



**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

**VLIV METHYLACE HUMINOVÝCH KYSELIN NA  
INTERAKCI S POVRCHOVĚ AKTIVNÍMI LÁTKAMI**

THE INFLUENCE OF HUMIC ACIDS METHYLATION ON THE INTERACTION OF SURFACE ACTIVE AGENTS

**DIPLOMOVÁ PRÁCE**

MASTER'S THESIS

**AUTOR PRÁCE**

AUTHOR

**Bc. Anna Bělušová**

**VEDOUCÍ PRÁCE**

SUPERVISOR

**Ing. Jiří Smilek, Ph.D.**

**BRNO 2021**

## Zadání diplomové práce

Číslo práce: FCH-DIP1483/2020 Akademický rok: 2020/21  
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie  
Studentka: **Bc. Anna Bělušová**  
Studijní program: Chemie pro medicínské aplikace  
Studijní obor: Chemie pro medicínské aplikace  
Vedoucí práce: **Ing. Jiří Smilek, Ph.D.**

### Název diplomové práce:

Vliv methylace huminových kyselin na interakci s povrchově aktivními látkami

### Zadání diplomové práce:

- 1) provést methylace vyizolovaných huminových kyselin a standardů huminových kyselin
- 2) ověřit methylaci huminových kyselin pomocí vhodných fyzikálně–chemických metod
- 3) provést optimalizaci vybraných fyzikálně–chemických metod vedoucí ke studiu interakci huminové látky–tenzid
- 4) prostudovat interakce v systému huminové látky–tenzid vhodnými metodami
- 5) diskutovat naměřené výsledky a vyvozovat logické závěry

### Termín odevzdání diplomové práce: 30.7.2021:

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

-----  
Bc. Anna Bělušová  
student(ka)

-----  
Ing. Jiří Smilek, Ph.D.  
vedoucí práce

-----  
prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.  
vedoucí ústavu

V Brně dne 1.2.2021

-----  
prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.  
děkan

## ABSTRAKT

Předložená diplomová práce se zabývá studiem interakcí mezi huminovými kyselinami, coby hlavní komponentou půdní organické hmoty a modelovým organickým polutantem v podobě kationického tenzidu – Septonexu (u něhož byla očekávána pozitivní interakce s huminovými kyselinami vzhledem k jeho náboji) prostřednictvím nekonvenčního spojení dialyzačních a difúzních technik realizovaných v difúzních celách společně s izotermickou titrační kalorimetrií schopnou objasnit charakter probíhajících reakcí z termodynamického hlediska. Experimenty byly prováděny se standardem huminových kyselin izolovaných z Leonarditu (1S104H), pořízeném od Mezinárodní společnosti pro huminové látky, s huminovými kyselinami izolovanými z lignitu a z černozemě modální. Cílem předložené diplomové práce je posouzení vlivu karboxylových funkčních skupin ve struktuře huminových kyselin při interakcích s kationickým Septonexem. Z tohoto důvodu byly zmíněné vzorky huminových kyselin modifikovány selektivní methyloací jejich karboxylových funkčních skupin, které se již dále nemohou podílet na interakcích s iontovými látkami. Výsledky z difúzních cel i z izotermické titrační kalorimetrie potvrdily předpoklad, že Septonex interagoval se všemi typy nemodifikovaných huminových kyselin více než s jejich methylovanými formami. Navzdory dostupné literatuře bylo překvapivé, že rozdíly v interakci huminových kyselin se Septonexem nebyly diametrálně odlišné při porovnání nemodifikovaných huminových kyselin s jejich methylovanými formami. Míra těchto interakcí byla posuzována skrze zdánlivou rovnovážnou konstantu  $K_{app}$  stanovenou při difúzních (dialyzačních) experimentech a z průběhu entalpických křivek z izotermické titrační kalorimetrie. Po provedených experimentech a jejich vyhodnocení lze dojít k závěru, že huminové kyseliny a Septonex při svých interakcích, vzhledem ke svým strukturám, pravděpodobně uplatňují nejen elektrostatické interakce, především přes dostupné karboxylové funkční skupiny huminových kyselin a kladně nabitě hydrofilní části molekul Septonexu, ale nezanedbatelnou roli při nich zastávají i hydrofobní efekt, vodíkové vazby a Van der Waalsovy síly.

## KLÍČOVÁ SLOVA

difúze, dialýza, izotermická titrační kalorimetrie, interakce, methylace, huminové kyseliny, tenzidy

## **ABSTRACT**

The presented diploma thesis deals with the study of interactions between humic acids as the main component of soil organic matter with a model organic pollutant presented by cationic surfactant Septonex (which was expected to interact positively with humic acids due to its charge) through unconventional combination of dialysis and diffusion techniques realized in diffusion cells together with isothermal titration calorimetry capable of elucidating the nature of ongoing reactions from a thermodynamic point of view. The experiments were performed with a humic acid isolated by standard isolation procedure from Leonardite (1S104H) purchased from the International Society for Humic Substances, with humic acids isolated from lignite as well as modal chernozem. The aim of the submitted diploma thesis is to assess the influence of carboxyl functional groups in the structure of humic acids to interactions with Septonex. For this reason, said samples of humic acids have been modified by selective methylation of their carboxyl functional groups, which can no longer participate in interactions with ionic substances. Results from diffusion cells and isothermal titration calorimetry confirmed the assumption that Septonex interacted with all types of unmodified humic acids more than with their methylated derivatives. Despite the available literature, it was surprising that the differences in the interaction of humic acids with Septonex were not diametrically different when comparing unmodified humic acids with their methylated derivatives. The extent of these interactions was assessed through the apparent equilibrium constant  $K_{app}$  determined in the diffusion (dialysis) experiments and from the course of enthalpy curves from isothermal titration calorimetry. After the experiments and their evaluation, it can be concluded that humic acids and Septonex in their interactions, due to their structures, probably apply not only electrostatic interactions, especially through available carboxyl functional groups of humic acids and positively charged hydrophilic parts of Septonex molecules, but also a significant role have a hydrophobic effect, hydrogen bonds and Van der Waals forces.

## **KEYWORDS**

diffusion, dialysis, isothermal titration calorimetry, interactions, methylation, humic acids, surfactants

BĚLUŠOVÁ, Anna. *Vliv methylace huminových kyselin na interakci s povrchově aktivními látkami*. Brno, 2021. 68 s. Diplomová práce na Fakultě chemické Vysokého učení technického v Brně, Ústavu fyzikální a spotřební chemie. Vedoucí práce Ing. Jiří Smilek, 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 VUT.

.....  
Bc. Anna Bělušová

*Na tomto místě bych rána poděkovala vedoucímu mé diplomové práce Ing. Jiřímu Smilkovi, Ph.D. a konzultantce Ing. Jitce Krouské, Ph.D., za jejich přístup, vedení, cenné rady a čas, který mi věnovali při koncepčním i dílčích řešeních této práce a zároveň za jejich pomoc při provádění experimentů. Dále bych chtěla poděkovat Ing. Michalu Kalinovi, Ph.D., Ing. Petru Sedláčkovi, Ph.D. a Ing. Vojtěchu Enevovi, Ph.D. za jejich pomoc při pracích v experimentální části. V neposlední řadě patří velké poděkování mé rodině a přátelům za jejich trvalou podporu během celého mého studia.*

## OBSAH

<b>1</b>	<b>ÚVOD</b> .....	<b>6</b>
<b>2</b>	<b>TEORETICKÁ ČÁST</b>	<b>7</b>
2.1	Huminové látky .....	7
2.1.1	Vznik huminových látek .....	7
2.1.2	Rozdělení huminových látek .....	8
2.1.3	Struktura a vlastnosti huminových látek .....	9
2.1.4	Vazebné možnosti huminových kyselin .....	11
2.1.5	Modifikace huminových kyselin .....	12
2.1.6	Využití huminových kyselin .....	13
2.2	Povrchově aktivní látky – tenzidy .....	14
2.2.1	Struktura a vlastnosti tenzidů .....	14
2.2.2	Dělení tenzidů .....	16
2.3	Izotermická titrační kalorimetrie .....	18
2.4	Difúze .....	20
2.5	Dialýza .....	21
2.5.1	Nerovnovážná dialýza .....	22
2.5.2	Rovnovážná dialýza .....	22
<b>3</b>	<b>SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY</b>	<b>25</b>
3.1	Interakce huminových látek s tenzidy .....	25
<b>4</b>	<b>EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST</b>	<b>32</b>
4.1	Použité pomůcky a přístroje .....	32
4.2	Použité chemikálie .....	32
4.3	Selektivní methylace karboxylových skupin huminových kyselin .....	33
4.4	Metody charakterizace huminových kyselin .....	33
4.4.1	Elementární analýza (EA) a termogravimetrie (TGA) .....	33
4.4.2	Infračervená spektrofotometrie s Fourierovou transformací (FT-IR) .....	34
4.4.3	Titrační určení kyselosti huminových kyselin .....	34
4.4.4	Stanovení kritické agregační koncentrace (CAC) Septonexu s HK a mHK .....	35
4.5	Stanovení kritické micelární koncentrace (CMC) Septonexu .....	36
4.5.1	Metoda rozptylu světla .....	36
4.5.2	Stanovení CMC měřením povrchového napětí .....	37
4.6	Difúzní (dialyzační) experimenty .....	37
4.6.1	Příprava roztoků pro difúzní (dialyzační) experimenty .....	39
4.6.2	Příprava difúzních cel k měření .....	39
4.7	Potenciometrická titrace kationického tenzidu Septonexu s iontově selektivní elektrodou (ISE) pro tenzidy .....	40
4.8	Izotermická titrační kalorimetrie (ITC) .....	42

<b>5</b>	<b>VÝSLEDKY A DISKUZE</b>	44
5.1	Charakterizace huminových kyselin .....	44
5.1.1	Elementární analýza (EA) a termogravimetrie (TGA).....	44
5.1.2	Infračervená spektrofotometrie s Fourierovou transformací (FT-IR) .....	45
5.1.3	Titrační určení kyselosti huminových kyselin.....	46
5.1.4	Stanovení kritické agregační koncentrace (CAC) Septonexu s HK a mHK .....	47
5.2	Stanovení kritické micelární koncentrace (CMC) Septonexu.....	49
5.2.1	Metoda rozptylu světla .....	49
5.2.2	Stanovení CMC měřením povrchového napětí .....	50
5.3	Difúzní (dialyzační) experimenty.....	50
5.3.1	Agregace LHK a Septonexu pozorovaná v přijímací komoře difúzní cely .....	56
5.4	Izotermická titrační kalorimetrie (ITC).....	56
<b>6</b>	<b>ZÁVĚR</b>	61
<b>7</b>	<b>SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ</b>	62
<b>8</b>	<b>SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK</b>	66
8.1	Seznam symbolů .....	66
8.2	Seznam zkratk .....	66
<b>9</b>	<b>PŘÍLOHY</b>	68

## 1 ÚVOD

O huminových kyselinách, coby esenciální součásti půdní organické hmoty, je známo, že značně ovlivňují mobilitu znečišťujících látek – obecně polutantů (jako jsou těžké kovy, organická barviva, tenzidy, pesticidy aj.) v životním prostředí. Z hlediska praktické využitelnosti huminových látek a jejich derivátů, nejen při ochraně, resp. rekultivaci životního prostředí, je důležitá znalost jejich chemické struktury a adsorpčních vlastností vůči těmto znečišťujícím látkám s uplatňujícími se vazebnými interakcemi. Porozumět jejich charakteru je proto neustále předmětem zkoumání. V rámci předložené diplomové práce byly možnosti interakcí huminových kyselin s organickými polutanty studovány transportním a termodynamickým přístupem. Kationický tenzid Septonex, použitý při experimentech, byl zvolen jako modelový organický polutant. Důraz byl kladen především na vyhodnocení důležitosti karboxylových funkčních skupin huminových kyselin při těchto interakcích, které jsou dle dostupné literatury [2, 5] obecně považovány za jedny z nejdůležitějších, nejvíce zastoupených, a tím i nejvíce reaktivitu ovlivňujících skupin při interakcích huminových kyselin s různými organickými i anorganickými látkami. K tomuto účelu byly karboxylové funkční skupiny ve vzorcích huminových kyselin selektivně blokovány methylovou skupinou, čímž se jim znemožnilo podílet se na interakcích s iontovými látkami. Tato práce má za cíl potvrdit teoretický předpoklad větších interakcí Septonexu s nemodifikovanými huminovými kyselinami než s jejich methylovanými formami.



## 2 TEORETICKÁ ČÁST

### 2.1 Huminové látky

Jsou přírodní organické sloučeniny vznikající chemickým a biologickým rozkladem organické hmoty (převážně rostlinných a živočišných zbytků) a syntetickou činností mikroorganismů ve složitém procesu nazývaném humifikace. Huminové látky jako podstatná část humusu zahrnují huminové kyseliny, fulvinové kyseliny a huminy. 60-80 % celkového organického uhlíku v půdě se vyskytuje ve formě huminových kyselin, 50-75 % rozpustné organické hmoty ve vodě se sestává z huminových a fulvinových kyselin. Za nejdůležitější frakci humifikované půdní organické hmoty jsou považovány huminové kyseliny díky svému až 16 % podílu na celkovém koloběhu uhlíku v přírodě [1, 2].

Huminové látky se vyskytují vedle půd i v kaustobiolitech, tj. sedimentech s vysokým obsahem organických látek jako jsou rašelina, černé a hnědé uhlí, lignit, leonardit a ropa, a v nižších koncentracích také v přírodních vodách. Jejich obsah se v přírodních matricích pohybuje od stopových množství (v píscích a jílech), přes jednotky procent (3 % v běžných zeminách, 3-10 % v hnědém uhlí) až k desítkám procent. Mimořádně vysoký obsah vykazuje lignit, rašelina a oxyhumolit, neboli zoxidované hnědé uhlí (až do 85 %). Většinou se huminové látky z těchto zdrojů získávají extrakčními, frakcionačními a izolačními procedurami použitím kyselých a zásaditých roztoků [1]. Na tomto principu je založen i standardní operační postup pro izolaci huminových látek dle metodiky Mezinárodní společnosti pro huminové látky (IHSS) [3].

Výskyt huminových látek takřka v celém ekosystému Země je přirozenou motivací k tomu, aby byly hlouběji zkoumány a jejich vlastnosti využívány při ozdravných procesech v krajině.

#### 2.1.1 Vznik huminových látek

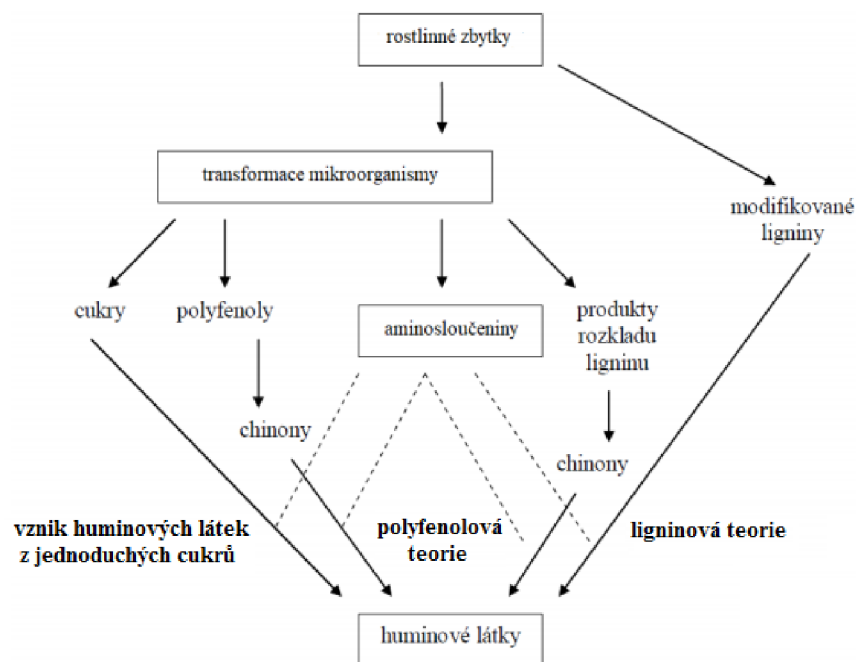
I když dodnes není přesný mechanismus vzniku huminových látek zcela objasněn, všechny teorie souhlasí s tím, že materiál pro jejich vznik je jak rostlinného, tak i živočišného původu. **Tři hlavní teorie vzniku huminových látek** schematicky znázorňuje Obrázek 1.

V **první** – nejstarší – **ligninové teorii** se předpokládalo, že huminové látky se vytvořily z neúplně mikrobiálně rozloženého ligninu, který byl dále modifikován.

**Druhá** – v současnosti nejvíce zastávaná – **polyfenolová teorie** pracuje s chinony, coby hlavními stavebními jednotkami při tvorbě huminových kyselin. V rámci této teorie dochází k mikrobiálnímu rozkladu ligninu i jiných rostlinných polymerů na polyfenolové jednotky, které jsou následně enzymaticky nebo chemicky v alkalickém prostředí přeměněny na chinony. Tyto látky poté reagují s dusíkatými sloučeninami a polymerizují za vzniku huminových makromolekul.

**Třetí teorie** popisuje vznik huminových látek z **jednoduchých cukrů** při reakcích mezi redukcujícími cukry a aminokyselinami za vzniku hnědých, dusík obsahujících polymerů.

Všechny výše popsané teorie mohou být považovány za možné mechanismy vzniku huminových látek v přírodě, přičemž v konkrétních podmínkách prostředí se uplatní ten či onen [1, 4, 5].



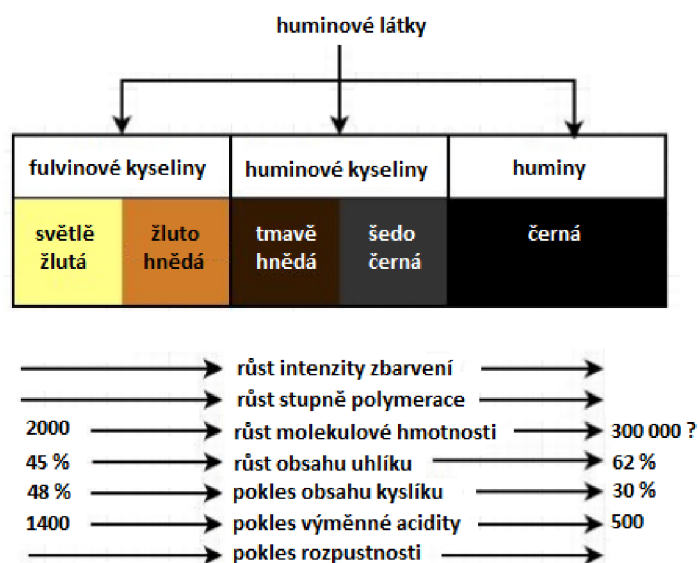
Obrázek 1: Možné mechanismy vzniku huminových látek [1]

### 2.1.2 Rozdělení huminových látek

Humínové látky lze dělit na základě jejich různé rozpustnosti v kyselém a alkalickém prostředí na tři hlavní frakce:

- tmavohnědé **humínové kyseliny** rozpustné při hodnotách pH nad 2 a v kyselejším prostředí precipitující,
- žlutohnědé **fulvinové kyseliny** ve vodných roztocích rozpustné v celém rozsahu pH
- a na ve vodných roztocích **nerozpustné** černě zbarvené **huminy**.

Ačkoli jsou si tyto látky chemickou strukturou blízké, z hlediska chemických a fyzikálních vlastností se značně odlišují, jak ukazuje Obrázek 2 [2].



Obrázek 2: Nejdůležitější vlastnosti a rozdělení huminových látek [1]

### *Humínové kyseliny*

Obsahují více uhlíku, vodíku a dusíku, ale méně kyslíku než fulvínové kyseliny. Jejich základní jednotky tvoří aromatická jádra fenolového, anebo chinonového typu, propojená různými funkčními skupinami (–O–, –NH–, –N–, –CH<sub>2</sub>–). Ve struktuře humínových kyselin se mohou nacházet i aromatické strukturní jednotky, tj. benzen, naftalen, anthracen nebo pyridin. Díky zastoupení různorodých funkčních skupin (–COOH, –OH, –NH<sub>2</sub>, –CH<sub>3</sub>, –SO<sub>3</sub>H, –C=O, –OCH<sub>3</sub>, –PO<sub>3</sub>H<sub>2</sub>) a relativně vysoké chemické stabilitě jsou humínové kyseliny schopné interakce s téměř všemi sloučeninami a strukturami v jejich přirozeném okolí, tj. s organickými a anorganickými molekulami, minerálními ionty i minerálními a mikrobiálními povrchy [1, 2].

### *Fulvínové kyseliny*

Jde o organické látky, zůstávající v roztoku po kyselém vysrážení humínových kyselin. Od humínových kyselin se liší menší relativní molekulovou hmotností a menším obsahem aromatických struktur, ale zato větším počtem alifatických řetězců a větším obsahem kyslíku. Hojnější zastoupení karboxylových skupin (na rozdíl od fenolových) jim dává oproti humínovým kyselinám kyselejší charakter, a proto disponují lepší rozpustností ve vodných roztocích. To je důvod, proč mezi humínovými látkami ve vodě zpravidla převládají. Stejně jako jejich soli se vyskytují v půdě nejčastěji v adsorbované formě. S oxidy železa a hliníku vytvářejí organominerální sloučeniny. Díky svým vlastnostem jsou nejreaktivnější frakcí humínových látek ve vodném prostředí [1, 2].

### *Humíny*

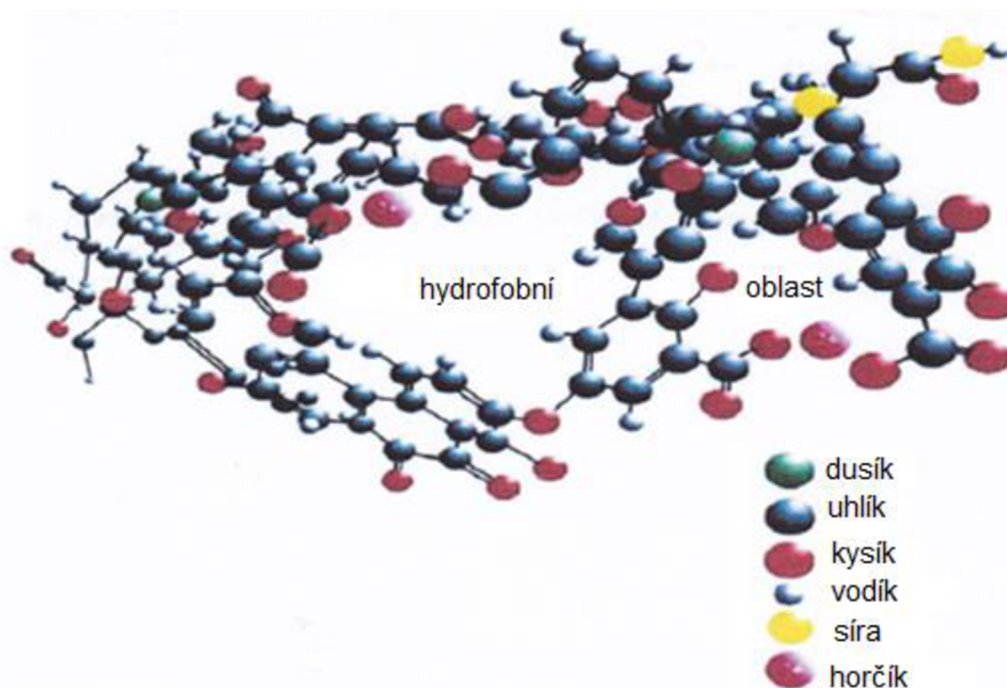
Jsou kondenzovanější a silněji dehydrované než humínové kyseliny. Někteří autoři pokládají humíny v podstatě za humínové kyseliny pevně vázané na minerální podíl půdy, dle jiných pramenů jde o silně karbonizovanou organickou hmotu charakterizovanou jako nerozpustné humínové kyseliny. Jejich schopnost zadržování vody, sorpce a vázání kovů je tak v porovnání s klasickými humínovými a fulvínovými kyselinami slabá. Udává se, že společně s humusovým uhlím obsahují humíny 20-30 % z celkového množství dusíku v půdě [1].

#### **2.1.3 Struktura a vlastnosti humínových látek**

Humínové látky jsou složité polycyklické sloučeniny s relativní molekulovou hmotností v rozmezí několika stovek až desítek tisíc Daltonů. Z fyzikálně chemického hlediska se ve vodě chovají jako hydrofilní koloidy s různým stupněm disperzity, jejichž strukturní jednotky mají v přírodních vodách záporný náboj a izoelektrický bod ležící v kyselé oblasti. **Základní strukturní jednotkou** fulvínových i humínových kyselin jsou **převážně polycyklické aromatické sloučeniny s bočními alifatickými řetězci a hydrofilními skupinami** vázanými jak na jádru, tak v postranním řetězci. Kromě aromatických jader byly zjištěny i chinoidní struktury, které jsou spolu s hydroxyskupinami příčinou jejich oxidačně-redukčních vlastností, a také dusíkaté heterocyklické sloučeniny. Charakteristická je zejména karboxylová a hydroxylová funkční skupina, a to zejména fenolová, dále alkoholická, methoxylová a karbonylová. **Karboxylové a fenolové skupiny** (případně ještě alkoholické) **dominují**, a jsou **příčinou kyselosti a komplexační a sorpční kapacity** humínových látek pro různé anorganické i organické látky. Tyto skupiny jsou i příčinou polárního charakteru humínových látek. Obvykle se udává, že v molekule humínových kyselin je 4-5 karboxylových skupin

na 3-4 skupiny fenolové. Příčinou komplexačních vlastností huminových látek, zvětšujících se s rostoucí hodnotou pH, je především přítomnost většího počtu karboxylových a fenolových skupin v poloze ortho, poněvadž se při vazbě kovových kationtů z těchto skupin uvolňují vodíkové kationty. Huminové látky mají díky obsahu hydrofilních i hydrofobních skupin povrchově aktivní charakter, což hraje významnou roli při utváření micelárních útvarů. Huminové látky tak mohou přilnout na povrch některých částic a ovlivnit jejich srážení nebo rozpustnost [2, 5].

Již desítky let se mnoho týmů výzkumníků snaží objasnit a sestavit hypotetické struktury huminových látek, vysvětlující jejich fyzikálně-chemické vlastnosti, reaktivitu a vazebné možnosti s různými látkami. Ze začátku se za nejpravděpodobnější považoval tzv. **polymerní model**, pohlížející na huminové kyseliny jako makromolekuly s lineární strukturou. V současnosti, s příchodem nových možností instrumentálních metod, jsou však huminové kyseliny označovány za **supramolekulární agregáty menších heterogenních molekul** (jako jsou aromatické fragmenty ligninu, alifatické řetězce, fragmenty polysacharidů a polypeptidů) s velikostí menší 2 kDa, které nejsou vzájemně vázané kovalentními vazbami, jak předpokládal dřívější polymerní model, ale stabilizované (samouspořádané) slabými silami, jako jsou disperzní hydrofobní interakce (Van der Waalsovy síly,  $\pi$ - $\pi$  a CH- $\pi$  interakce). Dále bylo zjištěno, že klíčovou roli při celkové stabilitě těchto supramolekulárních agregátů zastávají kationty kovů, kovalentně poutané s výše uvedenými organickými fragmenty [4, 6]. Supramolekulární model huminových kyselin, beroucí v úvahu vznik hydrofobních domén ve struktuře huminových látek realizovaný silně nepolárními stavebními jednotkami, ukazuje Obrázek 3 [7].



Obrázek 3: Supramolekulární model struktury huminových kyselin [7]

#### 2.1.4 Vazebné možnosti huminových kyselin

Huminové kyseliny značně ovlivňují mobilitu znečišťujících látek (jako jsou těžké kovy, organická barviva, tenzidy, pesticidy aj.) v životním prostředí, což je důvodem ke zkoumání jejich chemické struktury a adsorpčních vlastností. Při pH běžném pro většinu přírodních i zemědělských půd (s průměrnou hodnotou pH 6,2 pro ornou půdu a 5,4 pro trvalé travní porosty v ČR [8]) jsou huminové kyseliny pravděpodobně záporně nabitě – a tedy schopné adsorpce a přitahování kationtů. Když jsou navíc ve struktuře huminových látek spolu s karboxylovými skupinami disociované i skupiny fenolové, mohou probíhat složité chelatační reakce s ionty kovů i jinými složkami půdy. V půdním prostředí vytvářejí huminové kyseliny organominerální komplexy, přičemž jejich sorpce závisí jednak na typu jílového minerálu, ale také na chemické struktuře huminových kyselin, tj. funkčních skupinách, stupni humifikace a oxidace. Za hlavní mechanismus vazebného procesu huminových kyselin považují někteří autoři iontově výměnné interakce. Také bylo zjištěno, že hodnoty kationtové výměnné kapacity huminových látek se zvyšují přímo úměrně s hodnotou pH vodného média [1, 9, 10].

Je známo, že huminové kyseliny umí vázat kationty skrze elektrostatické interakce, ale stejně tak i neiontové organické sloučeniny pomocí vodíkových vazeb, dipól-dipól interakcí a hydrofobních interakcí. Experimentální práce naznačují, že kationtové sloučeniny interagují především s deprotonovanými karboxylovými skupinami huminových kyselin. Jiné funkční skupiny huminových kyselin, jako jsou chinony, mohou tvořit kovalentní vazby s aromatickými aminy či podobnými organickými sloučeninami. Interakce huminových kyselin s hydrofobními organickými látkami jsou způsobeny především  $\pi$ - $\pi$  interakcemi a hydrofobním efektem [11, 12].

Z hlediska využitelnosti huminových látek a jejich derivátů, nejen v oblasti životního prostředí, je důležitá znalost možných vazebných interakcí těchto látek s cizorodými látkami. Na základě dostupných informací **lze předpokládat několik typů vazebných interakcí mezi huminovými látkami a cizorodými látkami** (kontaminanty), přítomnými v půdě [10]:

##### ***Iontová vazba***

Tento typ vazby vychází z působení elektrostatických sil mezi fixními náboji přítomných funkčních skupin a ionty vyskytujícími se v roztoku. V jistém zjednodušeném pohledu se tak na huminové látky lze dívat jako na ionexy. Vznik elektrostatické vazby se dá u huminových látek předpokládat například u alkalických kovů a amoniaku.

##### ***Koordinační vazba***

Z hlediska imobilizace toxických kovů, nacházejících se v podzemních či odpadních vodách, představuje koordinační vazba nejdůležitější typ vazebné interakce. Potenciál vzniku těchto vazeb je tu dán značným zastoupením karboxylových a fenolických skupin ve struktuře huminových látek, a také hodnotou pH, a tím mírou disociace těchto funkčních skupin. Ve slabě kyselé oblasti se na vzniku koordinačních vazeb podílejí hlavně karboxylové skupiny, k nimž se s rostoucím pH nad 7 přidávají i fenolické funkční skupiny. Všeobecně se stabilita vznikajících komplexů s růstem pH zvyšuje, a to především u těch iontů (např.  $\text{Cu}^{2+}$ ), které tvoří silné karboxylát-fenolické komplexy.

### ***Kovalentní vazba***

Poznatek, že ve struktuře huminových látek může docházet k trvalé fixaci kontaminantů skrze kovalentní vazbu, byl prokázán na přelomu 70. a 80. let minulého století u antracenu při izolaci huminových kyselin z půdy znečištěné polyaromatickými uhlovodíky. Tuto vazbu tvoří huminové látky převážně s těžkými kovy a polyaromatickými polutanty díky přítomnosti karboxylových a fenolových funkčních skupin.

### ***Vodíkové můstky***

I když přesná struktura huminových látek není zcela objasněna, lze na základně prokázané přítomnosti některých funkčních skupin (amidová, laktamová, nitrilová) předpokládat vznik vodíkových můstků. Vodíková vazba má význam i při adsorpci organických molekul na huminové látky.

### ***Hydrofobní interakce***

Tento typ vazby vzniká při kontaktu nepolárních, např. alkylových skupin nesených molekulami, které se nachází ve vodném roztoku, kde tyto interakce mohou vycházet z působení van der Waalsových sil, anebo přesunu  $\pi$ -elektronů. Hydrofobní interakce jsou nejčastěji předpokládanou vazebnou interakcí huminových kyselin s hydrofobními a alifatickými kontaminanty. Touto interakcí je například vysvětlována skutečnost, že insekticid parathion ztrácí za přítomnosti huminových látek část své toxicity.

### **2.1.5 Modifikace huminových kyselin**

Jak již bylo zmíněno výše, dle literatury [2, 5] jsou karboxylové, hydroxylové (a zejména fenolové) funkční skupiny obecně považovány za jedny z nejdůležitějších, nejvíce zastoupených, a tím pádem i nejvíce reaktivitu ovlivňujících skupin v huminových kyselinách [2]. Za účelem posouzení zapojení těchto funkčních skupin při interakcích s kontaminanty proto již mnozí autoři prováděli jejich „selektivní blokáce“ modifikací, neboli navázáním vhodné strukturní jednotky, čímž těmto skupinám dále zabránili v podílu na interakcích s iontovými látkami. Díky selektivním modifikacím těchto funkčních skupin je tak možné více porozumět, jakým způsobem interagují huminové kyseliny s iontovými kontaminanty, a vyhodnotit tak vliv zapojení ostatních funkčních skupin a efektů podílejících se na těchto interakcích.

Mezi modifikace huminových kyselin patří například vysoce úspěšné (myšleno z hlediska míry účinnosti) selektivní methylace karboxylových skupin z tvaru  $-\text{COOH}$  na  $-\text{COOCH}_3$ , za použití thionyl chloridu a methanolu [13]; či trimethylsilyl diazomethanu v přítomnosti methanolu a chloroformu [14], s účinností blokáce karboxylových skupin dosahující až 92 %. Pro methylace kyselých funkčních skupin je běžně využíván diazomethan. Toho využili autoři v práci [15] pro methylaci karboxylových i fenolových skupin ve struktuře huminových kyselin, z tvaru  $-\text{COOH}$  a  $-\text{OH}$  na  $-\text{COOCH}_3$  a  $-\text{OCH}_3$ , ale i na methylaci pouze fenolových skupin pomocí dvou krokové modifikace, zahrnující nejprve již zmíněný diazomethan, a poté hydrolýzu esterových skupin pomocí NaOH (autoři však poznamenávají, že touto dvou krokovou metodou mohlo dojít i k methylaci jiných kyselých  $-\text{OH}$  skupin než jsou ty fenolové, u nichž se navíc blokáce povedla jen částečně). Jiní autoři [16] modifikovali fenolové

a alkoholové hydroxyly huminových kyselin acetylací, za použití anhydridu kyseliny octové a kyseliny sírové, úspěšnost blokace fenolových skupin však dosahovala pouze 2 %.

### **2.1.6 Využití huminových kyselin**

#### ***Zemědělství***

Příznivý vliv huminových kyselin v půdě je mnohostranný a neoddiskutovatelný. Spočívá v kladném ovlivnění všech půdních vlastností působících na obsah živin a úrodnost. Huminové kyseliny napomáhají prokypření a provzdušnění půdy, a díky zadržování molekul vody a živin napomáhají jejich snadnějšímu příjmu rostlinami. Navíc biologicky stimulují rostlinné enzymy a podporují i růst půdních mikroorganismů. Proto se huminové kyseliny, například ve formě humátů vápenatých, sodných a amonných, přidávají do celé řady agrochemických produktů – jako jsou hnojiva, pesticidy, půdních kondicionéry a další [10, 17].

#### ***Průmysl***

Huminové kyseliny mohou být pro své chelatační a iontově výměnné vlastnosti v jistém smyslu považovány za ionexy. Stejně jako průmyslové ionexy mohou být deriváty huminových kyselin používány ve formě přísad do odpadní vody k zachycování iontů toxických kovů s následným oddělením sedimentací nebo filtrací, nebo mohou sloužit jako náplně do chromatografických kolon. Konkrétně lze zmínit například iontoměničové materiály na bázi humátu vápenatého pro odstraňování iontů těžkých kovů (jako je  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ) z vody. V papírenském a kožedělném průmyslu se huminové kyseliny ve formě humátu sodného používají jako barviva. Ve stavebnictví se huminové kyseliny uplatňují jako hydrofobní plniva cementů ovlivňující smáčivost, disperzitu a řízené vytvrzování těchto materiálů. Obdobné využití mají i v keramice. Dále mohou být přidávány do chladících kapalin pro brusné a řezací nástroje na zvýšení viskozity, kde zároveň plní funkci emulzifikátoru [10, 17]

#### ***Ochrana životního prostředí***

Huminové kyseliny jsou schopné interakce s běžnými polutanty v půdě a vodě, jako jsou například těžké kovy, tenzidy, barviva a jiné škodlivé látky, čímž je mohou imobilizovat, nebo alespoň zabránit jejich další migraci v prostředí. V půdních systémech na sebe vážou produkty degradace pesticidů, tedy herbicidů, insekticidů a fungicidů, čímž omezují jejich toxické účinky. Stejně tak ale redukuje i přesolení půd způsobené nadměrným používáním průmyslových minerálních hnojiv. Na ochraně životního prostředí se ale podílí i nepřímo: dobře vyvinutý kořenový systém rostlin díky vysokému obsahu huminových kyselin v půdě zabraňuje erozi i úniku nitrátů a pesticidů do spodních vod. Velmi perspektivní je možnost využití huminových kyselin k remediaci půd po průmyslových a důlních zátěžích [10, 17].

#### ***Medicínské aplikace***

Huminové kyseliny se již od dávných dob nevědomky využívaly coby účinná složka v hydroterapii a balneoterapii. Zájem o jejich využívání v medicíně tkví jednak v jejich antivirových a protizánětlivých vlastnostech, ale také v jejich schopnosti tvořit komplexy s těžkými kovy – čehož je možné využít při odstraňování těchto kovů nejen z vody a půdy,

ale i z živých organismů. Huminové kyseliny celkově aktivizují metabolismus, zlepšují ochranu a adaptační schopnosti zvířat a mají významnou úlohu v prevenci a terapii mnohých onemocnění. Bylo například pozorováno, že přídavek huminových kyselin do krmné směsi skotu [16] vedl k mírně zvýšené produkci mléka, tvorbě zdravého střevního epitelu, stabilizaci střevní mikroflóry a celkově lepší kondici a odolnosti zvířete proti infekcím. V jiné studii zase huminové kyseliny podávané krysám významně snížily poškození jejich žaludku vyvolaného ethanolem, a také zrychlovaly proces hojení žaludečních vředů. Mnoho lékařských studií ukázalo, že huminové látky, zejména fulvinové kyseliny, mají schopnost chránit organismus před rakovinou a viry s ní související, a také napomáhat při obtížně léčitelných virových respiračních onemocněních u dětí. Větší aplikace huminových látek v biochemii a farmacii jsou však bohužel omezeny zjištěním, že na mnoho savčích buněk působí cytotoxicky, dosud ne zcela objasněným mechanismem; hlavním důvodem má být zřejmě redukce a uvolňování železa z bílkoviny feritinu vyvolané huminovými kyselinami, vzhledem k jejich oxidačně-redukčním vlastnostem [17].

## 2.2 Povrchově aktivní látky – tenzidy

Pro povrchově aktivní látky (PAL) se používá název tenzidy. Jedná se o skupinu organických látek, které se již při nízké koncentraci významně hromadí (adsorbují) na fázovém rozhraní a snižují tak mezifázovou (povrchovou) energii. V soustavě kapalina-plyn se v důsledku této adsorpce snižuje povrchové napětí, a v soustavě kapalina-kapalina, resp. kapalina-tuhá látka se snižuje mezifázové napětí na fázovém rozhraní, mohou tedy fungovat jakožto emulgátory [2].

### 2.2.1 Struktura a vlastnosti tenzidů

Schopnost tenzidů se hromadit na fázovém rozhraní je způsobena strukturou jejich molekul – označovanou jako **amfifilní**. Právě díky této struktuře jsou tenzidy schopné snižovat povrchové napětí vodných roztoků i jiných rozpouštědel, což následně vede k lepšímu smáčení povrchu a odstraňování nečistot. Molekula tenzidu se skládá ze dvou částí. **Hydrofilní část** má velkou afinitu k vodě a vzájemně se přitahuje s jejími molekulami, **hydrofobní část** má velkou afinitu k nepolárním rozpouštědlům (obecně označovanými jako oleje) a s molekulami vody se vzájemně odpuzují a naopak. Hydrofilní částí tenzidu je nejčastěji polární skupina, a hydrofobní část je obvykle tvořena uhlovodíkovým zbytkem s lineární, nebo rozvětvenou strukturou nejčastěji z 12-18 uhlíkových atomů. Existují však i tenzidy, které ve své molekule obsahují dvě hydrofilní a jednu hydrofobní část, či jednu hydrofilní skupinu mezi dvěma hydrofobními částmi [19, 21].

Při malé koncentraci tenzidu ve vodném roztoku tak dochází k adsorpci jeho molekul na fázovém rozhraní. S rostoucí koncentrací tenzidu je postupně dosaženo stavu, kdy je fázové rozhraní zcela obsazeno jeho molekulami a zvyšuje se koncentrace volných molekul tenzidu v objemové fázi (uvnitř roztoku). Při dosažení **kritické micelární koncentrace** (CMC) je nakonec koncentrace tenzidu v objemové fázi tak velká, že začne docházet ke spojování jeho molekul (agregaci) do útvarů nazývaných **micely**, přičemž hydrofilní (polární) části molekul tenzidu jsou orientovány do polární fáze (vody), a hydrofobní (nepolární) části jeho molekul směřují do nitra micel. Za základní příčinu vzniku agregátů z uhlovodíkových řetězců

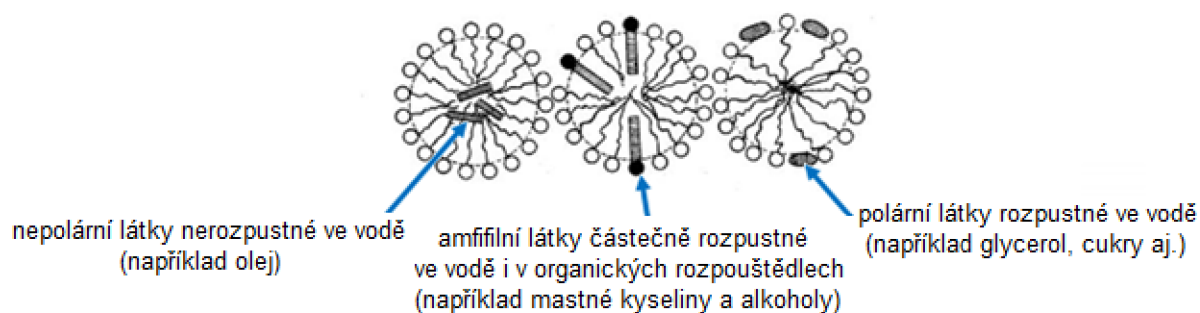


ve vodných roztocích jsou považovány velké kohezní síly mezi molekulami vody, které jsou daleko vyšší než vzájemná přitažlivost uhlovodíkových řetězců i přitažlivost mezi molekulami vody a uhlovodíkovými řetězci. Ve výsledku tak molekuly vody „jakoby vytěsňují“ uhlovodíkové řetězce z roztoku, což je spojeno s poklesem Gibbsovy energie soustavy, a tedy samovolností tohoto procesu. V některých případech se micely mohou tvořit i v nevodném prostředí, za vzniku tzv. obrácených micel, jejichž jádro tvoří polární skupiny, zatímco uhlovodíkové řetězce směřují ven do nepolárního prostředí. Je nutno podotknout, že kritická micelární koncentrace je spíše koncentrační interval a její hodnotu ovlivňuje jednak samotná struktura molekuly tenzidu, ale i teplota a přítomnost organických rozpouštědel či elektrolytů [19, 20, 21].

Fyzikálně chemické vlastnosti tenzidů, díky nimž se uplatňují jako hlavní součásti pracích, čistících, mycích, emulgačních, dispergačních a pěnicích prostředků, jsou dány protichůdným chováním jejich hydrofilních a hydrofobních částí, přičemž útvary zvané micely, do nichž se molekuly tenzidů v roztocích uspořádávají, jsou pro jejich využití v praxi zásadní [20].

### **Solubilizace**

Solubilizace je jev, který označuje rozpouštění ve vodě nerozpustných, případně nepatrně rozpustných organických sloučenin ve vodných roztocích tenzidů. Mechanismus solubilizace může být různý v závislosti na polaritě solubilizované látky, viz Obrázek 4. Pokud je ve vodném roztoku přítomno dostatečné množství tenzidových micel, tedy koncentrace tenzidu je vyšší než CMC, mohou se do jejich nitra v jistém množství zabudovávat nepolární látky, například nečistoty jinak nerozpustné ve vodě. Na tomto mechanismu fungují tenzidy v čistících a mycích prostředcích. Amfifilní látky, jako jsou mastné kyseliny a alkoholy, se začleňují do tenzidových micel tak, že jejich uhlovodíkové řetězce směřují dovnitř micel a polární skupiny do vodné fáze. Polární látky se solubilizují na povrchu micel nebo v jeho těsné blízkosti [19, 21].



Obrázek 4: Začleňování látek do tenzidových micel ve vodném roztoku [21]

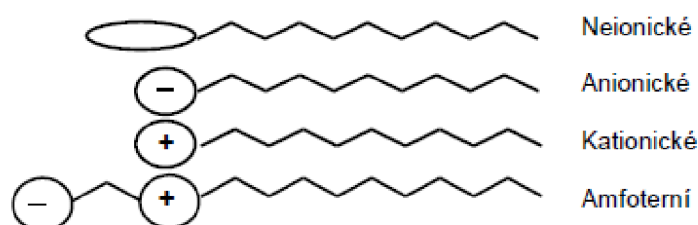
Solubilizace má velký praktický význam. Při detergenci se nečistota působením povrchově aktivních látek odstraňuje z pevného povrchu a převádí se ve formě suspenze nebo emulze do vodné fáze. Povrch solubilizované nečistoty má pak hydrofilní charakter a takováto nečistota se nemůže opětovně připoutat k čistému povrchu.

Orientování a koncentrování molekul při jejich solubilizaci v micelách může vést k podstatné změně kinetiky chemické interakce těchto molekul mezi sebou i jejich interakcí s látkami rozpouštěnými v jejich okolí. Toho se využívá při micelární katalýze. Další uplatnění

nachází solubilizace ve farmaceutickém i kosmetickém průmyslu, při výrobě herbicidů, insekticidů, fungicidů atd. V systémech s nepolárním prostředím, kde vznikají micely s hydrofilním jádrem a hydrofobním povrchem, dochází k tzv. obrácené solubilizaci. Příkladem je koloidní rozpouštění vody v oleji v přítomnosti povrchově aktivních látek, které se významně uplatňuje v potravinářském průmyslu [21].

### 2.2.2 Dělení tenzidů

Tenzidy lze hodnotit podle různých kritérií, nejčastější je však rozdělení **podle charakteru jejich hydrofilní části**, přesněji dle její schopnosti disociovat na ionty. Takto se tenzidy klasifikují na **ionické**, které se dále dělí na **anionické**, **kationické** a **amfoterní** (nabývající anionického nebo kationického charakteru dle pH prostředí) a na **neionické**, viz Obrázek 5. Ionické tenzidy obsahují funkční hydrofilní skupiny, schopné disociace ve vodě, přičemž vzniklé ionty jsou nositeli povrchové aktivity. Neionické tenzidy nemají náboj a ve vodném prostředí nedisociují, rozpouštějí se však solvatací většího počtu hydrofilních skupin [2, 20].

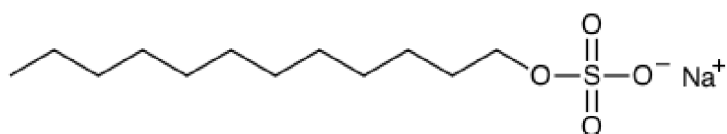


Obrázek 5: Dělení tenzidů dle jejich hydrofilní části [20]

#### *Anionické tenzidy*

Tyto tenzidy ve vodném prostředí disociují na záporně nabitý organický anion, který je nositelem povrchové aktivity a neaktivní kation. Anionické tenzidy patří stále mezi nejrozšířenější látky s nejučinnějšími detergenčními schopnostmi. Nejvyšší aktivitu vykazují v mírně alkalickém prostředí, v kyselém prostředí jsou obecně nestálé. Jsou kompatibilní vzájemně mezi sebou a s amfoterními a neionickými tenzidy.

Nejznámějšími a zároveň nejstaršími zástupci této skupiny jsou sodné a draselné soli karboxylových kyselin, neboli **mýdla**, jejichž velkou výhodou je snadná biologická rozložitelnost a vodohospodářská nezávadnost. Další důležitou skupinou jsou **alkylsulfáty** (alkylsíran), mající vysokou povrchovou aktivitu i v kyselém prostředí. Sodné soli alkylsulfátů se používají v pracích a čisticích prostředcích s nejlepší prací účinností při pH 8-10, v neutrálním prostředí jsou použitelné jako změkčovací prostředky. Do této skupiny patří jedna z nejznámějších povrchově aktivních látek – **dodecylsírán sodný** (SDS), znázorněný na Obrázku 6, použitý i v experimentální části této práce [2, 20].

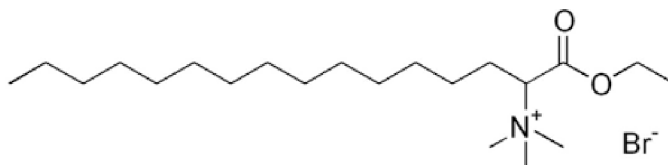


Obrázek 6: Dodecylsírán sodný [20]

### ***Kationické tenzidy***

Kationické tenzidy jsou sloučeniny obsahující jednu nebo více funkčních skupin, které ve vodném roztoku disociují na povrchově aktivní kladně nabitě organické ionty. Vzhledem k tomu jsou adsorbovány na negativně nabitých površích látek, např. půdy, skla, tkanin, ale i na povrchu mikroorganismů, kterým tak udělují hydrofobní charakter. Proto se prakticky neuplatňují v detergenčním procesu. Jejich význam spočívá především v jejich germicidních účincích, díky nimž jsou aplikovány do léčebných mastí a dezinfekčních přípravků a jako antiseptika (Ajatin, Septonex, Septosan). Dále jsou známy pro své antistatické a změkčovací účinky, pro které nacházejí uplatnění v textilním průmyslu jako součást aviváží. V kosmetice jsou zase využívány jako součást vlasových kondicionačních přípravků. Dále působí i jako inhibitory koroze. Kationtové tenzidy jsou (stejně jako aniontové) kompatibilní vzájemně mezi sebou a s amfoterními a neionickými tenzidy. Jejich nevýhodou je bohužel horší biologická rozložitelnost a také vyšší cena.

Zřejmě nejvýznamnější a nejvíce používanou skupinou kationických tenzidů tvoří **kvartérní amoniové soli**. Jejich hlavní uhlovodíkový řetězec obsahuje 12-18 uhlíků, zbývající řetězce jsou methylové nebo ethylové skupiny, protiontem bývá obvykle halogenidový aniont [2, 20]. Do této skupiny patří i **Septonex**, neboli N-( $\alpha$ -karbethoxypentadecyl) trimethyl ammonium bromid, znázorněný na Obrázku 7, coby modelový zástupce použitý v experimentální části této práce při studiu interakcí kationických tenzidů s huminovými kyselinami.



Obrázek 7: Septonex [23]

V medicíně je Septonex známý jako dezinfekční látka, brání rozmnožování bakterií a některých virů, používá se např. ve formě kapalného spreje k běžné dezinfekci drobných kožních poranění, nebo jako součást očních kapek (pod názvem Ophthalmo-Septonex [22]) a mastí k léčbě akutních a chronických nehnisavých zánětů.

### ***Amfoterní tenzidy***

Jsou charakterizovány přítomností dvou hydrofilních skupin – kyselé (karboxylové skupiny nebo sulfoskupiny) a zásadité (aminoskupiny nebo amoniové skupiny), které molekule udělují amfoterní charakter. V alkalickém prostředí se chovají jako anionické tenzidy a v kyselém prostředí jako kationické, kde je disociace karboxylové skupiny potlačena. V molekule musí mít alespoň jeden dlouhý alifatický řetězec. Mají velmi dobré prací a čistící schopnosti, nacházejí uplatnění v kosmetickém průmyslu a jako avivážní a antistatické prostředky s mikrobicidními účinky. Jejich velkou předností je jejich kombinovatelnost vzájemná i se všemi ostatními typy tenzidů [2, 20].

### ***Neionické tenzidy***

Tyto tenzidy ve vodném roztoku nedisociují, jejich rozpustnost ve vodě je však umožněna přítomností hydrofilních skupin vytvářejících vodíkové můstky (aminoskupiny, etherické

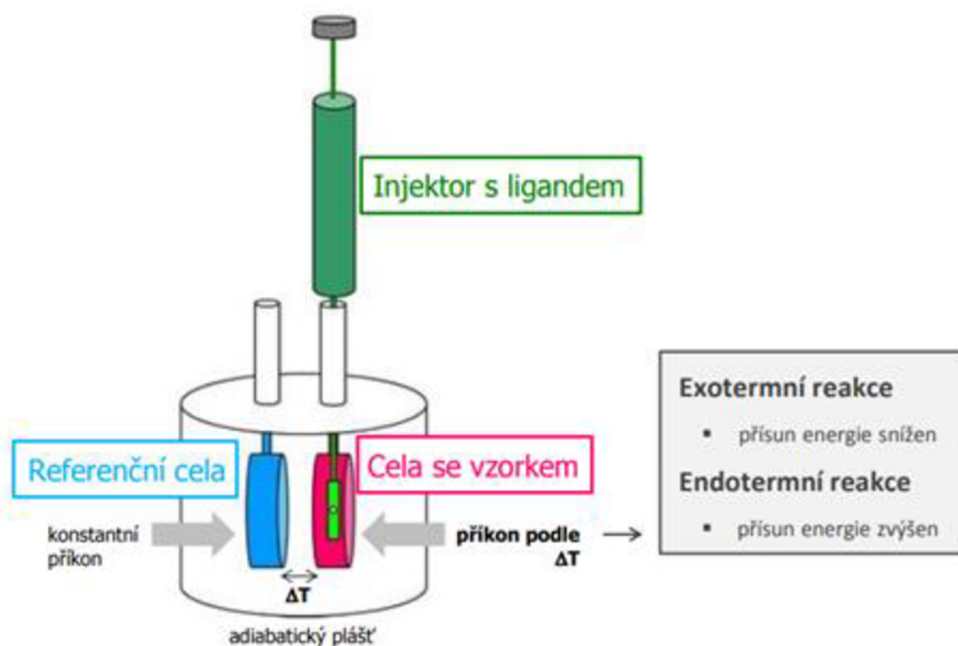
a hydroxylové skupiny), vázaných buď přímo nebo přes další funkční skupiny na hydrofobní část molekuly. Tyto tenzidy jsou netoxické, biologicky snadno odbouratelné (značný význam mají především neiontové tenzidy na bázi polyhydroxysloučenin) a používají se zejména v textilním průmyslu, kosmetice, zemědělství a potravinářství – při výrobě prostředků na chemické čištění látek, šamponů, pleťových krémů, zubních past, ale i jako přísady do krmiv hospodářských zvířat, kde zlepšují stravitelnost tuků, a při výrobě pečiva, kde zabraňují usychání. Jsou kompatibilní vzájemně mezi sebou i s ionickými typy tenzidů [2, 20].

### 2.3 Izotermická titrační kalorimetrie

Izotermická titrační kalorimetrie (ITC) je technika, kterou lze charakterizovat a stanovit povahu interakcí studovaných látek z pohledu termodynamiky, skrze přímé měření množství uvolněného či spotřebovaného tepla (přesněji tepelného toku) v průběhu reakce. Měření teplotního zabarvení reakce za konstantní teploty a tlaku následně umožňuje stanovení rovnovážné disociační konstanty ( $K_D$ ), z níž lze určit vazebnou afinitu reagujících látek; reakční stechiometrie ( $n$ ) a změny entalpie ( $\Delta H$ ), což je z molekulárního hlediska teplo spojené se vznikem, zánikem a deformací chemických vazeb. Ze získaných dat lze dále pomocí termodynamických vztahů určit i změnu Gibbsovy energie ( $\Delta G$ ), vypovídající o samovolnosti za daných podmínek, při kterých reakce probíhá, a změnu entropie ( $\Delta S$ ), popisující změnu uspořádanosti systému.

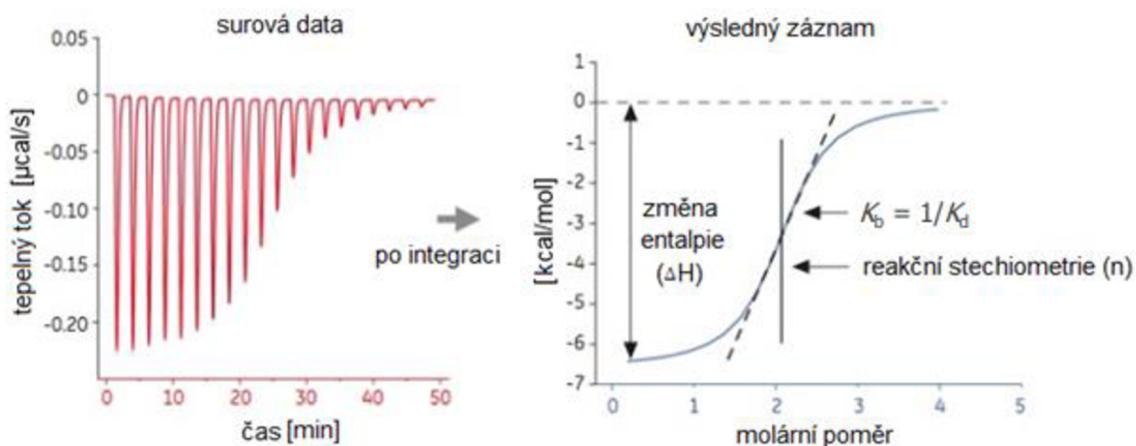
Izotermická titrační kalorimetrie je tedy technika poskytující kompletní termodynamický profil molekulární interakce, jehož pomocí lze více porozumět odehrávajícím se vazebným procesům mezi vybranými látkami, a to navíc v jejich přirozeném stavu – bez nutnosti jejich předchozích úprav jako je imobilizace, fluorescenční značení a podobně [24, 25, 26, 27].

**Izotermický titrační kalorimetr** je zařízení, které obsahuje v adiabatickém plášti uzavřené dvě identické kalorimetrické cely, referenční a vzorkovou, z chemicky odolných a výborně tepelně vodivých materiálů, které musí během celého měření udržovat na stejné ( $\pm 0,00012^\circ\text{C}$ ), předem nastavené teplotě. Teplotní změny mezi referenční a vzorkovou celou jsou v průběhu celého měření detekovány vysoce citlivým termočlánkem, umístěným v prostoru mezi celami, poskytujícím zpětnou vazbu topným tělískům, které mají za úkol kompenzovat tepelné změny mezi celami a obě je udržovat na stejné, předem nastavené teplotě. Změna přísunu elektrické energie pro vyrovnávání teplot obou cel je zaznamenávána v čase a ve finále vztažena k okamžité koncentraci jednotlivých reagujících složek ve vzorkové cele. Schéma izotermického titračního kalorimetru ukazuje Obrázek 8 [24, 25, 28].



Obrázek 8: Schéma izotermického titračního kalorimetru [28]

Během měření jsou velmi přesným injekčním zařízením s míchadlem a stříkačkou do cely se vzorkem postupně vpravovány malé přídavky titračního roztoku. Pokud dojde k vazbě mezi látkou přítomnou v titračním roztoku právě vstříknutou do vzorkové cely a látkou v ní původně obsaženou, jsou detekovány a měřeny tepelné změny v řádu miliontin stupně Celsia. V případě exotermní reakce, kdy se při vazbě molekul teplo uvolňuje, se vzorková cely stává teplejší než cely referenční, a tudíž je přísun energie na její ohřev snížen, což způsobí pokles měřeného signálu (tepelného toku) v měřicím záznamu. U reakce endotermní je tomu naopak. Během řady injekcí titračního roztoku se molární poměr mezi látkou v titračním roztoku a látkou původně obsaženou ve vzorkové cely zvyšuje, postupně však dochází k jejich vzájemnému nasycení, doprovázeném menším vznikem vazeb, čímž se změna teplot mezi referenční a vzorkovou celou snižuje. Výsledkem měření je surový záznam tepelného toku v čase. Po následné integraci ploch jednotlivých piků surového záznamu vznikne výsledný záznam coby závislost změny entalpie na molárním poměru reagujících látek, viz Obrázek 9 [24, 25, 28].



Obrázek 9: Příklad výstupu z ITC [28]

## 2.4 Difúze

Difúze je samovolný, nevratný a tepelně aktivovaný děj, při němž v soustavách s koncentračním gradientem dochází k přirozenému rozptylování pohybuschopných částic v dosažitelném prostoru, čímž postupně ve všech jeho částech vyrovnávají svoji koncentraci. Podstatou difúze je neuspořádaný tepelný pohyb (Brownův pohyb) každé jednotlivé částice, který podle zákonů termodynamiky umožňuje dosáhnout nejvyšší možnou míru entropie systému, a tedy stavu s nejnižší vnitřní energií.

Německý fyzik Adolf Fick zjistil, že difúze rozpuštěné látky je způsobena molekulárními silami, založenými na stejném principu jako je vedení tepla ve vodiči, a navrhl pro difúzi matematický popis – dnes známý jako **Fickovy zákony**. Ty popisují vztah mezi koncentračním gradientem a množstvím prodifundované látky a také závislost koncentračního gradientu na čase u nestacionární difúze.

Rychlost difúze je ve stacionárním prostředí vyjadřována difúzním tokem  $J_i$ , definovaným jako látkové množství difundující složky  $n_i$ , které za jednotku času ( $\tau$ ) projde jednotkovou plochou  $A$  kolmou ke směru difúze. Difúzní tok je roven součinu střední rychlosti toku částic  $u_i$  a jejich koncentrace  $c_i$ , viz rovnice (1) [21].

$$J_i = \frac{dn_i}{A \cdot d\tau} = u_i c_i \quad (1)$$

Podle **1. Fickova zákona** je difúzní tok při jednorozměrné **stacionární difúzi** úměrný koncentračnímu gradientu částic, viz rovnice (2) [21].

$$J_i = -D_i \cdot \frac{dc_i}{dx} \quad (2)$$

Difúzní koeficient  $D_i$  je číselně roven látkovému množství difundující složky  $i$ , které projde jednotkovou plochou za jednotku času při jednotkovém koncentračním gradientu. Závisí jak na vlastnostech prostředí, tak na vlastnostech difundujících částic. Při stacionární difúzi se koncentrační gradient  $dc_i/dx$  nemění s časem.

Při **nestacionární difúzi** popsané **2. Fickovým zákonem** se koncentrační gradient s časem mění a difúzní tok částic se mění s polohou, viz rovnice (3) a (4) [21].

$$\frac{dJ_i}{dx} = -\frac{dc_i}{d\tau} \quad (3)$$

$$\frac{dc_i}{d\tau} = D_i \cdot \frac{d^2c_i}{dx^2} \quad (4)$$

Na základě hydrodynamické teorie odvodil Einstein vztah mezi difúzním koeficientem  $D_i$ , koeficientem tření (frikčním koeficientem)  $f_i$ , a absolutní teplotou  $T$ . Jestliže je možno zanedbat vliv vnějších sil (např. gravitace) a uvažujeme-li pouze difúzi, působí na disperzní částici hybná síla difúze a proti ní brzdí síla prostředí, které ji obklopuje. Jakmile se obě síly vyrovnají, nastane rovnovážný stav a dostaneme **Einsteinovu rovnici pro difúzní koeficient**, viz rovnice (5) [21].

$$D_i = \frac{k_B T}{f_i} \quad (5)$$

Dle tohoto vztahu je difúzní koeficient přímo úměrný teplotě  $T$  a nepřímo úměrný koeficientu tření  $f_i$ , který charakterizuje odpor prostředí proti pohybu částice, kde  $k_B$  je Boltzmannova konstanta. Koeficient tření závisí na teplotě, rozměrech a tvaru částice a na viskozitě disperzního prostředí. V kapalném prostředí, které obsahuje velké difundující částice ve srovnání s molekulami disperzního prostředí a jejich střední volnou dráhou, lze v případě systémů s kulovitými (popř. izometrickými) částicemi vyjádřit koeficient tření **Stokesovou rovnicí** (6), kde  $r_i$  je poloměr částice a  $\eta_0$  viskozita disperzního prostředí. Pro difúzní koeficient tak dostaneme **Einsteinovu-Stokesovu rovnici** (7) [21].

$$f_i = 6\pi\eta_0 r_i \quad (6)$$

$$D_i = \frac{k_B T}{6\pi\eta_0 r_i} \quad (7)$$

V koloidních systémech je **difúze** řádově pomalejší než v analytických disperzích, a z výše uvedených vztahů je patrné, že **klesá s rostoucí velikostí částice a roste se stoupající teplotou**, poněvadž viskozita kapalného disperzního prostředí s rostoucí teplotou klesá [21].

## 2.5 Dialýza

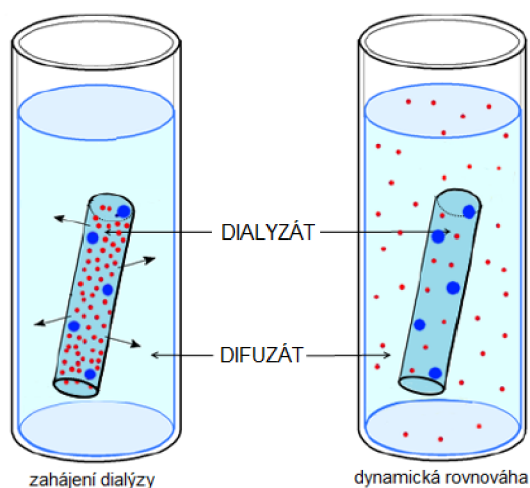
Je separační metoda, jejímž principem je **difúze** rozpuštěných částic přes **polopropustnou membránu**. Polopropustná (semipermeabilní) membrána, ať už přirozená či umělá, má póry, kterými mohou projít pouze některé z iontů nebo molekul přítomných v koncentrovanějším oddílu prostředí, zatímco větší molekuly (typicky polymery) skrze tyto póry neprojdou. Pro samotné rozpouštědlo je membrána prostupná oběma směry. Malé ionty a molekuly procházející póry membrány difundují, dokud se nevyrovná jejich koncentrace na obou stranách membrány. Tehdy se systém dostane do dynamické rovnováhy, kdy se děj z pohledu pozorovatele zastaví. Ve skutečnosti však výměna rozpouštědla i částic mezi oběma prostory membrány pokračuje, ovšem rovnovážně oběma směry. Polopropustné membrány využívané při dialýze jsou často vyrobeny z acetátu celulózy, neboli „celofánu“ [29, 30].

Charakteristickým parametrem každé membrány je tzv. *cut-off* hodnota (MWCO = *molecular weight cut-off*), což je limitní velikost molekul, které je membrána schopna propustit. Větší molekuly by měly být membránou zadrženy. Místo „*cut-off* hodnoty membrány“ se často používá ekvivalentního pojmu „velikost pórů membrány“ a obojí se udává v Daltonech (Da), např. 500 Da (v případě dialyzační membrány použité při experimentální části této práce).

Pro urychlení procesu dialýzy musí být po celou její dobu udržen dostatečný koncentrační spád – buď použitím velkého množství dialyzačního roztoku, nebo jeho častou výměnou. Rychlost tohoto procesu dále závisí na teplotě a na parametrech membrány, jako je její tloušťka, plocha a velikost a počet pórů. Dále hraje roli i afinita mezi membránou a difundujícími částicemi [29, 30].

### 2.5.1 Nerovnovážná dialýza

Při nerovnovážné dialýze se využívá polopropustné membrány **ke změně složení roztoku** za udržování dostatečného koncentračního spádu, například při přečišťování biopolymerů od nízkomolekulárních látek. Obsahuje-li na počátku dialýzy koncentrovanější oddíl roztoku (tzv. dialyzát), uzavřený v dialyzačním střeivu – membráně, směs látek o rozdílné velikosti částic, lze z této směsi oddělit vybrané látky, které mohou vzhledem ke své velikosti procházet póry membrány do méně koncentrovaného oddílu (tzv. difuzátu), viz Obrázek 10 [31].



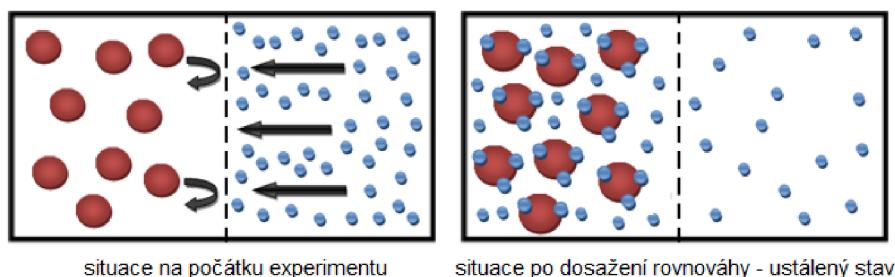
Obrázek 10: Nerovnovážná dialýza [29]

### 2.5.2 Rovnovážná dialýza

Rovnovážná dialýza má v jistém smyslu specifitější význam než nerovnovážná dialýza. Může být využita **ke studiu vazeb mezi většími molekulami látek**, nacházejícími se trvale na jedné straně pro ně nepropustné dialyzační membrány, **a menšími molekulami látek**, na počátku dialýzy přítomných na druhé straně membrány, která jim nebrání v pohybu směřujícím k dosažení rovnovážného stavu [31].

#### *Zdánlivá rovnovážná konstanta*

Máme-li k dispozici dvě stejné difúzní komory oddělené vhodnou dialyzační membránou (tzv. difúzní celu), jednu se supramolekulami (v našem případě s roztokem huminových kyselin, tzv. přijímací komoru) a druhou s membránovým permeantem (v našem případě s roztokem kationického tenzidu Septonexu, tzv. zdrojovou komoru), dochází dle předpokladů k následující situaci, zachycené na Obrázku 11.



Obrázek 11: Rovnovážná dialýza – schéma interakce v difúzní cele: supramolekuly neprocházející membránou jsou znázorněny hnědě, membránový permeant modře



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

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

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

Z právě popsaného lze vycházet při stanovení **zdánlivé rovnovážné konstanty**  $K_{app}$ , která udává míru interakcí – v našem případě mezi huminovými kyselinami a Septonexem skrze poměr koncentrace tenzidu vázaného na huminové kyseliny vůči koncentraci volného tenzidu v komorách **pro systém v rovnováze**. Platí tedy rovnice (8):

$$K_{app} = \frac{[\text{tenzid vázaný}]}{[\text{tenzid volný}]} \quad (8)$$

Pokud konstanta  $K_{app}$  nabývá hodnoty vyšší než 1, indikuje posun rovnováhy sorpčních procesů směrem k produktům. Naopak hodnoty nižší než 1 naznačují slabší tendenci Septonexu a huminových kyselin interagovat, tedy posun rovnováhy sorpčních procesů směrem k výchozím látkám. Při  $K_{app} = 0$  k interakcím nedochází. Pro konstantu se užívá označení „zdánlivá“, jelikož závisí jen na molárních koncentracích tenzidu a neuvažuje vliv koncentrace vazebných skupin huminových kyselin na posun interakční rovnováhy.

K odvození použitelného vztahu pro stanovení konstanty  $K_{app}$  je třeba vydefinovat podmínky jeho platnosti. Protože objem roztoků je stejný a neměnný v obou užitých komorách (tedy ve zdrojové se Septonexem i přijímací s huminovými kyselinami) a zvolená membrána tenzid nesorbuje (což bylo experimentálně ověřeno), platí, že výchozí koncentrace tenzidu  $c_0$  na počátku experimentu je v rovnováze dána součtem tří příspěvků – viz rovnice (9), která platí po celou dobu difúzního procesu:

$$c_0 = c_{\text{vázaná na HK}} + c_{\text{volná, zdroj. komora}} + c_{\text{volná, příj. komora}} \quad (9)$$

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

Naší snahou je určit vázanou koncentraci tenzidu  $c_{\text{vázaná na HK}}$ , kterou vyjádříme z předchozí rovnice (9). Tím dojdeme k rovnici (10):

$$c_{\text{vázaná na HK}} = c_0 - c_{\text{volná, zdroj. komora}} - c_{\text{volná, příj. komora}} \quad (10)$$

Ve stavu rovnováhy platí vztah (11):

$$c_{\text{volná, zdroj. komora}} = c_{\text{volná, příj. komora}} \quad (11)$$

Jeho využitím se rovnice (10) změní na rovnici (12):

$$c_{\text{vázaná na HK}} = c_0 - 2 \cdot c_{\text{volná, zdroj. komora}} \quad (12)$$

Definiční vztah (8) pro zdánlivou rovnovážnou konstantu  $K_{\text{app}}$  tím získá tvar rovnice (13):

$$K_{\text{app}} = \frac{c_0 - 2 \cdot c_{\text{volná, zdroj. komora}}}{c_{\text{volná, zdroj. komora}}} \quad (13)$$

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

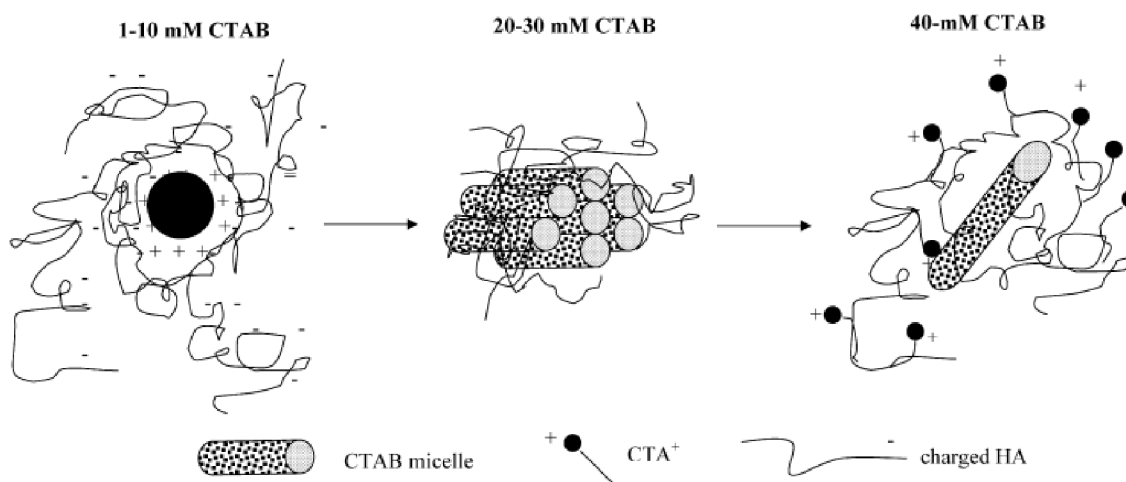
$$K_{\text{app}} = \frac{c_0}{c_{\text{volná, zdroj. komora}}} - 2 \quad (14)$$

### 3 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

V současné době velmi rozšířeného a často nešetrného používání tenzidů (povrchově aktivních látek) nejen v zemědělství, je jejich následná přítomnost ve vodách a půdě coby odpadu značně škodlivá. Huminové látky v nich obsažené nejen že dokážou vázat různé polutanty, příkladem jsou zmíněné tenzidy, mohou je v půdě též shromažďovat (imobilizovat). Porozumění charakteru jejich interakcí je proto neustále předmětem zkoumání s cílem přinést řešení tohoto problému [2]. Přitom tenzidy je možné považovat za modelové látky pro účely objasnění vazebných interakcí huminových kyselin s organickými látkami obecně.

#### 3.1 Interakce huminových látek s tenzidy

Byl studován vznik komplexů mezi HK a kationtovými povrchově aktivními látkami, konkrétně s hexadecyltrimethylamoniumbromidem (CTAB). HK s CTAB začaly vykazovat interakci už při nižších koncentracích CTAB, kdy byly komplexy rozpustné. Sraženiny mezi HK a CTAB se vytvořily při 20, 30 a 50 mmol·dm<sup>-3</sup> CTAB (a byly izolovány filtrací), zatímco rozpustné komplexy byly pozorovány při 1, 5, 10 a 40 mmol·dm<sup>-3</sup> CTAB. Ilustrace možných konfigurací komplexů ukazuje Obrázek 12. Sraženiny i rozpustné komplexy byly zkoumány pomocí metody založené na detekci rozptylu světla rentgenových paprsků. Při studiu se zjistilo, že hydrofilní části struktury CTAB, které jsou umístěny na vnější straně micel, jsou neutralizovány HK, což způsobuje deformaci válcovitého (tzv. hexagonálního) tvaru micel. Tvar micel CTAB po agregaci s HK i přes deformaci zůstává zachovalý. Chování vznikajících komplexů mezi CTAB a HK bylo vysvětleno na základě neutralizace náboje mezi anionty HK a micelami CTAB a následné obrácení náboje v důsledku hydrofobních interakcí. Mezi těmito komplexy vznikla vazba prostřednictvím elektrostatické interakce s hydrofilními kationickými skupinami CTAB a anionickými funkčními skupinami HK. Souhrnně lze konstatovat, že reakce mezi HK a CTAB jsou v některých ohledech podobné reakcím mezi nabitými polymery a povrchově aktivními látkami [32].



Obrázek 12: Ilustrace možných konfigurací komplexů HK-CTA<sup>+</sup> za různých experimentálních podmínek [32]

Dále se zkoumalo spojení alkytrimethylamoniumbromidů (obecně C<sub>n</sub>TAB) s různou délkou uhlíkového řetězce s HK a vliv této interakce na povrchovou aktivitu HK. Povrchové napětí bylo měřeno pomocí prstencové metody při 25 °C. Sady měření byly provedeny

přidáním malých množství koncentrovaného roztoku povrchově aktivní látky do vodného roztoku HK ( $100 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ ). Zjistilo se, že přidání i velmi nízkých koncentrací  $C_n\text{TAB}$  k vodnému roztoku HK má obrovský vliv na snížení povrchového napětí tohoto přírodního polyelektrolytu. Snížení povrchového napětí vody bylo mnohem vyšší ve vodném roztoku směsi  $C_n\text{TAB}$  s HK než v roztocích čistých složek. Pokles povrchového napětí byl způsoben i rostoucí délkou alkylového řetězce  $C_n\text{TAB}$  ( $C_{12}\text{TAB}$ ,  $C_{14}\text{TAB}$ ,  $C_{16}\text{TAB}$ ). Z toho všeho se dospělo k závěru, že proces srážení HK a  $C_n\text{TAB}$  byl přiřazen k tvorbě micel, vyvolané HK. Též se zjistilo, že i účinnost adsorpce je ve směsi  $C_n\text{TAB}$  s HK vyšší než ve vodných roztocích čistých složek. K vytváření struktur podobných micelám dochází při koncentracích HK a povrchově aktivních látek výrazně pod příslušnými kritickými micelárními koncentracemi. Autoři se domnívají, že hlavní hnací silou povrchové adsorpce  $C_n\text{TAB}$  v přítomnosti HK byla neutralizace disociované karboxylové kyseliny kationtovou povrchově aktivní látkou [33].

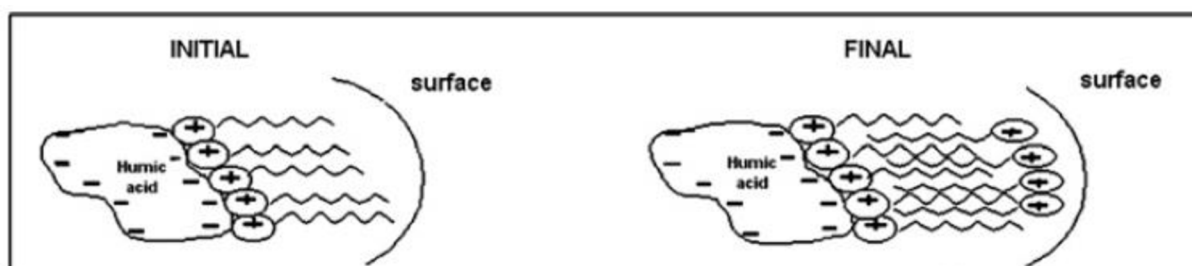
Již v jiných pracích [34] bylo prokázáno, že vazba iontových povrchově aktivních látek na opačně nabitý polyelektrolyt je kooperativním procesem, v důsledku hydrofobních interakcí mezi alkylovými řetězci povrchově aktivních látek. Kvůli silné elektrostatické přitažlivosti mezi těmito dvěma druhy začíná interakce při velmi nízkých koncentracích, kdy vytvářejí hydrofobní agregáty při velmi nízké koncentraci povrchově aktivní látky, známé jako kritická agregační koncentrace „CAC“, (analogicky ke kritické koncentraci micel CMC pozorované v čistých roztocích povrchově aktivní látky).

Dále byly zkoumány interakce aniontové povrchově aktivní látky dodecylsírany sodného (SDS) a dvou kationtových povrchově aktivních činidel, dodecylpyridiniumchloridu (DPC) a cetylpyridiniumchloridu (CPC), s purifikovanými huminovými kyselinami (PHK). Autoři sestavovali adsorpční izotermy pomocí titrace povrchově aktivní látky v přítomnosti PHK, při níž byl elektrodový potenciál zaznamenáván iontově selektivní elektrodou pro tenzidy. Adsorpční izotermy (jako látkové množství PAL navázané na PHK) byly stanoveny při pH 5 a 7 pro systém SDS-PHK; a při pH 5, 7 a 10 pro systémy DPC-PHK a CPC-PHK. Při daném pH 5, 7 a 10 a iontové síle  $0,025 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  mezi aniontovým povrchově aktivním činidlem (SDS) a PHK nebyla pozorována žádná významná vazba, zatímco dvě kationtová povrchově aktivní činidla (DPC, CPC) se silně vázaly na PHK v celém zkoumaném rozsahu pH. Komplexy kationtových povrchově aktivních látek se s PHK srážejí, jakmile se dosáhne bodu neutralizace náboje. Vazba je způsobena jak elektrostatickou, tak hydrofobní přitažlivostí. Počáteční afinita se zvyšuje se zvyšujícím se pH (tj. záporným nábojem PHK) a délkou hydrofobního konce tenzidu. Z této studie vyplývá, že HK jsou silně ovlivňovány i malými koncentracemi kationtových tenzidů [35].

Obdobné výsledky byly rovněž získány při studiu interakcí mezi kationickými tenzidy a HK měřením izoelektrického bodu pomocí detektoru náboje částic. V zařízení uvnitř cely tvaru válce je pohybováno pístem nahoru a dolů, čímž se vytváří elektrokinetický signál v závislosti na náboji částic přítomných v cele, což umožňuje „měření náboje“ koloidních částic nebo komplexů. V případě titrace studovaného vzorku komplexotvorným činidlem s opačným nábojem lze detekovat „bod obratu náboje“, neboli izoelektrický bod. Tímto způsobem byly studovány interakce kationických tenzidů – dodecylpyridiniumchloridu (DPC)

a cetylpyridiniumchloridu (CPC) s různými typy huminových a fulvinových kyselin při pH 4,5-5 a  $0,005 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$  a  $0,1 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$  NaCl. Měření detektoru náboje částic s povrchově aktivními látkami odhalilo, že komplexy kationický tenzid-HK dosáhly svého izoelektrického bodu ještě před dosažením kritické micelární koncentrace. S nárůstem vázaného množství se náboj komplexů kationtového povrchově aktivního činidla-HK měnil z negativního na pozitivní – toto pozorování naznačuje, že ionty povrchově aktivní látky se navazují na HK více než ekvivalentně. Afinita vazby cetylpyridiniového kationtu ( $\text{CP}^+$ ) k HK je větší, než afinita dodecylpyridiniového kationtu ( $\text{DP}^+$ ), kvůli delšímu alifatickému konci CPC. Z výsledků autoři usuzují, že vazba kationtového tenzidu na HK je způsobena elektrostatickou i hydrofobní přitažlivostí, přičemž se zřejmě mění i fyzikálně-chemické vlastnosti, jako je hustota náboje, hydrofobicita a vnitřní struktura HL. Celkový závěr je, že osud HK ve vodních systémech může být silně ovlivněn i malými koncentracemi kationtových povrchově aktivních látek [36].

Při ošetřování vody chlórem, v níž jsou přítomné HK, mohou vznikat karcinogenní trihalogenmethany. Proto je nutné před tím HK odstranit z vody, k čemuž byla studována technika flotace sraženiny HK pomocí cetyltrimethylamoniumbromidu (CTAB) a dodecylaminu (DDA), sloužících jako sběrače sraženin HK. Metodou rozptylu světla byl stanoven střední průměr částic pro sraženiny (HK-CTAB i HK-DDA). Dále použitá studie elektroforetické mobility ukázala, že interakce HK-CTAB byla mnohem silnější, než u HK-DDA. Hlavní rozdíl mezi srážením HK-CTAB a HK-DDA je ten, že k zahájení srážení je zapotřebí mnohem nižší koncentrace CTAB ve srovnání s DDA. Tento jev lze vysvětlit jako důsledek délky nepolární části molekul povrchově aktivních látek. V případě „delšího“ CTAB vede vyšší nerozpustnost k širší oblasti srážení. Výsledky experimentů flotace sraženiny prováděné ve speciální „flotační sloupcové koloně“ ukázaly, že více než 90 % HK lze odstranit z vody za pomoci kationických tenzidů coby sběračů jejich sraženin bez dalšího použití jakýchkoli jiných činidel [37].



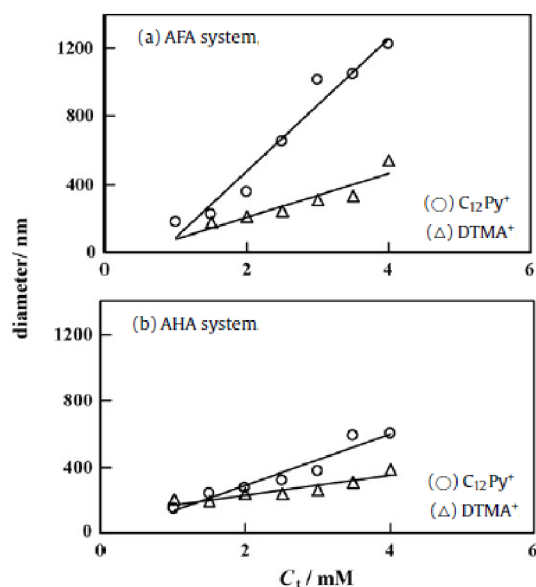
Obrázek 13: Schématické znázornění situace HK-tenzid s rostoucí koncentrací tenzidu v systému [37]

Autoři vysvětlili mechanismus interakcí následovně, viz Obrázek 13. Kationtová polární část povrchově aktivní látky se elektrostaticky váže na disociované karboxylové skupiny přítomné v HK za vzniku precipitátů. Avšak jak se zvyšuje koncentrace povrchově aktivní látky, nepolární části molekul povrchově aktivní látky interagují prostřednictvím van der Waalsových sil, které vytvářejí hemi-micely. To má vliv na hydrofobicitu sraženiny, která ukazuje snížení floatability pro vyšší koncentraci povrchově aktivní látky [37].

Byla studována i interakce HL s SDS a CTAB pomocí nukleární magnetické rezonance (NMR). Difúzní koeficienty měřené gradientovou nukleární magnetickou rezonanční

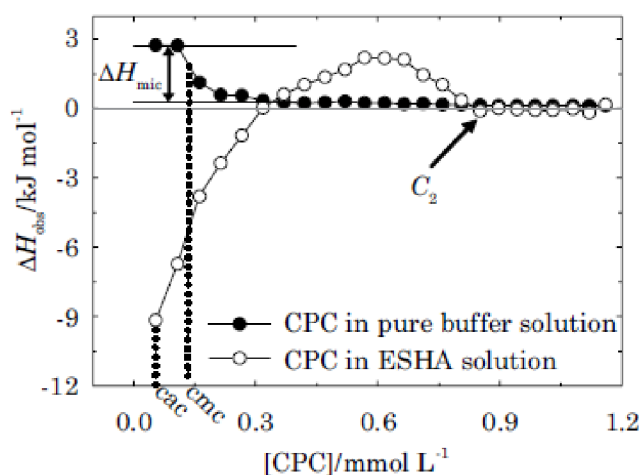
spektroskopií se používají v této studii ke zkoumání intermolekulárních interakcí povrchově aktivních látek – dodecylsírnanusodného (SDS) a cetyltrimethylamoniumbromidu (CTAB) za přítomnosti různých HL. Tyto výsledky naznačují, že HL zlepšují agregaci SDS před micelizací s výraznějším účinkem pozorovaným u více hydrofobních huminových materiálů. Pozitivně nabitá povrchově aktivní látka CTAB vytváří stabilní iontové páry s HL [38].

Vazba aniontového povrchově aktivního činidla, dodecylsírnanu sodného (SDS), s huminovými kyselinami izolovanými z půdy národního parku Aso v Japonsku (AHK), byla studována pomocí potenciometrické titrace a dynamického rozptylu světla (DLS) ve dvou oblastech pH 9,18 a 3,98 a iontové síle 0,03 a 0,10 mol·dm<sup>-3</sup>. Při pH 9,18 a nízké iontové síle mezi SDS a AHK nebyla pozorována žádná interakce ani jednou z metod, zatímco určitá interakce je pozorována při pH 3,98 a při vysoké iontové síle měřením DLS, protože elektrostatické odpuzování je potlačeno protionty v tomto roztoku. Dále byla potenciometrickou titrací a DLS zkoumána vazba mezi kationtovou povrchově aktivní látkou dodecyltrimethylamoniovým kationtem (DTMA<sup>+</sup>) a fulvinovými kyselinami rovněž izolovanými z půdy národního parku Aso v Japonsku (AFK) i AHK a porovnána s vazbou kationtu dodecylpyridinia (C<sub>12</sub>Py<sup>+</sup>). Bylo zjištěno, že vazba iontů DTMA<sup>+</sup> s AFK i AHK je slabší, než vazba s ionty C<sub>12</sub>Py<sup>+</sup>, a to pravděpodobně kvůli sférické zábraně hlavní skupiny iontů DTMA<sup>+</sup> a díky více atraktivní vazbě iontů C<sub>12</sub>Py<sup>+</sup> vyvolané pravděpodobně  $\pi$ - $\pi$  interakcí mezi aromatickými kruhy obou látek. Hydrodynamický průměr agregátů (zjištěný metodou DLS) je pro DTMA<sup>+</sup>-AFK/DTMA<sup>+</sup>-AHK menší, než průměr agregátů pro C<sub>12</sub>Py<sup>+</sup>-AFK/C<sub>12</sub>Py<sup>+</sup>-AHK, viz Obrázek 14. Ve všech systémech se hydrodynamické průměry zvyšovaly společně s rostoucí koncentrací kationických tenzidů. Toto chování silně naznačuje tvorbu nanoagregátů mezi kationickým tenzidem-HK díky neutralizaci náboje [39].



Obrázek 14: Závislost hydrodynamického průměru agregátů (mezi kationickým tenzidem-HK) na totální koncentraci tenzidu při pH 9,18 a iontové síle 0,03 mol·dm<sup>-3</sup> [39]

Dále bylo hodnoceno termodynamické hledisko interakcí mezi kationtovou povrchově aktivní látkou cetylpyridiniumchloridem (CPC) a HK různého původu při pH 10 a různé iontové síle metodou izotermické titrační kalorimetrie. Cílem autorů bylo získat informace o základní struktuře HK a zda HK z odlišného původu vykazují odlišné základní struktury. Na rozdíl od toho, co předpokládaly současné supramolekulární modely, došli autoři k názoru, že HK vykazují společnou základní strukturu, která je v prostředí spíše stabilní. Ačkoli HK různého původu mají různé funkční skupiny, zdálo se, že tato základní struktura je přítomna ve všech studovaných HK (zdroje: půda, rašelina a říční zdroje). Vzhledem k přítomnosti elektrického náboje jak v HK, tak v povrchově aktivních látkách použitých v této práci, výsledky ukazyvaly, že interakce HK-CPC je při nízké iontové síle hlavně elektrostatická. S rostoucí iontovou silou přechází interakce z elektrostatické na hydrofobní, přičemž adsorpční kapacita HK je udržována poměrně konstantní [40].



Obrázek 15: Kalorimetrické titrační křivky (pozorovány entalpické změny) při přidávání CPC (10 mmol·l<sup>-1</sup>) do roztoku huminové kyseliny Elliot – ESHA (0,1 mg·ml<sup>-1</sup>), iontová síla 0,05 mol·dm<sup>-3</sup> [40]

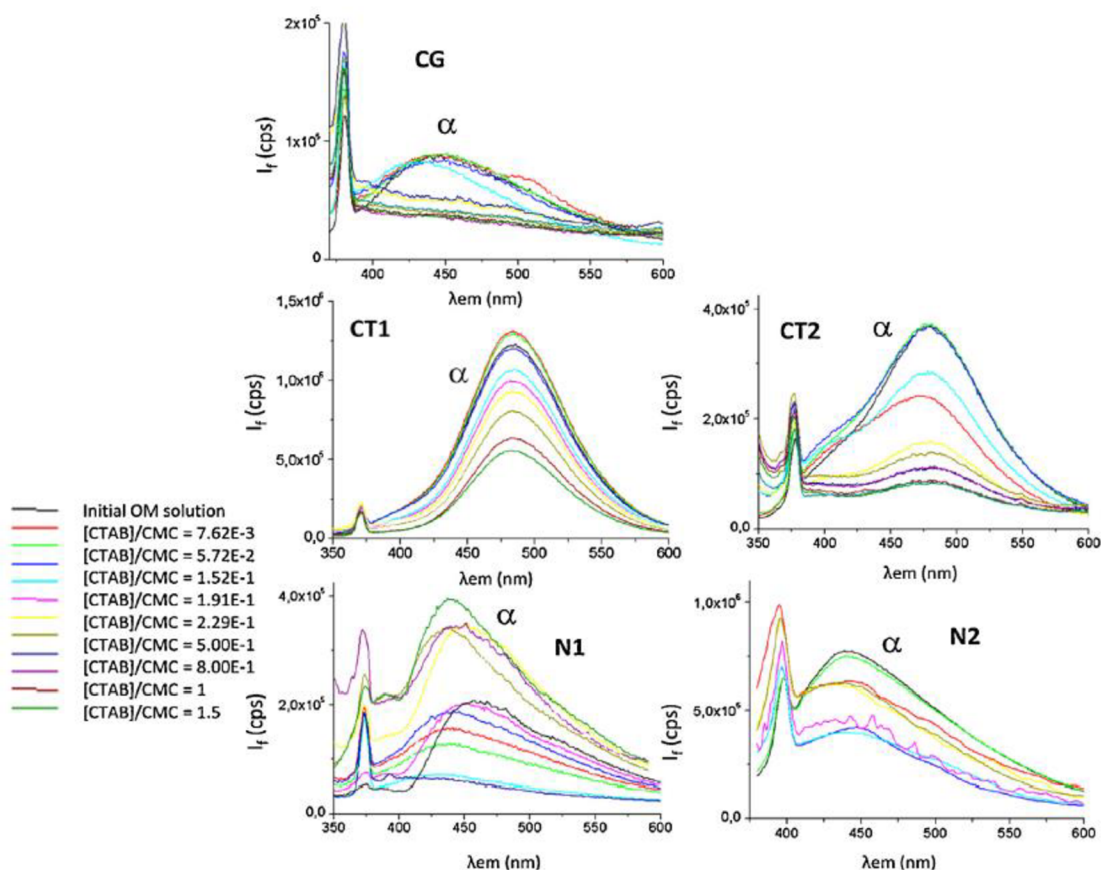
Vysvětlení probíhajících entalpických dějů vystihuje Obrázek 15. Počáteční část interakční křivky HK-CPC vykazuje exotermní průběh, přičemž se uvolňované teplo s každou injekcí CPC do roztoku HK snižuje; její jednotlivé molekuly se začínají adsorbovat na povrchu HK při tzv. kritické agregační koncentraci „CAC“. S dále rostoucí koncentrací CPC získává křivka endotermní charakter, dosahuje svého maxima a začíná klesat. To naznačuje, že monomery CPC se agregují blízko struktury HK. Průsečík obou křivek definuje bod  $c_2$  ( $c_2 = 0,81 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ ), ve kterém je roztok HK monomery CPC nasycen, nedochází k žádné další interakci a začínají se v něm tvořit volné micely CPC [40].

Kyselina dodecylbenzensulfonová (DBSA), kyselá forma dodecylbenzensulfonátu sodného, je často identifikována a detekována v půdách. V následujícím příspěvku byla studována a porovnávána sorpce kyseliny dodecylbenzensulfonové (DBSA) na dva různé typy půd (Mollisol a Alluvial) a na huminové kyseliny z nich izolované a diskutovány mechanismy těchto interakcí. Kinetika sorpce byla relativně pomalá a sorpční rovnováhy bylo možné dosáhnout do 10 hodin. V navrhovaném koncentračním rozmezí DBSA v této práci byly její maximální sorpční kapacity na huminové kyseliny z půdy Alluvial (ASHK) 115,0 mg·g<sup>-1</sup> a z půdy Mollisol (MSHK) 112,2 mg·g<sup>-1</sup>, které byly obě vyšší, než kapacity samotné půdy

Alluvial (AS) a samotné půdy Mollisol (MS). Sestaveným sorpčním izotermám nejlépe vyhovoval Freundlichův model. Sorpční kapacita ASHK byla větší než kapacita MSHK, AS a MS, což se připisovalo vyšší hydrofobicitě ASHK jako takové. Dále byly charakterizovány předem připravené komplexy HK-DBSA (přidáno 0,06 g HK do 50 ml-zátkových reakčních nádob s 20 ml roztoku DBSA o koncentraci  $360 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ , směs byla protřepána, odstředěna, promyta vodou a lyofilizována) pomocí elementární analýzy (EA), infračervené spektrofotometrie s mikro Fourierovou transformací (FT-IR), nukleární magnetické rezonance (NMR) v pevné fázi  $^{13}\text{C}$  a elektronové spinové rezonanční spektroskopie (ESR). V souhrnu došlo k sorpci DBSA hlavně na  $-\text{C}=\text{O}$ ,  $-\text{C}-\text{O}$  a na aromatické funkční skupiny HK. Data navíc naznačovala, že sorpční mechanismus spočíval hlavně v tvorbě H-vazeb, hydrofobních interakcí a v donor-akceptorním mechanismu. Autoři se domnívají, že by během těchto interakcí mohly existovat i interakce elektrostatické [41].

V přírodních organických látkách jsou běžně identifikovány různé fluorofory, představující různá fluorescenční emisní pásma; toho bylo využito při studiu vazby kationtového tenzidu cetyltrimethylamoniumbromidu (CTAB) a neiontogeních nonylfenol ethoxylátů (NPE) na přírodní huminové látky (HL), které byly zkoumány fluorescencí v ustáleném stavu, skrze sledování specifických fluoroforů HL  $\alpha$ ,  $\alpha'$  a  $\delta$ . Příklad fluorescenčních spekter ukazuje Obrázek 16. U neiontového tenzidu nebyl zaznamenán rozdíl ve fluorescenčních spektrech HL, a tedy nedošlo k žádné výrazné interakci mezi NPE a HL. Avšak přidání kationtového CTAB umožnilo pozorovat změny ve fluorescenční charakteristice HL a indikovalo vznik vazby. Vedle interakcí elektrostatických nelze vyloučit její hydrofobní charakter. Komplexní mechanismus je v podstatě řízen neutralizací náboje, která může být sledována specificky fluorescencí organických skupin [42].





Obrázek 16: Fluorescenční emisní spektra ( $\alpha$ -fluorofor) huminových sloučenin v přítomnosti různých koncentrací CTAB [42]

V další práci se zkoumaly vlastnosti komplexů HK-tenzid pomocí fluorescenční spektroskopie s excitačně-emisní maticí (EEMF) a pomocí synchronní fluorescenční spektroskopie (SFS). V této studii byly zkoumány interakce HK s anionickým tenzidem dodecylsíránem sodným (SDS), kationickým tenzidem hexadecyltrimethylamoniumbromidem (CTAB) a neionickým tenzidem Triton X-100 (TX-100). V alkalickém prostředí jsou HL záporně nabitě, a proto byly s anionickými a neionickými tenzidy vzhledem k jejich náboji očekávány pouze slabé intermolekulární interakce. V souladu s tímto se autorům pomocí výsledků intenzity fluorescenčního záření podařilo zjistit, že anionický tenzid SDS a neionický tenzid TX-100 nejsou schopny zhaset fluorescenci HK. Dále bylo zjištěno, že při dosažení kritické micelární koncentrace CTAB v roztoku HK dochází k úplnému zhasení fluorescence a k absenci daných fluorescenčních maxim v excitačně-emisních spektrech. Tento pokles intenzity fluorescence je způsoben silnými intermolekulárními interakcemi mezi kladně nabitými molekulami CTAB a záporně nabitými “supramolekulami” HK. Výsledky této studie prokázaly, že HK jsou silně ovlivňovány přítomností kationických tenzidů. Jako vhodnou metodu pro studium HK v přítomnosti tenzidu navrhuje autoři fluorescenční měření při vlnové délce 460/540 nm ( $\lambda_{ex}/\lambda_{em}$ ) [43].

## 4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 4.1 Použité pomůcky a přístroje

- Horizontální difúzní cely, PermeGear, průměr cel 40 mm, objem komor 60 ml
- Dialyzační membrána z acetátu celulózy, MWCO 0,5 kDa, Spectra/Por®
  - šířka plochy 31 mm
  - objem/délka 3,1 ml/cm
  - délka 10 m
- Silikonová pasta na vymazání zábrusů, Lucosan, Lučební závody Kolín
- EuroVector EA3000 CHNS/O – elementární analýza
- TGA Q5000, TA Instruments – termogravimetrie
- Nicolet iS50, Thermo Scientific – infračervená spektrofotometrie s Fourierovou transformací
- Zetasizer Nano ZS s automatickým titrátorem MPT-2, Malvern Instruments – pro stanovení kritické micelární (CMC) a kritické agregační koncentrace (CAC)
- Automatický titrátor 888 Titrand, Metrohm – pro stanovení kyselosti huminových kyselin a pro potenciometrickou titraci tenzidu Septonexu s iontově selektivní elektrodou (ISE)
- Microcal PEAQ-ITC, Metrohm – izotermická titrační kalorimetrie
- Tenziometr Sigma 700, KSV Instruments Ltd – stanovení CMC
- Vícemístná magnetická míchačka, Thermo Scientific
- pH metr, Mettler Toledo
- Další důležité vybavení laboratoře (analytické váhy, sušárna, digestoř, laboratorní sklo, skleněné pipety, injekční stříkačky, ochranné brýle a rukavice atd.)

### 4.2 Použité chemikálie

- Standard huminových kyselin Leonardite (1S104H-5) od mezinárodní huminové společnosti IHSS
- Huminové kyseliny izolované z jihomoravského lignitu (důl Mír, Mikulčice)
- Huminové kyseliny izolované z černozemě modální (odebrané v lokalitě Hrušovany nad Jevišovkou ze svrchní vrstvy 0-20 cm zemědělské půdy)
- Trimethylsilyl-diazomethan v 2 mol·dm<sup>-3</sup> hexanu, Aldrich Chemistry (SHBB9290V)
- Methanol p.a., Lach-Ner (PP2008000310)
- Chloroform, stabilizovaný amylenem, Sigma Aldrich (SHBJ8897)
- Septonex, GNB chem, a.s. (511SEP003)
- Dodecylsíran sodný, Lach-Ner (302790205)
- Hydroxid sodný NaOH, Penta (1905160514)
- Kyselina chlorovodíková HCl 35 %, Penta (2106280616)
- Normanaly 0,1 mol·dm<sup>-3</sup> HCl, Penta (2105060519V) a 0,1 mol·dm<sup>-3</sup> NaOH, Penta (2208310820V)
- Octan vápenatý, Sigma Aldrich (MKCD1978)
- Dihydrát hydrogenfosforečnanu disodného Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 2H<sub>2</sub>O, Penta, (2110121016)
- Dihydrát dihydrogenfosforečnanu sodného NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> · 2H<sub>2</sub>O, Penta (240306E)

Pro dosažení co nejpřesnějších výsledků byly **všechny roztoky** v experimentální části **připravovány z čisté deionizované vody**

### 4.3 Selektivní methylace karboxylových skupin huminových kyselin

Náplní této práce je prozkoumat vliv methylace karboxylových skupin huminových kyselin na jejich interaktivitu s povrchově aktivními látkami. Z toho důvodu bylo v prvním kroku nutné provést selektivní blokaci karboxylových funkčních skupin ve struktuře huminových kyselin pomocí methylace.

Pro selektivní methylaci karboxylových skupin se použilo methylační činidlo trimethylsilyl-diazometan (TMS-DM) k jejich esterifikaci (z funkční skupiny  $-\text{COOH}$  na  $-\text{COOCH}_3$ ), čímž se jim znemožnilo disociovat a podílet se na potenciálních elektrostatických interakcích s iontovými látkami. Díky tomu se otevírá možnost posoudit i vliv ostatních interakčních efektů, jako jsou například hydrofobní interakce.

Jako zástupce povrchově aktivních látek byl zvolen kationický tenzid Septonex, u něhož se očekávaly pozitivní interakce s huminovými kyselinami vzhledem k jeho náboji (řešeno v dřívější práci věnující se obdobné problematice [44]).

Výsledky zkoumání mají potvrdit teoretický předpoklad, že Septonex bude snáze reagovat s původními nemodifikovanými vzorky huminových kyselin, než s jejich methylovanou formou.

#### *Postup methylace huminových kyselin*

Postup methylace HK vychází z práce [45]. Do kádinky byly naváženy 2 g huminových kyselin, k nim se v digestoři napipetovalo 8 ml chloroformu a 4 ml methanolu a následně, za stálého míchání (na magnetické míchačce při 250 ot/min), se přikapávalo injekční stříkačkou 8 ml trimethylsilyl-diazometanu ve  $2 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  hexanu. Tato směs byla přikryta parafilmem a ještě 2 hodiny míchána (při konstantních otáčkách 250 ot/min) v digestoři. Poté k ní byl přidán další 1,5 ml trimethylsilyl-diazometanu ve  $2 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  hexanu. Po promíchání se již odkrytá směs ponechala v digestoři, kde byla volně sušena při laboratorní teplotě přes noc. Následující den se v sušárně, nastavené na  $50 \text{ }^\circ\text{C}$ , ponechala 48 hodin aby se z methylovaných huminových odpařilo nezreagované methylační činidlo.

Tímto způsobem byly methylovány všechny 3 typy huminových kyselin použitých při experimentech této práce: z leonarditu (**IHSS-HK**), z lignitu (**LHK**) a z černozemě (**ČHK**), nesoucích dále označení **mIHSS-HK**, **mLHK** a **mČHK**. Úspěšnost methylací byla ověřena níže uvedenými fyzikálně-chemickými metodami.

### 4.4 Metody charakterizace huminových kyselin

#### 4.4.1 Elementární analýza (EA) a termogravimetrie (TGA)

Elementární složení (konkrétně zastoupení uhlíku, vodíku, dusíku a síry) všech typů huminových kyselin (IHSS-HK, LHK, ČHK) a methylovaných huminových kyselin, (mIHSS-HK, mLHK, mČHK) se stanovilo elementárním analyzátozem EuroVector EA3000

CHNS/O, kalibrovaného pomocí standardní látky 4-amino-benzen-sulfonamidu. Navážené vzorky byly spáleny v kyslíkové atmosféře při pracovní teplotě reaktoru 980 °C a vyhodnocovacím programem *Callidus*, verze 5.1 se stanovilo jejich elementární složení. Měření bylo pro každý typ huminových kyselin a methylovaných huminových kyselin provedeno třikrát a z aritmetického průměru těchto hodnot se zjištěné elementární složení vzorků v hmotnostních procentech následně přepočítlo na atomová procenta.

Veškeré typy huminových kyselin a methylovaných huminových kyselin byly dále charakterizovány termogravimetrickým měřením na přístroji TGA Q5000 od společnosti TA Instruments za účelem stanovení nespalitelného podílu (množství popela) a vzdušné vlhkosti v těchto vzorcích. Měření byla prováděna v kyslíkové atmosféře od laboratorní teploty do 800 °C s rychlostí ohřevu 10 °C·min<sup>-1</sup> a konstantní hodnotou průtoku plynu 20 dm<sup>3</sup>·min<sup>-1</sup>. Z naměřených dat byly poté programem *TA Universal Analysis* vytvořeny termogravimetrické křivky, z nichž se odečetly hodnoty vlhkosti při teplotě 105 °C a množství popela při 700 °C pro každý vzorek.

Zastoupení kyslíku ve vzorcích huminových kyselin a methylovaných huminových kyselin bylo zjištěno komplementárním dopočtem, tedy po odečtení procentuálního zastoupení vlhkosti, popela a biogenních prvků uhlíku, vodíku, dusíku a síry v těchto vzorcích od celku.

#### **4.4.2 Infračervená spektrofotometrie s Fourierovou transformací (FT-IR)**

K identifikaci funkčních skupin a strukturních jednotek vzorků huminových a methylovaných huminových kyselin byla použita infračervená spektrofotometrie s Fourierovou transformací (FT-IR). FT-IR analýza vzorků se provedla na FT-IR spektrometru Nicolet iS50 a to za použití technik ATR (úplný zeslabený odraz) a DRIFT (spektroskopie s difúzní reflektancí). Primárním účelem využití obou zmíněných technik bylo potvrzení úspěšnosti methylace karboxylových skupin u vzorků huminových kyselin.

ATR analýza byla provedena s využitím jednodrazového diamantového ATR nástavce s parametry měření: 32 skenů, rozlišení 4 cm<sup>-1</sup>. DRIFT analýza se realizovala s využitím modulu *Smart Diffuse Reflectance Module*. Pro tuto analýzu byl vzorek ředěn v poměru přibližně 1:50 vysušeným práškovým KBr. Parametry DRIFT analýzy: 512 skenů, rozlišení 4 cm<sup>-1</sup>. Technika ATR poskytuje kvalitnější signál pro oblast nižších vlnočtů (2 000-500 cm<sup>-1</sup>), zatímco technika DRIFT pro oblast vyšších vlnočtů (4 000-2 000 cm<sup>-1</sup>).

#### **4.4.3 Titrační určení kyselosti huminových kyselin**

Kyselost huminových kyselin se stanovila dvěma typy titrací, pro něž byly nastaveny měřící metody v programu *Tiamo*, na automatickém titrátoru 888 Titrando, Metrohm. Hlavním výstupem těchto metod je jednak stanovení kyselosti vzorků huminových kyselin, která je dle literatury [2, 5] jedním ze základních znaků vypovídajícím o reaktivitě huminových kyselin, ale také ověření úspěšnosti methylace karboxylových skupin v jejich strukturách. Titrace byly pro každý typ huminových kyselin (IHSS-HK, LHK, ČHK) i methylovaných huminových

kyselin (mIHSS-HK, mLHK, mČHK) provedeny minimálně ve dvojnásobném opakování a výsledné kyselosti jsou aritmetickým průměrem těchto hodnot včetně směrodatné odchylky.

### ***Zpětná titrace***

Zpětná titrace slouží ke stanovení celkové kyselosti, která je u huminových kyselin způsobena přítomností fenolových a karboxylových skupin [46]. U vzorků mHK by tak měla být stanovená celková kyselost nižší v porovnání s původními nemodifikovanými vzorky.

Postup přípravy vzorku a provedení titrace: k 50 mg huminových kyselin (navážených do kádinky) bylo přidáno 50 ml  $0,1 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$  NaOH a vzniklá suspenze byla rozpouštěna 24 hodin na magnetické míchačce při 250 ot/min. Poté byl vzorek titrován  $0,1 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$  HCl s přidávkou po 0,1 ml/min s celkovým objemem 60 ml. Změna pH v průběhu titrace byla detekována pH elektrodou.

### ***Karboxylátová titrace (podle acetátové metody)***

Karboxylátová titrace podle acetátové metody slouží ke stanovení kyselosti způsobené přítomností karboxylových skupin ve struktuře huminových kyselin [46], a proto je ideální metodou pro ověření úspěšnosti jejich methylace do modifikované formy  $-\text{COOCH}_3$ . U vzorků mHK by tak mělo dojít k výraznému poklesu stanovené karboxylátové kyselosti, v ideálním případě (100 % úspěšnosti methylace) by se hodnoty měly blížit nule (v porovnání s původními nemodifikovanými vzorky).

Postup přípravy vzorku a provedení titrace: k 50 mg huminových kyselin (navážených do kádinky) bylo přidáno 40 ml  $0,5 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$  octanu vápenatého a 10 ml deionizované vody a vzniklá suspenze se rozpouštěla 24 hodin na magnetické míchačce při 250 ot/min. Stejně byl připraven i slepý vzorek, avšak bez obsahu huminových kyselin. Poté byl vzorek huminových kyselin i slepý vzorek přefiltrován přes papírový filtr, promyt deionizovanou vodou a doplněn do 100 ml. Takto připravené vzorky byly titrovány  $0,1 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$  NaOH s přidávkou po 0,1 ml/min, s celkovým objemem 10 ml. Změna pH v průběhu titrace se detekovala pH elektrodou.

Z naměřených dat z titrací se pomocí programu *MS Excel* vytvořily grafy titračních křivek, znázorňujících změnu pH v závislosti na objemu přidaného titračního činidla. Z maxima první derivace byl u každé titrační křivky určen inflexní bod, v němž byla ze spotřeby titračního činidla o známé koncentraci vypočtena kyselost IHSS-HK, LHK, ČHK, mIHSS-HK, mLHK, mČHK, vztažené na hmotnosti titrovaných vzorků.

#### **4.4.4 Stanovení kritické agregační koncentrace (CAC) Septonexu s HK a mHK**

Měření kritické agregační koncentrace (CAC) kationického tenzidu Septonexu s HK a mHK v prostředí fosfátového pufru je doprovázeno změnou velikosti částic ve studovaném systému. Ta je detekována prostřednictvím změny intenzity rozptýleného světla na přístroji Zetasizer Nano ZS ve spojení s automatickým titrátorem MPT-2.

Postupy příprav fosfátového pufru (o pH 7,4 a iontové síle  $0,05 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ ), roztoků huminových (HK) i methylovaných huminových kyselin (mHK) ve fosfátovém pufru a Septonexu ve fosfátovém pufru, jsou popsány v kapitole 4.6.1.

### ***Postup při měření a vyhodnocení CAC***

Do nádoby se závitem bylo napipetováno 10 ml vzorku HK/mHK o koncentraci  $50 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  ve fosfátovém pufru přefiltrovaného přes stříkačkový filtr s velikostí pórů  $0,45 \mu\text{m}$ . Následně se nádoba s vloženým magnetickým míchadlem a ponořenou pH elektrodou připevnila do automatického titrátoru MPT-2. Za stálého míchání byl vzorek průběžně transportován do průtočné cely s elektrodami (DTS 1070) umístěné v kyvetovém prostoru přístroje Zetasizer Nano ZS, kam automatický titrátor v režimu *aditivní titrace* ze zásobní nádoby do vzorku HK/mHK přidával kationický tenzid Septonex o koncentraci  $2 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  ve fosfátovém pufru, taktéž přefiltrovaný přes stříkačkový filtr s velikostí pórů  $0,45 \mu\text{m}$  s krokem  $2,5 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ . Po každém přidavku byla změřena intenzita rozptýleného světla a Z-průměr velikosti částic. Konečná koncentrace kationického tenzidu Septonexu ve vzorku HK byla  $80 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ , celkový objem přidaného titračního činidla činil 0,417 ml.

Z naměřených dat byl programem *MS Excel* vytvořen bodový graf znázorňující Z-průměr velikosti částic v závislosti na koncentraci přidávaného titračního činidla. Příklad bodového grafu pro Septonex-LHK se nachází na Obrázku 36 v kapitole Přílohy. Ten byl následně v programu *Origin* proložen sigmoidální Boltzmannovou křivkou a z maxima první derivace byl určen inflexní bod odpovídající hodnotě CAC studovaných systémů. Měření CAC proběhlo konkrétně u systémů Septonex-IHSS-HK, mIHSS-HK, LHK a mLHK minimálně ve dvojnásobném opakování a získaná hodnota CAC je aritmetickým průměrem těchto hodnot. U systémů Septonex-ČHK a mČHK CAC měřena nebyla vzhledem k časové náročnosti experimentů (8 hodin/1 měření) a obsazenosti přístroje; důvodně předpokládáme, že by získané hodnoty byly blízké hodnotám systémů proměřených.

## **4.5 Stanovení kritické micelární koncentrace (CMC) Septonexu**

### **4.5.1 Metoda rozptylu světla**

Měření kritické micelární koncentrace (CMC) kationického tenzidu Septonexu v prostředí fosfátového pufru je stejně jako v případě měření CAC doprovázeno změnou velikosti částic ve studovaném systému, ta je detekována prostřednictvím změny intenzity rozptýleného světla na přístroji Zetasizer Nano ZS ve spojení s automatickým titrátorem MPT-2.

### ***Postup při měření a vyhodnocení CMC***

Do nádoby se závitem bylo napipetováno 10 ml čistého fosfátového pufru přefiltrovaného přes stříkačkový filtr s velikostí pórů  $0,45 \mu\text{m}$ . Následně se nádoba s vloženým magnetickým míchadlem a ponořenou pH elektrodou připevnila do automatického titrátoru MPT-2. Za stálého míchání byl vzorek průběžně transportován do křemenné průtočné kyvety umístěné v kyvetovém prostoru přístroje Zetasizer Nano ZS, kam automatický titrátor v režimu *aditivní titrace* ze zásobní nádoby do vzorku čistého fosfátového pufru přidával kationický tenzid Septonex o koncentraci  $1 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  ve fosfátovém pufru, taktéž přefiltrovaný přes stříkačkový filtr

s velikostí pórů 0,45  $\mu\text{m}$  s krokem 5  $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ . Po každém přidavku byla změřena intenzita rozptýleného světla. Konečná koncentrace kationického tenzidu Septonexu ve vzorku čistého fosfátového pufru byla 50  $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ , celkový objem přidaného titračního činidla činil 0,526 ml.

Z naměřených dat byl programem *MS Excel* vytvořen bodový graf znázorňující intenzitu rozptýleného světla v závislosti na koncentraci přidávaného titračního činidla. Příklad bodového grafu pro Septonex se nachází na Obrázku 37 v kapitole Přílohy. Ten byl následně v programu *Origin* proložen sigmoidální Boltzmannovou křivkou a z maxima první derivace byl určen inflexní bod odpovídající hodnotě CMC Septonexu ve fosfátovém pufru. Měření bylo opakováno čtyřikrát a získaná hodnota CMC je aritmetickým průměrem těchto hodnot.

#### 4.5.2 Stanovení CMC měřením povrchového napětí

Hodnota kritické micelární koncentrace (CMC) Septonexu v prostředí fosfátového pufru byla pro ověření hodnoty CMC stanovena i měřením závislosti povrchového napětí vodných roztoků Septonexu na jeho koncentraci. Pro tyto účely byl použit tenziometr Sigma 700 od společnosti KSV Instruments, který měří povrchové napětí roztoku skrze sílu potřebnou k odtržení smáčivého prstence z platinového drátku od povrchu kapaliny.

##### *Postup přípravy vzorků, měření a vyhodnocení CMC*

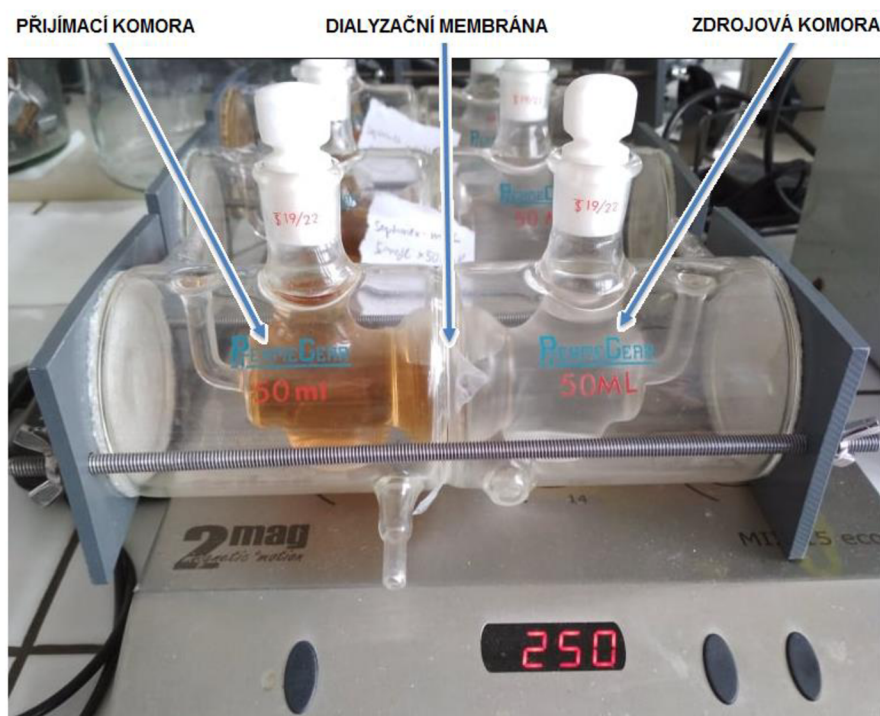
Ze zásobního roztoku Septonexu ve fosfátovém pufru o koncentraci 1  $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$  byla zředěním fosfátovým pufrům připravena řada kalibračních roztoků Septonexu o koncentracích: 0,5  $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ , 0,1  $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ , 0,05  $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ , 0,025  $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ , 0,0125  $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$  a 0,00625  $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$  v objemech po 20 ml. Nejprve bylo změřeno povrchové napětí pro čistý fosfátový pufr a poté pro vzorky Septonexu od nejnižší koncentrace po nejvyšší. Každý vzorek byl nalit do čisté a suché skleněné nádoby, která byla umístěna na stolek pod zavěšeným prstencem z platinového drátku, který musel být předtím omyt destilovanou vodou a vyžehán nad kahanem. Prstenec z platinového drátku byl poté ponořen do vzorku a měření probíhalo po dobu 5 min. Výstupem přístroje je přímo spočítaná hodnota povrchového napětí pro daný vzorek.

Z naměřených výsledků byl následně programem *MS Excel* vytvořen bodový graf, znázorňující závislost povrchového napětí na koncentraci tenzidu. CMC byla stanovena z průsečíku dvou aproximačních přímek, kterými byly proloženy lineární části bodového grafu. Měření na tenziometru bylo provedeno u dvou řad nezávisle připravených kalibračních roztoků Septonexu ve fosfátovém pufru, výsledek CMC je aritmetickým průměrem těchto dvou stanovení.

#### 4.6 Difúzní (dialyzační) experimenty

Předmětem této práce je studium interakcí mezi huminovými kyselinami s tenzidy a posouzení vlivu modifikace huminových kyselin na tyto interakce. K těmto experimentům jsou využívány **difúzní cely** – zařízení sloužící k difúzním experimentům v roztocích. Skládají se ze dvou oddělitelných komor, mezi něž lze vložit porézní přepážku v podobě membrán nebo tuhých či polotuhých vzorků uchycených ve vhodné formě (například hydrogelů). Každou komoru tvoří vnitřní a vnější plášť. Vnější plášť je průtočný a je určen k zajištění konstantní teploty experimentu (temperace), vnitřní plášť slouží k realizování samotného experimentu [46].

V těchto experimentech byl do jedné komory nalit roztok huminových kyselin (LHK, IHSS-HK, ČHK) či methylovaných huminových kyselin (mLHK, mIHSS-HK, mČHK) o koncentraci  $50 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  a do druhé komory roztok Septonexu o koncentraci  $80 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  – oba připravované ve fosfátovém pufru, aby bylo v difúzních celách zabráněno negativnímu projevu osmózy (řešeno v práci [44]). Mezi nimi byla upevněna dialyzační membrána s velikostí pórů 0,5 kDa. Tento parametr membrány, udávající limitní velikost molekul schopných projít skrze ni, byl experimentálně zvolen tak, aby přes membránu procházel pouze Septonex a nikoliv huminové kyseliny (experimentálně ověřeno v práci [44]). Difúzní cely přichystané k měření zachycuje Obrázek 17.



Obrázek 17: Sestavené difúzní cely

Při těchto experimentech je sledován pokles koncentrace původního roztoku Septonexu o známé koncentraci ve zdrojové komoře, který prochází skrze dialyzační membránu do přijímací komory s roztokem huminových kyselin, kde s nimi interaguje až do ustáleného stavu (rovnováha). Konkrétně byl při experimentech této práce celý objem roztoku Septonexu ze zdrojové komory po 1-3 týdnech odebírán, až do dosažení ustáleného stavu, který byl experimentálně stanoven na 12 týdnů (viz kapitola 5.3). Kvůli dlouhodobosti experimentů a efektivitě činností tak bylo nutné pracovat s více difúzními celami zároveň. Každá difúzní cely sloužila vždy pro jedno měření, které bylo ukončeno v definovaném čase odběrem vzorku roztoku Septonexu z její zdrojové komory.

Roztok Septonexu je čirý a nelze u něj přímo (například spektrofotometricky) stanovit jeho koncentraci. K těmto účelům slouží metoda **potenciometrické titrace s iontově selektivní elektrodou (ISE) pro tenzidy**, optimalizovaná v rámci této práce, která je šetrná k životnímu prostředí a nevyžaduje přítomnost organických barviv ani rozpouštědel – viz kapitola 4.7.



#### 4.6.1 Příprava roztoků pro difúzní (dialyzační) experimenty

Pro studium interakcí mezi huminovými kyselinami a Septonexem byla zvolena koncentrace huminových kyselin  $50 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  a koncentrace Septonexu  $80 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  – oba připravované ve fosfátovém pufru o pH 7,4 a iontové síle  $0,05 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ . Do každé z komor difúzních cel se vpravilo vždy 60 ml roztoku.

- Příprava fosfátového pufru o pH 7,4 a iontové síle  $0,05 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ : navážky 3,6 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  a 1,1 g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  se kvantitativně převedou do 500 ml odměrné baňky a deionizovanou vodou doplní po rysku.
- Příprava roztoku Septonexu o koncentraci  $80 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  ve fosfátovém pufru: 0,08 g Septonexu se kvantitativně převede do odměrné baňky o objemu 1 l a fosfátovým pufrům doplní po rysku.
- Příprava zásobního roztoku huminových (či methylovaných huminových) kyselin o koncentraci  $1 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ : navážka 0,05 g huminových kyselin se rozpustí ve 35 ml  $0,1 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$  roztoku NaOH přes noc na magnetické míchačce. Rozpuštěný pevný podíl v podobě huminových kyselin se následující den upraví na pH = 7 (pomocí několika kapek  $0,5 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$  roztoku HCl – ověřeno pH metrem) a doplní se deionizovanou vodou do 50 ml. Po přefiltrování přes filtrační papír je roztok připraven k použití a uchovává se v lednici.
- Příprava roztoku huminových (či methylovaných huminových) kyselin o koncentraci  $50 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  ve fosfátovém pufru: naředěním ze zásobního roztoku huminových (či methylovaných huminových) kyselin o koncentraci  $1 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  fosfátovým pufrům, s ohledem na výsledný objem – v případě difúzních cel 60 ml.

#### 4.6.2 Příprava difúzních cel k měření

Čisté a suché komory difúzních cel byly na vnějších okrajích zlehka potřeny silikonovou pastou pro vymazání zábrusů. Z cívky, na níž byl navinut rukávec materiálu dialyzační membrány s velikostí pórů 0,5 kDa, byl odstřižnut jednovrstvý aršík, následně promyt destilovanou vodou, upevněn na jednu komoru a zakroužením druhé komory připraven coby difúzní membrána v sestavené difúzní cele k použití. Po upevnění difúzní cely do držáku byla dovnitř vložena magnetická míchadla a pomocí malých nálevek současně nality roztoky Septonexu a huminových kyselin ve fosfátovém pufru, oba o shodném objemu 60 ml do svých komor difúzní cely. Poté byly do ústí hrdel obou komor vloženy teflonové zátky potřené silikonovou pastou na vymazání zábrusů. Cela upevněná v držáku byla položena na vícemístnou magnetickou míchačku rotující rychlostí 250 ot/min. Poté byly prováděny odběry Septonexu ze zdrojové komory difúzní cely ve stanovených intervalech až do předpokládaného ustáleného stavu. Z objemu Septonexu odebraného ze zdrojové cely bylo vždy 50 ml použito ke stanovení koncentrace metodou potenciometrické titrace s iontově selektivní elektrodou (ISE) pro tenzidy.

#### 4.7 Potenciometrická titrace kationického tenzidu Septonexu s iontově selektivní elektrodou (ISE) pro tenzidy

Kationické povrchově aktivní látky lze titrovat anionickými povrchově aktivními látkami, a naopak. Produktem titrace je sloučenina, která nese náboj, ale má přesné stechiometrické složení a je velmi málo rozpustná ve vodě [47].

Pro účely stanovení koncentrace kationického tenzidu Septonexu v difúzních celách byla optimalizována metoda potenciometrické titrace s iontově selektivní elektrodou (ISE) pro tenzidy [47], na automatickém titrátoru 888 Titrandu firmy Metrohm, pro niž byly nastaveny parametry měření v programu *Tiamo*, viz níže.

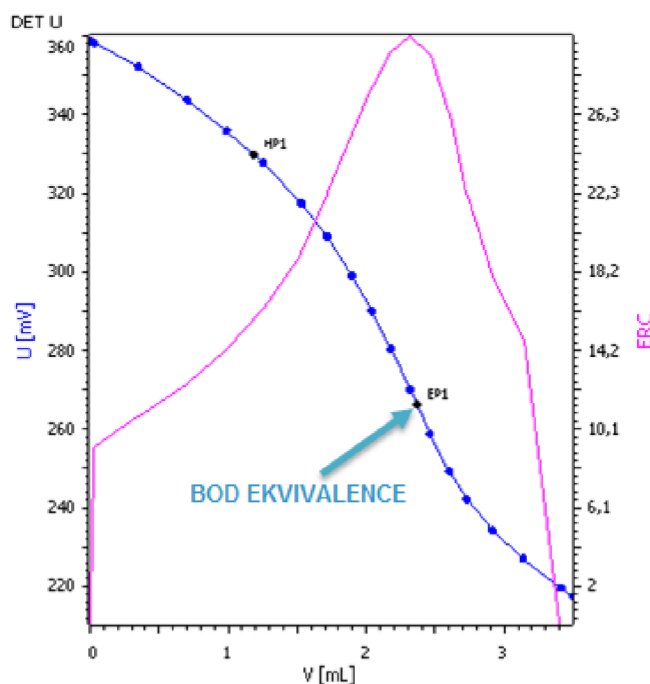
Při této potenciometrické metodě je zaznamenáván rozdíl elektrického napětí mezi dvěma elektrodami (při nulovém elektrickém odběru): pracovní iontově selektivní elektrodou pro tenzidy a referenční argentochloridovou elektrodou, které jsou ponořené v roztoku kationického tenzidu Septonexu během jeho titrace opačně nabitým anionickým tenzidem SDS. Automatický titrátor 888 Titrandu firmy Metrohm, přichystaný k měření zachycuje Obrázek 18.



Obrázek 18: Automatický titrátor 888 Titrandu firmy Metrohm

Výsledným záznamem potenciometrické titrace je sigmoidní „S-křivka“ znázorňující změnu napětí v roztoku detekovanou elektrodami v závislosti na objemu přidaného titračního činidla, viz Obrázek 19. Ze spotřeby titračního činidla SDS v bodě ekvivalence, nacházejícím se v inflexním bodu titrační křivky určeným z maxima její první derivace, je následně

automaticky měřícím programem *Tiamo* (instalovaným na běžném osobním počítači a datově propojeným s automatickým titrátorem) vypočtena koncentrace kationického tenzidu Septonexu v titrovaném vzorku. Při optimalizaci bylo zjištěno, že rozsah koncentrací Septonexu ve fosfátovém pufru stanovitelný touto metodou je v rozmezí 5 až 80 mg·l<sup>-1</sup>; navíc byla provedena kontrola funkčnosti metody za přítomnosti huminových kyselin při potenciometrické titraci, které při koncentraci 1 mg·l<sup>-1</sup> v 50 ml titrovaného roztoku Septonexu neovlivnily naměřený výsledek koncentrace tenzidu. Tím byla ověřena vhodnost této metody pro stanovení koncentrací Septonexu po odběru ze zdrojové komory difúzních cel.



Obrázek 19: Ukázka záznamu potenciometrické titrace Septonexu (ve fosfátovém pufru) o koncentraci 20 mg·dm<sup>-3</sup> titračním činidlem SDS o koncentraci 0,001 mol·dm<sup>-3</sup> z programu *Tiamo*

#### **Postup stanovení:**

50 ml vzorku kationického tenzidu Septonexu ve fosfátovém pufru **odebraného ze zdrojové komory difúzí cely** bylo v kádince za stálého míchání na magnetické míchače titrováno opačně nabitým anionickým tenzidem SDS o koncentraci 0,001 mol·dm<sup>-3</sup> rozpuštěným v deionizované vodě, s rychlostí přidávků 0,2 ml·min<sup>-1</sup>. Změny napětí v roztoku byly v průběhu titrace detekovány pracovní iontově selektivní elektrodou pro tenzidy a referenční argentochloridovou elektrodou.

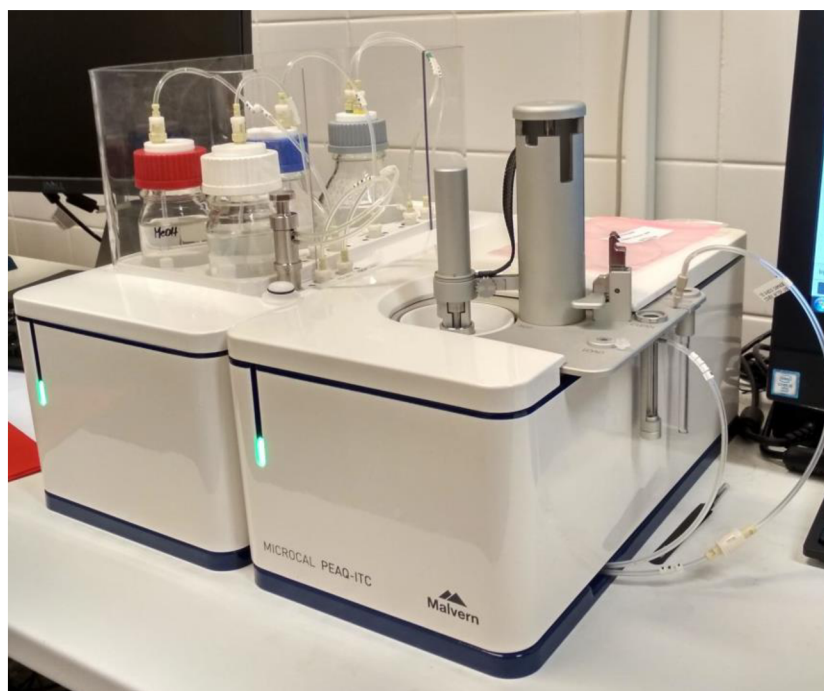
V měřícím programu *Tiamo* byla v počátečních podmínkách titrace nastavena pauza 60 s na promíchání roztoku určeného k titraci na magnetické míchače, v parametrech titrace bylo nastaveno převzetí naměřené hodnoty (*drift*) během titrace na 20 mV·min<sup>-1</sup> s maximální čekací dobou 38 sekund. Při dávkování přírůstků byla nastavena „hustota měřících bodů 2“, s minimálním přírůstkem 100 µl a rychlostí dávkování 0,2 ml·min<sup>-1</sup>, vše z důvodu optimální funkčnosti automatického titrátoru.

#### 4.8 Izotermická titrační kalorimetrie (ITC)

Izotermická titrační kalorimetrie je společně s difúzní (dialyzační) technikou v podobě difúzních cel další metodou použitou v této práci při studiu interakcí mezi Septonexem a huminovými či methylovanými huminovými kyselinami, která je schopná objasnit charakter probíhajících reakcí z termodynamického hlediska.

##### *Postup měření:*

Vzorková cela izotermického titračního kalorimetru byla skleněnou injekční stříkačkou naplněna 200  $\mu\text{l}$  roztoku HK/mHK o koncentraci 60  $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$  ve fosfátovém pufru, určenému k titraci. Do pohyblivého držáku s jehlou opatřenou míchadlem byl vpraven titrační roztok Septonexu o koncentraci 20  $\text{mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$  (8,45  $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ ) ve fosfátovém pufru a posléze zasunut do vzorkové cely. Referenční cela izotermického titračního kalorimetru obsahovala deionizovanou vodu. Měření po celou dobu probíhalo při konstantní teplotě 25  $^{\circ}\text{C}$  a při 750 ot/min míchadla. Během titrace bylo do vzorkové cely postupně po 2  $\mu\text{l}$  vpraveno celkem 40  $\mu\text{l}$  titračního roztoku Septonexu a při tom zaznamenávána změna tepelného toku v průběhu reakce, skrze měření rozdílu teplot mezi vzorkovou a referenční celou. Izotermický titrační kalorimetr přichystaný k měření zachycuje Obrázek 20.



*Obrázek 20: Izotermický titrační kalorimetr Microcal PEAQ-ITC firmy Metrohm*

Každá chemická reakce (tedy i míchání roztoků) je doprovázena určitým tepelným zabarvením. Proto, abychom byli schopni studovat interakce Septonexu s huminovými či methylovanými huminovými kyselinami pomocí izotermické titrační kalorimetrie, bylo nutné provést experimenty související s ředěním titračního činidla Septonexu ve fosfátovém pufru do čistého fosfátového pufru (tzv. měření referenčního vzorku) a tyto naměřené hodnoty tepelného zabarvení následně při vyhodnocení reálného vzorku odečítat od získaných hodnot entalpických změn, v našem případě při studiu interakcí Septonexu s huminovými, respektive methylovanými huminovými kyselinami.

Na základě výše popsaného proběhlo měření referenčního vzorku – tedy titrace čistého fosfátového pufru Septonexem o koncentraci  $20 \text{ mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$  ve fosfátovém pufru, a posléze titrace roztoků LHK, mLHK, IHSS-HK, mIHSS-HK, ČHK, mČHK o koncentraci  $60 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  Septonexem, o koncentraci  $20 \text{ mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$  ( $8,45 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ ) ve fosfátovém pufru, minimálně ve dvojnásobném opakování. Prvotním výsledkem měření je surový záznam tepelného toku v čase. Po následné integraci ploch jednotlivých píků surového záznamu vznikne výsledný záznam coby závislost změny entalpie na koncentraci titračního činidla Septonexu ve vzorkové cele. Dále lze diskutovat samovolnost a průběh reakcí na základě dalších termodynamických parametrů určených přístrojem jako je změna Gibbsovy energie, entalpie a entropie pro danou reakci.

## 5 VÝSLEDKY A DISKUZE

### 5.1 Charakterizace huminových kyselin

Pro experimenty související s předloženou diplomovou prací byl použit standard huminových kyselin (IHSS-HK) izolovaný z Leonarditu, zakoupený od Mezinárodní huminové společnosti IHSS, huminové kyseliny izolované z jihomoravského lignitu (LHK) a huminové kyseliny izolované z černozemě modální (ČHK). U všech tří typů byla provedena selektivní methylace jejich karboxylových skupin popsána v kapitole 4.3 a všech šest takto získaných vzorků bylo charakterizováno pomocí níže popsaných fyzikálně-chemických metod, jimiž byla ověřena i úspěšnost jejich methylací.

#### 5.1.1 Elementární analýza (EA) a termogravimetrie (TGA)

Elementární analýzou bylo stanoveno zastoupení základních biogenních prvků: uhlíku (C), vodíku (H) a dusíku (N) obsažených ve vzorcích huminových kyselin v suchém stavu. Obsah síry (S), která též patří do této skupiny, v nich byl pod detekčním limitem přístroje EuroVector EA3000 CHNS/O k tomuto účelu použitého; ten činí 0,5 hm. %. Termogravimetrickou analýzou byla následně stanovena vlhkost a množství nespalitelného podílu (popela) v těchto vzorcích. Zastoupení kyslíku (O), který je posledním ze skupiny základních biogenních prvků, bylo zjištěno komplementárním dopočtem, tedy po odečtení procentuálního zastoupení vlhkosti, popela a prvků C, H, a N v těchto vzorcích od celku.

Výsledky obou analýz se zastoupením jednotlivých prvků v atomových procentech, jejich atomové poměry vůči uhlíku (vše za předpokladu nulového zastoupení síry) a parametry vlhkosti a popela v hmotnostních procentech se nachází v Tabulce 1.

*Tabulka 1: Elementární a termogravimetrická analýza huminových a methylovaných huminových kyselin*

vzorek	C [at. %]	H [at. %]	N [at. %]	O [at. %]	H/C [-]	O/C [-]	N/C [-]	popel [hm. %]	vlhkost [hm. %]
<b>LHK</b>	40,0	40,5	1,0	18,6	1,01	0,46	0,02	29,7	5,9
<b>mLHK</b>	33,2	53,6	0,9	12,3	1,62	0,37	0,03	29,3	3,6
<b>IHSS-HK</b>	44,2	38,3	1,0	16,5	0,87	0,37	0,02	2,1	7,7
<b>mIHSS-HK</b>	43,2	41,0	1,1	14,8	0,95	0,34	0,02	1,7	2,0
<b>ČHK</b>	34,4	49,4	2,9	13,2	1,44	0,38	0,09	2,0	7,1
<b>mČHK</b>	31,8	54,9	2,5	10,8	1,73	0,34	0,08	2,4	3,5

Z Tabulky 1 je patrné, že huminové kyseliny jsou tvořeny především uhlíkem, vodíkem, kyslíkem a v menším množství i dusíkem. Nejvyšší obsah popela obsahují lignitické huminové kyseliny (LHK) a jejich methylovaná varianta (mLHK), což souvisí s menší mírou purifikace v průběhu izolačního procesu LHK. Míra vlhkosti je dávana do souvislosti s vyšším zastoupením kyselých funkčních skupin ve struktuře huminových kyselin, jako jsou skupiny karboxylové (–COOH) a fenolové (–OH), jejichž prostřednictvím dochází k sorpci vody. Nejvyšší vlhkosti dosahuje standard huminových kyselin IHSS-HK, poté ČHK a nejméně

LHK; tyto výsledky jsou v dobré shodě s hodnotami celkové kyselosti těchto vzorků, viz kapitola 5.1.3.

Vyšší obsah kyslíku ve strukturách huminových kyselin značí vyšší přítomnost kyselých funkčních skupin, jako jsou skupiny karboxylové  $-\text{COOH}$  a fenolové  $-\text{OH}$ . Vyšší obsah uhlíku ukazuje na více aromatický charakter huminových kyselin na úkor přítomnosti alifatických skupin. Obsah dusíku je často dáván do souvislosti s mikrobiální činností v průběhu humifikačního procesu, přičemž jeho vyšší obsah obvykle poukazuje na přítomnost nerozložené organické hmoty. Nejvíce dusíku obsahují ČHK izolované ze svrchní vrstvy (0-20 cm) zemědělské půdy. U LHK i standardu IHSS-HK je dusík obsažen ve stejném množství.

Skrze atomové poměry mohou být vlastnosti huminových kyselin vyloženy následovně. Vyšší O/C poměr značí vyšší přítomnost kyselých funkčních skupin souvisejících s vyšší mírou oxidace těchto látek. Vyšší H/C poměr ukazuje na přítomnost většího počtu alifatických jednotek ve struktuře a nižší H/C poměr naopak souvisí s vyšší mírou dehydrogenace a výraznějším aromatickým charakterem huminových kyselin.

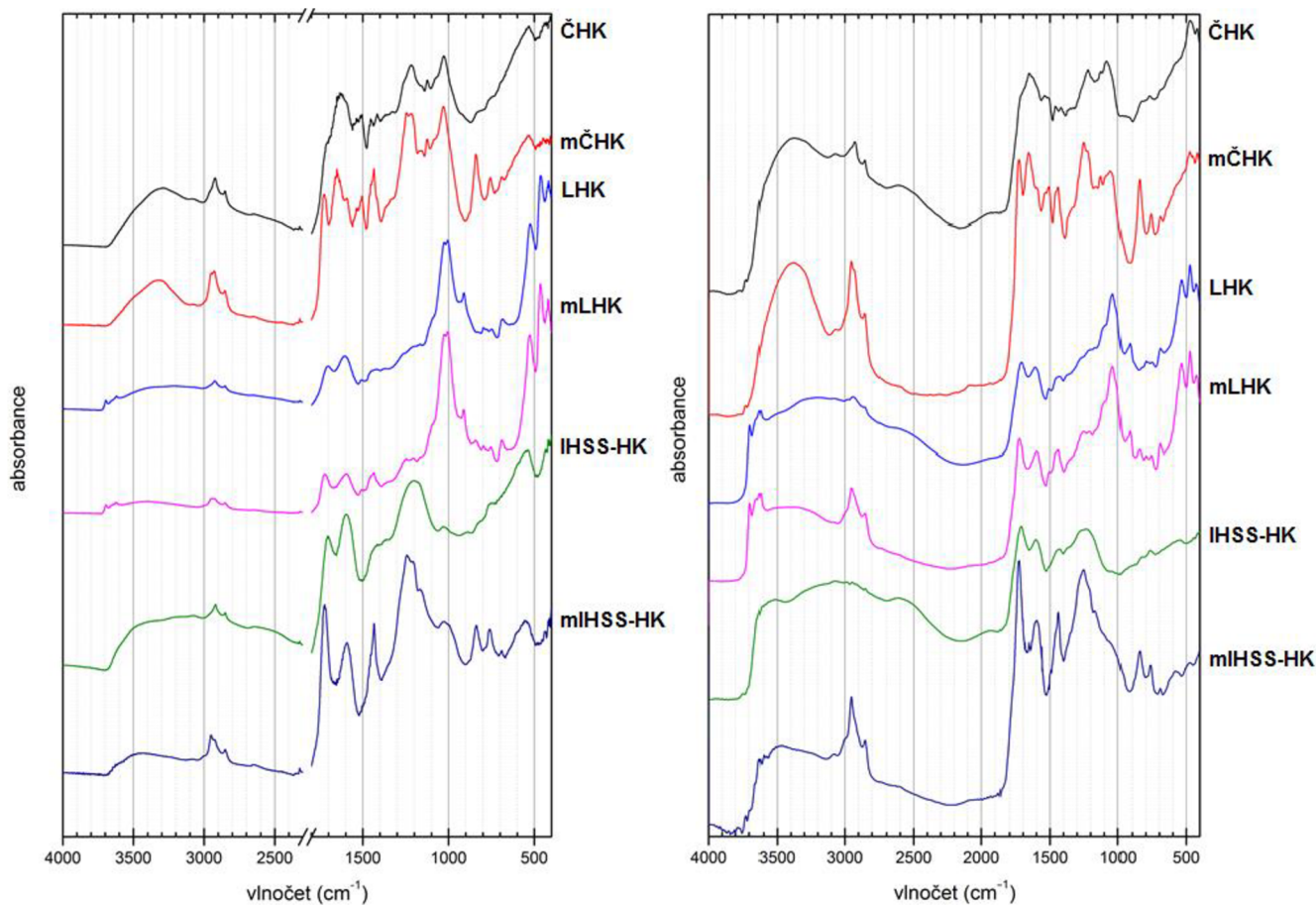
Při porovnání huminových kyselin před a po methylovaní je z hodnot v Tabulce 1 patrné, že ve struktuře methylovaných huminových kyselin (mHK) dochází k nárůstu množství vodíku a klesajícímu zastoupení kyslíku, neboť se při ní modifikují karboxylové skupiny methylovými skupinami (z tvaru  $-\text{COOH}$  na tvar  $-\text{COOCH}_3$ ). Úspěšnou methylací je tedy možné očekávat při zvýšeném poměru H/C a nižším poměru O/C. Navíc při ní dochází a v našem konkrétním případě i došlo k poklesu jejich vlhkosti, což přímo souvisí s blokadou karboxylových skupin, běžně se podílejících na sorpci vody, jak bylo popsáno výše.

Ukázky termogravimetrických křivek vytvořených v programu *TA Universal Analysis* z dat termogravimetrické analýzy pro IHSS-HK na Obrázku 38 a pro mIHSS-HK na Obrázku 39 se nachází v kapitole Přílohy. V křivkách je vyznačen odečet vlhkosti při teplotě  $105\text{ }^{\circ}\text{C}$  a množství popela při teplotě  $700\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

### 5.1.2 Infračervená spektrofotometrie s Fourierovou transformací (FT-IR)

Infračervená spektrofotometrie s Fourierovou transformací v této práci byla použita k ověření úspěšnosti methylace huminových kyselin. Spektra naměřená technikami ATR a DRIFT jsou na Obrázku 21.

Ve spektrech mHK jsou v porovnání se spektry HK patrné následující rozdíly: V oblasti vlnočtů  $2950\text{ cm}^{-1}$  a  $2850\text{ cm}^{-1}$  dochází u mHK k zesílení intenzity pásu odpovídající valenční vibraci C–H v  $\text{CH}_3$ . Další změna je případně mHK patrná při  $1730\text{ cm}^{-1}$ , kde dochází ke zvýšení intenzity pásu odpovídající valenční vibraci C=O v esterové vazbě. Vliv modifikace je patrný i změnou při  $1240\text{ cm}^{-1}$  odpovídající valenční C–C–O vibraci esteru. Ve spektru z techniky DRIFT je u mHK patrné nižší zastoupení karboxylových funkčních skupin ze snížené intenzity pásu při  $2600\text{ cm}^{-1}$ . Na základě výše popsaných rozdílů ve spektrech HK a mHK (pozorovaných i v práci [46]) lze tvrdit, že methylace karboxylových funkčních skupin u vzorků mHK proběhla úspěšně.



Obrázek 21: Spektra HK a mHK naměřená technikami ATR (vlevo) a DRIFT (vpravo)

### 5.1.3 Titrační určení kyselosti huminových kyselin

Kyselost vzorků huminových a methylovaných huminových kyselin byla určena pomocí zpětné titrace, z níž byla spočtena celková kyselost huminových kyselin způsobená přítomností fenolových a karboxylových funkčních skupin ve struktuře huminových kyselin. Pomocí karboxylátové titrace podle acetátové metody byla spočtena kyselost daná přítomností karboxylových funkčních skupin ve struktuře huminových kyselin, což z této titrace činí ideální metodu pro ověření úspěšnosti methylace karboxylových skupin ve vzorcích mHK. Hodnota fenolické kyselosti byla dopočítána jako rozdíl celkové a karboxylátové kyselosti stanovené u každého vzorku. Výsledky kyselostí huminových a methylovaných huminových kyselin vztažené k hmotnosti vzorků jsou uvedeny v Tabulce 2.



Tabulka 2: Výsledné hodnoty kyselosti huminových a methylovaných huminových kyselin určené zpětnou a karboxylátovou titrací

vzorek	celková kyselost [mmol·g <sup>-1</sup> ]	karboxylátová kyselost [mmol·g <sup>-1</sup> ]	fenolická kyselost [mmol·g <sup>-1</sup> ]
<b>LHK</b>	15,66 ± 0,08	2,44 ± 0,05	13,22 ± 0,13
<b>mLHK</b>	12,35 ± 0,12	0,16 ± 0,08	12,19 ± 0,24
<b>IHSS-HK</b>	18,32 ± 0,22	3,63 ± 0,02	14,69 ± 0,29
<b>mIHSS-HK</b>	13,04 ± 0,36	0,30 ± 0,04	12,76 ± 0,07
<b>ČHK</b>	17,35 ± 2,02	2,50 ± 0,06	14,86 ± 0,06
<b>mČHK</b>	16,58 ± 2,04	0,13 ± 0,11	16,46 ± 0,11

Z Tabulky 2 je patrné, že **nejvyšší hodnotu celkové i karboxylátové kyselosti** má standard huminových kyselin **IHSS-HK** a posléze **ČHK** a **LHK**. Dle literatury má na reaktivitu huminových kyselin největší vliv právě přítomnost „kyselých“ karboxylových a fenolových funkčních skupin, proto je očekáváno, že budou výsledky kyselosti huminových kyselin souviset s afinitou mezi huminovými kyselinami a kationickým tenzidem Septonexem. Nejvyšší hodnotu fenolické kyselosti dosahuje **ČHK**.

U všech vzorků mHK modifikovaných selektivní methylací jejich karboxylových skupin došlo dle očekávání k velmi výraznému poklesu hodnot karboxylátové kyselosti (blížíci se nule) a tedy i ke snížení hodnot celkové kyselosti u těchto vzorků. Na základě výsledků karboxylátové titrace lze tvrdit, že **účinnost blokace karboxylových skupin methylací** u všech vzorků mHK (oproti jejich původním variantám) **převyšuje 90 %**. Takto modifikované karboxylové skupiny huminových kyselin, nyní ve stavu –COOCH<sub>3</sub>, by se již nadále neměly podílet při interakcích s iontovými látkami (v této práci konkrétně s kationickým tenzidem Septonexem) skrze elektrostatické interakce.

#### 5.1.4 Stanovení kritické agregační koncentrace (CAC) Septonexu s HK a mHK

Kritické agregační koncentrace kationického tenzidu Septonexu s LHK, mLHK, IHSS-HK a mIHSS-HK v prostředí fosfátového pufru byly pomocí metody rozptylu stanoveny následovně, výsledky viz Tabulka 3.

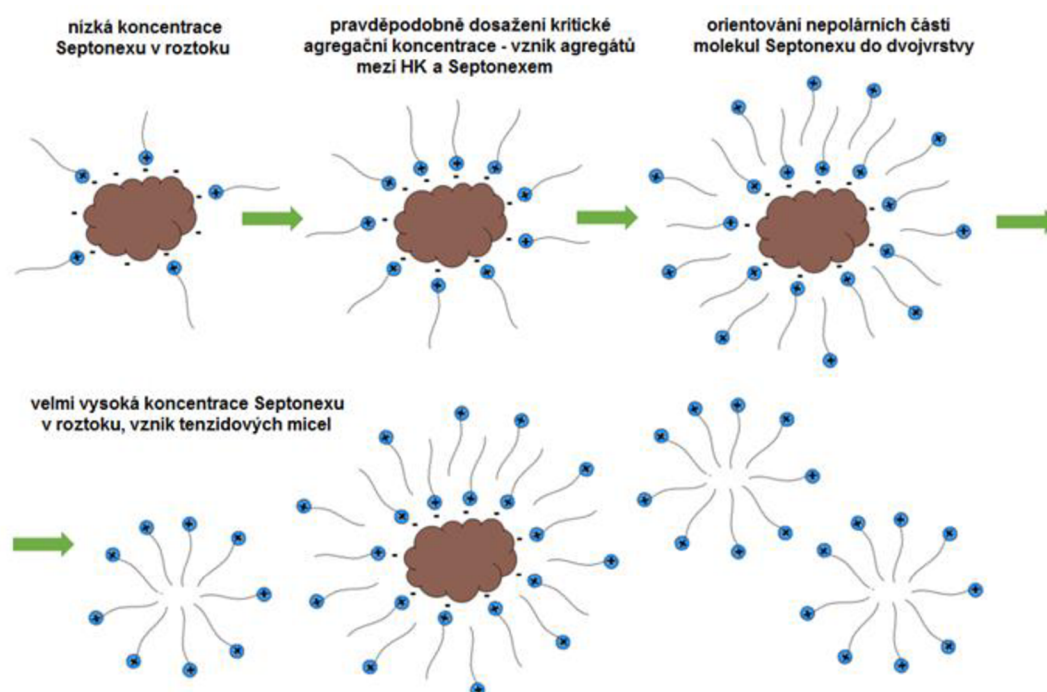
Tabulka 3: Výsledné hodnoty CAC systémů Septonex-LHK, mLHK, IHSS-HK, mIHSS-HK v prostředí fosfátového pufru

vzorek	CAC systémů Septonex-HK/mHK ve fosfátovém pufru [mmol·dm <sup>-3</sup> ]
<b>LHK</b>	0,091 ± 0,006
<b>mLHK</b>	0,145 ± 0,005
<b>IHSS-HK</b>	0,092 ± 0,013
<b>mIHSS-HK</b>	0,128 ± 0,020

Nejprve je nutno zmínit, že při počátečních měřeních CAC u systémů Septonex-HK a mHK na přístroji ZetaSizer Nano ZS byly roztoky HK a mHK filtrovány přes stříkačkový filtr s velikostí pórů 5  $\mu\text{m}$ , bohužel však výsledky naměřené při takovémto postupu nebyly reprodukovatelné (přístroj ZetaSizer Nano ZS má potíže s měřením roztoků s částicemi většími 2  $\mu\text{m}$ ). Proto bylo nutno roztoky HK a mHK před dalšími měřeními filtrovat přes stříkačkový filtr s velikostí pórů 0,45  $\mu\text{m}$ , i když při takto malé velikosti pórů filtru hrozí, že stanovená hodnota CAC nemusí 100 % odpovídat reálné CAC ve studovaném systému.

Z Tabulky 3 je patrné, že k agregaci nemodifikovaných huminových kyselin (HK) stačí nižší koncentrace kationického tenzidu Septonexu v roztoku, než v případě methylovaných huminových kyselin. Tento fakt lze odůvodnit tím, že HK disponují větším množstvím potenciálních vazebných míst a mohou s molekulami Septonexu snáze interagovat (především elektrostaticky) skrze své karboxylové funkční skupiny. U mHK, které mají tyto funkční skupiny zablokované pro interakce s iontovými látkami a disponují tím menším množstvím potenciálních vazebných míst, dochází nejprve ke vzniku micel mezi samotnými molekulami Septonexu a s rostoucí koncentrací začnou jeho volné molekuly interagovat s mHK, což vede až k jejich agregaci.

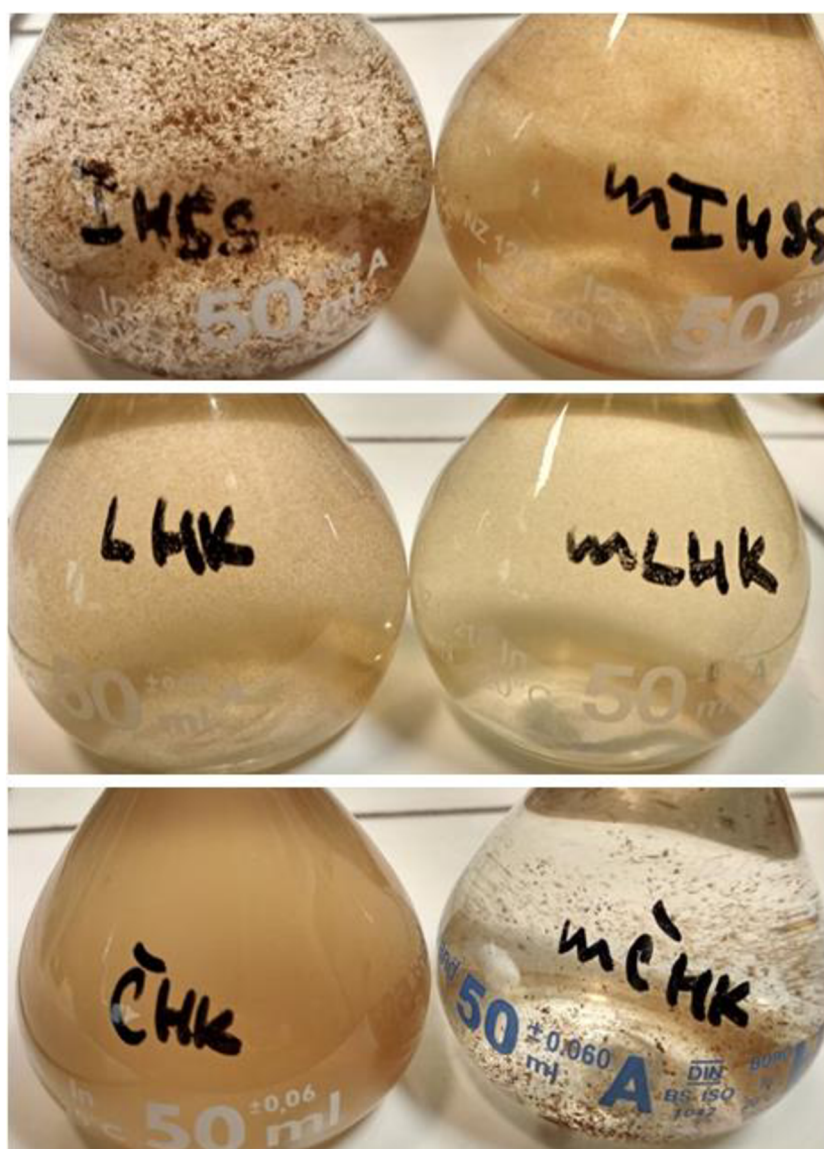
Důležité je zjištění, že LHK interagují se Septonexem nejen před, ale i po dosažení CAC – odůvodněno v kapitole 5.3.1. Domníváme se, že by interakce mezi kationickým tenzidem Septonexem a HK s postupně se zvyšující koncentrací Septonexu v roztoku mohly probíhat podle následujícího vytvořeného schématu, viz Obrázek 22. Obdobný názor mají i autoři článku [37], viz jejich Obrázek 13 v kapitole 2.1.



Obrázek 22: Schéma pravděpodobně probíhajících interakcí, mezi HK (znázorněny hnědě) a kationickým tenzidem Septonexem s jeho rostoucí koncentrací v roztoku

### ***Vizuální potvrzení agregace Septonexu s HK a mHK v odměrných baňkách***

Vznik drobných hnědých agregátů mezi kationickým tenzidem Septonexem a všemi typy vzorků HK i mHK byl vizuálně potvrzen jednoduchým experimentem. Odměrné baňky o objemech 50 ml obsahovaly Septonex o koncentraci  $80 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  a HK či mHK o koncentraci  $50 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  ve fosfátovém pufru o pH 7,4 a iontové síle  $0,05 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$  (obdobně jako při experimentech v difúzních celách); jejich stav po 24 hodinách míchání na magnetické míchačce při 250 ot/min dokumentuje a agregaci potvrzuje Obrázek 23.



Obrázek 23: Vizuální potvrzení agregace Septonexu, (shora) s IHSS-HK, mIHSS-HK, LHK, mLHK, ČHK a mČHK v prostředí fosfátového pufru

## **5.2 Stanovení kritické micelární koncentrace (CMC) Septonexu**

### **5.2.1 Metoda rozptylu světla**

Kritická micelární koncentrace kationického tenzidu Septonexu v prostředí fosfátového pufru byla stanovena metodou rozptylu světla (viz kapitola 4.5.1) s výsledkem  $0,0300 \pm 0,0055 \text{ mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$ .

### 5.2.2 Stanovení CMC měřením povrchového napětí

Kritická micelární koncentrace kationického tenzidu Septonexu v prostředí fosfátového pufru byla pro porovnání stanovena i měřením závislosti povrchového napětí vodných roztoků Septonexu na jeho koncentraci (viz kapitola 4.5.2) s výsledkem  $0,0296 \pm 0,0006 \text{ mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$ .

Stanovené hodnoty CMC oběma použitými metodami jsou téměř totožné a v přepočtu z molární koncentrace na hmotnostní (byl použit jejich aritmetický průměr  $0,0298 \text{ mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$ ) je tato hodnota rovna  $12,59 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ .

Protože na počátku difúzních (dialyzačních) experimentů obsahovala zdrojová komora difúzní cely pokaždé koncentraci  $80 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  Septonexu ve fosfátovém pufru a v případě izotermické titrační kalorimetrie mělo titrační činidlo  $8,45 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  Septonexu ve fosfátovém pufru – byl při všech prováděných experimentech zabezpečen dostatek „volných molekul“ kationického tenzidu Septonexu v roztoku.

### 5.3 Difúzní (dialyzační) experimenty

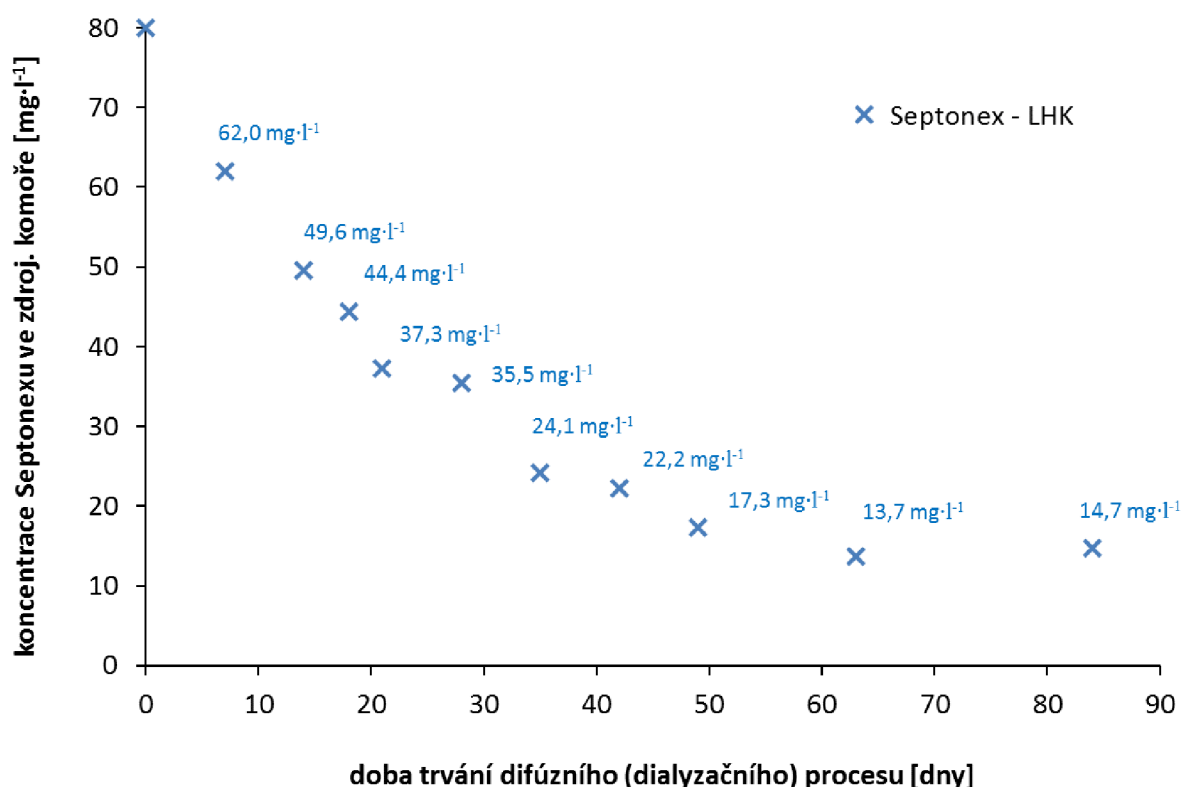
Vlastním úkolem této práce je studium interakcí mezi huminovými kyselinami a kationickým tenzidem Septonexem, u něhož lze vzhledem k jeho náboji očekávat pozitivní interakce s huminovými kyselinami. **Dle literatury karboxylové a fenolové skupiny ve struktuře huminových kyselin dominují a jsou příčinou jejich kyselosti a komplexační a sorpční kapacity pro různé anorganické i organické látky [2, 5].**

Abychom mohli posoudit vliv karboxylových skupin ve strukturách huminových kyselin při interakcích s modelovým organickým polutantem Septonexem, byly tyto skupiny huminových kyselin modifikovány methylací. Takto pozměněné karboxylové skupiny huminových kyselin již nemohou disociovat a podílet se na interakcích s iontovými látkami jako je Septonex skrze elektrostatické interakce. **Proto lze předpokládat, že by měl Septonex reagovat více s původními vzorky HK než s jejich methylovanou formou.**

Po blokaci karboxylových skupin methylací je možné vyhodnotit i vliv dalších efektů podílejících se na interakcích huminových kyselin jako jsou například vodíkové můstky, Van der Waalsovy síly a hydrofobní efekt.

Experimenty v difúzních celách byly prováděny vždy se 60 ml roztoku Septonexu o koncentraci  $80 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  ve fosfátovém pufru ve zdrojové komoře a se 60 ml roztoku huminových (LHK, IHSS-HK, ČHK) či methylovaných huminových kyselin (mLHK, mIHSS-HK, mČHK) o koncentraci  $50 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  ve fosfátovém pufru v přijímací komoře. Míra těchto interakcí byla posuzována sledováním úbytku koncentrace Septonexu ve zdrojové komoře difúzní cely v čase, neboli sledováním kinetiky jeho přechodu přes dialyzační membránu do přijímající komory difúzní cely s huminovými kyselinami. Tento proces byl ukončen nastolením rovnovážného stavu difúzního (dialyzačního) procesu.

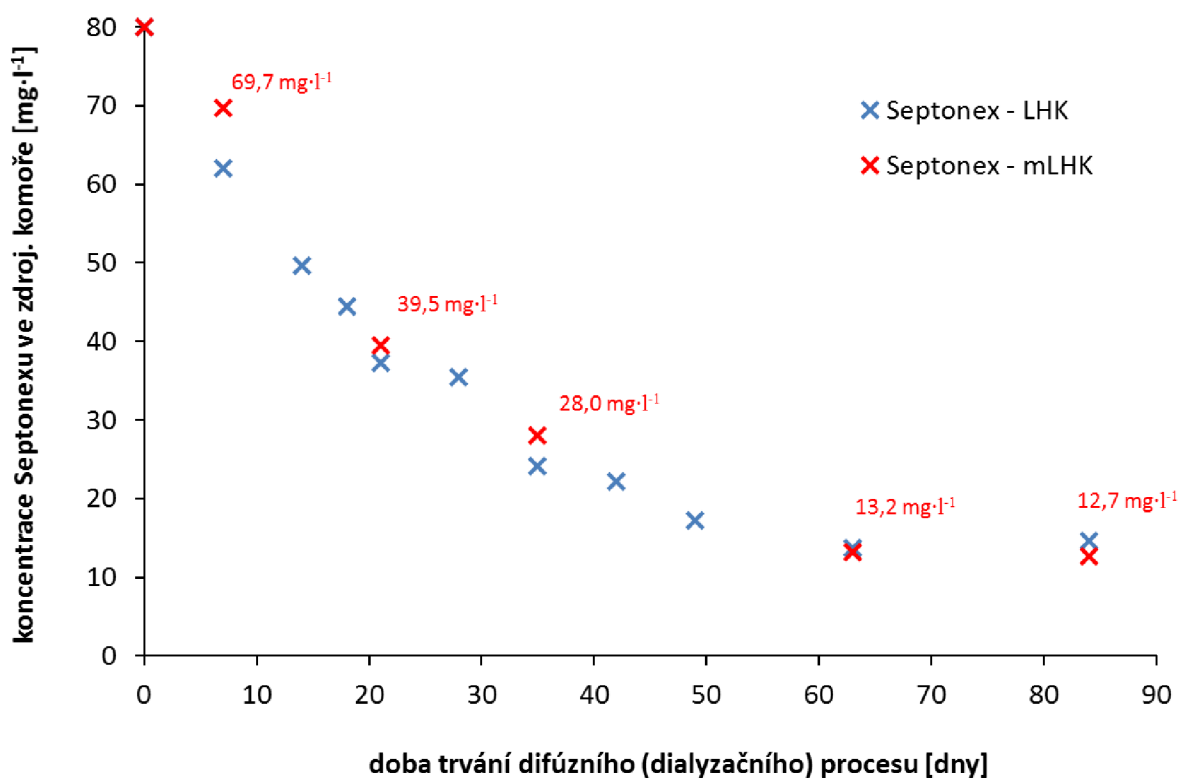
Na počátku experimentů bylo nutné stanovit vhodné časování pro odběry vzorků roztoku Septonexu ze zdrojové komory (1; 2; 2,5; 3; 4; 5; 6; 7; 9 a 12 týdnů), po odběrech zjistit jeho koncentrace a vyhodnotit dobu nastolení rovnovážného stavu difúzního (dialyzačního) procesu potřebnou pro výpočet zdánlivé rovnovážné konstanty  $K_{app}$  – viz kapitola 2.5.2. Toho bylo v případě difúzního (dialyzačního) procesu se Septonexem a huminovými kyselinami izolovanými z lignitu (LHK) ve fosfátovém pufru s jistotou dosaženo po 12 týdnech, jak ukazuje Obrázek 24.



Obrázek 24: Kinetika difúzního (dialyzačního) procesu pro Septonex a LHK

Z Obrázku 25 je patrná kinetika úbytku koncentrace Septonexu ve zdrojové komoře difúzní cely s tím, že na počátku experimentu dochází k nejrazantnějším úbytkům Septonexu, kdy za první týden poklesla jeho koncentrace ve zdrojové komoře o 22,5 % a po druhém týdnu o dalších 20 %, což je dáno jeho difúzní charakteristikou, charakterově blízkou exponenciálnímu průběhu se záporným koeficientem v jeho exponentu, která svědčí o pozitivní afinitě mezi Septonexem a LHK. Ze záznamu je patrné, že rovnovážného stavu bylo pravděpodobně dosaženo již po 9 týdnech difúzního (dialyzačního) procesu (13,7 mg·l<sup>-1</sup>), což bylo s jistotou potvrzeno až díky odběru po 12 týdnech (14,7 mg·l<sup>-1</sup>), kdy už koncentrace Septonexu ve zdrojové komoře difúzní cely zůstala prakticky nezměněná.

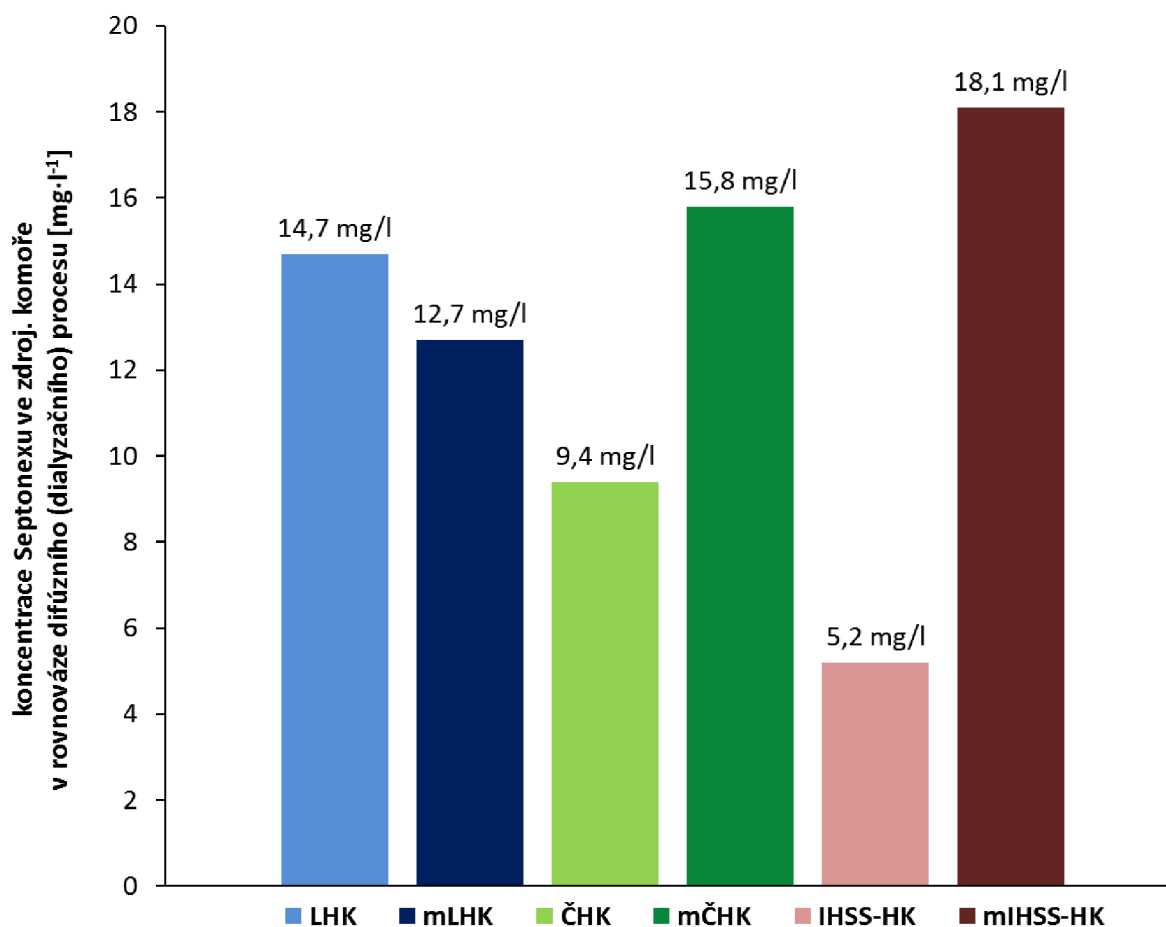
Abychom ověřili, zda bude pro methylované huminové kyseliny izolované z lignitu (mLHK) dosaženo obdobného průběhu jako pro LHK na Obrázku 24, byl výše uvedený experiment zopakován i pro mLHK s odběry vzorků v časových intervalech 1, 3, 5, 9 a 12 týdnů, jak dokumentuje Obrázek 25.



Obrázek 25: Kinetika difúzního (dialyzačního) procesu pro Septonex s LHK i mLHK

Z průběhu poklesu koncentrace Septonexu ve zdrojové komoře v čase je z Obrázku 25 patrné, že v případě mLHK bylo rovněž rovnovážného stavu s jistotou dosaženo při odběru po 12 týdnech. Navíc byla u mLHK až do 5. týdnu odběru pozorována vyšší koncentrace Septonexu ve zdrojové komoře, než v případě experimentu s původními LHK, což značí, že se při interakcích Septonexu a mLHK musela projevit blokáce karboxylových skupin, a tedy snížení počtu potenciálních vazebných míst pro molekuly Septonexu ve srovnání s LHK. Samotný trend poklesu koncentrace Septonexu ve zdrojové komoře v čase se ale pro LHK a mLHK neliší natolik, jak jsme očekávali – dle literatury [2, 5] jsou karboxylové funkční skupiny obecně považovány za jedny z nejdůležitějších, nejvíce zastoupených, a tím pádem i nejvíce reaktivitu ovlivňujících skupin v huminových kyselinách.

Výše popsané difúzní (dialyzační) experimenty byly provedeny i pro zbývající typy huminových kyselin IHSS-HK a ČHK a jejich methylované varianty mIHSS-HK a mČHK, tentokrát už (vzhledem k časové náročnosti experimentů) jen pro dobu odběru 12 týdnů, v níž jsme s vysokou mírou pravděpodobnosti předpokládali dosažení rovnovážného stavu i u těchto vzorků, vzhledem k jejich reaktivitě. Výsledné hodnoty koncentrací Septonexu ve zdrojové komoře difúzní cely po 12 týdnech pro všechny typy HK i mHK shrnuje sloupcový graf na Obrázku 26. Čím menší koncentrace Septonexu zůstala ve zdrojové komoře, tím více molekul Septonexu muselo přejít přes dialyzační membránu do přijímací komory s HK či mHK, což svědčí o vyšší afinitě HK k tenzidu.

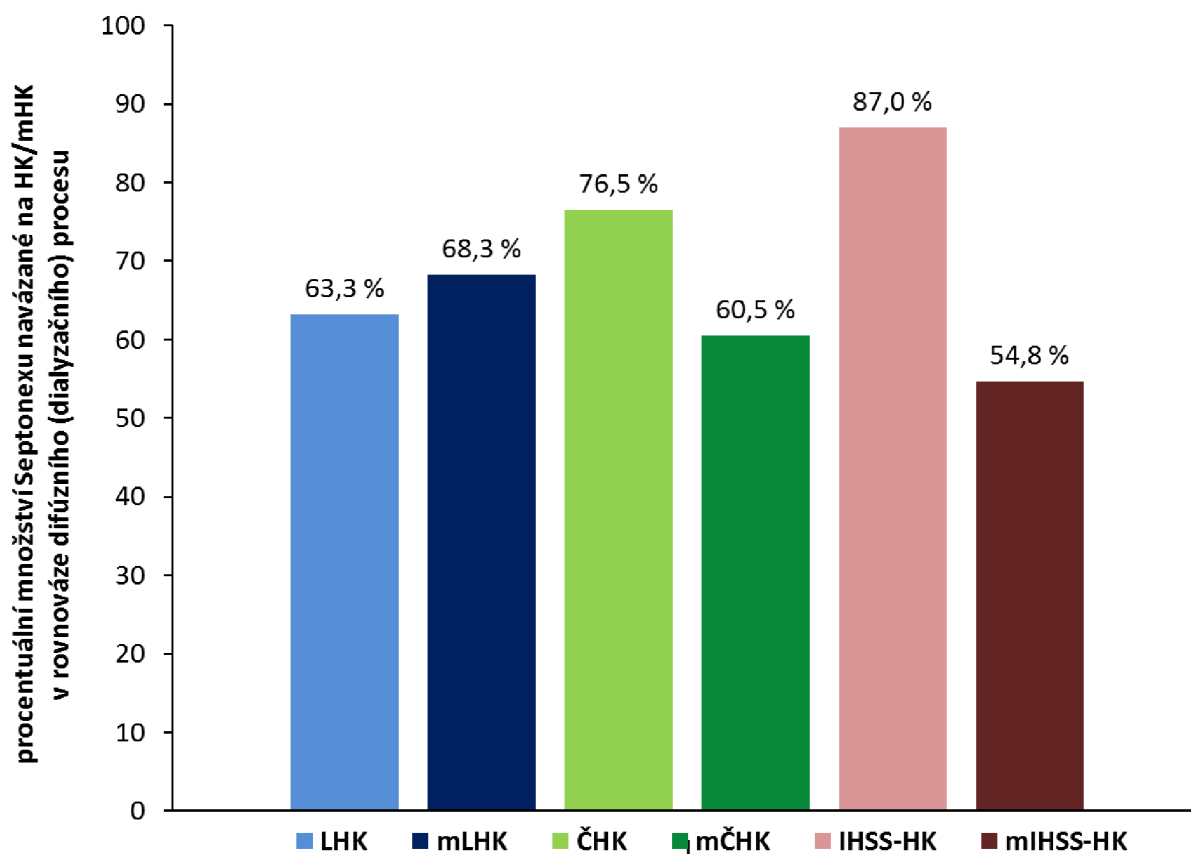


Obrázek 26: Koncentrace Septonexu ve zdrojové komoře v rovnováze difúzního (dialyzačního) procesu s HK a mHK

Ve sloupcovém grafu na Obrázku 26 je v případě ČHK a IHSS-HK patrný razantní pokles koncentrace Septonexu ve zdrojové komoře ve srovnání s experimenty s mČHK a mIHSS-HK – v obou těchto případech se výrazně projevil vliv blokace karboxylových skupin ve struktuře huminových kyselin, kde kationický tenzid **Septonex interaguje s původními ČHK a IHSS-HK více, než s jejich methylovanými formami**. V případě LHK a mLHK se rozdíl ve stanovené koncentraci Septonexu ve zdrojové cele smývají, což je pravděpodobně způsobeno až 30 % obsahem popela ve vzorcích LHK a mLHK (související s menší mírou purifikace při izolaci LHK) ve srovnání s přibližně 2-3 % obsahem popela (a tedy větší mírou purifikace) vzorků ČHK, mČHK, IHSS-HK a mIHSS-HK (viz výsledky z EA analýzy, kapitola 5.1.1). Z dosavadních výsledků vyplývá, že při interakcích mezi HK a Septonexem určité zastávají důležitou roli elektrostatické interakce, způsobené přítomností kyselých fenolových –OH a karboxylových –COOH funkčních skupin ve struktuře HK. Pro huminové kyseliny IHSS-HK a ČHK byl navíc ověřen původní předpoklad, že s nimi Septonex interagoval více, než s jejich methylovanými variantami mIHSS-HK a mČHK.

Pro lepší představu vazebných interakcí probíhajících v difúzní cele, byl sloupcový graf na Obrázku 26 vyjádřen i ve tvaru procentuálního množství Septonexu navázaného na HK a mHK v přijímací komoře při rovnovážném stavu z jeho původní koncentrace  $80 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  ve zdrojové komoře na počátku difúzního procesu, viz Obrázek 27.

Při výpočtu koncentrace Septonexu ve formě navázané na HK či mHK při rovnovážném stavu bylo využito rovnic (10), (11) a (12) odvozených v teoretické části této práce.



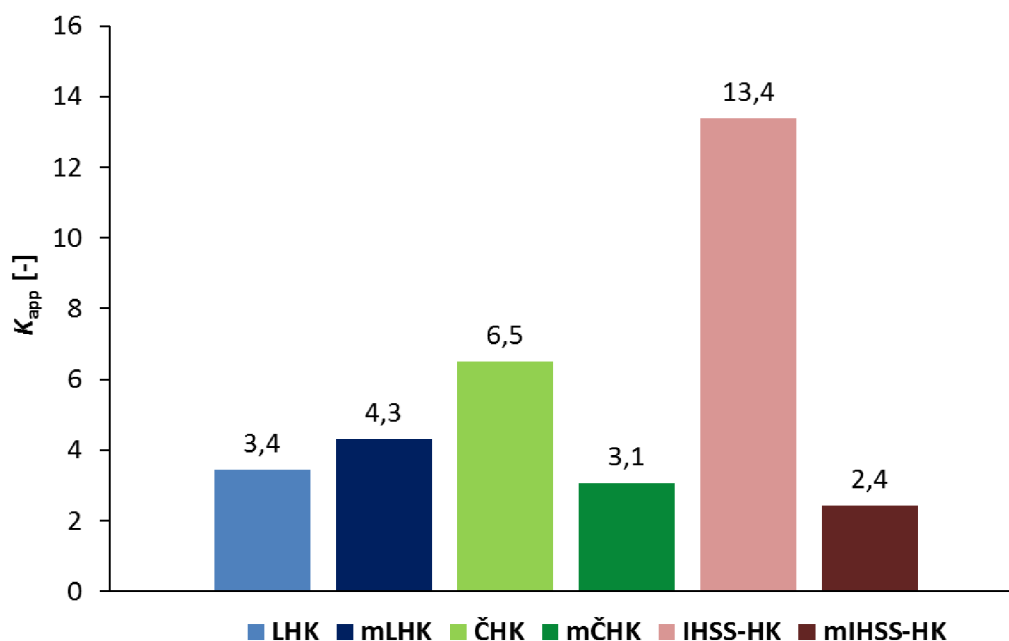
Obrázek 27: Procentuální množství Septonexu navázané na HK a mHK v rovnováze difúzního (dialyzačního) procesu z jeho původní koncentrace  $80 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$

Na závěr difúzních experimentů je proveden **výpočet zdánlivé rovnovážné konstanty  $K_{app}$**  z koncentrace Septonexu ve zdrojové komoře po 12 týdnech difúzních (dialyzačních) experimentů, kdy bylo v případě HK i mHK prokazatelně dosaženo rovnovážného stavu.  $K_{app}$  dává do poměru koncentraci Septonexu ve formě navázané na HK či mHK, ku volné koncentraci Septonexu v obou komorách difúzní cely. Čím větší hodnoty  $K_{app}$  nabývá, tím větší množství Septonexu je na konci difúzního (dialyzačního) procesu ve formě navázané na HK či mHK, z čehož lze přímo vyvodit závěry o vzájemné afinitě Septonexu a huminových kyselin.

Na sloupcovém grafu na Obrázku 28 jsou vyneseny vypočítané hodnoty zdánlivých rovnovážných konstant  $K_{app}$  pro Septonex a HK i mHK. Nejprve je nutno podotknout, že všechny hodnoty  $K_{app}$  dosahují u všech typů HK i mHK hodnot vyšších než 1, nehledě na jejich metylaci, což svědčí o pozitivní afinitě HK i mHK vůči Septonexu a také o tom,



že se po dosažení rovnovážného stavu v difúzních celách vyskytuje modelový kationický tenzid Septonex ve větší míře ve stavu navázaném na HK či mHK, než ve formě volné. Z tohoto důvodu tak nemohou být interakce mezi HK a Septonexem řízeny jen přítomností  $-\text{COOH}$  skupin ve strukturách HK. **Z porovnání výsledků  $K_{\text{app}}$  mezi HK a mHK je dále patrné, že vliv samotných  $-\text{COOH}$  skupin ve struktuře HK (které jsou podle výsledků karboxylátových titrací u mHK blokovány z více než 90 %) není celkově při interakcích HK a Septonexu (coby modelovým organickým polutantem) natolik rozhodující, jak by se dle literatury dalo očekávat.** Vzhledem ke struktuře Septonexu a rozmanitým funkčním skupinám ve struktuře HK lze očekávat, že se při jejich interakcích bude uplatňovat hydrofobní efekt, vodíkové můstky a Van der Waalovy síly. Nemůže být však opomenut fakt, že u mHK není účinnost blokace jejich karboxylových skupin 100 %.



Obrázek 28: Hodnoty  $K_{\text{app}}$  pro Septonex s HK a mHK v rovnováze difúzního (dialyzačního) procesu

Z Obrázku 29 vyplývá, že **Septonex nejvíce interaguje se standardem huminových kyselin IHSS-HK, dále s ČHK a nejméně s LHK**, což je v přesném souladu s výsledky celkových kyselostí, určených zpětnou titrací, těchto vzorků v kapitole 4.1.3:  $\text{IHSS-HK} (18,3 \text{ mmol}\cdot\text{g}^{-1}) > \text{ČHK} (17,4 \text{ mmol}\cdot\text{g}^{-1}) > \text{LHK} (15,7 \text{ mmol}\cdot\text{g}^{-1})$ .

Standard huminových kyselin IHSS-HK navíc dosahuje oproti ČHK ( $2,5 \text{ mmol}\cdot\text{g}^{-1}$ ) a LHK ( $2,4 \text{ mmol}\cdot\text{g}^{-1}$ ) nejvyšší hodnoty karboxylátové kyselosti ( $3,6 \text{ mmol}\cdot\text{g}^{-1}$ ), což rozhodně potvrzuje důležitost zapojení  $-\text{COOH}$  skupin huminových kyselin při interakcích se Septonexem, neboť výsledky fenolické kyselosti mezi IHSS-HK ( $14,7 \text{ mmol}\cdot\text{g}^{-1}$ ) a ČHK ( $14,9 \text{ mmol}\cdot\text{g}^{-1}$ ) jsou velmi obdobné.

Z porovnání reaktivity LHK a ČHK plyne, že oba vzorky dosahují téměř stejných hodnot karboxylátové kyselosti, ale přitom ČHK nabývá téměř dvakrát vyšší hodnoty  $K_{\text{app}}$  než LHK. Tento fakt je zřejmě zapříčiněn již zmíněným vysokým obsahem popela (téměř 30 %) ve vzorku LHK (i mLHK).

Co se týče methylovaných huminových kyselin, interaguje Septonex nejvíce s mLHK, poté s mČHK a nakonec s mIHSS-HK. Rozdíly v reaktivitě mezi mČHK ( $16,6 \text{ mmol}\cdot\text{g}^{-1}$ ) a mIHSS-HK ( $13,0 \text{ mmol}\cdot\text{g}^{-1}$ ) jsou opět v souladu s výsledky celkových kyselostí těchto vzorků. V případě mLHK, které by měly podle výsledků celkové kyselosti ( $12,3 \text{ mmol}\cdot\text{g}^{-1}$ ) interagovat se Septonexem nejméně ze všech mHK, je tomu ale přesně naopak. Tento výsledek je zřejmě opět způsoben až 30 % obsahem popela ve vzorku LHK a tedy i mLHK.

### 5.3.1 Agregace LHK a Septonexu pozorovaná v přijímací komoře difúzní cely

Při stanovování koncentrace Septonexu během difúzního (dialyzačního) experimentu s LHK byly přibližně po 4 týdnech pozorovány v přijímací komoře difúzní cely drobné hnědé agregáty, viz Obrázek 40 v kapitole Přílohy.

To však nemělo na samotné stanovení koncentrace Septonexu během difúzního experimentu vliv, protože je míra interakcí mezi Septonexem a HK posuzována na základě koncentrace Septonexu ve zdrojové komoře difúzní cely, kde zůstal roztok Septonexu čirý.

Z grafu na Obrázku 24 je přitom patrné, že i po čtvrtém týdnu difúzního procesu s LHK koncentrace Septonexu ve zdrojové komoře v čase stále exponenciálně klesala, což vypovídá o pozitivní afinitě Septonexu vůči LHK i přes viditelnou agregaci v přijímací komoře difúzní cely.

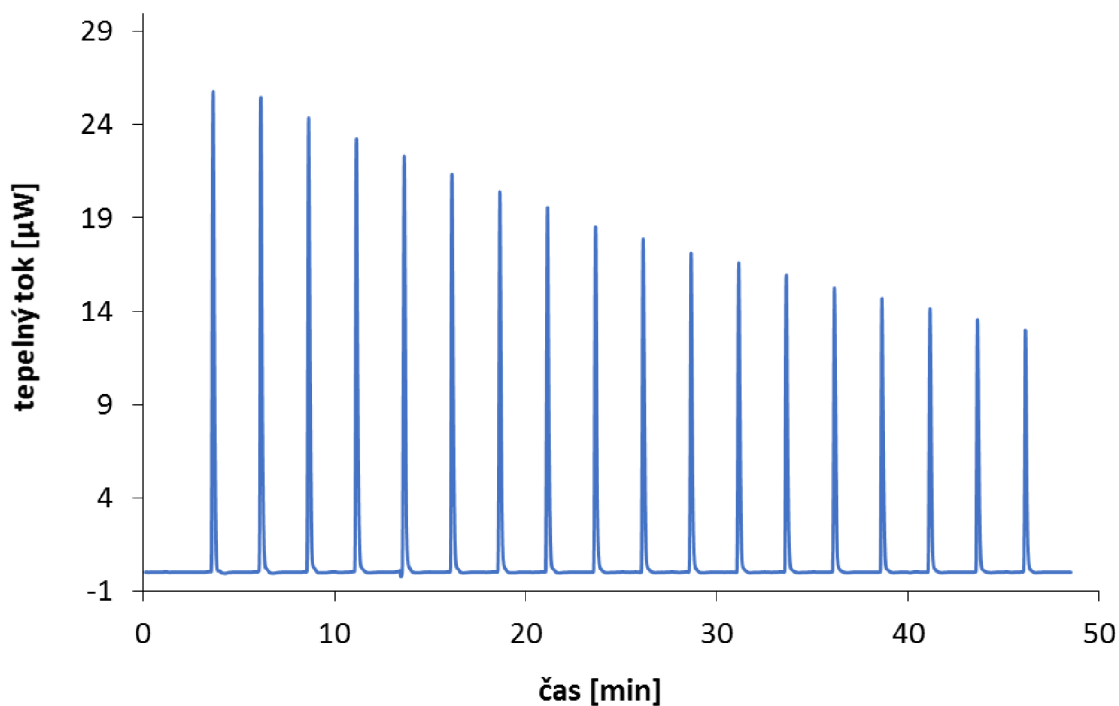
Vzhledem k tomu, že po čtyřech týdnech difúzního procesu měl dle grafu na Obrázku 24 roztok Septonexu ve zdrojové komoře koncentraci  $35,5 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ , neboli  $44,5 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  Septonexu muselo být přítomno v komoře přijímací, lze tvrdit, že LHK interagují se Septonexem před i po dosažení CAC, neboť CAC systému, která dle kapitoly 4.4.4 pro LHK-Septonex činí  $0,091 \text{ mmol}\cdot\text{dm}^{-3} = 38,45 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ , byla po 4 týdnech v přijímací komoře difúzní komory již překročena.

Domníváme se, že interakce mezi Septonexem a HK by mohly probíhat podle mechanismu na Obrázku 22.

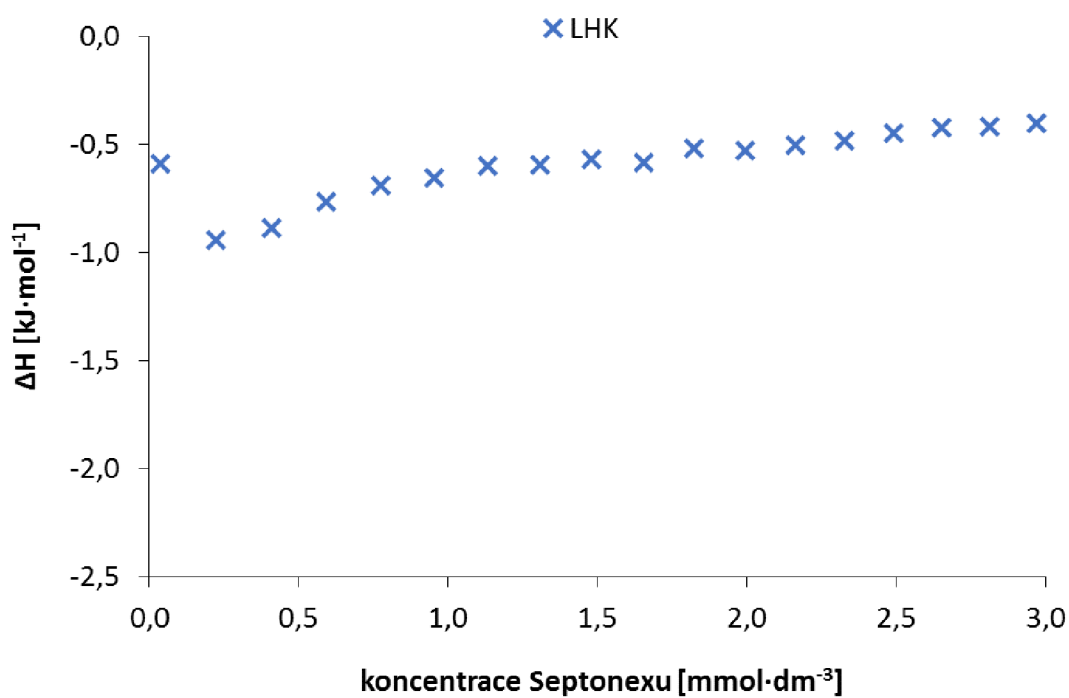
### 5.4 Izotermická titrační kalorimetrie (ITC)

Izotermická titrační kalorimetrie je spolu s difúzními celami další metodou využitou v této práci pro studium interakcí kationického tenzidu Septonexu s HK a mHK, která je schopná objasnit charakter probíhajících interakcí ve studovaném systému z termodynamického hlediska skrze záznam tepelných změn mezi vzorkovou a referenční celou v průběhu titrace.

Výsledkem měření izotermického titračního kalorimetru je nejprve surový záznam tepelného toku v čase; příklad surového záznamu titrace LHK Septonexem je znázorněn na Obrázku 30. Po následné integraci ploch jednotlivých piků, odpovídajícím přídávčkám titračního činidla Septonexu v průběhu reakce, vznikne ze surového záznamu výsledný záznam, coby závislost změny entalpie ( $\Delta H$ ) na molární koncentraci titračního činidla Septonexu ve vzorkové cele, viz Obrázek 30.



Obrázek 29: Surový záznam tepelného toku v čase pro Septonex-LHK



Obrázek 30: Výsledný ITC záznam pro systém Septonex-LHK

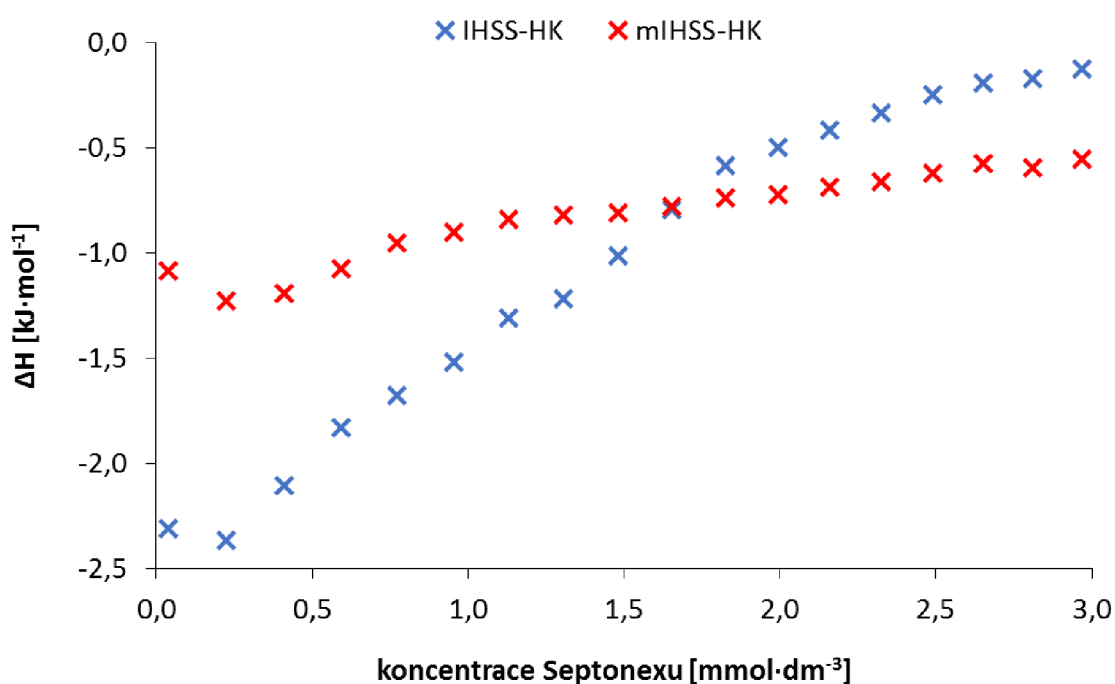
Na základě výsledků z ITC byl ověřen předpoklad, že Septonex interaguje se všemi vzorky HK více než s jejich methylovanými formami mHK.

U všech typů HK byla ve výsledných záznamech entalpií na koncentraci Septonexu pozorována vyšší síla interakcí, než v případě mHK.

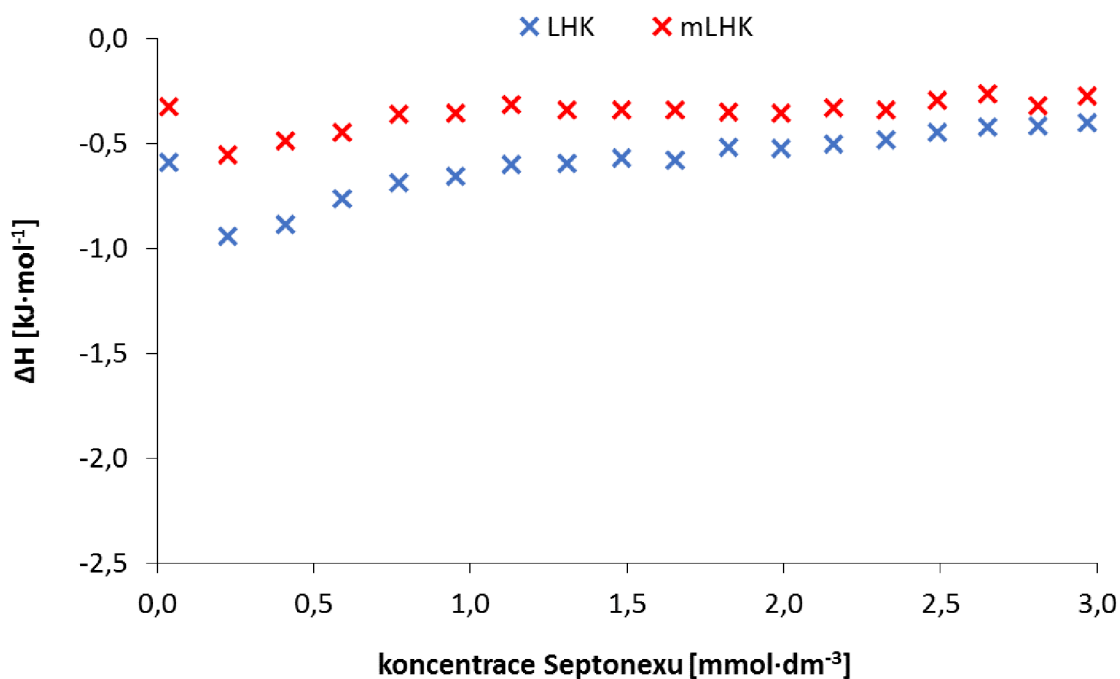
V souvislosti s tím je nutno podotknout, že ve všech výsledných záznamech interakcí HK a mHK se Septonexem byly hodnoty entalpií (pohybující se v rozsahu  $-2,37$  až  $-0,13$   $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ ) mnohem menší, než jsme původně očekávali. Může to být zapříčiněno tím, že zřejmě proces agregace HK či mHK se Septonexem je např. endotermního charakteru, zatímco samotné interakce HK či mHK se Septonexem jsou exotermního charakteru (případně naopak) a vzhledem k tomu, že tyto procesy probíhají ve vzorkové cele současně, tak se tepelné změny během titrace vzájemně kompenzují. Toto je jen naše experimentálně nepodložená hypotéza, která může být jedním z vysvětlení, proč jsou změny entalpií ve výsledných záznamech interakcí HK a mHK se Septonexem tak malé.

Proto nebyl popis těchto systémů skrze absolutní termodynamické hodnoty pro celkové reakce s jistotou prokazatelný a my jsme se tudíž rozhodli posuzovat míru interakcí Septonexu s HK a mHK spíše ze vzájemných trendů jejich entalpických křivek.

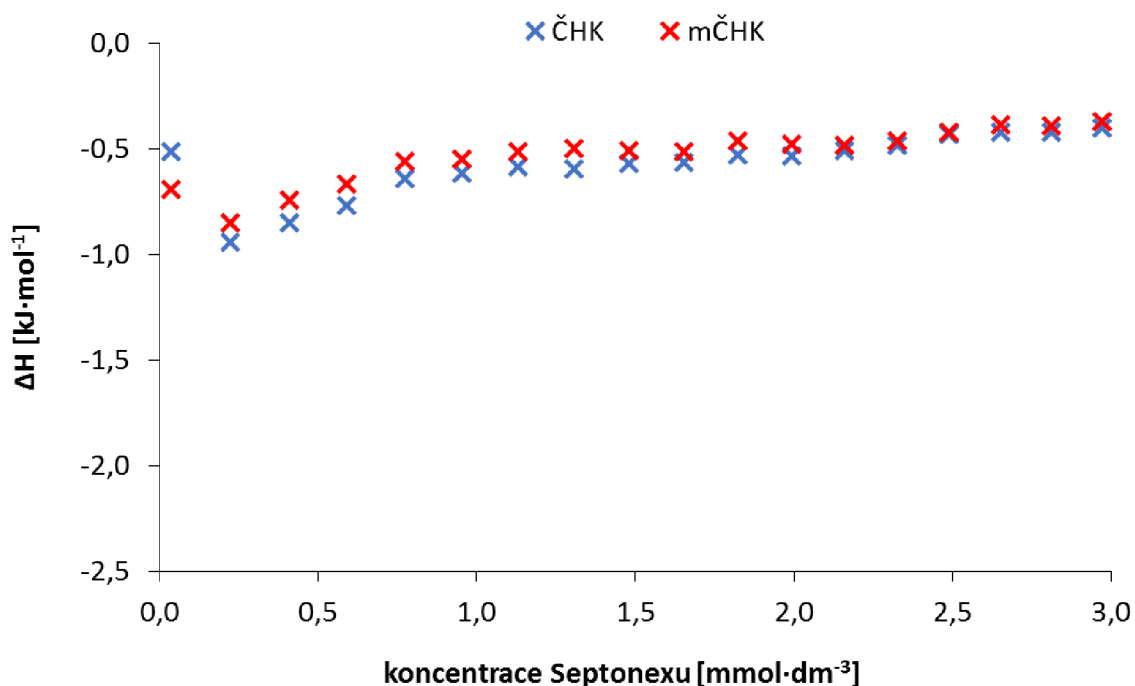
Cílem ITC bylo, stejně jako v případě difúzních cel, dokázat, že HK interagují se Septonexem více než jejich methylovaná forma mHK. To lze vypožorovat ze záznamů změn entalpií na koncentraci Septonexu, protože HK vykazují silnější tepelné zabarvení chemické reakce se Septonexem a  $\Delta H$  je v tomto případě vzdálenější od nuly než u mHK. Obrázek 31 dokumentuje tento stav pro IHSS a mIHSS, Obrázek 32 pro LHK a mLHK a Obrázek 33 pro ČHK a mČHK..



Obrázek 31: Výsledný ITC záznam pro Septonex s IHSS-HK a mIHSS-HK



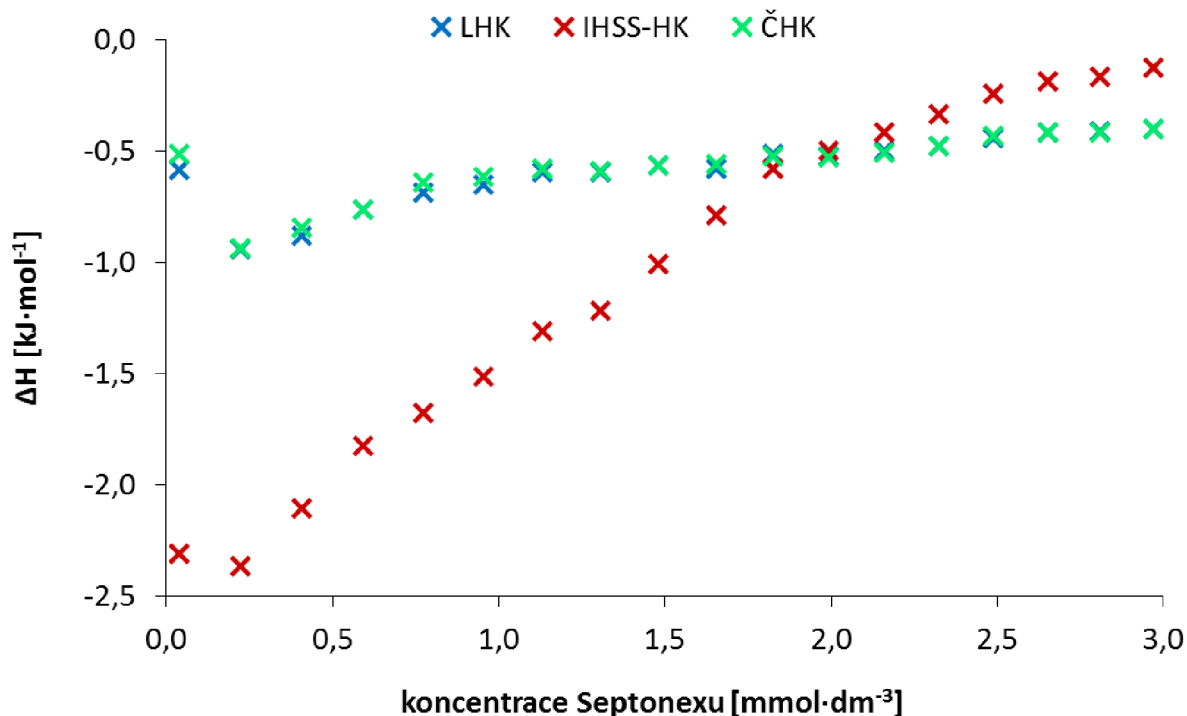
Obrázek 32: Výsledný ITC záznam pro Septonex s LHK a mLHK



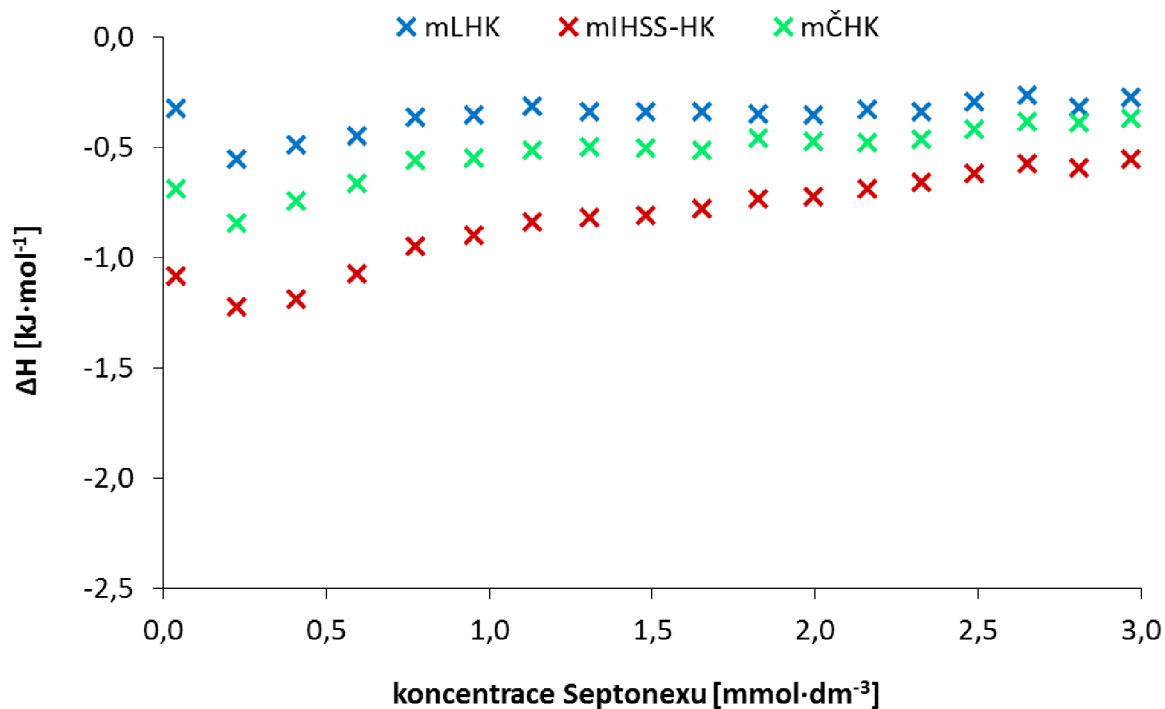
Obrázek 33: Výsledný ITC záznam pro Septonex s ČHK a mČHK

Z výsledných záznamů interakcí Septonexu s HK na Obrázku 34 a s mHK na Obrázku 35 je patrné, že **IHSS-HK i mIHSS-HK interagují se Septonexem nejvíce** v porovnání se zbývajícími typy HK a mHK, protože mají  $\Delta H$  nejvíce vzdálené od nuly, což svědčí o silnějším tepelném zabarvení chemických reakcí. Nejvyšší reaktivitu ve srovnání se zbylými typy HK vykazovaly IHSS-HK i podle experimentů z difúzních cel – což je v souladu s nejvyššími hodnotami celkové a karboxylátové kyselosti IHSS-HK ze všech HK, viz kapitola 5.1.3.

Naopak **LHK a mLHK interagují se Septonexem** ze všech typů HK a mHK **nejméně**, protože mají  $\Delta H$  nejbližší k nule, což svědčí o slabším tepelném zabarvení reakce. Tento výsledek lze odůvodnit na základě toho, že LHK i mLHK dosahují nejmenších hodnot celkových kyselostí v porovnání se zbývajícími typy HK i mHK, viz kapitola 5.1.3.



Obrázek 34: Výsledný ITC záznam pro Septonex se všemi typy HK



Obrázek 35: Výsledný ITC záznam pro Septonex se všemi typy mHK

## 6 ZÁVĚR

Náplní této diplomové práce bylo prostudovat interakce huminových kyselin (HK) izolovaných z různých zdrojů a jejich ekvivalentů se selektivně blokovanými karboxylovými funkčními skupinami formou methylace (mHK) s modelovým organickým polutantem v podobě kationického tenzidu Septonexu prostřednictvím dialyzačních a difúzních technik, realizovaných v difúzních celách a zároveň metodou izotermické titrační kalorimetrie. Výsledky z obou metod byly vzájemně korelovány a byl vyhodnocen vliv methylace HK při těchto interakcích, díky němuž jsme mohli usuzovat o významu a důležitosti karboxylových funkčních skupin ve struktuře huminových kyselin s ohledem na interakce s běžnými polutanty.

Protože koncentraci tenzidu v difúzní cele nelze přímo (například spektrofotometricky stanovit), byla pro tyto účely optimalizována metoda potenciometrické titrace s využitím iontově selektivní elektrody pro tenzidy, díky níž bylo možné stanovovat změnu koncentrace Septonexu ve zdrojové komoře difúzní cely v čase až do dosažení rovnovážného stavu. I tato samotná optimalizace zmíněné metodiky má významný vliv pro stanovení koncentrace tenzidů ve vodných roztocích titrační metodou.

Míra interakcí mezi Septonexem a HK či mHK byla posuzována skrze zdánlivou rovnovážnou konstantu  $K_{app}$ , vyjadřující množství Septonexu ve formě navázané na HK či mHK v rovnováze dialyzačního procesu (difúzní cely) a dále skrze porovnání výsledných záznamů entalpií na koncentraci Septonexu s HK či mHK získaných z izotermické titrační kalorimetrie titrací tenzidu do roztoku huminových kyselin a tomu odpovídajícím měřením tepelných toků při interakci těchto dvou látek.

Na základě výsledků z dialyzačních a difúzních experimentů (difúzní cely) i z izotermické titrační kalorimetrie byl potvrzen původní předpoklad, že kationický tenzid Septonex interagoval s původními vzorky HK více, než s jejich methylovanými formami, čímž se potvrdil vliv zapojení karboxylových funkčních skupin HK při těchto interakcích. Rozdíly v interakcích HK a mHK se Septonexem však nebyly natolik odlišné, jak jsme očekávali – vzhledem k tomu, že jsou dle literatury [2, 4] karboxylové funkční skupiny obecně považovány za jedny z nejdůležitějších, nejvíce zastoupených, a tím pádem i nejvíce reaktivitu ovlivňujících skupin v huminových kyselinách.

Podle výsledků  $K_{app}$  z difúzních cel vykazovaly nejvyšší míru reaktivity se Septonexem IHSS-HK, dále ČHK a nakonec LHK, což je v přesném souladu s hodnotami celkových kyselostí těchto vzorků HK. Podle výsledků z ITC vykazovaly nejvyšší míru reaktivity se Septonexem rovněž již zmíněné IHSS-HK, které mají navíc i nejvyšší hodnotu karboxylátové kyselosti ze všech vzorků HK.

Výsledky rovněž ukázaly, že Septonex interagoval se všemi typy HK i mHK, nehledě na methylaci karboxylových funkčních skupin HK, což značí, že HK neinteragují se Septonexem pouze elektrostaticky skrze své karboxylové funkční skupiny, ale že se při těchto interakcích (vzhledem ke struktuře a vlastnostem Septonexu i HK) pravděpodobně s velkou mírou uplatňují i hydrofobní interakce, vodíkové vazby a Van der Waalsovy síly.

## 7 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- [1] SKOKANOVÁ, M. a K. DERCOVÁ. Humínové kyseliny. Pôvod a štruktúra. *Chemické listy*. 2008, (102), 262-268.
- [2] PITTER, Pavel. *Hydrochemie*. 4., aktualiz. vyd. Praha: Vydavatelství VŠCHT Praha, 2009. ISBN 978-80-7080-701-9.
- [3] Isolation of IHSS Soil Fulvic and Humic Acids. © 2020 International Humic Substances Society [online]. <https://humic-substances.org/isolation-of-ihss-soil-fulvic-and-humic-acids/>
- [4] KHANNA, Rajesh, S. P. (Suraj Prakash) AGARWAL a R. K. (Roop Krishen) KHAR. *Humic substances in drug development*. New Delhi: Studium Press (India), 2009, x, 248 s.: il. ISBN 978-81-907577-1-3.
- [5] PIVOKONSKÝ, Martin, Petra VAŠATOVÁ, Jana NAČERADSKÁ a Lenka PIVOKONSKÁ. *Koagulace při úpravě vody: teorie a praxe*. Praha: Academia, 2020. ISBN 978-80-200-3116-7.
- [6] PICCOLO, Alessandro. *The supramolecular structure of humic substances: A novel understanding of humus chemistry and implications in soil science*. Elsevier, 2002, 2002, 57-134. *Advances in Agronomy*. doi:10.1016/S0065-2113(02)75003-7
- [7] VON WANDRUSZKA, Ray. Humic acids: Their detergent qualities and potential uses in pollution remediation. *Geochemical Transactions*. 2000, 1(1). ISSN 1467-4866. doi:10.1186/1467-4866-1-10
- [8] SMATANOVÁ, Michaela, Aleš SUŠIL, Miroslav FLORIÁN a Daniel JUREČKA. Výsledky agrochemického zkoušení zemědělských půd za období 2012–2017: Č.j.: UKZUZ 128497/2018. Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Sekce zemědělských vstupů, Brno, září 2018, 37.
- [9] TAN, Kim H. (Kim Howard). *Humic matter in soil and the environment: principles and controversies*. 2nd ed. Boca Raton: CRC Press, 2014, xxxii, 463 s.: il. ISBN 9781482234459.
- [10] SKOKANOVÁ, M. a K. DERCOVÁ. Humínové kyseliny. Interakcie humínových kyselín s kontaminantami. *Chemické listy*. 2008, (102), 338-345.
- [11] CHIANESE, Simeone, Angelo FENTI, Pasquale IOVINO, Dino MUSMARRA a Stefano SALVESTRINI. Sorption of Organic Pollutants by Humic Acids: A Review. *Molecules*. 2020, 25(4). ISSN 1420-3049. doi:10.3390/molecules25040918
- [12] CAPASSO, Sante, Simeone CHIANESE, Dino MUSMARRA a Pasquale IOVINO. Macromolecular Structure of a Commercial Humic Acid Sample: Their detergent qualities and potential uses in pollution remediation. *Environments*. 2020, 7(4). ISSN 2076-3298. doi:10.3390/environments7040032
- [13] ANĐELKOVIĆ, T., R. NIKOLIĆ, A. BOJIĆ, D. ANĐELKOVIĆ a G. NIKOLIĆ. Binding of cadmium to soil humic acid as a function of carboxyl group content. *Macedonian Journal of Chemistry and Chemical Engineering*. 2010, r. 29, č. 2, s. 215–224. ISSN 1857-5552.
- [14] SMILEK, Jiří, Petr SEDLÁČEK, Michal KALINA a Martina KLUČÁKOVÁ. On the role of humic acids' carboxyl groups in the binding of charged organic compounds. *Chemosphere*. 2015, 138, 503-510. DOI:



- 10.1016/j.chemosphere.2015.06.093. ISSN 00456535.  
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0045653515007134>
- [15] POMPE, S., K. SCHMEIDE, M. BUBNER, Gerhard GEIPEL, K. H. HEISE, G. BERNHARD a Heino NITSCHKE. Investigation of humic acid complexation behavior with uranyl ions using modified synthetic and natural humic acids. *Radiochimica Acta*. 2000, 88(9-11). ISSN 2193-3405.  
doi:10.1524/ract.2000.88.9-11.553
- [16] ANDJELKOVIC, T., J. PEROVIC, M. PURENOVIC, S. BLAGOJEVIC, R. NIKOLIC, D. ANDJELKOVIC a A. BOJIC. A direct potentiometric titration study of the dissociation of humic acid with selectively blocked functional groups. *Eclética Química*. 2006, 31(3), 39-46. ISSN 0100-4670.  
doi:10.1590/S0100-46702006000300005
- [17] PEÑA-MÉNDEZ, Eladia M., Josef HAVEL, Jiří PATOČKA a Pasquale IOVINO. Humic substances – compounds of still unknown structure: applications in agriculture, industry, environment, and biomedicine. *Journal of Applied Biomedicine*. 2005, 3(1), 13-24. ISSN 1214021X. doi:10.32725/jab.2005.002
- [18] Huminové látky, Výživa a krmení [online]. © 2021 Agropress.cz – Zemědělství, živočišná výroba, články, reportáže a rozhovory.  
<https://www.agropress.cz/huminove-latky/>
- [19] ŠMIDRKAL, Jan. *Tenzidy*. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 2020. ISBN 978-80-7592-056-0.
- [20] Chemie a technologie tenzidů II, Ing. Jana Sedlaříková, Ph.d. [online]. Fakulta Technologická, Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně.  
<https://docplayer.cz/29914679-Chemie-a-technologie-tenzidu-ii.html>
- [21] BARTOVSKÁ, Lidmila a Marie ŠIŠKOVÁ. *Fyzikální chemie povrchů a koloidních soustav*. Vyd. 5., přeprac. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 2005. ISBN 80-708-0579-X.
- [22] OPHTHALMO-SEPTONEX Oční kapky, roztok 10 ml [online]. Lékárna.cz: © 2021 Pears Health Cyber. <https://www.lekarna.cz/ophthalmo-septonex-1x10ml-plast-ocni-kapky-roztok/>
- [23] Organická chemie: Dusíkaté deriváty a heterocykly [online]. [cit. 2021-03-22]. [http://www.mojechemie.cz/Organick%C3%A1\\_Chemie:Dus%C3%ADkat%C3%A9\\_deriv%C3%A1ty\\_a\\_heterocykly](http://www.mojechemie.cz/Organick%C3%A1_Chemie:Dus%C3%ADkat%C3%A9_deriv%C3%A1ty_a_heterocykly)
- [24] *Isothermal Titration Calorimetry (ITC)* [online]. © Copyright 2021 - Malvern Panalytical Ltd is a Spectris company [cit. 2021-03-22].  
<https://www.malvernpanalytical.com/en/products/technology/microcalorimetry/isothermal-titration-calorimetry?fbclid=IwAR3n3JK87ff2AnPCyK9dHSTwVpTms-74MT9RGk07FknKAMKbCzjoKoSS9io>
- [25] ARCHER, William R. a Michael D. SCHULZ. Isothermal titration calorimetry: practical approaches and current applications in soft matter. *Soft Matter*. 2020, 16(38), 8760-8774. ISSN 1744-683X. doi:10.1039/D0SM01345E
- [26] J. McMurry, *Organická chemie. Vyd. 1*. Brno: VUTIUM, 2007, ISBN 978-80-214-3291-8.

- [27] Ch. Schalley, *Analytical Methods in Supramolecular Chemistry*, Kapitola 3, *Weinheim: Wiley-VCH*, 2007, ISBN 978-3-527-31505-5.
- [28] ŠTĚPÁNKOVÁ, Veronika. Mikrokalorimetrie pro studium biomakromolekul; *LOSCHMIDTOVY LABORATOŘE MASARYKOVA UNIVERZITA* [online]. In: *Biofyzikální chemie II*, 29.11.2013 [cit. 2021-03-22]. [https://is.muni.cz/el/sci/podzim2013/C5855/um/11\\_Stepankova\\_Mikrokalorimetrie.pdf?fbclid=IwAR3FbOA44NWGyq20rGAY188mAikQekSS4QWuQHhFA2MZ2aPwUU2P28r-5F0](https://is.muni.cz/el/sci/podzim2013/C5855/um/11_Stepankova_Mikrokalorimetrie.pdf?fbclid=IwAR3FbOA44NWGyq20rGAY188mAikQekSS4QWuQHhFA2MZ2aPwUU2P28r-5F0)
- [29] *Dialýza* [online]. [cit. 2021-03-22]. [http://www.lfp.cuni.cz/biochemie/pages/vyuka/materialy/Dial%C3%BDza\\_teorie.pdf](http://www.lfp.cuni.cz/biochemie/pages/vyuka/materialy/Dial%C3%BDza_teorie.pdf)
- [30] *Dialysis* [online]. National Kidney Foundation: Inc., 30 East 33rd Street, New York, NY 10016, 1-800-622-9010, 2017 [cit. 2021-03-22]. <https://www.kidney.org/atoz/content/dialysisinfo>
- [31] HAYNIE, Donald T. (Donald Templeton). *Biological thermodynamics*. 2nd ed. Cambridge: Cambridge University Press, 2008, xvi, 422 s.: il.; 25 cm. ISBN 978-0-521-71134-0.
- [32] SHANG, Chao a James A. RICE. Investigation of humate-cetyltrimethylammonium complexes by small-angle X-ray scattering. *Journal of Colloid and Interface Science*. 2007, 305(1), 57-61. DOI: 10.1016/j.jcis.2006.09.043. ISSN 00219797. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021979706008538>
- [33] GAMBOA, C. a A.F. OLEA. Association of cationic surfactants to humic acid. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 2006, 278(1-3), 241-245. DOI: 10.1016/j.colsurfa.2005.12.026. ISSN 09277757. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0927775705010113>
- [34] CHU, Deh Ying. a J. K. THOMAS. Effect of cationic surfactants on the conformation transition of poly(methacrylic acid). *Journal of the American Chemical Society*. 1986, 108(20), 6270-6276. DOI: 10.1021/ja00280a026. ISSN 0002-7863. <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ja00280a026>
- [35] KOOPAL, Luuk K., Tanya P. GOLOUB a Thomas A. DAVIS. Binding of ionic surfactants to purified humic acid. *Journal of Colloid and Interface Science*. 2004, 275(2), 360-367. DOI: 10.1016/j.jcis.2004.02.061. ISSN 00219797. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021979704002243>
- [36] ISHIGURO, Munehide, Wenfeng TAN a Luuk K. KOOPAL. Binding of cationic surfactants to humic substances. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 2007, 306(1-3), 29-39. DOI: 10.1016/j.colsurfa.2006.12.024. ISSN 09277757. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0927775706009484>
- [37] BRUM, Mariana Coutinho, José Farias OLIVEIRA a Luuk K. KOOPAL. Removal of humic acid from water by precipitate flotation using cationic surfactants. *Minerals Engineering*. 2007, 20(9), 945-949. DOI: 10.1016/j.mineng.2007.03.004. ISSN 08926875. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0892687507000842>
- [38] OTTO, William H., Danny J. BRITTEN a Cynthia K. LARIVE. NMR diffusion analysis of surfactant–humic substance interactions: Effects of humic substances hydrophobicity and surfactant tail length. *Journal of Colloid and Interface Science*. 2003, 261(2), 508-513. DOI: 10.1016/S0021-9797(03)00062-6. ISSN 00219797. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021979703000626>

- [39] YEE, Min Min, Tohru MIYAJIMA a Noboru TAKISAWA. Study of ionic surfactants binding to humic acid and fulvic acid by potentiometric titration and dynamic light scattering: Effects of humic substances hydrophobicity and surfactant tail length. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 2009, 347(1-3), 128-132. DOI: 10.1016/j.colsurfa.2009.02.010. ISSN 09277757. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0927775709000867>
- [40] VERGÜTZ, Leonardus, Luis Henrique Mendes da SILVA, Roberto Ferreira NOVAIS, Maria do Carmo Hespanhol da SILVA, Aparecida Barbosa MAGESTE a Ivo Ribeiro SILVA. Thermodynamic Characterization of Humic Acid-surfactant Interaction: New Insights into the Characteristics and Structure of Humic Acids. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*. 2015, 39(6), 1633-1642. DOI: 10.1590/01000683rbc20140258. ISSN 0100-0683. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0927775709000867>
- [41] ZHAO, Nan, Yizhong LV, Guixue SONG, Jing ZHANG, Aparecida Barbosa MAGESTE a Ivo Ribeiro SILVA. Sorption behavior of dodecylbenzene sulfonic acid on humic acids from Mollisol and Alluvial soils: New Insights into the Characteristics and Structure of Humic Acids. *Environmental Earth Sciences*. 2016, 75(4), 1633-1642. DOI: 10.1007/s12665-016-5249-6. ISSN 1866-6280. <http://link.springer.com/10.1007/s12665-016-5249-6>
- [42] ZHAO, Nan, Yizhong LV, Guixue SONG, Jing ZHANG, Aparecida Barbosa MAGESTE a Ivo Ribeiro SILVA. Sorption behavior of dodecylbenzene sulfonic acid on humic acids from Mollisol and Alluvial soils: New Insights into the Characteristics and Structure of Humic Acids. *Environmental Earth Sciences*. 2016, 75(4), 1633-1642. DOI: 10.1007/s12665-016-5249-6. ISSN 1866-6280. <http://link.springer.com/10.1007/s12665-016-5249-6>
- [43] SUBBIAH, Deepa, Ashok Kumar MISHRA, Guixue SONG, Jing ZHANG, Aparecida Barbosa MAGESTE a Ivo Ribeiro SILVA. Humic acid-cetyltrimethylammonium bromide interaction: a fluorimetric study. *Luminescence*. 2009, 24(2), 84-89. DOI: 10.1002/bio.1069. ISSN 15227235. <http://doi.wiley.com/10.1002/bio.1069>
- [44] BĚLUŠOVÁ, Anna. Studium interakce huminových látek s povrchově aktivními látkami. Vysoké učení technické v Brně. Fakulta chemická, 2019.
- [45] KLUČÁKOVÁ, Martina a Michal KALINA. Diffusivity of Cu(II) ions in humic gels – influence of reactive functional groups of humic acids. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 2015, 483, 162-170. ISSN 09277757. doi:10.1016/j.colsurfa.2015.05.041
- [46] SMILEK, Jiří. *Nové metody studia reaktivity a transportních vlastností biokoloidů*. Vysoké učení technické v Brně. Fakulta chemická, 2016.
- [47] Potentiometric determination of anionic and cationic surfactants with surfactant electrodes [online]. © Metrohm Česká republika 2010 - 2021 [cit. 2021-7-6]. <https://www.metrohm.com/cs-cz/aplikace/AB-233>

## 8 SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

### 8.1 Seznam symbolů

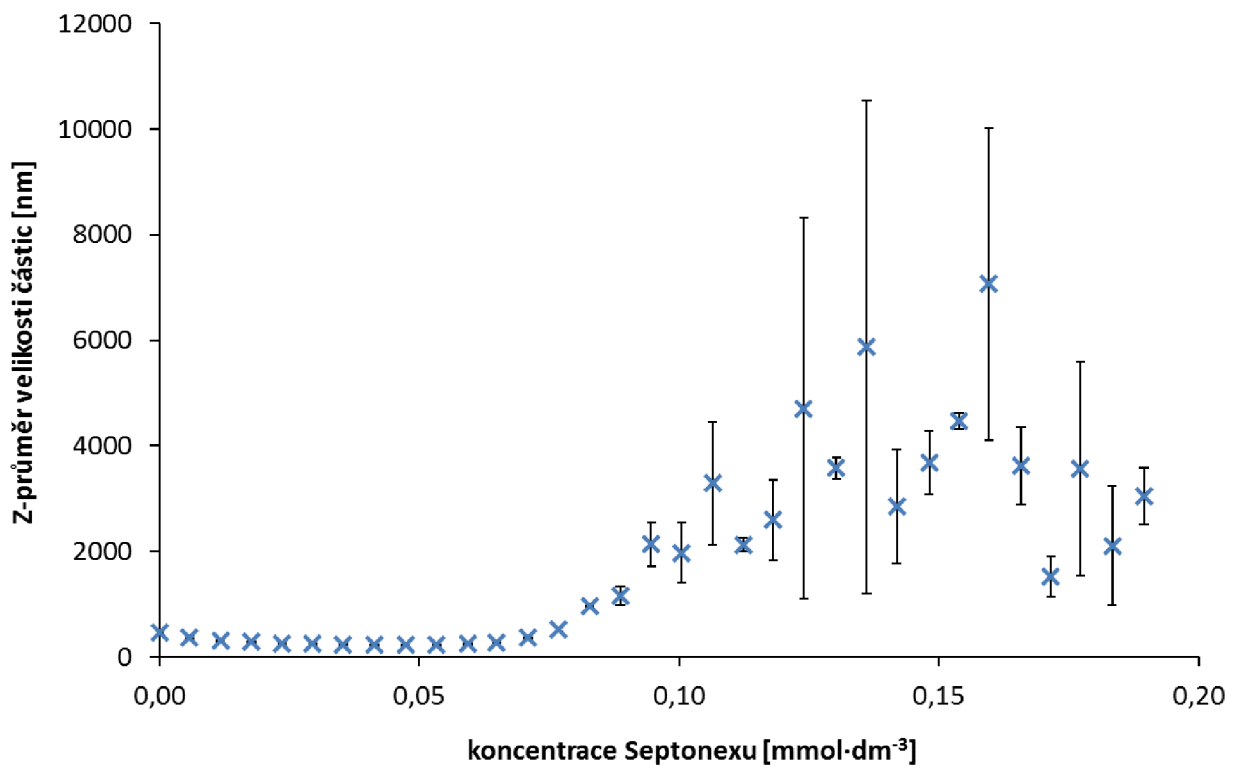
$K_D$	rovnovážná disociační konstanta	[-]
$n$	reakční stechiometrie	[mol]
$\Delta H$	změna entalpie	[kJ·mol <sup>-1</sup> ]
$\Delta G$	změna Gibbsovy energie	[kJ·mol <sup>-1</sup> ]
$\Delta S$	změna entropie	[kJ·mol <sup>-1</sup> ·K <sup>-1</sup> ]
$J_i$	difúzní tok	[mol·m <sup>-2</sup> ·s <sup>-1</sup> ]
$n_i$	látkové množství difundující složky $i$	[mol]
$A$	jednotková plocha kolmá ke směru difúze	[m <sup>2</sup> ]
$u_i$	střední rychlost toku částic	[m·s <sup>-1</sup> ]
$c_i$	koncentrace difundující složky $i$	[mol·dm <sup>-3</sup> ]
$D_i$	difúzní koeficient složky $i$	[m <sup>2</sup> ·s <sup>-1</sup> ]
$x$	vzdálenost v ose $x$	[m]
$f_i$	koeficient tření	[kg·s <sup>-1</sup> ]
$T$	absolutní teplota	[K]
$k_B$	Boltzmannova konstanta	[J·K <sup>-1</sup> ]
$r_i$	poloměr částice	[m]
$\eta_0$	viskozita disperzního prostředí	[Pa·s]
$K_{app}$	zdánlivá rovnovážná konstanta	[-]
$c_0$	koncentrace tenzidu ve zdroj. komoře na počátku experimentu	[mg·l <sup>-1</sup> ]
$C$ vázaná na HK	koncentrace tenzidu vázaná na huminové kyseliny	[mg·l <sup>-1</sup> ]
$C$ volná, zdroj. komora	koncentrace volného tenzidu ve zdrojové komoře	[mg·l <sup>-1</sup> ]
$C$ volná, přij. komora	koncentrace tenzidu v přijímací komoře	[mg·l <sup>-1</sup> ]

### 8.2 Seznam zkratk

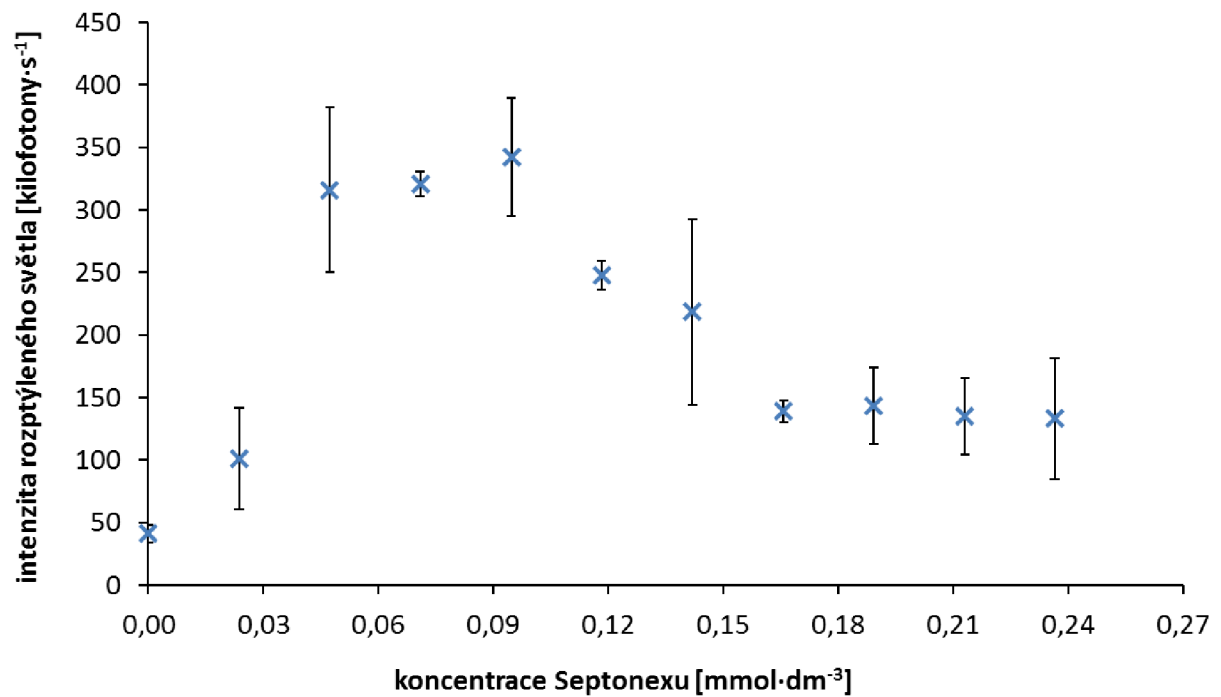
IHSS	Mezinárodní společnost pro huminové látky
PAL	povrchově aktivní látka
CMC	kritická micelární koncentrace
SDS	dodecylsírán sodný
ITC	izotermální titrační kalorimetrie
MWCO	<i>molecular weight cut-off</i> , neboli velikost pórů membrány
HK	huminové kyseliny
HL	huminové látky
CTAB	hexadecyltrimethylamoniumbromid
C <sub>n</sub> TAB	alkyltrimethylamoniumbromid
CAC	kritická agregační koncentrace
DPC	dodecylpyridiniumchlorid
PHK	purifikované huminové kyseliny
CPC	cetylpyridiniumchlorid
CP <sup>+</sup>	cetylpyridiniový kationt

DP <sup>+</sup>	dodecylpyridiniový kationt
DDA	dodecylamin
FK	fulvinové kyseliny
LHK	humínové kyseliny izolované z Leonarditu
NMR	nukleární magnetická rezonance
AHK	humínové kyseliny izolované v půdy národního parku Aso v Japonsku
DLS	dynamický rozptyl světla
AFK	fulvinové kyseliny izolované v půdy národního parku Aso v Japonsku
DTMA <sup>+</sup>	dodecyltrimethylamoniový kationt
C <sub>12</sub> Py <sup>+</sup>	dodecylpyridiniový kationt
DBSA	dodecylbenzensulfonová kyselina
ASHK	humínové kyseliny izolované z půdy Alluvial
MSHK	humínové kyseliny izolované z půdy Mollisol
AS	půda Alluvial
MS	půda Mollisol
EA	elementární analýza
FT-IR	infračervená spektrofotometrie s Fourierovou transformací
ESR	elektronová spinová rezonanční spektroskopie
NPE	neiontogenní nonylfenol ethoxyláty
EEMF	fluorescenční spektroskopie s excitačně-emisní maticí
SFS	synchronní fluorescenční spektroskopie
TX-100	Triton X-100
TMS-DM	trimethylsilyl-diazometan
IHSS-HK	standard huminových kyselin izolovaný z Leonarditu, zakoupený od Mezinárodní společnosti pro huminové látky
ČHK	humínové kyseliny izolované z černozemě modální, ze svrchní vrstvy (0-20 cm) zemědělské půdy
LHK	humínové kyseliny izolované z lignitu (důl Mír, Mikulčice)
mHK	modifikované formy huminových kyselin upravené selektivní methylovací jejich karboxylových funkčních skupin
ATR	technika úplného zeslabeného odrazu
DRIFT	spektroskopie s difúzní reflektancí
ISE	iontově selektivní elektroda
ITC	izotermická titrační kalorimetrie
TGA	termogravimetrická analýza

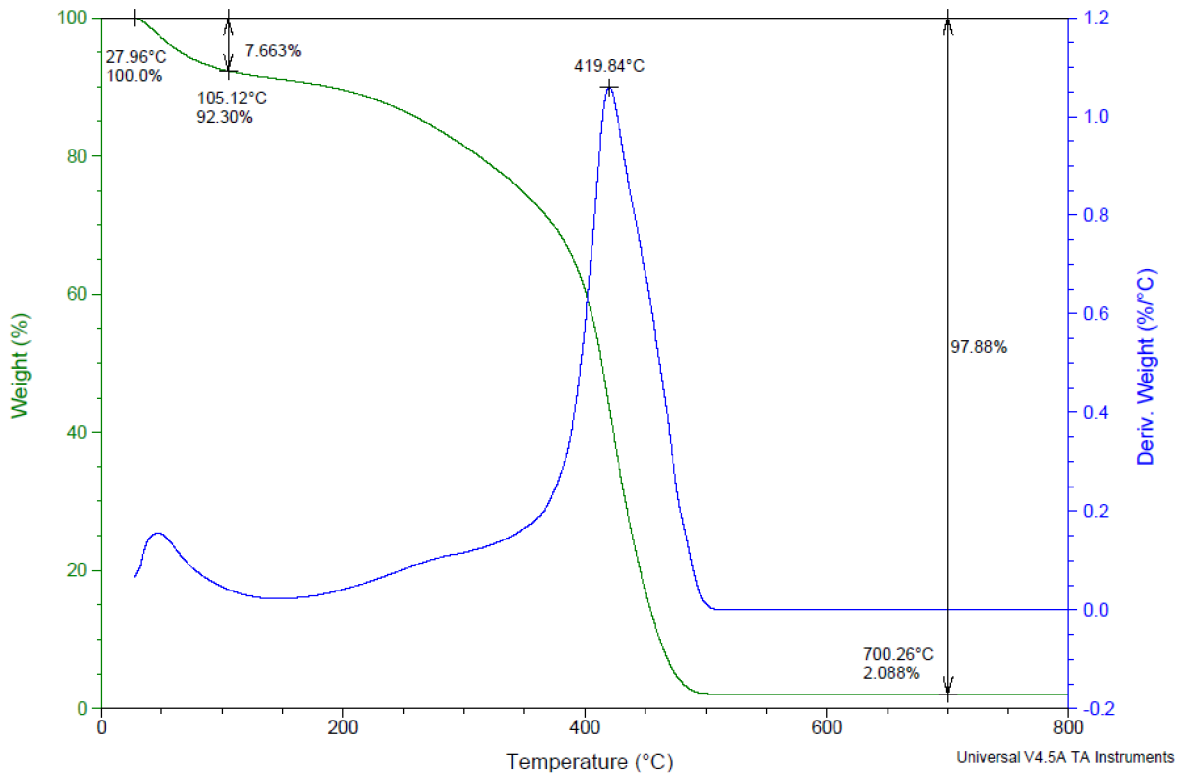
## 9 PŘÍLOHY



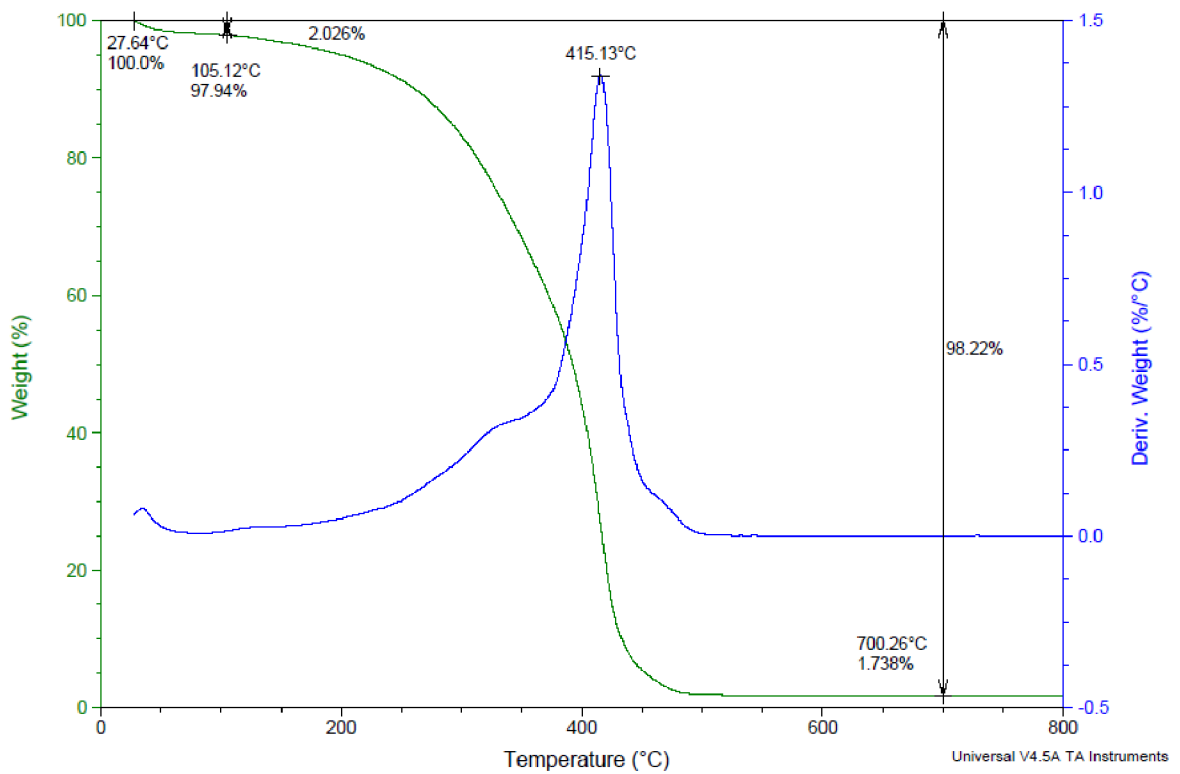
Obrázek 36: Bodový graf pro Septonex-LHK (zpracovaný výstup z měření CAC)



Obrázek 37: Bodový graf pro Septonex (zpracovaný výstup z měření CMC)



Obrázek 38: Ukázka termogravimetrické křivky pro IHSS-HK



Obrázek 39: Ukázka termogravimetrické křivky pro mIHSS-HK



*Obrázek 40: Agregáty mezi LHK a Septonexem pozorované po 4 týdnech difúzního (dialyzačního) procesu v přijímací komoře difúzní cely*