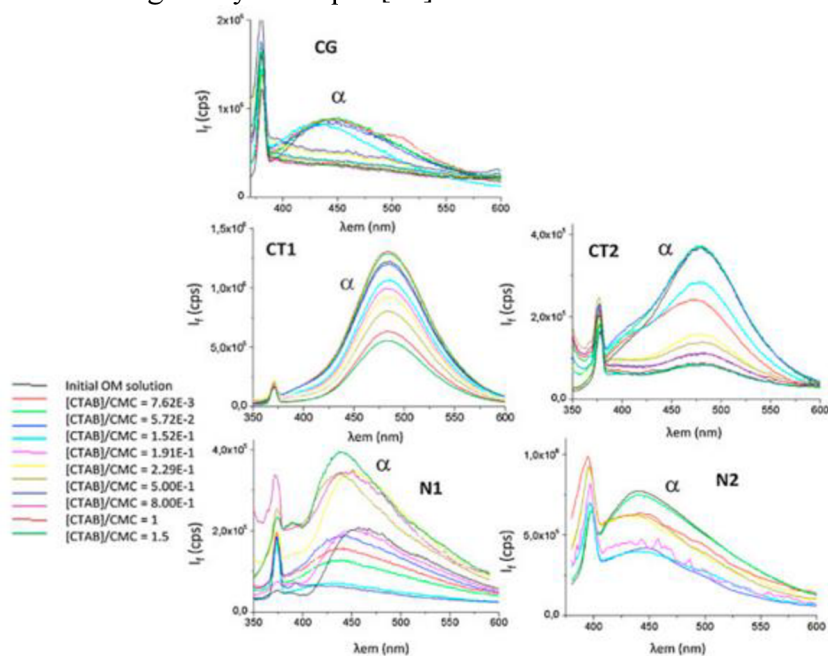
Pro stanovení kationtových tenzidů v průmyslových odpadních vodách byla použita metoda extrakční spektrofotometrie s využitím aniontového barviva Patent Blue V. Tato metoda je založená na tvorbě iontového páru mezi barvivem a kationtovým tenzidem (zde CTAB = cetyltrimethylamonium bromid) v chloroformu při daných podmínkách extrakce. Maximální vlnová délka absorpce pro iontový pár činí 627 nm. Výsledná kalibrační křivka byla lineární až do $5,48 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$, a vykazovala vysokou hodnotu koeficientu spolehlivosti. Metoda je velice citlivá a mez detekce velmi nízká ($8,6\cdot 10^{-8} \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ CTAB). Bylo zjištěno, že pro organický extrakt je nutný promývací krok k odstranění interferencí od cizích iontů v neznámých vzorcích. Metoda byla použita pro stanovení kationtových tenzidů z odpadních vod textilního průmyslu v oblasti Alžíru a ověřena jako vyhovující [43].

Další spektrofotometrická metoda pro stanovení kvartérních amoniových solí je založena na extrakci anionického barviva Orange II do chloroformu z vodného roztoku kationického tenzidu. Výsledky ukázaly, že barvivo reagovalo s kationaktivním tenzidem ve stechiometrickém poměru 1:1 [44].

Těž byla navržena spektrofotometrická metoda pro stanovení kationtových povrchově aktivních látek, jako je cetylpyridiniumchlorid, cetyltrimethylamoniumbromid a zephiramin. Metoda je založena na tvorbě ternárních komplexů s Fe (III) a Chromem Azurolem S (indikátor). Molární poměr komplexu je 2: 1: 1 (Fe (III): chrom azurol S: kationtová povrchově aktivní látka). Metoda je jednoduchá, rychlá a citlivá, dávající lineární rozsah od 0,1 do 6,0 $\mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ kationtových povrchově aktivních látek. Celkový obsah kationtových povrchově aktivních látek může být stanoven přímo ve vodných roztocích měřením absorbance při 680 nm (pH = 5,8). Metoda byla úspěšně aplikována u vzorků vody [45].

3.4 Studium interakcí huminových látek s tenzidy

Předmětem studia byla vazba kationtového tenzidu - cetyltrimethylamoniumbromid (CTAB) a neiontových nonylfenol ethoxylátů (NPE) na přírodní huminové látky (HL). U neiontového surfaktantu nebyl zaznamenán rozdíl ve fluorescenčních spektrech HL a tedy nedošlo k žádné výrazné interakci mezi NPE a HL. Avšak přidání kationtového CTAB umožnilo pozorovatelné změny ve fluorescenční charakteristice HL, což indikovalo vznik vazby. Příklad fluorescenčních spekter zachycuje Obrázek 8. Hlavním opodstatněním těchto reakcí byly interakce elektrostatické, avšak nelze vyloučit ani hydrofobní charakter vazby. Komplexní mechanismus je v podstatě řízen neutralizací náboje, která může být sledována specificky fluorescencí organických skupin [46].



Obrázek 8: Fluorescenční emisní spektra (α fluorofor) huminových sloučenin v přítomnosti různých koncentrací CTAB [46]

Dále byl studován vznik komplexů mezi huminovými kyselinami (HK) a kationtovými povrchově aktivními látkami – konkrétně s hexadecyltrimethylamoniumbromidem neboli CTAB. HK s CTAB začaly vykazovat interakci, avšak při nižších koncentracích CTAB byly komplexy rozpustné. Sraženiny mezi HK a CTAB se vytvořily při 20, 30 a 50 mM CTAB (a izolovány filtrací), zatímco rozpustné komplexy byly pozorovány při 1, 5, 10 a 40 mM CTAB. Sraženiny i rozpustné komplexy byly zkoumány pomocí metody založené na detekci rozptylu světla rentgenových paprsků. Chování vznikajících komplexů (mezi CTAB a HK) bylo vysvětleno na základě neutralizace náboje mezi anionty HK a micelami CTAB, a následné obrácení náboje v důsledku hydrofobních interakcí. Mezi těmito komplexy vznikla vazba prostřednictvím elektrostatické interakce s hydrofilními (kationickými) skupinami CTAB a anionickými funkčními skupinami HK [47].

Dále se zkoumala i možnost interakce aniontové povrchově aktivní látky (dodecylsulfát sodný, SDS) a dvou kationtových povrchově aktivních činidel (dodecyl- a cetylpyridiniumchlorid, DPC a CPC) na purifikované huminové kyseliny (HK). Při daném pH 5, 7 a 10, a iontové síle 0,025 M se mezi aniontovým povrchově aktivním činidlem (SDS) a purifikovanou HK nepozoruje žádná významná vazba, zatímco dvě kationtová povrchově aktivní činidla (DPC, CPC) se silně vážou na purifikované HK ve zkoumaném rozsahu pH. Komplexy kationtových povrchově aktivních látek se s purifikovanou HK srážejí, jakmile se dosáhne bodu neutralizace náboje. Vazba je způsobena jak elektrostatickou, tak hydrofobní přitažlivostí. Počáteční afinita se zvyšuje se zvyšujícím se pH (tj. záporným nábojem purifikované HK) a délkou hydrofobního konce surfaktantu. Z této studie tedy vyplývá, že HK jsou silně ovlivňovány byť malými koncentracemi kationtových tenzidů [48].

Byly studovány i povrchové vlastnosti vodných roztoků směsí huminových kyselin (HK) s řadou kationtových povrchově aktivních látek obecného tvaru CTAB, avšak s různou délkou uhlovodíkového řetězce. Zjistilo se, že již malé množství CTAB ve vodném roztoku HK má obrovský vliv na snížení povrchového napětí vody. Pokles povrchového napětí je spojen s rostoucí délkou alkylového řetězce CTAB. To vedlo k závěru, že proces srážení HK a CTAB byl přiřazen k tvorbě micel vyvolanou HK [49].

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Použité pomůcky a přístroje

- Difúzní cely (PermeGear)
- Držáky na difúzní cely
- Dialyzační membrána z acetátu celulózy o velikosti pórů 0,5 kDa (Spectrum – Spectra/Por Biotech, průměr membrány 20 mm)
- Vícemístná magnetická míchačka (Cimarec i Poly) a magnetická míchadla
- pH metr (Mettler Toledo)
- Tuk na vymazání zábrusů (Lucosan, Lučební závody Kolín)
- UV-VIS spektrofotometr HITACHI U-3900H
- Elektrický ohřivač (Eta 2107)
- Uzavíratelné křemenné kyvety optické délky 1 cm
- Běžné vybavení laboratoře

4.2 Použité chemikálie

- Standard huminových kyselin IHHS Leonardite (1S104H-5)
- Modifikovaný (methylovaný) standard huminových kyselin IHSS Leonardite
- Septonex, GNB chem, a.s. (511SEP003)
- Dodecylsírán sodný, Lach-Ner (302790205)
- Ethanol, Penta
- Hydroxid sodný, Penta (1905160514)
- Kyselina chlorovodíková 35%, Penta (2106280616)
- Kyselina sírová, Lach-Ner (PP/2018/05340)
- Disulfínová modř (neboli Patent blue V), Sigma Aldrich (BCBP2802V)
- Methylenová modř, Penta (1801300113)
- Chloroform, Sigma Aldrich (stabilizovaný amylenem)
- Dekahydrát tetraboritanu sodného, Sigma Aldrich (SZBF1660V)

4.3 Dialyzační experimenty

Předmětem této práce je studium interakcí mezi huminovými kyselinami a tenzidy pomocí difúzní a dialyzační techniky a posoudit vliv modifikace huminových kyselin na tyto interakce. Modifikace huminových kyselin spočívá v methylaci – tedy selektivní blokaci karboxylových skupin na huminových kyselinách (z tvaru $-\text{COOH}$ na $-\text{COOCH}_3$). Tímto krokem se zabrání disociaci karboxylových skupin, kterým je díky jejich vysokému zastoupení v huminových kyselinách připisována významná role při interakcích. K těmto experimentům jsou využívány **difúzní cely** – zařízení sloužící k difúzním experimentům v kapalných roztocích. Skládají se ze dvou oddělitelných komor, mezi něž lze vložit porézní přepážku v podobě membrán (zde dialyzační membránu) nebo tuhých či polotuhých vzorků uchycených ve vhodné formě (například hydrogelů). Každou komoru tvoří vnitřní a vnější plášť. Vnější plášť je průtočný a je určen k zajištění konstantní teploty experimentu, vnitřní plášť slouží k realizování samotného experimentu [50].

V těchto experimentech byl do jedné komory nalit roztok huminových kyselin (či modifikovaných huminových kyselin) a do druhé komory roztok Septonexu. Mezi nimi

byla upevněna dialyzační membrána s velikostí pórů 0,5 kDa. Tento parametr membrány, udávající limitní velikost molekul schopných projít skrze ni, byl experimentálně zvolen tak, aby přes membránu procházel pouze Septonex a nikoliv huminové kyseliny – viz kapitola 4.3.3. Difúzní cely přichystané k měření zachycuje Obrázek 9.



Obrázek 9: Sestavené difúzní cely

Vzhledem k tomu, že vlastní experiment je poměrně časově náročný (celý difúzní proces probíhal 144 hodin), byl pro účely této práce zvolen kationický tenzid Septonex, u něhož se předpokládala vyšší průkaznost interakcí s huminovými kyselinami než u tenzidů anionických.

V experimentech se tedy sleduje pokles koncentrace původního roztoku Septonexu o známé koncentraci ve zdrojové komoře, který prochází skrze dialyzační membránu do příjmové komory s roztokem huminových kyselin, kde s nimi interaguje, až do ustáleného stavu. Celý objem roztoku Septonexu byl ze zdrojové komory odebírán ve vhodně zvolených časových intervalech (24, 48, 72, 96, 120 a 144 hodin) až do dosažení ustáleného stavu (kvůli efektivitě činností se musí pracovat s více difúzními celami zároveň).

Roztok Septonexu je čirý a nelze přímo (například spektrofotometricky) stanovit jeho koncentraci. K tomu slouží optimalizovaná metoda Stanovení koncentrace kationaktivních tenzidů s disulfínovou modří: Roztok Septonexu je odebírán z cely v daném časovém intervalu a doplněn do 100 ml vodou; takto připravený vzorek je použit ke stanovení, koncentrace Septonexu je pak přepočtena s ohledem na ředění vzorku.

4.3.1 Příprava roztoků pro dialyzační experimenty

Pro studium interakcí mezi huminovými kyselinami a Septonexem byla zvolena koncentrace huminových kyselin $50 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ a koncentrace Septonexu ve třech variantách: 5, 10 a $15 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$. Do každé z komor difúzních cel se vpravilo vždy 60 ml roztoku.

- Příprava roztoků Septonexu o koncentracích 5, 10 a $15 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$: naředěním ze zásobního roztoku Septonexu o koncentraci $20 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ s ohledem na výsledný objem 60 ml.
- Příprava roztoku huminových kyselin o koncentraci $50 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$: navážka 0,0125 g huminových kyselin se rozpustí přes noc na magnetické míchačce ve 200 ml vodného roztoku upraveného na $\text{pH} = 10$ pomocí roztoku $0,5 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ NaOH vzhledem

k rozpustnosti huminových kyselin ve vodných roztocích. Rozpuštěný pevný podíl v podobě huminových kyselin se upraví na $\text{pH} = 7$ (několik kapek $1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ roztoku HCl) a doplní se vodou na 250 ml. Po přefiltrování přes filtrační papír je roztok připraven k použití.

- Příprava roztoku modifikovaných (methylovaných) huminových kyselin o koncentraci $50 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$: navážka $0,0125 \text{ g}$ modifikovaných huminových kyselin se rozpustí přes noc na magnetické míchačce ve 200 ml roztoku $0,1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ NaOH . Rozpuštěný pevný podíl v podobě huminových kyselin se upraví na $\text{pH} = 7$ pomocí $0,5 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ roztoku HCl a doplní se vodou na 250 ml. Po přefiltrování přes filtrační papír je roztok připraven k použití.

4.3.2 Příprava difúzních cel a vzorků k měření

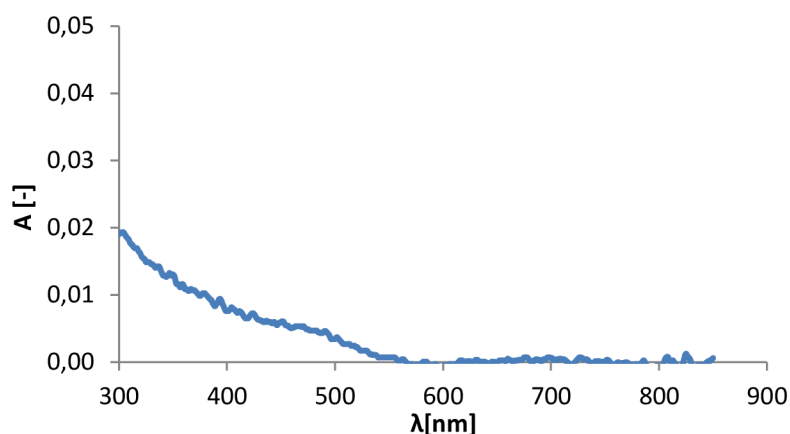
Čisté a suché komory difúzních cel byly na vnějších okrajích zlehka potřeny zábrusovým tukem. Z cívky, na níž byl navinut rukávec materiálu dialyzační membrány s velikostí pórů $0,5 \text{ kDa}$, byl odstřižen jednovrstvý aršík, následně promyt destilovanou vodou, upevněn na jednu komoru a zakroužením druhé komory připraven coby difúzní membrána v sestavené difúzní cele k použití. Po upevnění difúzní cely do držáku byla dovnitř vložena magnetická míchadla a pomocí malých nálevek současně nality roztoky Septonexu a huminových kyselin, oba o shodném objemu 60 ml do svých komor difúzní cely. Cely upevněná v držáku byla položena na vícemístnou míchačku rotující rychlostí 250 ot/min . Poté se prováděly odběry Septonexu po čtyřadvacetihodinových intervalech až do předpokládaného ustáleného stavu (po 144 hodinách difúze). Objem Septonexu odebraný z cely byl doplněn do 100 ml vodou a použit ke Stanovení koncentrace kationaktivních tenzidů s disulfinovou modří.

4.3.3 Zdůvodnění volby dialyzační membrány o velikosti pórů $0,5 \text{ kDa}$

Při experimentech s difúzními celami bylo třeba zajistit, aby přes dialyzační membránu procházel díky rozměrům svých molekul pouze Septonex a nikoli huminové kyseliny. Z tohoto důvodu se provedl test na propustnost (respektive nepropustnost) membrán pro zvolený standard huminových kyselin a to se třemi dialyzačními membránami, které se lišily velikostí pórů: $3,5 \text{ kDa}$, $1,0 \text{ kDa}$ a $0,5 \text{ kDa}$. Membrány byly upevněny do tří shodných difúzních cel shodně naplněných v jedné komoře roztokem huminových kyselin a v druhé komoře čistou vodou. Po 120 hodinách byla změřena absorbance u vzorků původně čisté vody.

Jako vyhovující se osvědčila membrána s velikostí pórů $0,5 \text{ kDa}$, u jejíhož vzorku vody byla naměřena zanedbatelná absorbance i u nižších vlnových délek (pod 400 nm), zatímco u vzorků od membrán s velikostmi pórů $3,5 \text{ kDa}$ a $1,0 \text{ kDa}$ byl v této oblasti spektra (pod 400 nm) pozorován její znatelný nárůst. Ten prokazoval přítomnost huminových kyselin v původně čistých vzorcích vody a tedy nevhodnost jejich použití pro zamýšlené účely.

Velikost molekul Septonexu (s hmotností $422,49 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$ [23]) je oproti huminovým kyselinám (s hmotnostmi v rozsahu $10\,000 - 70\,000 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$ [3]) malá, a tudíž Septonex prochází skrze membránu $0,5 \text{ kDa}$ bez problému, zatímco huminové kyseliny jsou jí zadržovány. Nárůst absorbance u nižších vlnových délek způsobený přítomností huminových kyselin ve vodě s použitím membrány o velikosti pórů $3,5 \text{ kDa}$ je znázorněn na Obrázku 10.



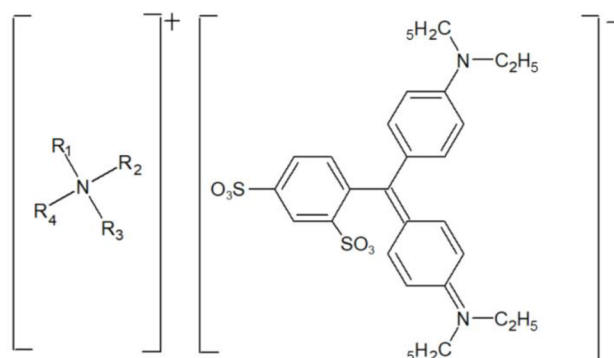
Obrázek 10: Nárůst absorbance u vzorku vody s membránou 3,5 kDa způsobený průchodem huminových kyselin

4.4 Stanovení koncentrace kationaktivních tenzidů s disulfínovou modří

Pro optimalizaci zvolené metody ke studiu interakcí mezi huminovými kyselinami a tenzidy bylo využito informací z knihy Chemické a fyzikální metody analýzy vod, v níž je řešena problematika stanovení ionických i neionických tenzidů [34]. Za standard kationaktivního tenzidu byl vybrán Septonex.

4.4.1 Princip

Kationaktivní tenzidy tvoří ve vodných kyselých roztocích ($\text{pH} > 2,7$) s anionickým barvivem - disulfínovou modří modře zbarvený komplex znázorněný na Obrázku 11. Tento barevný komplex kationaktivního tenzidu s alespoň jedním dostatečně dlouhým, přímým acyklickým uhlovodíkovým řetězcem je extrahovatelný do chloroformu. Nezreagovaná disulfínová modř zůstává rozpuštěna ve vodné fázi. Intenzita zbarvení chloroformového extraktu je úměrná obsahu kationaktivního tenzidu, a proto se dá stanovit spektrofotometricky při 625 nm. Citlivost metody závisí na struktuře zvoleného kationaktivního tenzidu jako standardu; již v roce 1986 se za standard pro tuto metodu navrhoval Septonex [34].



Obrázek 11: Schéma komplexu kationaktivního tenzidu s disulfínovou modří [34]

4.4.2 Použití

Metoda je vhodná pouze pro čisté vody. Při pokusu o stanovení vzorku tenzidu ze znečištěné vody se vytvoří na rozhraní vodné a chloroformové fáze stabilní emulze, která brání extrakci. Bez objemové úpravy vzorku před analýzou by mělo být možné stanovit koncentrace

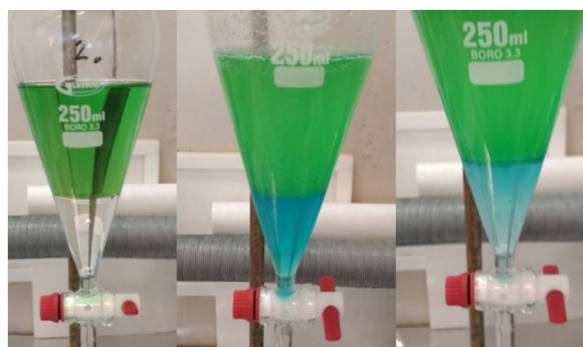
kationaktivních tenzidů (jako Septonex) v rozmezí $0,15 - 2 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ [34]. Experimentálně spektrofotometricky však šly po extrakci stanovit hodnoty až do koncentrací $8 - 10 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ bez objemové úpravy vzorku. Pro dosažení co nejpřesnějších výsledků stanovení, obzvlášť během kalibrace, je třeba všechny roztoky připravovat z čisté deionizované vody.

4.4.3 Příprava roztoků

- Disulfínová modř – zásobní roztok: 0,25 g disulfínové modři se rozpustí v 50 ml horkého vodného (10 obj. %) roztoku ethanolu a po ochlazení se tímto vodným roztokem doplní na 250 ml.
- Disulfínová modř – pracovní roztok: 20 ml výše uvedeného zásobního roztoku se smíchá s 30 ml 10 % roztoku kyseliny sírové (do 500 ml velké odměrné baňky s 300 ml vody se odměří 28 ml koncentrované H_2SO_4 s $\rho = 1,84 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$) a doplní destilovanou vodou na 500 ml.
- Septonex – standardní zásobní roztok o koncentraci $0,1 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$: Navážka Septonexu se rozpustí v destilované vodě a doplní na patřičný objem; roztok se uchovává v chladu a je stálý měsíc.
- Septonex – pracovní roztok o koncentraci $0,002 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$: Ze zásobního roztoku Septonexu se odpipetuje 10 ml a doplní na 500 ml destilovanou vodou. Tento roztok se využívá pro přípravu kalibračních roztoků.

4.4.4 Postup stanovení

Do dělicí nálevky o objemu 250 ml se odměří 25 ml chloroformu, 50 ml pracovního roztoku disulfínové modři a 100 ml vzorku tenzidu (nebo zředěného vzorku tenzidu) do maximální koncentrace $10 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$. Obsah nálevky se po dobu 1 min potřepává. Po oddělení fází se chloroformová vrstva vypustí do suché odměrné baňky o objemu 50 ml. Extrakce se opakuje ještě jednou, opět s objemem chloroformu 25 ml. Spojené extrakty se v odměrné baňce doplní čistým chloroformem na 50 ml. Absorbance extraktu se měří při vlnové délce 625 nm proti chloroformu, odpovídající absorpčnímu maximu. Její hodnota je stabilní pouze po dobu 24 hodin – je tedy nutné ji změřit co nejdříve po extrakci. Hmotnostní koncentrace kationaktivních tenzidů (jako je Septonex) ve vzorku v $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ je třeba odečíst z kalibračního grafu s ohledem na objem vzorku použitý k analýze [34]. Ukázky jednotlivých kroků během stanovení jsou zachyceny na Obrázku 12.



Obrázek 12: Zleva dělicí nálevka před protřepáváním, uprostřed po 1. extrakci a napravo po 2. extrakci

4.4.5 Rušivé vlivy

Rušivý vliv anionaktivních tenzidů se projevuje negativní chybou stanovení, protože konkurují disulfínové modři a samy reagují s kationaktivními tenzidy za vzniku pevnějšího komplexu než je komplex kationaktivní tenzid-disulfínová modř.

Z anorganických aniontů, běžně obsažených ve vodách, ruší ionty Cl^- (při $c_m(\text{Cl}^-) \geq 50 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$) a ionty NO_3^- (při $c_m(\text{NO}_3^-) \geq 10 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$); rušivý vliv se projevuje rovněž negativní chybou při stanovení. Rovněž ruší bílkoviny a jejich štěpné produkty, huminové kyseliny a ligninsulfonové kyseliny [34].

4.4.6 Kalibrace

Ze standardního roztoku Septonexu se připraví řada kalibračních roztoků o koncentracích $0,15 - 2 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$, viz Tabulka 3 [34].

Tabulka 3: Příprava kalibračních roztoků Septonexu

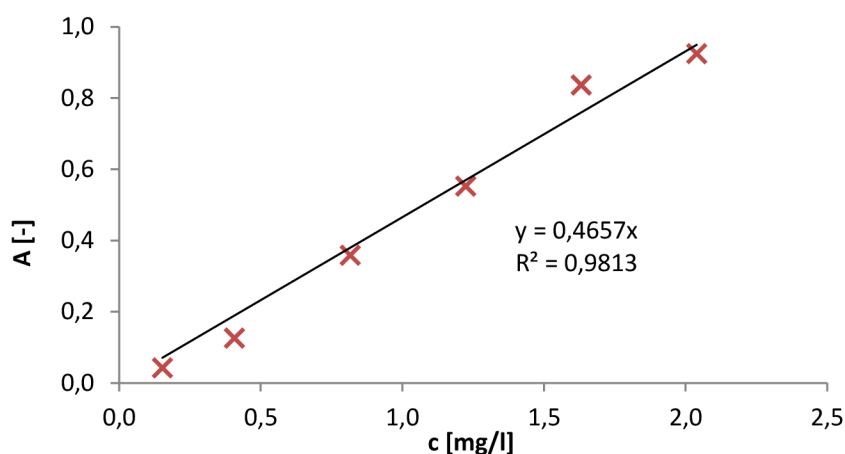
koncentrace Septonexu [$\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$]	0,15	0,4	0,8	1,2	1,6	2
objem pracovního roztoku Septonexu ve 100 ml vzorku [ml]	7,5	20	40	60	80	100

Dále se výše uvedeným postupem provede extrakce a následně se u chloroformových extraktů proměří absorbance. Chloroformové extrakty použité k sestrojení kalibrační závislosti jsou zachyceny na Obrázku 13.



Obrázek 13: Chloroformové extrakty Septonexu užití k sestrojení kalibrační závislosti

Z naměřených absorbancí sady kalibračních roztoků se sestrojí kalibrační závislost (vynesením absorbance proti hmotnostní koncentraci Septonexu). Matematicky aproximačně vyjádřená a graficky vynesená kalibrační závislost pro stanovení koncentrací neznámých vzorků Septonexu je znázorněna na Obrázku 14.



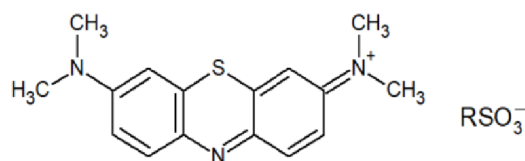
Obrázek 14: Kalibrační závislost Septonexu

4.5 Stanovení koncentrace anionaktivních tenzidů s methylenovou modří

Pro optimalizaci této metody bylo využito normy ČSN EN 903 (75 7534) a knihy Chemické a fyzikální metody analýzy vod, v níž je řešena problematika stanovení ionických i neionických tenzidů [33, 34]. Za standard anionaktivního tenzidu byl vybrán dodecylsírán sodný, neboli SDS.

4.5.1 Princip

Sulfatované a sulfonované anionaktivní tenzidy tvoří ve vodných roztocích s kationickým barvivem - methylenovou modří iontový asociát (komplex), extrahovatelný do chloroformu. Schéma tohoto komplexu je zachycen na Obrázku 15. Účinnost extrakce závisí na délce přímého acyklického uhlovodíkového řetězce aniontového tenzidu. V řetězci však musí být minimálně deset atomů uhlíku; s klesajícím počtem atomů uhlíku se účinnost extrakce barevného asociátu snižuje, protože zůstává ve vodné fázi. Z důvodu omezení rušivého vlivu látek bílkovinného charakteru, které mohou konkurovat methylenové modři při reakci s aniontovými tenzidy v kyselém prostředí, se extrakce nejprve provádí v prostředí alkalickém (pH = 10), a poté teprve v prostředí kyselém, v němž má komplex anionaktivního tenzidu s methylenovou modří modré zbarvení. Při pH > 7 se chloroformové extrakty i u slepého stanovení barví fialově, což je způsobeno produkty demethylace methylenové modři. Intenzita zbarvení modrého asociátu závisí na struktuře tenzidu a je úměrná jeho obsahu. Absorbance separované organické fáze se stanovuje spektrofotometricky při vlnové délce 650 nm, odpovídající absorpčnímu maximu. Vyhodnocení se provádí metodou kalibrační křivky v $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ použitého standardu. [33, 34].



Obrázek 15: Schéma komplexu anionaktivního tenzidu s methylenovou modří [34]

4.5.2 Použití

Metoda je vhodná pro koncentrační rozmezí 0,1 – 5,0 mg·l⁻¹. Spodní mez detekce pro roztok standardu v čisté vodě je 0,05 mg·l⁻¹. Experimentálně bylo možné vyextrahovat vzorek s maximální koncentrací tenzidu 15 mg·l⁻¹. Při vyšších koncentracích se vytváří na rozhraní vodné a chloroformové fáze stabilní emulze, která brání extrakci. U vzorků tenzidů, případně vzorků odebraných ze znečištěné vody, je doporučeno pracovat maximálně s 10 ml vzorku a provést objemovou úpravu, aby se opět předešlo vzniku emulze na rozhraní fází [33, 34]. Pro dosažení co nejpřesnějších výsledků stanovení, obzvláště během kalibrace, je vhodné všechny roztoky připravovat z čisté deionizované vody.

4.5.3 Příprava roztoků

- Methylenová modř – neutrální roztok: v odměrné baňce o objemu 1000 ml se rozpustí 0,350 g methylenové modři v destilované vodě a doplní po rysku. Je doporučeno roztok připravit alespoň 24 hodin před použitím.
- Methylenová modř – kyselý roztok: v odměrné baňce o objemu 1000 ml se v 500 ml destilované vody rozpustí 0,350 g methylenové modři a následně přidá 6,50 ml koncentrované kyseliny sírové ($\rho = 1,84 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$); po promíchání se roztok doplní destilovanou vodou po rysku. Je doporučeno roztok připravit alespoň 24 hodin před použitím.
- Tlumivý roztok tetraboritanu sodného s pH = 10: v odměrné baňce o objemu 1000 ml se v destilované vodě rozpustí 19 g dekahydrátu tetraboritanu sodného ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7\cdot 10\text{H}_2\text{O}$) a doplní destilovanou vodou po rysku.
- Dodecylsírán sodný (SDS) – standardní zásobní roztok o koncentraci 0,1 g·l⁻¹: V odměrné baňce o objemu 1000 ml se rozpustí 0,100 g SDS v destilované vodě a doplní po rysku. Zásobní roztok se uchovává v chladničce a vydrží stálý asi měsíc.
- Dodecylsírán sodný (SDS) – pracovní roztok o koncentraci 0,002 g·l⁻¹: Ze zásobního roztoku SDS se odpipetuje 10 ml a doplní na 500 ml vodou. Tento roztok se využívá pro přípravu kalibračních roztoků.

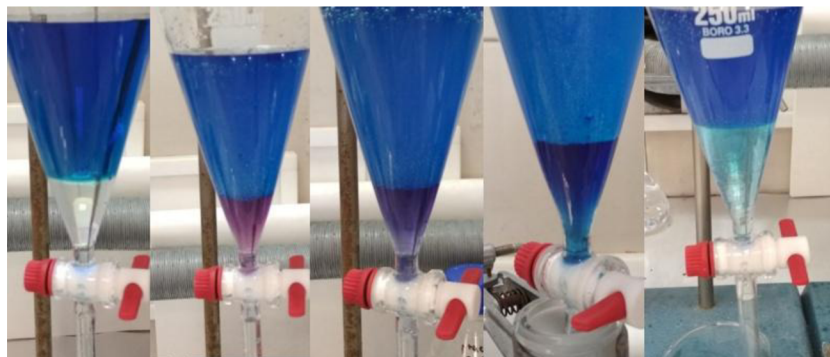
4.5.4 Postup stanovení

Pracuje se se dvěma dělicími nálevkami. Do první se převede 100 ml vzorku a přileje 10 ml tlumivého roztoku (pufru), poté se obsah promíchá a ještě přidá 5 ml neutrální methylenové modři s 10 ml chloroformu. Do druhé dělicí nálevky se odměří 100 ml destilované vody a 5 ml kyselého roztoku methylenové modři; obsah se promíchá.

Směs v první dělicí nálevce se 1 min protřepává a po oddělení fází se chloroformová vrstva vypustí do druhé dělicí nálevky. V první dělicí nálevce se postupně ještě dvakrát opakuje extrakce s 10 ml chloroformu a po 1 min protřepávání se opět vypouští do druhé dělicí nálevky (v první dělicí nálevce tedy třikrát probíhá extrakce s 10 ml chloroformu).

Druhá dělicí nálevka se po sesbírání všech tří chloroformových extraktů z první dělicí nálevky 1 min protřepává a po oddělení fází se chloroformová vrstva vypustí do kádinky. Ve druhé dělicí nálevce se postupně ještě dvakrát opakuje extrakce s 5 ml chloroformu a po 1 min se vypouští do k tomuto účelu vyhrazené kádinky; zde se postupně sesbírají všechny tři chloroformové extrakty (z druhé dělicí nálevky). Tyto se pak přefiltrují (přes nálevku s filtračním papírem) do odměrné baňky o objemu 50 ml a doplní čistým chloroformem po

rysku. Absorbance extraktu se měří při vlnové délce 650 nm proti chloroformu. Hmotnostní koncentrace anionaktivních tenzidů (jako SDS) ve vzorku v $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ je třeba odečíst z kalibračního grafu s ohledem na objem vzorku použitý k analýze [33, 34]. Ukázky jednotlivých kroků během stanovení jsou znázorněny na Obrázku 16.



Obrázek 16: Zleva: dělicí nálevka před protřepáváním; 3 obrázky uprostřed: po extrakci v 1. dělicí nálevce pro koncentrace SDS 0,1; 0,4 a 1,2 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$; napravo: po extrakci ve 2. dělicí nálevce

4.5.5 Rušivé vlivy

Stanovení koncentrace narušují aromatické sulfonany netenzidového typu, protože s methylenovou modří vytvářejí komplexy, které se též extrahují do chloroformu. Způsobují tedy pozitivní chybu stanovení.

Rušivý vliv kationaktivních tenzidů se projevuje negativní chybou stanovení, protože konkurují methylenové modři a samy reagují s anionaktivními tenzidy za vzniku pevnějšího komplexu, než je komplex anionaktivní tenzid-methylenová modř. Rušivý vliv bílkovin a aniontů (CN^- , NO_3^- , SCN^-) lze podstatně eliminovat extrakcí komplexu při $\text{pH} = 10$.

Rušivý vliv sulfidů, polysulfidů a thiosíranů se navrhoval odstranit přidávkem 10 ml tlumivého roztoku (pufry) a 30 obj. % roztoku peroxidu vodíku na každých 100 ml vzorku – po pěti minutách stání promíchané směsi lze přistoupit k vlastnímu stanovení (tlumivý roztok se pak již nepřidává).

Rušivý vliv barviv extrahovatelných za podmínek stanovení se vyloučí odečtením absorbance jejich extraktu, získaného při stejných podmínkách stanovení, ale bez přidavku methylenové modři [33, 34].

4.5.6 Kalibrace

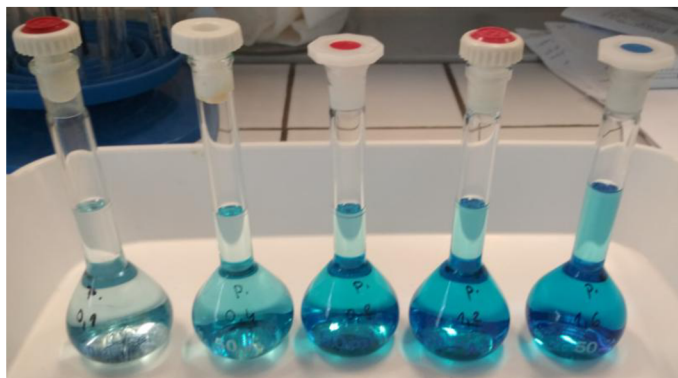
Ze standardního roztoku dodecylsíranu sodného (SDS) se připraví sada kalibračních roztoků o koncentraci 0,15 – 2 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ [33, 34], viz Tabulka 4.

Tabulka 4: Příprava kalibračních roztoků SDS

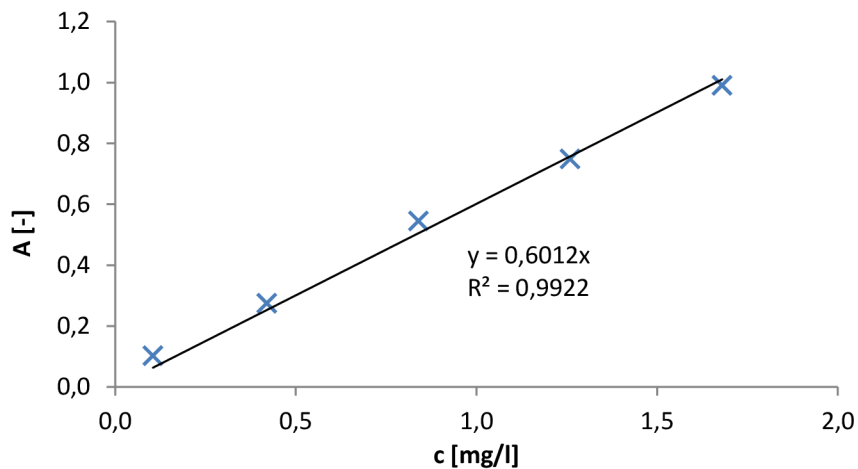
koncentrace SDS [$\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$]	0,1	0,4	0,8	1,2	1,6
objem pracovního roztoku SDS ve 100 ml vzorku [ml]	5	20	40	60	80

Dále se výše uvedeným postupem provede extrakce a následně proměří absorbance u chloroformových extraktů. Chloroformové extrakty použité k sestrojení kalibrační závislosti jsou zachyceny na Obrázku 17.

Z naměřených absorbancí sady kalibračních roztoků se sestrojí kalibrační závislost (vynesením absorbance proti hmotnostní koncentraci SDS). Matematicky aproximačně vyjádřená a graficky vynesená kalibrační závislost pro stanovení koncentrací neznámých vzorků Septonexu je znázorněna na Obrázku 18.



Obrázek 17: Chloroformové extrakty dodecylsírany sodného užitě k sestrojení kalibrační závislosti



Obrázek 18: Kalibrační závislost dodecylsírany sodného (SDS)

5 VÝSLEDKY A DISKUZE

5.1 Charakterizace huminových kyselin

Pro experimenty této práce byl použit standard huminových kyselin IHSS Leonardite (1S104H-5) a modifikovaný (methylovaný) standard IHSS Leonardite. Dělat charakterizaci a ověřovat metylaci huminových kyselin nebylo úkolem této bakalářské práce, byla již provedena v práci [51]. Výsledky z její kapitoly **Elementární analýzy a Infračervené spektrofotometrie s Fourierovou transformací** jsou zde níže uvedeny.

5.1.1 Elementární analýza a termogravimetrie

Elementární analýza umožňuje stanovit zastoupení základních biogenních prvků (kyslík, uhlík, vodík, dusík a síra) a díky termogravimetrickému stanovení lze též zjistit množství nespalitelného podílu (popel), včetně vlhkosti materiálu. V Tabulka 5 jsou uvedeny výsledky pro standard huminových kyselin z Leonarditu (IHSS HK) a pro methylovaný standard huminových kyselin z Leonarditu (MIHSS HK).

Tabulka 5: Elementární analýza vybraných látek (zastoupení jednotlivých prvků uvedeno v atomových procentech), včetně stanovení vlhkosti a popela [51]

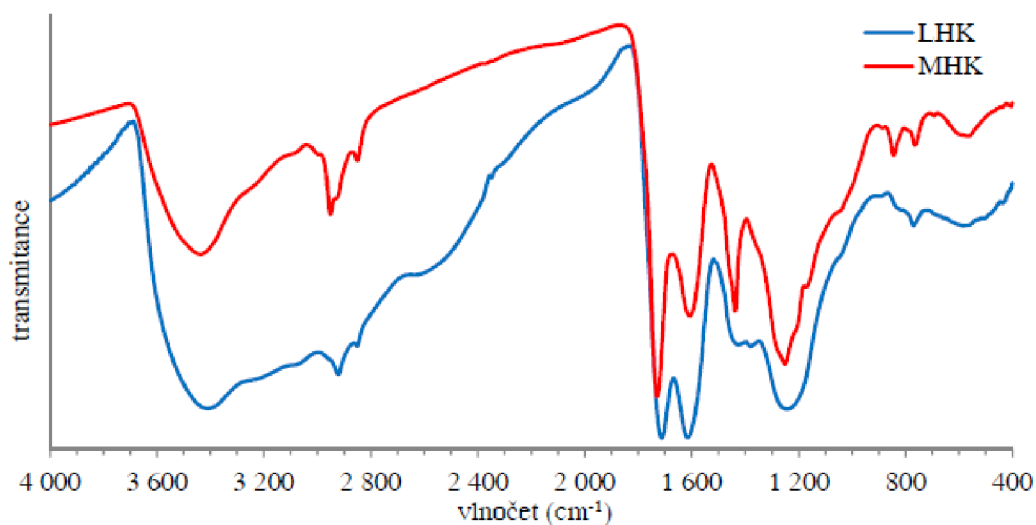
vzorek	O (at. %)	C (at. %)	H (at. %)	N (at. %)	S (at. %)	H/C	O/C	H/O	popel (hm. %)	vlhkost (hm. %)
IHSS HK	17,7	48,1	33,2	0,8	0,2	0,7	0,4	1,9	2,6	7,2
MIHSS HK	15,9	45,5	37,8	0,6	0,2	0,8	0,3	2,4	2,1	2,8

Při porovnání huminových kyselin před methylací (IHSS HK) a po methylaci (MIHSS HK) je zřejmé, že ve struktuře modifikovaných huminových kyselin dochází k nárůstu množství vodíku a klesajícímu zastoupení kyslíku, což lze logicky vysvětlit tím, že při methylaci dochází k selektivní blokaci, resp. obsazení karboxylových skupin methylovými skupinami (z tvaru $-\text{COOH}$ na $-\text{COOCH}_3$). Výsledná skupina tak teoreticky obsahuje trojnásobné množství vodíku v porovnání s nemodifikovanými huminovými kyselinami. Methylace se tedy u MIHSS HK ověřila tím, že narostl poměr H/C a naopak poklesl poměr O/C [51].

5.1.2 Infračervená spektrofotometrie s Fourierovou transformací (FT-IR)

Hlavním účelem využití infračervené spektrofotometrie s Fourierovou transformací bylo ověření úspěšnosti methylace huminových kyselin. Ostrým a navíc velmi intenzivním pásem je pokles transmitance při 1730 cm^{-1} v případě MHK (methylovaných LHK), resp. 1720 cm^{-1} u LHK (lignitických huminových kyselin). Tento pás je charakteristický pro vibraci karbonylových skupin, v případě MHK se jedná o karbonylové skupiny v arylesterech, zatímco u LHK jde o karbonyl v karboxylových skupinách ($-\text{COOH}$). Díky tomu, že esterová skupina vykazuje vyšší molekulovou hmotnost ve srovnání s karboxylovou skupinou, dochází k posunu pásu k vyšším vlnovým délkám (vzhledem k tomu, že pro rozvibrování esterové skupiny je zapotřebí vyšší energie, která je přímo úměrná vlnové délce) a tento posun je jedním z hlavních

kritérií, která dosvědčují zdárnou metylaci huminových kyselin [51]. Úspěšnou modifikaci huminových kyselin znázorňuje Obrázek 19.



Obrázek 19: Infračervená spektra lignitických, resp. methylovaných lignitických kyselin [51]

Na základě analýzy vzorků pomocí infračervené spektrofotometrie lze tedy tvrdit, že huminové kyseliny byly úspěšně modifikovány (karboxylové skupiny byly selektivně překryty methylovými zbytky). Stejným způsobem byla provedena i modifikace standardů huminových kyselin od mezinárodní společnosti pro huminové látky (IHSS). FT-IR spektra vykazovala obdobný charakter se stejným poklesem absorpance a stejnými pásy jako v případě srovnání LHK a MHK [51].

5.2 Dialyzační a difúzní experimenty

Náplní této práce je nejen studium interakcí mezi huminovými kyselinami a tenzidy prostřednictvím difúzních a dialyzačních technik, ale i posouzení vlivu modifikace (selektivní methylace karboxylových funkčních skupin ve struktuře huminových kyselin) na interakce standardů huminových kyselin s povrchově aktivními látkami. Prostřednictvím methylace se zabráni disociaci karboxylových skupin na huminových kyselinách – sníží se tedy počet možných vazebných míst huminových kyselin podílejících se na interakcích, jež by jinak poskytovaly disociované karboxylové skupiny. Předpokladem tedy je, že huminové kyseliny budou s kationaktivním tenzidem Septonexem interagovat více, než jejich methylovaná forma.

Míra těchto interakcí bude posouzena skrze zdánlivý parametr interakcí δ_{app} v definovaném čase, viz kapitola 5.3. Parametr δ_{app} bylo nutné použít proto, že z grafických závislostí je patrná stálá tendence k poklesu koncentrací v čase, neboli studované systémy se ani po 144 hodinách od počátku experimentu (tak byl definován časový limit pro tuto práci na jejím počátku) nedostaly do rovnováhy. Není tedy možné interakci huminových kyselin s tenzidy popisovat skrze běžně používanou zdánlivou rovnovážnou konstantu K_{app} .

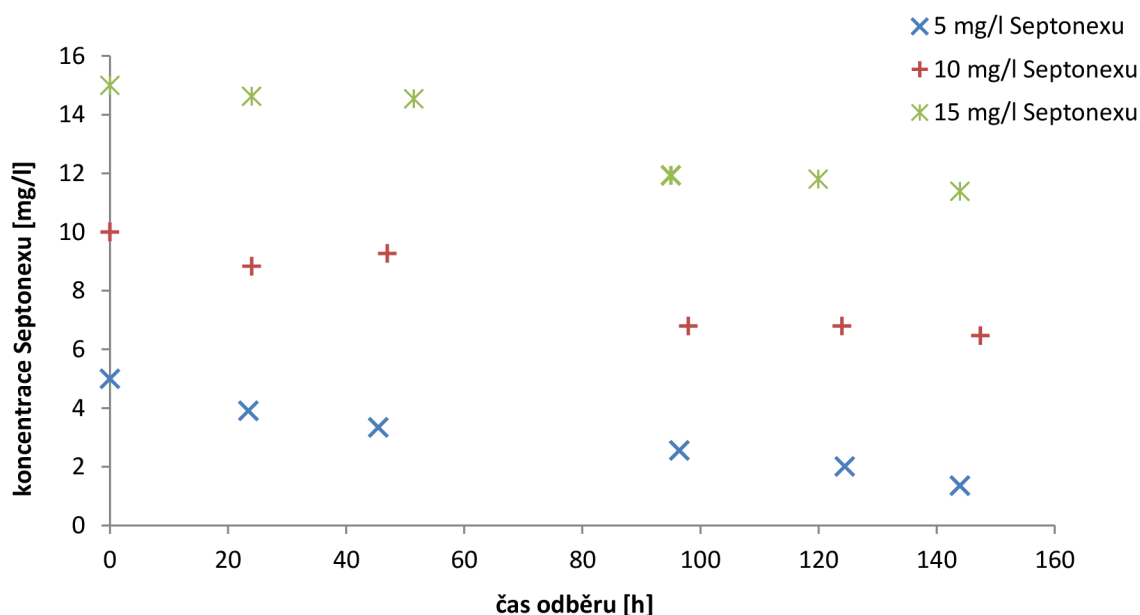
Experimenty byly prováděny dle počátečního zadání se standardem huminových kyselin izolovaným z Leonarditu (IHSS HK) a methylovaným standardem (MIHSS HK) vždy v koncentraci 50 mg·l⁻¹ v jedné části difúzní cely a se třemi variantami koncentrací

Septonexu: 5, 10 a 15 mg·l⁻¹ ve druhé části difúzní cely. Experimenty byly prováděny po dobu šesti dnů (tj. 144 hodin) s odběry Septonexu k následnému stanovení jeho koncentrace v intervalu po přibližně 24 hodinách.

Již z prvních výsledků interakcí byl patrný pokles koncentrace Septonexu ve zdrojové komoře s časem. Celý průběh měření pro **nemodifikované huminové kyseliny (IHSS HK)** znázorňuje Tabulka 6 a bodový graf na Obrázku 20.

Tabulka 6: Závislost koncentrací Septonexu v čase pro IHSS HK

IHSS HK - počáteční koncentrace Septonexu ve zdrojové komoře					
5 mg·l ⁻¹		10 mg·l ⁻¹		15 mg·l ⁻¹	
doba odběru [h]	koncentrace Septonexu [mg·l ⁻¹]	doba odběru [h]	koncentrace Septonexu [mg·l ⁻¹]	doba odběru [h]	koncentrace Septonexu [mg·l ⁻¹]
23,5	3,90	24	8,84	24	14,62
45,5	3,34	47	9,27	51,5	14,54
96,5	2,55	98	6,79	95	11,93
124,5	2,00	124	6,79	120	11,80
144	1,35	147,5	6,46	144	11,38



Obrázek 20: Závislost koncentrace Septonexu v čase pro IHSS HK

Snižující se koncentrace Septonexu ve zdrojové komoře během experimentu je dána jeho pozitivní afinitou k huminovým kyselinám a dle vědeckých článků [46, 47] se předpokládá, že jde u kationických tenzidů obecně o elektrostatické a hydrofobní interakce.

Během experimentů s **methylovanými huminovými kyselinami (MIHSS HK)** došlo k zajímavému jevu: ke snižování hladiny roztoků Septonexu ve zdrojové komoře a k nárůstu hladiny roztoků methylovaných huminových kyselin v přijímací komoře. Tento efekt byl

pravděpodobně způsoben **osmózou**, jelikož při přípravě roztoků methylovaných huminových kyselin je nutné je přes noc rozpouštět v 200 ml $0,1 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ roztoku NaOH a následně upravovat na $\text{pH} = 7$ pomocí $0,5 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ roztoku HCl, protože ve zdrojové a přijímací komoře difúzní cely v těchto případech není stejná iontová síla. Při vyrovnávání chemických potenciálů rozpouštědla v komorách tak dochází k jeho přechodu ze zředěnějšího do koncentrovanějšího prostředí, tedy do komory s methylovanými huminovanými kyselinami. Tento jev se projevoval nejrazantněji u vyšších koncentrací Septonexu ($15 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$) a je zachycen na Obrázku 21.



Obrázek 21: Nárůst hladiny roztoku MIHSS HK u koncentrace 15 mg/l Septonexu, v časech odběrů: zleva 24, 48 a 72 hodin

Aby se **omezil vliv osmózy** na výsledné stanovené koncentrace tenzidu, byl před každým odběrem vzorku k extrakci zaznamenán zůstatkový objem roztoku Septonexu ve zdrojové komoře a výsledné stanovené koncentrace Septonexu po extrakci s disulfínovou modří přepočteny dle následující rovnice (15):

$$c_{\text{přepočtená}} = c_{\text{stanovená po extrakci}} \cdot \frac{V_{\text{zůstatkový ve zdroj. komoře}}}{V_{\text{počáteční ve zdroj. komoře}}} \quad (15)$$

kde: $V_{\text{počáteční ve zdroj. komoře}} = 60 \text{ ml}$.

Za normálních okolností by se k zamezení vlivu osmózy využilo pufrů, poté bychom mohli brát v potaz „pouze vliv dialýzy“. Avšak přidavek iontové síly (formou pufru) by narušil citlivé stanovení koncentrace kationaktivních tenzidů disulfínovou modří, jejíž pomocí je stanovována koncentrace Septonexu ve zdrojové komoře, viz rušivé vlivy v kapitole 4.4.5. Z tohoto důvodu použití pufrů v roztocích nebylo možné. Bylo by vhodné se tomuto problému věnovat v navazující práci; vliv osmózy je jedno s úskalí, které je třeba vyřešit.

Výsledky měření (obsahující přepočtené koncentrace Septonexu ve snaze omezit vliv osmózy na jeho výsledné koncentrace) pro **modifikované huminové kyseliny (MIHSS HK)** obsahuje Tabulka 7.

Tabulka 7: Závislost koncentrací Septonexu v čase pro MIHSS HK

MIHSS HK - počáteční koncentrace Septonexu ve zdrojové komoře					
5 mg·l ⁻¹		10 mg·l ⁻¹		15 mg·l ⁻¹	
doba odběru [h]	koncentrace Septonexu [mg·l ⁻¹]	doba odběru [h]	koncentrace Septonexu [mg·l ⁻¹]	doba odběru [h]	koncentrace Septonexu [mg·l ⁻¹]
21	2,07	26	7,56	25,5	14,85
42	1,81	50	10,29	49,5	13,73
70	0,91	73,5	7,58	73	15,34
92	2,16	93	11,21	93	15,70
118	3,37	117	10,88	117	15,11
138	3,87	140	11,06	140	16,24

Z Tabulky 7 pro MIHSS HK je patrné, že u Septonexu s počáteční koncentrací 5 mg·l⁻¹ nastává ve zdrojové komoře difúzní cely na začátku difúzního procesu její prudký pokles, který po asi sedmdesáti hodinách dosahuje svého minima; poté se koncentrace Septonexu zvyšuje zpět k hodnotě blízké výchozí. Tento neočekávaný efekt, který se projevuje ještě silněji opakovanými zvraty v koncentrační závislosti u vzorků Septonexu s počátečními koncentracemi 10 mg·l⁻¹ a 15 mg·l⁻¹, může být způsoben následujícím:

- Vliv již zmíněné **osmózy** se mohl projevit natolik, že zkreslil i přepočtené standardně stanovené koncentrace tenzidu, viz Vztah (11), Tabulka 7 a Obrázku 21. Na obrázku je jasně patrné, že v přijímací komoře po čase došlo k podstatnému nárůstu hladiny (objemu) a tudíž i k osmotickému zvýšení koncentrace roztoku Septonexu v komoře zdrojové při úbytku rozpouštědla. Bylo by třeba tento aspekt detailněji prověřit v navazující práci.
- **Vyšší iontová síla** u methylovaných huminových kyselin **může způsobit potíže se stanovením koncentrace tenzidu**, jelikož roztoky MIHSS HK byly připravovány odlišným způsobem než roztoky IHSS HK. Opět je to téma pro navazující práci.
- Pokud bychom odmítli připustit rušivý vliv iontové síly způsobený postupem v přípravě roztoků MIHSS HK, můžeme předpokládat, že **se systém v případě methylovaných huminových kyselin již dostal do rovnováhy**. Ustálený stav se projevuje stálou koncentrací tenzidu. Tuto hypotézu podporuje fakt, že selektivní blokace karboxylových skupin (z tvaru –COOH na –COOCH₃) u methylovaných huminových kyselin, zamezuje interakcím kladných hydrofilních skupin Septonexu s (za normálních okolností) disociovanými karboxylovými skupinami huminových kyselin. Podle vědeckých článků lze tvrdit, že huminové kyseliny reagují s kationickými tenzidy skrze elektrostatické interakce [46] a karboxylovým skupinám se přisuzuje velký vliv při reakcích s kladně nabitými látkami [18]. Pokud jsou karboxylové kyseliny blokovány, dochází pouze k vyrovnávání koncentrací (čili chemických potenciálů) v obou komorách difúzních cel.

- **Metoda stanovení koncentrace tenzidu není vhodná** – avšak vzhledem k tomu, že byla provedena několikrát optimalizace metody pro toto stanovení, byla sestrojena kalibrační závislost a ověřena měřením neznámých koncentrací vzorků, jež přinesly uspokojivé výsledky, logicky se nabízí závěr, že tato hypotéza není správná. Metoda stanovení koncentrace tenzidu by neměla ovlivňovat nárůst v koncentraci Septonexu ve vyšších časech.

5.3 Zdánlivý parametr interakcí δ_{app}

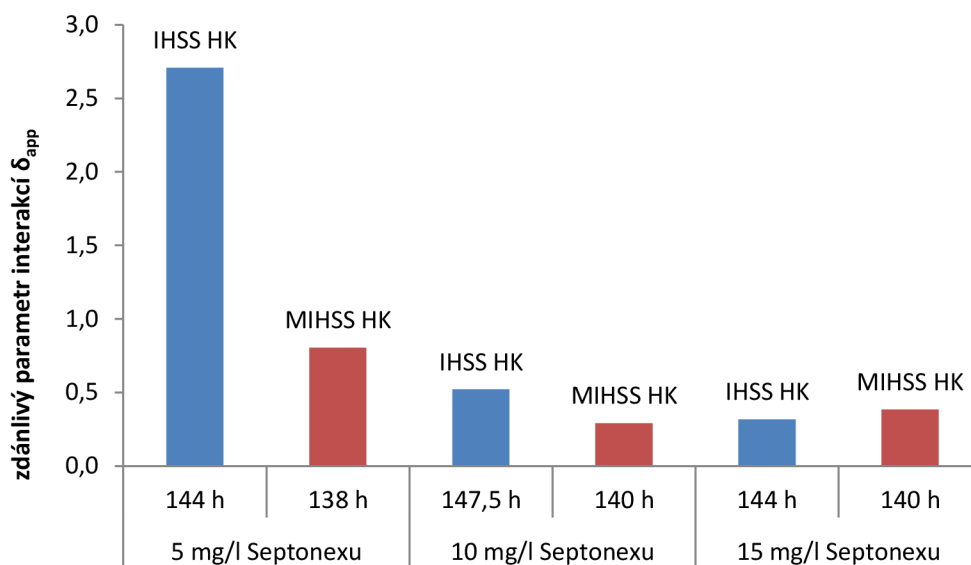
Dle původních představ se k posouzení míry interakcí mezi huminovými kyselinami IHSS HK a Septonexem, resp. jejich methylovanou formou MIHSS HK a Septonexem měla použít **zdánlivá rovnovážná konstanta K_{app}** , viz kapitola 2.8. Z uvedených tabulek i grafických závislostí koncentrací Septonexu v čase (jednoznačně u nemethylovaných huminových kyselin) je stále patrná tendence k poklesu koncentrací Septonexu. Je tedy zřejmé, že systém nedospěl do stavu rovnováhy ani po 144 hodinách provádění experimentů. U methylovaných huminových kyselin jsme stavu rovnováhy dosáhnout mohli, ale nelze to bez dalšího bádání ověřit. Proto bylo nezbytné pro účely této práce použít **zdánlivý parametr interakcí δ_{app}** , jež posloužil pro stejné časové intervaly odběrů Septonexu obdobně jako K_{app} . Má totiž obdobný význam, ale je definovaný **pro difúzní stav nerovnovážný**, viz kapitola 2.8. Čím vyšších hodnot bude δ_{app} nabývat, tím vyšší bude schopnost dané látky (huminových kyselin) s difundující látkou (Septonexem) interagovat.

Z naměřených dat koncentrací Septonexu v čase byly vypočítány **hodnoty zdánlivých parametrů interakcí δ_{app}** , které jsou pro všechny experimenty v časech odběrů co nejbližše 144 hodinám uvedeny v Tabulce 8 a graficky znázorněny na Obrázku 22.

Tabulka 8: Vypočítané hodnoty zdánlivého parametru interakcí δ_{app}

IHSS HK	čas odběru [h]	koncentrace Septonexu ve zdrojové komoře [mg·l ⁻¹]	δ_{app} [-]
5 mg·l ⁻¹ Septonexu	144	1,35	2,7077
10 mg·l ⁻¹ Septonexu	147,5	6,46	0,5208
15 mg·l ⁻¹ Septonexu	144	11,38	0,3180
MIHSS HK			
5 mg·l ⁻¹ Septonexu	138	3,87	0,8050
10 mg·l ⁻¹ Septonexu	140	11,06	0,2913
15 mg·l ⁻¹ Septonexu	140	16,24	0,3852

Z tabulky si můžeme povšimnout, že parametr interakcí δ_{app} nepřevyšuje kromě údaje u roztoku $5 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ Septonexu pro IHSS HK hodnotu 1. Z výše uvedených grafických závislostí a údajů v tabulkách je patrná tendence k poklesu koncentrace Septonexu v čase – především u IHSS HK. Rovnováhy tak nebylo dosaženo ani po limitním čase odběru 144 hodin.



Obrázek 22: Graf závislosti zdánlivého parametru interakcí δ_{app} na počáteční koncentraci Septonexu ve zdrojové komoře pro IHSS HK a MIHSS HK

Ze sloupcového grafu na Obrázku 22 je patrné, že hodnota zdánlivého parametru interakcí δ_{app} silně závisí na počáteční koncentraci Septonexu ve zdrojové komoře – u **IHSS HK** můžeme sledovat její prudký pokles v rozsahu koncentrací od $5 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ do $10 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$. Další hodnoty δ_{app} se už tak významně neliší.

Při vyhodnocení pro **MIHSS HK** registrujeme pokles δ_{app} mezi koncentracemi $5 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ a $10 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ Septonexu, avšak poté mírný nárůst ke koncentraci $15 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ Septonexu.

U koncentrací $5 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ a $10 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ je ověřen předpoklad, že zdánlivý parametr interakcí δ_{app} nabývá vyšších hodnot u IHSS HK než u jejich methylované formy MIHSS HK. To znamená, že tu hraje významnou roli selektivní blokáce karboxylových skupin u methylovaných kyselin při interakcích. U koncentrace $15 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ Septonexu však tento předpoklad splněn není, protože δ_{app} nabývá vyšší hodnoty u MIHSS HK. Toto experimentální zjištění je možné odůvodnit poznatkem, že elektrostatické interakce, především mezi disociovanými karboxylovými skupinami huminových kyselin a hydrofilními katioaktivními skupinami Septonexu mohou být nahrazeny u methylovaných MIHSS HK jiným typem interakcí, které se nejvíce projeví právě u koncentrace $15 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$, například π - π interakcemi či hydrofobními interakcemi. Avšak nesmíme opomenout fakt, že jsme se při experimentech nedostali do rovnovážného stavu. Bylo by tedy vhodné prozkoumat hodnoty δ_{app} pro delší časové intervaly.

6 ZÁVĚR

Náplní této bakalářské práce bylo prostudovat interakce huminových kyselin s povrchově aktivními látkami (tenzidy) prostřednictvím dialyzačních a difúzních technik a vliv karboxylových funkčních skupin na reaktivitu huminových kyselin.

Protože se koncentrace tenzidu v difúzní cele nedá přímo (například spektrofotometricky) stanovit, bylo třeba nejprve optimalizovat metody stanovení ionických tenzidů. Obě použité metody byly založené na principu vytvoření barevného iontového páru mezi tenzidem a opačně nabitým barvivem s následnou extrakcí tohoto páru do organického rozpouštědla.

Již z prvních experimentů při interakcích Septonexu s huminovými kyselinami, byl patrný pokles koncentrace Septonexu v čase ve zdrojové komoře, což svědčí o pozitivní afinitě huminových kyselin vůči Septonexu.

U experimentů s methylovanými huminovými kyselinami docházelo především u vyšších vstupních koncentrací Septonexu k pozorovatelnému úbytku hladiny roztoku Septonexu v čase ve zdrojové komoře na úkor vzrůstající hladiny roztoku huminových kyselin v komoře přijímací. Tento jev byl odůvodněn především osmózou; vysvětleno v kapitole 5.2. Za normálních okolností by se k zamezení vlivu osmózy využilo pufrů. Bohužel, přídavek iontové síly formou pufru by narušil citlivé stanovení kationaktivních tenzidů disulfínovou modří, jejíž pomocí je stanovována koncentrace Septonexu ve zdrojové komoře (viz rušivé vlivy, kapitola 4.4.5).

Míra interakcí mezi huminovými kyselinami a Septonexem byla posuzována na základně zdánlivého parametru interakcí δ_{app} , protože zdánlivá rovnovážná konstanta K_{app} nemohla být pro tyto výpočty použita, neboť jsme ani po 144 hodinách nedosáhli rovnováhy v difúzních celách při experimentech s huminovými kyselinami (IHSS HK). Variantně u methylovaných huminových kyselin (MIHSS HK) to nemůžeme s jistotou potvrdit. Stále platí předpoklad, že by IHSS HK měly mít vyšší interakční parametr než MIHSS HK.

Z grafické závislosti je patrné, že hodnota zdánlivého parametru interakcí δ_{app} silně závisí na počáteční koncentraci Septonexu ve zdrojové cele. Nejvyšší hodnota δ_{app} (a zároveň jako jediná nabývající hodnoty vyšší než 1) se jasně ukázala u roztoku $5 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ Septonexu pro IHSS HK. U hodnot δ_{app} pro koncentrace $5 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ i $10 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ Septonexu je splněn předpoklad, že zdánlivý parametr interakcí δ_{app} nabývá vyšších hodnot u IHSS HK než u jejich methylované formy MIHSS HK. Tedy při interakcích hraje významnou roli selektivní blokáce karboxylových skupin.

Perspektiva práce do budoucna:

Při studiu interakcí huminových kyselin s tenzidy v difúzních celách se vynořila řada otázek, které by bylo dobré vyřešit v budoucnu. V první řadě jde o použití optimalizovaných metod pro stanovení ionických tenzidů, v nichž se musí pracovat s chloroformem. Bylo by vhodné, pokusit se upravit optimalizované metody na „menší objemy“ roztoků, abychom omezili použití neekologického chloroformu. Navíc se chloroformové extrakty (především u stanovení kationaktivních tenzidů) musí spektrofotometricky změřit týž den, kdy byla prováděna extrakce, neboť absorpance chloroformových extraktů je nezávislá na čase pouze do 24 hodin od stanovení. V ideálním případě: pokusit se vyhledat přímou metodu pro

stanovení koncentrací tenzidů, nebo alespoň takovou, která by byla šetrnější k životnímu prostředí, tj. bez využití toxických organických rozpouštědel.

Co se týká difúzních experimentů: bylo by žádoucí vyřešit problém osmózy i iontové síly, jež zřejmě zkreslují stanovení a závislost koncentrace Septonexu v čase. Teprve pak je možné a smysluplné prodloužit doby odběru Septonexu v difúzních celách (významně více než 144 hodin) a dosáhnout stavu rovnováhy. To by umožnilo použít k posouzení vlivu míry interakcí zdánlivou rovnovážnou konstantu K_{app} a získat lepší možnost srovnání mezi interakcemi huminových a methylovaných huminových kyselin s tenzidy.

7 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- [1] Geologie. *Univerzita Palackého v Olomouci* [online]. Křížkovského 511/8, 771 47 Olomouc, Česká republika, 2016 [cit. 2017-04-14]. Dostupné z: <http://www.geology.upol.cz/>
- [2] PITTER, Pavel. Hydrochemie. 4. aktualiz. vyd. Praha: VŠCHT, 2009, viii, 579 s. ISBN 978-80-7080-701-9.
- [3] Huminové látky. *Humatex* [online]. 418 01 Bílina Česká republika: Humatex, a.s. ul. Důlní čp. 199, Copyright©2005-2015 [cit. 2017-04-12]. Dostupné z: <http://www.humatex.cz/cs/obecne-informace/huminove-latky>
- [4] PICCOLO, A., 2002: *The supramolecular structure of humic substances*. A novel understanding of humus chemismy and aplication in Soil Science. *Adv. Agron.* 75 s., 57-133
- [5] MIKULÁŠOVÁ, Barbora; LAPČÍK, Lubomír; MAŠEK, Ivan. Lignit - struktura, vlastnosti a použití. *Chemické listy*. 1997, č. 91, s. 160-168.
- [6] SKOKANOVÁ, M., K. DERCOVÁ. Humínové kyseliny. Interakcie humínových kyselín s kontaminantami. *Chemické listy*. 2008, č. 102, s. 338-345.
- [7] VESELÁ, L., KUBAL, M., KOZLER, J., Innemanová, P.: Struktura a vlastnosti přírodních huminových látek typu oxihumolitu. *Chemické listy* 99, 2005, str. 711 –717.
- [8] Gerse J., Kremo R., Csikor J., Pinter L.: *Proceedings of 6th IHSS Symposium: Humic Substances in the Global Environment and Implications on Human Health* (Senesi M., Miano T. M., ed.), str. 1297. Elsevier, Amsterdam 1994.
- [9] Fukushima M., Tanaka S., Nakamura H., Ito S.: *Talanta* 43, 383 (1996).
- [10] Gircher T., Badaev S. A., Pospí.íl F., Velemínský J.: *Mutat. Research* 22, 937 (1990).
- [11] Sato T., Ose Y., Nagase H.: *Mutat. Research* 162, 173 (1986).
- [12] DeSimone C., Piccolo A., DeMarco A.: *Proceedings of 6th IHSS Symposium: Humic Substances in the Global Environment and Implications on Human Health* (Senesi M., Miano T. M., ed.), str. 1114. Elsevier, Amsterdam 1994.
- [13] Senesi N., D’Orazio V., Miano T. M.: *Geoderma* 66, 273 (1995).
- [14] Katan J., Fuhreman T. W., Lichtenstein E. P.: *Sci.* 193, 891 (1976).
- [15] Combining kinetic investigation with surface spectroscopic examination to study the role of aromatic carboxyl groups in NOM adsorption by aluminum hydroxide [online]. *Journal of Colloid and Interface Science*, 2006 [cit. 2018-04-28]. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021979706004462?via%3Dihub>
- [16] Fourier transform infrared study of mercury interaction with carboxyl groups in humic acids. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*. 2008, 198, 205-214.
- [17] Binding of proton and iron to lignite humic acid size-fractions in aqueous matrix. *JOURNAL OF MOLECULAR LIQUIDS*. 2018, 254, 241-247.
- [18] ANĐELKOVIĆ, T., R. NIKOLIĆ, A. BOJIĆ, D. ANĐELKOVIĆ a G. NIKOLIĆ. Binding of cadmium to soil humic acid as a function of carboxyl group content. *Macedonian Journal of Chemistry and Chemical Engineering*. 2010, r. 29, č. 2, s. 215–224. ISSN 1857-5552.
- [19] SMILEK, J., P. SEDLÁČEK, M. KALINA a M. KLUČÁKOVÁ. On the role of humic acids‘ carboxyl groups in the binding of charged organic compounds. *Chemosphere*. 2015, r. 138, s. 503–510. ISSN 0045-6535.
- [20] Aggregation and charge reversal of humic substances in the presence of hydrophobic monovalent counter-ions: Effect of hydrophobicity of humic substances. *COLLOIDS AND SURFACES A-PHYSICO-CHEMICAL AND ENGINEERING ASPECTS*. 2018, 540.

- [21] Coagulation behavior of humic acid in aqueous solutions containing Cs⁺, Sr²⁺ and Eu³⁺: DLS, EEM and MD simulations. *ENVIRONMENTAL POLLUTION*. 2018, 236, 835-843.
- [22] A mechanistic study of stable dispersion of titanium oxide nanoparticles by humic acid. *WATER RESEARCH*. 2018, 135, 85-94.
- [23] Chemie a technologie tenzidů II, Ing. Jana Sedlaříková, Ph.D. [online]. Fakulta Technologická, Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, 0132n. 1. [cit. 2018-11-22]. Dostupné z: <https://docplayer.cz/29914679-Chemie-a-technologie-tenzidu-ii.html>
- [24] KIZLINK, J.: Technologie chemických latek II. 1 vyd. Brno: VUT, 2001. 209-421 s. ISBN 80-214-2013-8
- [25] GARCIA, M. T. , et al. Biodegradability and toxicity of sulphonate-based surfactants in aerobic and anaerobic aquatic environments. *Web of science* [online]. 2009, vol. 43 [cit. 2009-04-20], s. 295-302. Dostupný z WWW: <<http://apps.isiknowledge.com>>. ISSN 0043-1354.
- [26] ŠMIDRKAL, J.: Tenzidy a detergenty dnes. *Chem. Listy* [online]. 1999 [cit. 20. 4. 2009]. Dostupné na [www. http://chemicke-listy.vscht.cz](http://chemicke-listy.vscht.cz)
- [27] *Organická chemie: Dusíkaté deriváty a heterocykly* [online]. [cit. 2018-11-22]. Dostupné z:http://www.mojechemie.cz/Organick%C3%A1_Chemie:Dus%C3%ADkat%C3%A9_deriv%C3%A1ty_a_heterocykly
- [28] ŠVÍGLEROVÁ, Jitka. Difúze [online]. Poslední revize 2009-02-19, [cit. 2010-11-13]. <<https://web.archive.org/web/20160306065550/http://wiki.lfp-studium.cz/index.php/Difúze>>.
- [29] LEOŠ NAVRÁTIL, ROSINA JOZEF A KOLEKTIV, Medicínská biofyzika [online]. [cit. 2014-16-11]. <<https://www.grada.cz/medicinska-biofyzika-3633/>>
- [30] *Co je to povrchové napětí v koloidní chemii* [online]. Vysoká škola chemicko-technologická v Praze: Vydavatelství VŠCHT Praha Technická 5, 166 28 Praha 6, 2005 [cit. 2018-11-22]. Dostupné z: https://vydavatelstvi-old.vscht.cz/knihy/uid_es-001/motor/main.copyright.html
- [31] *Dialysis* [online]. National Kidney Foundation: Inc., 30 East 33rd Street, New York, NY 10016, 1-800-622-9010, 2017 [cit. 2018-11-24]. Dostupné z: <https://www.kidney.org/atoz/content/dialysisinfo>
- [32] HORÁKOVÁ, M., *Analytika vody*. 1. vyd. Praha: VŠCHT Praha, 2000. 283 s. ISBN 80-7080-391-6
- [33] ČSN EN 903 (75 7534): 1996. Jakost vod. Stanovení aniontových tenzidů methylenovou modří (MBAS). (ISO 7875-1:1984, modifikovaná). 06. 1996.
- [34] HORÁKOVÁ, Marta, Peter LISCHKE a Alexander GRÜNWARD. *Chemické a fyzikální metody analýzy vod*. 2. nezm. vyd. Praha ; Bratislava: SNTL ; Alfa, 1989, 389 s.
- [35] JANDOVÁ, J., SCHEJBAL, P.: Přehled metod stanovení neiontových tenzidů v povrchových a odpadních vodách. *Chem. Listy* [online]. 2001 [cit. 24. 1. 2019]. Dostupné na [www. http://chemicke-listy.vscht.cz](http://chemicke-listy.vscht.cz)
- [36] MALÝ, J., MALÁ, J. *Chemie a technologie vody*. 1. vyd. Brno: NOEL 2000 s.r.o., 1996. 200 s. ISBN 80-86020-13-4.
- [37] ŠVEC, Pavel. *Stanovení tenzidů v odpadních vodách* [online]. Brno: Vysoké učení technické v Brně. Fakulta chemická, 2009 [cit. 2019-01-24]. Dostupné z: <http://hdl.handle.net/11012/11224>. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně. Fakulta chemická. Ústav chemie a technologie ochrany životního prostředí. Vedoucí práce Milada Vávrová.
- [38] GODDARD, E. D., ANANTHAPADMANABHAN, K. P. *Interactions of Surfactant with Polymers and Proteins*. Florida: CRC Press, 1993. ISBN 0-8493-6784-0.

- [39] GRIFFITHS, P. C., CHEUNG, A. Y. F. *Interaction Between Surfactants and Gela-tin in Aqueous Solutions*. Materials Science and Technology. 2002, Vol. 18, 591 – 599.
- [40] SINI, Karima, Idouhar MADJID a Aida-Cherifa AHMIA. Spectrophotometric determination of anionic surfactants: optimization by response surface methodology and application to Algiers bay wastewater. *ENVIRONMENTAL MONITORING AND ASSESSMENT*. 2017, 189(12), 134-142. DOI: 10.1007/s10661-017-6359-7.
- [41] POBINER, Harvey. SPECTROPHOTOMETRIC DETERMINATION OF ANIONIC SURFACTANTS BY CONVERSION OF THE LEUCO-BASES OF TRIPHENYLMETHANE DYES. *ANALYTICA CHIMICA ACTA*. 1982, 141(SEP), 419-425. DOI: 10.1016/S0003-2670(01)95351-6.
- [42] KAMAYA, Minori. Spectrophotometric method for the determination of an anionic surfactant without liquid-liquid extraction. *ANALYTICA CHIMICA ACTA*. 1998, 362(2-3), 157-161. DOI: 10.1016/S0003-2670(98)00059-2.
- [43] IDOUHAR, M. Spectrophotometric Determination of Cationic Surfactants Using Patent Blue V: Application to the Wastewater Industry in Algiers. *JOURNAL OF SURFACTANTS AND DETERGENTS*. 2008, 11(4), 263-267. DOI: 10.1007/s11743-008-1079-1.
- [44] VANE. SCOTT, George. Spectrophotometric determination of cationic surfactants with Orange II. *Analytical Chemistry*. 1968, 40(4), 768–773. DOI: 10.1021/ac60260a038.
- [45] SONG, Ming. Spectrophotometric determination of cationic surfactants, by formation of ternary complexes with Fe(III) and chrome azurol S. *CHINESE JOURNAL OF CHEMISTRY*. 1996, 14(3), 228-234. DOI: <https://doi.org/10.1002/cjoc.19960140308>.
- [46] JUNG, A.-V. ,C. FROCHOT a J.-L. BERSILLON. Fluorescence spectroscopy as a specific tool for the interaction study of two surfactants with natural and synthetic organic compounds. *Colloids and Surface A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 2015, r. 481, s. 567–576. ISSN 0927-7757.
- [47] Investigation of humate-cetyltrimethylammonium complexes by small-angle X-ray scattering. *Journal of Colloid and Interface Science*. 2007, 305, 57-61.
- [48] KOOPAL, L. K., GOLOUB, T. P., DAVIS, T. A. Binding of ionic surfactants to purified humic acid. *Journal of Colloid and Interface Science*. 2004, vol. 275, issue 2, s. 360-367. DOI: 10.1016/j.jcis.2004.02.061.
- [49] GAMBOA, C., OLEA A. F. Association of cationic surfactants to humic acid: Effect on the surface activity. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 2006, vol. 278, 1-3, s. 241-245. DOI: 10.1016/j.colsurfa.2005.12.026.
- [50] Stanovení difúzních koeficientů metodou difúzní cely. In: SMILEK, Jiří. *ChemPoint* [online]. 2012 [cit. 2019-03-03]. Dostupné z: <http://www.chempoint.cz/stanoveni-difuznich-koeficientu-metodou-difuzni-cely>
- [51] SMILEK, Jiří. Nové metody studia reaktivity a transportních vlastností biokoloidů. Vysoké učení technické v Brně. Fakulta chemická, 2016.