

VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ
CENTRUM MATERIÁLOVÉHO VÝZKUMU

FACULTY OF CHEMISTRY
MATERIALS RESEARCH CENTRE

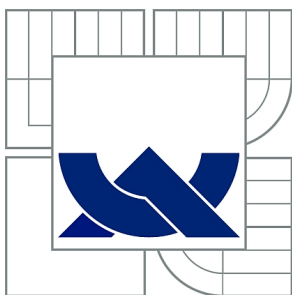
MOLEKULÁRNÍ ORGANIZACE HUMINOVÝCH KYSELIN V ROZTOCÍCH

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE
BACHELOR'S THESIS

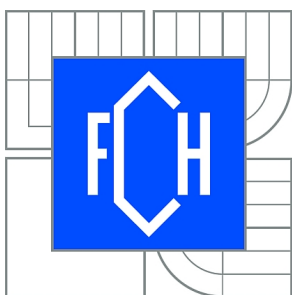
AUTOR PRÁCE
AUTHOR

ANETA CHYTILOVÁ

BRNO 2014



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ
BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA CHEMICKÁ
CENTRUM MATERIÁLOVÉHO VÝZKUMU
FACULTY OF CHEMISTRY
MATERIALS RESEARCH CENTRE

MOLEKULÁRNÍ ORGANIZACE HUMINOVÝCH Kyselín v roztocích

MOLECULAR ORGANIZATION OF HUMIC ACIDS IN SOLUTIONS

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE
BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE
AUTHOR

ANETA CHYTILOVÁ

VEDOUCÍ PRÁCE
SUPERVISOR

doc. Ing. MARTINA KLUČÁKOVÁ,
Ph.D.

BRNO 2014



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

Zadání bakalářské práce

Číslo bakalářské práce:	FCH-BAK0790/2013	Akademický rok: 2013/2014
Ústav:	Centrum materiálového výzkumu	
Student(ka):	Aneta Chytilová	
Studijní program:	Chemie a chemické technologie (B2801)	
Studijní obor:	Chemie pro medicínské aplikace (2808R031)	
Vedoucí práce	doc. Ing. Martina Klučáková, Ph.D.	
Konzultanti:	Ing. Michal Kalina	

Název bakalářské práce:

Molekulární organizace huminových kyselin v roztocích

Zadání bakalářské práce:

Cílem práce je prostudovat molekulární organizaci huminových kyselin ve vodných roztocích v závislosti na koncentraci a způsobu přípravy těchto systémů.

Termín odevzdání bakalářské práce: 23.5.2014

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

Aneta Chytilová
Student(ka)

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

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
Ředitel ústavu

V Brně, dne 31.1.2014

prof. Ing. Jaromír Havlica, DrSc.
Děkan fakulty

ABSTRAKT

Rozmanitá struktura a obsah velmi různorodých funkčních skupin huminových kyselin jednak činí tyto látky velmi vděčným studijním materiálem pro celou řadu vědeckých pracovišť, především však zapřičiňuje celou řadu jejich velmi zajímavých vlastností. Jedná se primárně o vlastnosti spektrální, koloidní, elektrochemické, iontově výměnné a sorpční. Využití huminových kyselin v širokém oborovém spektru je předmětem dalšího výzkumu a vývoje. Tyto složité heterogenní polydisperzní látky jsou převážně cyklického aromatického charakteru, což podle některých studií má za následek jejich hnědé zbarvení. Obecně existuje více teorií předpokládající jejich možnou sekundární strukturu. Studium struktury a konformace huminových kyselin ve vodných roztocích bylo hlavním předmětem této práce. Pro tyto účely byly připraveny koncentrační řady huminových kyselin ve čtyřech různých prostředích: 0,1 M NaOH, ve vodě s pH následně upraveným na hodnotu 12 (bazické prostředí), 0,1 M NaOH + 0,1 M HCl, 0,1 M NaCl (neutrální prostředí). Ke studiu konformace byly využity tyto analytické metody: ultrafialová a viditelná spektrometrie, dynamický rozptyl světla, elektroforetický rozptyl světla, měření hustoty, potenciometrické stanovení pH a přímá konduktometrie. Při experimentování byl kladen důraz především na čistotu huminových kyselin extrahovaných z lignitu.

KLÍČOVÁ SLOVA

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

ABSTRACT

The diverse structure and content of the highly varied functional groups of humic acids determine these substances as a worthwhile study material for a number of scientific institutions. Above all, the structure causes a wide range of their interesting properties, especially spectral, colloidal, electrochemical, ion-exchange and adsorption properties. Humic acids have variety of utilization in the industry while they have been the subject of a range of further research and development. The character of these complex heterogeneous polydisperse substances is mainly cyclic and aromatic, which according to some studies results in their brown color. Generally, there are multiple theories assuming their potential secondary structure. The aim of this study is the analysis of structure and conformation of humic acids in aqueous solutions. For the purposes mentioned above a concentration series of humic acids have been prepared in four different mediums: 0,1 M NaOH, humic acids in water with pH modified to 12 (basic medium), 0,1 M NaOH + 0,1 M HCl, 0,1 M NaCl (neutral medium). In order to study conformations several analytic methods have been used: ultraviolet and visible spectroscopy, dynamic light scattering, electrophoretic light scattering, potentiometric determination of pH and direct conductimetry. Throughout the experimentation the emphasis was mainly on the purity of humic acids extracted from lignite.

KEYWORDS

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

CHYTILOVÁ, A. *Molekulární organizace huminových kyselin v roztocích*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2014. 62 s. Vedoucí bakalářské práce doc. Ing. Martina Klučáková, Ph.D.

PROHLÁŠENÍ

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

.....
podpis studenta

Poděkování:

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

OBSAH

1	ÚVOD	8
2	CÍL PRÁCE.....	9
3	TEORETICKÁ ČÁST.....	10
3.1	Historie výzkumu a využití huminových látek	10
3.2	Huminové látky.....	10
3.2.1	Vznik huminových látek.....	11
3.2.2	Dělení huminových látek.....	14
3.2.3	Vlastnosti a struktura huminových látek	15
3.3	Huminové kyseliny	17
3.3.1	Vlastnosti a struktura	17
3.3.2	Reaktivita huminových kyselin	20
3.3.3	Molekulární organizace	23
3.3.4	Metody studia molekulární organizace HK.....	25
3.4	Funkce HK v přírodě	31
3.4.1	Aplikační možnosti huminových látek v technické praxi	33
4	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	34
4.1	Použité chemikálie	34
4.2	Použité přístroje	34
4.3	Příprava studovaných materiálů.....	34
4.3.1	Izolace HK z lignitu:.....	34
4.4	Charakterizace huminových kyselin	35
4.5	Použitá instrumentální metodika.....	35
4.5.1	Potenciometrické stanovení pH	36
4.5.2	Přímá konduktometrie	36
4.5.3	UV – VIS spektrometrie	36
4.5.4	Měření hustoty	37
4.5.5	Dynamický rozptyl světla	38
4.5.6	Elektroforetický rozptyl světla	39
5	VÝSLEDKY A DISKUZE	41
5.1	Charakterizace huminových kyselin	41

5.1.1	Potenciometrické stanovení pH	41
5.1.2	Přímá konduktometrie	42
5.1.3	Měření hustoty	43
5.1.4	UV – VIS spektrometrie	44
5.1.5	Dynamický rozptyl světla	44
5.1.6	Elektroforetický rozptyl světla	49
6	ZÁVĚR.....	52
7	SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ	54
8	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK.....	61

1 ÚVOD

Huminové kyseliny patří k přírodním organickým sloučeninám vznikajícím chemickým a biologickým rozkladem organické hmoty a syntetickou činností mikroorganismů. Struktura huminových kyselin je velmi rozmanitá a liší se podle původu, naleziště, ale i doby odběru vzorku, neboť se huminové kyseliny chovají jako „živý organismus“ a za vhodných podmínek mění svou strukturu. Tento cyklus přeměny struktury je důležitou součástí půdotvorných procesů. Již od počátku byly možnosti výzkumu struktury huminových kyselin úzce spjaty se stavem poznání v oblasti dostupných analytických technik. S technologickým rozvojem se tak měnily i všeobecně uznávané pohledy na samotnou strukturu od počátečního polymerního modelu až k současnému supramolekulárnímu modelu. Znalost struktury huminových kyselin je nezbytná pro pochopení jejich možných fyzikálně – chemických interakcí s látkami přítomnými v životním prostředí a rovněž k predikci jejich potenciálních aplikací zejména v zemědělství, ochraně životního prostředí, průmyslu a farmakologii.

2 CÍL PRÁCE

Cílem práce je prostudovat vlastnosti huminových kyselin s ohledem na jejich molekulární organizaci ve vodných roztocích. Dále posoudit vliv koncentrace, způsobu přípravy použitých systémů a typu prostředí na konformační změny a stabilitu těchto biokoloidních látek.

3 TEORETICKÁ ČÁST

3.1 Historie výzkumu a využití huminových látek

Příznivé účinky huminových kyselin (HK) na úrodnost půdy jsou známy již od středověku, avšak už i Egypťané používali rašelinové obklady na léčení ran. Lidé ve středověku objevili léčivé účinky bahna a vznikaly první koupele a začátky balneoterapie. Léčivé bahno využívali dokonce i při léčení vojáků během 1. světové války. To, že v těchto procesech hrají hlavní úlohu především huminové kyseliny, je nám známo pouze krátkou dobu [1].

První výzkum huminových kyselin pochází z konce 18. století, kdy německý chemik F. Achard uskutečnil první extrakci huminových kyselin z rašelinišť pomocí zásady. Další pokrok ve studiu huminových látek (HL) přišel v roce 1804 zavedením termínu humus, o což se postaral F. de Saussure. Humusem označil hnědé látky organického původu v půdě. Pojem huminové kyseliny nicméně zavedl až Döbereiner, který přišel v roce 1822 na to, že hlavní složky HL mají kyselou povahu. Termín huminové kyseliny se začal ještě více používat díky pokusům švédského chemika Berzelia, který v roce 1839 izoloval HL jako frakce rozpustné ve vodě a alkáliích. Pro další studium klasifikace HL byl stěžejní počátek dvacátého století, kdy Odén označil HL rozpustné ve vodě jako fulvinové kyseliny (FK) a zavedl dělení HL, jež je používáno dodnes. Až se zavedením nových moderních analytických metod došlo k posunu výzkumu vlastností a chemické struktury huminových sloučenin [2,3].

3.2 Huminové látky

Huminové látky patří mezi nejvíce rozšířené komplexotvorné ligandy všudypřítomné v životním prostředí (v půdě, vodách a sedimentech ekosféry) [4], nejčastějšími zdroji HL jsou kaustobiolity – rašelina, lignit a zoxidované hnědé uhlí, tzv. oxyhumolit, vznikající chemickým a biologickým rozkladem organické hmoty a syntetickou činností mikroorganismů. Obecně se proces vzniku HL nazývá humifikace, což je převážně soubor anaerobních enzymatických a biochemických pochodů a uskutečňuje se mineralizací výchozích látek [5,6]. V procesu humifikace hraje důležitou roli rostlinný lignin a jeho transformující se produkty jako jsou např. polysacharidy, melanin, proteiny, lipidy apod. [7]. Ze studií [8,9,10] bylo zjištěno, že se HL vyskytují dokonce i na Antarktidě, kde jsou humifikační procesy velmi odlišné od jiných kontinentů díky specifickým klimatickým podmínkám.

Složitost a pozoruhodné vlastnosti HL neustále přitahují pozornost mnoha badatelů z celého světa. Dlouhodobým výzkumem byly získány nové poznatky o jejich struktuře, fyzikálně - chemických a biologických vlastnostech, ale i přes to je stále obtížné určit přesný vztah mezi strukturou a aktivitou těchto látek [11].

HL jsou složité vysokomolekulární polycyklické sloučeniny s relativní molekulovou hmotností v rozmezí několika stovek až desítek tisíců Da. Ve vodě se vyskytují buďto jako

jednotlivé molekuly, nebo jsou vzájemně spojené slabými vazebnými interakcemi do supramolekulárních struktur a mohou se vyskytovat i jako micelární koloidy s hydrofobní částí molekuly umístěnou uvnitř a hydrofilní vně molekuly [12]. V důsledku svého chemického složení (aromatické jádro, funkční skupiny) jsou HL schopné vázat polární i nepolární látky a mohou tak mít vliv na biologickou dostupnost určitých nutrietů (stopové prvky, aminokyseliny, lipidy apod.). Nezanedbatelné je rovněž pozitivní působení HL na své okolí - např. v půdě HL rozhodující měrou ovlivňují obsah dostupných živin, zadržovací schopnost pro vodu a rovněž zvyšují sorpční a samočisticí schopnosti [5,6].

Rozkladnými a syntetickými pochody se z odumřelé rostlinné a živočišné hmoty v půdě tvoří tzv. humus, tmavě zbarvená amorfni organická složka půdy. Procesem humifikace prochází jen zhruba polovina primární organické hmoty, zbytek se následně mineralizuje. Rozdíly lze nalézt i mezi samotnými druhy humusu. Vodní humus vzniká rozkladem planktonu a vodních rostlin a je méně stabilizován než půdní. Složení humusu závisí na jeho původu (tekoucí nebo stojaté vody). Kromě rozkladných procesů probíhají i syntetické reakce, polymerace a kondenzace. Humus se hromadí v půdě, rašeliništích a dnových sedimentech, odkud rozpustné podíly humusu přecházejí do povrchových nebo podzemních vod. Nejvíce humusu obsahuje rašelina (40 % až 55 %). Při humifikačních pochodech vznikají zpočátku ve vodě částečně rozpustné HL a nakonec nerozpustné huminy, které již nemají vodohospodářský význam [2]. Obsah humusu je v půdě vyrovnaný, pokud je zajištěn pravidelný přísun organických látek. Zvýšenými dodávkami organických látek lze zvýšit obsah humusu v půdě za 50 let o cca 0,2 – 0,5 %. Naproti tomu zápornou bilancí organických látek lze v relativně kratší době výrazně snížit jeho obsah a tím i samotnou půdní úrodnost [13].

3.2.1 Vznik huminových látek

Teorie vzniku HL je dodnes v mnoha oblastech předmětem spekulací. Podle Felbeckovy studie vznikají HL čtyřmi možnými způsoby:

- chemickou polymerizací
- buněčnou autolýzou
- mikrobiální syntézou
- přeměnou rostlin

Hypotéza vzniku HL *chemickou polymerací* předpokládá, že mikroorganismy rozkládají rostlinný materiál na malé molekuly, přitom spotřebovávají uhlík a energii na syntézu fenolů či aminokyselin, a ty pak vylučují do svého okolí. Vyloučené látky se poté oxidují a polymerizují na HL.

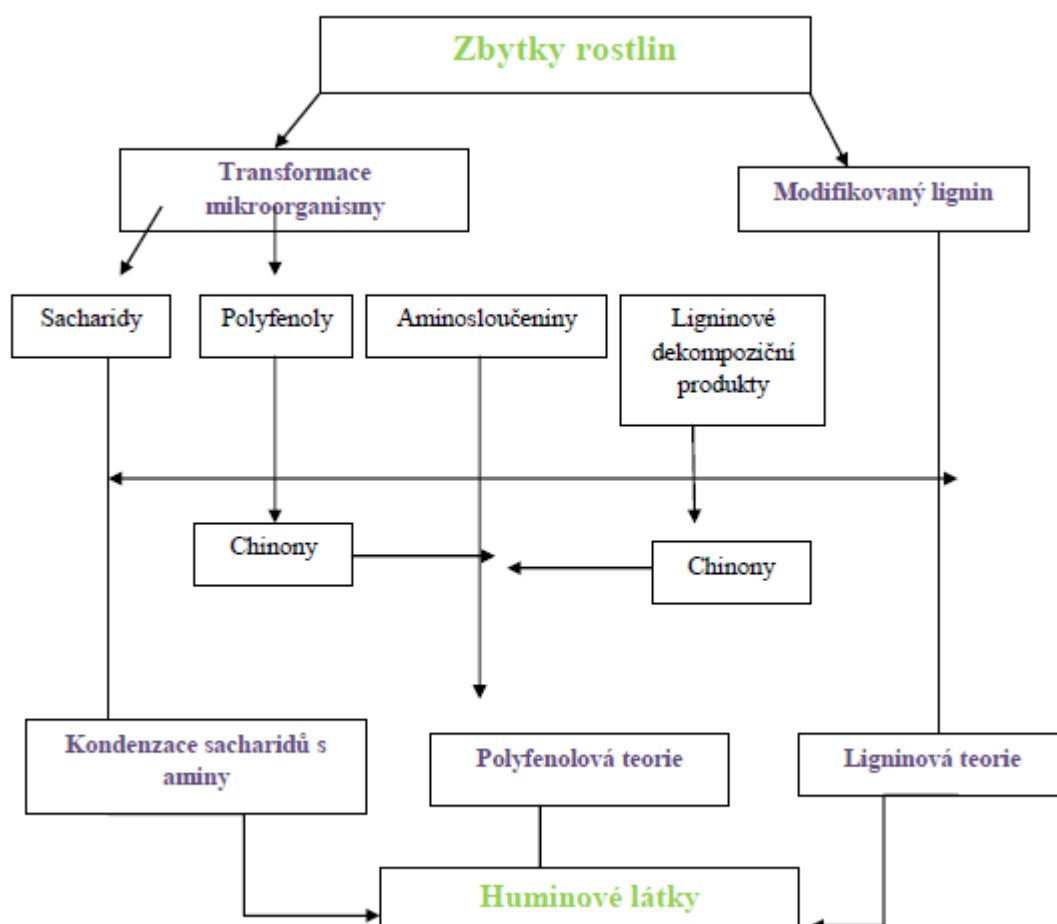
V případě *buněčné autolýzy* by se jednalo o HL, které vznikly jako produkt rozpadu buněk rostlin a buněk mikrobů po jejich smrti. Vzniklý heterogenní materiál by se tvořil pomocí náhodných kondenzací a volnou radikálovou polymerizací buněčných zbytků (sacharidy, aminokyseliny apod.).

Vznik HL pomocí *mikrobiální syntézy* by probíhal vnitrobuněčnou syntézou vysokomolekulárních HL a mikroorganismy by pak získaly uhlík a energii z buněčných tkání.

Přeměnou rostlin by HL vznikaly částečnou přeměnou částí tkání rostlin rezistentních vůči mikrobům v půdě. Původní složení rostlinného materiálu silně ovlivňuje nově vzniklou HL. Nejprve, dochází k humifikaci, kdy vznikají vysokomolekulární HK a huminy. Ty jsou pak částečně rozkládány za pomoci mikroorganismů na FK a poté na oxid uhličitý a vodu [14].

V literaturách [5] (viz. **Obr. 1**), [15], [16] můžeme najít další teorie vzniku HL. Patří k nim:

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



Obr. 1 Teorie vzniku huminových látek (Stevenson 1982) [5]

Ligninová teorie

Dlouhou dobu se předpokládalo, že HL vznikly z ligninu. Činností mikroorganismů je lignin neúplně přeměněn a jeho zbytek se poté stává součástí půdního humusu. Lignin se během procesu strukturně mění a ztrácí methoxylové skupiny (OCH_3). Methoxylové skupiny

jsou původci tvorby orthohydroxyfenolů a oxidace postranních řetězců vedoucí ke vzniku karboxylových skupin (COOH). Materiál dále prochází různými neznámými procesy, které poskytují jako první HK, poté FK. Tento způsob je doložen Waksmanovou ligninovou teorií. Za předpokladu, že HL představují systém polymerů, výchozím produktem by byly HK, další oxidací a fragmentací by vznikly FK [5].

Waksman podal několik argumentů, aby podpořil ligninovou teorii:

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

Lignin není příliš snadno rozložitelný mikroorganismy oproti jiným rostlinným složkám, nicméně existují v přírodě mechanismy, kterými se úplně aerobně rozloží. V případě, že by tomu tak nebylo, nerozložené zbytky rostlin by se hromadily při půdním povrchu a organické látky obsažené v půdě by se koncentrovaly, dokud by se nevyčerpal všechny CO_2 z atmosféry. V normálně aerobních půdách může být lignin rozkládán na produkty, které mají nízkou molekulovou hmotnost před syntézou humusu. Ligninová teorie pravděpodobně převládá při tvorbě humusu z rašeliny, jezerních sedimentů, špatně odvodněných půd a mokřích sedimentů [15].

Polyfenolová teorie

Polyfenolová teorie v sobě zahrnuje opět důležitou roli ligninu v humusové syntéze. Fenolické aldehydy a kyseliny uvolněné z ligninu totiž působením mikroorganismů prochází enzymatickou přeměnou na chinony vznikající oxidací fenolů. Chinony mají porušený aromatický kruh a v přítomnosti aminosloučenin, ale i bez nich polymerizují, za vzniku huminových makromolekul. Patří zde i způsob vzniku HL, kdy jsou polyfenoly syntetizovány z neligninových zdrojů uhlíku (např. celulózy). Během reakcí zahrnující chinony je velice známým jevem tvorba látek hnědé barvy, který se uskutečňuje při tvorbě melaninu. Děje se tak např. v mechanicky poškozené dužině zralého ovoce.

Za zdroje fenolů pro syntézu humusu považujeme lignin, mikroorganismy, elementární fenoly v rostlinách a třísloviny, z nichž nejdůležitější jsou první dva zdroje.

Flaigův koncept vzniku humusu:

- lignin, uvolněný z celulózy při rozkladu rostlinných zbytků, je oxidačně štěpen za vzniku primárních strukturních jednotek (deriváty fenylypropanu).

- Vedlejší řetězce stavebních jednotek ligninu jsou oxidovány, dochází k demethylaci a výsledné polyfenoly jsou přeměněny na chinony pomocí enzymu zvaného polyfenoloxidáza.
- Chinony vzniklé z ligninu (popřípadě jiných zdrojů) reagují se sloučeninami obsahujícími dusík a vytvoří tmavě zabarvené polymery.

Roli mikroorganismů jakožto zdrojů polyfenolů objasnila Kononova, která došla k závěru, že HL vznikly díky mykobakteriím rozkládajících celulózu, před rozkladem ligninu [5,15,16].

Kondenzace sacharidů s aminy

Další možností vzniku HL je kondenzace aminosloučenin s redukujícími sacharidy. Polymerizací redukujících sacharidů a aminů bez přítomnosti enzymů vznikají hnědé dusíkaté polymery. Hlavním argumentem proti této teorii je, že reakce probíhá poměrně pomalu při teplotách za normálních půdních podmínek. Avšak, drastické a časté změny v půdním prostředí jako je mrznutí, tání, vlhko, sucho, společně s tím, jak se reaktanty mísí s minerálním materiálem, má katalytické vlastnosti, které mohou usnadnit kondenzaci. Pozitivním argumentem teorie je, že reaktanty (sacharidy, aminokyseliny apod.) jsou syntetizovány ve velkém množství prostřednictvím mikroorganismů. Při kondenzaci sacharidů s aminy nejprve dochází k adici aminu na aldehydickou skupinu sacharidu, kdy vzniká *N*-substituovaný glykosylamin. Glykosylamin se následně rozkládá za tvorby *N*-substituované 1-aminodeoxy-2-ketosy. To je podmíněno fragmentací a vznikem 3-uhlíkového řetězce aldehydů a ketonů (diacetyl apod.), dále dehydratací a formací reduktonů a hydroxylmethyl furfuralů. Tyto reaktivní sloučeniny v přítomnosti aminosloučenin ochotně polymerují za tvorby hnědě zbarvených produktů [5,15,16].

3.2.2 Dělení huminových látek

HL patří k těm látkám, jež nelze klasifikovat jako jiné chemické třídy sloučenin (např. proteiny) [12]. V důsledku velkého počtu různých organických sloučenin přítomných v živém organismu, vedou jejich rozkladné a rekombinační procesy k téměř nekonečnému počtu molekul s širokým spektrem vlastností [5].

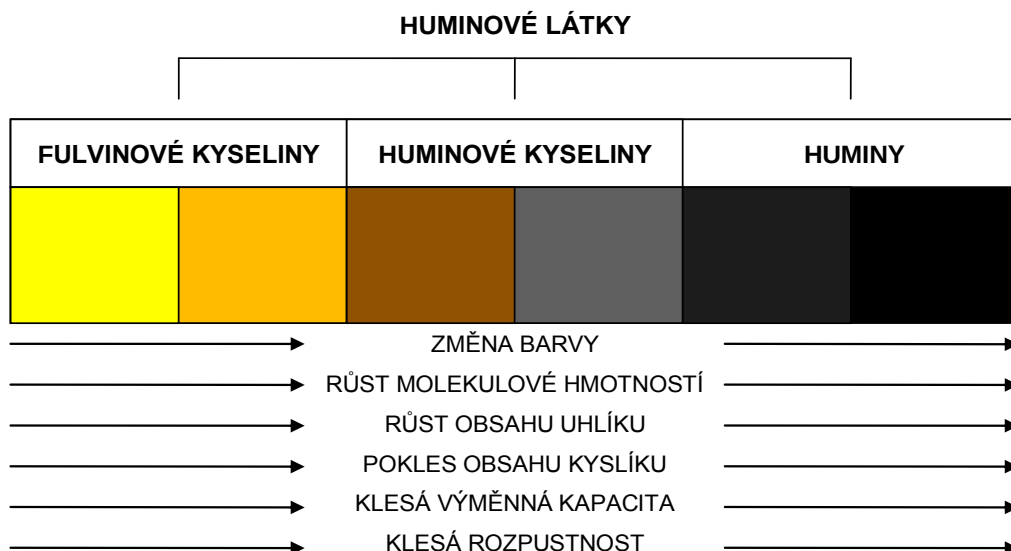
HL lze z pevných i kapalných matric izolovat a dělit na základě různé rozpustnosti v kyselém či alkalickém prostředí aplikací sloupcové chromatografie [7].

Podle rozpustnosti ve vodných roztocích se HL dělí na:

- Huminy (nerozpustné)
- HL rozpustné ve vodě
 - fulvinové kyseliny (FK)
 - huminové kyseliny (HK)

Huminy jsou černohnědé látky nerozpustné ve vodě, alkoholech, zásaditých ani kyselých roztocích a mají nejvyšší molekulovou hmotnost z HL. Chemickou strukturou i vlastnostmi se podobají HK [5].

Vlastnosti jednotlivých frakcí HL se výrazně odlišují (**viz Obr. 2**). Nejsvětlejší žluté až žlutozelené zbarvení mají FK, HK jsou už tmavší a mají zbarvení do hněda, nejtmavší jsou pak černé až černošedé huminy. Různé zbarvení má souvislost s dalšími vlastnostmi jako je molekulová hmotnost, obsah základních prvků (C, H, O, N) a funkčních skupin (např. karboxylových, fenolových apod.). Molekulová hmotnost roste od FK k huminům. Porovnání obsahu prvků v HK a FK nám ukazuje *tabulka 1 elementární složení HK a FK* [17].



Obr. 2 Rozdělení huminových látek podle zbarvení (Stevenson 1982) [18]

Huminové kyseliny můžeme dále dělit *podle rozpustnosti v alkoholech* na:

- Hymatomalanovou kyselinu, která se v alkoholu rozpouští
- Humusovou kyselinu, která se v alkoholu nerozpouští

K. Simon dále řadí k huminovým kyselinám také humoligninové kyseliny podobající se ligninu a lišících se pouze svou nerozpustností v NaF [19].

3.2.3 Vlastnosti a struktura huminových látek

Huminové látky jsou vysoce chemicky reaktivní a velmi náchylné k biodegradaci. Charakterizujeme je jako neuvěřitelně komplexní koloidní směsi, které nikdy nebyly separovány na čisté komponenty. Struktura HL a uspořádání jednotlivých stavebních bloků HL jsou poměrně závislé na okolním prostředí, jelikož již nepatrné změny pH způsobí rozbití huminových polymerů původní molekuly. Frakce HL poté volně asociují s řadou volných radikálů, kovy či nečistotami. Skládají se pak ze stovek odlišných molekul s mnoha různými rozměry a mnoha způsoby, jak se mohou orientovat pomocí otáčení, ohýbání, stlačení, rozpínání (konformační změny). V koloidním stavu jsou drženy pouze slabými silami, avšak jakákoliv změna pH roztoku, koncentrace nebo přítomnost kovových iontů – převážně vápenatých – způsobí velké konformační změny. Časová náročnost těchto dějů se může poměrně výrazně lišit [7]. Při hodnotě pH 1 se HK z roztoku sráží, zatímco FK zůstávají v rozpuštěné formě. Díky tomu, že jsou FK více rozpustné, bývají v přírodních vodách v převaze. FK ve srovnání s huminovými mají nižší molekulové hmotnosti, obsahují méně

aromatických struktur, více alifatických postranních řetězců a mají více homogenní strukturu. Hranice mezi oběma typy kyselin HL je velmi obtížně stanovitelná. Navíc se mezi sebou liší i elementárním složením. Rozdíly v elementárních složeních jednotlivých frakcí jsou způsobeny různorodostí samotných zdrojů HL [17].

Tab. 1 *Elementární složení huminových a fulvinových kyselin* [20]

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

Údaje z elementárních analýz vzorků HK pocházejících z různých zdrojů se odlišují v elementárním složení, ale i reaktivitou. Při procesu tvorby HK (humifikace) se zvyšuje obsah COOH a C=O skupin, přičemž obsah alkoholových, fenolových, a OCH₃ skupin se snižuje.

Dále bylo zjištěno, že HK izolované z lignitu obsahují více aromatických struktur v porovnání s HK izolovanými z oxyhumolitu bohatších naopak na alifatické řetězce [21]. FK obsahují až dvakrát více karboxylových skupin než HK, ale názory na obsah fenolových a hydroxylových skupin se v literatuře značně rozcházejí. Zejména karboxylové skupiny mají relativně silně kyselý charakter (disociační konstanty jsou řádu 10⁻² až 10⁻⁵), zatímco hydroxylové skupiny jsou jen slabě kyselé (disociační konstanty 10⁻⁹ až 10⁻¹¹). Zásadní vliv na pH mají zejména substituenty v poloze ortho vůči karboxylové skupině.

Kromě hodnot disociačních konstant přítomných karboxylových a hydroxylových skupin je kyselost HL ovlivněna také polaritou (dipólovým momentem) molekul. Mezi významné vlastnosti HL dále patří schopnost tvorby nejrůznějších komplexů především s vícemocnými kationty. Tato vlastnost je ovlivněna přítomností karboxylových a fenolových skupin a také aromatickou molekulou.

Vlastnosti HL jako je rozpustnost ve vodě, schopnost agregace a disociace, nábojové poměry či schopnost vytvářet komplexy s kovovými ionty, úzce souvisejí s jejich složením, které je ovlivněno humifikačním procesem. Vedle těchto procesů jsou také významně ovlivněny velikostí jednotlivých molekul a částic, stupněm jejich dispergace (pravé nebo koloidní roztoky), polaritou, která je dána charakterem skeletu (aromatický či alifatický) a hlavně druhy, počty a disociačními schopnostmi funkčních skupin.

Ve většině přírodních vod se při běžných hodnotách pH huminové látky vyskytují jako negativně nabitě, povrchově aktivní makromolekuly. Jejich záporný náboj je dán přítomností funkčních skupin, zejména karboxylových a hydroxylových [12]. Mobilita HL v půdě je úzce spjata s jejich nábojem, jelikož náboj HK výrazně ovlivňuje i samotnou stabilitu HK v koloidním stavu. O tom, jaký bude mít HK náboj, rozhoduje typ a množství funkčních skupin [22].

3.3 Huminové kyseliny

Huminové kyseliny představují takovou frakci HL, která není rozpustná v kyselých a neutrálních vodných roztocích, ale je v těchto roztocích rozpustná při vyšších hodnotách pH. HK tedy mohou být získány alkalickým loužením vhodné matrice a následným okyselením výluhu [14].

3.3.1 Vlastnosti a struktura

Huminové kyseliny se považují za vysokomolekulární, multifunkční, polykonjugované systémy přírodního původu. Jedná se o vysoce reaktivní frakci HL, která se patrně nejvíce studuje vzhledem k možným aplikacím [23]. Vanloon a Duffy [24] popisují HK jako komplexní aromatické makromolekuly, kde spojení mezi aromatickými skupinami zajišťují aminokyseliny, aminocukry, peptidy a alifatické sloučeniny. Přítomnost funkčních skupin jako je karboxylová, karbonylová, hydroxylová v kombinaci s aromatickými strukturami poskytuje široké rozmezí interakcí v adsorpčních procesech [23].

V přírodě mohou být HK prezentovány v mnoha podobách – nejčastěji ve formě pevných látek, rozpuštěné ve formě roztoků, ale také ve formě nabobtnalých hydrogelů [25].

V důsledku chemického složení jsou HK schopné vázat polární i nepolární sloučeniny. Roztoky HK mají v závislosti na koncentraci pH kolem 3,5. HK jsou horšími redukčními činidly než FK [2].

Půdní HK mají molekulární hmotnosti v rozmezí od několika sto až do několika set tisíců Da a skládají se z řady chemických funkčních skupin, které zajišťují jejich hydrofobní/hydrofilní a polyelektrolytické vlastnosti [26].

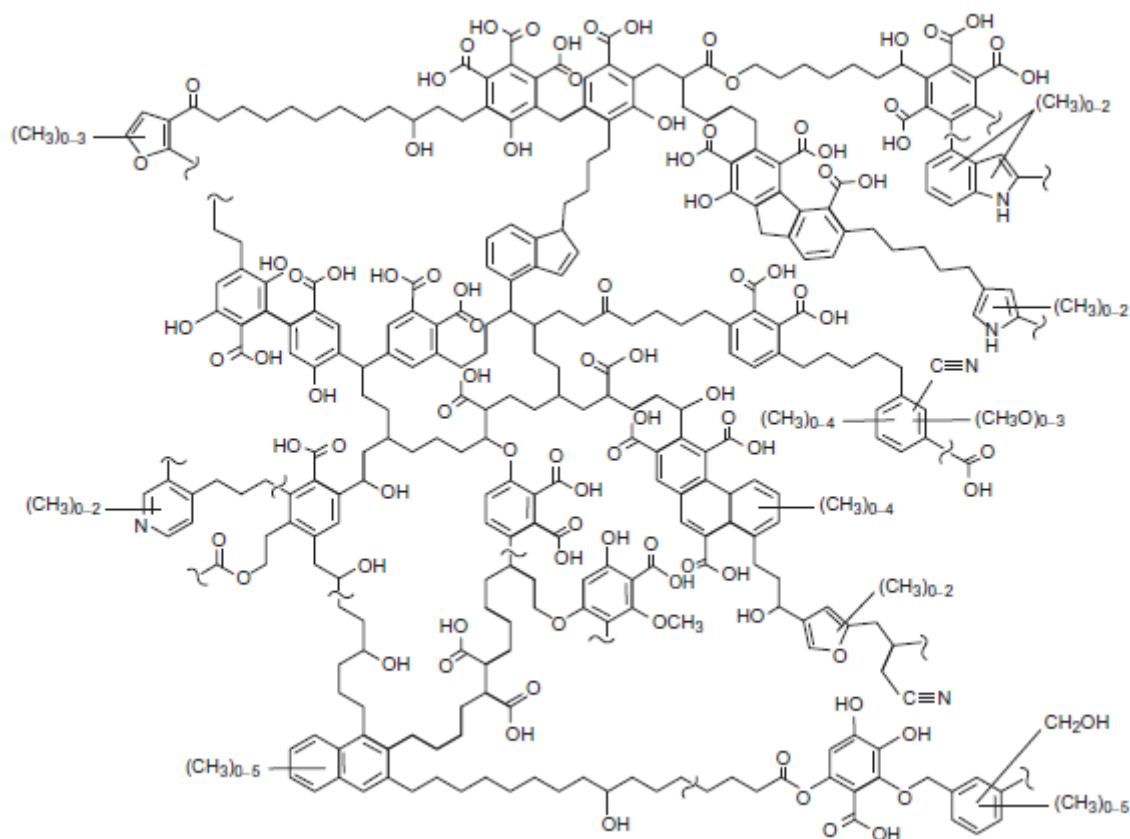
Při nízkých koncentracích HK, HK vodního původu existují primárně jako rozpuštěné ionty. Při vysokých koncentracích jsou formovány koloidy a sraženiny. K agregaci (shlukování) dochází při reakci HK s kationty a protony. Agregace a disagregace má vliv na jejich biogeochemické chování [16]. Obdobné výsledky pozoroval Simpson a kol. [27] za pomoci difúzně – reflexní spektroskopie. Experimenty ukázaly, že agregáty HK odpovídají průměrné molekulové hmotnosti nad 66 000 Da v koncentrovaných roztocích a 2500 – 6100 Da v méně koncentrovaných roztocích.

Autoři studie [28] koloidních vlastností HK ve vodných roztocích v závislosti na koncentraci a pH zjistili, že sodné soli HK při $\text{pH} < 4$, existují ve vodných roztocích jako 30 – 120 nm agregáty. Při $\text{pH} > 4$ stav HK závisí na koncentraci roztoku. Při nízkých koncentracích existují jako jednotlivé molekuly, ale se zvyšováním koncentrace asociují k tvorbě supramolekulární struktury (při 5 mg/dm^3) a micel (8 g/dm^3). Supramolekulární struktury zvyšovaly adsorpci na jílové materiály a podporovaly projev solubilizačních vlastností HK v roztocích dokonce i u koncentrace 5 mg/dm^3 , která je o tři řády nižší než kritická micelární koncentrace (8 g/dm^3).

Struktura

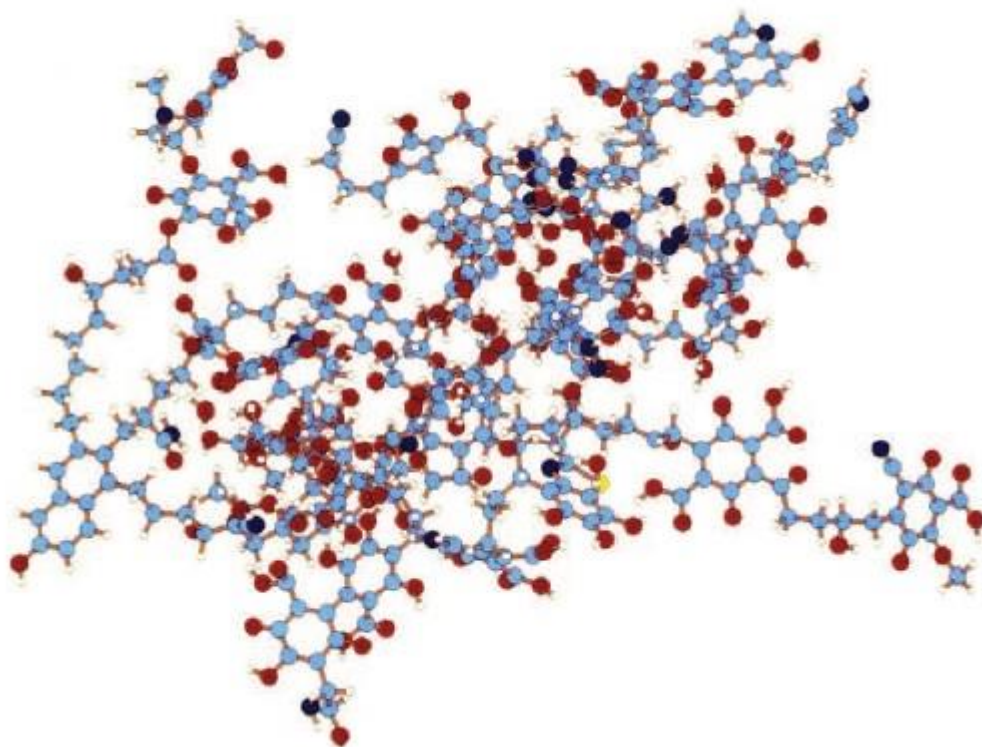
Schnitzer a Schulten (1992) demonstrovali, že se HK skládají především z uhlovodíků, fenolů, monomerů a dimerů ligninu, lipidů (alkanů, alkenů, mastných kyselin, esterů *N* –

alkylů a alkylaromátů) a sloučenin obsahující dusík [29]. Prokázala se přítomnost relativně velkých množství alkyl- substituovaných aromatických uhlovodíků (Schulten a spol., 1991) skládajících se z aromatických kruhů kovalentně spojených s alifatickými skupinami a řetězci [30].



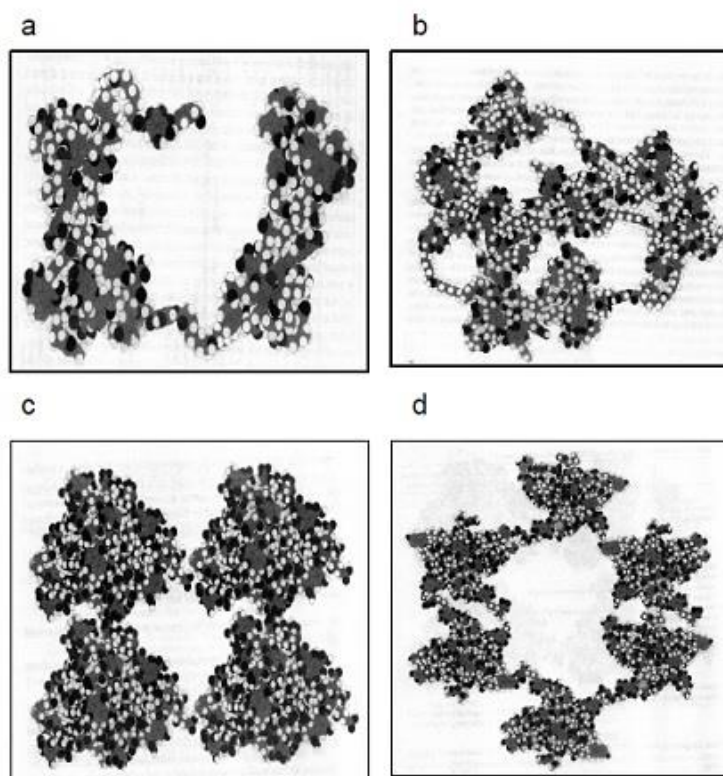
Obr. 3 2D struktura navrhovaná podle Schnitzera a Schultena (1993) [6]

V prvních studiích Schulten předpokládal, že alkylaromáty jsou stavební bloky HK, uvolňující se během pyrolýzy z alkylaromatických strukturních sítí. Schulten a Schnitzer (1993) přiřazují *N*-alkylaromátům významnou roli [31]. Kyslík v HK je přítomen ve formě karboxylů, fenolů a alkoholových hydroxylů, esterů, etherů a ketonů, zatímco dusík ve formě nitrilů a *N*-heterocyklických struktur. Autoři dále předpokládají, že sacharidy a proteinogenní materiály nejsou integrální konstrukční komponenty HK, ale jsou adsorbovány elektrostaticky ve vnitřních doménách nebo na vnějších plochách. Přítomnost prázdných míst v navrhované struktuře HK je jedním z nejzajímavějších rysů, jelikož se zde mohou zachycovat a vázat další organické sloučeniny jako jsou sacharidy, proteinogenní materiály, lipidy, anorganické látky apod. V roce 1997 převedli 2D strukturu do 3D projekce, jelikož 2D projekce nestačila pojmout všechny funkční skupiny obsahující kyslík. Výsledek lze vidět na **Obr. 4**.



Obr. 4 3D struktura HK podle Schultena a Schnitzera (1997); modrozelená barva představuje uhlík, bílá vodík, červená kyslík a modrá dusík. [6]

Experimentální studie [32] předpokládá tyto možné struktury HK:



Obr. 5 Předpokládané struktury HK: A – dimer, B – trimer, C – tetramer, D – hexamer [32]

3.3.2 Reaktivita huminových kyselin

Pro pochopení interakcí HK s různými ať už anorganickými či organickými látkami, nebo pro studium jejich fyziologické aktivity a pro predikci jejich chování v přirozeném prostředí, ekosystémech, je nutná jejich frakcionace [33]. Přibližnou představu o možných vazebných interakcích můžeme odvodit z dosud známých informací o struktuře a z některých dalších vlastností HL. Na základě dostupných informací tedy můžeme předpokládat několik typů vazebných interakcí mezi HL a cizorodými látkami přítomných v půdě.

Pro studium reaktivity jsou důležité strukturní formace jako např. chinoidní oxidačně – redukční struktury vykazující schopnost tvorby semichinoidních seskupení. Oxidačně – redukční aktivita HK je známá již velmi dlouho, kde např. huminové kyseliny připravené z rašeliny byly hydrogenovány a pak titrovány ke stanovení oxidačně – redukčního potenciálu, který byl nalezen mezi 0,32 a 0,36 V. Pro HK byl také opakovaně zjištěn pozitivní EPR (elektronová paramagnetická rezonance) signál svědčící o existenci nepárového elektronu odpovídajícího zřejmě semichinoidnímu uhlíkatému radikálu. Zajímavé je v této souvislosti např. pozorování přímé redukční schopnosti HK při redukci rtuťnatých iontů na kovovou rtuť. Podobná redukční aktivita HK byla pozorována při redukci Cr^{6+} a Au^{3+} a některých organických barviv. Právě chinoidní struktury jsou dosti důležité při přímém chemickém vytváření kovalentních vazeb humusu s cizorodými látkami bez asistence enzymatické katalýzy [17].

Vazba cizorodých látek a HL je silně ovlivněna podmínkami prostředí jako je například pH, iontová síla, koncentrace bez kovových iontů a přítomnost konkurenčních iontů [34].

Typy vazeb, které vytvářejí HK s ostatními látkami, jsou následující:

Iontová vazba

Vychází z působení elektrostatických sil mezi fixními náboji přítomných funkčních skupin a ionty vyskytujícími se v roztoku. Uvažujeme-li iontovou vazbu, potom můžeme ve zjednodušeném pohledu na HL pohlížet jako na ionxy, kterým lze v některých případech přisuzovat vlastnosti srovnatelné se syntetickými ionxy. Vznik elektrostatické vazby u HL předpokládáme např. v případě alkalických kovů a amoniaku.

Koordinační vazba

Z hlediska imobilizace toxických kovů představuje nejdůležitější typ vazebné interakce koordinační vazba mezi makromolekulární matricí HL a ionty kovů schopných tento typ vazby vytvářet. Potenciál ke vzniku koordinačních vazeb je zde dán zejména značným zastoupením karboxylových, fenolických, a dalších funkčních skupin ve struktuře HL. Předpovědět průběh komplexotvorných reakcí pro určitý typ HL, bude vzhledem ke složitosti struktury velmi obtížné, protože vznik koordinačních vazeb, na kterých se budou podílet karboxylové či fenolické skupiny, bude ovlivněn hodnotou pH a mírou disociace těchto skupin.

Kovalentní vazba

Interakce vedoucí ke vzniku kovalentních vazeb zde mohou být rozděleny na dvě skupiny:

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

Interakce kovalentního typu byla prokázána na přelomu 70. a 80. let minulého století a jejím příkladem zde může být kovalentní vazba anthracenu na HK.

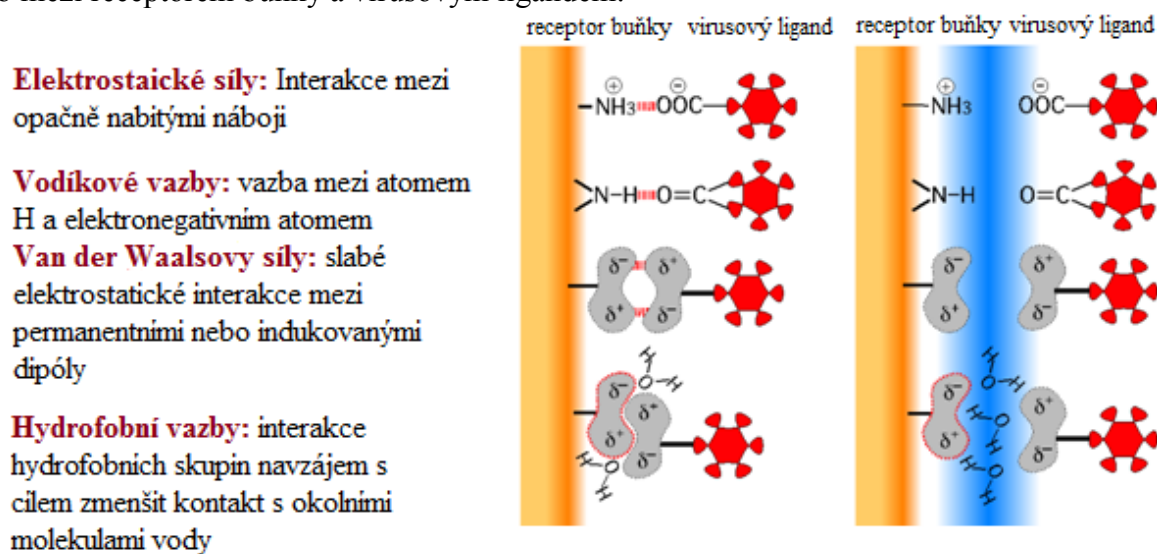
Vodíkové můstky

I přes skutečnost, že přesná struktura HL zůstává nedořešena, lze na základě prokázané přítomnosti některých funkčních skupin (amidová, laktamová, nitrilová) předpokládat možnost vzniku vodíkových můstků. Tyto vazby se, ačkoliv mají nízký energetický obsah, mohou význačně podílet na vazebných schopnostech mezi HL a kontaminanty.

Hydrofobní interakce

Hydrofobní interakce vzniká při kontaktu nepolárních skupin (např. alkylových) nesených molekulami nacházejících se ve vodném roztoku, kde tyto interakce mohou např. vycházet z působení van der Walsových sil nebo přesunu π elektronů [17].

Pro lepší představu vzniku jednotlivých vazeb poslouží **Obr. 6**, který zobrazuje vznik vazeb mezi receptorem buňky a virusovým ligandem.



Obr. 6 Vznik jednotlivých vazeb mezi receptorem buňky a virusovým ligandem [35]

Interakcí HL s jinými sloučeninami strukturami vznikají:

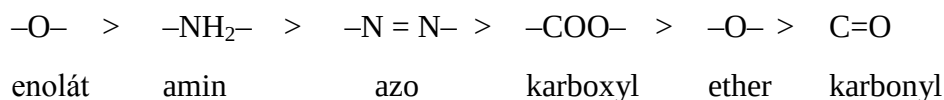
- *solí nízkomolekulárních organických kyselin* – reakce organických kyselin (např. kyselina octová, šťavelová) s minerály (např. magnezit, kalcit)
- *solí alkalických kovů a kovů alkalických zemin* – navázání alkalických kationtů (Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+}) iontovou vazbou na karboxylové skupiny HL. Dělí se na humáty (solí HK) a fulváty (solí FK).

- *komplexy s kovy* - podstatou tvoření komplexů s kovy je zaplnění volných orbitalů kovů elektrony donorových skupin ligandů. V půdě roli ligandů přebírají jednoduché organické sloučeniny a funkční skupiny v HL [14].

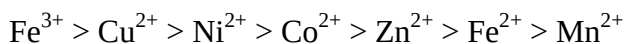
Cheláty s kovovými ionty:

Chelátové komplexy jsou tvořeny, pokud dva nebo více koordinovaných pozic okolo kovového iontu jsou nahrazeny donorovými skupinami jednoho ligandu pro vytvoření vnitřní kruhové struktury.

Klesající afinita organických skupin na kovové ionty je přibližně v pořadí:



Pořadí klesající schopnosti kovových iontů chelatace je následující:



Komplexotvorné schopnosti HK do značné míry závisí na jejich obsahu kyslíku funkčních skupin jako je COOH, fenolová, OH a C=O [15].

Komplexní charakter interakce mezi HL a kationty (H^+ a kovové ionty) je dán heterogenním, polyelektrolytickým a polydisperzním charakterem HL, který je výsledkem přítomnosti různých funkčních skupin v trojrozměrné struktuře makromolekuly HL. Při vyšším pH mohou některé hydrolyzovatelné kovy s HL vytvářet komplexy i prostřednictvím svých hydroxokomplexů [36].

Interakce HL s jíly

- *komplexy s jíly* – jsou tvořeny interakcemi HL s jíly a způsobují změny odrážející se v chemických, fyzikálních a biologických vlastnostech půdy.
- Vazebné interakce vznikající mezi HL a jíly jsou následující:
- *Van der Waalsovy síly* – mezi atomy důsledkem kolísání hodnot elektronové hustoty
- *Kationtové můstky* – můstky mezi souhlasně nabitými strukturami HL a maticí jílu tvoří kationty s vyšší valencí
- *Vodíkové vazby* – mezi polárními skupinami HL a vodíkem, který může být součástí molekuly vody nebo silikátu v minerálu
- *Adsorpce do pórů jílu* – pouze u nízkomolekulárních FK při $pH < 5,5$ [37].

Interakce HL s barviv

Sedláček a spol. (2013) provedli zajímavou studii [38] o tom, jak HK ovlivňují mobilitu iontových barviv v hydrogelech za použití difúzních cel, kde pozorovali difúzi methylenové modři ve vodných roztocích a agarózových gelech s a bez přídavku HK. Výsledky ukázaly, že vazba methylenové modři s HK výrazně zpomaluje její transport, což je charakterizováno potřebou vyššího času k penetraci u vzorků s vyšší koncentrací HK. Nicméně výsledky naznačovaly, že methylenová modř do určité míry interaguje s agarózou, což by se stávat

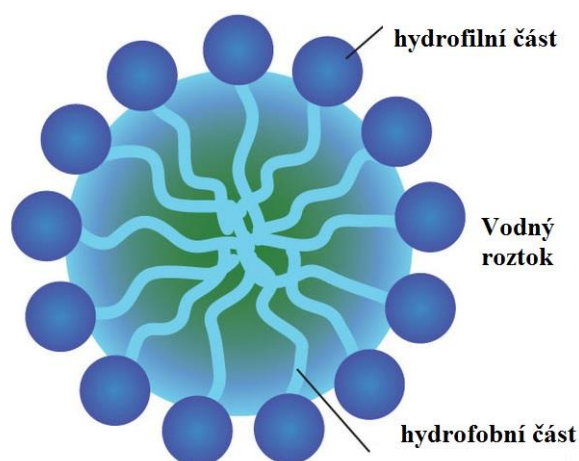
nemělo. Celá problematika si vyžadovala další prošetření a výsledky dalších experimentů ukazuje studie [39], kde byla provedena nestacionární difúze dvou kationtových barviv (Methylenové modři a Rhodaminu 6G) opět v hydrogelu s různým obsahem agarózy a HK. Experimenty prováděné při různých hodnotách pH a iontové síly prokázaly, že interakce HK a opačně nabitých organických barviv jsou mnohem složitější, než se očekávalo a neměly by být považovány za pouhé interakce elektrostatických sil.

3.3.3 Molekulární organizace

Jelikož jsou HL heterogenní a polydisperzní, není jednoduché určit jejich sekundární strukturu a konformační uspořádání [5], nicméně tyto poznatky mají zásadní význam pro mnohé procesy v životním prostředí, a proto se vědci HL neustále intenzivně zabývají. Studií na toto téma je opravdu nespočet, avšak některé nejsou již dávno aktuální, jelikož se poznatky neustále mění s vývojem nových experimentálních technik. Nejprve byly HL látky považovány za makromolekuly, což vyplývalo ze studií hodnot jejich molekulových hmotností, které mohou přesáhnout 1 000 000 Da [31, 40]. Aby mohla být prostudována případná makromolekulární povaha HL, bylo potřeba prozkoumat další vlastnosti jako je tvar molekul, velikost apod. Visser (1964) přisoudil HL rigidní globulární strukturu [41], Orlov a spol. (1972) zase HL látky popsali jako flexibilní elipsoidy [42]. Studie Ghoshe a Schnitzera (1980) ukázaly, že při vysokých koncentracích HK, nízkých hodnotách pH či vysokých koncentracích neutrálních solí, se formují sférické koloidy a naopak při vysokých hodnotách pH, nízkých koncentracích HL a neutrálních solí, se formují lineární koloidy [43]. Autoři studií [5, 44, 45] byly zastánci toho, že HL mají polymerní strukturu a skládají se z náhodně svinutých (stočených) makromolekul mající protáhlý tvar v bazických roztocích, nebo v roztocích s malou iontovou silou, ale stanou se stočenými v kyselých roztocích nebo v roztocích s vysokými hodnotami iontové síly. Nicméně nedávné informace shromážděné pomocí spektroskopických, mikroskopických, pyrolytických a měkkých ionizačních technik nejsou v souladu s polymerním modelem HL. Námitky proti polymerní teorii mají i studie jako např. [46, 47, 48, 49, 50]. Vysoká molekulová hmotnost totiž může být vysvětlena asociací malých komponentů do agregátů ve vodných roztocích s makromolekulárními vlastnostmi. Navíc Piccolo [27] podotýká, že tradiční názor polymerní struktury HL, není podložen žádným přímým důkazem, ale předpokládá se pouze na základě laboratorních experimentů s modelovými molekulami a výsledcích vzniklých nesprávně použitými analytickými postupy či matematickými modely vyvinutými pro čisté biopolymery. Novější koncept předpokládá supramolekulární sdružení HL, ve kterém mnoho relativně malých a chemicky různorodých organických molekul tvoří shluky spojené vodíkovými vazbami a hydrofobními interakcemi. Dle výzkumu Baigorriho a spol. (2007) se HL jeví jako složené ze dvou hlavních frakcí. Frakce vykazující v roztocích čistě makromolekulární chování (s přítomnými makromolekulami nebo stabilními molekulovými agregáty), a druhé frakce formované molekulárními agregáty (supramolekulární asociace), která zahrnuje molekuly nízkých hmotností a nečistoty makromolekulární povahy [51].

V poslední době je nejdiskutovanější koncept micelární struktury tj. uspořádání organické molekuly ve vodném roztoku za vzniku hydrofilní vnější oblasti a hydrofobní oblasti po

kontaktu s vicinálními molekulami vody [52]. *Guetzloff a Rice* (1994) však předpokládají, že ne všechny HK komponenty, se podílejí na tvorbě micelárních agregátů [53]. *Chilom, Bruns, Rice* (2009) se snažili ověřit, že jedna třetina komponent HK se chová jako surfaktant, a proto mají HK amfifilní vlastnosti [54]. Ve studii *Chilom a Rice* (2009) navázali na předchozí experimenty a dále studovali strukturální organizace HK v roztocích. Domnívají, že se HK skládá ze tří frakcí: dvou frakcí kyselé povahy a jedné frakce podobné lipidům, mající různé role v procesu vlastní organizace. Experimenty prováděli přímým porovnáním jejich organizace s fyzikálními směsí skládající se ze tří frakcí pomocí diferenční skenovací kalorimetrie (*Differential scanning calorimetry* – DSC). Srovnávací měření měrné tepelné kapacity jako funkce teploty odhalily rozdíly mezi původní HK a směsí se stejným chemickým složením. Tyto rozdíly poskytují přímý důkaz, že struktura HK v pevném stavu, je více než jen směsí složek a je určena specifickými interakcemi mezi jednotlivými komponenty. Studie naznačuje, že HK v pevném stavu mají hierarchickou, složenou strukturu [55].



Obr. 7 Struktura micely [56]

Muscolo a spol. (2013) studovali HL jako případné surfaktanty (tenzidy). Podle nich HL z půd a sedimentů mohou být definovány jako surfaktanty na základě měření jejich povrchového napětí. Autoři práce se rozhodli zhodnotit vlivy HL a derivátů na jejich povrchové napětí a přišli na to, že nejdůležitějším faktorem je původ HL. Mnoho průmyslově vyráběných HL působí pouze málo, nebo nemají dokonce žádný vliv na povrchové napětí, naproti tomu HL z přírodních zdrojů ovlivňují povrchové napětí do velké míry. Bylo uvedeno, že spontánní agregace vodných roztoků HL může probíhat na intramolekulární (zahrnující jedinou molekulu polymeru) nebo intermolekulární (zahrnující více řetězců) úrovni [57, 58]. Vnitřní část těchto agregátů je relativně hydrofobní, zatímco vnější je hydrofilní. Vliv HL na povrchové napětí roztoků je dán jejich amfifilním charakterem a zároveň tendencí se hromadit na rozhraní voda – vzduch. Faktory jako koncentrace roztoku, pH a koncentrace iontů kovů určují vliv HL na povrchové napětí a tvorbu pseudomicel. Děje se tomu tak proto, že oba efekty jsou projevy stejných vlastností roztoku. Všechny HL zkoumané v této studii prokazovaly schopnost ovlivňovat povrchové napětí, nicméně nemůžou být definovány jako opravdové surfaktanty [59]. K podobným výsledkům došli i *Klavins a Purmalis* (2010) [60].

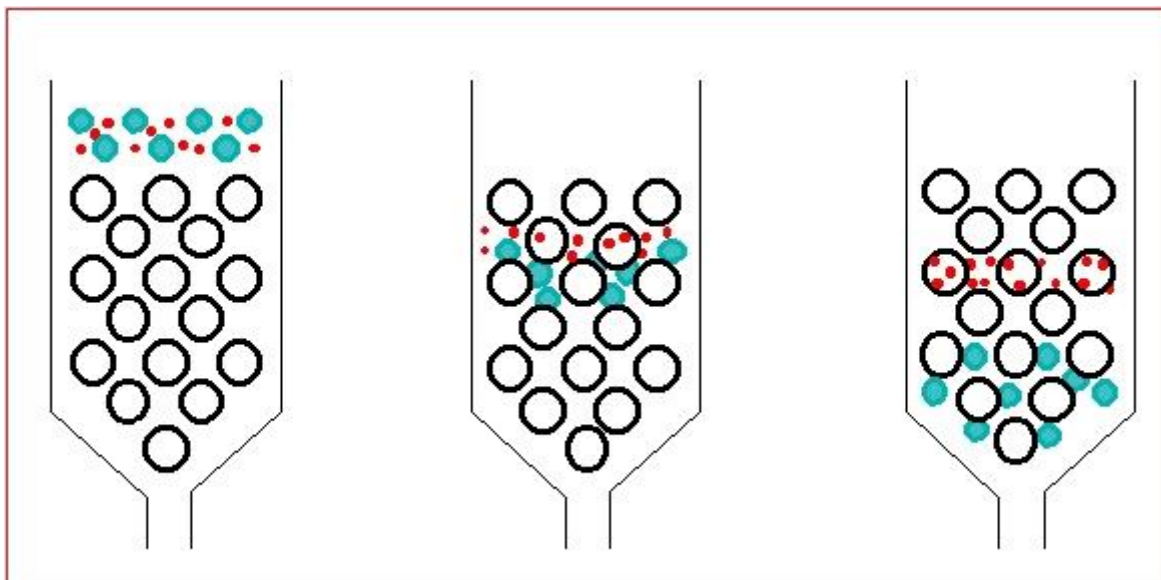
3.3.4 Metody studia molekulární organizace HK

V průběhu let se ukázalo, že žádný jednoduchý experiment nedokáže popsat povahu těchto složitých materiálů, proto vědci často využívají kombinace různých metod, aby dosáhli, co nepřesnějších výsledků.

Gelová permeační chromatografie

Pomocí gelové permeační chromatografie (*Gel Permeation Chromatography* – GPC) je možné separovat jakékoliv molekuly, které se liší svými rozměry, pokud se dobře rozpouštějí v některém rozpouštědle. Na rozdíl od absorpční či rozdělovací chromatografie je separace u GPC závislá pouze na velikosti molekul analyzovaných látek a téměř vůbec nezávisí na jejich chemické povaze. Chromatografická kolona po GPC je naplněná malými částicemi gelu obsahující póry různých rozměrů. Prostory mezi zrny gelové náplně i póry vyplňuje rozpouštědlo (mobilní fáze). Zředěný roztok vzorku se nanese na vstup do kolony a postupně je vymýván mobilní fází. Molekuly mající rozměry větší než jsou rozměry pórů, jsou z gelové náplně vyloučeny (exkludovány), mohou se nacházet pouze v prostoru mezi zrny a procházejí kolonou bez zadržení. Pořadí eluce je takové, že největší molekuly opouštějí kolonu nejdříve a teprve potom odcházejí z kolony molekuly s menší molární hmotností [61].

Častou technikou využívající se pro studium HL je vylučovací chromatografie (*Size Exclusion Chromatography* – SEC) patřící pod GPC, kde mechanismus separace probíhá pouze na základě molekulové hmotnosti. Může probíhat za zvýšeného (*High Pressure Size Exclusion Chromatograph* - HPSEC) i sníženého (*Low Pressure Size Exclusion Chromatography* – LPSEC) tlaku. [62]



Obr. 8 Separace vzorku procházejícího chromatografickou kolonou [63]

Ačkoliv je HPSEC vědci velmi používaná metoda pro zjišťování distribucí molekulových hmotností vodných HL, autoři článku [64] jsou vůči ní mírně skeptičtí. Problém vidí

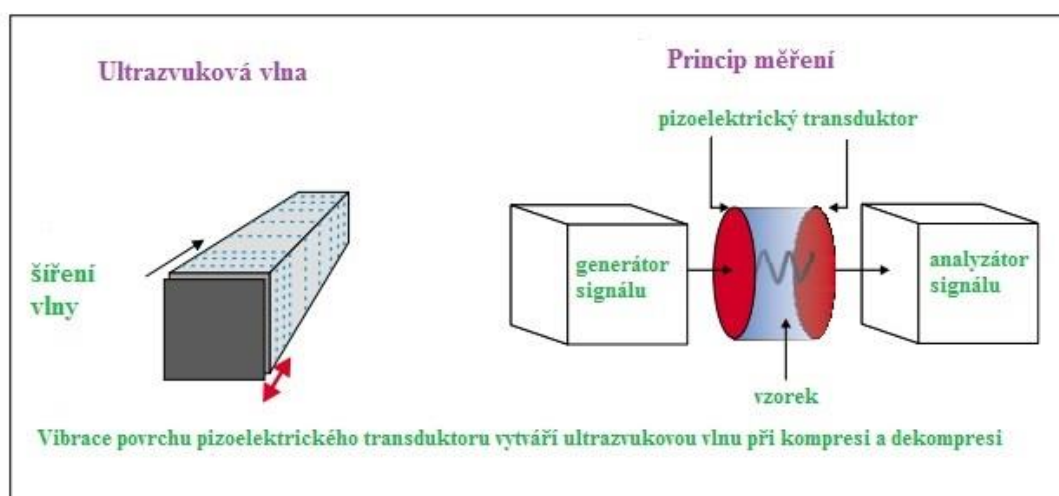
v reprodukovatelnosti měření a přesnosti, a proto se zaměřili na zlepšení těchto parametrů. Nakonec výsledky ukázaly, že je nutné při vyhodnocování HPSEC metody postupovat opatrně a nepodceňovat detaily během měření například molekulové hmotnosti, jelikož měření ovlivňují faktory jako je výběr vhodných standardů apod.

Piccolo a spol. (1997) se zabývali chováním HL v prostředí jednoduchých organických sloučenin, kde sledovali změny distribuce molekulové velikosti. U sloučenin HL s monokarboxylovými, dikarboxylovými a trikarboxylovými kyselinami byl zaznamenán posun v absorbancích od vysokomolekulárních k nízkomolekulárním velikostem. Minerální kyseliny, fenoly, alkoholy posun jako v případě organických kyselin nevykazovaly, jelikož jejich absorbance byla naměřena stejná jako u HL samostatných. Při reakci HL se silnými anorganickými kyselinami se molekulární konfigurace mění na globulární tvary díky tvorbě inter- a intramolekulárních vodíkových vazeb po protonaci skupin HK. *Piccolo* se domnívá, že výsledky jsou důkazem micelárního chování HL a mají význam z hlediska hydrofobních vazeb držící huminové molekuly pohromadě. Organické kyseliny pronikají do vnitřní struktury micely a změni její stereochemické hydrofobní uspořádání. V alkalickém prostředí rozvinuté záporné náboje naruší zdánlivě vysokomolekulární konfigurace a rozptýlí je do malých micel [48]. *Piccolo a spol. (1999)* v této práci porovnávají HK z dvou různých zdrojů odebraných ze sopečných půd. Ke studiu využívali metodu HPSEC a výsledky chromatografů ukázaly pestré odlišnosti v základních molekulárních strukturách HK z různých zdrojů. *Piccolo* zde poukazuje na možnost, že by se HL jako slabě vázané molekulové agregáty mohly během HPSEC eluce narušit. Nakonec rozdílů přiřadili vnitřním huminovým vlastnostem jako je stabilita konformační struktury. HL se v roztocích chovaly jako volně vázané asociace malých molekul, které mohou být trvale rozptýlené difúzí přes vylučovací póry [49]. *Piccolo (2002)* pokračoval v předchozích výzkumech a potvrdil, že velké množství důkazů ukazuje na alternativu pochopení konformační povahy HL jako supramolekulárních sdružení heterogenních a relativně malých molekul. Hlavním aspektem supramolekulární konformace je to, že je stabilizována převážně slabými disperzními silami namísto kovalentních vazeb. Hydrofobní (van der Waalsovy síly, $\pi - \pi$ interakce, CH – π interakce) a vodíkové vazby jsou zodpovědné za vysoké molekulové hmotnosti HL [65]. *Varga a spol. (2000)* předpokládali micelární chování HL a pokusili se narušit předpokládané micely přidávkou organických kyselin. Změny sledovali na základě retenčního posunu vylučovací chromatografie. Současně však brali v potaz parametry jako je pH elučního činidla, koncentrace soli, kapacita pufru. Výsledky naznačily, že retenční posun nebyl zapříčiněn důsledkem micelárního členění, ale (zejména hydrofobními) interakcemi způsobenými změnou pH na stacionární fázi [66]. *Nebbioso a Piccolo (2012)* izolovali a identifikovali huminové molekulární komponenty v oddělených velikostních frakcích za pomoci HPSEC. V souladu se supramolekulárním konceptem zjistili, že hydrofobní sloučeniny se vyskytovaly především v největší velikostní frakci, zatímco hydrofilní složky byly eluovány v nejmenší velikostní frakci. Kromě toho, sloučeniny s lineárními řetězci nebo skládajícími se aromatickými kruhy spojené v pravidelné struktury byly hojnější v největší velikostní frakci, zatímco nepravidelně tvarované sloučeniny bránící sdružení do větších velikostí v nejmenší velikostní frakci. Dále výsledky ukázaly, že HL jsou složeny z heterogenních molekul náhodně se spojujících v závislosti na velikosti,

tvaru, chemické afinitě, hydrofobicitě a strukturální charakterizace jednotlivých molekul. Omezením jsou však silné mezimolekulové interakce stabilizující jejich supramolekulární asociace [67].

Vysoce rozlišovací ultrazvuková spektroskopie

Většina metod, které mohou být využity k objasnění sekundární struktury HL, mají omezení jako je například složení mobilní fáze pro aplikace vylučovací chromatografie nebo limitní koncentrace roztoků HL u velkého počtu spektroskopických metod. Tyto omezení byly překonány analytickou technikou vysoce rozlišovací ultrazvukové spektroskopie (*High resolution ultrasonic spectroscopy* – HRUS). Jednou z výhod této metody je bimodální uspořádání, kdy se měření vlastností vzorku může sledovat buď za izotermického, nebo ne izotermického režimu [68]. Mezi dva hlavní parametry měřené u metody HRUS jsou zeslabení a rychlost ultrazvukové vlny. Měření zeslabení nevyžaduje vysokou teplotní stabilitu vzorku, což umožňuje měření velkých vzorků. Rychlost ultrazvukové vlny je ovlivňována hustotou a elasticitou média, která je extrémně citlivá na molekulární organizaci a intramolekulární interakce ve vzorku. Nicméně měření naopak vyžaduje vysoké rozlišení, čehož nemůže být dosaženo u velkých vzorků díky obtížnosti kontroly teploty. Hlavní princip měření zobrazuje **Obr. 9** [69].



Obr. 9 Princip měření metody HRUS [69]

Kučerík a spol. (2007) využili metodu HRUS pro studium sodné soli HK z půdy a lignitu vykazující podobné chování, což podporuje hypotézu, že jak neutrální tak i alkalické pH, napomáhá agregaci HK již od velmi nízkých koncentrací. Stejného závěru lze dosáhnout pro roztoky s vysokou iontovou silou. Snažili se použít stejný postup pro studium micelizace a stanovení kritické micelární koncentrace běžných surfaktantů. Koloidní stav HK ve vodném roztoku je velmi citlivý na přítomnost jiných molekul a to jak neutrálních, tak nabitých. Agregace HK může být narušena nebo podporována v závislosti na koncentraci, elektrostatických nebo dalších slabých interakcí s cizími molekulami. Struktury různé pevnosti (tuhosti) mohou být vytvořeny v roztocích složených ze stejných složek,

ale o různých koncentracích. Takové chování odráží mechanismy vyskytující se během oddělování (sekvestrace) hydrofobních organických sloučenin a má několik důsledků pro ochranu/transport labilních struktur a kontaminujících látek pravděpodobně zapouzdřených v hydrofobní kapse rozpustných huminových agregátů [68]. *Kučerík a spol.* (2009) studovali termodynamickou stabilitu HK za pomoci HRUS při teplotním rozmezí 5 až 90 °C. Měření provázelo několik přechodů, které se připisují oslabení sekundární struktury. Další experimenty, ve kterých byl vzorek HK modifikován HCl, ukázaly mírnou strukturální stabilizaci vedoucí k závěru, že huminové micely jako subagregáty, vytvářejí sestavy otevřených vrstev snadno přístupných pro interakci s cizí molekulou [70]. *Klučáková a spol.* (2012) měřili ultrazvukovou rychlost, útlum, a hustotu použitých huminových solů za účelem studia konformačních změn v roztocích HK (NaCl a NaOH) při různých hodnotách pH. Dospěli k závěru, že organizace částic ve zředěných a koncentrovaných roztocích solů HK je jiná. Pokles stlačitelnosti poukázal na vytvoření více rigidní struktury, která by mohla vést ke snížení HK schopnosti vázat se. Bylo potvrzeno, že chemické složení HK stejně jako prostředí silně ovlivňují jejich molekulární organizaci ve vodných roztocích. Použité vzorky HK se lišily jak v obsahu kyselých funkčních skupin, tak i v aromaticitě. Silné alkalické podmínky způsobovaly sdružení (asociaci) záporně nabitých částic HK mnohem slaběji. Mnohem stabilnější agregáty byly tvořeny postupně s rostoucí koncentrací, což se snižovalo se vzdáleností huminových částic [71].

Nukleární magnetická rezonance

Princip nukleární magnetické rezonance (*Nuclear magnetic resonance* – NMR) spočívá v interakci elektromagnetického záření v oblasti krátkých rádiových vln s atomovými jádry měřené látky. Při interakci absorbovaná energie způsobuje přechody nenulových magnetických momentů na vyšší energetické stavy. Ve spektrech NMR se projevují magnetické momenty jaderných spinů. Jádra prvků a jejich izotopů mají tzv. vnitřní moment hybnosti, označovaný častěji jako spin. U těch jader, která mají nenulový spin (^{13}C , ^{19}F , ^{31}P , ^{17}O , ^2H , ^1H a další) je vzbuzováno magnetické pole. Z prvků, které se vyskytují v organických sloučeninách, se nejčastěji měří NMR spektra u ^1H , ^{13}C a ^{19}F . Ostatní běžně se vyskytující elementy (^{12}C , ^{16}O a ^{32}S) jsou nemagnetické (mají nulový spin). Základem této metody je, že běžně přítomné atomy uhlíku (^{12}C) neinterferují ve spektrech a tím je podstatně zjednodušují [62].

Simpson a spol. (2002) předpokládají, že hlavními molekulovými strukturální komponenty ve směsi HL jsou alifatické kyseliny, ethery, estery a alkoholy, fragmenty derivátů aromatického ligninu, polysacharidy a polypeptidy. Metodou difúzí řízené spektroskopie (*Diffusion Ordered Spectroscopy* – DOSY) bylo prokázáno, že největší samostatnou jednotkou jsou sacharidy. Kapalinová chromatografie potvrdila, že HL mohou být snadno odděleny a komponenty mají relativně nízké molekulové hmotnosti $< \sim 2\,000$ Da. Široce uznávané vlastnosti HL jako charakteristické orientační síťování, makromolekulární sítě, mohou být nyní vysvětleny jako agregace směsí, s největší pravděpodobností vyvolané tvorbou komplexů s kovovými ionty [27]. *Sutton a Sposito* (2005) podotýká, že podle nového pohledu, jsou HL sbírky různorodých, relativně nízkomolekulárních složky tvořící dynamické asociace stabilizované hydrofobními interakcemi a vodíkovými vazbami. Tyto

asociáty jsou schopny se organizovat do micelární struktury ve vhodných vodných prostředích. Huminové komponenty zobrazují kontrastní molekulární pohybové chování a mohou být prostorově odděleny v měřítku nanometrů. V tomto novém strukturálním kontextu komponenty zahrnují veškeré molekuly úzce spojené s HL, které jako takové nemohou být účinně odděleny chemickými či fyzikálními metodami [72].

Dynamický rozptyl světla

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

Gustavo González – Gaitano and Josemaría – García-Mina (2005) svými průzkumy potvrdili výhody využití neinvazivní techniky dynamického rozptylu světla ke studiu strukturálních změn HL v důsledku kolísání pH, iontové síly a teploty. Ve zkoumaném systému byly vidět významné molekulární agregace HK způsobené okyselením HCl pravděpodobně v důsledku významné tvorby vodíkových vazeb a hydrofobních interakcí. Stejná molekulární agregace nebyla zjištěna při acidifikaci organickými kyselinami (šřavelová, citrónová). Tato skutečnost může být způsobena účinkem molekulární solvatace HK molekulami organických kyselin, které zabraňují tvorbě vodíkové vazby a hydrofobním interakcím. Jejich experimentální údaje ukazují, že alkalické extrakty HK používané v této studii jsou v zásadě tvořeny frakcí relativně malých makromolekul spolu s malým podílem některých druhů supramolekulárních struktur, avšak naznačují, že tyto malé molekuly netvoří složitější supramolekulární struktury [73]. *Kalina a spol.* (2012) zjišťovali vliv pH a iontové síly na velikost částic různých vzorků HK. Výsledky ukázaly, že se zvyšující se koncentrací soli v roztoku se zvyšuje velikost částic HK. Více složité chování bylo pozorováno při studiu pH závislosti. Největší částice byly při hodnotě pH mezi 8 a 10. Se změnou bazické až na kyselé pH velikost částic se snižovala [25].

Kombinace metod a ostatní metody

Gaëlle M. Roger a spol. (2010) využili vysoce přesnou konduktometrii při různých pH, velikostech a nábojích referenčních HK, FK, dále přírodní organické hmoty a polyakrylové kyseliny. Získané výsledky byly porovnány a potvrzeny dvěma nezávislými technikami: mikroskopie atomárních sil (*atomic force microscopy* – AFM) a DLS. Bez ohledu na jejich geologický původ měly studované HK stejný náboj, stejný průměr přibližně 2 nm, pH mělo vliv na efektivní náboje těchto koloidů, ale ne na jejich velikost. Dále experimenty potvrdily, že HK se skládají z malých jednotek o velikosti několik nanometrů. Tyto subjekty mohou agregovat v roztoku a tvořit supramolekulární struktury [74].

Changlun Chen a spol. (2007) studovali makromolekulární chování a tvar půdních HK při nízkých a vysokých hodnotách pH a vysoké iontové síle za pomoci dvou metod: rastrovací elektronové mikroskopie (*scanning electron microscope* – SEM) a AFM. Experimenty ukázaly, že sférické koloidy jsou tvořeny při nízkém pH a vysokém obsahu soli, zatímco síťovité a lineární struktury jsou tvořeny při vysokém pH a nízké koncentraci soli. Přitom studovali konformace HK: HK v 0,01 M NaNO₃ pH 5 a 11. Metoda SEM (HK – pH 5) prokázala přítomnost typických sférických koloidů při nízkém pH a vysoké koncentraci elektrolytu. SEM analýza také ukázala flexibilní lineární strukturu (HK – pH 11) při vysokých

hodnotách pH. Nicméně bylo zajímavé, že lineární struktury byly nepravidelné a část HK agregovala při vysoké hodnotě pH. U HK bez přídavku NaNO_3 se tvořily síťovité struktury, většina částic měly průměr $\sim 0,1 \mu\text{m}$ a některé částice tvořily agregáty s $0,5 - 1 \mu\text{m}$. Ačkoliv metoda neprokázala žádné prstencové struktury při nízkém pH, agregované struktury vykazovaly podobné vlastnosti jako prstencové struktury. Nepravidelné struktury mohou být přisuzovány heterogenní struktuře HK [75].

Ruggero Angelico a spol. (2014) se zabývali velikostí částic a koloidní stabilitou HK s koprecipitovaným ferrihydritem. Zvýšená koloidní stabilita vodných roztoků HK dosažená při vysoké hodnotě pH, může být připsána intramolekulárnímu elektrostatickému odpuzování a rekonformaci huminových sítí. Metody TEM, difrakce rentgenových paprsků (*X-ray diffraction – XRD*) a dielektrická relaxační spektroskopie (*dielectric relaxation spectroscopy – DRS*) ukázaly, že sloučeniny HK s Fe se skládaly z ferrihydritu s důležitými strukturálními variacemi. DLS data ukázaly bimodální distribuci velikosti při kyselém pH, zatímco při velmi nízkém pH byl pozorován pomalý proces agregace. Za alkalických podmínek se řetězce HK zvětšovaly, což mělo za následek zvýšenou stabilizaci koloidních částic. Z výsledků usoudili, že koprecipitace ferrihydritu s HK hraje důležitou roli při stabilizaci a persistenci uhlíku nejen v organických půdách, ale i ve vodách, které obsahují rozpuštěné organické látky [76].

Tarasevich a spol. (2013) studovali zastoupení optických vlastností vodných roztoků HK prostřednictvím jejich molárních extinkčních koeficientů ϵ . Výsledky ukázaly, že v koncentračním rozmezí ($5 \text{ mg/dm}^3 - 8 \text{ g/dm}^3$) v neutrálním prostředí molekuly HK nepodléhají změnám poté, co se tvoří asociáty určitého typu např. micely. Je zřejmé, že micely nejsou jediné struktury formující se jako výsledek molekulární asociace v roztoku. Asociace HK v neutrálním prostředí v premicelární koncentraci okolo 5 mg/dm^3 může být připsána supramolekulárním strukturám [77].

Danilenko a spol. (2010) [78] pracovali s metodou chromatografie s reverzní fází a zjistili, že HK získané z vermikompostu (využití schopnosti žížal přeměňovat rostlinné zbytky na velmi kvalitní organické hnojivo – vermikompost) [79] s různým trváním vermikompostování se skládá z hydrofilní a hydrofobní části, hydrofobní část má podstatně nižší obsah nabitých pravděpodobně karboxylových skupin. Změna teplotní závislosti tepelné kapacity zředěných vodných roztoků HK na $\sim 58^\circ\text{C}$ zjištěná diferenční skenovací mikrokolorimetrií znamená zvýšení hydratace hydrofobních skupin. Další rozmezí teplot bylo $86 - 90^\circ\text{C}$ a opět se prokázalo zvýšení tepelné kapacity, což může být důsledek hydratace hydrofobních skupin uvnitř micel. Bylo prokázáno, že zvýšení doby vermikompostování vede ke zvýšení relativního obsahu hydrofobní frakce HK ve spolupráci s termodynamickou transformací, která se projevuje jako skok tepelné kapacity vyplývající pravděpodobně ze zvýšení „micelární“ velikosti [78].

Terashima a spol. (2004) se zajímali o vliv pH a povrchové aktivity HK extrahovaných rašelinové půdy za pomoci měření povrchového napětí (γ) a zvýšení solubility p – dichlorbenzenu (p – DCB). Povrchové napětí roztoků HK pozvolna klesaly se zvyšující se koncentrací HK. Logaritmická koncentrace HK v místě agregace, povrchové napětí a plochy obsazené HK molekulou sigmoidně klesaly s poklesem pH. Tyto výsledky lze přičíst

disociačnímu chování HK. Změna ploch obsazené molekulami HK může být způsobena díky spolupráce adsorpce a snížení elektrostatického odporu mezi karboxylovými skupinami na rozhraní vzduch – voda. Výsledky ukazují, že agregace do micel a mezifázová adsorpce HK byly značně usnadněny v kyselé oblasti [80].

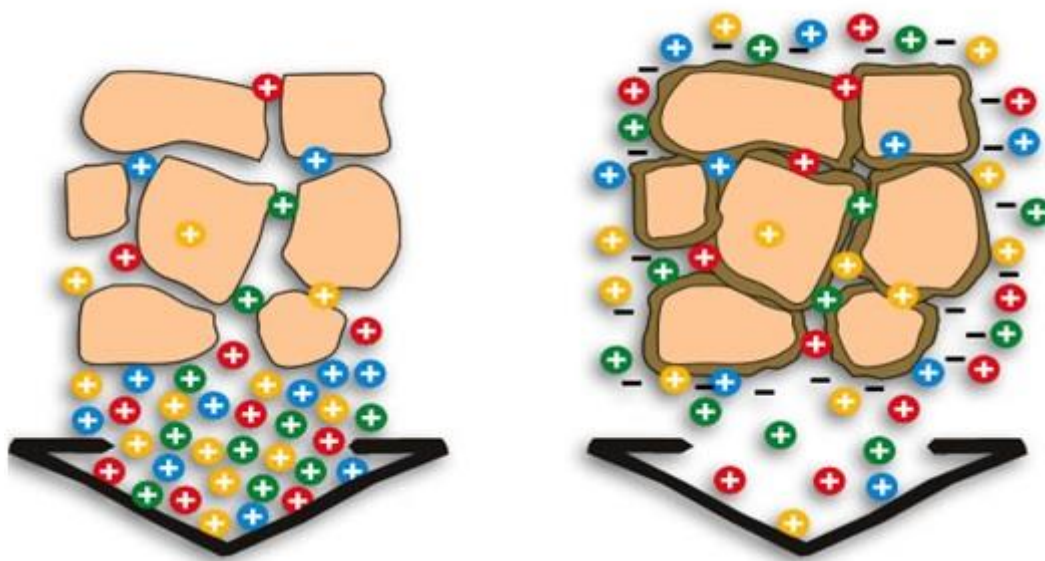
Prado a spol. (2011) studovali hustotu povrchového náboje HK za pomoci potenciometrických a konduktometrických titrací. Také byl pozorován vliv pH na molekulární konformace za pomoci UV – VIS spektroskopie a SEM. Hustota povrchového náboje byla přibližně nula v rozmezí pH 3,5 až 6 pro všechny vzorky. Vliv pH na úroveň molekulární kondenzace byl pozorován za pomoci stanovení β indexu z Doty – Steiner rovnice. Vysoké hodnoty β byly získány v kyselém rozsahu v důsledku kondenzované konformace kvůli slabým přitažlivým interakcím, zatímco kolem neutrální oblasti se projevují odpudivé intramolekulární síly, což vede k delší konformaci huminových molekul. Kromě toho, při velmi alkalických podmínkách, hustota náboje na povrchu molekul je více negativní, což zvyšuje odpor a disperzi částic, a také se koná formace micelárních struktur kvůli amfifilnímu rysu HK [81].

Studie Juga a Franka (2013) pojednává o experimentech, kdy je zhášení fluorescence indikátor konformačních změn HK. Výsledkem bylo zjištění, že největší agregáty HK nefluoreskují díky fluorescenčnímu zhášení. Důvodem není chování konkrétní frakce HK, ale prostředí. Myšleno tak, že záleží na tom, jaké jsou v blízkosti agregáty či které funkční skupiny se podílejí na molekulárních vazbách. Při jakékoliv změně v prostředí podléhaly HK reorganizaci, a jelikož se v životním prostředí neustále tyto změny prostředí dějí, vysvětluje to složitost těchto látek [82].

3.4 Funkce HK v přírodě

Během dlouhodobého výzkumu bylo zjištěno, že HK jsou nejen důležité pro úrodnost půdy, ale jsou také významnými předchůdci uhlí, ropy, rašeliny apod. Mají však i škodlivé účinky, jelikož mohou mít vliv na životní prostředí tím, že vytvářejí komplexy s kovy a organickými látkami, které mohou modifikovat toxicitu těžkých kovů, pesticidů a herbicidů. Ovlivňují také účinnost průmyslových procesů, jako je například extrakce oxidu hlinitého z bauxitu. Dále mohou mít nepříznivý vliv na čištění vody, kde mohou vytvářet karcinogeny během surové desinfekce vody [24]. Příznivé účinky HK v půdě jsou mnohostranné a spočívají v kladném ovlivnění všech půdních vlastností působících rozhodující mírou na obsah živin v půdě i na půdní úrodnost. Zdokonalují strukturu půdy a předcházejí tak vysokým ztrátám vody a živin v lehkých či písčitých půdách (viz **Obr. 10**).

V písčitých půdách nebo půdách s nízkým obsahem humusu, povrch půdních částic ztrácí vysoké množství živin, které nemůže zadržet. HK zajišťují, aby k tomuto nedocházelo tím, že udělí půdě negativní náboj (–), a ten se začne přitahovat s pozitivním (+) nábojem živin (hnojivo). Tím je zajištěna retence živin, ale i vody v půdách.(viz **Obr. 10**) [83].



Obr. 10 Výhody použití HL v písčitých půdách [83]

V těžkých a kompaktních půdách zlepšují provzdušnění, retenci vody a v důsledku toho i kultivační vlastnosti. Regulací pH hodnot přispívají k neutralizaci kyselých a zásaditých půd. Zlepšují a optimalizují příjem živin a vody rostlinami, obsahují látky potřebné pro růst rostlin, vyznačují se vysokou kationtovou – výměnnou kapacitou, uvolňují CO_2 z půdního CaCO_3 a umožňují mu zúčastňovat se fotosyntézy.

HK biologicky stimulují rostliny a aktivitu půdních mikroorganismů (viz. **Obr. 11**)



- Stimulují rostlinné enzymy a zvyšují jejich produkci
- Zvyšují přirozenou rezistenci rostlin vůči chorobám a škůdcům
- Zlepšují klíčení a životaschopnost semen
- Podporují fotosyntézu
- Stimulují bakteriální aktivitu

Obr. 11 Vlivy HL na rostlinné organismy [84]

Výhody HK v přírodě jsou i ekonomické – HK chelatují sloučeniny nutričních prvků v půdě ve formě vhodné pro jejich utilizaci rostlinami. Tímto způsobem je zajištěn optimální přísun živin do rostliny. HK zvyšují i půdní kapacitu zadržování vody, čímž přispívají ke snížení spotřeby vody na zavlažování pěstovaných rostlin.

HK představují prospěšné a účinné řešení problémů životního prostředí, jeho ochrany a zachování. Dobře vyvinutý kořenový systém díky vysokému obsahu HK zabraňuje úniku nitrátů a pesticidů do spodních vod. HK redukují přesolení půd, ke kterému dochází

nadměrným používáním ve vodě rozpustných průmyslových minerálních hnojiv a snižují obsah soli, čímž snižují i toxicitu [83].

3.4.1 Aplikační možnosti huminových látek v technické praxi

HK jsou svojí strukturou blízké průmyslově vyráběným ionexům, proto je možné používat oxyhumolity a deriváty HK k zachycování toxických kovů (Pb, Hg, Cd, Cu, Zn, Ni, Cr) respektive jejich iontů z odpadních vod. Stejně jako ionexy se dají použít do kolon a regenerovat, nebo se používají ve formě přísad do odpadní vody s následným oddělením sedimentací nebo filtrací. Jsou ekologicky nezávadné a vazebná síla vůči kovům je srovnatelná s průmyslovými ionexy.

V papírenském průmyslu se uplatňují HK, resp. jejich sodná forma, humát sodný, který se používá jako barvivo papíru. Jeho přítomnost zároveň zlepšuje retenci papíroviny a snižuje průnik toxických látek do podsítných vod.

Ve stavebnictví se HL uplatňují jako účinná složka plastifikátorů betonových směsí. Plastifikátory s obsahem HA řeší základní problém transportbetonu, tj. zablokování hydratace cementu a zachování konzistence betonové směsi během její dopravy bez negativního vlivu na rychlost nárůstu počátečních pevností betonu.

Aplikace v humánní a veterinární medicíně - účinnost HL spočívá v jejich schopnosti vázat rizikové chemické prvky, ovlivňovat fyziologické procesy a pohlcovat UV záření [85].

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Použité chemikálie

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

Hydroxid sodný (Normex), Carlo Erba Reagents Group

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

Huminové kyseliny

4.2 Použité přístroje

pH metr (Mettler Toledo)

konduktometr (Mettler Toledo)

UV – VIS spektrometr (Hitachi U-3900H)

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

koloidní analyzátor Zetasizer Nano Series (Malvern)

termogravimetrický analyzátor TGA Q5000 (TA instruments)

4.3 Příprava studovaných materiálů

4.3.1 Izolace HK z lignitu:

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

Proces lyofilizace

Lyofilizace je nejdokonalejší současnou sušící metodou, jedná se o sublimační sušení při nízkém tlaku. Dochází k odstranění vody sublimací, tj. přechodem z pevného skupenství přímo do plynného. K tomuto přechodu je nutné připravit vhodné podmínky. V látce obsažená vlhkost se převede zmrazením do tuhé fáze. Následující sublimací a desorpcí ve vakuu se odstraní pokud možno všechna voda. Odstraněním této vody se transport molekul v látce téměř znemožňuje a uchováním ve vakuu se úplně zastavuje vnější látková výměna. Hlavní část procesu lyofilizace probíhá při teplotách pod 0 °C, ve většině případů v oblasti – 40 °C až – 20 °C [86].

Příprava HK solů

Pro samotné měření byly používány HK ve formě čtyř různých vodných roztoků a koncentrací v rozmezí 5 – 0,01 g/dm³. První koncentrační řada byla připravena rozpuštěním HK v NaOH. Navážka byla zvolena tak, aby nejkoncentrovanější roztok měl koncentraci 5 g/dm³. Ředěním byla připravena koncentrační řada HK v NaOH o koncentracích 5 – 0,01 g/dm³. Druhá koncentrační řada byla připravena neutralizací připravených roztoků HK v NaOH z první řady pomocí 0,1 M HCl (1:1). Třetí koncentrační řada byla připravena postupným ředěním roztoku HK v NaOH neutralizovaného HCl s nejvyšší koncentrací (5 g/dm³) pomocí 0,1 M roztoku NaCl. Poslední koncentrační řada byla připravena rozpuštěním HK v milli - Q vodě a následně proběhla úprava pH na hodnotu 12. Vzorky tedy byly namíchány tak, aby byly získány pro všechny čtyři způsoby přípravy stejné koncentrační řady.

Příprava vodných roztoků

Vodné roztoky 0,1 M NaOH a 0,1 M HCl byly připraveny z normanalů (Normanal ®), Lach – Ner, s. r. o. a (Normex), Carlo Erba Reagents Group. Příslušné normanale byly kvantitativně převedeny do odměrných baněk o objemech 1 dm³ a následně doplněny milli – Q vodou až po rysku. Vodný roztok 0,1 M NaCl byl připraven přesným navážením odpovídajícího množství NaCl, který byl kvantitativně převeden do odměrné baňky o objemu 1 dm³ a doplněn milli – Q vodou po rysku.

4.4 Charakterizace huminových kyselin

Znalost elementárního složení HK umožňuje zhodnotit celkový obsah uhlíku, vodíku, dusíku, kyslíku v molekule HK. Prvkové složení přímo ovlivňuje chemické vlastnosti a strukturu HK [87]. V rámci této bakalářské práce byly použité HK podrobeny charakterizaci za pomoci elementární analýzy na CHNSO Mikroanalyzátoru Carlo Erba na ÚSMH AVČR v Praze (výsledky viz **Tab. 2**). Rovněž byl stanoven obsah popele pomocí termogravimetrie (výsledek uveden v kapitole 5).

4.5 Použitá instrumentální metodika

Potenciometrické stanovení pH

Přímá konduktometrie

Ultrafialová a viditelná spektrometrie (UV – VIS spektrometrie)

Měření hustoty

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

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

4.5.1 Potenciometrické stanovení pH

Příprava vzorku pro měření pH a měrné vodivosti:

Nejprve byla provedena kalibrace pH metru pomocí kalibračních roztoků o přesném pH. Následně bylo do kádinky o objemu 25 cm³ odpipetováno 10 cm³ roztoku HK, do něj byla ponořena elektroda a byla naměřena hodnota dané veličiny, buď pH nebo měrná vodivost. Po ustálení byla hodnota zaznamenána. Měření se opakovalo třikrát pro každý roztok HK.

Princip měření:

Přímá potenciometrie je elektrochemická metoda, při níž měříme elektromotorické napětí článku tvořeného měrnou (indikační) a referenční (srovnávací) elektrodou, přičemž potenciál měrné elektrody závisí na aktivitě, resp. koncentraci stanovovaného iontu a potenciál referenční elektrody je nezávislý na složení roztoku, má konstantní hodnotu. Metodicky se nejčastěji využívá metoda kalibrační závislosti, kdy se zjišťuje závislost elektromotorického napětí článku na koncentraci příslušného iontu. Články používané k měření pH jsou tvořeny nejčastěji skleněnou elektrodou a elektrodou referenční (elektrodou 2. druhu, např. kalomelovou, argentochloridovou). S ohledem na vlastnosti skleněné elektrody je nutné ji vždy kalibrovat s použitím vhodných standardních tlumivých roztoků [88].

4.5.2 Přímá konduktometrie

Princip měření:

Stanovit koncentraci elektrolytu na základě přímého měření roztoku je možné jen tehdy, jestliže je složení elektrolytu známé a konstantní. V roztocích obsahujících jen jednu látku je možno stanovit její koncentraci v širokém koncentračním rozmezí, kdy platí lineární závislost měrné vodivosti na koncentraci [89]. V konduktometrii měříme vodivost roztoků elektrolytů. V přímé konduktometrii ze změřené vodivosti usuzujeme na obsah rozpuštěných elektrolytů nebo zjišťujeme jiné veličiny, např. stupeň disociace a disociační konstanty slabých elektrolytů, součin rozpustnosti silných elektrolytů apod. Měrná vodivost roste s obsahem iontů. Pro zředěné roztoky platí přímá úměra mezi měrnou vodivostí a koncentrací iontů, neboť lze zanedbat jejich interakce. Při velmi vysokých koncentracích dochází s růstem koncentrace vlivem interakcí i k poklesu měrné vodivosti [62].

4.5.3 UV – VIS spektrometrie

Příprava vzorku pro měření:

Nejprve byla provedena korekce na baselinu pomocí prostředí, ve kterém byly HK rozptýleny. Do křemenné kyvety bylo nalito 3 cm³ vzorku a naměřeno příslušné spektrum.

Princip měření:

V současné době považujeme molekulovou absorpční spektrální analýzu pro její rychlost, experimentální nenáročnost, přesnost a citlivost za jednu z nejužívanějších analytických metod pro stanovování látek v roztocích. Stanovení látek molekulovou absorpční spektrometrií je založeno na měření absorpce elektromagnetického záření molekulami látek v ultrafialové a viditelné oblasti v rozsahu vlnových délek asi 200 nm až 800 nm. Fotony záření z ultrafialové a viditelné oblasti elektromagnetického spektra mají dostatečnou energii, aby excitovaly elektronové stavy a tím spíše i vibrační a rotační stavy molekuly. Výsledné absorpční spektrum látky je pásové, protože při jeho registraci jednotlivé diskrétní přechody zpravidla splývají. Pouze při měření v plynné fázi (za nízké teploty) lze v absorpčním spektru rozlišit jemnou vibrační a někdy i rotační strukturu a v roztocích rozpouštědlem dostaneme soubory širších pásů, protože molekuly sledované látky již nejsou izolovány, ale solvatovány rozpouštědlem, které ruší jejich volnou rotaci a ovlivňuje i vibraci molekuly látky. Vztah mezi množstvím absorbovaného záření – absorbancí, a koncentrací je dán, jako ve všech absorpčních metodách, Lambertovým – Beerovým zákonem. Jehož platnost je omezena pouze na zředěné čiré roztoky absorbujících látek o koncentracích zpravidla menších než 0,01 mol/l.

K nalezení vztahu $A = f(c)$ se využívá standardních kalibračních metod, měření se provádí při konstantní vlnové délce, zpravidla při vlnové délce, $\lambda(\text{max})$, při níž látka absorbuje nejvíce (maximum na absorpčním pásu) [90].

Lambert – Beerův zákon zní: Absorbance je přímo úměrná koncentraci absorbující látky a tloušťce absorbující vrstvy [62]. Matematické vyjádření Lambert-Beerova zákona:

$$A = \varepsilon_{\lambda} \cdot l \cdot c, \quad (1)$$

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

4.5.4 Měření hustoty

Příprava vzorku pro měření:

Měření hustoty vzorků probíhalo pomocí hustoměru s oscilační U - trubicí, kde byla nejprve provedena kalibrace přístroje pomocí injekční stříkačky naplněné odplyněnou milli - Q vodou. Následně byl aplikován vzorek do měřicí cely a byla naměřena hustota. Měření bylo opakováno třikrát.

Princip měření:

Oscilační U – trubice je naplněna 1 ml vzorku. Přístroj elektronicky excituje U – trubicí, která simultánně osciluje svojí základní rezonanční a harmonickou frekvencí. Oscilační charakteristiky jsou kontrolovány referenčním oscilátorem zajišťujícím správnou frekvenci. Referenční oscilátor je umístěn v teplotním kontaktu s oscilační U – trubicí. Toto umístění umožňuje kompenzaci veškerých driftů způsobených teplotním stresem. Na základě těchto

měření je hustota stanovena s mimořádnou přesností a současně je korigován vliv viskozity [91].

4.5.5 Dynamický rozptyl světla

Příprava vzorku:

Příprava vzorku pro měření dynamického rozptylu částic a elektroforetického potenciálu probíhala tak, že bylo odlito 1 cm³ vzorku HK do křemenné kyvety. Po změření velikosti částic byla do kyvety se vzorkem vložena Dip cela pro stanovení zeta potenciálu.

Princip měření:

Dynamický rozptyl světla (*Dynamic light scattering* – DLS) také známý také jako foton korelační spektroskopie (*Photon correlation spectroscopy* – PCS) je jedna z nejoblíbenějších nedestruktivních metod používaných k určení velikosti částic. Během měření dynamického rozptylu světla dochází k interakci laserového zdrojového záření s částicemi ve vzorku. Po osvětlení vzorku monochromatickým koherentním světelným paprskem jako je laser, dochází z důvodu Brownova pohybu u kulovitých částic k Dopplerově posuvu při dopadu světla na pohybující se částici. Dochází ke změně vlnové délky dopadajícího světla, což souvisí s velikostí částic. Je možné vypočítat rozložení velikosti a popsat pohyb částice v médiu měřením difúzního koeficientu částice za pomoci autokorelační funkce [92]. V případě polydisperzních systémů se musí vzít do úvahy pohyb částic rozdílných velikostí, korelační funkce má poté složitější formu. Získaná průměrná velikosti koloidních částic je vážena podle páté mocniny (tzv. *Z* – average), takže velké částice jsou v této hodnotě velmi nadhodnoceny a dokonce se může u některých přístrojů stát, že frakce malých částic se úplně ztratí ve velké intenzitě záření rozptýleného na větších částicích. Rozsah metody je oproti jiným sedimentačním metodám výrazně jiný – dolní mez se dnes pohybuje okolo 0,5 nm a maximální pak okolo 3 μm (větší částice již nepodléhají Brownovu pohybu) [93]. Velikosti částic může být determinována ze Stoke – Einsteinovy rovnice,

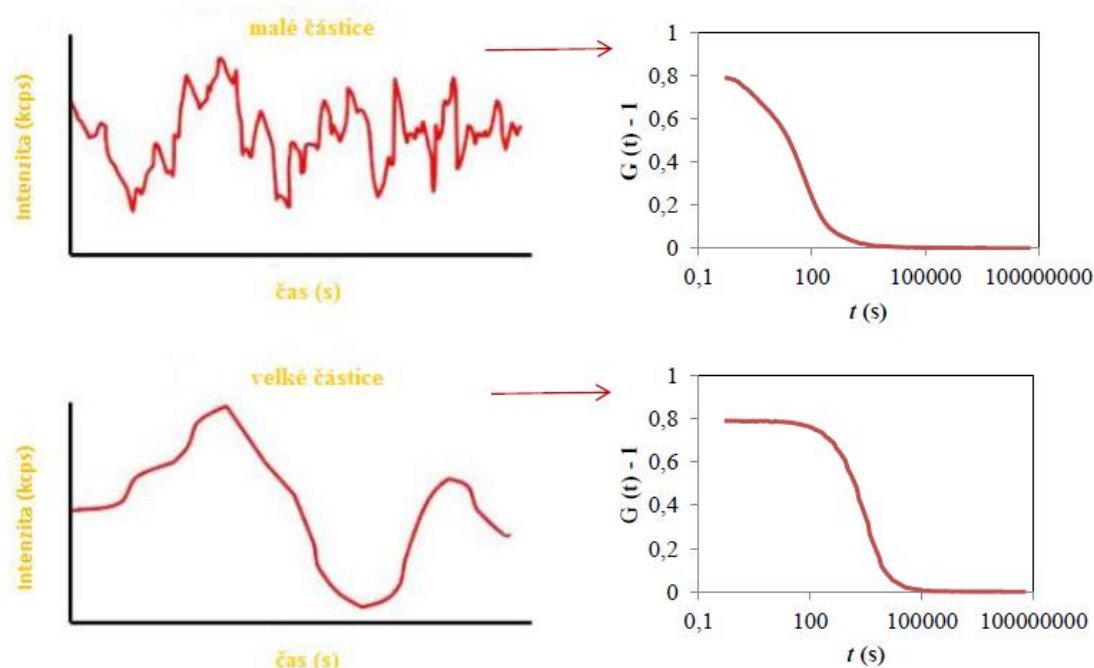
$$D = \frac{k_b \cdot T}{6 \cdot \pi \cdot \eta \cdot d_H} \quad (2)$$

kde je k_b Boltzmannova konstanta, T je teplota, η dynamická viskozita, d_H je hydrodynamický poloměr [25].

Korelační funkce

Rychlosti částic, které se pohybují Brownovým pohybem, souvisí s velikostí částic (Stokes - Einsteinova rovnice), velké částice se pohybují pomalu, zatímco menší částice se pohybují rychle. Jestliže se měří velké částice, pak bude intenzita fluktuovat pomalu, u malých částic tomu bude naopak. Po změření korelační funkce lze vypočítat distribuci velikosti částic. Software Zetasizer používá algoritmy pro získání rychlosti rozkladu pro řadu tříd velikosti, aby vytvořil distribuci velikosti. Ačkoli základní distribuce velikosti generovaná DLS je distribuce intenzity, může se převést, s použitím teorie Mie, na distribuci objemu. Tato distribuce objemu se může také dále převést na početní distribuci. Početní

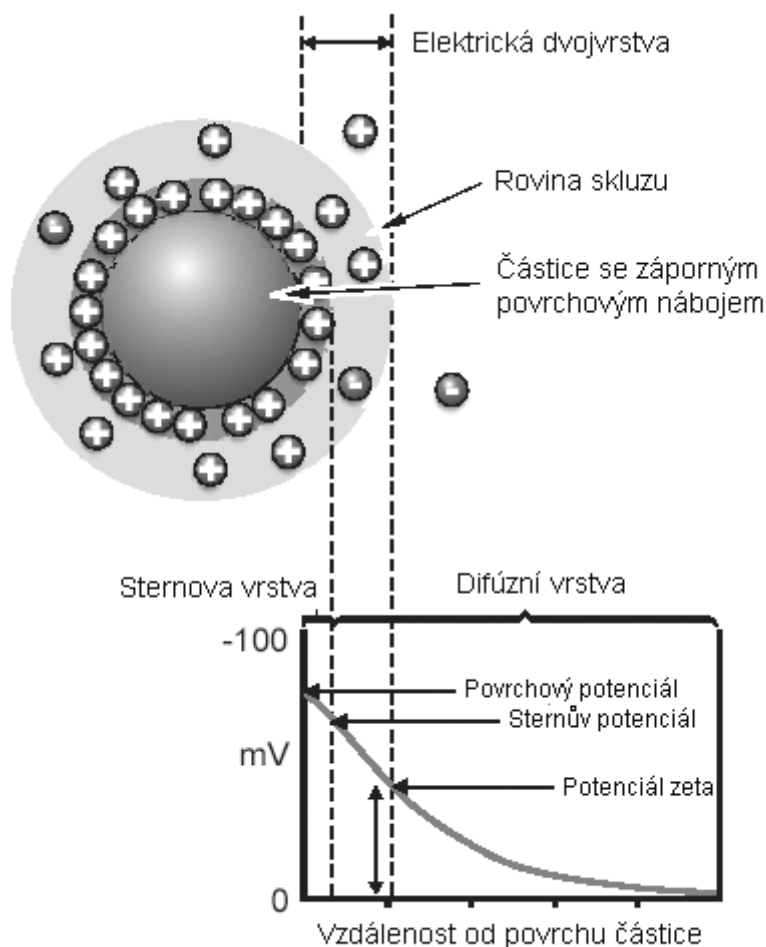
distribuce má omezené použití, protože malé chyby ve shromažďování dat pro korelační funkci povedou k obrovským chybám v distribuci počtu [94].



Obr. 12 Časový vývoj fluktuací intenzity rozptýleného světla v případě měření: velkých a malých částic a příklady korelačních křivek získaných během měření metodou DLS [95]

4.5.6 Elektroforetický rozptyl světla

Přítomnost částic disperzní fáze a široce rozvinutého fázového rozhraní v disperzních soustavách podmiňuje zvláštní ráz jejich elektrických vlastností a především vznik tzv. elektrokinetických jevů. Podobně jako malý jednoduchý ion kolem sebe vytváří iontovou atmosféru protiiontů, tak se i kolem nabitě koloidní částice seskupují malé ionty opačného znaménka, takže na povrchu této částice vznikají dvě nabitě vrstvy, tzv. **elektrická dvojvrstva**. V elektrické dvojvrstvě lze vymezit dvě základní části. Kompaktní část bližší k povrchu, kde působí adsorpční síly, a vzdálenější difúzní část, kde lze tyto adsorpční síly zanedbat. Vzhledem k povrchovému náboji koloidních částic existuje potenciálový rozdíl mezi jejich povrchem a roztokem. Lze rozlišit dva druhy potenciálových rozdílů. Prvním z nich je elektrochemický potenciál, jehož hodnota je dána celkovým potenciálovým rozdílem mezi povrchem částice a objemem kapaliny. Je odpovědný za jevy spojené s vedením elektrického proudu a za membránové potenciály. Druhým potenciálem je elektrokinetický potenciál (ξ potenciál, zeta potenciál), jímž se rozumí potenciálový rozdíl mezi objemem kapaliny a tenkou vrstvou protiiontů poutanou k povrchu částice, tedy na rozhraní mezi kompaktní a difúzní částí elektrické dvojvrstvy. Elektrický náboj dvojvrstvy charakterizuje a zároveň ovlivňuje stabilitu koloidních systémů. Zeta potenciál, který odpovídá náboji difúzní části dvojvrstvy, je právě mírou tohoto náboje, přičemž název získal díky existenci tzv. elektrokinetických jevů, tedy kinetických dějů způsobených vlivem elektrického pole na koloidní soustavu [93].



Obrázek 13 Schématické znázornění zeta potenciálu [94]

Velikost potenciálu zeta naznačuje potenciální stabilitu koloidního systému. Obecná hranice mezi stabilní a nestabilní suspenzí se zpravidla bere buď při + 30 mV nebo – 30 mV. Částice s potenciálem zeta kladnějším než + 30 mV, nebo zápornějším než – 30 mV se normálně považují za stabilní. Nejdůležitější faktor, který ovlivňuje potenciál zeta je pH. Hodnota potenciálu zeta sama o sobě bez uvedení pH, je prakticky číslo nemající žádný smysl [94].

Měření elektroforetické pohyblivosti

Základem klasického mikroeletroforetického systému je cela s elektrodami na každém konci, na které je aplikovaný potenciál. Částice se pohybují směrem k elektrodě s opačným nábojem, jejich rychlost se měří a vyjádří se v jednotkách intenzity pole jako jejich pohyblivost. Technika používaná pro měření této rychlosti je laserová Dopplerova velocimetrie (*Laser doppler velocimetry – LDV*) [94].

5 VÝSLEDKY A DISKUZE

5.1 Charakterizace huminových kyselin

Elementární analýza

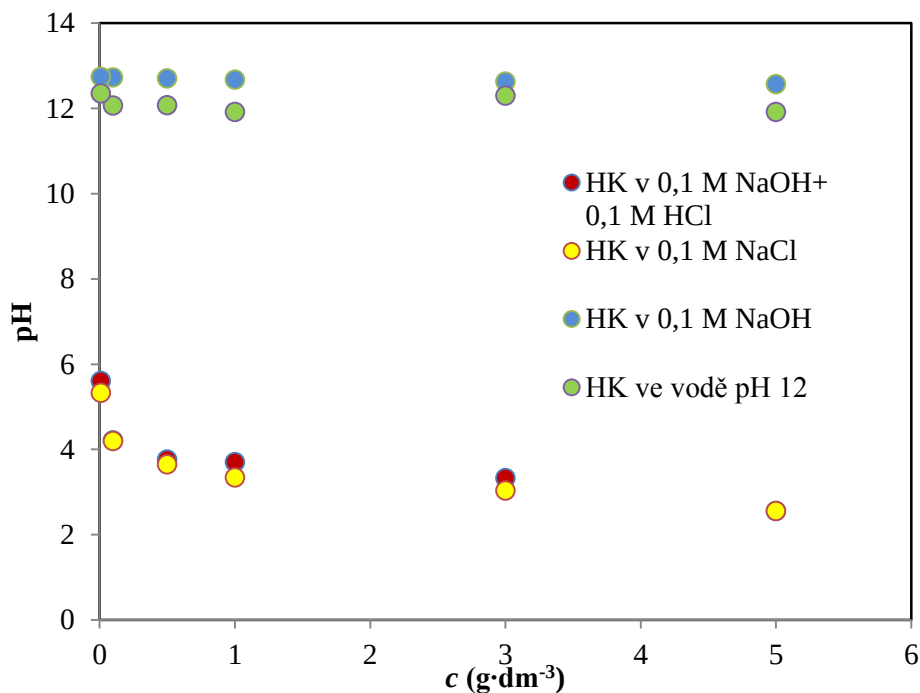
V rámci této bakalářské práce byly použité HK podrobeny charakterizaci za pomoci elementární analýzy (viz **Tab. 2**). Nejvíce zastoupené prvky ve strukturách HK jsou biogenní prvky (uhlík, vodík, kyslík, dusík, síra a fosfor), což potvrdily i výsledky analýzy. HK z jihomoravského lignitu obsahují nejvíce uhlíku, vodíku a v menší míře i kyslíku. Zatímco prvky jako N a S jsou zastoupeny v zanedbatelném množství. Obsah popele byl stanoven na hodnotu 0.

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

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

5.1.1 Potenciometrické stanovení pH

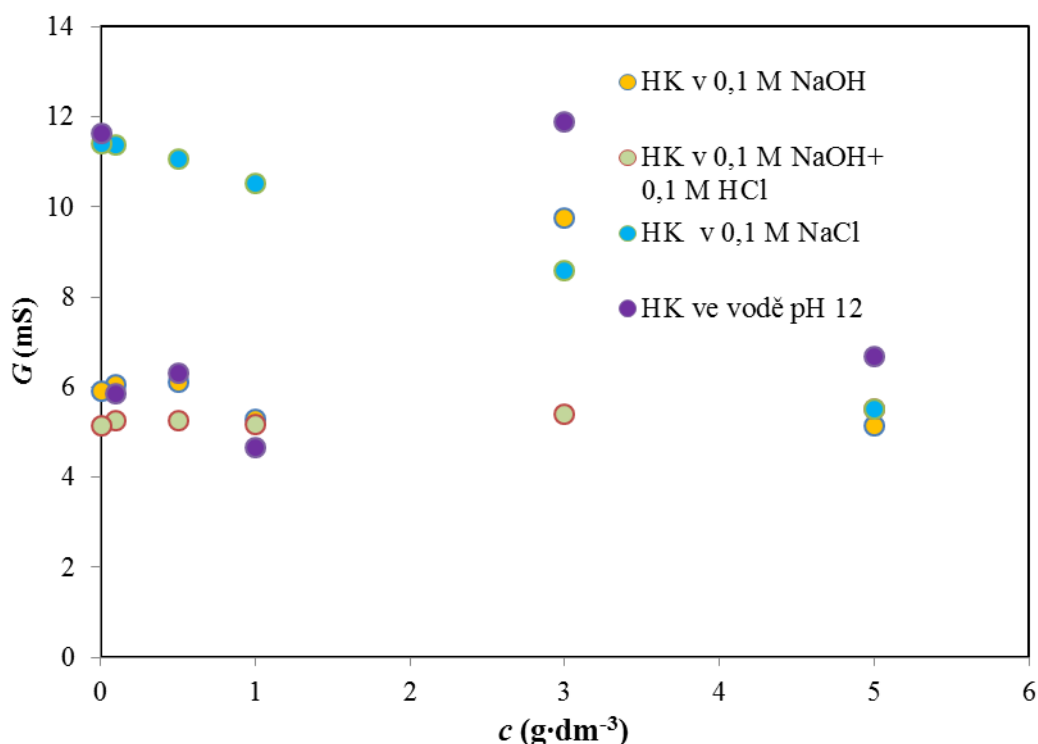
Z naměřených hodnot vyplývá, že pro první koncentrační řadu (HK v 0,1 M NaOH) byly hodnoty pH u zředěných roztoků poměrně konstantní. U vyšších koncentrací však docházelo k nepatrnému poklesu pH. Důvodem poklesu může být disociace HK v alkalickém prostředí. V případě HK ve vodě, jejichž pH bylo poté upraveno na hodnotu 12, jsou hodnoty nepatrně odlišné. Opět dochází u koncentrovanějších roztoků k poklesu pH, nicméně v porovnání s první koncentrační řadou jsou hodnoty pH u roztoků 5 – 1 g/l nižší. U roztoků připravených neutralizací jsou hodnoty pH u některých roztoků vyšší než u roztoků připravených přímo pomocí NaCl. V obou případech dochází k exponenciálnímu poklesu. Rozdíly jsou způsobeny odlišnou přípravou roztoků, která způsobila změnu ve strukturním uspořádání.



br. 14 Závislost pH na koncentraci HK pro všechny koncentrační řady

5.1.2 Přímá konduktometrie

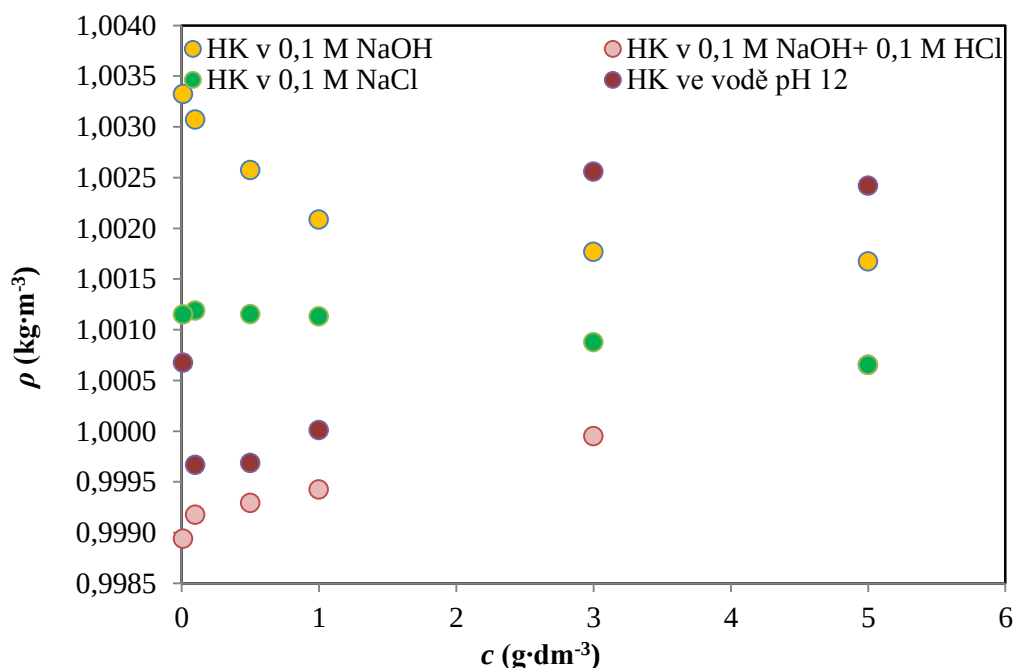
Metoda přímé konduktometrie je výhodná v tom, že zahrnuje vliv všech přítomných iontů v roztoku, na rozdíl od potenciometrické stanovení pH, které zaznamenává přítomnost pouze iontů H^+ (OH^-). Výsledky měrné vodivosti látky poté záleží na druhu jednotlivých iontů, jejich pohyblivosti a na tom v jakém jsou koncentračním poměru. U koncentrační řady HK v 0,1 M NaOH docházelo k poklesu vodivosti se zvyšující se koncentrací. Děje se tomu tak, jelikož v alkalickém prostředí převažuje vliv OH^- iontů a ty mají nižší pohyblivost než ionty Na^+ . U vzorku s koncentrací 3 g/l došlo pravděpodobně k chybě měření, neboť hodnota neodpovídá trendu. U vzorků HK v NaOH + HCl byly hodnoty poměrně konstantní a nepatrně vzrůstaly se vzrůstající se koncentrací. Nejvyšší hodnoty měrné vodivosti byly naměřeny u koncentrační řady HK v NaCl, kde u nižších koncentrací se hodnoty zdály konstantní, nicméně u vyšších koncentrací následoval poměrně prudší pokles.



Obr. 15 Závislost měrné vodivosti na koncentraci HK pro všechny koncentrační řady

5.1.3 Měření hustoty

V případě koncentrační řady HK v 0,1 M NaOH nastával exponenciální pokles se zvyšující se koncentrací. Výsledky hustot v koncentračním rozmezí 5 – 1 g/l byly poměrně konstantní. Přesně naopak tomu však bylo u koncentrační řady HK v 0,1 M NaOH + 0,1 M HCl, kde se hustota zvyšovala s narůstající koncentrací. Řada HK ve vodě pH upravené na 12 vykazovala značné výkyvy oproti ostatním řadám, což je patrné i z výsledků měření pH a důvodem je pravděpodobně úprava pH pomocí NaOH (množství přídavku). U koncentrace 0,1 g/l došlo k prudšímu poklesu hustoty HK oproti nejnižší koncentraci, poté byly hodnoty poměrně konstantní a od koncentrace 1 g/l nastal opět prudký nárůst hustoty. U koncentrační řady HK v 0,1 M NaCl se hodnoty hustot prakticky neměnily. Vliv prostředí je zde opravdu značný, v případě alkalických prostředí (HK v 0,1 M NaOH, HK ve vodě pH upravené na 12) vykazuje vyšší hodnoty hustot HK v 0,1 M NaOH. Řetězce HK v alkalickém prostředí se více rozvinou, což vede k vyšším naměřeným hodnotám hustot než u neutrálního prostředí. V neutrálním prostředí byly naměřeny vyšší hodnoty u HK v 0,1 M NaCl. Souhrnně však lze říci, že hustota HK solů připravených různými postupy se příliš neměnila, jelikož byl zaznamenán projev až na třetím desetinném místě hodnot.



Obr. 16 Závislost hustoty na koncentraci HK pro všechny koncentrační řady

5.1.4 UV – VIS spektrometrie

Z naměřených UV – VIS spekter byly odečteny hodnoty absorpance při 465 nm (E_4) a 665 nm (E_6). Poměr A_{465}/A_{665} (označován také jako E_4/E_6) je tzv. humifikační index. Udává poměr mezi ligninovými strukturami odolnými vůči humifikaci a množstvím „mladých“ HK (v prvním stupni humifikace). Obvyklá hodnota humifikačního indexu pro HK je menší než 5,0 a snižuje se s rostoucí molekulovou hmotností a stupněm disperzity. Nízký poměr může znamenat relativně vysoký podíl aromatických částic a naopak vysoký ukazuje na větší obsah alifatických struktur. Výsledky pro vybrané vzorky jsou uvedeny v Tab. 3.

Tab. 3 Průměrné hodnoty humifikačních indexů pro všechny prostředí

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

Hodnoty humifikačního indexu byly u všech vzorků nižší u vysokých koncentrací, což naznačuje větší výskyt aromatických struktur, ale se snižující se koncentrací (většinou od koncentrace 1 g/l) hodnoty prudce narostly. Z toho vyplývá, že se snižující se koncentrací mají částice HK tendenci zjednodušovat svou strukturu.

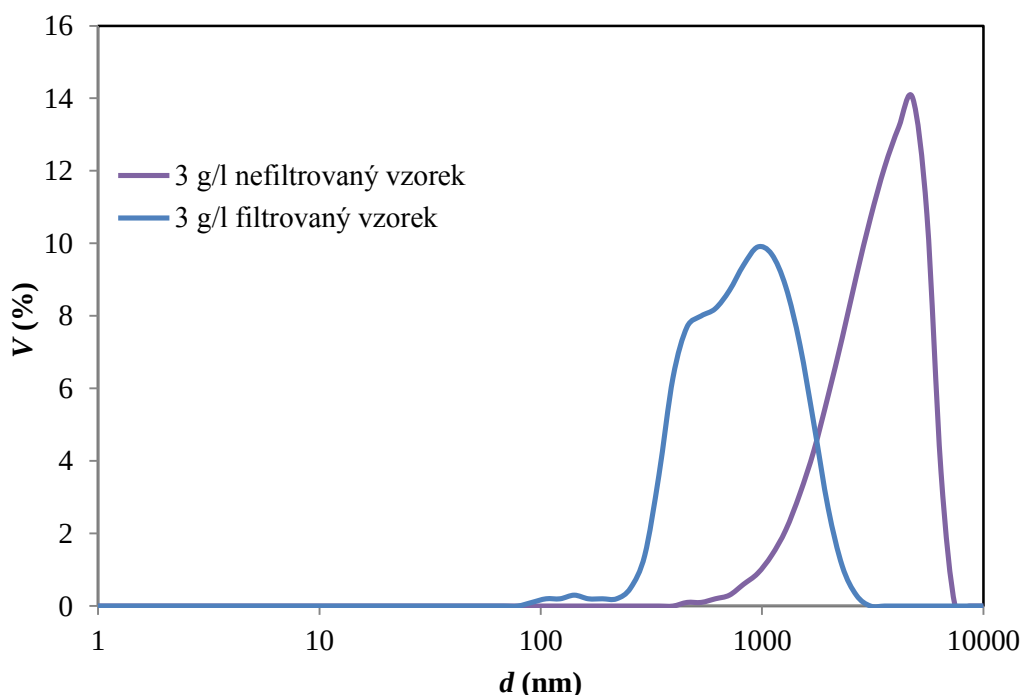
5.1.5 Dynamický rozptyl světla

Pro zjištění distribuce velikosti částic v jednotlivých roztocích byl použit dynamický rozptyl světla měřený na přístroji Zetasizer Nano ZS. Tato neinvazivní nedestruktivní optická metoda detekuje časový vývoj fluktuací rozptýleného světla pohybujícími se částicemi ve vzorku. Metoda dynamického rozptylu světla je poměrně citlivá na jakékoliv změny velikostí

částic a konformací supramolekulárních agregátů ve zkoumaném vzorku. Velikost molekul nebo agregátu molekul HK představuje důležitý parametr, který je třeba brát v potaz při studiu struktury, konformací, ale rovněž i v případě určení možných aplikací HL.

Optimalizace metody

Nejprve byly optimalizovány podmínky měření, a proto bylo nutné správně nastavit optiku a fokusaci na určité specifické místo v kyvetě, s čímž souvisí optická délka dráhy laserového paprsku v kyvetě. V případě vyšších koncentrací je snaha optickou dráhu zkrátit, aby nedocházelo k mnohonásobnému rozptylu světla, což by významně ovlivnilo naměřená data. Na druhou stranu v případě hodně zředěných roztoků, je třeba optickou dráhu prodloužit nastavením měřicí pozice detekce rozptýleného světla na střed kyvety. Porovnáním naměřených korelačních křivek byla stanovena jako optimální měřicí pozice detekce rozptýleného světla pro studované systémy HK v různých prostředích 1 mm od stěny kyvety. Toto nastavení je v souladu s výsledky předchozí práce [96]. Poté byly vzorky měřeny bez filtrace, nicméně výsledky nebyly příliš uspokojivé. Ve vodných roztocích HK nastává stejně jako v ostatních roztocích biopolymerů a biokoloidů proces agregace. Přítomnost velkých agregátů molekul, případně nečistot v měřeném vzorku významně ovlivňuje měření dynamického rozptylu světla. Měření nefiltrovaných huminových solů poukázalo na přítomnost velkých agregátů resp. nečistot ve vzorcích. Z těchto důvodů byly vzorky filtrovány přes 5 μm stříkačkový filtr (membrána – nylon). Filtrací byly částečně eliminovány velké částice, které způsobují snížení rozlišení v oblasti menších částic.



Obr. 17 Porovnání objemové distribuce velikosti částic nefiltrovaných a filtrovaných vzorků HK v 0,1 M NaOH + 0,1 M HCl pro koncentraci 3 g/l

Tuto teorii nám potvrdily i výsledky měření. Jak lze vidět v grafu, hodnoty objemových distribucí částic před a po filtraci vzorku se ve značné míře odlišují. Je zřejmé, že filtrace má

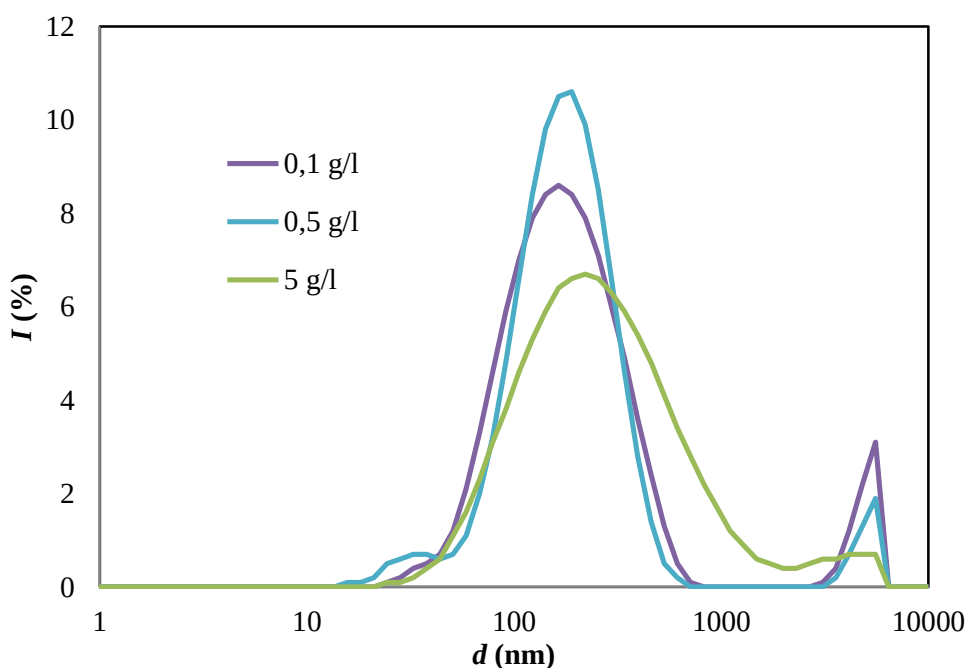
opravdu velký vliv na uspořádání částic ve vzorku a po přefiltrování velkých částic již nedochází k zastínění malých částic, i když jsou hodnoty velikosti částic ještě pořád vysoké, což může být důsledkem agregace menších částic do větších celků.

Porovnání intenzitní distribuce s objemovou

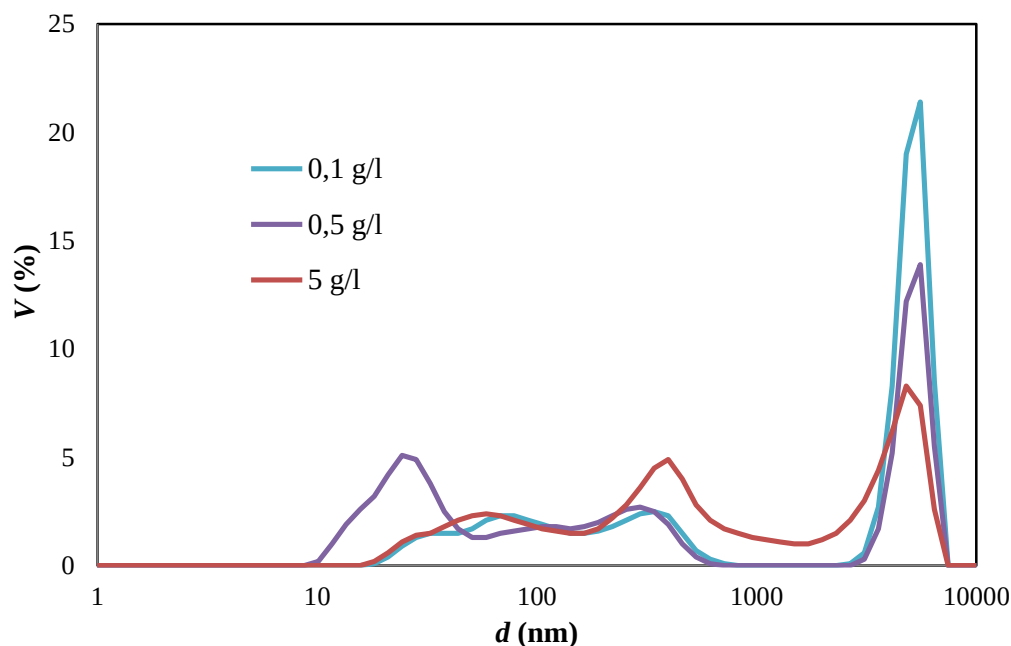
V případě intenzitní distribuce částic jsou velké částice často nadhodnoceny a může se stát, že frakce malých částic se úplně ztratí ve velké intenzitě záření rozptýleného na větších částicích, z těchto důvodů lepší vypovídací hodnotu o distribuci hmoty ve vzorku představuje objemová distribuce velikosti částic. K přepočtu intenzitní distribuce na objemovou je zapotřebí znalost indexu lomu částic ve vzorku, který se zjišťuje metodou spektrální elipsometrie (přístroj Horiba JobinYvon) pro vlnovou délku 632,8 nm, což je vlnová délka laseru v přístroji Zetasizer. Porovnáním těchto dvou distribucí lze zjistit, které částice v distribuci zaujímají větší část hmoty vzorku, případně jestli jsou částice ve vzorku zagregované apod. Zjištěné hodnoty indexu lomu pro všechny prostředí jsou uvedeny v **Tab. 4**.

Tab. 4 Indexy lomu částic pro všechny prostředí

HK ve vodě pH = 12	HK v 0,1 M NaOH	HK v 0,1 M NaOH + 0,1 M HCl	HK v 0,1 M NaCl
1,528	1,439	1,550	1,570



Obr. 18 Závislost intenzity rozptýleného světla částicemi jednotlivých velikostí, HK ve vodě pH = 12

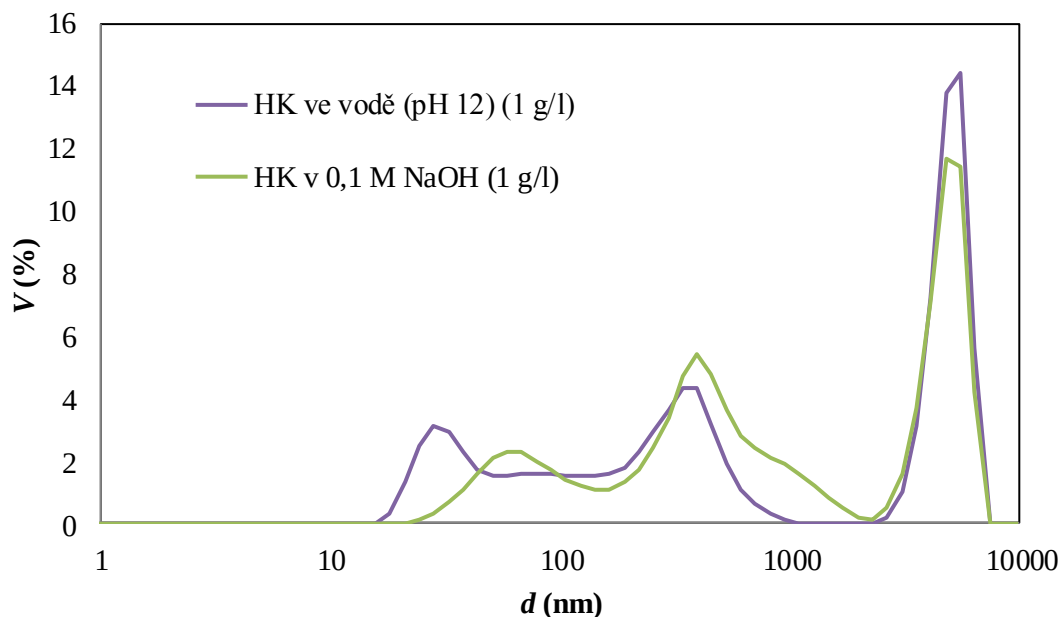


Obr. 19 Objemová distribuce velikosti částic, HK ve vodě pH = 12

Obr. 18 a 19 představují příklady získaných intenzitních a objemových distribucí velikosti částic pro koncentrační řadu HK ve vodě s pH upraveným na 12. Po porovnání objemové distribuce s distribucí intenzity rozptýleného světla bylo zjištěno, že dle distribuce intenzity rozptýleného světla rozptylují nejvíce částice okolo 200 – 300 nm. Tomuto rozmezí velikostí částic patrně odpovídají samotné neagregované částice HK. Z grafu objemové distribuce vyplývá, že částice o velikostech několik mikronů jsou rovněž přítomné, nicméně je jich poměrně málo, jelikož nedošlo k velkému projevu u distribuce intenzity rozptýleného světla. Je tedy patrné, že u použitých HK dochází v daném prostředí k částečné agregaci, což dokazuje přítomnosti výše zmíněných částic o střední velikosti několik mikronů. Podobné výsledky byly zjištěny i u HK v NaOH. V případě koncentračních řad HK v NaOH + HCl a HK v NaCl, však distribuce poukazuje na jiné uspořádání sekundární struktury a také na to, že částice agregovaly jiným způsobem než v předešlých vzorcích.

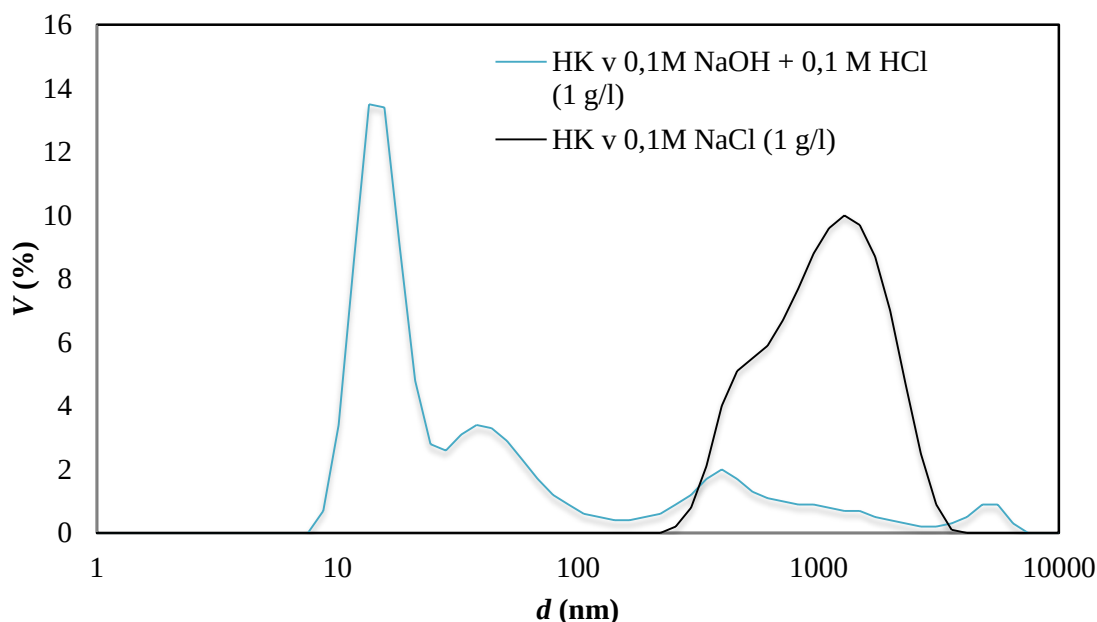
Vliv prostředí

Chemické složení HK stejně jako prostředí silně ovlivňují jejich molekulární organizaci ve vodných roztocích.



Obr. 20 Objemová distribuce; Bazické prostředí – různé přípravy 0,1 M NaOH, HK ve vodě pH 12

Dle grafu lze konstatovat, že ač jsou obě prostředí alkalická, projevil se zde způsob přípravy prostředí, ikdyž nejsou rozdíly až tak velké. V případě HK v 0,1 M NaOH jsou zastoupeny jak frakce o menších velikostech částic, tak i částic o velikostech několik mikronů. HK ve vodě s pH upraveným na hodnotu 12 ukazují opět na přítomnost velkého množství částic o několika mikronů, nicméně po porovnání s intenzitní distribucí částic lze opět vydedukovat, že v roztoku musely být agregáty, což mohlo být v tomto ovlivněno úpravou pH na hodnotu 12 5 M NaOH. Alkalické prostředí HK jsou v zásadě tvořeny frakcí relativně malých molekul HK se střední velikostí částic do 100 nm, dále se v distribucích vyskytují částice okolo 400 nm. Těmto částicím patrně odpovídají supramolekulární agregáty HK, které jsou stabilizovány nevazebnými interakcemi. Toto zjištění je v souladu s novými teoriemi struktury HK (supramolekulární teorie viz [27, 46, 47, 48, 49, 50]). Síla stabilizace supramolekulární struktury HK je silně závislá na hodnotě pH prostředí. Tento fakt byl potvrzen porovnáním distribucí na **Obr. 20** (HK v alkalických prostředích) a objemovými distribucemi HK v neutrálních prostředích (směs NaOH + HCl resp. v NaCl), které jsou zobrazené na **Obr. 21**. Tyto distribuce jasně poukazují na odlišné chování, změnu uspořádání a patrně i stabilizace HK ve vodných roztocích při změně pH.



Obr. 21 Objemová distribuce částic; Neutrální prostředí - různé přípravy 0,1 M NaCl, 0,1 M NaOH + 0,1 M HCl

Významnější difference v distribucích velikosti částic oproti distribucím naměřeným pro HK v alkalických prostředích (**Obr. 20**) vykazovalo chování HK v neutrálních prostředích. U řady HK 0,1 M NaOH + 0,1 M HCl objemové distribuce v **Obr. 21** poukazují na zvýraznění píku malých částic do 100 nm. Poměrně dominantní je pík okolo 20 nm. S klesajícím pH tedy patrně dochází k destabilizaci supramolekulární struktury a k uvolnění samostatných nízkomolekulárních molekul HK. Supramolekulární agregáty nevymizí úplně, pík okolo 400 – 500 nm se v distribuci vyskytuje rovněž. V distribuci však pro tuto koncentrační řadu dochází prakticky k úplnému vymizení píku agregátů větších než 1 μm . Naopak u řady HK v 0,1 M NaOH patrně dochází k odstínění záporného náboje funkčních skupin HK nízkomolekulárními ionty a k následné agregaci vzorku.

5.1.6 Elektroforetický rozptyl světla

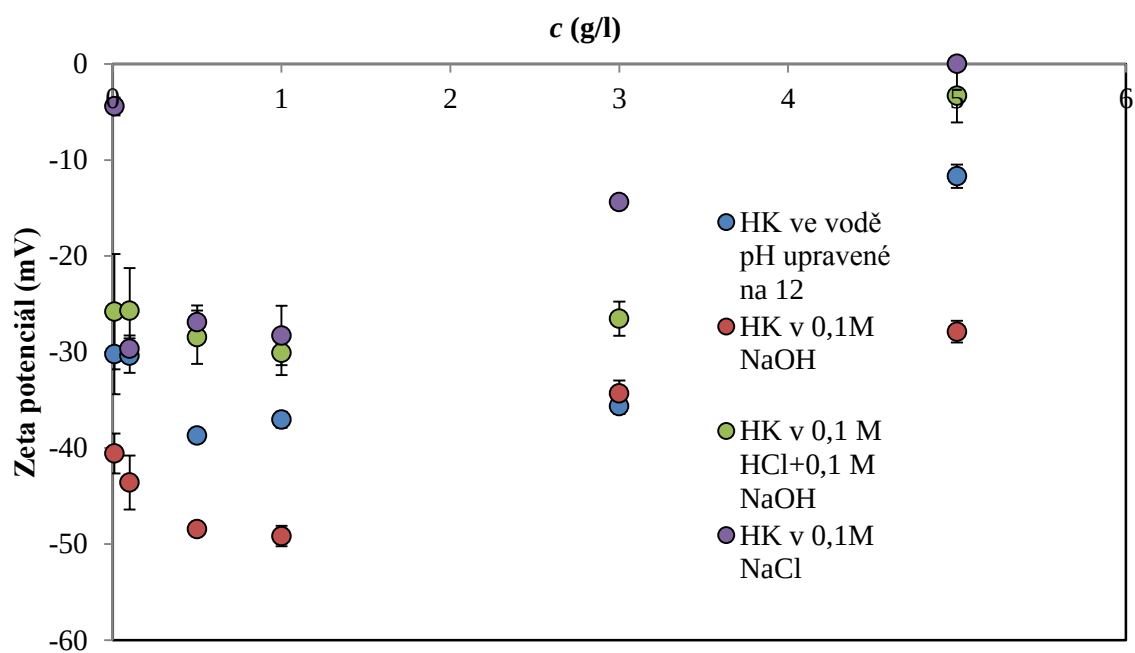
Další metodou použitou ke studiu agregace HK ve vodných roztocích byl elektroforetický rozptyl světla měřený rovněž na přístroji Zetasizer Nano ZS. Získaný parametr – zeta potenciál – je ukazatel stability daného systému. Pokud je jeho hodnota v rozmezí – 30 až + 30 mV je daný vzorek nestabilní vůči agregaci molekul.

Tab. 5 Naměřené hodnoty zeta potenciálů jednotlivých koncentračních řad HK

c (g/l)	HK v 0,1 M NaOH + 0,1 M HCl	HK v 0,1 M NaCl	HK v 0,1 M NaOH	HK ve vodě pH = 12
5	-3,32	-	-27,88	-11,70
3	-26,52	-14,40	-34,32	-35,66
1	-30,10	-28,28	-49,18	-37,06
0,5	-28,46	-26,90	-48,46	-38,70
0,1	-25,70	-29,66	-43,60	-30,38
0,01	-25,80	-4,42	-40,58	-30,23

Z **Tab. 5** vyplývá, že u koncentrační řady HK v 0,1 M NaOH byly hodnoty poměrně vysoké a jeví se jako stabilní. Huminové kyseliny ve vodě (pH = 12) vykazovaly větší stabilitu u více koncentrovaných roztoků až na roztok 5 g/l, kde laser nedokázal vzorek prosvítit a hodnota tak byla zatížena velkou experimentální chybou. V případě koncentračních řad HK v NaOH + HCl a HK v NaCl hodnoty zeta potenciálu odpovídaly nestabilnímu systému. Souhrnně lze říci, že u vzorků s koncentrací 5 g/l byl problém zeta potenciál naměřit, jelikož tato vysoká koncentrace vzorků a tím způsobené jejich tmavé zabarvení neumožňovalo prosvítit roztok zdrojovým laserem.

Obecně jsou hodnoty zeta potenciálu závislé na přítomnosti volných nízkomolekulárních iontů. Ty mohou odstínit náboj na molekulách nebo agregátech molekul. Dochází tak ke snížení odpuzování jednotlivých souhlasně nabitých molekul. Absolutní hodnoty naměřených zeta potenciálů pak klesají směrem k nule a vzorky se tedy destabilizují. Obdobná tendence nastala v případě měření zeta potenciálu u vzorků ve směsi NaOH + HCl resp. v NaCl. Tyto vzorky měly vyšší vodivost a obsahovaly tedy i vyšší množství nízkomolekulárních iontů (Na^+ respektive Cl^-). Naměřené absolutní hodnoty zeta potenciálů byly nižší v porovnání se zbylými dvěma systémy (HK v NaOH a HK ve vodě). Destabilizace těchto vzorků byla potvrzena zejména u koncentrační řady HK v NaCl měřením distribucí velikostí částic metodou dynamického rozptylu světla. Z těchto distribucí vyplývá, že vzorky byly zcela zagregovány, obsahovaly totiž pouze částice o střední velikosti okolo 2 μm .



Obr. 22 Závislost zeta potenciálu na koncentraci HK pro všechny koncentrační řady

6 ZÁVĚR

Souborem několika analytických metod byl proveden základní výzkum sekundární struktury a konformace huminových kyselin ve vodných roztocích v závislosti na jejich koncentraci, způsobu přípravy a podmínkách přípravy. Výsledky ukázaly, že příprava huminových kyselin je důležitým aspektem ovlivňujícím jejich chování a konformační uspořádání ve vodných roztocích.

Výsledky potenciometrického měření pH vykazují se zvyšující se koncentrací přibližně konstantní hodnoty u všech prostředí, avšak u koncentrační řady HK v neutrálním prostředí (u obou způsobů příprav) docházelo k velmi mírnému exponenciálnímu poklesu.

Metoda přímé konduktometrie poskytuje výsledky závislé na druhu jednotlivých iontů, jejich pohyblivosti a na tom, v jakém jsou koncentračním poměru. U vzorků HK v alkalickém prostředí docházelo k poklesu vodivosti, jelikož v alkalickém prostředí převažuje vliv OH^- iontů a ty mají nižší pohyblivost než ionty Na^+ . Nejvyšší hodnoty měrné vodivosti byly naměřeny u koncentrační řady HK v NaCl, kde u nižších koncentrací se hodnoty zdály konstantní, nicméně u vyšších koncentrací následoval poměrně prudší pokles.

Měření hustoty HK prokázalo, že vliv prostředí na konformaci HK v roztoku je opravdu značný, v případě alkalických prostředí (HK v 0,1 M NaOH, HK ve vodě pH upravené na 12) vykazuje vyšší hodnoty hustot HK v 0,1 M NaOH. Řetězce HK v alkalickém prostředí se více rozvinou, což vede k vyšším hodnotám než u neutrálního prostředí. V neutrálním prostředí byly naměřeny vyšší hodnoty u HK v 0,1 M NaCl. Souhrnně však lze říci, že se hustota HK v odlišných prostředích, příliš neměnila, jelikož byl zaznamenán projev až na třetím desetinném místě hodnot.

Z naměřených UV – VIS spekter byly odečteny hodnoty absorbance při 465 nm (E_4) a 665 nm (E_6). Následně byl vypočítán, což je poměr A_{465}/A_{665} , označován také jako tzv. humifikační index. Hodnoty humifikačního indexu byly u všech vzorků nižší u vysokých koncentrací, což naznačuje větší výskyt aromatických struktur, ale se snižující se koncentrací (většinou od koncentrace 1 g/l) hodnoty prudce narostly. Z toho vyplývá, že se snižující se koncentrací mají částice HK tendenci zjednodušovat svou strukturu.

Metoda dynamického rozptylu světla je poměrně citlivá na jakékoliv změny velikostí částic a konformací supramolekulárních agregátů ve zkoumaném vzorku. Velikost molekul nebo agregátu molekul HK představuje důležitý parametr, který je třeba brát v potaz při studiu struktury, konformací, ale rovněž i v případě určení možných aplikací HL. Nejprve bylo potřeba optimalizovat podmínky měření, jelikož měření nefiltrovaných huminových solí poukázalo na přítomnost velkých agregátů resp. nečistot ve vzorcích. Z těchto důvodů byly vzorky filtrovány přes 5 μm stříkačkový filtr (membrána – nylon). Filtrací byly částečně eliminovány velké částice, které způsobují snížení rozlišení v oblasti menších částic. Dále byl kladen zřetel na porovnání intenzitní distribuce částic s objemovou. Z výsledků je patrné, že u použitých HK dochází v daném prostředí k částečné agregaci, což dokazuje přítomnosti výše zmíněných částic o střední velikosti několik mikronů. Podobné výsledky byly zjištěny i u HK v NaOH. V případě koncentračních řad HK v NaOH + HCl a HK v NaCl,

však distribuce poukazuje na jiné uspořádání sekundární struktury a také na to, že částice agregovaly jiným způsobem než v předešlých vzorcích. Chemické složení HK stejně jako prostředí silně ovlivňují jejich molekulární organizaci ve vodných roztocích, proto byl tento poznatek prozkoumán. Alkalické prostředí HK jsou v zásadě tvořeny frakcí relativně malých molekul HK se střední velikostí částic do 100 nm, dále se v distribucích vyskytují částice okolo 400 nm. Těmito částicím patrně odpovídají supramolekulární agregáty HK, které jsou stabilizovány nevazebnými interakcemi. Toto zjištění je v souladu s novými supramolekulárními teoriemi struktury HK. S klesajícím pH patrně dochází k destabilizaci supramolekulární struktury a k uvolnění samostatných nízkomolekulárních molekul HK.

Další metodou použitou ke studiu agregace HK ve vodných roztocích byl elektroforetický rozptyl světla. Obecně jsou hodnoty zeta potenciálu závislé na přítomnosti volných nízkomolekulárních iontů. Ty mohou odstínit náboj na molekulách nebo agregátech molekul, což nastalo v případě měření zeta potenciálu u vzorků ve směsi NaOH + HCl resp. v NaCl. Tyto vzorky měly vyšší vodivost a obsahovaly tedy i vyšší množství nízkomolekulárních iontů (Na^+ respektive Cl^-). Naměřené absolutní hodnoty zeta potenciálů byly nižší v porovnání se zbylými dvěma systémy (HK v NaOH a HK ve vodě).

V souhrnu lze říct, že koncentrační řady HK ve vodě $\text{pH} = 12$ a HK v NaOH a stejně tak i HK v NaOH + HCl s HK v NaCl vykazují podobné vlastnosti. S odlišností koncentračních poměrů v jednotlivých roztocích se mění i strukturní uspořádání částic. Nicméně je nutné další prošetření této problematiky.

7 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- [1] *Nová exota: Huminové kyseliny v chove exotických vtakov* [online]. 2011[cit. 2013-12-22]. ISBN 1213-6549. Dostupné z: www.novaexota.eu
- [2] PITTER, P. *Hydrochemie*, 3. vydání. VŠCHT v Praze, 1999, s. 327–333.
- [3] SUSIC, Michael. More than two centuries of humic acid research – why so long?. *Humic Acid* [online]. 2008 [cit. 2013-12-29]. Dostupné z: <http://humicacid.wordpress.com/a-history-of-humic-acid-research/>
- [4] GAFFNEY, J. S., MARLEY N. A. a CLARK. S. B. Humic and Fulvic Acids and Organic Colloidal Materials in the Environment. [online]. s. 2 [cit. 2013-05-19]. DOI: 10.1021/bk-1996-0651.ch001. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/bk-1996-0651.ch001>
- [5] STEVENSON, F. J. *Humus chemistry: Genesis, composition, reactions*, 2nd edition. New York, 1994, p. 496. ISBN 0-471-59474-1.
- [6] SCHNITZER, F.J., MONREAL C.M. Quo vadis soil organic matter research? *Advances in agronomy*. 2011, vol. 113, p. 139–213.
- [7] MUSCOLO, A., SIDARI M. a NARDI S. Humic substance: Relationship between structure and activity. Deeper information suggests univocal findings. *Journal of Geochemical Exploration*. 2013, vol. 129, s. 57-63. DOI: 10.1016/j.gexplo.2012.10.012. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0375674212002129>
- [8] GAJDOŠOVÁ D., POKORNÁ L., LÁSKA S., PROŠEK P., HAVEL J.: Are there humic acids in Antarctica? In *Ghabbour E. A. and Davies G. (eds): Humic Substances. Structures, Models and Functions*. RSC, Cambridge 2001, pp. 121.131.
- [9] GAJDOŠOVÁ D., NOVOTNÁ K., PROŠEK P., HAVEL, J.: Separation and characterization of humic acids from Antarctica by capillary electrophoresis and matrix-assisted laser desorption ionization time of-flight mass spectrometry inclusion complexes of humic acids with cyclodextrins. *J. Chromatogr. A*. 1014:117.127, 2003.
- [10] PACHECO M.L. a HAVEL J.: Capillary zone electrophoresis of humic acids from American continent. *Electrophoresis*, 23: 268.277, 2002.
- [11] PENA-MÉNDEZ, E., M., HAVEL, J., PATOČKA, J.: Humic substances – Compounds of still unknown structure: Application in agriculture, industry, environment and biomedicine. *Journal of Applied Biomedicine*, číslo 3, 2005, s. 13 – 24.
- [12] PIVOKONSKÝ, M., PIVOKONSKÁ, L., BUBÁKOVÁ, P. a JANDA V. Úprava vody s obsahem huminových látek. *Chemické listy* [online]. 2010, č. 104 [cit. 2013-12-22]. Dostupné z: http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2010_11_1015-1022.pdf
- [13] ŠKARPA, Petr. Význam organické hmoty v půdě. *Výroba a využití organických hnojiv* [online]. 2013 [cit. 2013-12-22]. Dostupné z: http://web2.mendelu.cz/af_291_projekty2/vseo/stranka.php?kod=464
- [14] SCHNITZER, M, KHAN, S., U.: *Humic substances in the environment*. Marcel Dekker, INC. New York. 1972.
- [15] SOIL HUMIC SUBSTANCES. *The formation of humic substances*. [online]. [cit. 2012-04-16]. Dostupné z: <http://karnet.up.wroc.pl/~weber/powstaw2.htm>.

- [16] STEINBERG, Ch., E. *Ecology of humic substances in freshwaters: determinants from geochemistry to ecological niches*. Berlin: Springer, 2003, 440 s. ISBN 35-404-3922-6.
- [17] VESELÁ, L., KUBAL, M., KOZLER, J., INNEMANOVÁ, P.: Struktura a vlastnosti přírodních huminových látek typu oxihumolitu. *Chemické listy* 99, 2005, s. 711–717.
- [18] ŠKARPA, Petr. Význam organické hmoty v půdě. *Výroba a využití organických hnojiv* [online]. 2013 [cit. 2013-12-22]. Dostupné z: http://web2.mendelu.cz/af_291_projekty2/vseo/stranka.php?kod=464
- [19] HUBÁČEK, J. et al. *Chemie uhlí*, Praha: SNTL, 1962.
- [20] ŽÁČEK, L. *Hydrochemie*. Brno: VUTIUM, 1998, s. 51. ISBN 80-214.1167-8.
- [21] SKOKANOVÁ, Marianna; DERCOVÁ, Katarína. Humínové kyseliny. Pôvod a štruktúra. *Chemické listy*. 2008, 102, 4, s. 262-268. ISSN 1213-7103.
- [22] CHRISTL, I., KRETZSCHMAR, R. Relating Ion Binding by Fulvic and Humic Acids to Chemical Composition and Molecular Size. 1. Proton Binding. *Environmental Science & Technology*, č. 35, 2001, s. 2505 - 2511.
- [23] SAVEL'EVA, A. V., IVANOV, A., A., YUDINA, N., V., LOMOVSKY, O., I. a DUGARZHAY, D. Influence of the conditions of mechanical activation of lignite on the composition and sorption properties of humic acids isolated from it. *Russian Journal of Applied Chemistry* [online]. 2013, vol. 86, issue 4, s. 552-557 [cit. 2014-04-08]. DOI: 10.1134/S1070427213040174. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1134/S1070427213040174>
- [24] VANLOON, G. W., DUFFY, S. J.: *Environmental chemistry : a global perspective*. United States by Oxford University Press Inc., New York, 2000. 492 p. ISBN 0-19-856440 6.
- [25] KALINA, Michal, KLUČÁKOVÁ, Martina a VĚŽNÍKOVÁ, Kateřina. *Dynamic light scattering study of particle size development of humic acids*. Brno University of Technology, 2012.
- [26] TRUBETSKOJA, Oleg A., RICHARD, Claire, GUYOT, Ghislain, VOYARD, Guillaume a TRUBETSKAYA. Analysis of electrophoretic soil humic acids fractions by reversed-phase high performance liquid chromatography with on-line absorbance and fluorescence detection. *Journal of Chromatography A*, 1243 (2012), 62 – 68 Dostupné z: <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2012.04.043>
- [27] PICCOLO, SIMPSON, A. J.; KINGERY, W. L.; HAYES, M. H. B.; SPRAUL, M.; HUMPFER, E.; DVORTSAK, P.; KERSSEBAUM, R.; GODEJOHANN, M.; HOFMANN, M. Molecular structures and associations of humic substances in the terrestrial environment. *Naturwissenschaften* **2002**, 89, 84-88.)
- [28] TARASEVICH, Yu. I., S. A. DOLENKO, M. Yu. TRIFONOVA a E. Yu. ALEKSEENKO. Association and colloid-chemical properties of humic acids in aqueous solutions. *Colloid Journal* [online]. 2013, vol. 75, issue 2, s. 207-213 [cit. 2014-04-08]. DOI: 10.1134/S1061933X13020166. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1134/S1061933X13020166>
- [29] SCHNITZER, M., and SCHULTEN, H. R. (1992). The analysis of soil organicmatter by pyrolysis-field ionization mass spectrometry. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 56, 1811–1817
- [30] SCHULTEN, H. R., PLAGE, B., and SCHNITZER, M. (1991). A chemical structure for humic substances. *Naturwissenschaften* 78, 311–312.
- [31] SCHULTEN, H. R. a M. SCHNITZER. A state of the art structural concept for humic substances. *Naturwissenschaften*. 1993, vol. 80, issue 1, s. 29-30. DOI: 10.1007/BF01139754.

- [32] TAN K. H.: *Humic Matter in Soil and the Environment: Chemical Composition of Humic Matter*. Marcel Dekker, New York 2003
- [33] ZAVARZINA, A. G., N. G. VANIFATOVA a A. A. STEPANOV. Fractionation of humic acids according to their hydrophobicity, size, and charge-dependent mobility by the salting-out method. *Eurasian Soil Science* [online]. 2008, vol. 41, issue 12, s. 1294-1301 [cit. 2014-04-18]. DOI: 10.1134/S1064229308120065.
- [34] XIONG, Juan. Lead Binding to Soil Fulvic and Humic Acids: NICA-Donnan Modeling and XAFS Spectroscopy. *Environ. Sci. Technol.* 2013, 47, 11634–11642
- [35] L., Dana, Troy C., Yevgeniya, LE a Mark D. Polymer-Mediated Broad Spectrum Antiviral Prophylaxis: Utility in High Risk Environments. *Progress in Molecular and Environmental Bioengineering - From Analysis and Modeling to Technology Applications* [online]. InTech, 2011-08-01 [cit. 2014-04-18]. DOI: 10.5772/20920.
- [36] HAVELCOVÁ, Martina, Jiří MIZERA, Vladimír MACHOVIČ, Oldřich PŘIBYL, Lenka BORECKÁ a Ivana KRAUSOVÁ. Sorbenty na bázi huminových látek a chitosanu. *Chemické listy*. 2011, č. 105, s. 913-917.
- [37] WEBER, J.: *Definition of soil organic matter*, Humintech. [online]. 2002 [citováno: 2008-04-10]. Dostupné z: <<http://www.humintech.com/001/>>.
- [38] SEDLÁČEK, P., SMILEK, J., KLUČÁKOVÁ, M., How the interactions with humic acids affect the mobility of ionic dyes in hydrogels – 2. Non-stationary diffusion experiments, *Reactive and Functional Polymers*, vol. 75, February 2014, s. 41-50, ISSN 1381-5148, <http://dx.doi.org/10.1016/j.reactfunctpolym.2013.12.002>.
- [39] SEDLÁČEK, P., SMILEK, J., KLUČÁKOVÁ, M., How the interactions with humic acids affect the mobility of ionic dyes in hydrogels – 2. Non-stationary diffusion experiments, *Reactive and Functional Polymers*, vol. 75, February 2014, s. 41-50, ISSN 1381-5148, <http://dx.doi.org/10.1016/j.reactfunctpolym.2013.12.002>.
- [40] SWIFT, R., S., Molecular weight, size, shape, and charge characteristics of humic substances: some basic considerations, M.H.B. Hayes, P. MacCarthy, R.L. Malcolm, R.S. Swift (Eds.), *Humic Substances II, In Search of Structure*, Wiley, New York, USA (1989), pp. 449–466
- [41] VISSER, S. A. A physico-chemical study of the properties of humic acids and their changes during humification. *Journal of Soil Science*. 1964, roč. 15, s. 202 – 207.
- [42] ORLOV, D. S.; AMMOSOVA, Ya. M. a GLEBOVA, G. I. Molecular parameters of humic acids. *Geoderma*. 1975, roč. 13, s. 211–219.
- [43] GHOSH, K. a SCHNITZER, M. Macromolecular structure of humic substances. *Journal of Soil Science*. 1980, roč. 129, s. 266–276.
- [44] CAMERON, R. S. et al. Molecular weight and shape of humic acid from sedimentation and diffusion measurements on fractionated extracts. *Journal of Soil Science*. 1972, roč. 23, s. 395–408.
- [45] SWIFT, R. S. Macromolecular properties of soil humic substances: Fact, fiction, and opinion. *Soil Sci.* 1999, 164, 790- 802.
- [46] PICCOLO, A. The supramolecular structure of humic substances. *Soil Sci.* 2001, 166, 810-832.

- [47] BURDON, J. Are the traditional concepts of the structures of humic substances realistic? *Soil Sci.* 2001, 166, 752-769.
- [48] PICCOLO, A., S. NARDI a G. CONCHERI. Micelle-like conformation of humic substances as revealed by size exclusion chromatography. *Chemosphere*. 1996, roč. 33, č. 4, s. 595–602. Piccolo a spol. 1996
- [49] CONTE, P. a PICCOLO, A. Conformational Arrangement of Dissolved Humic Substances. Influence of Solution Composition on Association of Humic Molecules. *Environmental Science & Technology*, 1999, roč. 33, č. 10, s. 1682–1690
- [50] WERSHAW, R., L., Molecular aggregation of humic substances, *Soil Sci.*, 1999, č. 164, s. 803 – 813
- [51] BAIGORRI, Roberto, Marta FUENTES, Gustavo GONZÁLEZ-GAITANO a Jose Ma GARCÍA-MINA. Analysis of molecular aggregation in humic substances in solution. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 2007, vol. 302, 1-3, s. 301-306. DOI: 10.1016/j.colsurfa.2007.02.048. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0927775707001628>
- [52] von WANDRUSZKA, R.; ENGBRETSON, R. R.; YATES, L. M. Humic acid pseudomicelles in dilute aqueous solution: Fluorescence and surface tension measurements. In *Understanding Humic Substances: Advanced Methods, Properties and Applications*; Ghabbour, E. A., Davies, G., Eds.; Royal Society of Chemistry: Cambridge, U. K., 1999; pp 79-85
- [53] GUETZLOFF, T. F.; RICE, J. A. *Scie. Total Environ.* 1994, č. 152, s. 31–35
- [54] CHILOM, Gabriela, Angela S. BRUNS a James A. RICE. Aggregation of humic acid in solution: Contributions of different fractions. *Organic Geochemistry*. 2009, vol. 40, issue 4, s. 455-460. DOI: 10.1016/j.orggeochem.2009.01.010. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/BF01139754>
- [55] CHILOM, Gabriela a James A. RICE. Structural Organization of Humic Acid in the Solid State. *Langmuir*. 2009-08-18, vol. 25, issue 16, s. 9012-9015. DOI: 10.1021/la900750z. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/la900750z>
- [56] PASQUALI, Matteo. Gelation. *Nature Materials*. 2010, vol. 9, issue 5, s. 381-382. DOI: 10.1038/nmat2761. Dostupné z: <http://www.nature.com/doi/abs/10.1038/nmat2761>
- [57] ENGBRETSON, Reginald R., Tammy AMOS a Ray VON WANDRUSZKA. Quantitative Approach to Humic Acid Associations. *Environmental Science*. 1996, vol. 30, issue 3, s. 990-997. DOI: 10.1021/es950478g. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/es950478g>
- [58] LIPPOLD, Holger, GOTTSCHALCH Uta, KUPSCH Hermann, Joint influence of surfactants and humic matter on PAH solubility. Are mixed micelles formed?. *Chemosphere*. 2008, vol. 70, issue 11, s. 1979-1986. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2007.09.040. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0045653507012106>
- [59] MUSCOLO, Adele; SIDARI, M.; NARDI, Serenella, 2013: Humic substance; relationship between structure and activity; deeper information suggests univocal findings. *Journal of Geochemical Exploration* 129
- [60] KLAVINS, Maris a Oskars PURMALIS. Humic substances as surfactants. *Environmental Chemistry Letters*. 2010, vol. 8, issue 4, s. 349-354. DOI: 10.1007/s10311-009-0232-z. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s10311-009-0232-z>

- [61] CHURÁČEK, J. a kolektiv. *Analytická separace látek*. Praha: SNTL – Nakladatelství technické literatury, 1990, s. 276-277. ISBN 80-03-00569-8
- [62] KLOUDA, P. *Moderní analytické metody*. Ostrava: Pavel Klouda, 2003. 132 s. ISBN 80-86369-07-2, s. 31–122.
- [63] SEYWALD, Sandra. *Physical Chemistry of Polymers: Size Exclusion Chromatography (SEC)*[online]. 2010 Dostupné z: <http://www2.mpip-mainz.mpg.de/groups/landfester/facilities/polyana/GPC>
- [64] ZHOU, Q. Consideration in the use of High-Pressure Size Exclusion Chromatography (HPSEC) for determining molecular weights of aquatic humic substances. *Elsevier Science*. 2000, č. 34, 3505 - 3514.
- [65] PICCOLO, A. The Supramolecular structure of Humic Substances: A Novel Understanding of Humus Chemistry and Implications in Soil Science. *Advances in Agronomy*, 2002, roč. 75, s. 57–134.
- [66] VARGA, Bálint, Gyula KISS, István GALAMBOS, András GELENCSE, József HLAVAY a Zoltán KRIVÁCSY. Secondary Structure of Humic Acids. Can Micelle-like Conformation Be Proved by Aqueous Size Exclusion Chromatography?. *Environmental Science* [online]. 2000, vol. 34, issue 15, s. 3303-3306 [cit. 2014-04-19]. DOI: 10.1021/es991286e. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/es991286e>
- [67] NEBBIOSO, A. a PICCOLO, A. Advances in humeomics: Enhanced structural identification of humic molecules after size fractionation of a soil humic acid. *Analytica Chimica Acta*. 2012, roč. 720, s. 77–90.
- [68] KUČERÍK, Jiří, Daniela ŠMEJKALOVÁ, Hana ČECHLOVSKÁ a Miloslav PEKAŘ. New insights into aggregation and conformational behaviour of humic substances: Application of high resolution ultrasonic spectroscopy. *Organic Geochemistry*. 2007, vol. 38, issue 12, s. 2098-2110. DOI: 10.1016/j.orggeochem.2007.08.001. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S014663800700188X>
- [69] BUCKIN, Vitaly, Breda O'DRISCOLL a Cormac SMYTH. Ultrasonic spectroscopy for material analysis: Recent advances. *Spectroscopy Europe*. 2003, č. 15.
- [70] KUČERÍK, J., H. ČECHLOVSKÁ, P. BURSÁKOVÁ a M. PEKAŘ. Lignite humic acids aggregates studied by high resolution ultrasonic spectroscopy. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*. 2009, vol. 96, issue 2, s. 637-643. DOI: 10.1007/s10973-008-9391-6. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s10973-008-9391-6>
- [71] KLUČÁKOVÁ, M.; KARGEROVÁ, A. a NOVÁČKOVÁ, K. Conformational Changes In Aqueous Solutions of Humic Acids. *Chemistry & Life*. 2012.
- [72] SUTTON, Rebecca a Garrison SPOSITO. Molecular Structure in Soil Humic Substances: The New View. *Environmental Science*. 2005, vol. 39, issue 23, s. 9009-9015. DOI: 10.1021/es050778q
- [73] GONZÁLEZ-GAITANO, Gustavo a Josemaría GARCÍA-MINA. The Macromolecular or supramolecular nature of humic substances: A dynamic light scattering study [online]. London: Taylor and Francis, Inc., 2005, s. 35-40 [cit. 2014-04-21]. ISBN 0-203-48760-5.
- [74] Gaëlle M. Roger, Serge Durand-Vidal, Olivier Bernard, Guillaume Mériguet, Scott Altmann, Pierre Turq. Characterization of humic substances and polyacrylic acid: A high precision conductimetry study, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, Volume 356, Issues 1–3, 5 March 2010, Pages 51-57, ISSN 0927-7757, <http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfa.2009.12.029>

- [75] CHEN, Changlun, Xiangke WANG, Hui JIANG a Wenping HU. Direct observation of macromolecular structures of humic acid by AFM and SEM. *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects* č. 302 (2007) s. 121–125
- [76] ANGELICO, Ruggero, Andrea Ceglie, Ji-Zheng HE, Yu-Rong LIU, Giuseppe PALUMBO. Particle size, charge and colloidal stability of humic acids coprecipitated with Ferrihydrite: The New View. *Chemosphere*. 2014, vol. 99, issue 23, s. 239–247. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2013.10.092. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0045653513015750>
- [77] TARASEVICH, Yu. I., S. A. DOLENKO, M. Yu. TRIFONOVA a E. Yu. ALEKSEENKO. Association and colloid-chemical properties of humic acids in aqueous solutions. *Colloid Journal* [online]. 2013, vol. 75, issue 2, s. 207–213 [cit. 2014-04-08]. DOI: 10.1134/S1061933X13020166. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1134/S1061933X13020166>
- [78] DANILENKO, A. N., E. E. BRAUDO, N. E. PAVLOVSKAYA, E. I. YUSHKOVA a I. L. ZHURAVLEVA. A study of dilute aqueous solutions of humic acids by scanning microcalorimetry. *Biophysics*. 2011, vol. 56, issue 1, s. 47–50. DOI: 10.1134/S0006350911010076. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1134/S0006350911010076>
- [79] HODEK, Tomáš. *Kompostuj.cz* [online]. 2014 [cit. 2014-05-11]. Dostupné z: <http://www.kompostuj.cz>
- [80] TERASHIMA, Motoki, Masami FUKUSHIMA a Shunitz TANAKA. Influence of pH on the surface activity of humic acid: micelle-like aggregate formation and interfacial adsorption. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 2004, vol. 247, 1–3, s. 77–83. DOI: 10.1016/j.colsurfa.2004.08.028.
- [81] PRADO, Alexandre G. S., Jonas PERTUSATTI a Alécio R. NUNES. Aspects of protonation and deprotonation of humic acid surface on molecular conformation. *Journal of the Brazilian Chemical Society*. 2011, vol. 22, issue 8, s. 1478–1483. DOI: 10.1590/S0103-50532011000800011. Dostupné z: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext
- [82] JUG, T. a M. FRANKO. Fluorescence quenching as an indicator of the conformational change of humic acids. *Emir. J. Food Agric*. 2013, č. 25, s. 994–1001. DOI: 10.9755/efja.v25i12.16737.
- [83] HUMINTECH. *Server o humusu*. [online]. [cit. 2011-10-10]. Dostupné z: <http://www.humintech.com>.
- [84] *Humber Palmers* [online]. 2010 [cit. 2014-05-11]. Dostupné z: <http://www.humberpalmers.co.uk/the-concept>
- [85] TYL, Pavel, ŘIMNÁČ, Roman ŠPÁNEK, Július ŠTULLER, Zdeňka LINKOVÁ, Josef KOZLER, Barbora ANTOŠOVÁ a Vojtěch VÁŇA. *Tvorba ontologie huminových látek*. Institute of Computer Science Academy of Sciences of the Czech Republic. No. 1098. Technický report. Institute of Computer Science Academy of Sciences of the Czech Republic.
- [86] VALA, M, KŠÍR, R. Návod k obsluze a údržbě lyofilizačních zařízení LZ 9.2, 30.2, 45.2. Kolín: Frigera n.p. Kolín, 1984. 532 stran. SIP 41692/04467
- [87] HLADKÝ, J., L. POSPÍŠILOVÁ a T. LIPTAJ. Spectroscopic characterization of natural humic substances. *Journal of Applied Spectroscopy*. 2013, vol. 80, issue 1, s. 8–14. DOI: 10.1007/s10812-013-9713-8. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s10812-013-9713-8>
- [88] JANČÁŘOVÁ, Irena a Luděk JANČÁŘ. *Analytická chemie*. Vyd. 1. Brno: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita, 2003, 195 s. ISBN 978-80-7157-647-12008.

- [89] KŘÍŽENECKÁ, Sylvie. *Základy analytické chemie*. Univerzita Jana Evangelisty Purkyně Ústí nad Labem, Fakulta životního prostředí, 2007.
- [90] Zdroj: OPEKAR, František. *Základní analytická chemie: pro studenty, pro něž analytická chemie není hlavním studijním oborem*. 1. vyd. Praha: Karolinum, 2003, 201 s. ISBN 80-246-0553-8.
- [91] Anton Paar: Stanovení hustoty a rychlosti zvuku DSA 5000 M. Anton Paar [online]. [cit. 2014-05-11]. Dostupné z: <http://citace.lib.vutbr.cz/dokument/kdVRsuTULVe7QL53>
- [92] SARTOR, Marta. DYNAMIC LIGHT SCATTERING to determine the radius of small beads in Brownian motion in a solution. In: *Fraden Group* [online]. [cit. 2013-05-19]. Dostupné z: <http://216.92.172.113/courses/phys39/light%20scattering/DLS%20LabView%20UCSD.pdf>
- [93] KVÍTEK, Libor a Aleš PANÁČEK. *Základy koloidní chemie*. KATEDRA FYZIKÁLNÍ CHEMIE PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA UNIVERZITA PALACKÉHO, 2007. Dostupné z: <http://fch.upol.cz/skripta/kol/koch.pdf>
- [94] Oddělení strukturní analýzy, katedra fyziky kondenzovaných látek MFF UK: Dynamický rozptyl světla. [Http://www.xray.cz/](http://www.xray.cz/) [online]. 2008 [cit. 2014-05-11]. Dostupné z: <http://www.xray.cz/kfkl-osa/eng/zetasizer/dls.htm>
- [95] *Alfa test* [online]. [cit. 2014-05-11]. Dostupné z: <http://www.alfatest.it/listing.asp?CatID=184>
- [96] KALINA, M.; KLUČÁKOVÁ, M.; VĚŽNÍKOVÁ, K. Utilization of DLS for the study of behavior of humic acids in aqueous solutions. In *Studentská konference Chemie je život - Sborník příspěvků*. Brno: FCH VUT v Brně, 2012. s. 310-315. ISBN: 978-80-214-4425- 6.

8 SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

HL	humínové látky
HK	humínové kyseliny
FK	fulvínové kyseliny
GPC	gelová permeační chromatografie
SEC	vylučovací chromatografie
HPSEC	vylučovací chromatografie za zvýšeného tlaku
LPSEC	vylučovací chromatografie za sníženého tlaku
NMR	nukleární magnetická rezonance
UV – VIS	ultrafialová a viditelná spektrofotometrie
DLS	dynamický rozptyl světla
LDV	laserová Dopplerova velocimetrie
HRUS	vysoce rozlišovací ultrazvuková spektrometrie
DSC	diferenční skenovací kalorimetrie
AFM	mikroskopie atomárních sil
SEM	rastrovací elektronová mikroskopie
TEM	difrakce rentgenových paprsků
DRS	dielektrická relaxační spektroskopie
ELS	elektroforetický rozptyl světla
DOSY	difúzí řízená spektroskopie
PCS	foton korelační spektroskopie
RPM	počet otáček za minutu
EPR	elektronová paramagnetická rezonance
XRD	rentgenová difrakce
<i>p</i> – DCB	<i>p</i> – dichlorbenzen
β	beta index
<i>d</i>	hydrodynamický průměr
<i>D</i>	difúzní koeficient
k_B	Boltzmannova konstanta
<i>T</i>	absolutní teplota
π	Ludolfovo číslo

η	dynamická viskozita
d_H	hydrodynamický poloměr
ξ	zeta potenciál
A	absorbance
ε	molární absorpční koeficient
l	tloušťka absorbující vrstvy
c	látková koncentrace
A_{465}	absorbance při vlnové délce 465 nm
A_{665}	absorbance při vlnové délce 665 nm
γ	povrchové napětí
λ	vlnová délka
M	molární koncentrace ($mol \cdot dm^{-3}$)