

VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

Fakulta chemická

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Brno, 2016

Bc. Aneta Chytilová



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

**FRAKCIONACE A MOLEKULÁRNÍ ORGANIZACE
HUMINOVÝCH KYSELIN**

FRACTIONATION AND MOLECULAR ORGANIZATION OF HUMIC ACIDS

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Aneta Chytilová

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

prof. Ing. Martina Klučáková, Ph.D.

BRNO 2016



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

Zadání diplomové práce

Číslo diplomové práce: **FCH-DIP0999/2015** Akademický rok: **2015/2016**
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie
Student(ka): **Bc. Aneta Chytilová**
Studijní program: Chemie pro medicínské aplikace (N2846)
Studijní obor: Chemie pro medicínské aplikace (2808T031)
Vedoucí práce **prof. Ing. Martina Klučáková, Ph.D.**
Konzultanti:

Název diplomové práce:

Frakcionace a molekulární organizace huminových kyselin

Zadání diplomové práce:

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

Termín odevzdání diplomové práce: 6.5.2016

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

Bc. Aneta Chytilová
Student(ka)

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

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
Ředitel ústavu

V Brně, dne 31.1.2016

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
Děkan fakulty

ABSTRAKT

Huminové kyseliny jsou součástí přírodní organické hmoty vyskytující se všude kolem nás. Cílem této diplomové práce je prostudovat molekulární organizace, konformace huminových kyselin ve vodných roztocích, jelikož pořád vyvolávají řadu otázek. Zda jsou huminové kyseliny polymery, supramolekuly či tvoří micely, o tom se vědci z celého světa dohadují již delší dobu. S postupem času, díky novým technologiím, se však odklánějí od polymerního modelu a přiklánějí se spíše k supramolekulárnímu uspořádání huminových kyselin. Studovat složité huminové systémy však není jednoduché, jsou totiž polydisperzní a heterogenní, což značně komplikuje jakoukoliv jejich charakterizaci. Navíc jejich molekulární organizaci ovlivňuje řada faktorů jako např. pH, iontová síla apod. Pro studium konformace huminových kyselin byly připraveny koncentrační řady IHSS (mezinárodní asociace pro huminové látky) Leonardite huminových kyselin standardů ve čtyřech různých prostředích: 0,1 M NaOH, ve vodě s pH následně upraveným na hodnotu 12 (bazické prostředí), 0,1 M NaOH + 0,1 M HCl, 0,1 M NaCl (neutrální prostředí). Navíc byla provedena frakcionizace huminových kyselin za účelem zjednodušení složité struktury těchto látek. Připravené koncentrační řady byly charakterizovány za pomoci několika analytických metod jako je ultrafialová a viditelná spektrometrie, dynamický rozptyl světla, elektroforetický rozptyl světla, mikroreologie, gelová permeační chromatografie, potenciometrické stanovení pH a přímá konduktometrie. Diplomová práce navazuje na předchozí bakalářskou práci s tím, že byly využity odlišné huminové kyseliny. Z naměřených výsledků vyplývá, že studované systémy vykazují supramolekulární chování a v některých případech podléhají agregaci do větších celků (micel).

KLÍČOVÁ SLOVA

huminové kyseliny, frakcionace, konformace, dynamický rozptyl světla, elektroforetický rozptyl světla

ABSTRACT

Humic acids are part of the natural organic matter occurring all around us. The aim of this thesis is to study the molecular organization, conformation of humic acids in aqueous solutions, that always raise a number of questions. For a long time, the scientists all over the world argue, if humic acid are polymers, micelles or supramolecules. Over time, thanks to new technologies, their opinions are moving away from a polymer model and tend rather to supramolecular arrangement of humic acids. Studying humic complex systems is not easy, because they are polydisperse and heterogeneous, which significantly complicates any characterization. Moreover, its molecular organization is affected by many factors such as e.g. pH, ionic strength and etc. For the study of the conformation of humic acids, concentration series of IHSS (International humic substances association) Leonardite humic acids standards in four different mediums were prepared: 0,1 M NaOH, humic acids in water with pH modified to 12 (basic medium), 0,1 M NaOH + 0,1 M HCl, 0,1 M NaCl (neutral environment). Furthermore it has been performed the fractionation of humic acids for the purpose of simplifying the complicated structure. Prepared concentration series were characterized with several analytical methods such as ultraviolet and visible spectroscopy, dynamic light scattering, electrophoretic light scattering, microrheology, gel permeation chromatography, potentiometric pH determination and direct conductometry. Diploma thesis is built on the previous bachelor thesis in which different sample of humic acids was studied. The measured results indicate that the studied systems show supramolecular behavior and in some cases are subject to aggregation into larger units (micelles).

KEYWORDS

humic acids, conformation, fractionation, dynamic light scattering, electrophoretic light scattering

CHYTILOVÁ, A. *Frakcionace a molekulární organizace huminových kyselin*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2016. 97 s. Vedoucí diplomové práce prof. Ing. Martina Klučáková, Ph.D..

PROHLÁŠENÍ

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

.....
podpis studenta

Poděkování:

Na tomto místě bych ráda poděkovala vedoucí diplomové práce prof. doc. Ing. Martině Klučákové, Ph.D. za poskytnutí potřebných rad a připomínek během vypracovávání práce. Dále bych chtěla poděkovat Ing. Michalovi Kalinovi, Ph.D. za pomoc při osvojování experimentálních technik a poskytnutí cenných konzultací. Velký dík také patří mé rodině a příteli, kteří mi poskytli dobré zázemí a po celou dobu studia mě podporovali.

OBSAH

1	ÚVOD	8
2	CÍL PRÁCE.....	9
3	TEORETICKÁ ČÁST.....	10
3.1	Proč studovat huminové látky?	10
3.2	Co jsou to huminové látky?	10
3.3	Dělení huminových látek	11
3.4	Vznik huminových látek	14
3.5	Vlastnosti a struktura huminových látek.....	15
3.6	Huminové kyseliny	17
3.6.1	Vlastnosti a struktura.....	17
3.7	Molekulární organizace a konformace HK.....	22
3.8	Metody studia molekulární organizace a frakcionace HK.....	25
3.8.1	Ostatní metody a kombinace	31
3.9	Frakcionace HK	32
3.10	Aplikační možnosti HK	34
3.11	Úloha HL v přírodě	37
3.11.1	Zajímavosti.....	38
4	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	40
4.1	Použité chemikálie	40
4.2	Použité přístroje	40
4.3	Příprava studovaných materiálů.....	40
4.3.1	Izolace HK z lignitu:	40
4.3.2	Frakcionace huminových kyselin.....	41
4.4	Charakterizace huminových kyselin	42
4.5	Použitá instrumentální metodika.....	42
4.5.1	Potenciometrické stanovení pH.....	42
4.5.2	Přímá konduktometrie	43
4.5.3	UV – VIS spektrometrie.....	43
4.5.4	Dynamický rozptyl světla.....	45
4.5.5	Elektroforetický rozptyl světla	47
4.5.6	Gelová permeační chromatografie	49

4.5.7	Mikroreologie.....	49
5	VÝSLEDKY A DISKUZE	52
5.1	Charakterizace huminových kyselin	52
5.1.1	Potenciometrické stanovení pH.....	52
5.1.2	Přímá konduktometrie	53
5.1.3	UV–VIS spektrometrie.....	54
5.1.4	Dynamický rozptyl světla.....	55
5.1.5	Elektroforetický rozptyl světla.....	62
5.1.6	Mikroreologie.....	63
5.1.7	Gelová permeační chromatografie	69
5.1.8	Frakcionace HK.....	73
6	ZÁVĚR.....	80
7	SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ	83
8	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ.....	95

1 ÚVOD

Huminové kyseliny ovlivňují mnoho geochemických a enviromentálních procesů, jakožto všudypřítomná komponenta organické hmoty v půdě. Jedním z procesů, na kterých se tyto látky podílí, je např. regulace interakce kovů v půdě, s čímž souvisí problém znečišťování životního prostředí různými kontaminanty. V závislosti na geochemických parametrech mohou huminové kyseliny působit jako geochemické bariéry, nebo mohou přispívat k tomu, aby se kovy transportovaly v půdě, aniž by nějak zásadně ovlivňovaly přírodní procesy v ní probíhající. Důležitým aspektem pro pochopení těchto procesů je bezpochyby konformační povaha huminových kyselin. V závislosti na podmínkách prostředí, se mohou huminové látky vyskytovat ve formě koloidů, agregovat (srážet se) do větší celků, nebo zůstat v roztoku jako záporně nabitě komplexy. S nástupem nových sofistikovanějších technologií se změnilo do té doby uznávané pohledy na strukturu, konformaci těchto látek. Zpočátku se na huminové kyseliny pohlíželo jako na polymery, dnes se spíše vědci přiklánějí k supramolekulárnímu modelu. Znalost struktury a molekulární organizace těchto látek je stěžejní pro predikci jejich možných fyzikálně – chemických interakcí s látkami přítomnými v životním prostředí a dále ke studiu jejich potenciálních aplikací zejména v zemědělství, ochraně životního prostředí, průmyslu a farmakologii.

2 CÍL PRÁCE

Cílem práce je prostudovat změny konformace a molekulární organizace huminových kyselin v závislosti na jejich koncentraci a způsobu a podmínkách přípravy jejich roztoků. Diplomová práce navazuje na předchozí bakalářskou práci s tím, že byly použity IHSS standardy huminových kyselin, charakterizace se rozšířila o nové analytické metody a byla provedena frakcionace za účelem zjednodušení komplikovanější struktury huminových kyselin.

3 TEORETICKÁ ČÁST

3.1 Proč studovat huminové látky?

Ačkoliv po celém světě dochází k redukci, recyklaci a opětovnému použití materiálů z komunálních odpadů, většina z nich stejně leží ladem na skládce, a to zejména v rozvojových zemích. Problémy se však týkají ve velké míře i vyspělých zemích, například Číny, kde skončí na skládce více než 90 % odpadu. Na skládce tyto odpadní materiály podléhají fyzikálním, chemickým a biologickým přeměnám. Některé organické látky degradují a dostávají se do podzemních vod, zatímco jiné látky odolnější vůči biodegradaci přicházejí do styku s půdní organickou hmotou, mezi kterou patří i huminové látky (HL). Pro HL je typické, že kolísají jejich poměry elementárního složení, chemické funkce a distribuce molekulových velikostí, což může zásadně ovlivnit chování některých znečišťujících látek v přírodním prostředí. Typickými příklady, které je zde třeba zmínit, jsou pak těžké kovy. [1]

V dnešní době dochází ke kontaminaci půdních systémů, vod, snižování úrodnosti půdy apod. velmi často. Jedním z největších znečišťovatelů je beze sporu člověk. Aby se tyto problémy mohly řešit, je nutné znát strukturu a vlastnosti HL, jelikož se na procesech v půdě podílí. Není však jednoduché tyto složité systémy zkoumat a předpovídat jejich chování, protože se neustále transformují. Největším problémem, se kterým se setkáváme při charakterizaci těchto látek, je jejich heterogenita. [2]

3.2 Co jsou to huminové látky?

Každý živý organismus uvolňuje do prostředí mnoho organických látek, ať už za svého života, nebo i po smrti rozkladem svých tkání. Tyto látky následně podléhají chemickému a biologickému rozkladu za tvorby humusu, temně zbarvené organické hmoty, ve kterém už nerozeznáme původní strukturu.

Humus rozdělujeme na dvě části:

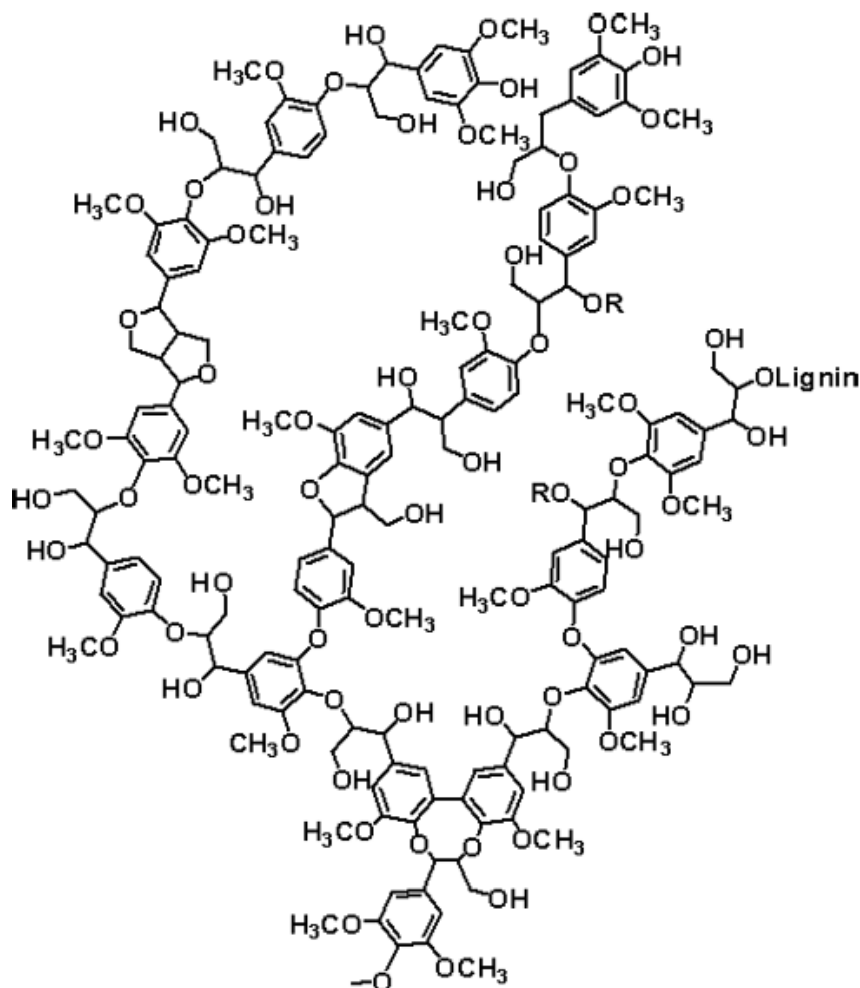
Nehumifikovaná část, obsahující téměř všechny biochemické složky původního materiálu, které můžeme přesně chemicky určit (sacharidy, lipidy, proteiny, aminokyseliny, nukleové kyseliny,...). Tyto látky se mohou dále rozkládat a nebo vstupovat do procesu humifikace – kvantitativně druhého nejdůležitějšího biogeochemického procesu na Zemi hned po fotosyntéze.

Humifikovaná část, vysokomolekulární koloidní hmota nazývaná huminový materiál. Tato frakce představuje významnější část humusu, protože je chemicky nejaktivnější částí půdy. [3]

Výměna živin, energie a uhlíku mezi organickou hmotou v půdě, půdním prostředím, vodních systémech a atmosférou je důležitá pro zemědělskou produktivitu, kvalitu vody a klima. [4]

HL jsou významnou součástí přírodní organické hmoty v půdách, rašelině, hnědém uhlí a sedimentech, ale také v povrchové a podzemní vodě. Jejich úloha je naprosto nezastupitelná pro život edafonu v půdě a zásadně ovlivňují i růst rostlin, úsporu základních živin apod.

Představují největší a z hlediska globální stability na Zemi nejvýznamnější zásobu organického uhlíku. Jsou výsledkem biochemických a chemických reakcí doprovázejících rozklad a přeměny zbytků rostlinné a mikrobiální biomasy (souhrnně nazývaných humifikace). Nejdůležitější látky, účastníci se tohoto procesu, jsou lignin a produkty jeho přeměny, dále polysacharidy, melanin, kutin, lipidy, nukleové kyseliny aj. Jen v půdních uhlíkatých sloučeninách je vázáno přibližně 3,3 krát více uhlíku než v atmosféře a 4,5 krát více než v živých organismech. Nelze se tedy divit, že HL zásadním způsobem ovlivňují život na Zemi. Opět prvořadou otázkou pro pochopení úlohy HL v globálních procesech přeměny uhlíku je určení jejich komplikované struktury. [2]



Obr. 1 *Struktura ligninu* [5]

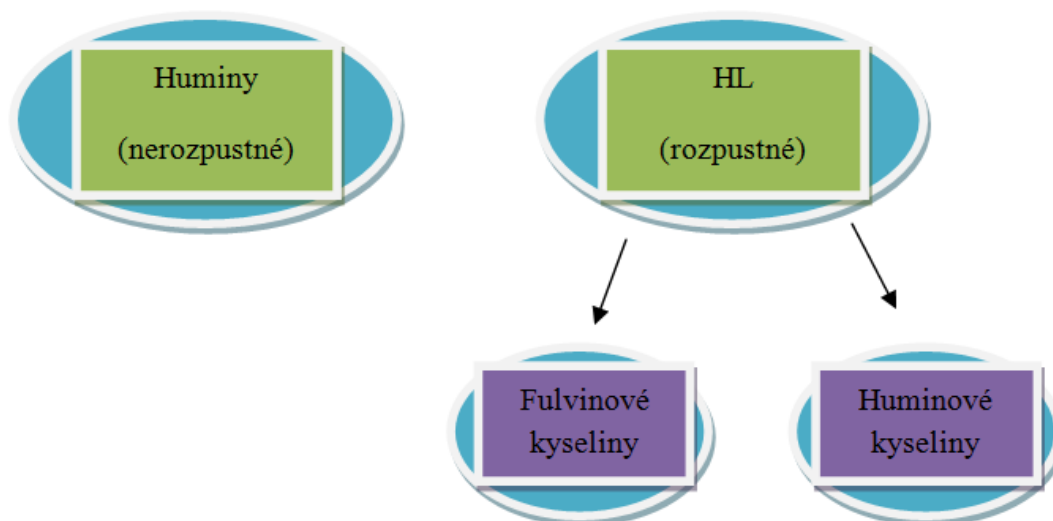
Stáří HL je sice uváděno stovky i tisíce let, ale je známo, že v případě nedostatku zdroje organického uhlíku, jsou HL opět mikroorganismy využity. Poslední výzkumy naznačují, že existuje vztah mezi mikrobiologickou aktivitou a termoanalytickým chováním humifikovaných substrátů. Tento přístup by potenciálně umožňoval predikci chování různých typů půdy a modelování tepelných toků a cyklu uhlíku v přírodě. [6]

3.3 Dělení huminových látek

HL patří k těm látkám, jež se nedají klasifikovat jako jiné chemické třídy sloučenin (např. proteiny, sacharidy, lipidy). [7]

Po izolaci HL z pevných i kapalných matric je lze dělit na základě různé rozpustnosti v kyselém či alkalickém prostředí aplikací sloupcové chromatografie. [8]

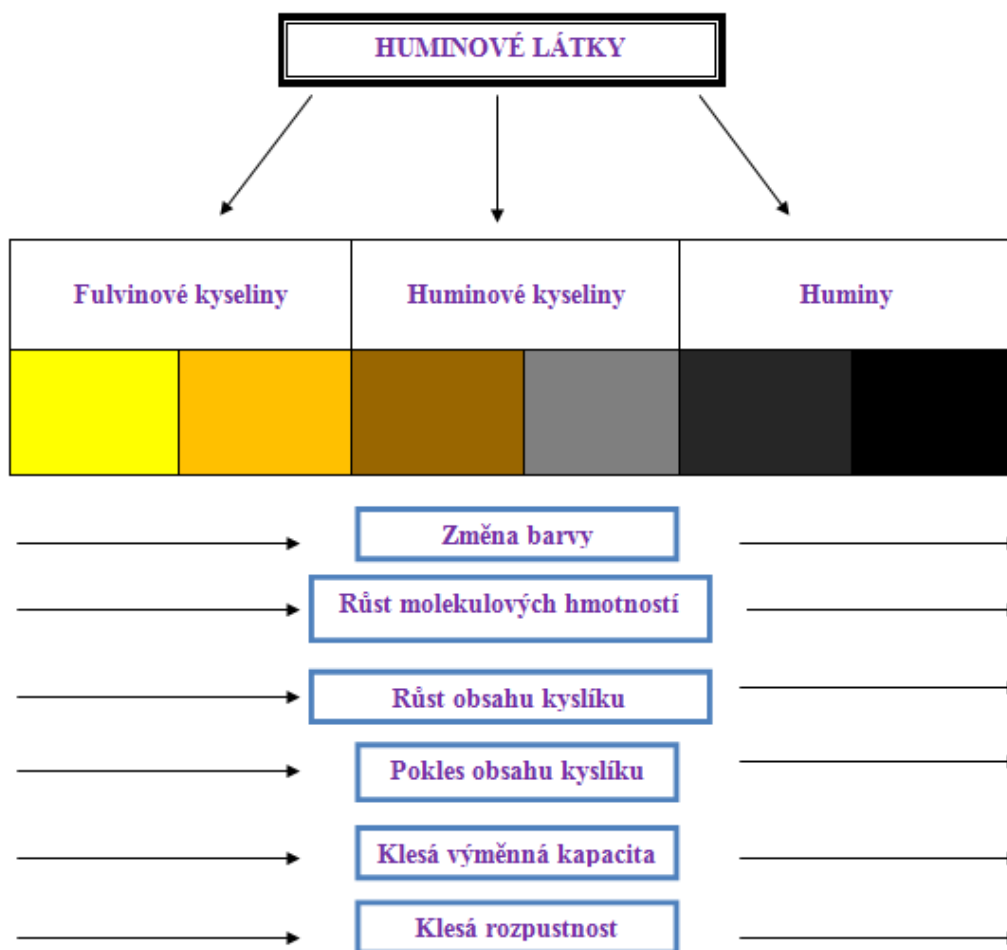
Obecně se HL dělí na základě rozpustnosti ve vodných roztocích na:



Obr. 2 Dělení HL dle rozpustnosti ve vodných roztocích [9]

HK a fulvinové kyseliny (FK) představují frakce rozpustné ve vodných roztocích, alespoň v části pH stupnice. Jako huminy označujeme látky černohnědé nerozpouštějící se ve vodě, alkoholech, zásaditých ani kyselých roztocích a mající nejvyšší molekulovou hmotnost z HL. Chemickou strukturou i vlastnostmi se podobají HK. [9]

Co se týče vlastností jednotlivých frakcí HL, tak zde panují výrazné odlišnosti (**viz Obr. 3**). Nejsvětlejší žluté až žlutozelené zbarvení mají FK, HK jsou už tmavší a mají zbarvení do hněda, nejtmaší jsou pak černé až černošedé huminy. Různorodé zbarvení souvisí především s dalšími vlastnostmi, jako jsou molekulová hmotnost, obsah základních prvků (C, H, O, N) a funkčních skupin (např. karboxylových, fenolových, hydroxylových apod.). Molekulová hmotnost narůstá od FK k huminům. Porovnání obsahu základních prvků v HK a FK můžeme vidět níže v **Tab. 1**. [10]



Obr. 3 Rozdělení huminových látek podle zbarvení (Stevenson 1982) [11]

Tab. 1 Elementární složení huminových a fulvinových kyselin [12]

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

HK lze také dělit *podle rozpustnosti v alkoholech* na:

- Hymatomalanové kyseliny – nerozpouští se v alkoholech
- Humusové kyseliny – rozpouští se v alkoholech

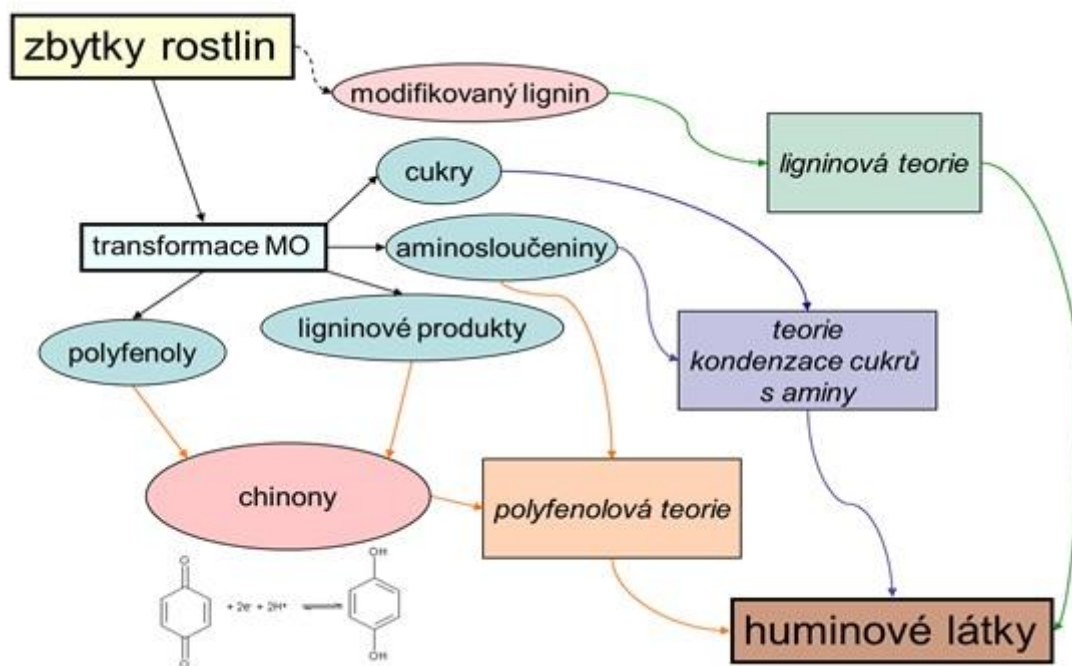
K. Simon zařadil k HK i humoligninové kyseliny, jež se podobají ligninu a liší se pouze svou nerozpustností v NaF. [13]

3.4 Vznik huminových látek

Teorie vzniku HL dodnes nejsou úplně jasné a popsané.

V literaturách [9, 14, 3], můžeme najít předpokládané teorie vzniku HL (viz. **Obr. 4**) Patří k nim teorie:

- ligninová
- polyfenolová
- vznik HL kondenzací aminosloučenin s redukujícími sacharidy



Obr. 4 Schéma předpokládaných možností vzniku HL [15]

Ligninová teorie

Ligninová neboli degradační teorie popisuje vznik HL mikrobiálním rozkladem odumřelého rostlinného materiálu, kdy z těžko rozložitelných látek jako je lignin, kutin nebo melanin vznikají vysokomolekulární huminy. Ty jsou pak oxidací postupně transformovány přes HK na FK a dále na ještě menší molekuly. Pokud degradační mechanismus pokračuje, jsou HL postupně a velmi pomalu rozloženy až na oxid uhličitý a vodu. [16]

Ligninová teorie pravděpodobně převládá při tvorbě humusu z rašeliny, jezerních sedimentů, špatně odvodněných půd a mokřích sedimentů. [14]

Polyfenolová teorie

Polyfenolová neboli syntetická teorie naopak vychází z předpokladu, že rostlinné tkáně jsou nejprve degradovány na malé molekuly (karboxylové kyseliny, fenoly atd.) a z nich se pak syntézou tvoří HL. Nejprve by tedy vznikaly FK, až pak HK a nakonec huminy. [16]

Roli mikroorganismů jakožto zdrojů polyfenolů objasnila Kononova, která došla k závěru, že HL vznikly díky mykobakteriím rozkládajících celulózu, před rozkladem ligninu [14, 9, 3].

Kondenzace sacharidů s aminy

Jednou z dalších možností vzniku HL se jeví kondenzace aminosloučenin s redukujícími sacharidy. Polymerizací redukujících sacharidů a aminů (bez přítomnosti enzymů) vzniknou hnědé dusíkaté polymery. Logicky zde vyvstává argument proti této teorii, že reakce bude probíhat poměrně pomalu při teplotách za normálních půdních podmínek. Nicméně, drastické a časté změny v půdním prostředí jako je mrznutí, tání, vlhko, sucho, společně s tím, jak se reaktanty mísí s minerálním materiálem, mají katalytické vlastnosti, jež mohou usnadnit kondenzaci. Pozitivním argumentem teorie je, že reaktanty (sacharidy, aminokyseliny apod.) syntetizují ve velkém množství mikroorganismy. Při kondenzaci sacharidů s aminy nejprve dochází k adici aminu na aldehydickou skupinu sacharidu, kdy vzniká *N*-substituovaný glykosylamin. Glykosylamin se následně rozloží za tvorby *N*-substituované 1-aminodeoxy-2-ketosy. Což je podmíněno fragmentací a vznikem 3-uhlíkového řetězce aldehydů a ketonů (diacetyl apod.), dále dehydratací a formací reduktonů a hydroxylmethylfurfuralů. Vzniklé reaktivní sloučeniny v přítomnosti aminosloučenin ochotně polymerují a tvoří hnědě zbarvené produkty. [14, 9, 3]

3.5 Vlastnosti a struktura huminových látek

Huminové látky bychom mohli definovat jako relativně velké aglomeráty molekul různých struktur a molekulových hmotností. Vlastnosti a struktura HL závisí na zdroji (voda, půda, lignit, sedimenty), vegetaci a specifických podmínkách extrakce. [8] HL jsou odpovědné za barvy v přírodních vodách (zvýšení hodnoty pH způsobí zvýšení intenzity barvy). [17]

Zastoupení jednotlivých prvků v HL se pohybuje relativně v konstantním rozmezí. Obsah uhlíku se pohybuje okolo 53,8 až 58,7 hm. % pro HK, 40,7 až 50,65 hm % pro FK. Obsah vodíku je pro HK 3,2 až 6,2 hm. %, a pro FK je velmi podobný 3,8 až 7 hm. %. Průměrný obsah kyslíku v HL se pohybuje v rozmezí 31,8 až 51,9 hm.%. Dusík je obsažen v 0,8 až 4,3 hm. % pro HK a 0,9 až 3,3 hm. % pro FK. [18]

Díky jejich rozmanité struktuře a množství funkčních skupin se jedná o poměrně reaktivní látky, které aktivně reagují např. s halogeny. Vykazují však i významné adsorpční vlastnosti vůči aktivnímu uhlí, oxidu hlinitému a minerálním koloidům, což pravděpodobně ovlivňuje koagulační procesy. Tvoří komplexy s různými ionty kovů (zejména s Fe^{3+} , Al^{3+} , a Cu^{2+}) a jsou schopné absorbovat mnoho organických mikropolutantů jako pesticidy, ftaláty apod. [17]

Pro představu o struktuře HL, chemických, fyzikálních a biologických vlastnostech, je stěžejní obsah funkčních skupin. Nejvyšší zastoupení mají většinou karboxylové skupiny, které udávají kyselost HL, právě zde jsou místa absorpce a výměny kationtů. FK mají vyšší obsah COOH skupin než HK. Další struktury, které se podílejí na kyselosti HL, jsou hydroxylové skupiny, a to především fenolické a alkoholové hydroxyly. [9]

Vlastnosti HL však významně ovlivňuje i zastoupení aromatických a alifatických struktur. Relativní množství aromatických struktur (oproti alifatickým) se označuje jako aromaticita.

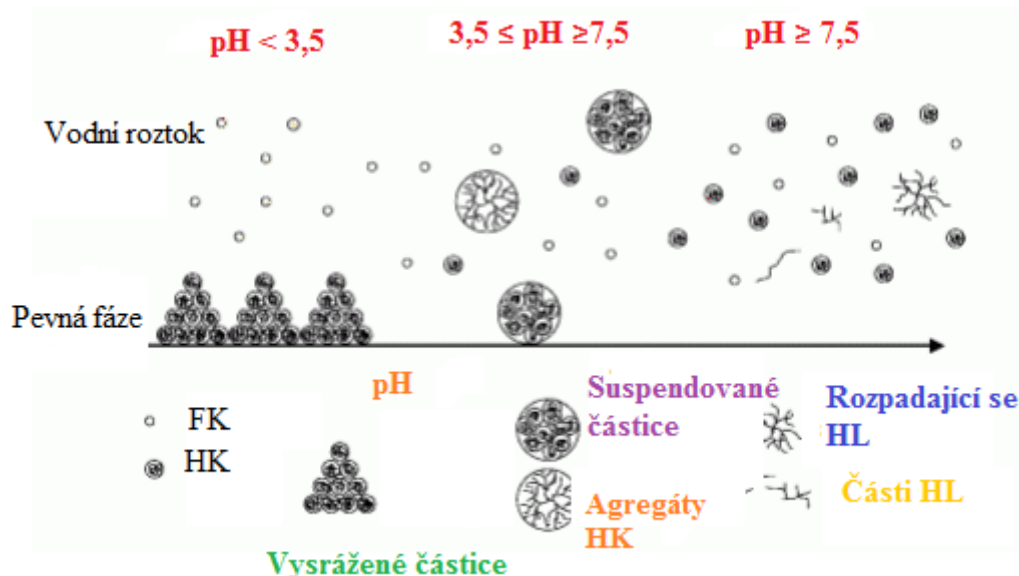
Ta má vliv na stabilitu a chování HL a také poukazuje na původ a typ HL. HK jsou až dvakrát aromatictější než FK, což souvisí s procesem jejich vzniku – humifikací. Významným činitelem v této oblasti jsou rovněž mikroorganismy, které způsobují rozklad alifatických řetězců, čímž dochází k nárůstu obsahu stabilnějších aromatických struktur. [19]

Mezi další faktory, jež ovlivňují chování HL, patří velikost jednotlivých molekul a částic, stupeň jejich dispergace (pravé nebo koloidní roztoky), polarita, která je dána charakterem skeletu (aromatický či alifatický) a hlavně druhy, počty a disociačními schopnostmi funkčních skupin. [20]

Sekundární a terciární struktura HL (viz **Obr. 5**) má velký vliv na biogeochemické procesy.

Struktura HL a uspořádání jednotlivých stavebních bloků HL jsou poměrně závislé na okolním prostředí. I nepatrné změny pH způsobí rozpad struktury huminových látek. Mohou se vyskytovat rozpuštěné v roztoku, v koloidní formě, nebo vysrážené.

V koloidním stavu jsou drženy pouze slabými silami, avšak jakákoliv změna pH roztoku, koncentrace nebo přítomnost kovových iontů – zejména vícevalných – způsobí velké konformační změny. [21]



Obr. 5 Chování HL ve vodném prostředí – upraveno dle Bergelin [22]

Huminy představují frakci HL, jenž je ve vodě nerozpustná jak při kyselé, tak i alkalické hodnotě pH. Fulvinové kyseliny představují frakci HL, která je rozpustná ve vodě v celém rozmezí pH a zůstává v matrici po vysrážení HK v kyselé oblasti pH stupnice. Od HK se liší nižší molekulovou hmotností. Díky tomu, že mají ze všech frakcí HL nejlepší rozpustnost, jsou v přírodních vodách v převaze. [23]

Pro vody s obsahem HL je typická nejen vysoká koncentrace těchto látek, ale také nízký obsah vápníku, hořčíku a hydrogenuhličitanových iontů, nízká hodnota pH a často také zvýšený obsah hliníku, což jsou typické rysy vod v horských oblastech nebo horních částech toků. Ve většině případů bývají nevyhovující i některé senzorní vlastnosti vody, jako je barva, chuť a zápach. [16]

3.6 Huminové kyseliny

3.6.1 Vlastnosti a struktura

Huminové kyseliny patří mezi hlavní a pravděpodobně nejcennější složku HL v půdě. Jsou rozpustné v alkalickém prostředí, částečně rozpustné ve vodě a nerozpustné v kyselém prostředí, což se může měnit např. s pH nebo iontovou silou. Díky jejich amfifilnímu charakteru tvoří v neutrálním až kyselém prostředí struktury podobné micelám, zvané pseudomicely. Tuto vlastnost lze využít při studiích odstraňování znečištění životního prostředí, nebo ke zvýšení rozpustnosti hydrofobních léčiv ve vodě. [24, 25]

Machesky definuje HK jako složité polydisperzní směsi heterogenních polyelektrolytů. [26] *Hladký a spol.* popsal HK jako komplexní složité přírodní organické makromolekuly s vysoce variabilním chemickým složením a různými aktivními funkčními skupinami. [27] Autoři článku [28] tvrdí, že HK jsou tmavě šedé nebo červenohnědé makromolekuly hydroxykarboxylových kyselin obsahující dusík a jsou z roztoku získávány alkalickým loužením. [28] Typické poloměry izolovaných jednotlivých HK jsou v rozsahu 20 – 80 nm, nicméně u nich odchází k agregaci do větších celků. [29]

Zájem o HK a jejich soli (humáty) zapřičiňuje především to, že vykazují řadu zajímavých vlastností, jež je možné prakticky uplatnit. Za zmínku stojí jejich schopnost iontové výměny či sorpční a hydrofilní vlastnosti. Rozpustné soli alkalických kovů HK jsou absorbovány na rozhraní pevná látka – voda nebo olej – voda. V těchto systémech se poté dokážou chovat jako povrchové aktivní látky (PAL). Molekuly těchto vysokomolekulárních látek obsahují kondenzované a substituované aromatické kruhy k sobě vázané přes nearomatické fragmenty. Supramolekulární struktury nebo molekulární asociáty HK obsahují funkční skupiny jako –COOH nebo –OH, které určují výše uvedené vlastnosti těchto sloučenin. Přírodní zdroje HK jsou různé, nejčastěji však se jedná o hnědé uhlí, rašelinu či zeminu, ty se poté liší elementárním složením, počtem ionogenních skupin, stupněm kondenzace molekul, poměrem hydrofilních ku hydrofobním fragmentům a molekulovou hmotností.

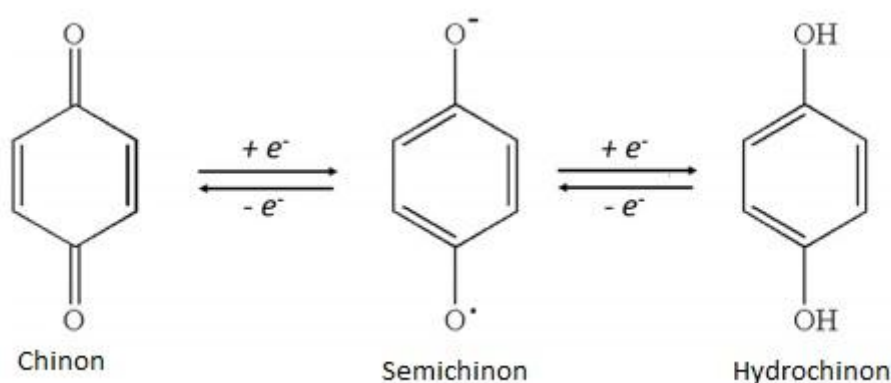
V poslední době bylo prokázáno, že mohou HK být produkovány fermentačně za použití ovoce a palmových stromů jakožto substrátu, což je přírodní a udržitelný zdroj. Kromě toho je taky možné použít chemickou syntézu přes polymerační/kondenzační reakce. [24]

Systémy, jež se používají s největší frekvencí v průmyslových procesech, jsou vodné roztoky solí HK. Mohou sloužit např. jako stabilizátory vodné jílové suspenze (vrtné kaly), změkčovadla, emulgátory koloidních paliv apod. Často se také používají humáty ve spojení s vodou, která má různé stupně mineralizace.

Roztoky humátů alkalických kovů jsou velmi citlivé na přídavek silných elektrolytů, které způsobí jejich vysrážení. Množství použitých elektrolytů udává míru stability těchto sloučenin, označuje se jako práh koagulace, nebo také práh strukturace. Přidání silné kyseliny např. HCl do vodného roztoku solí HK má za následek tvorbu sraženiny. [30]

Struktura

Chemické složení HK se může lišit v závislosti na geografickém původu, věku, klimatu a biologických podmínkách, takže přesná charakterizace struktury je obtížná. Jejich molekulární hmotnosti se pohybují v rozmezí od 2 do 1300 kDa. Hlavní složky jejich struktury jsou fenoly, karboxylové kyseliny, enoláty, chinony, ethery, ale také cukry a peptidy. Ovšem fenoly a karboxylové kyseliny jsou ve značné převaze. Složitá struktura HK se skládá z hydrofilních částí (zejména funkční skupiny –OH, –COOH), hydrofobních částí skládajících se z alifatických řetězců a aromatických kruhů. Fenolové a karboxylové skupiny jsou zodpovědné za to, že se HK chovají jako slabé kyseliny. Chinony jakožto akceptoři elektronů jsou zodpovědné za produkci reaktivních forem kyslíku. Jsou redukovány na semichinony, které jsou stabilizovány svými aromatickými kruhy a další redukcí vznikají hydrochinony, které jsou ještě více stabilní (viz. **Obr. 6**). [24]

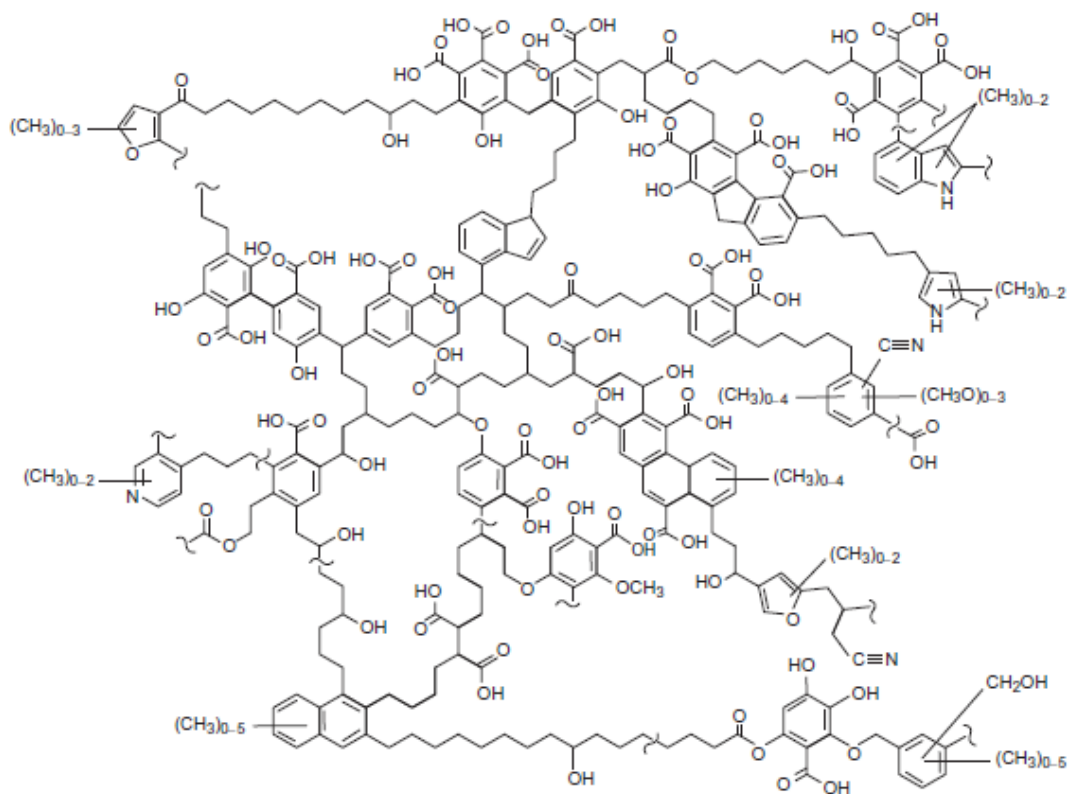


Obr. 6 Redukce chinonů přes semichinony na hydrochinony [24]

Aeschbacher a spol. [31] studovali části HK – elektronové akceptory (chinony) a donory elektronů (fenoly) získané z různých zdrojů. Zjistili, že původ a stáří HK má přímý účinek na jejich redoxní vlastnosti. Analýza za pomoci ¹³C NMR ukázala, že HK z vod mají vyšší počty elektron donorů a nižší počty elektron akceptorů než suchozemské HK. Autoři podporují hypotézu, že fenolické skupiny HK zpomalují oxidační transformaci chinonů zvýšením jejich stálosti.

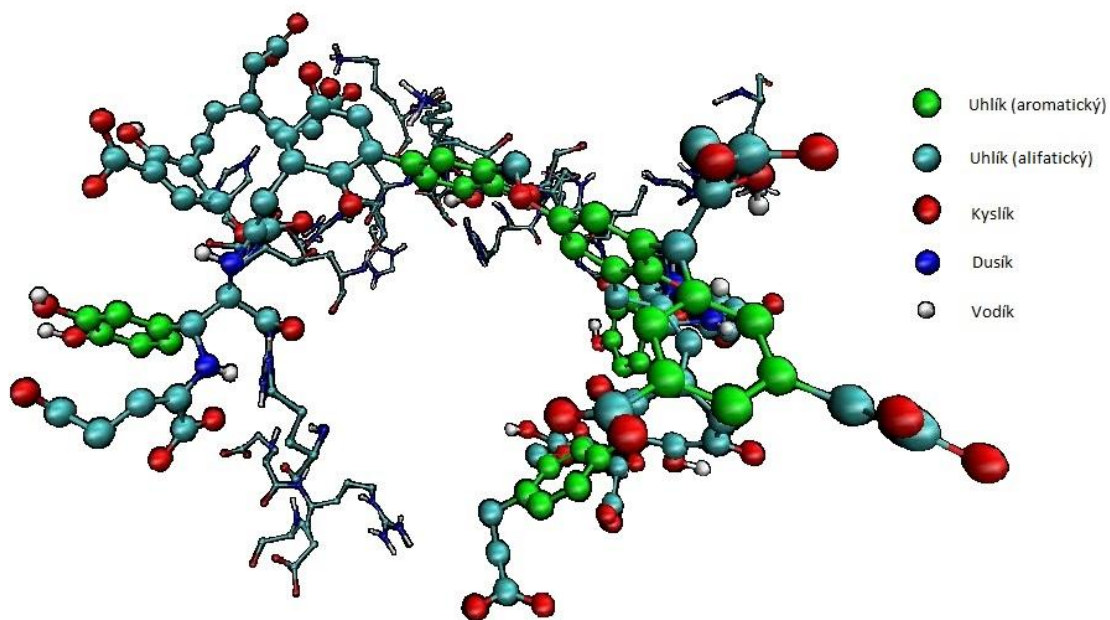
Přítomnost prázdných kavit v navrhované struktuře HK je jedním z nejzajímavějších rysů, jelikož se zde mohou zachycovat a vázat další organické sloučeniny jako jsou sacharidy, proteinogenní materiály, lipidy, anorganické látky apod.

Schnitzer a Schulten [32] navrhli v roce 1993 2D strukturu HK, která se podle nich skládá především z uhlovodíků, fenolů, monomerů a dimerů ligninu, lipidů (alkanů, alkenů, mastných kyselin, esterů *N* – alkylů a alkylaromátů) a sloučenin obsahující dusík, vyobrazeno na **Obr. 7**.



Obr. 7 2D struktura navrhovaná podle Schnitzera a Schultena (1993) [32]

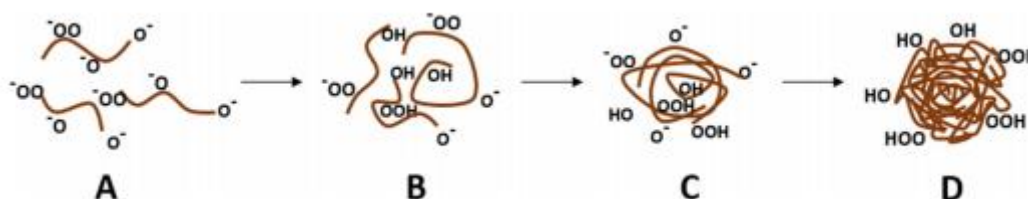
V roce 1997 převedli 2D strukturu do 3D projekce, jelikož 2D projekce nestačila pojmut všechny funkční skupiny obsahující kyslík. [32] Výsledek lze vidět na **Obr. 8**.



Obr. 8 3D struktura HK podle Schnitzera a Schultena [33]

Rozpustnost a vliv pH

V alkalickém prostředí jsou fenolické a karboxylové skupiny deprotonovány a repulze těchto záporně nabitých skupin způsobuje, že se molekuly vyskytují ve více protažené konfiguraci. Se snížením pH nastává situace, že jsou molekuly naopak protonovány, molekuly poté zaujmou stočenou a kompaktní strukturu. V této fázi jsou hydrofobní části vnitř struktury a hydrofilní části jsou v kontaktu s vodným médiem. Právě tehdy se formují struktury podobné micelám, což se využívá u HK, které fungují jako detergenty, čili snižují povrchové napětí látek. Dochází k tvorbě agregátů na intramolekulární úrovni, následované tvorbou intermolekulární organizace a nakonec dojde k precipitaci, což je znázorněno na (Obr. 9). [24]



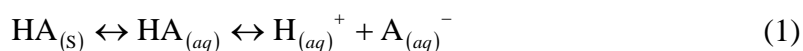
Obr. 9 Chování HK v alkalických podmínkách a proces agregace po snížení pH: Alkalické pH-nábojové repulze (A), snížení pH: intramolekulární agregace (B), snížení pH: intermolekulární agregace (C), kyselé pH: srážení (precipitace) (D). [24]

Prado a spol. poznamenal, že pH neovlivňuje pouze rozpustnost HK, ale i stabilitu jejich suspenzí. Difúzní elektrická dvojvrstva se tvoří kolem nabitých částic, chrání je a umožňuje systému být nenabitý (bez náboje). Kromě toho koncentrace iontu zajišťuje ochranu náboje částic, která je větší pro systémy s nižší iontovou silou, protože iontové částice budou mít silnější interakci s elektrickou vrstvou než s rozpouštědlem molekuly. [34]

Solubilizace

Při neutrálním pH je solubilizace HK pouze částečná. Ačkoliv můžeme HK nalézt v přírodě rozpuštěné ve vodě, ne všechny izolované pevné preparáty se rozpustí. [24]

Autoři práce [35] navrhli různé rozpouštěcí mechanismy pro lignitické suspenze HK ve vodě, v níž má pevná látka nerozpustné a rozpustné frakce. Vzhledem k tomu, že jsou HK slabé polyelektrolyty, mohou existovat ve vodě jako disociované molekuly a v disociované formě (rov. 1).



Tento mechanismus odpovídá rozpustné frakci HK. Nerozpustná frakce interaguje s životním prostředím prostřednictvím povrchu a chová se jako iontoměnič tím, že uvolní H^{+} ionty do roztoku, zatímco anionty zůstávají nerozpustné (rov. 2). [35]

Reaktivita

Interakce HK s cizorodými látkami v půdě silně ovlivňuje mnoho faktorů jako je pH, iontová síla, koncentrace bez kovových iontů a přítomnost konkurenčních iontů. [36]

Jelikož znalosti o HK nejsou doposud kompletní, představa o možných vazebných interakcích HK je zatím poměrně přibližná, nicméně na základě dostupných informací jsme schopni předpokládat tyto vazebné interakce HL s cizorodými látkami:

Iontová vazba – pokud bychom brali v úvahu vznik iontové vazby, potom bychom mohli ve zjednodušeném pohledu na HL pohlížet jako na ionexy. Např. v případě alkalických kovů a amoniaku.

Koordinační vazba – důležitějším typem vazebné interakce, uplatňující se u imobilizace toxických kovů v půdě, je koordinační vazba mezi makromolekulární matricí HL a ionty kovů v případě, že jsou schopné tento typ vazby vytvořit. Místa, kde by mohla tato vazba potenciálně vznikat jsou karboxylové, fenolické a další funkční skupiny vyskytující se ve struktuře HL ve velké míře.

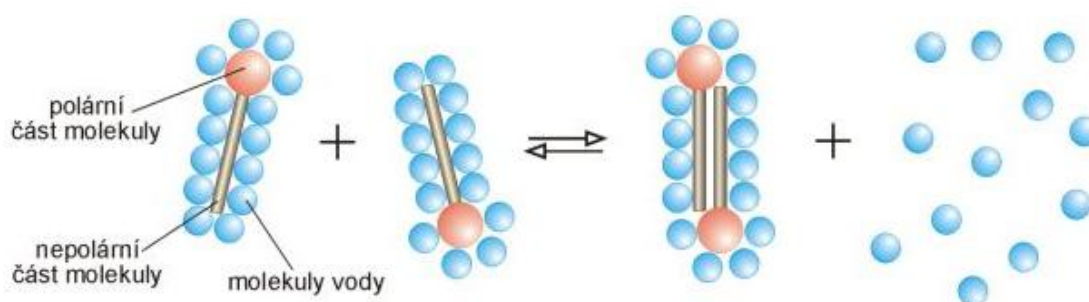
Kovalentní vazba – interakce vedoucí ke vzniku kovalentních vazeb mohou být rozděleny na dvě skupiny:

1. reakce probíhající bez využití aktivity enzymů
2. reakce s využitím biokatalýzy

Příkladem zde může být kovalentní vazba anthracenu na HK.

Vodíkové můstky – na základě prokázané přítomnosti některých funkčních skupin ve struktuře HL lze (amidová, laktamová, nitrilová) předpokládat možnost vzniku vodíkových můstků, jež se mohou význačně podílet na vazebných schopnostech mezi HL a kontaminanty.

Hydrofobní interakce – vznikají při kontaktu nepolárních skupin (např. alkylových) nesených molekulami nacházejících se ve vodném roztoku, kde tyto interakce mohou např. vycházet z působení van der Walsových sil nebo přesunu π elektronů. [10]



Obr. 10 Schematické znázornění vzniku hydrofobních interakcí [37]

Interakcí HL s jinými sloučeninami strukturami vznikají:

soli nízkomolekulárních organických kyselin – reakce organických kyselin (např. kyselina octová, šťavelová) s minerály (např. magnezit, kalcit)

soli alkalických kovů a kovů alkalických zemin – navázání alkalických kationtů (Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+}) iontovou vazbou na karboxylové skupiny HL. Dělí se na humáty (soli HK) a fulváty (soli FK).

komplexy s kovy - podstatou tvoření komplexů s kovy je zaplnění volných orbitalů kovů elektrony donorových skupin ligandů. [38]

Toxicita

Toxicita HK byla shledána jako mimořádně nízká. [39, 40, 41] Provedené dermální testy přípravků s HK nevykázaly žádné abnormality v akutích a chronických studiích toxicity. [26] *Sato a kol.* provedli zkoušky mutagenity HK za použití *Salmonella typhimurium* TA100 a TA98, mutagenní účinky nebyly pozorovány. [42]

3.7 Molekulární organizace a konformace HK

Jak už zde bylo zmíněno, HL jsou heterogenní a polydisperzní, což značně komplikuje jejich charakterizaci z hlediska sekundární struktury a molekulární organizace v roztocích. Studují se však intenzivně, jelikož jsou obsažené v půdě a podílejí se na všech procesech, které se v ní odehrávají včetně procesů spojených se znečištěním půdy, vody apod. Výzkum těchto zajímavých látek trvá již dlouhá léta, bylo vydáno nespočet publikací, ale názory na jejich případnou strukturu či konformační uspořádání se s vývojem experimentálních technik, což umožnilo přesnější analýzu, postupně měnily. Nejdříve se autoři studií [43, 44, 9] domnívali, že HL mají polymerní strukturu a skládají se z náhodně svinutých (stočených) makromolekul mající protáhlý tvar v bazických roztocích, nebo v roztocích s malou iontovou silou, ale stanou se stočenými v kyselých roztocích nebo v roztocích s vysokými hodnotami iontové síly. Nicméně od této teorie se již postupem času upouští. Námitky proti polymerní teorii vznesly studie jako např. [7, 45, 46, 47, 48]. Vysoká molekulová hmotnost totiž může být vysvětlena asociací malých komponentů do agregátů ve vodných roztocích s makromolekulárními vlastnostmi. Nejvíce pravděpodobný se zdá být novější koncept předpokládající supramolekulární strukturu HL, jež navrhuje Piccolo [7]. Piccolo identifikoval ve struktuře HL velké množství relativně malých a chemicky různorodých organických molekul tvořící shluky spojené slabými disperzními silami. Van der Waalsovy, $\pi-\pi$ vazby, $\text{CH}-\pi$ interakce a vodíkové vazby jsou zodpovědné za zdánlivě velké molekulární velikosti HK. Nicméně jeho experimentální práce vyvolala řadu otázek a poznámek, jelikož výsledky těchto studií mohou být vysvětleny jak makromolekulárním, tak supramolekulárním chováním HL. [49]

Zielinska a spol. [29] tvrdí, že koloidním interakcím HK mohou dominovat elektrostatické nebo hydrofobní interakce. HK jsou charakterizovány jako heterogenní proto, že u nich může dojít k obou typům reakcí, ačkoliv tvorba agregátů podobným micelám při poměrně vysoké koncentraci HK je připisována především hydrofobním interakcím. *Colombo a spol.* [50] studovali vliv pH na struktury agregátů HK a výsledky ukázaly, že agregáty připravené při pH 5 jsou kulovitého tvaru. V případně absence hydratačních sil a při kyselém pH jsou HK stabilizovány intermolekulárními dipól – dipól interakcemi a van der Waalsovými silami.

Simpson a spol. [51, 52] provedli NMR experimenty s HL a odhalili existenci polysacharidu, polypeptidu, ligninu a dlouhých uhlovodíkových řetězců náhodně sjednocených (jak navrhl Piccolo) do supramolekulárních komplexů, ale byly vázány přes kovové můstky.

Trubetskoi a Trubetskaya [49] zkoumali elektroforetické frakce HL pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie s reverzní fází (*reverse phase high performance liquid chromatography – RP – HPLC*) a jejich výsledky naznačují, že supramolekulární koncept struktury HL opravdu může být použit pro vysvětlení některých půdních procesů zahrnující HL.

Dle výzkumu *Baigorriho a spol.* [53] se HL jeví jako složené ze dvou hlavních frakcí. Frakce vykazující v roztocích čistě makromolekulární chování (s přítomnými makromolekulami nebo stabilními molekulovými agregáty), a druhé frakce formované molekulárními agregáty (supramolekulární asociace), která zahrnuje molekuly nízkých hmotností a nečistoty makromolekulární povahy.

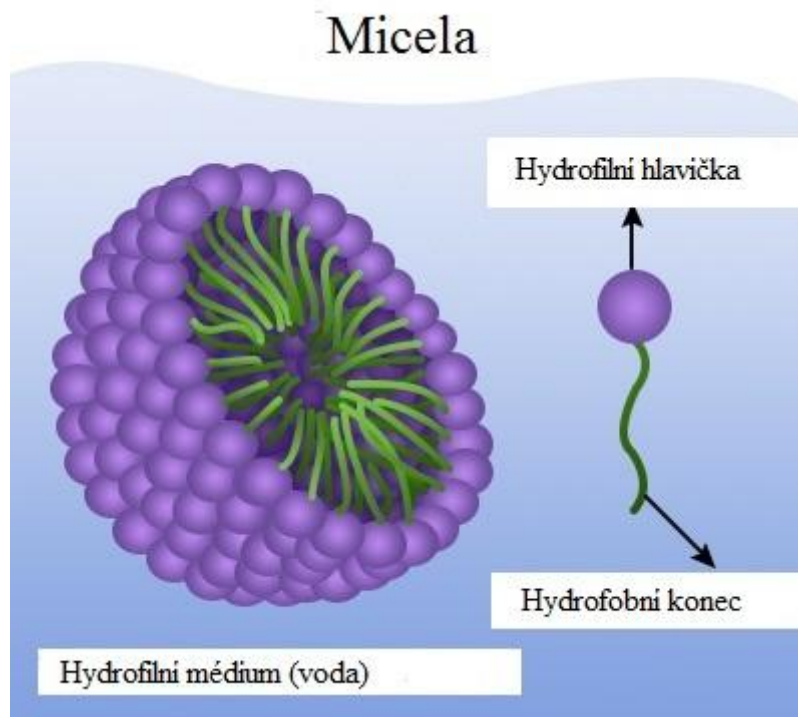
Balousha a spol. [54] studovali supramolekulární strukturu metodou transmisní elektronové mikroskopie (*Transmission Electron Microscopy – TEM*) a zjistili tvorbu agregátů v řádu několika stovek nanometrů. Agregáty HK obsahovaly i rozvětvené struktury, ale díky ne příliš vysokému rozlišení, špatně viditelné. Výsledky ukázaly, že studované HK se skládaly ze sítí složených ze základních molekul o průměru 20 nm, ale obsahovaly i izolované větší makromolekuly v rozmezí 30 – 200 nm.

Ovšem nejdiskutovanějším konceptem dnešní doby je koncept micelární struktury, při kterém se organické molekuly uspořádají ve vodném roztoku za vzniku hydrofilní vnější oblasti a hydrofobní oblasti po kontaktu s vicinálními molekulami vody. [55] Micelární model HK navrhoval už Wershaw [56], když při svém výzkumu naznačil, že by měly podjednotky HK podléhat spontánně agregaci drženy pohromadě slabými silami, jako jsou vodíkové vazby, π – vazbami apod. Navrhl tak proto, že některé frakce HL se ve vodných a alkalických roztocích chovají jako povrchově aktivní látky. Micely mohou být rozděleny na menší jednotky přidáním organických kyselin nebo manipulací s pH. [46, 48]

Guetzloff a Rice [57] však pochybují, že všechny HK frakce se podílejí na tvorbě micelárních agregátů. *Chilom, Bruns, Rice* [58] předpokládají, že jedna třetina komponent HK se chová jako surfaktant (povrchově aktivní látka), což právě zapříčiňuje amfifilní vlastnosti HK. Studie *Chilom a Rice* [59] navazuje na předchozí experimenty a dále studuje molekulární organizace HK v roztocích. Výsledky naznačují, že se HK skládá ze tří frakcí: dvou frakcí kyselé povahy a jedné frakce podobné lipidům, jež má různé role v procesu vlastní organizace. Vzorky HK měřili pomocí diferenční skenovací kalorimetrie (*Differential scanning calorimetry – DSC*). Výsledky ukázaly, že struktura HK v pevném stavu, je více než jen směsí složek a určují ji specifické interakce mezi jednotlivými komponenty. *Kleber a spol.* [60] popisují HL jako směs složek s proměnnou amfifilností.

Smyslem práce *Varga a spol.* [61] bylo prostudovat chování HK po přidavcích organických či anorganických kyselin a souběžně s tím byly sledovány parametry jako pH elučního činidla, koncentrace soli a pufrační kapacita. Výsledky ukázaly, že retenční posun nebyl

zapříčiněn tvorbou micel, ale sekundárními (zejména hydrofobními) interakcemi způsobených změnou pH. Proto tvrdí, že vznik micel nelze jenom tak jednoduše potvrdit ani vyvrátit.



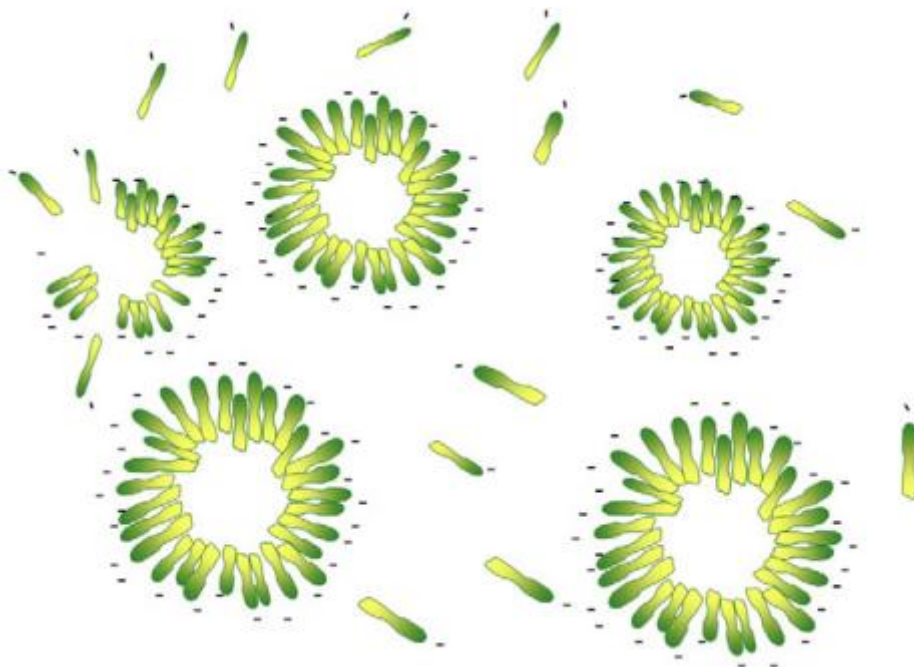
Obr. 11 Struktura micely [62]

Musco a spol. [8] studovali povrchové napětí HL, protože se jim HL jevíly nadějně jako případné surfaktanty (tenzidy). Dle jejich výzkumu, HL z půd a sedimentů mohou být definovány jako vhodné surfaktanty na základě měření jejich povrchového napětí. Po zhodnocení různých vlivů (a jejich derivátů) na povrchové napětí HL usoudili, že úplně klíčový je původ HL. Jelikož např. v případě průmyslově vyráběných HL dochází k tomu, že působí pouze málo, nebo nemají dokonce žádný vliv na povrchové napětí. Naproti tomu HL z přírodních zdrojů dokážou ovlivnit povrchové napětí ve velké míře. Navíc spontánní agregace vodných roztoků HL může probíhat na intramolekulární (zahrnující jedinou molekulu polymeru) nebo intermolekulární (zahrnující více řetězců) úrovni. Vnitřní část agregátů se jeví jako relativně hydrofobní, zatímco vnější je hydrofilní. Vliv HL na povrchové napětí roztoků je dán jejich amfifilním charakterem a zároveň tendencí se hromadit na rozhraní voda – vzduch. Při tvorbě pseudomicel hrají důležitou roli faktory jako koncentrace roztoku, pH a koncentrace iontů kovů, jež mají vliv i na to, jak HL ovlivňují povrchové napětí látek. Všechny HL studované v této práci prokázaly schopnost ovlivňovat povrchové napětí, nicméně nelze s určitostí konstatovat, že se jedná o opravdové surfaktanty. K čemuž dospěli, jak *Klavins a Purmalis* [63], tak např. *Conte a spol.* [64].

Montoneri a spol. [65] zkoumali HK, konkrétně jejich schopnosti jakožto surfaktantů, nicméně zaměřili výzkum i na jejich strukturu. Dospěli k názoru, že HK mohou nahradit komerční surfaktanty, zajímavé však byly i studie struktury. Studované HK jsou podle nich směsí malých molekul s molekulovými hmotnostmi okolo několika tisíců Da a méně, a makromolekul s molekulovými hmotnostmi okolo několika stovek tisíců Da. Velikost makromolekul není ovlivněna koncentrací vody, zatímco u malých molekul může

docházet k agregaci. Stejně vlastnosti analyzovali i *Salati a spol.* [66] na základě předpokladu, že HK se skládají ze supramolekulárních struktur dvou hydrofobních frakcí, obsahující především z uhlovodíkových řetězců pocházejících ze segmentů rostlinných polymerů a hydrofilní frakce sestávající se zejména z iontových skupin typu karboxylových kyselin, neionogenních polárních částí jako jsou fenoly, alkoholy, aldehydy, ketony, amidy a aminy. Z čehož může plynout, že mají amfifilní vlastnosti a tím pádem mohou být vhodnými povrchově aktivními látkami.

Gambova a Olea [67] tvrdí, že přidavek velmi nízké koncentrace kationtových surfaktantů do vodného roztoku HK vyvolá velkou změnu povrchových vlastností tohoto přírodního polyelektrolytu. Formace do útvarů micel se udává při koncentraci (HK i surfaktantu) hluboko pod kritickou micelární koncentrací. Vydedukovali, že proces agregace by mohl být považován za micelizaci indukovanou HK. Na druhé straně, snížení povrchového napětí vody je mnohem větší u vodných roztoků HK/ surfaktant, než u roztoků čistých složek.



Obr. 12 Předpokládaná struktura micely HK dle *Salati* [66]

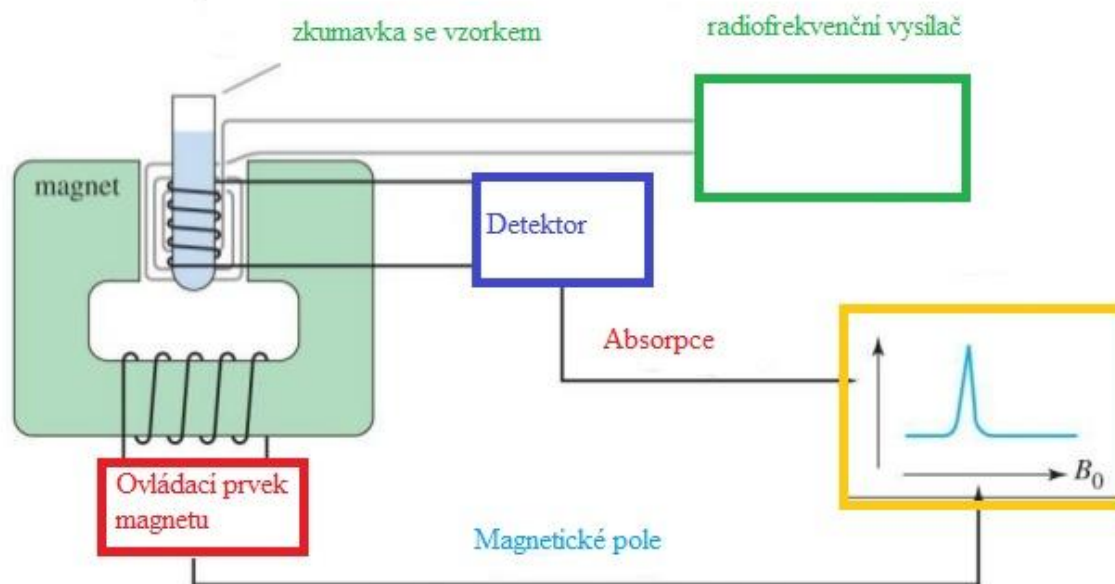
3.8 Metody studia molekulární organizace a frakcionace HK

Během dlouhých let výzkumu, jež se provádí na HK, se zjistilo, že charakterizovat tyto složité polydisperzní a heterogenní systémy pomocí jedné analytické metody není možné. Z tohoto důvodu vědci začali využívat kombinace různých metod, jež napomáhají získat co nejpřesnější a nejaktuálnější výsledky o molekulární organizaci (konformaci) či struktuře HK.

Nukleární magnetická rezonance

Nukleární magnetická rezonance (NMR) je metoda založená na distribuci a chování magnetických momentů určitých izotopů v magnetickém poli. Principem NMR je interakce radiofrekvenčního magnetického pole s magnetickými momenty atomů ve vnějším statickém magnetickém poli. Tuto interakci představuje absorpce energie střídavého radiofrekvenčního

magnetického pole v jádrech atomů. Obecně můžeme pozorovat tuto absorpci u všech izotopů s nenulovým (přesněji řečeno nevykompenzovaným) magnetickým momentem. Z kvantového pohledu se jedná nejčastěji o izotopy, jejichž spinové kvantové číslo jádra je rovno násobku 1/2. Především v experimentech se můžeme setkat s používáním např. izotopů ^{13}C , ^{19}F , ^{23}Na nebo ^{31}P , ale často se používá i ^1H . [68] Základem této metody je, že běžně přítomné atomy uhlíku (^{12}C) neinterferují ve spektrech a tím je podstatně zjednodušují [69].



Obr. 13 Princip nukleární magnetické rezonance [70]

Sutton a Spósito [71] ve své studii, kde zkoumali HK za pomoci metody NMR, podotýkají, že dle nového pohledu, jsou HL složeny z různorodých, relativně nízkomolekulárních složek tvořící dynamické asociáty, jež jsou stabilizované hydrofobními interakcemi a vodíkovými vazbami. Asociáty jsou pak schopny ve vodném prostředí vytvořit micelární strukturu.

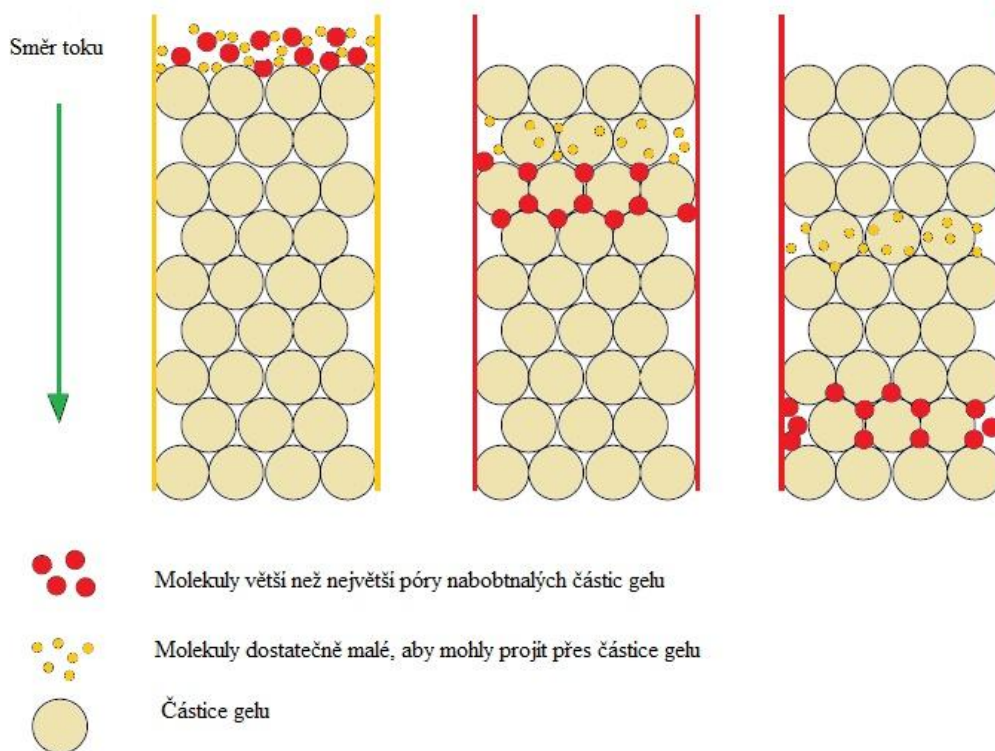
Shirzadi a spol. [72] studovali HK za pomoci poměrně nové techniky NMR – přenosu saturace s dvojitým rozdílem (*Saturation transfer double difference – STDD*), která se používá např. na určení interakcí pesticidů s HK na molekulární úrovni. Stupeň interakce v každém NMR pozorovatelném jádře lze kvantifikovat ve formě epitopové mapy, která znázorňuje mechanismus interakce pesticidu s HK. Jejich výsledky ukázaly, že při pH 7, atomy halogenu (F a Cl) ve vodě rozpustných pesticidech (diflufenzopyr, acifluorfen a chlorsulfuron) hrají dominantní roli v ovlivňování vazby HK, přičemž karboxylové skupiny pravděpodobně hrají sekundární roli, pokud jsou atomy halogenu také přítomné v molekule. Elektronegativita a elektronové hustoty se zdá hrají klíčovou roli v mechanismu vazby a výsledky naznačují, že polární vazby jsou primární místa, kde dochází ke kontaktu HK s pesticidy. Interakce mohou zahrnovat vodíkové vazby a dipól – dipól interakce.

Longstaffe a spol. [73] zkoumali za pomoci metody reverzní heteronukleární saturace přenosu rozdílu (*Reverse Heteronuclear Saturation Transfer Difference –RHSTD*) NMR vztah mezi pH roztoku a distribucí vazebných interakcí v různých doménách rozpuštěných HK pro tři xenobiotika: pentafluoroaniline (PFA), pentafluorfenyl (PFP) a hexafluorobenzen (HFB). Při nízkém pH, PFA a PFB interagují především s aromatickými složkami HK, se zvyšující pH dochází k poklesu interakce. Naopak HFB interaguje se všemi složkami HK stejně v celém rozsahu pH. Bylo prokázáno, že $\pi - \pi$ interakce π – elektronu, jež přebírá HK struktura jsou o něco silnější u PFA a PFB než u HFB. Za použití spektroskopie řízené difúze (*Diffusion Ordered Spectroscopy –DOSY*) NMR se ukázalo, že pH závislost interakcí koreluje se změnami v konformaci sacharidových složek HK spíše než aromatických. Dle jejich názoru, pozorovaná preference pro aromatické HK je způsobena omezeným přístupem k nearomatickým složkám HK při nízkém pH. Tyto složky HK tvoří těsně vázající se hydrofobní domény kvůli silným inter- a intramolekulárním vodíkovým vazbám. Při vysokém pH se tyto struktury otevírají, čímž se stávají více dostupné pro interakce s polárními sloučeninami.

Gelová permeační chromatografie

Často se pro studium HL využívá vylučovací chromatografie (*Size Exclusion Chromatography – SEC*). [69] SEC je termín nedávno zavedený pro metodu, která byla více než 30 let používána pod názvem gelová permeační chromatografie (*Gel Permeation Chromatography – GPC*). [74] Pomocí GPC je možné separovat jakékoliv molekuly, které se liší svými rozměry, pokud se dobře rozpouštějí v některém rozpouštědle. Největší výhodou GPC je, že separace závisí pouze na velikosti molekul studovaného materiálu a téměř vůbec ne na chemické povaze, což neplatí pro absorpční či rozdělovací chromatografii. [75]

Metoda SEC může probíhat za zvýšeného (*High Pressure Size Exclusion Chromatography – HPSEC*) i sníženého (*Low Pressure Size Exclusion Chromatography – LPSEC*) tlaku.[69] Tato metoda dnes velmi výrazně dominuje mezi postupy používanými ke stanovení distribucí molárních hmotností. Vzorek polydisperzního polymeru je promýván kolonou, naplněnou porézními kuličkami s uniformní velikostí pórů, a dělí se na složky podle velikosti molekul. Stěny pórů musí být inertní tak, aby se na nich makromolekuly neadsorbovaly. Zvláštností ovšem je, že jak póry, tak prostory mezi zrny náplně jsou naplněny tímž rozpouštědlem, kterého se používá i k eluci nastříknutého vzorku. [76]



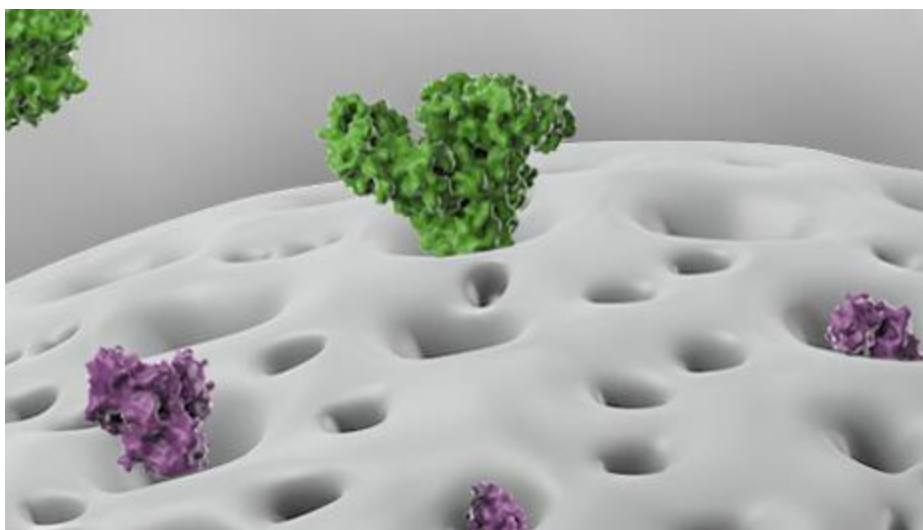
Obr. 14 Separace molekul vzorků procházejících chromatografickou kolonou [77]

Velmi často používají při studiu HL metodu SEC autoři studií [46, 47, 78, 79], např. Nebioso a Piccolo [79] identifikovali frakce HL za pomoci HPSEC. Jejich výsledky byly v souladu se supramolekulárním konceptem. Zjistili, že hydrofobní sloučeniny se vyskytovaly především v největší velikostní frakci, zatímco hydrofilní složky byly eluovány v nejmenší velikostní frakci. Dále výsledky ukázaly, že HL jsou složeny z heterogenních molekul náhodně se spojujících v závislosti na velikosti, tvaru, chemické afinitě, hydrofobicitě a strukturální charakterizace jednotlivých molekul. Problematické jsou však silné mezimolekulové interakce stabilizující jejich supramolekulární asociace.

Trubetskaya a spol. [80] studovali frakce HK podle jejich hydrofobnosti za pomoci metody RP – HPLC. Zjistili, že frakce A s nejnižší elektroforetickou mobilitou (EM) a nejvyšší molekulovou hmotností (MH) jsou v podstatě více hydrofobní než frakce B, která vykazovala střední hodnoty EM a MH. Nejnižší hydrofobicitu zaznamenali u frakcí C a D s nejvyšší EM a nejnižší MH. Tyto vlastnosti přisuzují tomu, že nejvíce hydrofilní aromatické frakce C a D se zdají být vázány k ostatním většinou alifatickým hydrofobním frakcím A a B prostřednictvím nekovalentní (možná vodíkové) vazby.

Trubetskoi a Trubetskaya [49] využívali znovu metodu RP – HPLC ke studiu hydrofobnosti půdních HK a jejich stabilních elektroforetických frakcí A, B, C + D předběžně připravených kombinací gelové permeační chromatografie na Sephadexu a polyakrylamidové gelové elektroforézy. V obou vzorcích HK různé geneze a frakce A o větší molekulové hmotnosti byly nejvíce hydrofobní. Frakce C+D nejmenší velikosti molekul byly nejvíce hydrofilní. Frakce B o střední molekulové velikosti vykazovala střední hodnoty. Použitím RP – HPLC

umožnilo poprvé detekci hydrofobní elektroforetické frakce A s největšími velikostmi molekul složených převážně z alifatických dlouhých řetězců uhlovodíků, bílkovin a fragmentů půdních HK.



Obr. 15 Separace molekul na povrch materiálu Sephadex [81]

Wang a spol. [82] využili metodu kapalinové chromatografie hydrofilních interakcí (*Hydrophilic interaction liquid chromatography* – HILIC) pro měření kompozice (složení) vzorků HL odebraných z řeky, přehrady a čističky odpadních vod na základě jejich fyzikálně – chemických vlastností. Měření poskytlo zajímavé výsledky jako např., že podíl karboxylových skupin HL pozemního původu je méně než poloviční, oproti HL obsažených v čističce odpadních vod. Vyšší obsah bazických sloučenin byl pozorován u HL z odpadních vod a přehrady, než v případě vzorku z řeky. U HL z řeky (Loire) byl nalezen větší podíl hydrofobních makromolekul, než u většiny vzorků a HL (z odpadní vody) obsahovaly méně iontových neutrálních sloučenin, než ve vodách z pozemního původu. Vzorek HK z řeky Suwannee byl prokázán jako nejvíce homogenní.

Vysoce rozlišovací ultrazvuková spektroskopie

Celá řada metod používající se, jak už k objasnění sekundární struktury, tak např. konformačního uspořádání HL, skýtá řadu omezení a překážek, jež stěžují charakterizaci těchto složitých systémů. Mnohdy se jedná o problémy spojené s limitem koncentrace roztoků HL, u chromatografických metod může nastat problém s mobilní fází, problémem může být i např. heterogenita HL. A právě z toho důvodu je při studiu HL často využívána metoda vysoce rozlišovací ultrazvukové spektroskopie (*High resolution ultrasonic spectroscopy* – HRUS), která tyto omezení nevykazuje. [83]

HRUS je poměrně nová technika pro materiálovou analýzu založená na měření parametrů ultrazvukové vlny šířící se přes vzorek. Což umožňuje přímé a nedestruktivní měření vnitřních vlastností materiálů, bez toho aby se tvořili deriváty či se změnil jejich stav. Velkou výhodou použití HRUS je, že analyzovaný vzorek může být vysoce zbarvený, nebo dokonce neprůhledný světlu.

Princip metody spočívá v tom, že po průchodu ultrazvukové vlny vzorkem se měří rychlost a útlum ultrazvukové vlny způsobený interakcí zvuku se složkami vzorku. Nejčastěji dochází k měření tlumení zvuku, jelikož zde není závislost na teplotě a jedná se o nejjednodušší způsob. Útlum a rychlost jsou citlivé na změny v intermolekulární interakci a molekulární organizaci. [84]

Kučerík a spol. [85] studovali termodynamickou stabilitu HK za pomoci HRUS při teplotním rozmezí 5 až 90 °C. Měření prokázalo několik přechodů, které lze vysvětlit tím, že dochází k oslabení sekundární struktury HK. Poté byly provedeny experimenty, kde byl vzorek HK modifikován přidavkem HCl, což vedlo k tomu, že zde se struktura HK mírně stabilizovala. Autoři práce se tedy domnívají, že huminové micely jako subagregáty, vytvářejí sestavy otevřených vrstev, jež jsou snadno přístupné pro interakci s cizí molekulou. *Klučáková a kol.* [86] měřili ultrazvukovou rychlost, útlum, a hustotu použitých huminových solů za účelem studia konformačních změn v roztocích HK (NaCl a NaOH) při různých hodnotách pH. Dle jejich výzkumu se částice ve zředěných a koncentrovaných roztocích solů HK organizují odlišným způsobem. Navíc experimenty potvrdily, že chemické složení HK, ale i prostředí silně ovlivňují to, jak se molekuly HK ve vodných roztocích organizují.

Dynamický rozptyl světla

Princip metody je podrobně uveden v kapitole 4. 5. 5.

Cílem práce *Esfahani a spol.* [87] bylo prozkoumat agregaci HK za podmínek nízké konduktivity, dále prováděly laboratorní studie simulace vzorků z prostředí přírodních vod, ale i skutečných vzorků odebraných z přírodních vod. Za pomoci metody dynamického rozptylu světla (*Dynamic light scattering – DLS*) získaly intenzitní a objemové distribuce velikosti částic. Agregáty následně rozdělili do tří skupin: 10 – 100 nm, 100 – 1000 nm a > 1 μm. Předpokládají, že jednotlivé biomakromolekuly a agregáty mezi 10 nm a 1 μm jsou prekurzory pro tvorbu velkých 5 μm částic. Supramikronové velikosti částic se tvořily, rozpadaly a znovu vytvořily v turbulentních/klidových cyklech v přítomnosti azidu sodného indukujícího reverzibilní samouspořádání. Analýza zeta potenciálu ukázala, že koloidní stabilita se zvyšuje s koncentrací. DLS studie reálných odebraných vzorků vod se shodovaly s těmi simulovanými laboratorními vzorky. Nicméně přístrojové vybavení DLS je schopno zaznamenat pouze velikosti částic v rozmezí 0,6 nm – 6 μm, takže nelze vyloučit přítomnost agregátů o velikosti nad 6 μm. *Klučáková a Kalina* [88] rozdělili HK do několika frakcí prostřednictvím jejich rozpuštění v pufrech s různými hodnotami pH. Získané huminové frakce charakterizovali s ohledem na jejich složení, strukturu, velikost částic a nábojů. Dle jejich očekávání, frakce získané postupným rozpouštěním byly různorodější než ty připravené postupnou extrakcí. Frakce získané při nižších hodnotách pH obsahovaly vyšší množství aromatických a karboxylových skupin, zatímco ty, které se extrahují při vyšších hodnotách pH byly bohaté na alifatické a/nebo peptidové skupin. Frakce extrahované v blízkosti neutrálního pH vykazovaly specifické vlastnosti. Dle autorů článku mohou slabší karboxylové skupiny v méně kyselých roztocích disociovat a tím se mohou rozpouštět další aromatické frakce. Konformační změny a proces deagregace se lišili od frakcionačního procesu a koncentrace zkoumaných vzorků. Pro některé méně koncentrované roztoky

humínových frakcí byly získány bimodální distribuce velikosti částic a vyšší hodnoty polydisperzity.

3.8.1 Ostatní metody a kombinace

Chernysheva a Badun [89] se snažili odhalit interferenci HL a globulárních proteinů (albumin, lysozym) a jejich rozdělení v systému voda/organická kapalina. Dále studovali adsorpci na rozhraní kapalina/kapalina jakožto modelu interakcí přírodní organické hmoty s proteiny v přírodě na hydrofilních/hydrofobních površích. Využívali metodu radioaktivní stopovací látky včetně aktivace tepelným tritiem a scintilační fáze metody, dále DLS a optickou mikroskopii. Výsledky naznačují, že v obou případech, HK a proteinu se jedná o záporně nabitě látky (HK – albumin směs), přičemž mechanismus interakce mezi nimi v objemu vody a na rozhraní kapalina/kapalina je řízen koncentrací HK. Při nízkých koncentracích HK, volný protein zabraňuje adsorpci na rozhraní kapalina/kapalina a jejímu přechodu do organické fáze a to díky coulombické repulzi. Při vysoké koncentraci HK, dochází k tvorbě hydrofilních komplexů díky elektrostatickému přitahování mezi kladně nabitý zbytek aminokyseliny a hydrofobní interakce. V případě směsi HK – lysozym, interakce mezi proteinem a HK je opatřena elektrostatickou přitažlivostí, což zajišťuje vyšší hydrofobicita směsi HK – lysozym ve srovnání se samostatnou HK. Zvýšení koncentrace HK má za následek částečné nabití konjugátu, které vede ke snížení množství lysozymu na rozhraní.

WU a spol. [90] ve své práci zkoumali za použití HPLC a RP – HPLC s online 3D excitačně emisní maticí k detekci fluorescence HL v závislosti na jejich velikosti a polaritě. Studovali FK, HK a přírodní organickou hmotu (NOM). V případě NOM byly zjištěny rozdíly v maximální fluorescenci tím, jak se NOM chromatograficky dělila na základě velikosti a polarity. Obecně docházelo k silným závislostem mezi velikostí, fluorescenčním obrazem a polaritou. HK, FK a frakce proteinového charakteru vykazovaly zřetelný hydrofilní/hydrofobní charakter. Výsledky taky naznačili, že HPSEC je lepší použít pro charakteristiku hlavně FK a menších frakcí HL, ale pro větší frakce a HK, jelikož se silně adsorbují na HPSEC kolonu díky jejich hydrofobním charakteru.

Gao a spol. [91] využívali metodu DLS a FT – IR spektroskopii, aby prozkoumali ion adsorpční chování na montmorillonitu a jeho směsi s HK, za účelem rozložení kompozitní struktury a tvorby mechanismu. Zjistili nízkou afinitu HK k iontu a vysvětlují to tím, že kinetika agregace montmorillonitu je významně inhibována tvorbou sloučeniny s HK. Ca^{2+} ionty adsorbují na směs HK a montmorillonitu, dochází k tvorbě sendvičovitých struktur, kde Ca^{2+} ionty se nacházejí uprostřed struktury a plní stabilizační funkci. Navíc v průběhu tvorby sloučeniny dochází ke konformačním přechodům u karboxylových skupin HK.

Ikeya a spol. [92] studovali složení HK s různou mírou humifikace, jenž byly izolované z deseti běžných půd Japonska za pomoci ion cyklon rezonanční hmotnostní spektrometrie (za použití ionizace elektrosprejem a Fourierovy transformace). Zvláštní pozornost věnovali polyjaderným aromatickým uhlovodíkům, které jsou spojené s odolností HL proti biodegradaci v půdě. Analýza FTIR CR – MS ukázala, že HK z různých půd obsahovaly čteně molekulární vzorce obsahující dusíkaté sloučeniny v oblasti molekuly, která

zahrnuje alifatické struktury a struktury podobné proteinům. Ve velké míře byly zastoupeny i sacharidy. Dále bylo zjištěno, že počet a suma píků patřících sloučeninám podobným ligninu klesá se zvyšující se mírou humifikace, která nastane dříve pro větší sloučeniny. Naopak počet a suma píků patřící kondenzovaným aromatickým sloučeninám se zvyšuje se zvyšujícím se stupni humifikace. HK z Andosolové půdy jsou bohaté na kondenzované aromatické sloučeniny, ale chudé na ty, které souvisejí s biomolekulami. K tomu dochází pravděpodobně proto, že HK mají vekou příležitost k strukturálním změnám v rámci stabilní akumulace díky silné interakce na amorfní hlininito – křemičité minerály apod.

Arenella a spol.(2014) [93] vyhodnocovali účinek HL na identifikaci modelu proteinů s různými vlastnostmi, jako např. myoglobinu, glukosidázy a β – glukosidázy za pomoci elektroforézy, ESI a MALDI hmotnostní spektroskopie (MS). Prokázali, že kontakt mezi proetiny a HL nezmění elektroforetickou pohyblivost, ale způsobí modifikaci proteinu, což ovlivnilo charakterizaci proteinu u MS. Pokles parametrů při identifikaci proteinu byl zřejmější pro myoglobin než v případě glukosidázy a β – glukosidázy, pravděpodobně v důsledku jeho nižší molekulové hmotnosti a méně složité molekulární struktury. Analýza dat z MS ukázala, že za pozorované odlišnosti po kontaktu HL s proteiny mohou být zodpovědné hydrofobní interakce.

Vaz Jr. a spol. [94] se snažili zmapovat dopad antibiotik tetracyklinů, jež se používají v průmyslu skotu pro léčbu onemocnění a pro podporu růstu zvířat na životní prostředí, především na tropickou půdu v Brazílii. Využili sorpci a interakci na molekulární úrovni oxytetracyklinu s HK extrahovanou z půdy. Při studiu používali techniky jako jsou ^{13}C NMR, elementární analýzu, elektronovou paramagnetickou rezonanci pro charakterizaci HK a Infračervenou spektroskopii s Fourierovou transformací, UV – VIS spektroskopii pro studium molekulární interakce a jejich mechanismů. Interakce probíhaly v kyselém i alkalickém prostředí, rozmezí hodnot pH bylo od 3,01 do 8,3. Interakční mechanismy byly závislé na PH a vykazovaly hydrofobní interakce (vodíkové vazby) a slabé interakce přenosu protonů. Popsané chování se odlišovalo od chování HK mírného pásma a autoři naznačují, že zbytky antibiotik by mohly dosáhnout podzemních vod.

3.9 Frakcionace HK

Pro charakterizaci makromolekul a částic existuje celá řada metod založená na různých principech, které zpravidla poskytují spolehlivé výsledky v případě jednoduchých vzorků s úzkou distribucí vlastností, zatímco v případě složitých směsí se účinnost těchto metod snižuje. Studium polydisperzních směsí makromolekul a částic vyžaduje zpravidla jako klíčový krok separaci, která tyto vzorky zjednoduší rozdělením vhodné pro další analýzu a měření.

HK jsou heterogenní systémy, jež se po frakcionaci na celky s podobnými vlastnostmi, stanou méně složitými pro následnou charakterizaci za pomoci příslušných analytických metod. [95, 96]

Obecně frakcionovat HK, ale není úplně jednoduché. Neméně náročné je též získat informace o tom, jak a čím takovou frakcionaci provést nejlépe.

Ve skutečnosti dle *Stenson* [96] frakcionace HL na jednotlivé molekuly může obecně snižovat konečný cíl poskytovat reprodukovatelné výsledky, které umožní srovnání mezi vzorky HL, jež mohou poskytnout vodítka k celkovému strukturálnímu a funkčnímu složení každého vzorku. Samozřejmě největším kamenem úrazu frakcionace je ohromná složitost HL.

Například výsledky separace za pomoci RP – HPLC většinou poskytnou kontinuální spíše nevýrazné píky. Totéž platí pro gelovou permeační chromatografii, vylučovací chromatografii i v případě chromatografie s imobilizovaným kovem. *Whelan a spol.* [97] se podařilo získat alespoň uspokojivé výsledky dosažené RP – HPLC s lineárními gradienty (získané přes iontové párování).

Další překážkou jsou detektory, které neposkytují zrovna univerzální a uspokojivé informace. Často se stává, že odlišné detektory ukazují zcela odlišné chromatogramy pro stejný huminový materiál, což je jev, který se může někdy s výhodou použít. [98, 99] Dokonce relativně citlivé detektory jako 3D excitačně – emisní matricový fluorescenční obvykle odhalí pouze jemné rozdíly. [90] Nemožnost použití většiny detektorů, jenž mají poskytnout konkrétní informace o molekulárních rozdílech mezi jednotlivými huminovými frakcemi, je nevýhoda, která se překonalavyužitím metody HRUS či FTI – CR MS. FTI – CR MS řeší otázku jednotlivých iontů a poskytuje informace o molekulární úrovni. I když pro FTI – CR MS nepředstavuje komplexita sama o sobě problém, překrývání izomerů, nebo složitost uvnitř nějaké dané hmotnosti, už problém představují. Tento jev brání získání tandemových hmotnostních spektrálních dat, jež by daly informace o struktuře. Hmotnostní spektrometrie vyžaduje individuální ionty (a následně jejich fragmenty), které mají být izolovány v hmotnostním spektrometru. Huminové ionty jsou příliš těsně u sebe, aby mohla být provedena tato izolace. [96]

Přesto všechno nejčastější metodou pro frakcionaci HL zůstává velikostně vylučovací chromatografie. Použitím HPSEC byly překonány problémy způsobené sekundární interakcí HL s materiálem kolony, nicméně pořád zde vyvstávají problémy se zařízením používající se na detekci (UV – absorpce, fluorescence, ICP – MS), které mají různé nedostatky jako např. detekční limity, šum signálu apod. [74] Proto *Franke a spol.* [100] se snažili prozkoumat možnost použití radioaktivního značení v HPSEC. Kromě značení hlavního uhlíkového řetězce HL, sledovali interakci HL s hliníkem. Vzhledem k absenci vhodného hliníkového izotopu použili ¹¹¹In jako náhradu. Výsledky ukázaly, že radioaktivní dvojité značení může být v HPSEC užitečným nástrojem.

Kapilární elektroforéza (CE) je metoda, která umožňuje elektroforetickou separaci malých molekul, polymerů, makromolekul, koloidů až k nanočásticím, bakteriím, virům v různých módech separace za použití nevodných a vodných tlumivých roztoků v různých kapilárních kolonách. Kombinace CE a hmotnostní spektroskopie poskytuje velmi univerzální analytický systém. Kromě toho, použití ionizace pomocí elektrospreje (ESI – MS) umožnilo detekční limity až k pikomolů pro jednotlivé komponenty, což využil ve své studii přírodní organické hmoty (HL) i *Schmitt-Kopplin* [101], který tvrdí, že kombinace kapilární elektroforézy a preparativní volné elektroforézy ještě v kombinaci s online a offline MS otevírá nové možnosti v chápání chemické struktury a chování v roztoku přírodní organické hmoty.

Frakcionace molekulových hmotností Suwannee river FK (SRFA) a přečištěných HK Aldrich (PAHA) provedli autoři za pomoci adsorpce na kaolinit a hematit. Při studiu využili také metodu SEC s UV detekcí. Zjistili, že vyšší frakce FK a vodní HL byly přednostně absorbovány jak na kaolinit, tak na hematit, zatímco přečištěné HK a pozemní HL se lišily pro oba minerály. Autoři studie to vysvětlují tím, že jedna z možností, proč dochází k těmto rozdílům je, že u sorpcí na kaolinit se očekává vyšší podíl hydrofobních interakcí než u hematitu.

3.10 Aplikační možnosti HK

HK mají nedefinované chemické složení (strukturu), které se liší v závislosti na původu, procesu získání a funkčních skupinách přítomných v jejich strukturách jako jsou chinony, fenoly a karboxylové kyseliny. Chinony jsou zodpovědné za tvorbu reaktivních forem kyslíku v HK, čímž jsou užitečné pro hojení ran a mají fungicidní/baktericidní účinky. Fenoly a karboxylové kyseliny způsobují deprotonaci v neutrálních a zásaditých médiích, ovšem mají i další užitečné vlastnosti jako např. antioxidační a protizánětlivé vlastnosti. Zejména přítomnost fenolických skupin v HK způsobují antioxidační vlastnosti tím, že dokáží zachycovat volné radikály. Vzhledem k jejich amfifilní povaze HK tvoří struktury podobné micelám v neutrálním a kyselém prostředí, jež jsou užitečné v zemědělství, nápravě znečištění životního prostředí, medicíně a vývoje léků. [24]

Medicína

Huminové kyseliny disponují s překvapivě širokou škálou prospěšných biologických účinků, které našly široké uplatnění např. v lázeňství. [102] U mnoha HK byla pozorována antivirová aktivita proti mnoha virům jako je například cytomegalovirus (CMV), virům vakcín, lidským imunodeficientním virům typu 1 (HIV-1) a typu 2 (HIV-2). [103, 104, 105] Molekuly HK mající záporný náboj v neutrálních a bazických médiích, mohou tedy inhibovat replikaci viru vazbou kationtových dómen virů, což je nezbytnost pro upevnění viru na povrch buněk. [104]

Anti – HIV aktivita těchto látek byla prokázána potvrzením inhibice infekčnosti lidských lymfocytů in vitro, kromě toho bylo prokázáno blokování tvorby syncytia (soubuní) mezi infikovanými a neinfikovanými lymfocyty. [106]

van Rensburg a Naude [107] prokázali, že humát draselný potlačuje tvorbu zánětlivých cytokinů (TNF- α , IL-1 β , IL-6) díky jeho vazebným vlastnostem.

Bylo pozorováno, že HK jsou inhibitory mutagenese, čili vykazují antimutagenní aktivitu, která blokuje proces mutagenese uvnitř buněk a mutagenní aktivitu, která inhibuje mutagenesi mimo buněk. [46]

Schopnost HK vázat kovy byla zkoumána v medicínské studii *Litvin a Minaev* [108]. Zkoušeli syntetizovat nanočástice stříbra potažené syntetickou HK pomocí elektrostatických interakcí k tomu, aby byla získána biologicky aktivní látka pro lékařské aplikace. Bylo prokázáno, že HK mají schopnost stabilizovat stříbrné nanočástice přes odpudivé síly po dobu jednoho roku. Kromě toho vykazují schopnosti zvýšit antibakteriální vlastnosti stříbrných nanočástic, což značí, že mají velký potenciál pro přípravu léčiv.

Dle *Jurscik* [109] HK mohou mít pozitivní vliv na hojení ran a léčbu rakoviny. Proces hojení vyžaduje zvláštní přídavek kyslíku. Lidské tělo má tento požadavek ihned v první minutě po zranění v důsledku fagocytózy, hlavní události při procesu hojení ran, což spotřebuje množství kyslíku. Semichinony jsou schopny produkovat látky poskytující kyslík prostřednictvím různých mechanismů. V přítomnosti molekulárního kyslíku vyrábějí semichinony superoxidové ionty, které jsou převedeny na peroxid vodíku v přítomnosti superoxidodismutázy. Hyperoxidové ionty produkují hydroxylové radikály pomocí reakce s přechodovými kovy nebo peroxidem vodíku. Chinony jsou široce studovány v léčbě rakoviny, protože látky obsahující kyslík jsou příčinou oxidačního stresu a indukují apoptózu v rakovinných buňkách pomocí DNA fragmentace a můžou se chovat jako intracelulární signály apoptózové kaskády. Kromě toho chinony zasahují i přímo do apoptózy normálních a nádorových buněk v závislosti na koncentraci. [110, 111, 112, 113, 114]

Studie zahrnující kosmetické a farmaceutické aplikace existují zatím v malém množství. Ovšem HK vykazují vlastnosti, které jsou zajímavé pro mnoho aplikací v prevenci nebo léčbě různých nemocí. HK v přirozené podobě mohou být použity v produktech na ochranu před slunečním zářením, proti stárnutí a v péči o pleť obecně vzhledem k jejich schopnosti absorbovat záření v UV oblasti. [24]

Klöcking a spol. [115] studovali potenciál HK aplikovaných do rtěnek, kde by zabraňovaly reaktivaci viru herpes simplex UV světlem. Dále byla zkoumána antivirová aktivita HK v kosmetice, kde byly součástí pleťové masky používající se pro prevenci virové reaktivaci po chemickém ošetření obličeje.

Martini a spol. [116] syntetizovali komplexy β -karotenu a HK, aby zvýšili rozpustnost β -karotenu ve vodě. Tyto karotenoidy vykazují významnou biologickou aktivitu, včetně antioxidačních vlastností, jakožto prekurzory vitamínu A. Bohužel jsou hydrofobní, což omezuje jejich použití v farmaceutickém, kosmetickém a potravinářském oboru. Autoři dokázali, že rozpustnost ve vodě β -karotenu byla výrazně zvýšena komplexací s HK a jeho stabilita vůči světelným zářením se zlepšila o přibližně 60 %.

Ghosal a Khanna a spol. [117, 118] vyvinuli dopravní systémy HK pro účinné látky (farmaceutické, nutriční a kosmetické) s nízkou rozpustností. Tyto systémy tvoří komplexy mezi HK a léky tvořící hydrofobní vazby, kovalentní vazby nebo chelatace. Jsou schopny zvyšovat rozpustnost léčiva, propustnost a biologickou dostupnost. Proto jsou HK slibné matice pro zabudování bioaktivních složek v nano- a mikrostrukturách.

Surfaktanty

Díky schopnosti HL tvořit micelární útvary ve vodném prostředí, se HL jeví jako potenciální přírodní surfaktanty, čili látky měnící povrchové napětí, vlastnosti jež se hojně využívá např. u detergentů.

Conte a spol. [64] studovali HL jako případné náhrady syntetických surfaktantů. Syntetické povrchově aktivní látky jako je například dodecylsírán sodný (SDS) a Triton X-100 (TX100) jsou účinné látky používající se na čištění půd, nicméně problém je, že vykazují biologickou

toxicitu. Autoři studie dokázali, že roztok HK může být použit na promývání kontaminované zeminy se stejnou účinností jako u syntetických povrchově aktivních látek.

HK se používají jako povrchově aktivní látky i v textilním průmyslu konkrétně např. v barvení, kde se snaží zvýšit rozpustnost barvy, nebo jako stabilizátory dispergovaného stavu či zajištění rovnoměrného rozložení barviva v textiliích. Hlavním problémem v oblasti barvení textilií je velké množství odpadních vod z průmyslu, které obsahují vysokou koncentraci barviva, ale také povrchově aktivních látek, což může být nebezpečné z hlediska toxicity. Právě z tohoto důvodu se zavádí vývoj nových materiálů tzv. biosurfaktantů s nízkým dopadem na životní prostředí. [66] Nedávné studie (*Montoneri a spol.* [119], *Savarino a spol.* [120]) testování schopnosti HK, extrahovaných z biomasy, nahrazovat povrchově aktivní látky se zdají být příznivé. Dále bylo zjištěno, že HK mohou být použity jako náhrady syntetických PAL u detergentů tkanin. Detergentní vlastnosti extraktů HK byly porovnávány se syntetickými např. (SDS). Bavlněné vzorky byly máčeny v roztoku oleje (hexadekan) s barvicím prostředkem nebo standardní textilie znečištěné sazemi minerálními oleji. Vyhodnocovali procento odstraněného oleje a zrcadlovou reflektanci znečištěných a promývaných vzorků. Stejně jako syntetické SDS, nevykazovaly vzorky žádné rozdíly pokud se jedná o intenzitu nebo jednotnost barvy. Nicméně někteří autoři (*García Becerra a spol.* [121]) poukazují na potenciální žloutnutí substrátu po jeho kontaktu s HK. Ovšem *Savarino a kol.* [122] podotýkají, že se žloutnutí neprokázalo být tak značné.

Odstraňování znečištění životního prostředí

Polycyklické aromatické uhlovodíky (PAU) jsou znečišťujícími látkami mnoha přírodních prostředí včetně prostředí moří. V důsledku jejich toxických vlastností vzbuzují obavy ohledně zdraví lidí a ekosystémů. Ačkoliv podléhají mnoha procesům, kterými je lze odstranit jako např. foto-oxidace, biodegradace zde hraje dominantní roli. Nicméně, bez ohledu na to, že existují bakterie s vlastní metabolickou drahou, jež dokážou PAU přirozeně degradovat, je pořád výskyt těchto polutantů hojný. Z části je to díky jejich nízké biologické dostupnosti, což znamená, že se vyskytují ve formě, ke které nejsou schopny bakterie získat přístup.

Smith a spol. [123] zkoumali HK jakožto potenciální nosiče PAU sloučenin, které by zvýšily biologickou dostupnost těchto látek bakteriím pro případnou degradaci. Prováděli řízené degradační experimenty využívající mikrokrystalický fenanthren, bakterie rodu *Sphingomonas sp. LH162*. Byly provedeny, jak experimenty s HK, tak bez nich, aby mohlo být provedeno porovnání. Při absenci HK, byl fenanthren přítomen pořád v maximální koncentraci a nedocházelo ke zvětšení dostupnosti pro degradační bakterie, avšak v přítomnosti HK docházelo ke zvětšení degradace tohoto potenciálního polutantu.

Mezi další polutanty, jež znečišťují životní prostředí, patří toxické těžké kovy. Jelikož jsou HK všudypřítomné v půdě, sedimentech a vodních prostředích, přicházejí do styku právě s těmito polutanty a mohou ovlivňovat přeměny, přenos a osud těžkých kovů v životním prostředí. Znalost mechanismů sorpcí iontů těžkých kovů na HK je nezbytná pro posouzení jejich vlivu na životní prostředí a zdravotních rizik. Jenomže díky nejasné struktuře, rozdílným vlastnostem HK a pestrosti podmínek životního prostředí (teplota, pH,

iontové síle apod.) jsou způsoby chování HK v přítomnosti těžkých kovů nadále ne úplně popsáné.

Burlakovs a kol. [124] studovali možnosti využití HK jako činidla pro sanaci životního prostředí kontaminovaného těžkými kovy. Nejvíce se HK, jakožto sanační činidla, osvědčily u biologicky dostupné mědi a olova. Kontaminované hlinitopísčité a písčité půdy vystavené působení HL přeměnily kovy na biologicky nedostupné stabilní formy a snížily množství volně přenášených iontů.

3.11 Úloha HL v přírodě

Jakožto chemické sloučeniny, mohou mít HL, ať už pozitivní, tak negativní, dopad na organismy, které s nimi přijdou do styku. Znalosti ohledně toho, jaký je vliv HL na organismy jsou pořád neúplné. V mnoha případech HL pouze modulují biologickou dostupnost živin, nebo potlačují patogeny. Z toho vyplývá, že účinky HL na organismy jsou prozatím považovány více či méně za nepřímé. Jedním z důvodů, proč jsou nepřímé je, že HL jsou prozatím považovány za příliš velké molekuly, aby mohly proniknout biomembránami. [74]

Pflugmacher a spol. [125] silné účinky přírodních a syntetických HL na enzymový systém, což vyvolává potlačení fotosyntetické aktivity dvou běžných vodních rostlin *Ceratophyllum demersum* and *Vesicularia dubyana*. Efekt je podobné povahy a je stejně tak závažný jako u antrachinonu, známého inhibitoru rostlinné fotosyntézy. Rostlina buď syntetizuje HL během svého vlastního života, nebo se k rostlině dostanou z jiného organismu.



Obř. 16 *Ceratophyllum demersum* (vlevo), *Vesicularia dubyana* (vpravo) [126, 127]

Půdní HL jsou známy pro několik svých ekologických funkcí, v přirozeném a antropogenním ekosystému. Zodpovídají za úrodnost půdy tím, že ovlivňují strukturu a pórovitost svým účinkem na agregaci částic. Kromě toho dodávají rostlinám živiny, přes mechanismy spojené s chelatací minerálních látek, ale také vlastním degradačním procesem a zároveň poskytují hlavní zdroj organického uhlíku. [128]

Fedotov a Shoba [129] tvrdí, že odklon od makromolekulárního (polymerního) konceptu k supramolekulární povaze HL vytváří změněný pohled na úlohu HL při vytváření homeostázy půdy. Pokud HL existují ve formě supramolekul, mohou teoreticky vystupovat jako zásobárna organických látek s nízkými molekulovými hmotnosti sloužící jako výživa mikroorganismů při deficitu opadu. Tvorba HL je spontánní proces, který se provádí bez potřeby energie, jelikož není potřeba žádných mikrobiálních enzymů. Výroba

nízkomolekulárních organických látek ze supramolekul HL působením mikroorganismů lze taky provést bez spotřeby energie, pokud jsou nahrazeny molekulami metabolitu uvolněných z mikroorganismů. V tomto případě mikroorganismy vyřeší dva problémy: získají výživu a využijí odpad.

3.11.1 Zajímavosti

Smaier a White [130] studovali kalcitové speleotémy vyskytující se v jeskynních díky prosakování vod z nadzemních částí půd. Speleotémy jsou hrubě krystalické, mají různé odstíny barev hnědé až oranžové a bílé. Co je zajímavé, vykazují silně luminiscenci. U většiny speleothémů za luminiscenci a barvu zodpovídají huminové látky, které jsou začleněné do krystalů kalcitu. Pro kvantitativní hodnocení vlastností těchto luminiscenčních jevů, obsah organických látek speleotémů se oddělil za pomoci gelové chromatografie. Spektra byla měřena jako funkce molekulové hmotnosti. Nejintenzivnější luminiscence byla získána z frakce molekulové hmotnosti v rozmezí 4000 – 6000 daltonů (rozsah odpovídající FK).



Obr. 17 *Speleotém* [131]

„Huminové umění“

Philippe Schmitt-Kopplin ve svém článku [101] podotýká, že je stále před námi dlouhá cesta k úplnému pochopení HL. Během té cesty budeme jistě objevovat mnoho nových zemí, stačí si jen představit, že šplháme a pojmenováváme každý vrchol pahorků zobrazených na **Obr. 18** níže.



Obr. 18 *HumArt Terragen V0.8.11 krajina generovaná na základě dat CE-ESI/MS, přírodní organická hmota- Suwannee řeka [101]*

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Použité chemikálie

Kyselina fosforečná 85%

Kyselina octová 99,8 %

Kyselina boritá

Hydrát octanu vápenatého

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

Hydroxid sodný (Normex), Carlo Erba Reagents Group

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

IHSS Leonardite

4.2 Použité přístroje

pH metr (Mettler Toledo)

konduktometr (Mettler Toledo)

UV – VIS spektrometr (Hitachi U-3900H)

koloidní analyzátor Zetasizer Nano Series (Malvern)

termogravimetrický analyzátor TGA Q5000 (TA instruments)

GPC chromatograf s UV – VIS (Agilent Technologies) + další detektory (Wyatt): Optilab T-rEX + DAWN HELIOS5-II

4.3 Příprava studovaných materiálů

4.3.1 Izolace HK z lignitu:

Huminové kyseliny použité v této práci byly získány metodou alkalické extrakce z jihomoravského lignitu. 30 g namletého lignitu bylo smícháno s 1 dm³ 0,1 M roztoku HCl, tato suspenze byla ponechána 1 hodinu na třepačce (dekalcinace). Poté byl lignit promyt dostatečným množstvím destilované vody do odstranění Cl⁻ iontů. Přítomnost chloridových iontů byla zjištěna pomocí AgNO₃. Takto předupravený lignit byl převeden do plastové nádoby s extrakčním činidlem tj. 2 dm³ 0,5 M NaOH a 0,1 M Na₄P₂O₇·10 H₂O, láhev byla ponechána na třepačce přes noc. Získaná suspenze byla odstředěna po dobu 20 min, 4000 RPM při 15 °C. Kapalný podíl tj. roztok huminových a fulvinových kyselin byl přefiltrován přes filtr (žlutý pruh) a okyselen koncentrovaným roztokem HCl na hodnotu pH menší než 2. Po dvou hodinách došlo k vysrážení HK, které byly odděleny od roztoku FK odstředěním při stejných parametrech centrifugy. Pevný podíl získaný po odstředění byl znovu podroben extrakci. Získané HK (po první a druhé extrakci) byly převedeny do plastové nádoby s 1 dm³ 0,5 % obj. roztoku směsi HCl a HF, nádoba umístěna na třepačku po dobu 1 – 2 dní. Suspenze byla odstředěna při 4000 RPM a 15 °C po dobu 20 min a pevný podíl HK byl převeden do dialyzačních membrán (3500 Da) a dialyzován proti destilované vodě do

vymytí Cl^- iontů (zkouška pomocí AgNO_3). Dialýza byla provedena, aby bylo dosaženo, co největší čistoty HK. Po dialýze byl vzorek lignitických HK lyofilizován.

Proces lyofilizace

Lyofilizace je nejdokonalejší současnou sušicí metodou, jedná se o sublimační sušení při nízkém tlaku. Dochází k odstranění vody sublimací, tj. přechodem z pevného skupenství přímo do plynného. K tomuto přechodu je nutné připravit vhodné podmínky. V látce obsažená vlhkost se převede zmrazením do tuhé fáze. Následující sublimací a desorpcí ve vakuu se odstraní pokud možno všechna voda. Odstraněním této vody se transport molekul v látce téměř znemožňuje a uchováním ve vakuu se úplně zastavuje vnější látková výměna. Hlavní část procesu lyofilizace probíhá při teplotách pod $0\text{ }^\circ\text{C}$, ve většině případů v oblasti $-40\text{ }^\circ\text{C}$ až $-20\text{ }^\circ\text{C}$ [132]. Existují tři typy fází u lyofilizace a to, vlastní proces lyofilizace, primární sušení, sekundární sušení. [133]

Příprava HK solí

Pro samotné měření byly používány IHSS HK standardy ve formě čtyř různých vodných roztoků a koncentrací v rozmezí $5 - 0,01\text{ g/dm}^3$. První koncentrační řada byla připravena rozpuštěním HK v NaOH. Navážka byla zvolena tak, aby nejkonzentrovanejší roztok měl koncentraci 5 g/dm^3 . Ředěním byla připravena koncentrační řada HK v NaOH o koncentracích $5 - 0,01\text{ g/dm}^3$. Druhá koncentrační řada byla připravena neutralizací připravených roztoků HK v NaOH z první řady pomocí $0,1\text{ M HCl}$ (1:1). Třetí koncentrační řada byla připravena postupným ředěním roztoku HK v NaOH neutralizovaného HCl s nejvyšší koncentrací (5 g/dm^3) pomocí $0,1\text{ M}$ roztoku NaCl. Poslední koncentrační řada byla připravena rozpuštěním HK v milli-Q vodě a následně proběhla úprava pH na hodnotu 12. Vzorky tedy byly namíchány tak, aby byly získány pro všechny čtyři způsoby přípravy stejné koncentrační řady.

Příprava vodných roztoků

Vodné roztoky $0,1\text{ M NaOH}$ a $0,1\text{ M HCl}$ byly připraveny z odměrných roztoků (Normanal®), Lach – Ner, s. r. o. a (Normex), Carlo Erba Reagents Group. Příslušné koncentráty byly kvantitativně převedeny do odměrných baněk o objemech 1 dm^3 a následně doplněny milli-Q vodou až po rysku. Vodný roztok $0,1\text{ M NaCl}$ byl připraven přesným navážením odpovídajícího množství NaCl, který byl kvantitativně převeden do odměrné baňky o objemu 1 dm^3 a doplněn milli-Q vodou po rysku.

4.3.2 Frakcionace huminových kyselin

Frakcionace HK byla provedena metodou postupné frakcionace podle pH. Princip této metody spočívá v tom, že se HK rozpustí v pufru o daném pH (v určitém poměru). Nerozpuštěná frakce HK je použita v dalším kroku pro rozpouštění v pufru o vyšším pH. Následně je pak v každém dalším roztoku rozpouštěno menší množství HK než v roztoku předcházejícím. K frakcionaci byl použit univerzální pufr složený z kyseliny fosforečné, octové, borité a hydroxidu sodného. Do 2 dm^3 roztoku o pH 2 bylo přidáno 40 g huminové kyseliny. Vytvořený roztok o koncentraci 20 g/dm^3 byl po dobu 48 hodin

protřepáván v uzavřené nádobě. Po usazení části, která se nerozpustila byl roztok nad ní opatrně slit. Roztok obsahující rozpuštěnou část HK byl analyzován UV – VIS spektroskopií a následně z něj byly okyselením pomocí 35 % HCl vysráženy HK. Vysrážené HK byly zfiltrvány, promyty, vysušeny při 50°C, zváženy a použity pro další měření. Nerozpuštěný podíl byl vysušen při 50 °C, zvážen a použit jako výchozí množství pro další měření. Nerozpuštěný podíl by vysušen při 50 °C, zvážen a použit jako výchozí materiál pro rozpouštění roztoku o nejbližším vyšším pH. Tímto způsobem byla postupně vytvořena řada roztoků o pH 2, 4, 6, 8, 10 a 12.

4.4 Charakterizace huminových kyselin

K úplně základní charakterizaci HK patří bezesporu znalost jejich elementárního složení. Elementární analýza umožňuje zhodnotit celkový obsah uhlíku, vodíku, dusíku, kyslíku v molekule HK, jakožto základních stavebních kamenů HK. [29] V rámci této diplomové práce byly použité HK podrobeny charakterizaci za pomoci elementární analýzy na CHNSO Mikroanalyzátoru Carlo Erba na ÚSMH AVČR v Praze (výsledky viz **Tab. 2**). Rovněž byl stanoven obsah popele pomocí termogravimetrie (výsledek uveden v kapitole 5).

4.5 Použitá instrumentální metodika

Potenciometrické stanovení pH

Přímá konduktometrie

Ultrafialová a viditelná spektrometrie (UV – VIS spektrometrie)

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

Elektroforetický rozptyl světla (*Electrophoretic light scattering – ELS*)

Gelová permeační chromatografie (*Gel Permeation Chromatography – GPC*)

Mikroreologie

4.5.1 Potenciometrické stanovení pH

Příprava vzorku pro měření pH a měrné vodivosti:

Pro zajištění přesnosti měření na pH metru, byla v první řadě provedena kalibrace pomocí kalibračních roztoků o přesném pH. Poté bylo do kádinky o objemu 25 cm³ odpipetováno 10 cm³ roztoku HK, do něj byla ponořena elektroda a po ustálení byla zaznamenána hodnota dané veličiny (pH, vodivost). Měření se opakovalo třikrát pro každý roztok HK.

Princip měření:

Potenciometrie je metoda využívající se pro stanovení aktivity (koncentrace) sledované látky měřením elektromotorického napětí elektrochemických článků, které nejsou proudově zatíženy (článkem neprochází prakticky žádný proud). Je-li aktivita stanovované složky určována přímo z hodnoty elektromotorického napětí článku, jedná se o přímou potenciometrii (např. měření pH). Elektrochemické články používané při potenciometrických metodách se skládají ze dvou elektrod: elektrody měrné (indikační), jejíž potenciál je závislý

na koncentraci stanovované látky a elektrody referentní, jejíž potenciál je za daných podmínek konstantní. Jako referentní elektrody se používají např. elektrody chloridostříbrné, chloridortuťnaté (kalomelové) a merkurosulfátové; jako měrné pak většinou elektrody z kovu jehož ionty jsou obsaženy v měřeném roztoku, nebo iontově selektivní elektrody membránové, z nichž nejznámější je elektroda skleněná [134].

4.5.2 Přímá konduktometrie

Princip měření:

Stanovit koncentraci elektrolytu na základě přímého měření roztoku je možné jen tehdy, jestliže je složení elektrolytu známé a konstantní. V roztocích obsahujících jen jednu látku je možno stanovit její koncentraci v širokém koncentračním rozmezí, kdy platí lineární závislost měrné vodivosti na koncentraci [135]. V konduktometrii měříme vodivost roztoků elektrolytů. V přímé konduktometrii ze změřené vodivosti usuzujeme na obsah rozpuštěných elektrolytů nebo zjišťujeme jiné veličiny, např. stupeň disociace a disociační konstanty slabých elektrolytů, součin rozpustnosti silných elektrolytů apod. Měrná vodivost roste s obsahem iontů. Pro zředěné roztoky platí přímá úměra mezi měrnou vodivostí a koncentrací iontů, neboť lze zanedbat jejich interakce. [69]

4.5.3 UV – VIS spektrometrie

Příprava vzorku pro měření:

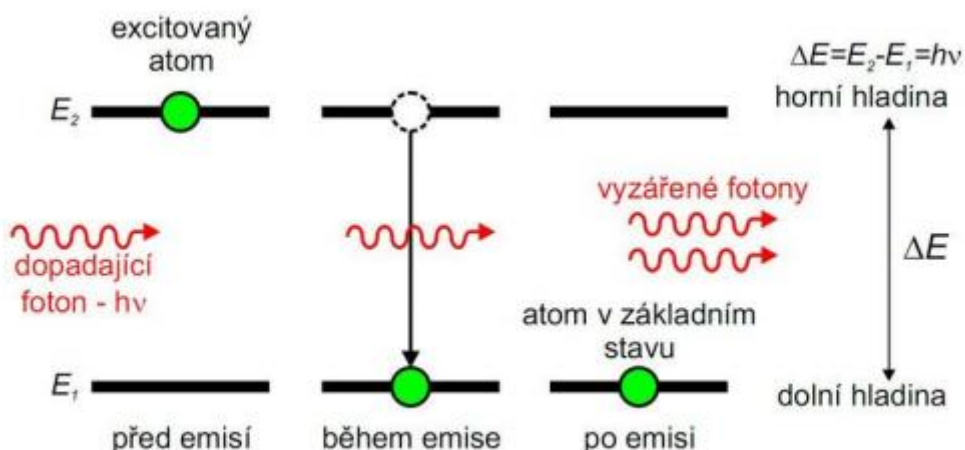
Prvním krokem u měření na UV – VIS spektrofotometru je vždy korekce na baselinu pomocí prostředí, ve kterém byly HK rozptýleny. Do křemenné kyvety bylo poté nalito 3 cm³ vzorku a naměřeno příslušné absorpční spektrum.

Princip měření:

UV-VIS spektroskopie je analytickou metodou, kterou řadíme mezi elektromagnetické spektroskopické metody. Podstatou je absorpce elektromagnetického záření v intervalu 200 – 800 nm molekulami vzorku. Při absorpci dochází k excitaci valenčních elektronů, které jsou součástí molekulových orbitalů. Proto molekulová absorpční spektra v UV – VIS oblasti jsou svou podstatou elektronová spektra. Tato metoda vyniká přesností, rychlostí, citlivostí a experimentální nenáročností. Díky těmto vlastnostem našla široké uplatnění. Měření je prováděno buď při vhodné vlnové délce, nebo jsou snímána celá spektra v krátkých časových intervalech. [136]

Interakce látky s elektromagnetickým zářením

Látky mohou elektromagnetické záření pohltit nebo vyzařit. Mluvíme-li o pohlcení nebo-li absorpci, tak molekuly přijímají energii. Naopak pokud molekuly vyzařují energii, mluvíme o emisi. Spektrum obsahující vlnové délky v určitém rozsahu se označuje jako spojité spektrum. Příklad spojitého spektra lze získat rozkladem bílého světla. Rozkladem spojitého spektra získáme souvislý pás spektrálních barev. [136]



Obr. 19 Interakce elektromagnetického záření s látkou [136]

Aby došlo k absorpci, musí být v látce minimálně dvě hladiny, a to základní energetická hladina a hladina příslušející excitovanému stavu viz obr. Pravděpodobnosti přechodů mezi jednotlivými hladinami jsou úměrné počtu molekul v příslušných stavech. [136]

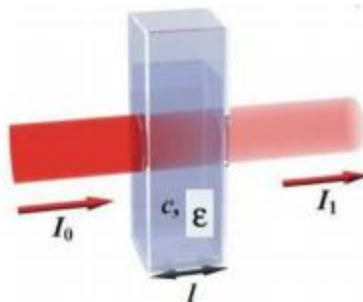
Vztah mezi množstvím absorbovaného záření- absorpencí, a koncentrací je dán, jako ve všech absorpčních metodách, Lambertovým – Beerovým zákonem. Jehož platnost je omezena pouze na zředěné čiré roztoky absorbujících látek o koncentracích zpravidla menších než 0,01 mol/l.

K nalezení vztahu $A = f(c)$ se využívá standardních kalibračních metod, měření se provádí při konstantní vlnové délce, zpravidla při vlnové délce, λ (max), při níž látka absorbuje nejvíce (maximum na absorpčním pásu) [137]

Lambert – Beerův zákon zní: Absorbance je přímo úměrná koncentraci absorbující látky a tloušťce absorbující vrstvy. Matematické vyjádření Lambert-Beerova zákona:

$$A = \varepsilon_{\lambda} \cdot l \cdot c, \quad (3)$$

kde ε_{λ} je molární absorpční koeficient (konstanta pro danou látku za daných podmínek při určité vlnové délce; $(dm^3 \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1})$), c představuje látkovou koncentraci $(mol \cdot dm^{-3})$ a l tloušťku absorbující vrstvy (cm) . [69]



Obr. 20 Průchod záření kyvetou [136]

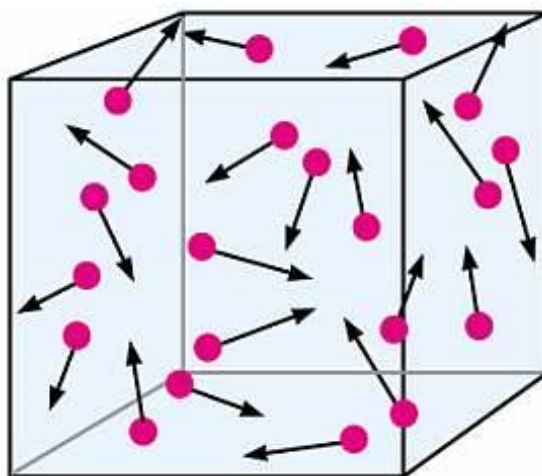
4.5.4 Dynamický rozptyl světla

Příprava vzorku pro měření:

Měření dynamického rozptylu částic a elektroforetického potenciálu probíhalo tak, že bylo odlito 1 cm³ vzorku HK do křemenné kyvety. Po skončení měření velikosti částic byla do kyvety se vzorkem vložena Dip či DSC 700 cela pro stanovení zeta potenciálu.

Princip měření:

Dynamický rozptyl světla (*Dynamic light scattering – DLS*) nebo také foton korelační spektroskopie (*Photon correlation spectroscopy – PCS*) se stala velmi populární metodou používanou pro pozorování difúze částic látek ať už v roztoku nebo suspenzi. Určením rychlosti difúze (difúzního koeficientu) můžeme získat informace o velikosti částic, konformaci makromolekulárních řetězců, různých interakcí mezi složkami v roztoku, nebo suspenzi a dokonce i o kinetice zkoumaných látek bez nutnosti kalibrace. Výhody PCS, mezi něž patří i skutečnost, že se jedná o neinvazivní metodu vyžadující pouze malé množství vzorku a nevyžadující rozsáhlé přípravy vzorku, řadí tuto metodu mezi nejpoužívanější prostředky pro studování velikosti submikronových částic, ale i pro certifikaci norem a kontrol velikosti částic. PCS měří fluktuaci rozptýleného záření od částic v médiu. Měřit lze cokoliv, co má jiný index lomu než médium a je stabilní během měření. Společným rysem všech studovaných systému je jejich pohyb. Tento nahodilý pohyb vzniká v důsledku tepelného pohybu molekul média a je známý jako Brownův pohyb. Jako první byl pozorován na květech rostlin, když se jejich pyl rozptýlil do vody. Obecně lze říci, že dolní limit velikosti tohoto typu měření se určuje podle detekované odchylky fluktuace částic ku experimentálnímu šumu. Měřený rozptyl fluktuace musí být větší než experimentální šum způsobený různými příčinami, včetně rušivých vlivů fluktuace teploty, elektrického šumu, aby se docílilo objektivního výsledku. Horní limit měření velikosti je ovlivněn především sedimentačním limitem. Sedimentované částic podléhají řízenému pohybu, který komplikuje měření fluktuace. Horní mez velikosti v PCS experimentech je několik mikronů v závislosti na hustotě materiálu a střední viskozitě a dolní mez zhruba několik nanometrů v závislosti na rozdílu indexu lomu mezi částicemi a médiem. [138]



Obr. 21 Brownův pohyb molekul [139]

Během měření dynamického rozptylu světla dochází k interakci laserového zdrojového záření s částicemi ve vzorku. Poté co je vzorek osvětlen monochromatickým koherentním světelným paprskem, jako je laser, dochází z důvodu Brownova pohybu u kulovitých částic k Dopplerově posuvu při dopadu světla na pohybující se částici. Následně pak dochází ke změně vlnové délky dopadajícího světla, což souvisí s velikostí částic.

Pomocí autokorelační funkce jsme pak schopni vypočítat distribuci velikosti částic a popsat také pohyb částice v médiu měřením difúzního koeficientu částice [140]. Podle disperzity zkoumaných systémů se mění i korelační funkce, v případě polydisperzních systémů má složitější formu, jelikož zde musíme brát v úvahu pohyb frakcí částic různých velikostí. [141] Velikosti částic může být determinována ze Stoke – Einsteinovy rovnice,

$$D = \frac{k_b \cdot T}{6 \cdot \pi \cdot \eta \cdot d_H} \quad (4)$$

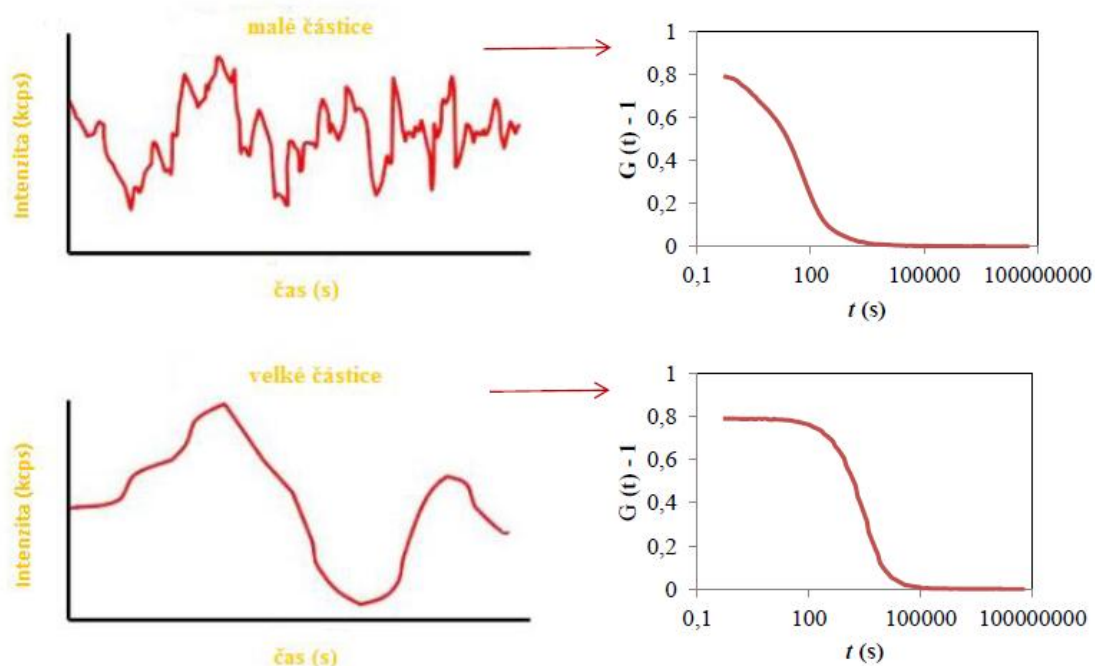
kde je k_b Boltzmannova konstanta, T je teplota, η dynamická viskozita, d_H je hydrodynamický poloměr. [142]



Obr. 22 Přístroj Zetasizer Nano ZS [143]

Korelační funkce

Částice pohybující se Brownovým pohybem, se pohybují různou rychlostí v závislosti na jejich velikosti (Stokes - Einsteinova rovnice). Velké částice se pohybují poněkud pomaleji, než menší částice. V případě měření velkých částic bude intenzita fluktuovat pomalu, u malých částic tomu bude přesně naopak. Základním výstupem metody DLS je intenzitní distribuce velikosti částic, nicméně se dá poměrně snadno převést na distribuci objemu. [144]



Obr. 23 Časový vývoj fluktuací intenzity rozptýleného světla v případě měření: velkých a malých částic a příklady korelačních křivek získaných během měření metodou DLS [145]

4.5.5 Elektroforetický rozptyl světla

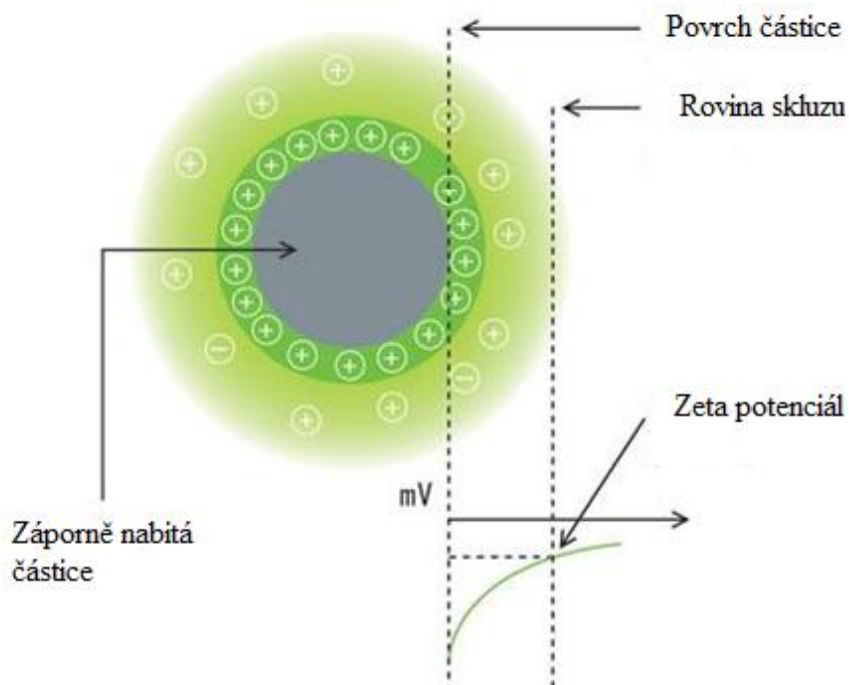
Technologie elektroforetického rozptylu světla se používá především k charakterizaci povrchového náboje koloidních částic (termín pro mikrometrové a nanometrové částice) v kapalném médiu. Jednou z výrazných vlastností koloidních částic, ve srovnání s velkými částicemi, nebo sypkými materiály je ta, že z důvodu jejich malých rozměrů mají extrémně velké specifické povrchové plochy. Velký specifický povrch koloidních částic znamená, že rozhraní částice a kapaliny může silně ovlivnit mnoho fyzikálních vlastností koloidních disperzí, jako jsou dispergovatelnost a stabilita. [138]

Elektrický náboj na povrchu koloidních částic vytváří elektrické pole, jehož vlivem dochází v těsné blízkosti částice k uspořádání opačně nabitých iontů (protiiontů) a vzniká tak útvar složený ze dvou vrstev opačně nabitých iontů – **elektrická dvojvrstva**. V elektrické dvojvrstvě rozlišujeme dvě základní části: Kompaktní (vnitřní) vrstvu bližší k povrchu, kde působí adsorpční síly, a vzdálenější difúzní část, kde tyto adsorpční síly zanedbáváme, a ionty jsou k sobě přitahovány elektrostatickými silami. Při pohybu částice s elektrickou dvojvrstvou vůči nepohyblivému disperznímu prostředí se kompaktní vrstva iontů s částicí pohybuje, kdežto vrstva difúzní se s částicí nepohybuje. Rozhraní oddělující pohyblivou a nepohyblivou část se nazývá rovina skluzu. A právě potenciál, existující v této vzdálenosti od povrchu částice, je odpovědný za její interakci s vnějším elektrickým polem – tedy za tzv. **elektrokinetické jevy**. Proto se nazývá elektrokinetický potenciál nebo-li ξ potenciál (zeta potenciál). O jeho velikosti rozhodují jednak adsorbované ionty, ale i – a dosti značně – iontová síla roztoku. S rostoucí koncentrací elektrolytu přecházejí opačně nabitě ionty z difúzní části elektrické dvojvrstvy blíže k vnitřní části elektrické dvojvrstvy – difúzní

část se tak zmenšuje, což vede ke snížení hodnoty ξ potenciálu a tím současně ke ztrátě stability koloidních částic. [141]



Obr. 24 Dip cela (vlevo) [146], DSC 700 cela (vpravo) [147]



Obr. 25 Schématické znázornění zeta potenciálu [148]

Obecná hranice mezi stabilní a nestabilní suspenzí se zpravidla bere buď při + 30 mV nebo – 30 mV. Částice s potenciálem zeta kladnějším než + 30 mV, nebo zápornějším než – 30 mV se normálně považují za stabilní. Nejdůležitější faktor, který ovlivňuje potenciál zeta je pH. Hodnota potenciálu zeta sama o sobě bez uvedení pH, je prakticky číslo nemající žádný smysl. [144]

Měření elektroforetické pohyblivosti

Technika pro měření elektroforetické pohyblivosti se nazývá laserová Dopplerova velocimetrie (*Laser doppler velocimetry* – LDV) Základem měření je cela s elektrodami na každém konci, na které je aplikovaný potenciál. Částice se pohybují

směrem k elektrodě s opačným nábojem, měří se jejich rychlost a vyjádří se v jednotkách intenzity pole. [144]

4.5.6 Gelová permeační chromatografie

Příprava vzorku:

Nejprve byly vzorky všech HK i frakcionovaných filtrovány přes 0,45 μm stříkačkový filtr. Poté bylo napipetováno 1 cm^3 vzorku do vialek, vialky byly vloženy do autosampleru chromatografu. Vzorek byl poté nastříknut (100 μl) na kolonu: Sephadex G-2000 (firma Phenomenex), rozměry kolony 700 x 7,5 mm. Stacionární fází byl – gel na bázi poroční silicy, mobilní fází 0,1 M PBS (fosfátový pufr). Průtok mobilní fáze byl nastaven na 0,6 cm^3/min .

Princip měření:

GPC separuje látky na základě molekulárního hydrodynamického objemu či velikosti, spíše než na základě entalpické interakce se stacionární fází, jak je tomu v případě jiných druhů např. kapalinové chromatografie, adsorpce nebo iontové výměny. V GPC se polymer rozpustí ve vhodném rozpouštědle a je nastříknut do kolony naplněné porézních částic definovaných velikostí pórů. Mobilní fáze je obecně stejné rozpouštědlo použité k rozpouštění polymeru. Polymer je eluován přes kolonu, molekuly, které jsou příliš velké, aby pronikly do pórů, jsou vymývány do intersticiálního či prázdného objemu kolony. [149]

Podrobnější popis metody je uveden v kapitole 3.8.

4.5.7 Mikroreologie

Příprava vzorku:

Příprava vzorku pro měření mikroreologie na přístroji Zetasizer Nano ZS probíhala tak, že bylo odlito 3 cm^3 vzorku HK do křemenné kyvety a přidáno 5 μl polystyrenových částic o velikosti 0,5 μm .

Princip měření:

Základním principem mikroreologie je narušování struktury materiálů drobnými částicemi, které jsou zakomponovány do materiálu. Podle způsobu pohybu těchto částic můžeme mikroreologii rozdělit do dvou oblastí: první z nich je tzv. aktivní mikroreologie, jež používá aktivní manipulaci částic pomocí magnetického či elektrického pole nebo jiných mikromechanických sil, jako je například užití optické pinzety. Tato měření jsou analogická s klasickou reologií, kde je na vzorek vkládán vnější tlak a výsledné napětí je použito k získání smykového modulu. Druhá oblast tzv. pasivní mikroreologie používá pouze Brownova pohybu začleněné mikročástice. Tento přístup pracuje pouze s tepelnou energií sondy k určení struktury a reologických vlastností materiálu. Měření spočívá v přípravě vzorků, následném zavedení inertních mikročástic do vzorku a použitím mikroskopu k detekci těchto částic. Díky vysokorychlostnímu záznamovému zařízení pak dochází k záznamu pohybu částic ve vzorku a tento záznam je pak obrazovou analýzou zpracován a jsou získána data charakterizující tzv. střední kvadratický posun částice (*mean square displacement – MSD*) nebo-li zjednodušeně řečeno trajektorii částice. Ta pak vypovídá o mechanických

vlastnostech vzorku. [150] Další možností, jak studovat pohyb částic ve zkoumaném vzorku je metoda DLS, která byla využita v této diplomové práci.

Výhodou pasivní mikrореologie je převážně pozorování až tisíce částic a ne jenom jedné samotné částice. Pohyb částic v roztoku závisí především na tuhosti místního prostředí. Hodnotu elastického modulu G' nám udává následující rovnice:

$$\frac{k_B \cdot T}{a^3} = \frac{G' \cdot L^2}{a^2} \quad (5)$$

kde hodnotu k_B označujeme jako Boltzmannovu konstantu, která má velikost $1,38 \cdot 10^{-23} \text{ J} \cdot \text{K}^{-1}$, T označujeme termodynamickou teplotu, a značí poloměr částic a L je označení pro délku posunu. Pro většinu materiálů by se teplota T neměla nějak výrazně lišit. Díky této metodě jsme schopni změřit horní limit modulu pružnosti, jež závisí na velikosti vložené částice do roztoku a na schopnosti vyřešit posun částic o řád L . Závisí tedy na konkrétním použitém systému, jeho rozmezí se pohybuje od 1 Å do 10 nm, což nám umožňuje měření s mikrometrovými částicemi s elastickým modulem až po 10 – 500 Pa.

Dynamika pohybující se částice je popsána v čase pomocí korelační funkce střední hodnoty čtverce posunu (MSD) nebo také označována jako $(\Delta x^2(\tau))$.

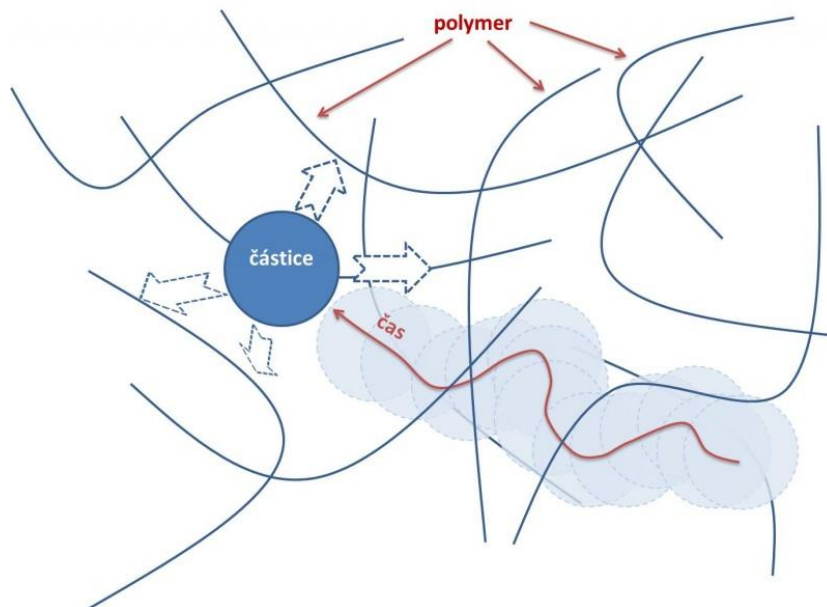
$$(\Delta x^2(\tau)) = \langle (x(t+\tau) - x(t))^2 \rangle \quad (6)$$

Z čehož pro difúzní koeficient částice plyne:

$$(\Delta x^2(\tau)) = 2dD\tau \quad (7)$$

D označujeme difúzní koeficient, d vyjadřujeme dimenzi. Po získání difúzního koeficientu jej dosadíme do Stokes- Einsteinova vztahu (viz **rov. 4**) Získáme tak hodnotu viskozity pro zkoumanou látku.

Pokud jsou částice, jež pozorujeme, volně rozptýlené ve vzorku, můžeme říct, že se jedná o látku čistě viskózního charakteru. Jestliže se částice pohybují sub-difúzním pohybem, znamená to, že systém vykazuje viskoelastické vlastnosti. [151]



Obr. 26 Princip měření pasivní mikroreologie [150]

5 VÝSLEDKY A DISKUZE

5.1 Charakterizace huminových kyselin

Elementární analýza

IHSS HK (zdroj – leonardite) použité v této diplomové práci byly podrobeny charakterizaci za pomoci elementární analýzy viz. (Tab. 2). HK nejčastěji obsahují biogenní prvky jako jsou (C, H, N, O, S a P). Obsah těchto látek byl zjištěn i u HK použitých v této práci. Ve struktuře IHSS HK byly nejvíce zastoupeny uhlík, vodík a kyslík. Kdežto dusík a síra se zde nacházejí pouze v malém množství. V porovnání s HK, se kterými se pracovalo v bakalářské práci, mají IHSS HK Leonardite více uhlíku a nepatrně více kyslíku, nicméně obsah vodíku je menší (viz. Tab. 2 a Tab. 3). Obsah popele byl stanoven na 2,42 hm. %.

IHSS HK Leonardite

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

elementární složení HK (atomová %)				
C	H	O	N	S
48,1	33,2	17,7	0,8	0,2

Porovnání s HK použitou v předchozí práci:

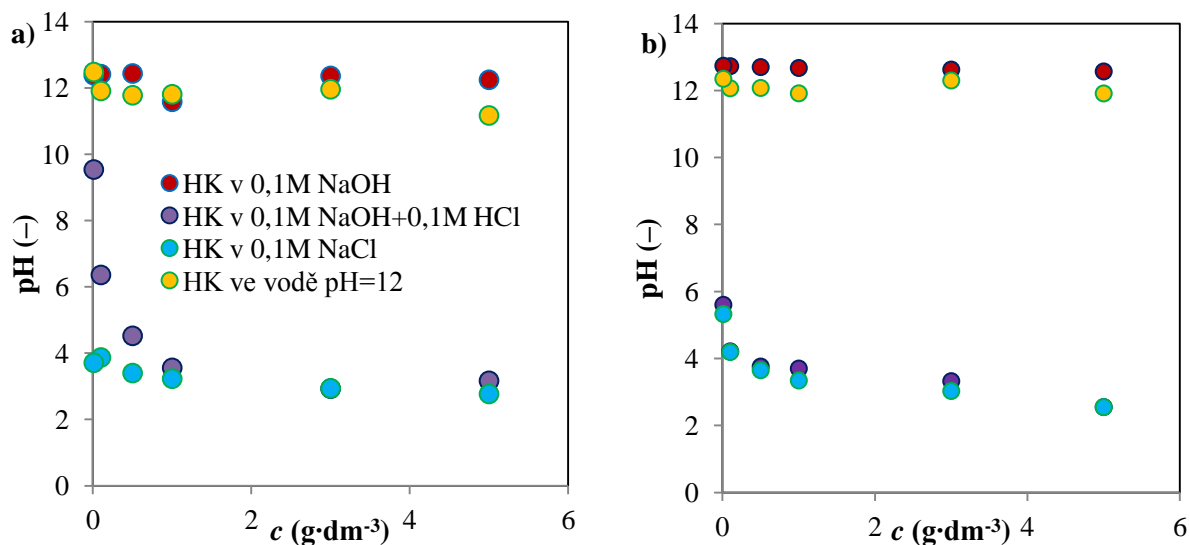
Tab. 3 Elementární složení HK (atomová % jsou vztažena na vzorek bez vlhkosti a popela)

elementární složení HK (atomová %)				
C	H	O	N	S
44,2	36,7	17,4	1,3	0,4

5.1.1 Potenciometrické stanovení pH

Výsledky potenciometrického stanovení pH vzorků HK ukázaly, že v případě řady HK v 0,1 M NaOH jsou hodnoty pH poměrně konstantní, odlišné chování vykazuje vzorek s koncentrací 1 g/dm³ kde je hodnota pH nižší, což může být způsobeno disociací HK. V případě HK ve vodě, kde bylo pH upraveno na hodnotu 12, se hodnoty nepatrně odlišují. Kromě vzorků s koncentrací 1 a 0,01 g/dm³ jsou hodnoty pH o něco nižší, než v případě koncentrační řady HK v 0,1 M NaOH. U roztoků připravených neutralizací dvěma způsoby přípravy se hodnoty liší poměrně značně. Měření pH koncentrační řady HK v 0,1 M NaOH + 0,1 M HCl ukázalo, že oproti HK v 0,1 M NaCl jsou hodnoty vyšší a obecně dochází k exponenciálnímu poklesu se vzrůstající koncentrací HK, zatímco v případě HK v 0,1 M NaCl se hodnoty příliš nemění, alespoň u vyšších koncentrací. Tyto rozdíly se připisují odlišné přípravě roztoků, jenž vyvolala strukturální změny v HK. Obecně by se mělo pH (v případě roztoků připravených neutralizací) pohybovat v neutrální oblasti, nicméně zde zřejmě sehrály velkou roli HK, díky nimž se pH posunulo více do kyselé oblasti. V porovnání s výsledky z bakalářské práce jsou výsledky u koncentrační řady HK v 0,1 M NaOH a HK ve vodě (pH upraveno na hodnotu 12) méně konstantní, hodnoty pH

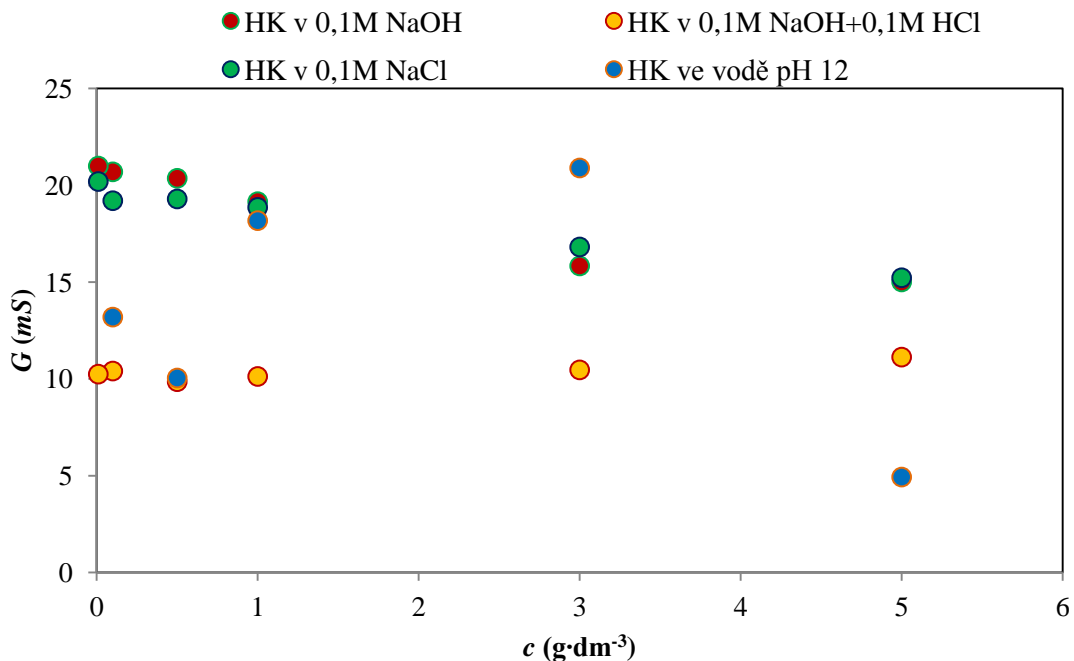
jsou nepatrně nižší. U vzorků připravených neutralizací je vidět rozdíl v případě HK v 0,1 M NaOH + 0,1 M HCl především u méně koncentrovaných vzorků.



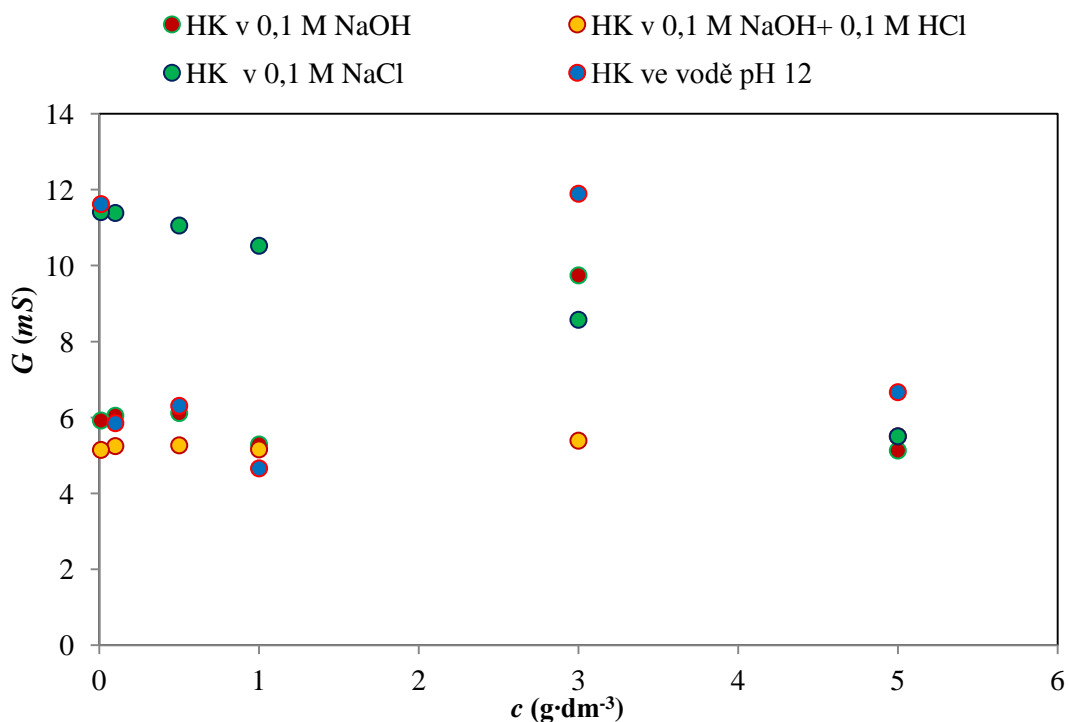
Obr. 27 Závislost pH na koncentraci HK pro všechny koncentrační řady a) výsledky diplomové práce b) výsledky z bakalářské práce (legenda je společná pro oba grafy)

5.1.2 Přímá konduktometrie

Největší výhodou použití metody přímé konduktometrie spočívá v tom, že zahrnuje vliv veškerých iontů, které se v roztoku nacházejí. To se ovšem nedá říct o potenciometrickém stanovení pH, jež zaznamenává přítomnost pouze iontů H^+ (resp. OH^-). Výsledky měrné vodivosti látky ovlivňují druhy jednotlivých iontů, jejich pohyblivosti a neméně důležité je také to, v jakém se nacházejí koncentračním poměru. Největší měrná vodivost byla zaznamenána u koncentrační řady HK v 0,1 M NaOH, o něco nižší výsledky byly naměřeny u koncentrační řady HK v NaCl. Získané výsledky jsou v rozporu s očekávanými výsledky, jelikož by největší vodivost měla být zaznamenána u koncentrační řady HK v 0,1 M NaCl, z toho důvodu, že pohyblivost Na^+ a Cl^- je nepochybně větší než OH^- , zřejmě zde však sehrály svou roli koncentrační poměry iontů, nebo mohlo dojít k chybě měření. V případě koncentrační řady HK ve vodě (pH upraveno na hodnotu 12) jsou hodnoty měrné vodivosti rozmanité a nepodléhají žádnému trendu. Výsledky měrné vodivosti HK v 0,1 M NaOH + 0,1 M HCl jsou poměrně konstantní, nicméně u vyšších koncentrací se hodnoty mírně zvyšují, což je způsobeno větším množstvím pohyblivých iontů ve vzorku. V porovnání s výsledky z bakalářské práce jsou naměřené hodnoty poměrně odlišné ve všech koncentračních řadách, ale úplně největší rozdíly jsou zaznamenány právě v případě řad HK v 0,1 M NaOH a 0,1 M NaCl, kde v případě bakalářské práce se výsledky jeví jako více pravděpodobné tím, že největší měrná vodivost byla naměřena u HK v 0,1 M NaCl. Obecně jsou naměřené hodnoty vyšší než v bakalářské práci, což může být také způsobeno tím, že byly použity odlišné HK.



Obr. 28 Závislost měrné vodivosti na koncentraci HK pro všechny koncentrační řady



Obr. 29 Závislost měrné vodivosti na koncentraci HK pro všechny koncentrační řady (bakalářská práce)

5.1.3 UV–VIS spektrometrie

Z naměřených UV – VIS spekter byly odečteny hodnoty absorbance při 465 nm (E_4) a 665 nm (E_6). Poměr A_{465}/A_{665} (označován také jako E_4/E_6) je tzv. humifikační index. Humifikační index nám poskytne informaci o poměru mezi ligninovými strukturami

odolnými vůči humifikaci a množstvím „mladých“ HK (v prvním stupni humifikace). Hodnota humifikačního indexu pro HK je obvykle menší než 5,0 a snižuje se s rostoucí molekulovou hmotností a stupněm disperzity. Nízký poměr může znamenat relativně vysoký podíl aromatických částic a naopak vysoký ukazuje na větší obsah alifatických struktur. Výsledky pro vybrané vzorky jsou uvedeny v **Tab. 4**.

Tab. 4 Průměrné hodnoty humifikačních indexů pro všechny prostředí

HK v 0,1 M NaOH	HK ve vodě pH = 12	HK v 0,1 M NaOH + 0,1 M NaOH	HK v 0,1 M NaCl
3,0328	2,5974	0,5567	2,8670

Tab. 5 Průměrné hodnoty humifikačních indexů pro všechny prostředí (bakalářská práce)

HK v 0,1 M NaOH	HK ve vodě pH = 12	HK v 0,1 M NaOH + 0,1 M NaOH	HK v 0,1 M NaCl
4,3845	0,9838	4,9597	3,4751

Humifikační indexy jednotlivých koncentračních řad se liší pouze nepatrně až na HK v 0,1 M NaOH + 0,1 M HCl, kde je hodnota humifikačního indexu poměrně nižší. Obecně hodnoty humifikačních indexů v případě vysokých koncentrací byly nižší, což znamená, že se ve struktuře HK nalézalo množství aromatických struktur, se snižující koncentrací se však hodnoty měnily na vyšší. Důvodem může být to, že s narůstající koncentrací se zvyšovala chyba měření, jelikož vzorky byly i po ředění poměrně tmavé. Podobných výsledků bylo dosaženo i v bakalářské práci. Jediná koncentrační řada, která vykazovala odlišnosti byla HK v 0,1 M NaOH + 0,1 M HCl, kde bylo dosaženo přesně opačných výsledků, kdy hodnoty humifikačních indexů byly nejvyšší u nejkonzentrovanejších vzorků, což může být vysvětleno tím, že HK v prostředí 0,1 M NaOH + 0,1 M HCl měly tendenci shlukovat se do větších aglomerátů se snižující se koncentrací.

5.1.4 Dynamický rozptyl světla

Pro studium distribuce velikosti částic v jednotlivých vzorcích byla použita neinvazivní nedestruktivní metoda dynamického rozptylu světla. Měření probíhalo na přístroji Zetasizer Nano ZS, který dokáže změřit časový vývoj fluktuací rozptýleného světla pohyblivými se částicemi ve vzorku. Citlivost této metody vůči jakýmkoli změnám velikosti částic nám umožňuje zkoumat změny konformace supramolekulárních útvarů HK. Z naměřených distribucí velikostí částic, ať už intenzitních či objemových, jsme schopni vydedukovat, zda dochází k destabilizaci struktury, agregaci nebo změně konformace molekul zkoumané látky.

Optimalizace metody

Abychom získaly správné, odpovídající výsledky bylo nutné nejdříve nastavit podmínky měření studovaných systémů HK. Měření na přístroji Zetasizer Nano ZS vyžaduje správně nastavit především optický systém a fokusaci laserového paprsku na specifické místo v kyvetě. Pokud se mění fokusace laserového paprsku, mění se tím i optická délka

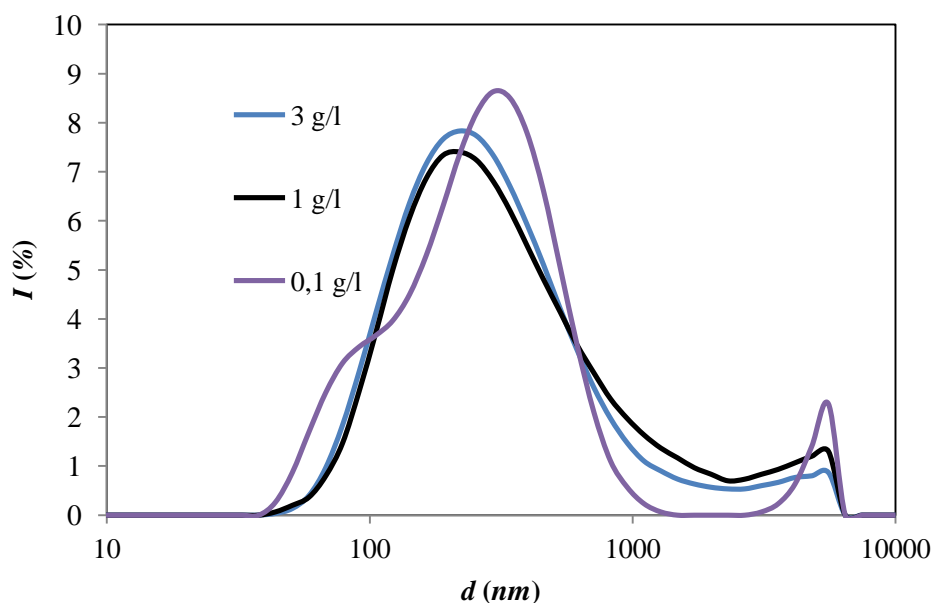
dráhy laserového paprsku. Lze tak snadno upravovat měřicí parametry pro různé koncentrace, např. u vyšších koncentrací je výhodné optickou dráhu zkrátit, aby nedocházelo k mnohonásobnému rozptylu světla, čímž by došlo k ovlivnění naměřených dat. V případě hodně zředěných roztoků je tomu přesně naopak. Vzhledem k mé předchozí bakalářské práci, byla stanovena optimální měřicí pozice detekce rozptýleného světla pro HK v různých prostředích na 1 mm od stěny kyvety. Na rozdíl od bakalářské práce, kde byly vzorky filtrovány přes 5 μm stříkačkový filtr, byly studovány IHSS HK bez předchozí filtrace větších částic. Vzorky v bakalářské práci totiž měly tendence vytvářet viditelné pevné sraženiny HK, kdežto u IHSS HK byly roztoky bez těchto sraženin.

Distribuce velikosti částic

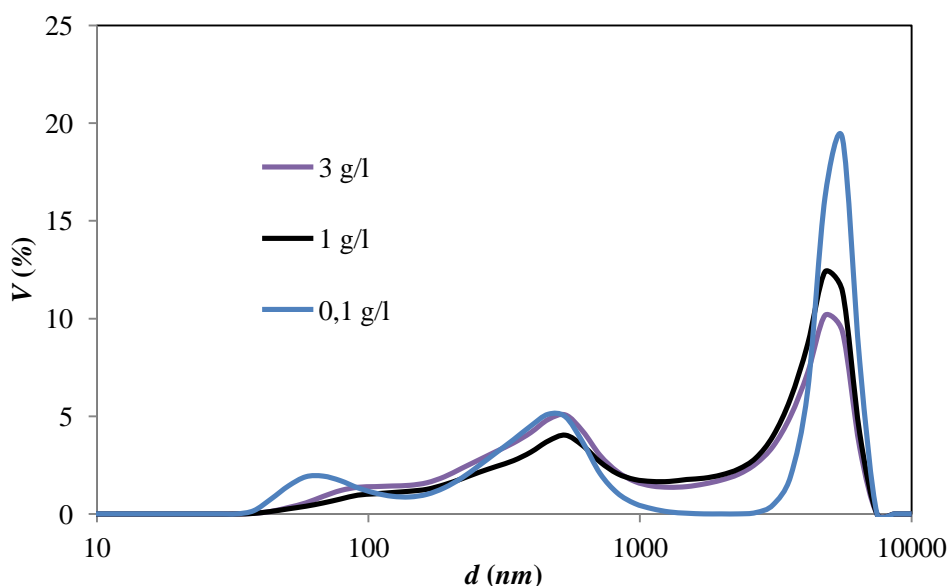
Výsledkem měření dynamického rozptylu světla je intenzitní a objemová distribuce velikosti částic. Nejlepší nástrojem pro přesnou charakterizaci je porovnání distribuce intenzitní s objemovou. Jelikož v případě intenzitní distribuce částic mohou velké částice často nadhodnocovat výsledky a může dojít k situaci, že frakce malých částic se úplně ztratí ve velké intenzitě záření rozptýleného na větších částicích, proto má lepší vypovídací hodnotu o distribuci hmoty ve vzorku objemová distribuce velikosti částic. K přepočtu intenzitní distribuce na objemovou je zapotřebí znát index lomu částic ve vzorku, pro vlnovou délku laseru v přístroji Zetasizer – 632,8 nm. Po porovnání těchto dvou distribucí jsme schopni vydedukovat, které částice ve vzorku převažují, či zda dochází k agregaci apod. Hodnoty indexu lomu pro všechny prostředí jsou uvedeny v **Tab 6**.

Tab. 6 Hodnoty indexu lomu pro všechny prostředí

HK v 0,1 M NaOH	HK ve vodě pH = 12	HK v 0,1 M NaOH + 0,1 M NaOH	HK v 0,1 M NaCl
3,0328	2,5974	0,5567	2,8670



Obr. 30 Závislost intenzity rozptýleného světla částicemi jednotlivých velikostí, HK ve vodě $pH = 12$



Obr. 31 Objemová distribuce velikosti částic, HK ve vodě $pH = 12$

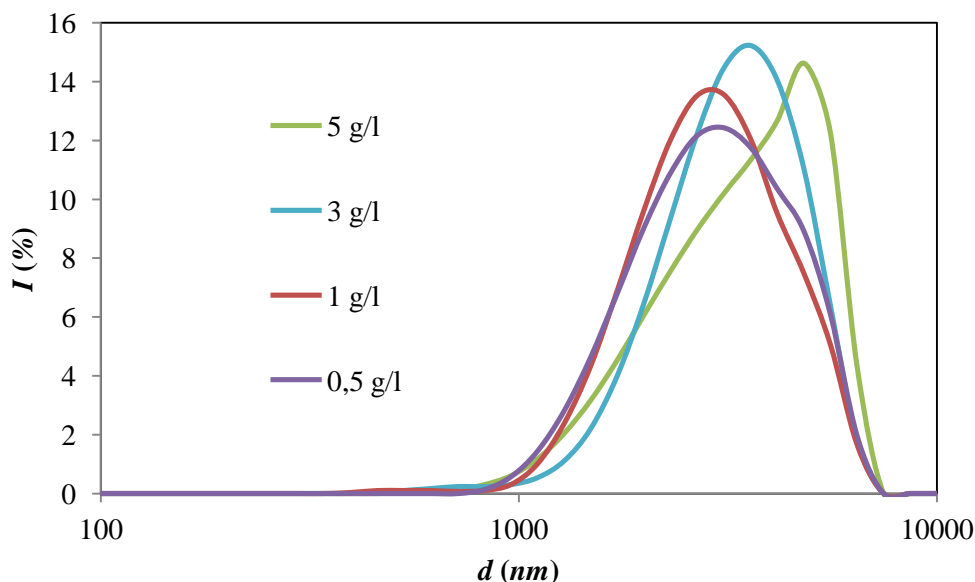
Obr. 30 a 31 představují získané intenzitní a objemové distribuce pro určité koncentrace řady HK ve vodě $pH = 12$. Intenzitní distribuce velikosti částic ukazuje, že v největším množství rozptylují částice s velikostí v rozmezí 300 – 500 nm, což odpovídá supramolekulárním micelám HK, jelikož jednotlivé struktury HK jsou převážně o velikosti do 100 nm, v objemové distribuci se však objevuje poměrně značný pík u velikostí několik mikronů. Z toho lze vydedukovat, že částice o velikosti několik mikronů se v roztoku HK nacházejí, nicméně v poměrně malém množství, jinak by se samozřejmě jejich přítomnost projevila v intenzitní distribuci velikosti částic. Větší částice o několika mikronů tedy pravděpodobně vznikly asociací více menších stavebních jednotek, či micel HK do agregátů. Popřípadě se může jednat o ne úplně rozpuštěné frakce HK, nebo v případě výskytu

nízkomolekulárních iontů ve vzorku mohou být HK víc zagregované, a to již z původních HK, nemusí to být nutně od přípravy vzorku

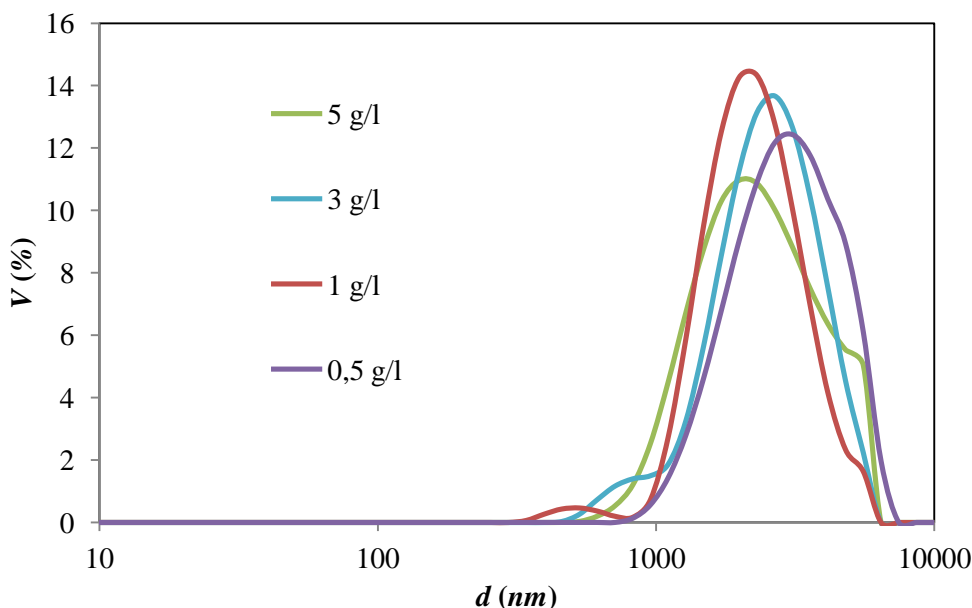
Nutné je taky vzít v úvahu, že v roztocích jednotlivých koncentračních řad se mohou vyskytovat částice ještě daleko větší než ty, které nám ukazují naměřené distribuce, ale metoda dynamického rozptylu světla bohužel není schopná je zaznamenat, jelikož větší částice již nepodléhají Brownovu pohybu. V porovnání s výsledky z bakalářské práce lze konstatovat, že studované systémy se chovaly poněkud odlišně. V případě bakalářské práce částice předpokládaných supramolekulárních útvarů HK odpovídaly velikosti přibližně 200 – 300 nm a částice měly tendenci částečně agregovat do větších celků, avšak v menší míře než v případě IHSS HK standardů. Zde můžeme názorně vidět, že každý studovaný systém HK se opravdu chová odlišně.

Prostředí s vysokou iontovou silou

Již nepatrné rozdíly v přípravě prostředí, kde se HK budou vyskytovat, ovlivňují velkou měrou jejich konformaci či molekulární organizaci ve vodných roztocích.

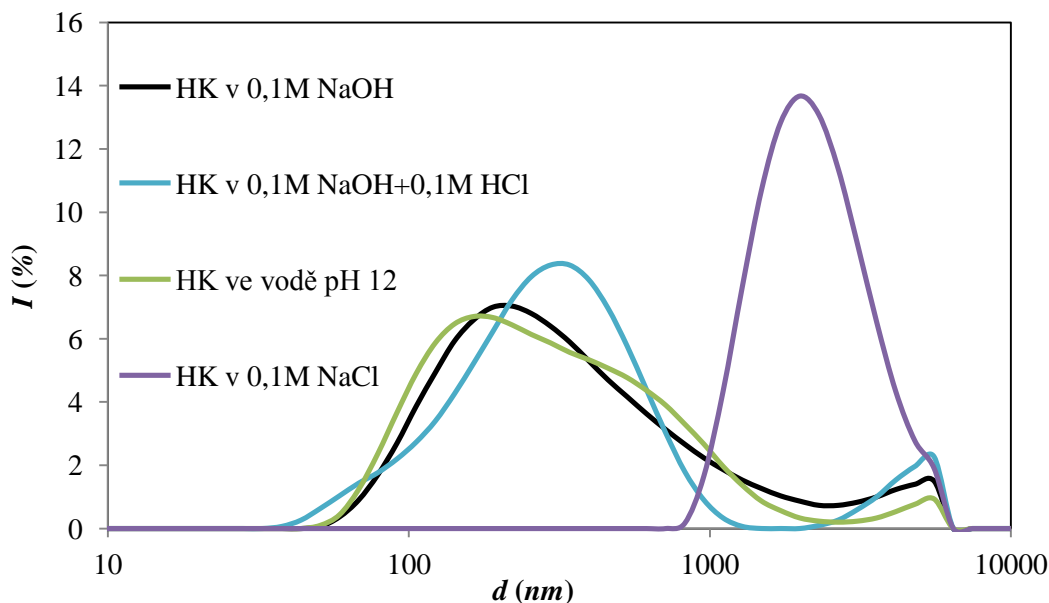


Obr. 32 *Závislost intenzity rozptýleného světla částicemi jednotlivých velikostí, HK v 0,1 M NaCl*

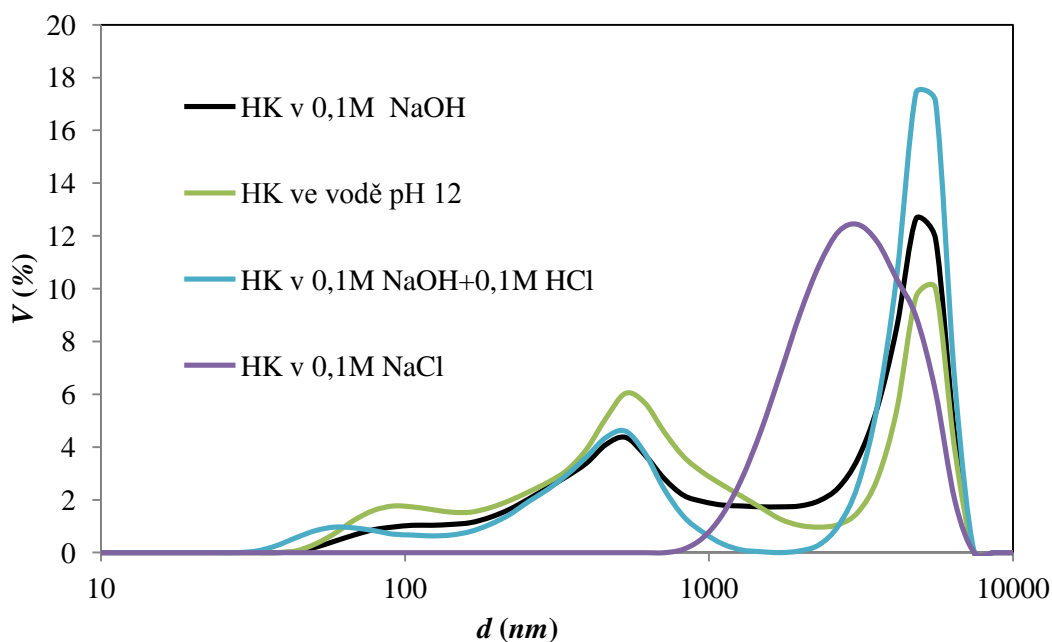


Obr. 33 Objemová distribuce velikosti částic, HK v 0,1 M NaCl

Obr. 32 a 33 zobrazují získané intenzitní a objemové distribuce pro koncentrační řadu HK v 0,1 M NaCl. Tato koncentrační řada vykazovala úplně odlišné chování než v případě ostatních prostředí, což způsobuje její způsob přípravy. Byla totiž připravena postupným ředěním roztoku HK v NaOH neutralizovaného HCl pomocí 0,1 M roztoku NaCl. Přídavek 0,1 M NaCl zvýšil iontovou sílu roztoků natolik, že HK se v tomto prostředí měly tendenci úplně agregovat do větších celků. Tyto poznatky nám dokládají i získané intenzitní distribuce, které ukazují, že jsou přítomné částice o velikosti několika mikronů a úplně stejně tomu tak bylo i u objemových distribucí. V případě HK v 0,1 M NaOH + 0,1 M HCl docházelo pouze k částečné agregaci, především u koncentrovanějších vzorků. Méně koncentrované vzorky obsahovaly ve velké míře částice menších rozměrů.

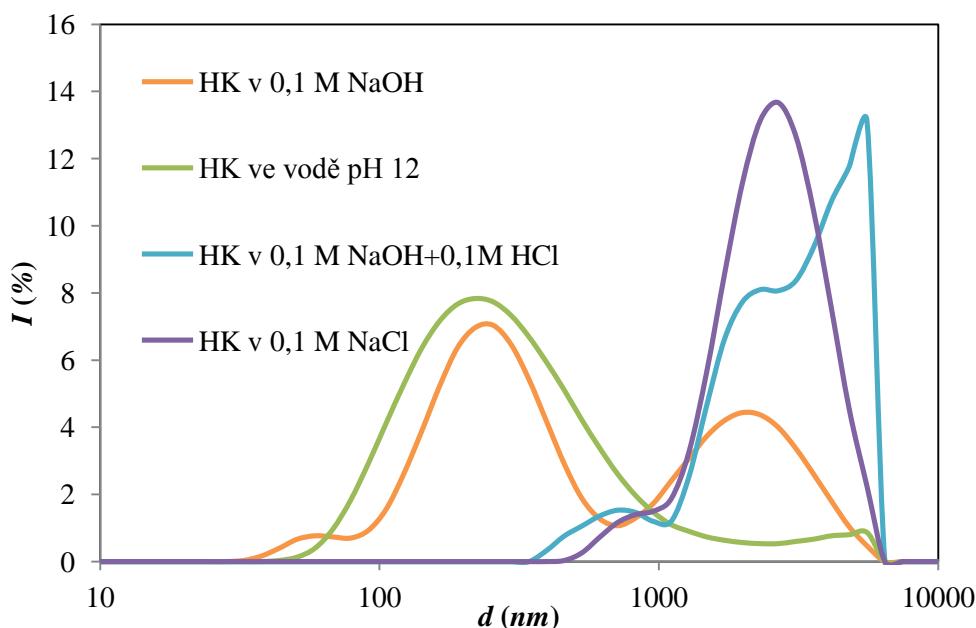


Obr. 34 Závislost intenzity rozptýleného světla částicemi jednotlivých velikostí pro všechny prostředí pro koncentraci 0,5 g/l

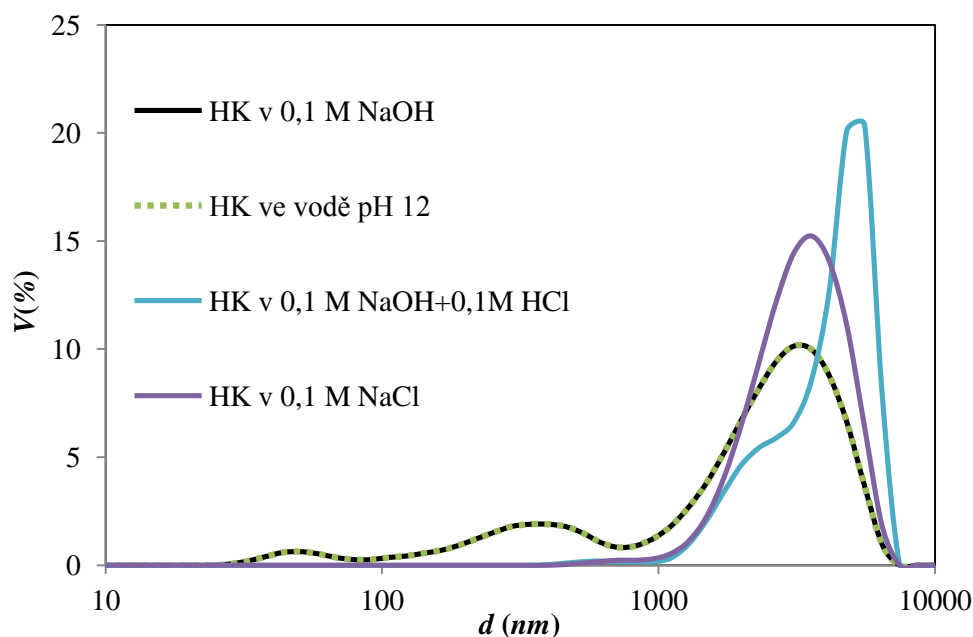


Obr. 35 Objemová distribuce velikosti částic pro všechny prostředí pro koncentraci 0,5 g/l

Obr. 34 a 35 zobrazují rozdíly naměřených výsledků pro odlišné přípravy vzorků vždy pro jednu koncentraci, zde $0,5 \text{ g/dm}^3$. V případě HK v alkalickém prostředí je distribuce velikosti částic poměrně podobná a lze vidět, že v roztoku převládají micely HK o velikosti 200 – 300 nm. Kdežto v neutrálním prostředí jsou výsledky úplně odlišné, právě zde se opět projevila odlišná příprava roztoků. Intenzitní distribuce HK v 0,1 M NaOH + 0,1 M HCl vypovídá o přítomnosti částic o velikosti okolo 500 nm, zatímco u vzorku HK v 0,1 M NaCl jsou přítomny agregáty HK o velikosti několik μm , částice menších rozměrů (v případě HK v 0,1 M NaOH + 0,1 M HCl) se ve vzorku mohly nacházet, ale pravděpodobně došlo k zastínění většími částicemi.



Obr. 36 Závislost intenzity rozptýleného světla částicemi jednotlivých velikostí pro všechny prostředí pro koncentraci 3 g/l



Obr. 37 Objemová distribuce velikosti částic pro všechny prostředí pro koncentraci 3 g/l

Obr. 36 a 37 ukazují získané distribuce velikosti částic pro různá prostředí pro koncentraci 3 g/dm³. Jak v alkalickém prostředí, tak v neutrálním prostředí odlišná příprava způsobila, že naměřené distribuce velikosti částic se lišily. Rozdíl je poměrně vyšší než u nižší koncentrace 0,5 g/dm³. U alkalického prostředí se výsledky lišily v tom, že v případě HK v 0,1 M NaOH distribuce naznačila přítomnost větších částic (několik μm), kdežto u HK ve vodě pH 12 pouze velikosti částic do 500 nm. Objemová distribuce pro tyto prostředí byla prakticky totožná, což znamená, že vzorky HK ve vodě pH 12 obsahovaly částice o velikosti několika μm , nicméně jich obsahovaly méně než v případě HK v 0,1 M NaOH. Oproti vzorkům s nižší koncentrací (0,5 g/dm³, alkalické prostředí) se zde projevuje větší tendence k agregaci.

Odlišně se částice chovaly i v neutrálním prostředí, kde docházelo k prakticky úplné agregaci micel HK do větších celků. Zajímavé je, že největší velikosti částic vykazovala řada HK v 0,1 M NaOH + 0,1 M HCl, kdy v případě nižší koncentrace (0,5 g/dm³) tomu bylo přesně naopak.

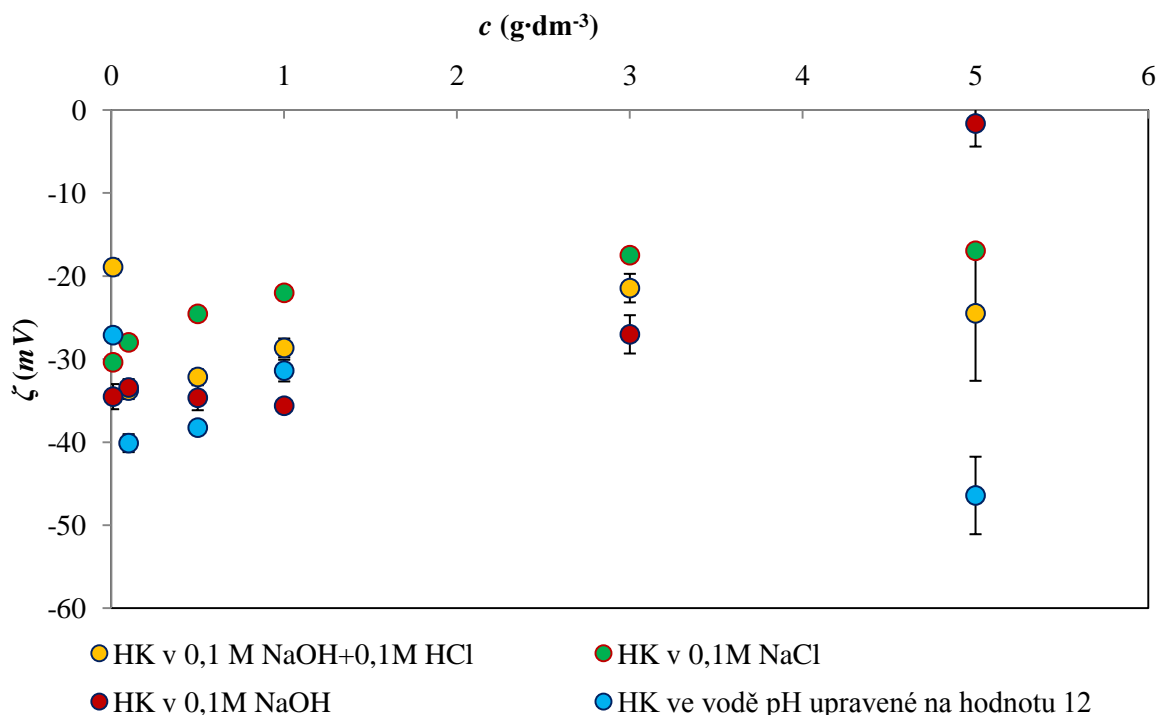
5.1.5 Elektroforetický rozptyl světla

Kvůli Brownovu pohybu se budou částice nepřetržitě mezi sebou srážet a následkem toho se částice mohou shlukovat kvůli Van der Waalsovým přitažlivým silám. To může vést k vytváření sekundárních částic (aglomerátů) o mnohem větší velikosti. Jestliže odpuzivá síla mezi částicemi převýší přitažlivou sílu, pak by výsledkem měl být stabilní systém. Energetická bariéra vyplývající z odpuzivé síly zabrání, aby se dvě částice navzájem k sobě přiblížily a držely ohromadě, pokud tyto částice nemají dostatečnou tepelnou energii pro překonání této bariéry. Velikost této potenciálové bariéry může být vyjádřena velikostí zeta potenciálu. Jestliže všechny částice v suspenzi mají vysoký negativní nebo pozitivní potenciál zeta, pak budou inklinovat k odpuzování se navzájem a nebudou mít tendenci se shlukovat. [152]

Přidáním elektrolytu lze elektrickou dvojrstvu silně zkomprimovat (snížit zeta potenciál) a koloidní soustavu tak destabilizovat. [141] Přidavkem elektrolytu podle teorie DVLO dochází k stlačení elektrické dvojrstvy a snížení hodnoty zeta potenciálu. Částice se pak mohou vzájemně více přibližovat a následně spojovat. Elektrická dvojrstva ovšem tvoří energetickou bariéru, kterou je nutno překonat k dosažení destabilizace koloidních částic. K agregaci teď dojde pouze v případě, je-li koncentrace přidávaného elektrolytu dostatečná – musí být překročen tzv. koagulační práh – γ (mol·dm⁻³). [152]

Tab. 7 Naměřené hodnoty zeta potenciálů pro jednotlivé koncentrační řady HK

c (g/dm ³)	HK v 0,1 M NaOH + 0,1 M HCl	HK v 0,1 M NaCl	HK v 0,1 M NaOH	HK ve vodě pH = 12
5	-24,47	-16,93	-	-46,40
3	-21,43	-17,47	-27	-
1	-28,63	-22,00	-35,60	-31,37
0,5	-32,13	-24,53	-34,63	-38,23
0,1	-33,77	-27,97	-33,40	-40,10
0,01	-18,90	-30,37	-34,50	-27,10



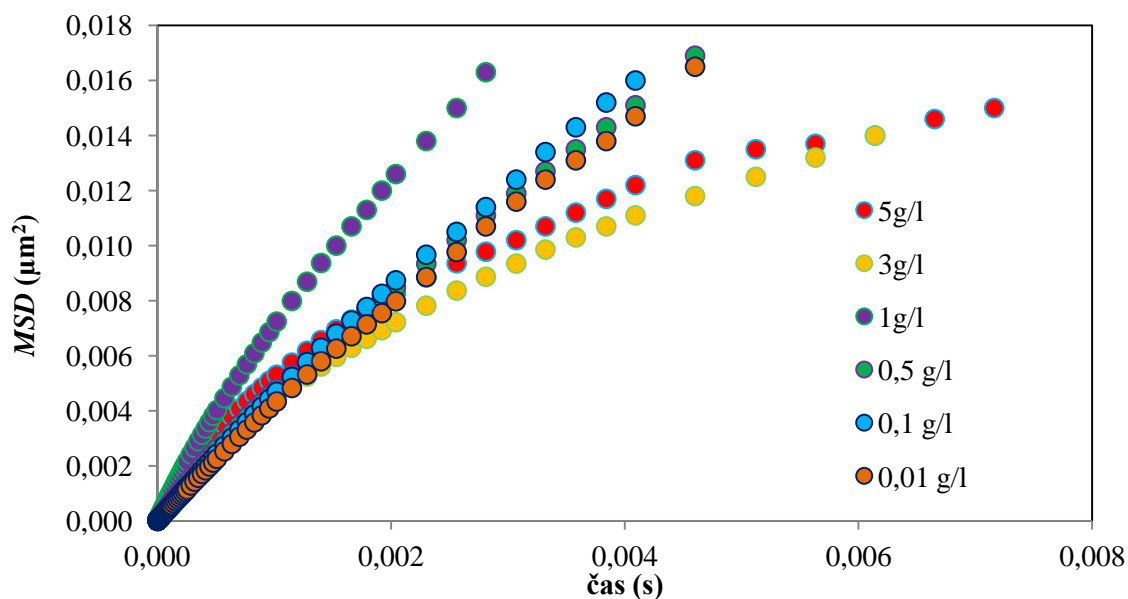
Obr. 38 Závislost zeta potenciálu na koncentraci HK pro všechny koncentrační řady

Tab. 7 nám ukazuje naměřené hodnoty zeta potenciálů (ζ) všech koncentračních řad IHSS HK, které se pro jednotlivé řady poměrně liší. V případě IHSS HK v alkalickém prostředí nastal problém se vzorky o koncentraci 5 a 3 g/dm³, kde skoro nebylo možné zaznamenat zeta potenciál z toho důvodu, že vzorky jsou příliš tmavé, aby je mohl prosvítit laser. Hodnoty byly zatíženy příliš velkou chybou, nicméně byla vyzkoušena jiná měřící cela DSC 700 oproti Dip cele, která naměřila uspokojivější výsledky. DSC 700 obsahuje kapiláru, kde se vejde menší množství vzorku, čímž se zvýší optická transparentnost vzorku.

V případě řad IHSS HK v neutrálním prostředí obecně dochází k destabilizaci systému, nicméně se zmenšující se koncentrací se jejich stabilita nepatrně zvyšovala. U koncentrační řady HK v 0,1 M NaCl v důsledku přidávání elektrolytu (NaCl) dochází ke snižování absolutní hodnoty zeta potenciálu, přitažlivé síly mezi částicemi převažují nad odpudivými, a z tohoto důvodu docházelo k agregaci IHSS HK do větších celků, což potvrdila i metoda dynamického rozptylu světla. Naproti tomu koncentrační řady IHSS HK v alkalickém prostředí se jevíly poměrně stabilní (výrazně vyšší absolutní hodnoty zeta potenciálů). V porovnání s HK v bakalářské práci byly absolutní hodnoty zeta potenciálu v neutrálním prostředí poměrně nižší, kdežto u HK v alkalickém prostředí byly vyšší.

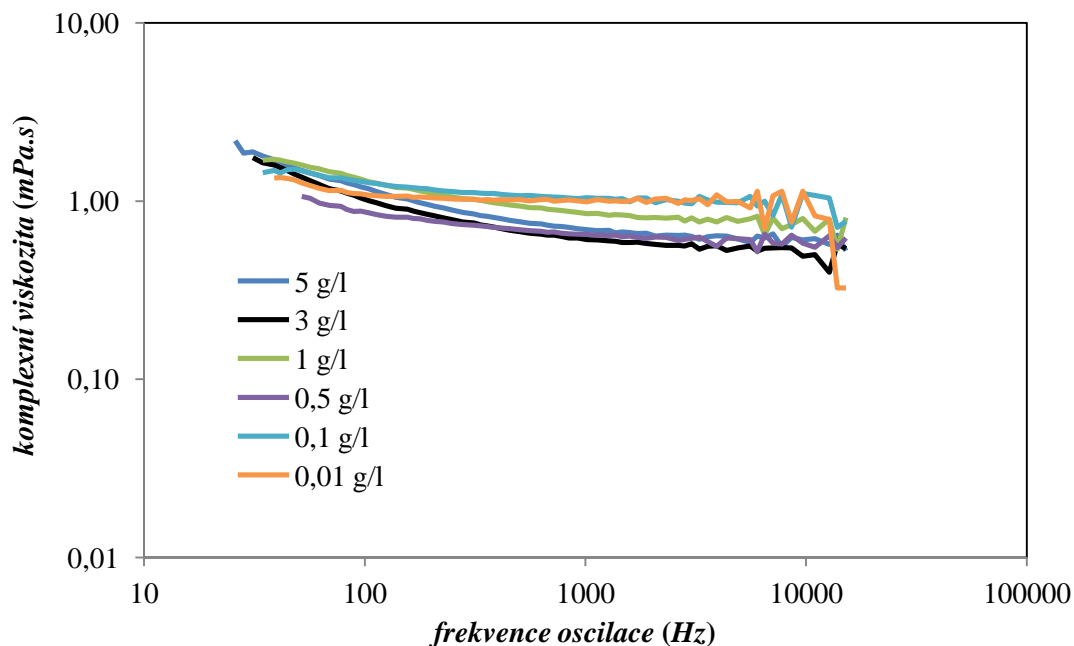
5.1.6 Mikroreologie

Pomocí metody mikroreologie jsme schopni zjistit, zda je zkoumaná látka viskózní či viskoelastické povahy. Pokud jsou částice, které pozorujeme volně rozptýlené ve vzorku, můžeme říct, že se jedná o látku čistě viskózního charakteru. Jestliže se však částice pohybují subdifúzním pohybem, znamená to, že systém vykazuje viskoelastické vlastnosti. [151]

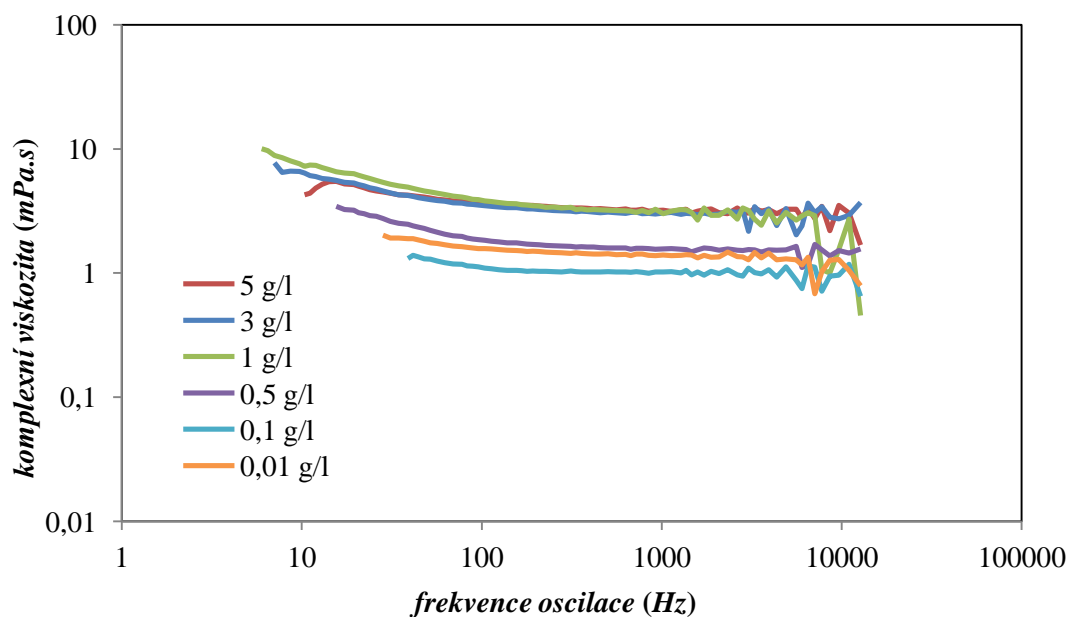


Obr. 39 Zobrazení MSD systém HK v 0,1 M NaOH v závislosti na čase

Obr. 39 ukazuje lineární závislost MSD na čase pro HK v 0,1 M NaOH. Z funkce MSD se dále vypočítává hodnota viskozity zkoumaného vzorku. Z naměřených výsledků pro koncentrační řadu HK v 0,1 M NaOH vyplývá, že pro méně koncentrované vzorky jsou závislosti MSD na čase spíše lineární, z čehož můžeme soudit, že jsou vzorky viskózní povahy. Naproti tomu více koncentrované vzorky jsou spíše viskoelastického charakteru.

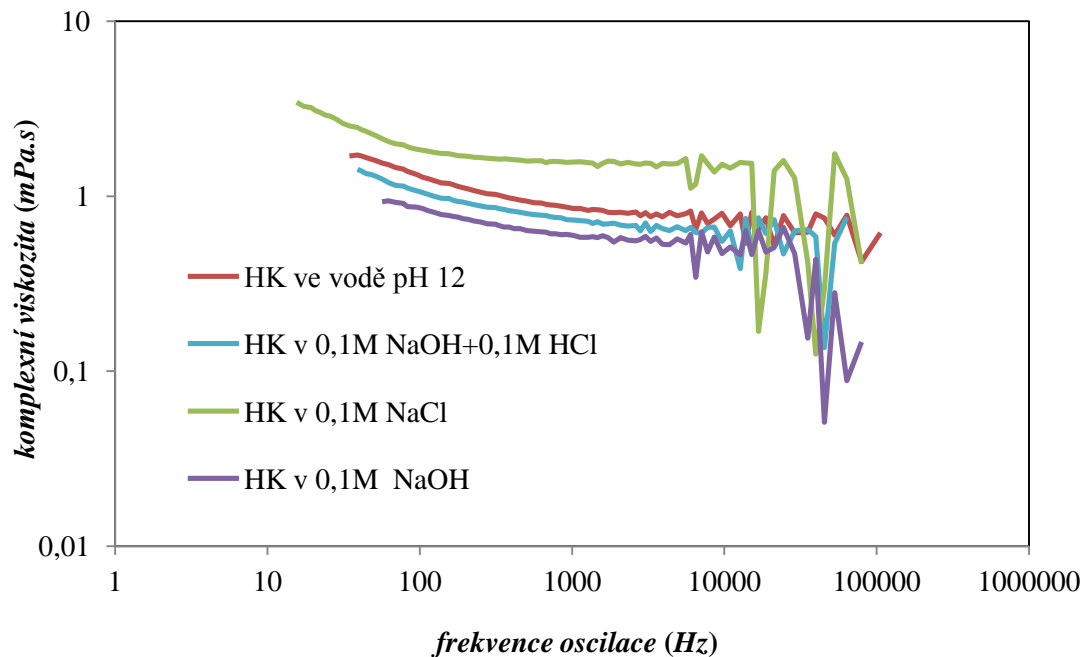


Obr. 40 Závislost komplexní viskozity na frekvenci oscilace pro koncentrační řadu HK ve vodě pH 12



Obr. 41 Závislost komplexní viskozity na frekvenci oscilace pro koncentrační řadu HK v 0,1 M NaCl

Na **Obr. 40** můžeme vidět závislost komplexní viskozity na frekvenci oscilace pro koncentrační řadu HK ve vodě pH 12. Z naměřených hodnot lze usoudit, že u vyšších koncentrací ve vzorcích dochází ke zvyšování viskozity, což znamená, že částice HK kladly polystyrenovým částicím větší odpor než v případě méně koncentrovaných vzorků, ty se pak pohybovaly po jednodušší trajektorii. Opět lze vydedukovat, že v případě vyšších koncentrací mohlo docházet k agregaci do větších celků, a ty pak bránily zmiňovaným polystyrenovým částicím v pohybu, což způsobilo nárůst viskozity. U vzorků s nižší koncentrací byly naměřené viskozity o něco nižší, avšak ne markantně. U vyšších koncentrací se vzrůstající frekvencí namáhání vzorku docházelo k poklesu viskozity, u nižších koncentrací vzorků měly hodnoty viskozity tendenci spíše být konstantní. U řady HK v 0,1 M NaCl (viz. **Obr. 41**) se s klesající koncentrací nejprve viskozita skoro neměnila (5 – 1 g/dm³), ale poté docházelo k výraznějšímu poklesu s klesající koncentrací vzorku.



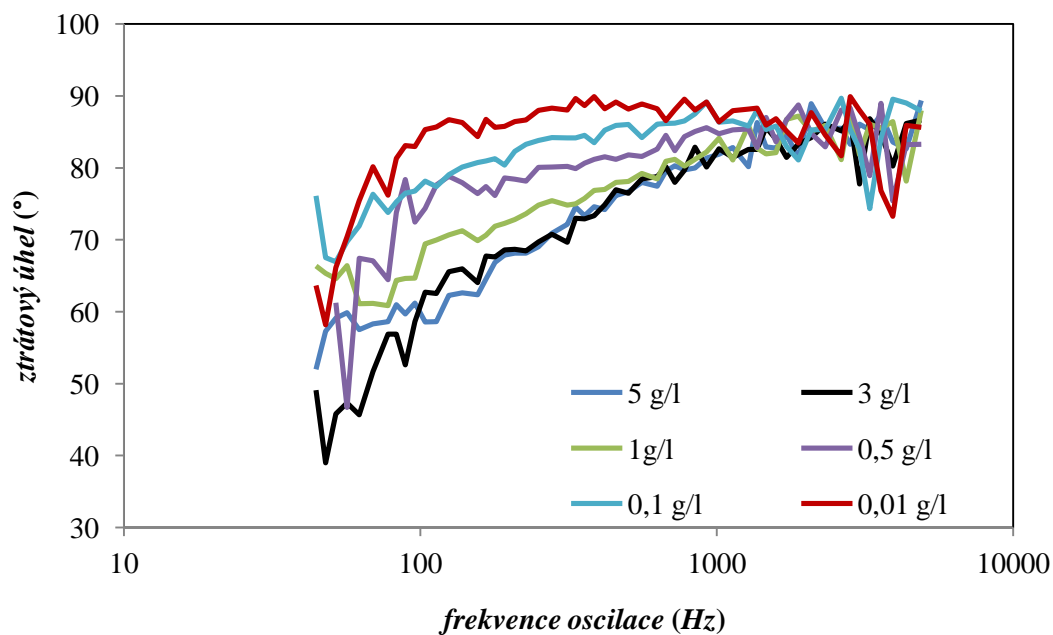
Obr. 42 Závislost komplexní viskozity na frekvenci oscilace pro všechny koncentrační řady pro vzorek 1 g/l

Po porovnání viskozit pro všechny koncentrační řady HK pro koncentraci 1 g/dm³ (viz. **Obr. 42**) bylo zjištěno, že největší viskozitu vykazovalo prostředí HK v 0,1M NaCl. Jak už zde bylo řečeno, tato koncentrační řada vykazovala značný srážecí proces, díky tomu obsažené částice větších rozměrů kladly větší odpor polystyrenovým částicím, nicméně s větší frekvencí namáhání docházelo k poklesu viskozity u všech koncentračních řad. Nicméně pro koncentraci 1 g/dm³ lze vidět, že odlišná příprava vzorků způsobila opět odlišné vlastnosti těchto roztoků.

Jeden z dalších parametrů, jež metoda mikrorologie zaznamenává je i komplexní modul pružnosti ve smyku G a ten může být rozdělen do dvou částí – elastický (paměťový) modul G' a viskózní ztrátový modul G'' . Paměťový modul je ve fázi s deformací, charakteristika ideálně elastické pevné látky, naproti tomu ztrátový modul není ve fázi s alikovanou deformací – příspěvek fluidního chování, viskózní kapalina. Vztah mezi moduly lze vyjádřit pomocí ztrátového úhlu δ :

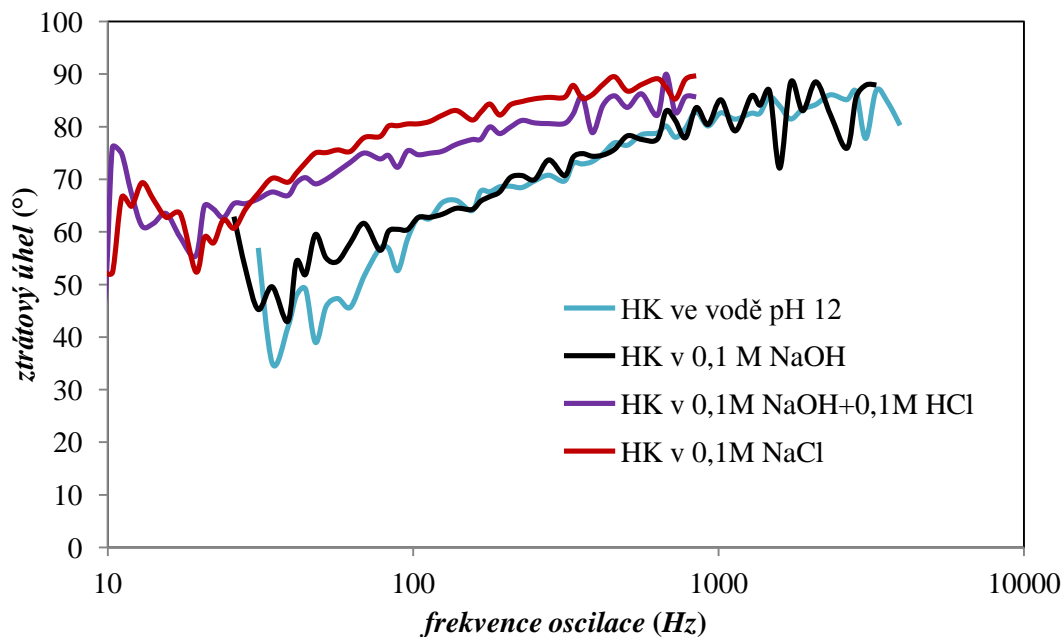
$$\tan \delta = \frac{G''}{G'} \quad (8)$$

Materiály se budou chovat jako viskózní tzv. „liquid-like“ (kapalné) při vysoké hodnotě ztrátového úhlu δ . Na druhou stranu ztrátový úhel δ menší než 1 je charakteristický pro elastické „solid-like“ (pevné) materiály. [153]

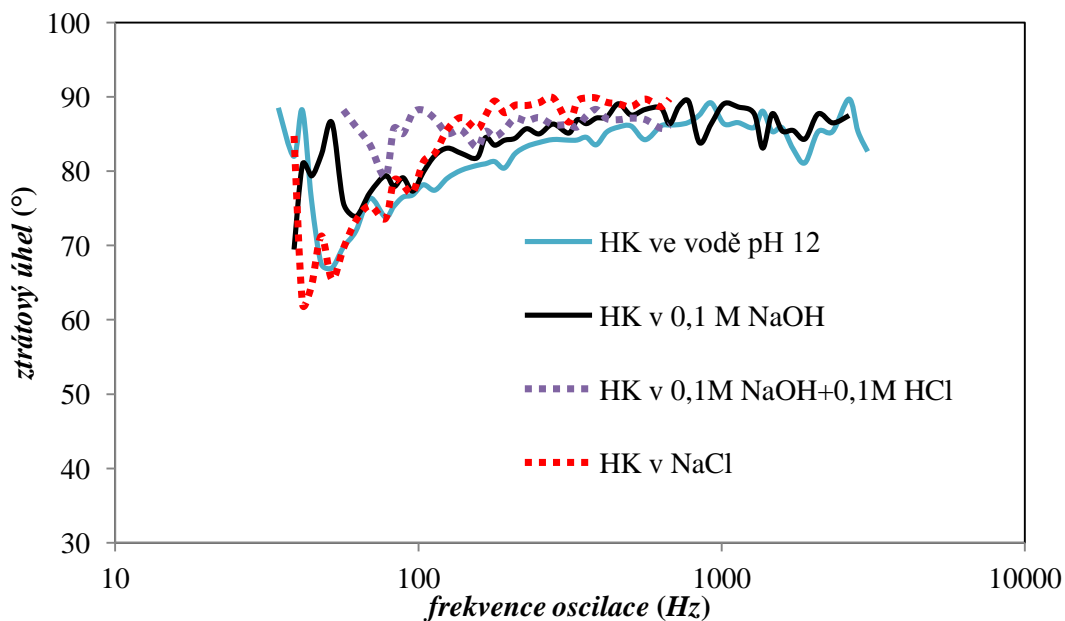


Obr. 43 Závislost ztrátového úhlu na frekvenci oscilace pro koncentrační řadu HK ve vodě pH 12

Závislost ztrátového úhlu na frekvenci oscilace pro HK ve vodě pH 12 nám ukazuje **Obr. 43**. Naměřené závislosti jsou bohužel zatíženy nežádoucím šumem, nicméně tento výstup z metody mikrorheologie jako jediný dokáže zobrazit koncentrační efekt u měřených vzorků. Obecně lze říci, že s rostoucí frekvencí namáhání vzorku dochází k růstu ztrátového úhlu, z čehož vyplývá, že převažuje viskózní modul, což znamená, že vzorek je více tekutý. Se vzrůstající se koncentrací vzorku se při nižších frekvencích namáhání posouvá hodnota ztrátového úhlu k nižším hodnotám. To znamená, že se více projevuje elastická složka, což je logické kvůli většímu množství pevných částic. Navíc hodnoty ztrátového úhlu pro všechny roztoky jsou většinou vyšší než 45° . Čím je totiž vzorek více zředěný, tím vyšší jsou hodnoty ztrátového úhlu, tedy tím méně se zde projeví elastická složka pevných částic HK. S klesající koncentrací koncentrací se pak méně mění hodnota ztrátového úhlu s rostoucí koncentrací namáhání, díky tomu, že vzorky obsahují méně pevných částic.



Obr. 44 Závislost ztrátového úhlu na frekvenci oscilace pro všechny koncentrační řady pro koncentraci 3 g/l



Obr. 45 Závislost ztrátového úhlu na frekvenci oscilace pro všechny koncentrační řady pro koncentraci 1 g/l

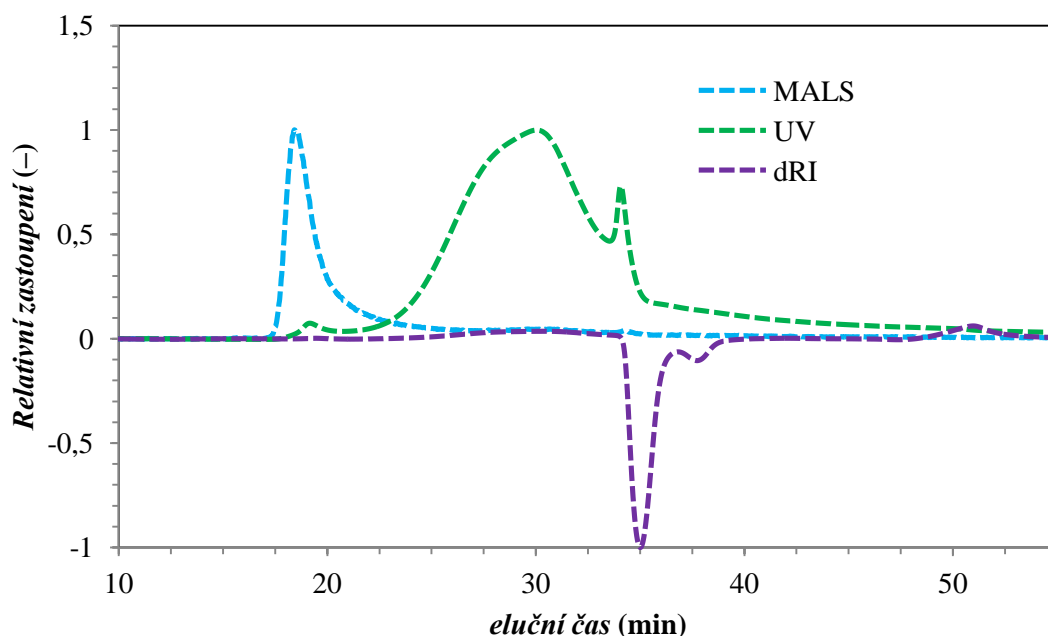
V případě vynesení závislosti ztrátového úhlu na frekvenci oscilace pro všechny koncentrační řady u vybraných hodnot koncentrací (viz. **Obr. 44 a Obr. 45**) nám výsledky ukazují, že jak v alkalickém, tak v neutrálním prostředí se hodnoty ztrátových úhlů nějak markantně neliší (hlavně u vyšší koncentrace vzorku). V neutrálním prostředí (3 g/dm^3) ztrátový úhel se vzrůstajícím namáháním vzorku vzrůstal. To znamená, že všechny vzorky byly spíše viskózního charakteru s tím, že se zvyšováním namáháním byly nejvyšší hodnoty (pro všechny řady – 3 g/dm^3) ztrátového úhlu naměřeny u řady HK v 0,1 M NaCl. V případě nižší koncentrace (1 g/dm^3) v alkalickém prostředí byly opět výsledky podobné a s větším

namáháním vzorku se stávaly spíše konstantní. V neutrálním prostředí (1 g/dm^3) u koncentrační řady v $0,1 \text{ M NaOH} + 0,1 \text{ M HCl}$ se ztrátový úhel s narůstajícím namáháním měnil jen nepatrně, kdežto u HK v $0,1 \text{ M NaCl}$ docházelo ke zvyšování hodnoty ztrátového úhlu. Vzorky HK s koncentrací (1 g/dm^3) vykazovaly větší hodnoty ztrátových úhlů, jež se neměnily tak značně jako u vyšší koncentrace. Kvůli tomu, že obsahují méně pevných částic.

Obecně výstupy z metody mikrorologie ukazovaly na to, že dochází k ať už částečné nebo úplné agregaci studovaných systémů HK, nicméně ve velké míře záleží na prostředí a koncentraci, jelikož zde panovaly rozdíly v molekulární organizaci HK.

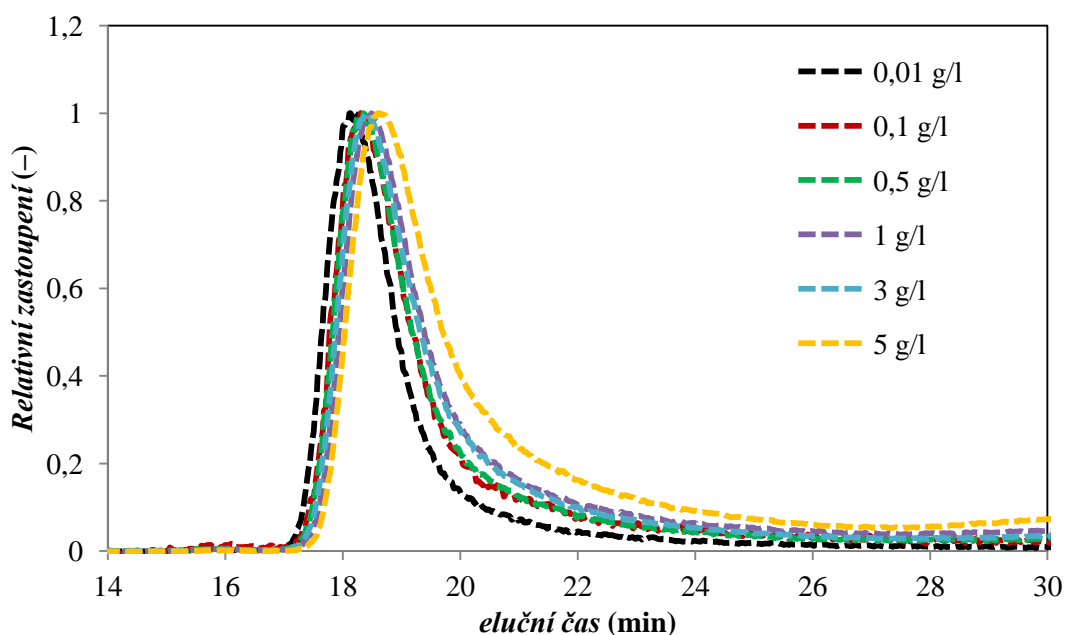
5.1.7 Gelová permeační chromatografie

Při měření vzorků pomocí gelové permeační chromatografie byly použity tři typy detektorů: UV – VIS, dRI a LS detektor (multiangle light scattering neboli MALS detektor).

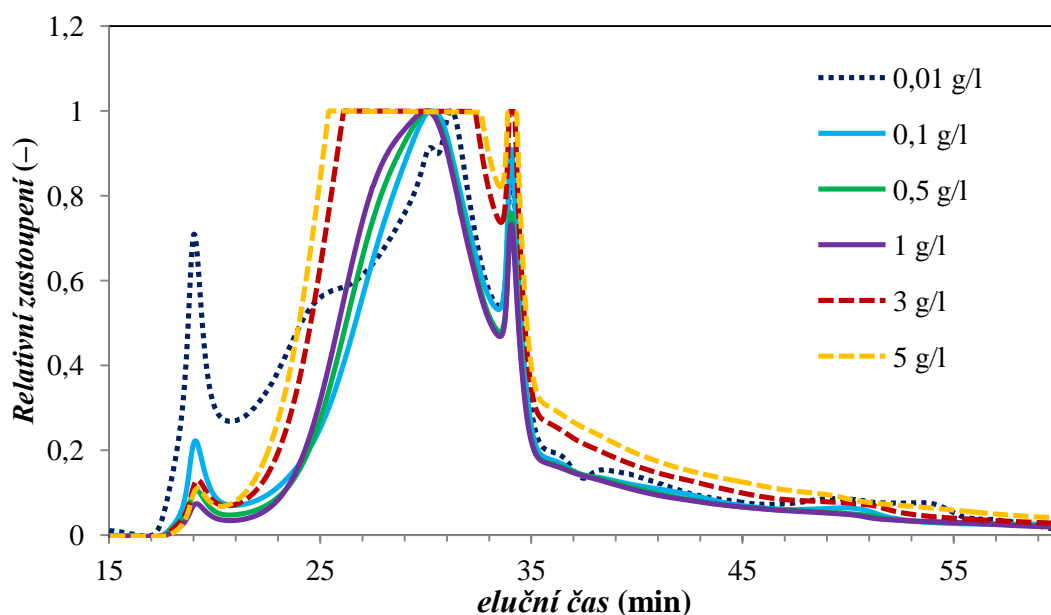


Obr. 46 Chromatogram se signály z jednotlivých detektorů pro vzorek HK ve vodě pH 12 (1 g/l)

Obr. 46 zobrazuje příklad chromatogramu se signály z jednotlivých detektorů pro řadu HK ve vodě pH 12 (konkrétně pro 1 g/dm^3), kde lze vypočítat pík v elučním čase 17 – 22 minut, který pravděpodobně odpovídá agregátům studovaných HK. V elučním čase 22 – 50 minut pak chromatogram ukazuje, že HK byly asociované do větších celků, nicméně byly přítomné i jednotlivé molekuly HK. Ve studovaném vzorku (1 g/dm^3) se agregátů vyskytovalo poměrně málo, jelikož koncentrační detektor dRI skoro nic nezaznamenal. I přes to, že jejich obsah byl nízký, však tyto částice rozptylovaly většinu z celkového množství rozptýleného světla všemi částicemi ve vzorku. Proto (i díky relativnímu měřítku) částice v rozmezí 22 – 50 minut elučního času nejsou na MALS detektoru vidět.



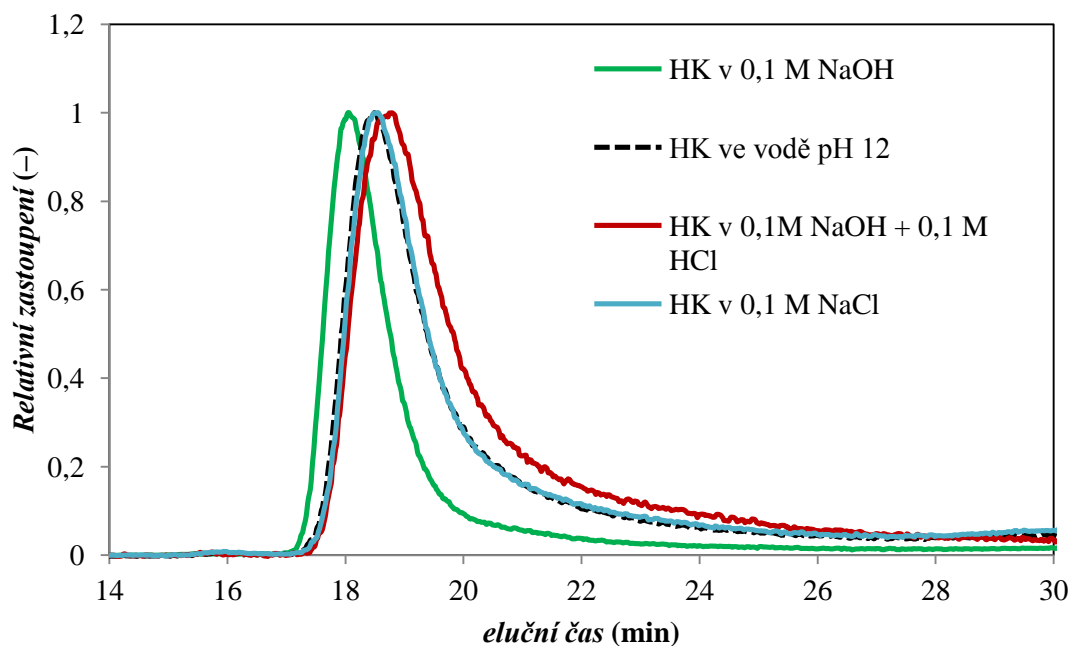
Obr. 47 Chromatogram – zobrazující koncentrační efekt pro řadu HK ve vodě pH 12 (signál z MALS detektoru)



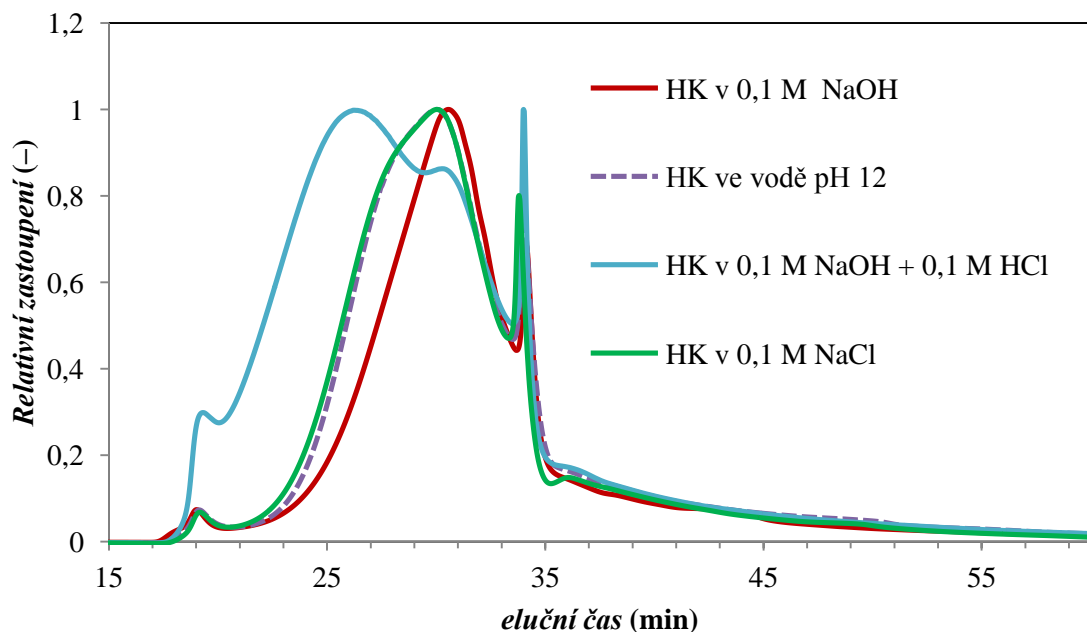
Obr. 48 Chromatogram – zobrazující koncentrační efekt pro řadu HK ve vodě pH 12 (signál z UV – VIS detektoru)

Srovnání koncentračního efektu (signál z MALS a UV – VIS detektoru) pro řadu HK ve vodě pH 12 je vyobrazeno na **Obr. 47 a 48**. První chromatogram (MALS detektor) ukazuje, že se během měření příliš nic nemění. Jelikož je na ose y relativní měřítko, hodnoty jsou vždy vztažené k celkové hodnotě rozptýleného světla, nicméně pozice píků jsou naprosto stejné. Opět se zde vyskytují zřejmě agregáty HK v elučním čase 17–21 minut, poté supramolekulární asociáty a jednotlivé molekuly HK v elučním čase 22–50 minut. Bohužel vzhledem k relativnímu měřítku, agregáty HK zastíní obrovskou intenzitou rozptýleného

světla menší molekuly a dále nejsme schopni nic zaznamenat. Avšak na UV – VIS a dRI detektoru lze vidět neagregované HK při vyšších koncentracích. Od vzorku 3 g/dm³ vzhledem k vysoké koncentraci nebylo možné zaznamenat celý UV – VIS chromatogram, jelikož bylo měření nad detekčním limitem detektoru.



Obr. 49 Chromatogram – srovnání jednotlivých koncentračních řad pro vybraný vzorek 1 g/l (signál z MALS detektoru)



Obr. 50 Chromatogram – srovnání jednotlivých koncentračních řad pro vybraný vzorek 1 g/l (signál z UV – VIS detektoru)

Pro posouzení vlivu prostředí, kde se HK nacházejí, na molekulární organizaci byly srovnány chromatogramy pro vybraný vzorek HK ve vodě pH 12 pro 1 g/dm³ viz. **Obr. 49 a 50**. Výsledky ukazují, že jak pro alkalické, tak pro neutrální prostředí odlišná

příprava vzorků způsobila konformační změny ve struktuře HK. Signál z MALS detektoru byl opět poměrně nedostačující v důsledku přítomnosti agregátů, jež zastínily menší částice. Nicméně porovnání se signálem z UV – VIS detektoru ukázalo, že opět se ve vzorku nenachází těchto agregátů velké množství. Následují supramolekulární asociace a jednotlivé molekuly HK v elučním čase 20 – 50 minut. Z výsledků vyplývá, že v neutrálním prostředí řada HK v 0,1 M NaOH + 0,1 M HCl obsahovala více supramolekulárních asociací a jednotlivých molekul než tomu bylo v neutrálním prostředí HK v 0,1 M NaCl, kde byly částice sražené do větších celků. Naměřené chromatogramy vypadají podobně, což souvisí s tím, že HK v 0,1 M NaCl byly více zagregované, a podstatná část těch agregátů byla odfiltrována, to co vidíme, jsou jen ty neagregované HK. V alkalickém prostředí nebyl rozdíl v molekulární organizaci HK příliš velký. Obecně při měření metodou gelové permeační chromatografie u nižších koncentrací byl signál z jednotlivých detektorů slabší (především u koncentrační řady HK v 0,1 M NaCl), jelikož zde mohla být poměrně nízká koncentrace studovaných HK z důsledku filtrace vzorku před měřením stříkačkovým filtrem (0,45 μm).

Stanovení molekulové hmotnosti HK

Pomocí gelové permeační chromatografie lze zjistit molekulové hmotnosti studovaných systémů. U složitých systémů HK nejsme schopni přesně charakterizovat jejich molekulové hmotnosti, nicméně v rámci této diplomové práce byla snaha alespoň vyzorovat jejich průměrné molekulové hmotnosti, konkrétně to, jak se mění v různých prostředích, kde byly HK rozpuštěné. Výsledky jsou uvedené v **Tab. 8**.

Tab. 8 Průměrné molekulové hmotnosti HK

Vzorek	1. Pík – Mr (Da)	2. Pík – Mr (Da)
HK ve vodě pH 12	31 470	3 093
HK v 0,1 M NaOH	41 907	3 243
HK v 0,1 M NaOH + 0,1 M HCl	31 508	5 971
HK v 0,1 M NaCl	19 021	7 073

Vyšší hodnoty průměrných molekulových hmotností u všech koncentračních řad (1. pík) odpovídají pravděpodobně agregátům HK, kdežto ty nižší (2. pík) zase supramolekulárním asociacím a jednotlivým molekulám HK. Nejvyšší hodnoty průměrných molekulových hmotností agregátů (1. pík) byly naměřeny u koncentrační řady HK v 0,1 M NaOH, naopak nejnižší u HK v 0,1 M NaCl, což je způsobeno opět tím, že podstatná část agregátů byla odfiltrována při přípravě vzorku pro měření (0,45 μm stříkačkový filtr). Logicky vzato by měly být hodnoty nejvyšší právě u této řady, což naznačují i hodnoty druhého píku, kde se průměrné molekulové hmotnosti posouvají směrem k větším částicím.

Pík odpovídající supramolekulárním asociátům a jednotlivým molekulám HK měl nejvyšší stanovenou hodnotu v řadě HK v 0,1 M NaCl, nejnižší však v případě HK ve vodě pH 12. Je

zřejmé, že vyšší obsah nízkomolekulárních iontů způsobil posun v průměrné molekulové hmotnosti stanovené pro druhý pík, což naznačuje, že kdyby nebyla provedena filtrace při přípravě vzorku pro měření, tak by pravděpodobně byly hodnoty průměrných molekulových hmotností stanovené pro první pík v případě koncentračních řad HK v 0,1 M NaOH + 0,1 M HCl a HK v 0,1 M NaCl vyšší. Nicméně naměřené hodnoty jsou opravdu pouze přibližné vzhledem ke komplikovanosti charakterizace struktury systémů HK.

5.1.8 Frakcionace HK

Jak už zde bylo zmíněno několikrát, HK mají složitou strukturu, proto by frakcionace mohla pomoci separovat tyto látky na menší frakce, jež by bylo možné snáze charakterizovat. Byla vybrána frakcionizační metoda postupné frakcionizace podle pH pufru, která prokázala, že rozpustnost HK při velmi nízkém pH (pH 2 – frakce 1) je poměrně malá. Nejvíce HK bylo získáno při pH 4 (frakce 2), 6 (frakce 3), 8 (frakce 4). U vyšších pH (10, 12) se výtěžek opět snižoval. Nejvíce alkalické prostředí pH 12 (frakce 6) prokázalo kupodivu poněkud malou schopnost rozpouštět huminové kyseliny. U rozpuštěných frakcí 2, 4 došlo po 48 hodinách protřepávání k poklesu pH, u ostatních frakcí tomu bylo přesně naopak (viz. **Tab. 9**)

Tab. 9 Výsledky potenciometrického stanovení pH

Frakce	pH před frakcionací (–)	pH po frakcionaci (–)
1	2,25	2,27
2	4,14	3,63
3	6,75	6,82
4	8,13	7,18
5	9,88	9,98
6	12,21	12,38

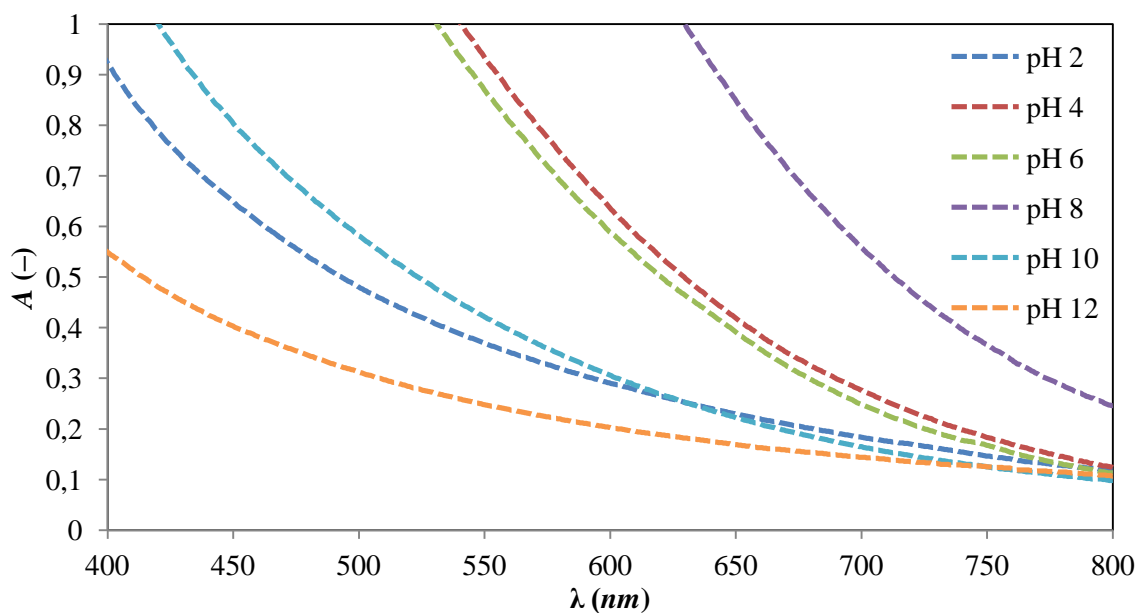
UV – VIS spektrometrie

Rozpuštěné frakce HK byly postupně charakterizovány za pomoci UV – VIS spektrometrie, kde byly získány především hodnoty absorbancí důležitých vlnových délek 280, 465 a 665 nm. Poměr A_{465}/A_{665} (označován také jako E_4/E_6) je tzv. humifikační index. Humifikační index nám poskytne informaci o poměru mezi ligninovými strukturami odolnými vůči humifikaci a množstvím „mladých“ HK (v prvním stupni humifikace) viz. kapitola 5.1.3. Absorpční poměr $A(280\text{ nm})/A(465\text{ nm})$ udává poměr mezi lignitovými strukturami odolnými vůči humifikaci a množstvím lignitu. [154]

Tab. 10 Průměrné hodnoty humifikačních indexů a absorpčního poměru $A_{280/465}$ pro všechny pH

Frakce HK	Popis frakce HK	$A_{465/665}$ (-)	$A_{280/465}$ (-)
1	pH 2	2,76	5,22
2	pH 4	2,14	13,26
3	pH 6	2,10	28,10
4	pH 8	2,33	6,63
5	pH 10	3,59	14,47
6	pH 12	2,33	7,52

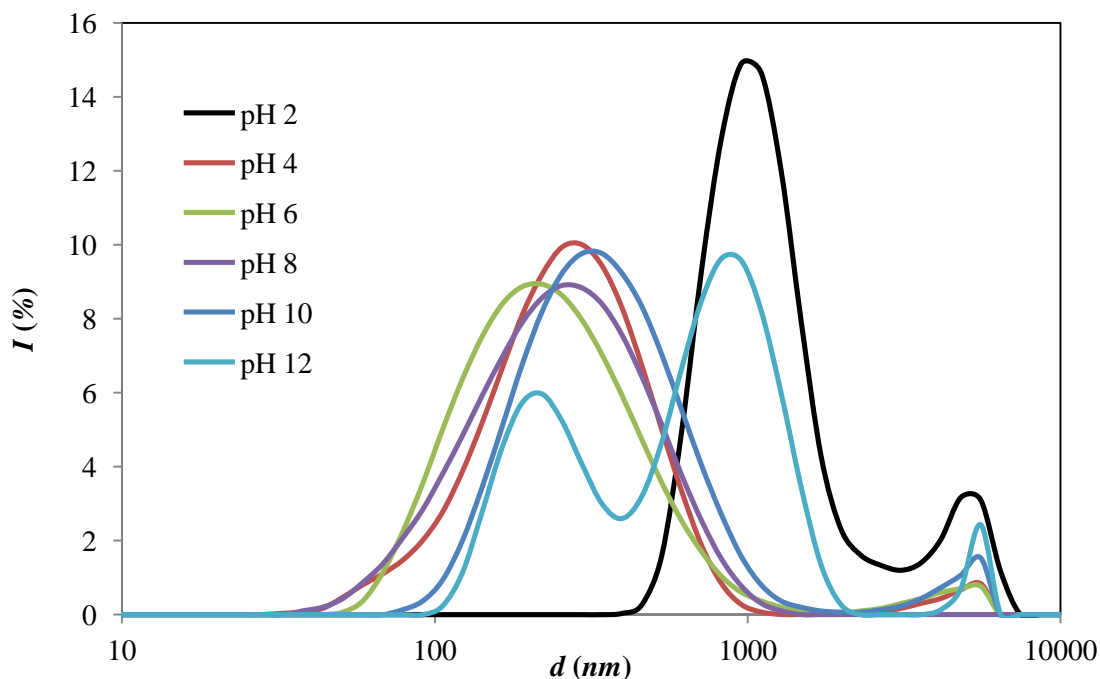
Humifikační indexy jednotlivých frakcí se liší pouze nepatrně až na frakci 5, kde je hodnota humifikačního indexu poměrně vyšší. Obecně hodnoty humifikačních indexů ukazují, že se ve struktuře HK nalézalo množství aromatických struktur. Důvodem vyššího humifikačního indexu pro frakci 5 může být, že při pH 10 se struktura HK změnila, mohlo např. dojít k rozpadu části některých agregátů. Naměřená UV – VIS spektra zaznamenaly posun k vyšším absorbancím u frakcí 2, 3, 5, což je logické, jelikož tyto vzorky byly nejtmavší vzhledem k tomu, že se zde HK rozpouštěly nejvíce. U dalších frakcí byly naměřené absorpance nižší.



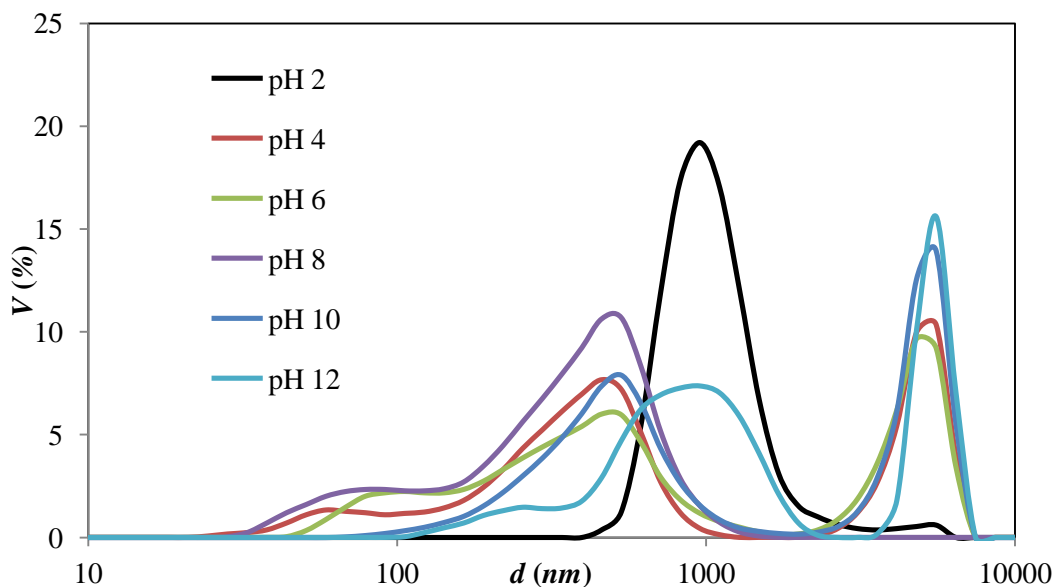
Obr. 51 UV – VIS spektra jednotlivých frakcí HK

Dynamický rozptyl světla

Metoda dynamického rozptylu světla nám poskytla zajímavé informace o konformaci jednotlivých frakcí v roztoku, výsledky můžeme vidět na **Obr. 52 a 53** níže. Opět nebyly vzorky pro měření filtrovány, jelikož neobsahovaly viditelné sraženiny HK.



Obr. 52 Závislost intenzity rozptýleného světla částicemi jednotlivých frakcí HK



Obr. 53 Objemová distribuce velikosti částic pro jednotlivé frakce HK

Dle naměřených distribucí velikostí částic, HK při hodně nízkém pH mají tendenci se vysrážet z roztoku v podobě agregátů o velikosti přibližně okolo $1 \mu\text{m}$. Ve vzorku se patrně nacházejí částice ještě větších rozměrů, ale bohužel jsou pravděpodobně opět nad detekčním limitem přístroje. Se vzrůstajícím pH dochází k tomu, že HK tvoří jednotky o velikosti 400 – 500 nm, což odpovídá supramolekulárním micelám, nicméně i částice o několik μm velikosti se v roztoku také nacházejí, avšak ne v příliš velkém zastoupení. V alkalickém pH docházelo opět k nárůstu velikostí částic díky tomu, že HK mají tendenci své řetězce protahovat (viz. **Obr. 9**)

Elektroforetický rozptyl světla

Abychom zjistili, zda jsou jednotlivé frakce HK stabilní či ne, byla použita opět technika elektroforetického rozptylu světla.

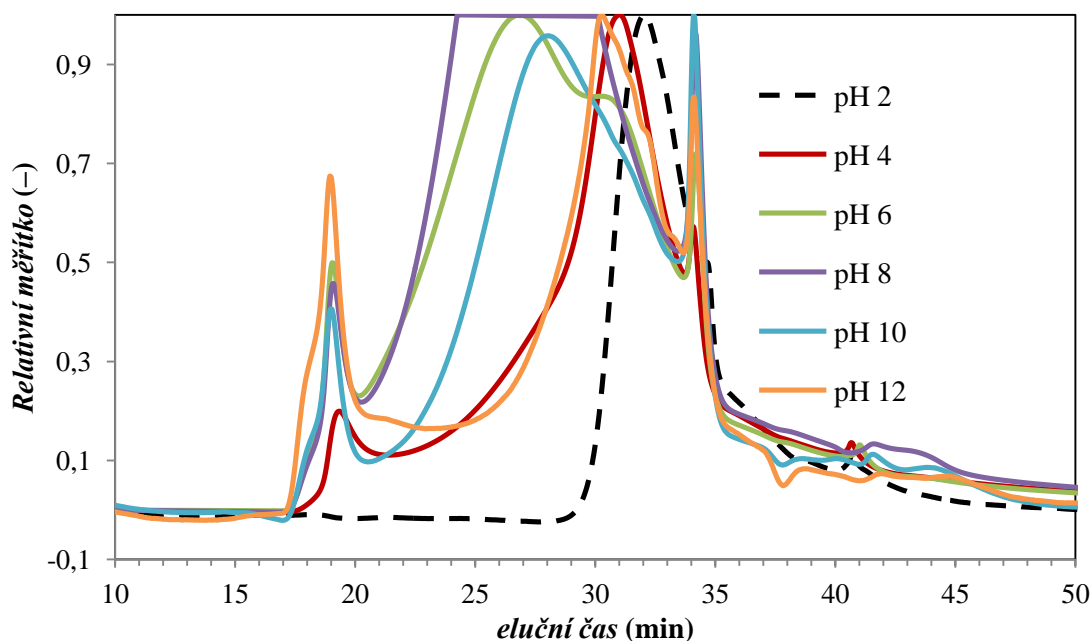
Tab. 11 Naměřené hodnoty zeta potenciálů pro všechny frakce s odchylkami měření

Frakce	Zeta potenciál (mV)	Odchylka
1	-14,47	2,61
2	-15,30	1,57
3	-16,13	1,05
4	0,24	0,13
5	-33,43	1,41
6	-40,57	1,79

Naměřené hodnoty zeta potenciálů (viz. **Tab. 11**) vypovídají o tom, že až na pH 10 a 12 byly vzorky poměrně nestabilní. V případě frakce 4 nebylo možné zeta potenciál ani vůbec naměřit, jelikož byl vzorek až příliš tmavý na to, aby ho laser prosvítil. Nepodařilo se to ani za použití odlišné DSC 700 cely. V různých hodnotách pH se konformace HK neustále měnily. Tím, že se nacházely nejdříve v pH kyselém, se začaly srážet do větších celků, což způsobilo destabilizaci původní struktury. Se zvyšováním pH (neutrální oblast) se HK začaly v prostředí nejenom více rozpouštět, ale i jejich konformace se změnila tím, že měly tendenci alespoň z části zjednodušit svou strukturu. V alkalickém pH však opět změnily svou molekulární organizaci, což zřejmě v tomto případě zapříčinilo stabilizaci struktury HK.

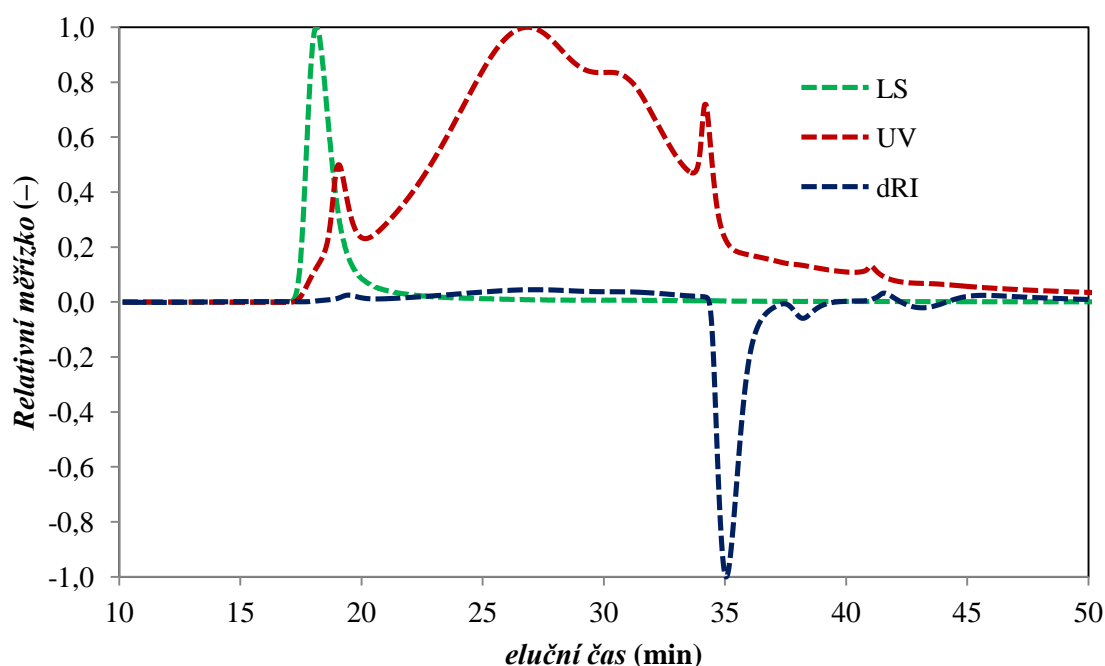
Gelová permeační chromatografie

Při měření vzorků pomocí gelové permeační chromatografie byly použity tři typy detektorů, nicméně, jak zde bylo řečeno, např. signál z MALS detektoru byl někdy až příliš slabý, proto byly vybrány data naměřené pomocí UV – VIS detektoru viz. **Obr. 54**.



Obr. 54 Chromatogram jednotlivých frakcí HK – výstup z UV – VIS detektoru

Chromatogram jednotlivých frakcí HK naznačuje, že v případě frakce 1 (pH 2) částice HK značně zagregovaly. Vzniklé agregáty se při přípravě vzorku na měření odfiltrovaly a právě proto zde chybí všechny částice, které mají eluční čas pod 30 minut. Což nám dokázal i signál z MALS detektoru, kde byly výsledky výrazně zatíženy nežádoucím šumem, nebyl detekován téměř žádný rozptyl světla od částic z tohoto vzorku. Jelikož byly částice poměrně velké, tak v relativním měřítku dochází k zakrytí rozptylu ostatních částic, proto v oblasti 20 – 35 min elučního času nebylo (v případě MALS detektoru) skoro nic vidět. Co se týče další frakcí tak lze usoudit, že s rostoucím pH (od pH 4 a výše) jsou chromatogramy poměrně podobné. První pík v oblasti elučních časů 17 – 20 minut odpovídá velkým agregátům. Další pík odpovídá normálním (nezagregovaným) HK a částečně asociovaným molekulám, proto je tak široký. Každopádně v neutrální oblasti pH dochází k asociaci do micel nejvíce, jelikož absorbance roste v oblasti 20 – 25 minut elučního času. Dále s rostoucím pH v téhle oblasti klesá absorbance, ale postupně roste pík velkých agregátů mezi 17 – 20 minutami, takže pravděpodobně vzniklé asociáty se postupně ještě víc shlukují a přechází na ještě větší shluky, případně se rozpadají na jednodušší molekuly s nižší molekulovou hmotností (roste totiž intenzita píků v oblasti elučních časů 27 – 35 minut). V případě frakce (pH 8) byla velká koncentrace nad detekčním limitem UV – VIS detektoru, proto je pík neúplný. U ostatních detektorů byl signál velmi podobný.



Obr. 55 Chromatogram se signály z jednotlivých detektorů frakce 3 (pH 6)

Ukázka celého záznamu z chromatogramu se signály z jednotlivých detektorů pro frakci 3 (pH 6) je znázorněn na **Obr. 55**. Výsledky naznačují, že nejprve se vylučovaly kolonou velké agregáty částic, které mají v případě UV – VIS detektoru poměrně úzký pík. Není jich však moc, což naznačuje malý dRI signál (koncentrační detektor). Avšak tím, že jsou částice velké, tak rozptylují obrovské množství světla, což zobrazuje signál z MALS detektoru. Dále se vylučuje velký pík nejprve asociátů molekul, které postupně v distribuci splývají s jednotlivými molekulami (eluční čas od 20 skoro do 45 min.). Tyto částice absorbují poměrně výrazně, ale tím, že jsou tak malé oproti velkým agregátům, tak se na MALS skoro neprojevují.

Tab. 12 Naměřené hodnoty průměrných molekulových hmotností a gyračních poloměrů pro jednotlivé frakce HK (první pík)

Frakce	Mr (Da)	Odchylka měření (%)	Gyrační poloměr (nm)	Odchylka měření (%)
1	1 249	5,2	48,0	9,7
2	7 967	0,6	47,4	1,1
3	24 708	0,8	52,6	1,1
4	25 575	0,8	55,4	1,0
5	24 511	0,8	67,0	0,9
6	21 964	0,8	48,8	1,3

Tab. 13 Naměřené hodnoty průměrných molekulových hmotností a gyračních poloměrů pro jednotlivé frakce HK (druhý pík)

Frakce	Mr (Da)	Odchylka měření (%)	Gyrační poloměr (nm)	Odchylka měření (%)
1	861	15,6	69,5	24,3
2	4 310	0,9	49,3	1,9
3	2 311	2,8	60,9	4,2
4	2 820	2,9	63,1	5,9
5	4 640	3,1	65,5	5,3
6	5 570	4,2	70,4	7,3

O tom, že částice ve frakci 1 (pH 2) byly značně zagregované, byly odfiltrovány při přípravě vzorků pro měření, a tím pádem měly vzorky nízkou koncentraci HK, svědčí i výsledky středních molekulových hmotností a gyračních poloměrů uvedených v **Tab. 12** a **Tab. 13**. Platí to obzvláště pro **Tab. 12**, jež zobrazuje naměřené hodnoty pro první pík chromatogramu. Obecně výstupy z gelové permeační chromatografie poskytují cenné výsledky o distribuci částic HK a dávají do vzdájemného vztahu velikost částic, jejich molekulovou hmotnost a koncentraci, a to vše v závislosti na použitém prostředí. Pouze v případě HK v NaCl jsou data z GPC zatíženy poměrně velkou chybou, jelikož bylo nutné při přípravě vzorku na měření provést filtraci přes stříkačkový filtr o velikosti 0,45 μm , takže velká část částic byla odfiltrována.

6 ZÁVĚR

Cílem této diplomové práce bylo souborem několika analytických metod prostudovat změny konformace a molekulární organizace huminových kyselin v závislosti na jejich koncentraci a způsobu a podmínkách přípravy jejich roztoků. Práce volně navazuje na předchozí bakalářskou práci s tím, že zde byly použity IHSS HK Leonardite standard.

Výsledky potenciometrického měření pH vykazují přibližně konstantní hodnoty u všech prostředí, avšak u koncentrační řady HK v neutrálním prostředí (HK v 0,1 M NaOH + 0,1 M HCl) docházelo k mírnému exponenciálnímu poklesu se zvyšující se koncentrací.

Metoda přímé konduktometrie poskytla poněkud rozpolupné výsledky, nicméně u HK v neutrálním prostředí byly hodnoty poměrně konstantní, avšak u řady HK v 0,1 M NaCl docházelo k poklesu se zvyšující se koncentrací, což docházelo i v alkalickém prostředí v případě HK v 0,1 M NaOH. Koncentrační řada HK ve vodě pH upravené na 12 nepodléhala žádnému trendu, což mohlo být způsobeno odlišnou přípravou.

Z naměřených UV – VIS spekter byly odečteny hodnoty absorbance při 465 nm (E_4) a 665 nm (E_6). Následně byl vypočítán, což je poměr A_{465}/A_{665} , označován také jako tzv. humifikační index. Obecně hodnoty humifikačních indexů v případě vysokých koncentrací byly nižší, což znamená, že se ve struktuře HK nalézalo množství aromatických struktur, se snižující koncentrací se však hodnoty měnily na vyšší.

Pro studium distribuce velikosti částic v jednotlivých vzorcích byla použita neinvazivní nedestruktivní metoda dynamického rozptylu světla. Intenzitní distribuce velikosti částic ukazuje, že v největším množství rozptylují částice s velikostí v rozmezí 300 – 500 nm, což odpovídá supramolekulárním micelám HK, jelikož jednotlivé struktury HK jsou převážně o velikosti do 100 nm, nicméně částice o velikosti několik mikronů se v roztoku HK nacházejí také, avšak v poměrně malém množství. Větší částice o několika mikronů pravděpodobně vznikly asociací více menších stavebních jednotek, či micel HK do agregátů. Nutné je taky vzít v úvahu, že v roztocích jednotlivých koncentračních řad se mohou vyskytovat částice ještě daleko větší než ty, které nám ukazují naměřené distribuce, ale metoda dynamického rozptylu světla bohužel není schopná je zaznamenat, jelikož větší částice již nepodléhají Brownovu pohybu. Koncentrační řada HK v 0,1 M NaCl vykazovala úplně odlišné chování než v případě ostatních prostředí, což způsobuje její způsob přípravy. Přídavek 0,1 M NaCl zvýšil iontovou sílu roztoků natolik, že HK se v tomto prostředí měly tendenci úplně agregovat do větších celků (micel). Získané výsledky jsou v souladu se supramolekulárním, micelárním konceptem.

Technologie elektroforetického rozptylu světla byla použita k charakterzaci povrchového náboje huminových kyselin, naměřením hodnoty zeta potenciálu lze snadno zjistit, jestli je systém v daném roztoku stabilní či ne. V případě řad IHSS HK v neutrálním prostředí obecně docházelo k destabilizaci systému, nicméně se zmenšující se koncentrací se jejich stabilita nepatrně zvyšovala. Naproti tomu koncentrační řady IHSS HK v alkalickém prostředí se jevíly poměrně stabilní. V porovnání s HK v bakalářské práci byly absolutní hodnoty zeta potenciálu v neutrálním prostředí poměrně nižší, kdežto u HK v alkalickém prostředí byly vyšší.

Pomocí metody mikroreologie jsme schopni zjistit, zda je zkoumaná látka viskózní či viskoelastické povahy. Po porovnání viskozit pro všechny koncentrační řady HK bylo zjištěno, že největší viskozitu vykazovalo prostředí HK v 0,1M NaCl. Jak už zde bylo řečeno, tato koncentrační řada vykazovala značný srážecí proces, díky tomu obsažené částice větších rozměrů kladly větší odpor polystyrenovým částicím, nicméně s větší frekvencí namáhání docházelo k poklesu viskozity u všech koncentračních řad. Obecně výstupy z metody mikroreologie ukazovaly na to, že dochází k ať už částečné nebo úplné agregaci studovaných systémů HK, nicméně ve velké míře záleží na prostředí a koncentraci, jelikož zde panovaly rozdíly v molekulární organizaci HK.

Další metodou použitou pro charakterizaci systémů HK byla gelová permeační chromatografie, kde byly porovnávány signály ze tří typů detektorů (MALS, UV – VIS, dRI). Při měření koncentrovanějších vzorků (od 3 g/dm³) bohužel nastal problém s detekčním limitem, avšak obecně jako první většinou procházely eluční kolonou větší agregáty, poté následovaly supramolekulární asociace a jednotlivé molekuly HK. Srovnáním koncentračního efektu (signál z MALS a UV – VIS detektoru) bylo zjištěno, že zmíněných agregátů se ve vzorcích nacházelo poměrně málo. Dále byl posouzen vliv prostředí na molekulární organizaci HK. Výsledky ukazují, že jak pro alkalické, tak pro neutrální prostředí opět odlišná příprava vzorků způsobila konformační změny ve struktuře HK. V neutrálním prostředí řada HK v 0,1 M NaOH + 0,1 M HCl obsahovala více supramolekulárních asociací a jednotlivých molekul než tomu bylo v neutrálním prostředí HK v 0,1 M NaCl, kde byly částice sražené do větších celků. V alkalickém prostředí nebyl rozdíl v molekulární organizaci HK příliš velký. V neposlední řadě byly stanoveny přibližné průměrné molekulové hmotnosti HK, kde vyšší hodnoty průměrných molekulových hmotností u všech koncentračních řad (1. pík) odpovídají pravděpodobně agregátům HK, kdežto ty nižší (2. pík) zase supramolekulárním asociacím a jednotlivým molekulám HK. Obecně při měření metodou gelové permeační chromatografie u nižších koncentrací byl signál z jednotlivých detektorů slabší (především u koncentrační řady HK v 0,1 M NaCl), jelikož zde mohla být poměrně nízká koncentrace studovaných HK z důsledku filtrace vzorku před měřením stříkačkovým filtrem (0,45 μm).

Poslední metodou využitou pro studium IHSS HK byla frakcionace, protože, jak už zde bylo zmíněno několikrát, HK mají složitou strukturu, z tohoto důvodu by frakcionace mohla pomoci separovat tyto látky na menší frakce, jež by bylo možné snáze charakterizovat. Byla vybrána frakcionizační metoda postupné frakcionizace podle pH pufru, která prokázala, že nejvíce HK bylo získáno při pH 4 (frakce 2), 6 (frakce 3), 8 (frakce 4). Rozpuštěné frakce HK byly postupně charakterizovány za pomoci UV – VIS spektrometrie, kde byly získány především hodnoty absorbcí důležitých vlnových délek 280, 465 a 665 nm. Poměr A_{465}/A_{665} (označován také jako E_4/E_6) je tzv. humifikační index. Obecně hodnoty humifikačních indexů ukazují, že se ve struktuře HK nalézalo množství aromatických struktur. Metoda dynamického rozptylu světla nám poskytla zajímavé informace o konformaci jednotlivých frakcí v roztoku. HK při hodně nízkém pH mají tendenci se vysrážet z roztoku v podobě agregátů o velikosti přibližně okolo 1 μm. se vzrůstajícím pH dochází k tomu, že HK tvoří jednotky o velikosti 400 – 500 nm, což odpovídá supramolekulárním micelám, nicméně i částice o několik μm velikosti se v roztoku také nacházejí, avšak ne v příliš velkém

zastoupení. V alkalickém pH docházelo opět k nárůstu velikostí částic díky tomu, že HK mají tendenci své řetězce protahovat. Měřením zeta potenciálu HK bylo zjištěno, že v různých hodnotách pH se konformace HK neustále měnily. Tím, že se nacházely nejdříve v pH kyselém, se začaly srážet do větších celků, což způsobilo destabilizaci původní struktury. Se zvyšováním pH (neutrální oblast) se HK začaly v prostředí nejenom více rozpouštět, ale i jejich konformace se změnila tím, že měly tendenci alespoň z části zjednodušit svou strukturu. V alkalickém pH však opět změnilly svou molekulární organizaci, což zřejmě v tomto případě zapříčinilo stabilizaci struktury HK. Při měření vzorků pomocí gelové permeační chromatografie byly použity tři typy detektorů, nicméně, jak zde bylo řečeno, např. signál z MALS detektoru byl někdy až příliš slabý, proto byly vybrány data naměřené pomocí UV – VIS detektoru. V případě frakce pH 2, HK značně zagregovaly. Co se týče další frakcí tak lze usoudit, že s rostoucím pH (od pH 4 a výše) jsou chromatogramy poměrně podobné. První pík v oblasti elučních časů 17 – 20 minut odpovídá velkým agregátům. Další pík odpovídá normálním (nezagregovaným) HK a částečně asociovaným molekulám, proto je tak široký. Každopádně v neutrální oblasti pH dochází k asociaci do micel nejvíce, jelikož absorbance roste v oblasti 20 – 25 minut elučního času. Dále s rostoucím pH v téhle oblasti klesá absorbance, ale postupně roste pík velkých agregátů mezi 17 – 20 minutami, resp. se zvýrazňuje pík v oblasti vyšších elučních časů (27 – 35 minut). Z toho lze usoudit, že pravděpodobně dochází jednak k částečné agregaci supramolekulární asociovaných molekul HK (zvýšení intenzity píku agregátů v chromatogramu v oblasti 17 – 20 minut), a rovněž část z těchto asociátů se rovněž rozpadá. To má za následek částečné zjednodušení struktury HK spojené se zmenšením velikosti jejich částic (pozdější eluce z kolony). V případě frakce (pH 8) byla velká koncentrace nad detekčním limitem UV – VIS detektoru, proto je pík neúplný.

Souborem několika analytických metod byly prozkoumány vzorky IHSS HK a v souhrnu lze říci, že studované systémy vykazují supramolekulární chování a v některých případech podléhají agregaci do větších celků (micel). Vše je ovlivněno koncentračními poměry, prostředím a způsobem přípravy těchto složitých systémů HK. Nicméně výsledky pořád nejsou dostačující, a je proto nutné další prošetření této problematiky.

7 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- [1] XIAOLI, CH., SHIMAOKA, T., QIANG, G., YOUCAI, Z. Characterization of humic and fulvic acids extracted from landfill by elemental composition, ^{13}C CP/MAS NMR and TMAH-Py-GC/MS. *Waste Management*, 2008, vol. 28, no. 5, s. 896-903. DOI: 10.1016/j.wasman.2007.02.004.
- [2] NOVÁK, F., HRABAL R. Kvantitativní ^{13}C NMR Spektroskopie Huminových látek. *Chemické listy* [online]. 2011, vol. 105, [cit. 2016-02-17]. Dostupné z: http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2011_10_752-760.pdf
- [3] STEINBERG, C. E. W., KAMARA S., PROKHOTSKAYA V. Y., MANUSADZIANAS L., T. KARASYOVA A., TIMOFEYEV M. A., JIE Z., PAUL A., MEINELT T., FARJALLA V. F., MATSUO A. Y. O., BURNISON B. K., and MENZEL R. Dissolved humic substances - ecological driving forces from the individual to the ecosystem level? *Freshwater Biology*, 2006, vol. 51, s. 1189-1210.
- [4] LEHMANN, J., KLEBER M. The contentious nature of soil organic matter. *Nature* [online]. 2015, [cit. 2016-02-01]. DOI: 10.1038/nature16069.
- [5] Western University. What is Lignin? <Http://www.lignoworks.ca/> [online]. 2016 [cit. 2016-01-27]. Dostupné z: <http://www.lignoworks.ca/content/what-lignin>
- [6] ČECHLOVSKÁ, H., KISLINGER J., PEKAŘ M. a KUČEŘÍK J. Kinetika degradace frakcí huminových kyselin ve vztahu k jejich biologické dostupnosti. In: *7th Workshop of Physical Chemists and Electrochemist*. Brno: Masarykova univerzita, 2007, s. 25-26. ISBN 978-80-210-4235-3.
- [7] PICCOLO, A. The supramolecular structure of humic substances. *Soil Sci.*, 2001, vol. 166, s. 810-832.
- [8] MUSCOLO, A., SIDARI M. a NARDI S. Humic substance: Relationship between structure and activity. Deeper information suggests univocal findings. *Journal of Geochemical Exploration*, 2013, vol. 129, s. 57-63. DOI: 10.1016/j.gexplo.2012.10.012.
- [9] STEVENSON, F. J. *Humus chemistry: Genesis, composition, reactions*, 2nd edition. New York, 1994, pp. 496. ISBN 0-471-59474-1.
- [10] VESELÁ, L., KUBAL, M., KOZLER, J., INNEMANOVÁ, P.: Struktura a vlastnosti přírodních huminových látek typu oxihumolitu. *Chemické listy* 99, 2005, s. 711–717.
- [11] ŠKARPA, Petr. Význam organické hmoty v půdě. *Výroba a využití organických hnojiv* [online]. 2013 [cit. 2013-12-22]. Dostupné z: http://web2.mendelu.cz/af_291_projekty2/vseo/stranka.php?kod=464
- [12] ŽÁČEK, L. *Hydrochemie*. Brno: VUTIUM, 1998, s. 51. ISBN 80-214.1167-8.
- [13] HUBÁČEK, J. et al. *Chemie uhlí*, Praha: SNTL, 1962.
- [14] SOIL HUMIC SUBSTANCES. *The formation of humic substances*. [online]. [cit. 2012-04-16]. Dostupné z: <<http://karnet.up.wroc.pl/~weber/powstaw2.htm>>.

- [15] Mikroorganismy jako indikátory stavu půdního prostředí. *Mendeova univerzita v Brně* [online]. 2016 [cit. 2016-01-28]. Dostupné z: http://web2.mendelu.cz/af_291_projekty2/vseo/print.php?page=3422&typ=html
- [16] PIVOKONSKÝ, M., PIVOKONSKÁ, L., BUBÁKOVÁ, P. a JANDA V. Úprava vody s obsahem huminových látek. *Chemické listy* [online]. 2010, č. 104 [cit. 2013-12-22]. Dostupné z: http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2010_11_1015-1022.pdf
- [17] RODRÍGUEZ, F.J., SCHLENGER P., GARCÍA-VALVERDE M. Monitoring changes in the structure and properties of humic substances following ozonation using UV–Vis, FTIR and ¹H NMR techniques. *Science of The Total Environment*, 2016, vol. 541, s. 623-637. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2015.09.127.
- [18] TAN K. H.: *Humic Matter in Soil and the Environment: Chemical Composition of Humic Matter*. Marcel Dekker, New York. 2003
- [19] SCHNITZER, M., KODAMA H., RIPMEESTER J. A. Determination of the Aromaticity of Humic Substances by X-Ray-Diffraction Analysis. *Soil Science Society of America Journal*, 1991, vol. 55, s. 745-750.
- [20] STUM W., MORGAN J. J.: *Aquatic Chemistry*. J. Wiley, New York 1996.
- [21] BERGELIN, A. *Properties of Humic Substances in Inland Waters* [online]. 2008 [cit. 2016-12-22]. Dostupné z [www: <http://www.kht.se/en/che/divisions/inorg/research/properties-of-humic-substances-in-inland-waters-1.19942>](http://www.kht.se/en/che/divisions/inorg/research/properties-of-humic-substances-in-inland-waters-1.19942).
- [22] VLACHOVÁ, K.: *Vliv huminových látek na toxicitu komplexních vzorků ze životního prostředí*, Bakalářská práce, MU Brno, Přírodovědecká Fakulta, 2007.
- [23] HAVELCOVÁ, M., MIZERA, J., MACHOVIČ, V., PŘIBYL, O., BORECKÁ, L., KRAUSOVÁ, I. Sorbenty na bázi huminových látek a chitosanu. *Chemické listy*. [online] Praha: 2011, č. 105. ISSN 752-760 Dostupné z: http://w.chemicke-listy.cz/docs/full/2011_12_913-917.pdf
- [24] DE MELO, B.A.G., MOTTA F.L., SANTANA M.H.A. Humic acids: Structural properties and multiple functionalities for novel technological developments. *Materials Science and Engineering: C*, 2015, vol. 63, no. 5. DOI: 10.1016/j.msec.2015.12.001.
- [25] GIANNAKOPOULOS, E., DROSOS, M., DELIGIANNAKIS, Y. A humic-acid-like polycondensate produced with no use of catalyst. *Journal of Colloid and Interface Science*, 2009. vol. 336, no. 1, s. 59-66.
- [26] MACHESKY, M.L. Calorimetric acid–base titrations of aquatic and peat derived fulvic and humic acids. *Sci. Technol*, 1993, vol. 27, s. 1182–1188.
- [27] HLADKÝ, J., POSPÍŠILOVÁ, L., LIPTAJ, T. Spectroscopic characterization of natural humic substances. *Journal of Applied Spectroscopy*, 2013, vol. 80, s. 8–14.

- [28] TIKHOVA, V.D., SHAKIROV, M.M, FADEEVA, V.P., DERGACHEVA, M.I., KALLAS, E.V., ORLOVA, L.A. *Russian Journal of Applied Chemistry*. vol. 74, no. 8, s. 1380-1384. DOI: 10.1023/A:1013783002596.
- [29] ZIELIŃSKA, K., TOWN R.M., YASADI K., VAN LEEUWEN H.P. Partitioning of Humic Acids between Aqueous Solution and Hydrogel: Concentration Profiling of Humic Acids in Hydrogel Phases. *Langmuir*, 2014, vol. 30, no. 8, s. 2084-2092. DOI: 10.1021/la4050094.
- [30] KHIL'KO, S.L., TITOV, E.V., FEDOSEEVA A.A. The contentious nature of soil organic matter. *Colloid Journal*, 2015, vol. 63, no. 5, s. 645-648. DOI: 10.1023/A:1012319623489.
- [31] AESCHBACHER, M., GRAF C., SCWARZENBACH, R.P., SANDER, M., Antioxidant properties of humic substances, *Environ. Sci. Technol*, 2012, vol. 46, s. 4916–4925
- [32] SCHNITZER, F.J., MONREAL C.M. Quo vadis soil organic matter research? *Advances in agronomy*, 2011, vol. 113, s. 139–213.
- [33] LEITA, L., MARGON A., PASTRELLO A., ARČON I., CONTIN M., MOSETTI D. Soil humic acids may favour the persistence of hexavalent chromium in soil: Structural properties and multiple functionalities for novel technological developments. *Environmental Pollution*, 2009, vol. 157, no. 6, s. 1862-1866. DOI: 10.1016/j.envpol.2009.01.020.
- [34] PRADO, A.G.S., PERTUSATTI, J., NUNES, A.R. Aspects of protonation and deprotonation of humic acids surface on molecular conformation, *J. Braz. Chem. Soc.*, 2011, vol. 22, no 8, s. 1478–1483.
- [35] KLUČÁKOVÁ, M., PEKAŘ, M., Solubility and dissociation of lignitic humic acids in water suspension, *Colloids Surf., A: Physicochem. Eng. Asp.*, 2005, vol. 252, no. 2-3, s. 157–163.
- [36] XIONG, J. Lead Binding to Soil Fulvic and Humic Acids: NICA-Donnan Modeling and XAFS Spectroscopy. *Environ. Sci. Technol.*, 2013, vol. 47, s. 11634–11642.
- [37] BARTOVSKÁ, L., ŠIŠKOVÁ, M. Co je co v povrchové a koloidní chemii. In: *Vysoká škola chemicko-technologická v Praze* [online]. 2005 [cit. 2016-03-14]. Dostupné z: http://147.33.74.135/knihy/uid_es-001/hesla/hydrofobni_interakce.html
- [38] SCHNITZER, M., KHAN, S.U. *Humic substances in the environment*. Marcel Dekker, INC. New York. 1972.
- [39] CZYZEWSKA-SZAFRAN, H., JASTRZEBSKI, Z., SOLTYSIAK-PAWLUCZUK, D., WUTKIEWICZ, M., JEDRYCH, A., REMISZEWSKA, M. Systemic toxicity and dermal irritation of Tolpa Peat Preparation, *Acta Pol. Pharm*, 1993, vol. 50, no. 4-5, s. 373–377.
- [40] RIEDE, U.N., JONAS, I., KIRN, B., USENER, U.H., KREUTZ, W., SCHLICKWEY, W., Collagen stabilization induced by natural humic substances, *Arch. Orthop. Trauma Surg.*, 1992, vol. 111, s. 259–264.
- [41] THIEL, K.D., HELBIG, B., KLÖCKING, R., WUTZLER, P., SPRÖSSIG, M., SCHWEIZER, H. Comparison of the in vitro activities of ammonium humate and of enzymically oxidized chlorogenic and caffeic acids against type 1 and type 2 human herpes virus, *Pharmazie*, 1981, vol. 36, no. 1, s. 50–53

- [42] SATO, T., OSE, Y., NAGASE, H. Desmutagenic effect of humic acid, *Mutat. Res.*, 1986, vol. 162, s. 173–178.
- [43] CAMERON, R. S. et al. Molecular weight and shape of humic acid from sedimentation and diffusion measurements on fractionated extracts. *Journal of Soil Science*, 1972, vol. 23, s. 395–408.
- [44] SWIFT, R. S. Macromolecular properties of soil humic substances: Fact, fiction, and opinion. *Soil Sci.*, 1999, vol. 164, s. 790-802.
- [45] BURDON, J. Are the traditional concepts of the structures of humic substances realistic? *Soil Sci.*, 2001, vol. 166, s. 752-769.
- [46] PICCOLO, A., S. NARDI a G. CONCHERI. Micelle-like conformation of humic substances as revealed by size exclusion chromatography. *Chemosphere*, 1996, roč. 33, č. 4, s. 595–602.
- [47] CONTE, P. a PICCOLO, A. Conformational Arrangement of Dissolved Humic Substances. Influence of Solution Composition on Association of Humic Molecules. *Environmental Science & Technology*, 1999, roč. 33, č. 10, s. 1682-1690
- [48] WERSHAW, R., L., Molecular aggregation of humic substances, *Soil Sci.*, 1999, č. 164, s. 803-813
- [49] TRUBETSKOI, O.A., TRUBETSKAYA, O.E. Reversed-phase high-performance liquid chromatography of the stable electrophoretic fractions of soil humic acids. *Eurasian Soil Science*, 2015, vol. 48, no. 2, s. 148-156. DOI: 10.1134/S106422931502012X.
- [50] COLOMBO, C., PALUMBO, G., ANGELICO, R., CHO, H.G., FRANCIOSO, O., ERTANI, A., NARDI, S. Spontaneous aggregation of humic acid observed with AFM at different pH. *Chemosphere*, 2015, vol. 138, s. 821-828. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2015.08.010.
- [51] KINGERY, W.L., SIMPSON, A.J., HAYES, M.H.B., HAYES, M.A., LOCKE, M.A., HICKS, R.P. “The application of multidimensional NMR to the study of soil humic substances.” *Soil Sci.*, 2000, vol. 165, s. 483–494.
- [52] SIMPSON, A.J., KINGERY, W.L., HAYES, M.H., SPRAUL, M., HUMFER, E., DVORTSAK, P., KERSSEBAUM, R., HOFFMAN, M. “Molecular structures and associations of humic substances in the terrestrial environment.” *Naturwissenschaften.*, 2002, vol. 89, s. 84–88.
- [53] BAIGORRI, R., FUENTES, M., GONZÁLEZ-GAITANO, G., GARCÍA-MINA, J.M. Analysis of molecular aggregation in humic substances in solution. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 2007, vol. 302, no. 1-3, s. 301-306. DOI: 10.1016/j.colsurfa.2007.02.048.
- [54] BAALOUSHA, M., MOTELICA-HEINO, M., GALAUP, S., LE COUSTUMER, P. Supramolecular structure of humic acids by TEM with improved sample preparation and staining. *Microscopy Research and Technique*, 2005, vol. 66, no. 6, s. 299-306. DOI: 10.1002/jemt.20173.

- [55] von WANDRUSZKA, R.; ENGBRETSON, R. R.; YATES, L. M. Humic acid pseudomicelles in dilute aqueous solution: Fluorescence and surface tension measurements. In *Understanding Humic Substances: Advanced Methods, Properties and Applications*; Ghabbour, E. A., Davies, G., Eds.; Royal Society of Chemistry: Cambridge, U. K., 1999, pp 79-85
- [56] HOFFMAN, L.W., CHILOM, G., VENKATESAN, S., RICE, J.A. Electron and Force Microscopy Characterization of Particle Size Effects and Surface Phenomena Associated with Individual Natural Organic Matter Fractions. *Microscopy and Microanalysis*, 2014, vol. 20, no. 2, s. 521-530. DOI: 10.1017/S1431927614000038.
- [57] GUETZLOFF, T. F., RICE, J. A. Does humic acids form a micelle? *Scie. Total Environ.*, 1994, č. 152, s. 31–35
- [58] CHILOM, G., BRUNS, A.S., RICE, J.A. Aggregation of humic acid in solution: Contributions of different fractions. *Organic Geochemistry*, 2009, vol. 40, issue 4, s. 455-460. DOI: 10.1016/j.orggeochem.2009.01.010.
- [59] CHILOM, G., RICE, J.A. Structural Organization of Humic Acid in the Solid State. *Langmuir*, 2009, vol. 25, issue 16, s. 9012-9015. DOI: 10.1021/la900750z.
- [60] KLEBER, M., P. SOLLINS a R. SUTTON. A conceptual model of organo-mineral interactions in soils: self-assembly of organic molecular fragments into zonal structures on mineral surfaces. *Biogeochemistry*, 2007-7-4, vol. 85, no 1, s. 9-24. DOI: 10.1007/s10533-007-9103-5.
- [61] VARGA, B., KISS, G., GALAMBOS, I., GELENCŠÉR, A., HLAVAY, J., KRIVÁCSY, Z. Secondary Structure of Humic Acids. Can Micelle-like Conformation Be Proved by Aqueous Size Exclusion Chromatography?. *Environmental Science*, 2000, vol. 34, issue 15, s. 3303-
http://ojs.cnr.ncsu.edu/index.php/BioRes/article/view/BioRes_03_1_0123_Montoneri_BQMC
RM Pt1_HumicAcidMatter
- [66] SALATI, S., PAPA, G., ADANI, F., MENDICHI, R., CHIEROTTI, GOBETTO, R., MEDANA. Perspective on the use of humic acids from biomass as natural surfactants for industrial applications. *Biotechnology Advances* [online]. 2011, vol. 29, no. 6, s. 913-922 [cit. 2016-02-24]. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2011.07.012.
- [67] GAMBOA, C., OLEA, A.F. Association of cationic surfactants to humic acid. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* [online]. 2006, vol. 278, no. 1-3, s. 241-245 [cit. 2016-02-26]. DOI: 10.1016/j.colsurfa.2005.12.026.
- [68] BENEŠ, J., JIRÁK, D., VÍTEK, F. *Základy lékařské fyziky: revue littéraire mensuelle* [online]. 4. vydání. V Praze: Univerzita Karlova, nakladatelství Karolinum, 2015 [cit. 2016-03-06]. ISBN 978-80-246-2645-1.
- [69] KLOUDA, P. *Moderní analytické metody*. Ostrava: Pavel Klouda, 2003. 132 s. ISBN 80-86369-07-2, s. 31–122.
- [70] L.G. WADE, L.G.Jr. *Organic chemistry* [online]. 8th ed. Boston: Pearson, 2013 [cit. 2016-03-08]. ISBN 03-217-6841-8

- [71] SUTTON, R., SPOSITO, G. Molecular Structure in Soil Humic Substances: The New View. *Environmental Science*, 2005, vol. 39, issue 23, s. 9009-9015. DOI: 10.1021/es050778q
- [72] SHIRZADI, A., SIMPSON, M.J., XU, Y., SIMPSON, A.J. Application of Saturation Transfer Double Difference NMR to Elucidate the Mechanistic Interactions of Pesticides with Humic Acid. *Environmental Science*, 2008, vol. 42, no. 4, s. 1084-1090. DOI: 10.1021/es7024356.
- [73] LONGSTAFFE, J.G., COURTIER-MURIAS, D., SIMPSON, A.J. The pH-dependence of organofluorine binding domain preference in dissolved humic acid. *Chemosphere*, 2013, vol. 90, no. 2, s. 270-275. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2012.07.004.
- [74] GHABBOUR, E.A., DAVIES, G. *Humic Substances Nature's Most Versatile Materials*. London: Taylor, 2003. ISBN 02-034-8760-5.
- [75] CHURÁČEK, J. a kolektiv. *Analytická separace látek*. Praha: SNTL – Nakladatelství technické literatury, 1990, s. 276-277. ISBN 80-03-00569-8
- [76] POUCHLÝ, J. *Fyzikální chemie makromolekulárních a koloidních soustav* [online]. Version 1.0. Praha : VŠCHT Praha, 2008 [cit. 2016-02-28]. P. 146. Available from www: <http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid_isbn-978-80-7080-674-6/pages-img/146.html>. ISBN 978-80-7080-674-6
- [77] Thin Layer Chromatography. *DRGP Institute* [online]. 2014 [cit. 2016-03-08]. Dostupné z: <https://drgpinstitute.wordpress.com/category/chemistry/page/3/>
- [78] PICCOLO, A. The Supramolecular structure of Humic Substances: A Novel Understanding of Humus Chemistry and Implications in Soil Science. *Advances in Agronomy*, 2002, roč. 75, s. 57–134.
- [79] NEBBIOSO, A. a PICCOLO, A. Advances in humeomics: Enhanced structural identification of humic molecules after size fractionation of a soil humic acid. *Analytica Chimica Acta*, 2012, roč. 720, s. 77–90.
- [80] TRUBETSKAYA, O.E., TRUBETSKOJ, O.A., VOYARD, G., RICHARD, C. Determination of hydrophobicity and optical properties of soil humic acids isolated by different methods. *Journal of Geochemical Exploration*, 2013, vol. 132, s. 84-89. DOI: 10.1016/j.gexplo.2013.06.004.
- [81] Sephadex Size Exclusion Media. *GE healthcare life sciences* [online]. 2016 [cit. 2016-03-08] Dostupné z: [http://www.gelifesciences.com/webapp/wcs/stores/servlet/CategoryDisplay?categoryId=131317 & atalogId=78661&productId=&top=Y&storeId=11786&langId=-1](http://www.gelifesciences.com/webapp/wcs/stores/servlet/CategoryDisplay?categoryId=131317&atalogId=78661&productId=&top=Y&storeId=11786&langId=-1)
- [82] WANG, Ren-Qi, GUTIERREZ, L., CHOON, N.S., CROUÉ, Jean-Philippe. Hydrophilic interaction liquid chromatography method for measuring the composition of aquatic humic substances. *Analytica Chimica Acta*, 2015, vol. 853, s. 608-616. DOI: 10.1016/j.aca.2014.09.026.
- [83] KUČERÍK, J., ŠMEJKALOVÁ, D., ČECHLOVSKÁ, H., PEKAŘ, M. New insights into aggregation and conformational behaviour of humic substances: Application of high resolution

- ultrasonic spectroscopy. *Organic Geochemistry*, 2007, vol. 38, issue 12, s. 2098-2110. DOI: 10.1016/j.orggeochem.2007.08.001.
- [84] O'DRISCOLL, B., SMYTH, C., ALTING, A.C., VISSCHERS, R.W., BUCKIN, V. Recent applications for high-resolution ultrasonic spectroscopy. In: *American Laboratory* [online]. 2003 [cit. 2016-03-09]. Dostupné z: <http://www.ultrasonic-scientific.com/Applications/pdf/O'Driscoll-Reprint.pdf>
- [85] KUČERÍK, J., H. ČECHLOVSKÁ, P. BURSÁKOVÁ a M. PEKAŘ. Lignite humic acids aggregates studied by high resolution ultrasonic spectroscopy. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 2009, vol. 96, issue 2, s. 637-643. DOI: 10.1007/s10973-008-9391-6.
- [86] KLUČÁKOVÁ, M., KARGEROVÁ, A. a NOVÁČKOVÁ, K. Conformational Changes In Aqueous Solutions of Humic Acids. *Chemistry & Life*. 2012.
- [87] ESFAHANI, M.R., STRETZ, H.A., WELLS, M.J.M. Abiotic reversible self-assembly of fulvic and humic acid aggregates in low electrolytic conductivity solutions by dynamic light scattering and zeta potential investigation. *Science of The Total Environment*, 2015, vol. 537, s. 81-92. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2015.08.001.
- [88] KLUČÁKOVÁ, M., KALINA, M., WELLS, M.J.M. Composition, particle size, charge, and colloidal stability of pH-fractionated humic acids. *Journal of Soils and Sediments*, 2015, vol. 15, no. 9, s. 1900-1908. DOI: 10.1007/s11368-015-1142-2.
- [89] CHERNYSHEVA, M.G., BADUN, G.A. HS-protein associates in the aqueous/oil system: composition and colloidal properties. *Journal of Soils and Sediments*, 2014, vol 14, no. 2, s. 280-291. DOI: 10.1007/s11368-013-0744-9. ISSN 1439-0108.
- [90] WU, F. C., R. D. EVANS a P. J. DILLON. Separation and Characterization of NOM by High-Performance Liquid Chromatography and On-Line Three-Dimensional Excitation Emission Matrix Fluorescence Detection: composition and colloidal properties. *Environmental Science*, 2003, vol. 37, no. 16, s. 3687-3693. DOI: 10.1021/es020244e.
- [91] GAO, X., YANG, G., TIAN, R., DING, W., HU, F., LIU, X., LI, H. Formation of sandwich structure through ion adsorption at the mineral and humic interfaces: A combined experimental computational study. *Journal of Molecular Structure*, 2015, vol. 1093, no. 9, s. 96-100. DOI: 10.1016/j.molstruc.2015.03.060.
- [92] IKEYA, K., SLEIGHTER, R.L., HATCHER, P.G., WATANABE, A. Characterization of the chemical composition of soil humic acids using Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 2015, vol. 153, s. 169-182. DOI: 10.1016/j.gca.2015.01.002.
- [93] ARENELLA, M., GIAGNONI, L., MASCIANDARO, G., CECCANTI, B., NANNIPIERI, P., RENELLA, G., LI, H. Interactions between proteins and humic substances affect protein identification by mass spectrometry: A combined experimental computational study. *Biology and Fertility of Soils*, 2014, vol 50, no. 3, s. 447-454. DOI: 10.1007/s00374-013-0860-0.
- [94] VAZ, S., LOPES, W.T, MARTIN-NETO, L., CECCANTI, B., NANNIPIERI, P., RENELLA, G., LI, H. Study of molecular interactions between humic acid from Brazilian soil and the

- antibiotic oxytetracycline: A combined experimental computational study. *Environmental Technology*, 2015, vol. 4, no 3, s. 260-267. DOI: 10.1016/j.eti.2015.09.004.
- [95] CHMELÍK, J. VYUŽITÍ FIELD-FLOW FRAKCIONACE PRO MĚŘENÍ VLASTNOSTÍ MAKROMOLEKUL A ČÁSTIC. *Chemické listy* [online]. 1999, vol. 93 [cit. 2016-02-15]. Dostupné z: http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/1999_11_670-677.pdf
- [96] STENSON, A.C., EVANS, R.D., DILLON, P.J. Reversed-Phase Chromatography Fractionation Tailored to Mass Spectral Characterization of Humic Substances: composition and colloidal properties. *Environmental Science*, 2008, vol. 42, no. 6, s. 2060-2065. DOI: 10.1021/es7022412.
- [97] WHELAN, T.J., KANNANGARA, G.S.K., WILSON, M.A., WATANABE, A. Increased Resolution in High-Performance Liquid Chromatograph Spectra of High-Molecular-Weight Organic Components of Bayer Liquors. *Industrial*, 2003, vol. 42, no. 26, s. 6673-6681. DOI: 10.1021/ie0303754.
- [98] WU, F.C.; EVANS, R.D.; DILLON, P. J. High-performance liquid chromatographic fractionation and characterization of fulvic acid. *Anal. Chim. Acta*, 2002, vol. 464, s. 47–55.
- [99] HUTTA, M.; GÓRA, R. Novel stepwise gradient reversed-phase liquid chromatography separations of humic substances, air particulate humic-like substances and lignins. *J. Chromatogr. A.*, 2003, vol. 1012, s. 67–79.
- [100] FRANKE, K., RÖSSLER, D., KUPSCH, H. Use of radioactive tracers for the characterization of humic and fulvic acids in high performance size exclusion chromatography. Edited by Elham and Ghabbour. *Humic Substances Nature's Most Versatile Materials* [online]. London: Taylor, 2003, s. 3-5 [cit. 2016-04-04]. ISBN 0203487605.
- [101] SCHMITT-KOPPLIN, P. INTERPRETING CAPILLARY ELECTROPHORESIS—ELECTROSPRAY/MASS SPECTROMETRY (CZE-ESI/MS) OF SUWANNEE RIVER NATURAL ORGANIC MATTER (NOM). EDITED BY ELHAM A. GHABBOUR, edited by Elham A. Geoffrey Davies. *Humic Substances Nature's Most Versatile Materials* [online]. London: Taylor, 2003, s. 6-20 [cit. 2016-04-04]. ISBN 0203487605.
- [102] PETR, P. a kol. Kontakt [online]. 2012 [cit. 2016-04-04]. ISSN 1804-7122. Dostupné z: <http://casopis-zsfju.zsf.jcu.cz/kontakt/clanky/1~2012/799-huminove-latky-v%C2%A0balneologii-soucasny-stav-a%C2%A0perspektivy>
- [103] SCHOLS, D., WUTZLER, P., KLÖCKING, R., HELBIG, B., CLERCQ, E.D. Selective inhibitory action of polyhydroxycarboxylates derived from phenolic compounds against human immunodeficiency virus replication, *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.*, 1991, vol. 7, s. 677–685.
- [104] KLÖCKING, R., HELBIG, B. Medical aspects and applications of humic substances, *Biopolym. Lignin Humic Subst. Coal.*, 2005, s. 3–16.
- [105] NEYTS, J., SNOECK, R., WUTZLER, P., HELBIG, B., WANG, P., CLERCQ, E.D. Poly (hydroxy) carboxylates as selective inhibitors of cytomegalovirus and herpes simplex virus replication, *Antivir. Chem. Chemother.*, 1992, vol. 3, s. 215–222.

- [106] ZANETTI, M. Treatment of HIV infection with humic acid, *WO Patent number* 008335, 1995.
- [107] JUNEK, R., MORROW, R., SCHOENHERR, J.I., SCHUBERT, R., KALLMEYER, R., PHULL, S., KLÖCKING, R., Bimodal effect of humic acids on the LPS-induced TNF- α release from differentiated U937 cells, *Phytomedicine*, 2009, vol. 16, no. 6, s. 470–476.
- [108] LITVIN, V.A., MINAEV, B.F., Spectroscopy study of silver nanoparticles fabrication using synthetic humic substances and their antimicrobial activity, *Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.*, 2013, vol. 108, s. 115–122.
- [109] JURSCI, I., Possibilities of applying humic acids in medicine (wound healing and cancer therapy), in: N. Senesi, T.M. Milano (Eds.), *Humic Substances in the Global Environment*, Elsevier, Amsterdam, London, New York, Tokyo. 1994, pp. 1331–1336.
- [110] PAN, J., SIMAMURA, E., KOYAMA, J., SHIMADA, H., HIRAI, K.I. Induced apoptosis and necrosis by 2-methylfuranonaphthoquinone in human cervical cancer HeLa cells, *Cancer Detect. Prev.*, 2000, vol. 24, no. 3, s. 266–274.
- [111] SAGAR, S., GREEN, I.R. Pro-apoptotic activities of novel synthetic quinones in human cancer cell lines, *Cancer Lett.*, 2009, vol. 285, no.1, s. 23–27.
- [112] MORALES, P., VARA, D., GOMEZ-CANAS, M., ZUNIGA, M.C., OLEA-AZAR, C., GOYA, P., FERNANDEZ-RUIZ, J., DIAZ-LAVIADA, I., JAGEROVIC, N., Synthetic cannabinoid quinones: preparation, in vitro antiproliferative effects and in vivo prostate antitumor activity, *Eur. J. Med. Chem.*, 2013, vol. 70, s. 111–119.
- [113] ENDO, S., NISHIYAMA, A., SUYAMA, M., TAKEMURA, M., SODA, M., CHEN, H., TAJIMA, K., EL-KABBANI, O., BUNAI, Y., HARA, A., MATSUNAGA, T., IKARI, A. Protective roles of aldo-keto reductase 1B10 and autophagy against toxicity induced by p-quinone metabolites of tert-butylhydroquinone in lung cancer A549 cells, *Chem. Biol. Interact.*, 2014, vol. 234, s. 282–289.
- [114] MÜLLER, I., JENNER, A., BRUCHELT, G., NIETHAMMER, D., HALLIWELL, B. Effect of concentration on the cytotoxic mechanism of doxorubicin—apoptosis and oxidative DNA damage, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1997, vol. 230, no. 2, s. 254–257.
- [115] WOLLINA, U. Peat: a natural source for dermatocosmetics and dermatotherapeutics, *J. Cutan. Aesthet. Surg.*, 2009, vol. 2, no. 1, s. 17–20.
- [116] MARTINI, S., D'ADDARIO, C., BONECHI, C., LEONE, G., TOGNAZZI, A.A., CONSUMI, M., MAGNANI, A.A., C. ROSSI, C. Increasing photostability and water-solubility of carotenoids: synthesis and characterization of β -carotene-humic acid complexes, *J. Photochem. Photobiol. B Biol.*, vol. 101, no. 3, s. 355–361.
- [117] GHOSAL, S. Patentes delivery system for pharmaceutical, nutritional and cosmetic ingredients, *US Patent number* 6. 2003, vol. 558,712.
- [118] KHANNA, R., AGARWAL, S.P., KHAR, R.K. Fulvic acids and humic acids as novel complexing agents and a process Indian, *Patent number* 239574., 2010.

- [119] MONTONERI, E., SAVARINO, P., BOTTIGLIENGO, S., MUSSO, G., BOFFA, V., BIANCO PREVOT, A., et al. Humic acid-like matter isolated from green urban wastes. Part II: performance in chemical and environmental technologies. *Bioresources*. 2008b, vol. 3, s. 217–33.
- [120] SAVARINO, P., MONTONERI, E., BIASIZZO, M., QUAGLIOTTO, P.L., VISCARDI, G., BOFFA, V. Upgrading biomass wastes in chemical technology. Humic acid-like matter isolated from compost as chimica auxiliary for textile dyeing. *J. Chem. Tech. Biotech.*, 2007, vol. 82, s. 939–48.
- [121] GARCÍA BECERRA, F.Y., GRANT ALLEN, D., ACOSTA, E.J. Surfactant-like properties of alkaline extracts from wastewater biosolids. *J. Surfact. Deterg.*, 2009, vol. 13, s. 261–71.
- [122] SAVARINO, P., MONTONERI, E., MUSSO, G., BOFFA, V. Biosurfactants from urban wastes for detergent formulation: surface activity and washing performance. *J. Surfact. Deterg.*, 2010, vol. 13, s. 59–68
- [123] SMITH, K.E.C., THULLNER, M., WICK, L.Y., HARMS, H. Sorption to Humic Acids Enhances Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Biodegradation. *Environmental Science*, 2009, vol. 43, no.19, s. 7205-7211. DOI: 10.1021/es803661s.
- [124] BURLAKOV, J., KĻAVIŅŠ, M., OSINSKA, L., PURMALIS, O. The Impact of Humic Substances as Remediation Agents to the Speciation Forms of Metals in Soil. *APCBEE Procedia*, 2013, vol. 5, s. 192-196. DOI: 10.1016/j.apcbee.2013.05.034.
- [125] PFLUGMACHER, S., edited by Elham A.Geoffrey Davies. *Humic Substances Nature's Most Versatile Materials* [online]. London: Taylor, 2003, s. 209-222 [cit. 2016-04-04]. ISBN 0203487605.
- [126] *Ceratophyllum demersum 'Foxtail'*. *Tropica* [online]. [cit. 2016-04-04]. Dostupné z: [http://tropica.com/en/plants/plantdetails/CeratophyllumdemersumFoxtail'\(021APOR\)/4434](http://tropica.com/en/plants/plantdetails/CeratophyllumdemersumFoxtail'(021APOR)/4434)
- [127] *Vesicularia dubyana 'Christmas'*. *Tropica* [online]. [cit. 2016-04-04]. Dostupné z: <http://tropica.com/en/plants/plantdetails/4396/4396>
- [128] NARDI, S., PIZZEGHELLO, D., SCHIAVON, M., ERTANI, A. Plant biostimulants: physiological responses induced by protein hydrolyzed-based products and humic substances in plant metabolism. *Scientia Agricola*, 2016, vol. 73, no. 1, s. 18-23. DOI: 10.1590/0103-9016-2015-0006.
- [129] FEDOTOV, G.N., SHOBA, S.A. Current ideas on the possible pathways for the formation of humic substances in soils. *Eurasian Soil Science*, 2013, vol. 46, no. 12, s. 1263-1269. DOI: 10.1134/S106422931312003X.
- [130] SMAILER, S.M., WHITE, W.B. The luminescent humic substances in speleothems. *Applied Geochemistry*, 2013, vol. 36, s. 132-139. DOI: 10.1016/j.apgeochem.2013.06.002.
- [131] *Speleothem*. *National centers for enviromental information* [online]. 2003 [cit. 2016-02-14]. Dostupné z: <https://www.ncdc.noaa.gov/data-access/paleoclimatology-data/datasets/speleothem>

- [132] VALA, M, KŠÍR, R, *Návod k obsluze a údržbě lyofilizačních zařízení LZ 9.2, 30.2, 45.2.* Kolín: Frigera n.p. Kolín, 1984. 532 stran. SIP 41692/04467
- [133] SEGURA, L.A., OYARZÚN, C.A., QIANG, G., YOUCAI, Z. Experimental evidence of mass transfer mechanisms during freeze-drying in a capillary porous medium. *International Journal of Refrigeration*, 2012, vol. 35, no. 8, s. 2102-2109. DOI: 10.1016/j.ijrefrig.2012.08.014.
- [134] JANČÁŘOVÁ, I., JANČÁŘ, L. *Analytická chemie*. Vyd. 1. Brno: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita, 2003, 195 s. ISBN 978-80-7157-647-12008.
- [135] KŘÍŽENECKÁ, Sylvie. *Základy analytické chemie. Univerzita Jana Evangelisty Purkyně Ústí nad Labem, Fakulta životního prostředí*, 2007.
- [136] NOVOTNÁ, Radka, Tomáš ŠILHA a Zdeněk TRÁVNÍČEK. *Spektrální metody studia chemických látek*. Olomouc, 2011.
- [137] OPEKAR, František. *Základní analytická chemie: pro studenty, pro něž analytická chemie není hlavním studijním oborem*. 1. vyd. Praha: Karolinum, 2003, 201 s. ISBN 80-246-0553-8.
- [138] XU, Rensheng. *Particle characterization: light scattering methods*. Dordrecht; Kluwer Academic, 2000. Powder technology series, v.13. ISBN 07-923-6300-0.
- [139] Microscopic world. *Quantumfreak* [online]. 2014, č. 1 [cit. 2014-01-08]. Dostupné z: <http://quantumfreak.com/motion-of-molecules/>.
- [140] SARTOR, Marta. DYNAMIC LIGHT SCATTERING to determine the radius of small beads in Brownian motion in a solution. In: *Fraden Group* [online]. [cit. 2013-05-19]. Dostupné z: <http://216.92.172.113/courses/phys39/light%20scattering/DLS%20LabView%20UCSD.pdf>
- [141] KVÍTEK, Libor a Aleš PANÁČEK. *Základy koloidní chemie*. KATEDRA FYZIKÁLNÍ CHEMIE PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA UNIVERZITA PALACKÉHO, 2007. Dostupné z: <http://fch.upol.cz/skripta/kol/koch.pdf>
- [142] KALINA, M., KLUČÁKOVÁ, M., VĚŽNÍKOVÁ, K. *Dynamic light scattering study of particle size development of humic acids*. Brno University of Technology, 2012.
- [143] KALINA, M.. Využití dynamického rozptylu světla k měření viskozity. *Chempoint* [online]. 2012 [cit. 2016-03-13]. Dostupné z: <http://www.chempoint.cz/vyuziti-dynamickeho-rozptylu-svetla-k-mereni-viskozity>
- [144] Oddělení strukturní analýzy, katedra fyziky kondenzovaných látek MFF UK: Dynamický rozptyl světla. [Http://www.xray.cz/](http://www.xray.cz/) [online]. 2008 [cit. 2014-05-11]. Dostupné z: <http://www.xray.cz/kfkl-osa/eng/zetasizer/dls.htm>
- [145] *Alfa test* [online]. [cit. 2014-05-11]. Dostupné z: <http://www.alfatest.it/listing.asp?CatID=184>
- [146] Universal 'Dip' Cell Kit. *Malvern* [online]. United Kingdom, 2016 [cit. 2016-05-02]. Dostupné z: <https://www.malvernstore.com/en-gb/accessories/sample-presentation/ZEN1002>
- [147] ¿Qué es el potencial Z?, ¿Por qué se mide la movilidad electroforética? *IESMAT* [online]. 2010 [cit. 2016-04-06]. Dostupné z: <http://www.iesmat.com/tecnologias-potencialz.htm>
- [148] Zeta Potential. *Horiba scientific* [online]. [cit. 2016-04-06]. Dostupné z: <http://www.horiba.com/scientific/products/particle-characterization/technology/zeta-potential/>

- [149] BY SADAO MORI, Howard G. *Size Exclusion Chromatography*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 1999. ISBN 978-366-2039-106.
- [150] HALASOVÁ, Tereza. Mikroreologie. *Chempoint* [online]. 2012 [cit. 2016-03-13]. Dostupné z: <http://www.chempoint.cz/mikroreologie>
- [151] Microrheology. In: GARDEL, Margaret. Cellular biophysics lab [online]. 2008 [cit. 2012-03-31]. Dostupné z: <http://squishycell.uchicago.edu/papers>
- [152] *Chemagazín: STABILITA SUZPENZÍ A DISPERZÍ – PROČ JSOU PARAMETRY JAKO VELIKOST ČÁSTIC, ZETA POTENCIÁL A REOLOGICKÉ VLASTNOSTI TAK DŮLEŽITÉ?* [online]. 2011, vol. 21, no. 4. [cit. 2016-04-07]. ISSN 1210-7409. Dostupné z: http://www.chemagazin.cz/userdata/chemagazin_2010/file/CHEMAGAZIN_XXI_4_c13.pdf
- [153] GRILLET, A.M., WYATT, N.B., GLOE, L.M.: Polymer Gel Rheology and Adhesion, Rheology, Dr. Juan De Vicente (Ed.), ISBN: 978-953-51-0187-1, *InTech*, 2012. [online]. Dostupné z: <http://www.intechopen.com/books/rheology/rheology-andadhesion-of-polymer-gels>
- [154] ZAUJEC, A., GONET, S. S., BIELEK, P.: *Humic Substances in Ecosystems*. 1. vydání. Výskumný ústav pôdoznanectva a ochrany pôdy v Bratislave a Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre, 1998.

8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

IHSS	mezinárodní asociace pro huminové látky
HL	huminové látky
HK	huminové kyseliny
FK	fulvinové kyseliny
PAL	povrchově aktivní látky
NOM	přírodní organická hmota
PFA	pentafluoranilin
PFP	pentafluorfenyl
HFB	hexafluorbenzen
EM	elektroforetická mobilita
MH	molekulová hmotnost
SRFA	Suwannee river fulvinové kyseliny
PAHA	přečištěné Aldrich huminové kyseliny
CMV	cytomegalovirus
SDS	dodecylsírán sodný
TX100	triton X-100
PAU	polyaromatické uhlovodíky
GPC	gelová permeační chromatografie
SEC	vylučovací chromatografie
HPSEC	vylučovací chromatografie za zvýšeného tlaku
LPSEC	vylučovací chromatografie za sníženého tlaku
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
RP – HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie s reverzní fází
NMR	nukleární magnetická rezonance
STDD NMR	nukleární magnetická rezonance přenosu saturace s dvojitým rozdílem
RHSTD NMR	nukleární magnetická rezonance reverzní heteronukleární s přenosem saturace s dvojitým rozdílem
HILIC	chromatografie hydrofilních interakcí
FT – IR	infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací
FT – ICR	iontová cyklotronová rezonance s Fourierovou transformací
UV – VIS	ultrafialová a viditelná spektrofotometrie

DLS	dynamický rozptyl světla
LDV	laserová Dopplerova velocimetrie
HRUS	vysoce rozlišovací ultrazvuková spektrometrie
DSC	diferenční skenovací kalorimetrie
TEM	transmisní elektronová mikroskopie
ELS	elektroforetický rozptyl světla
DOSY	difúzí řízená spektroskopie
PCS	foton korelační spektroskopie
RPM	počet otáček za minutu
MS	hmotnostní spektroskopie
ESI	elektrosprej
MALDI	ionizace laserem za přítomnosti matrice
ICP – MS	hmotnostní spektroskopie s indukčně vázaným plazmatem
OES	optická emisní spektroskopie
CE	kapilární elektroforéza
MSD	mean square displacement
PBS	fosfátový pufr
β	beta index
d	hydrodynamický průměr
D	difúzní koeficient
d	dimenze
k_B	Boltzmannova konstanta
T	absolutní teplota
π	Ludolfovo číslo
η	dynamická viskozita
d_H	hydrodynamický poloměr
ζ	zeta potenciál
A	absorbance
ε	molární absorpční koeficient
l	tloušťka absorbující vrstvy
c	látková koncentrace
A_{465}	absorbance při vlnové délce 465 nm

A_{665}	absorbance při vlnové délce 665 nm
A_{280}	absorbance při vlnové délce 280 nm
γ	povrchové napětí
λ	vlnová délka
M	molární koncentrace ($mol \cdot dm^{-3}$)
G	komplexní modul pružnosti ve smyku
G'	elastický modul
G''	viskózní ztrátový modul
δ	ztrátový úhel
a	poloměr částic
L	délka posunu
γ	práh koagulace