



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE

INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

**STUDIUM SUPRAMOLEKULÁRNÍ STRUKTURY
HUMINOVÝ KYSELIN**

STUDY ON THE SUPRAMOLECULAR STRUCTURE OF HUMIC ACIDS

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

David Širůček

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. Michal Kalina, Ph.D.

BRNO 2017

Zadání bakalářské práce

Číslo práce: FCH-BAK1176/2016
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie
Student: **David Širůček**
Studijní program: Chemie a chemické technologie
Studijní obor: Spotřební chemie
Vedoucí práce: **Ing. Michal Kalina, Ph.D.**
Akademický rok: 2016/17

Název bakalářské práce:

Studium supramolekulární struktury huminový kyselin

Zadání bakalářské práce:

1. Zpracovat literární rešerši na téma studium supramolekulární struktury huminových kyselin a následně vybrat vhodné metody použitelné k těmto účelům z přístrojového vybavení dostupného na FCH VUT v Brně
2. Provézt pilotní měření a optimalizovat experimentální metodiku na vzorku huminového standardu
3. Získané výsledky korelovat s daty naměřenými pro další vzorky huminových kyselin lišících se zdrojovou maticí, ze které byly izolovány
4. Diskutovat rozdíly zejména s přihlédnutím ke zdrojové matici vzorků
5. Zhodnotit experimentální výsledky a závěry

Termín odevzdání bakalářské práce: 19.5.2017

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

David Širůček
student(ka)

Ing. Michal Kalina, Ph.D.
vedoucí práce

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2017

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

ABSTRAKT

Tato bakalářská práce je zaměřena na studium supramolekulární struktury huminových kyselin. Tato problematika byla v rámci BP studována na řadě vzorků HK, které se lišily zdrojovou maticí (lignit, leonardit, půda, rašelina a kompost). K těmto účelům byly využity metody velikostně vylučovací chromatografie, dynamického a elektroforetického rozptylu světla a UV-VIS spektrometrie. Pro lepší pochopení vzniku supramolekulární struktury HK, způsobu její stabilizace a jejího ovlivnění se změnou pH byly jednotlivé vzorky HK studovány ve třech prostředích lišících se hodnotou pH (3,5; 7 a 12).

Výsledky získané na širokém spektru použitých HK jsou v souladu se supramolekulární teorií struktury huminových kyselin ve vodných roztocích, která tyto látky popisuje jako volně vázané supramolekulární asociáty relativně malých molekul, které mají jak polární, tak nepolární části a mohou se seskupovat do složitějších supramolekulárních agregátů v závislosti na podmínkách v roztoku (pH, obsah nízkomolekulárních iontů, atd.).

ABSTRACT

This bachelor thesis is focused on the study of supramolecular structure of humic acids. This issue was studied on a number of HA samples which differed in source matrix (lignite, leonardite, soil, peat and compost). For these purposes, methods of size exclusion chromatography, dynamic and electrophoretic light scattering and UV-VIS spectrometry were used. In order to better understand the formation of the supramolecular structure of HA, the ways of its stabilization and how it was influenced by the change in pH, individual HA samples were studied in three pH-varying mediums (3,5; 7 and 12).

The results obtained on a wide range of used humic acids are in accordance with the supramolecular theory of the structure of humic acids in aqueous solutions which describes them as freely-bound supramolecular associates of relatively small molecules having both polar and nonpolar parts and can be formed into more complex supramolecular aggregates depending on the conditions in the solution (pH, content of low molecular weight ions, etc.).

KLÍČOVÁ SLOVA

huminové kyseliny, supramolekulární struktura, vliv pH, velikost částic, zeta potenciál, molekulová hmotnost, izolace

KEY WORDS

humic acids, supramolecular structure, pH effect, particle size, zeta potential, molecular weight, isolation

ŠIRŮČEK, D. *Studium supramolekulární struktury huminových kyselin*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2017. 51 s. Vedoucí bakalářské práce Ing. Michal Kalina, Ph.D..

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že tato bakalářská práce byla vypracována samostatně, a že všechny použité literární zdroje jsou správně a úplně citovány. Tato práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické Vysokého učení technického v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího bakalářské práce a děkana FCH VUT.

.....
David Širůček

Na tomto místě bych velmi rád poděkoval mému vedoucímu Ing. Michalu Kalinovi, Ph.D., za veškerou pomoc a poskytnutí rad, ať už v laboratoři, nebo při sepisování této práce. Dále patří velké poděkování celé mé rodině, která mě celé ty roky podporovala a poskytovala skvělé zázemí.

Obsah

1	Úvod	7
2	Teoretická část.....	8
2.1	Huminové látky.....	8
2.1.1	Vznik huminových látek.....	8
2.1.2	Dělení huminových látek.....	10
2.1.3	Struktura a vlastnosti	13
2.1.4	Extrakce, frakcionace, purifikace	16
2.1.5	Využití huminových kyselin.....	18
2.2	Metody studia supramolekulární struktury	19
2.2.1	UV-VIS spektrometrie.....	20
2.2.2	Dynamický rozptyl světla.....	21
2.2.3	Elektroforetický rozptyl světla	22
2.2.4	Velikostně vylučovací chromatografie.....	24
3	Současný stav řešené problematiky	28
4	Experimentální část	30
4.1	Použité chemikálie	30
4.2	Použité přístroje	30
4.3	Příprava huminových kyselin	30
4.3.1	Extrakce huminových kyselin	30
4.3.2	Příprava roztoků HK.....	31
4.4	Nastavení přístrojů	31
4.4.1	Elementární a termogravimetrická analýza	31
4.4.2	UV-VIS spektrometrie.....	32
4.4.3	Dynamický rozptyl světla.....	32
4.4.4	Elektroforetický rozptyl světla	32
4.4.5	Velikostně vylučovací chromatografie.....	32
5	Výsledky a diskuze.....	33
5.1	Charakterizace HK a UV-VIS spektrometrie.....	33
5.2	Dynamický rozptyl světla	35
5.3	Elektroforetický rozptyl světla.....	39

5.4	Velikostně vylučovací chromatografie	40
6	Závěr	46
7	Použitá literatura.....	47
8	Seznam zkratk.....	50
9	Seznam symbolů.....	51

1 ÚVOD

Huminové kyseliny jsou přírodní látky, které s dalšími dílčími frakcemi huminových látek (fulvinové kyseliny a huminy) vznikají degradací biologického materiálu. Všechny tyto frakce jsou odlišné ve fyzikálně-chemických vlastnostech, tj. v rozpustnosti, reaktivitě, elementárním složení a také barvě, která je od světle žluté až po černou.

Dnes jsou huminové látky předmětem intenzivního vědeckého výzkumu. Jsou to organické látky se složitou a dodnes ne zcela dobře popsanou strukturou. Základem struktury HK jsou aromatické cykly, na kterých jsou navázány alifatické části a z funkčních skupin hlavně karboxylové a fenolické. Právě znalost struktury je velmi důležitá k pochopení funkcí huminových látek v přírodě a k lepšímu porozumění jejich reaktivity. Jsou to látky rozmanitého původu a vlastností a jejich struktura souvisí také se zdrojovou maticí, ze které byly HK izolovány.

Po mnoho desetiletí byly huminové látky považovány za makromolekulární látky se složitou strukturou a vysokou molekulovou hmotností. Teprve až s rozvojem nových analytických metod bylo možné popsat strukturu huminových látek detailněji. Dnes jsou huminové kyseliny chápány jako volně vázané supramolekulární asociáty, takže si je lze představit jako relativně malé molekuly různého původu, stabilizované slabými nevazebnými interakcemi, které se samovolně organizují do supramolekulárních konformací.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Huminové látky

Huminové látky představují na Zemi největší a nejvýznamnější zásobu organického uhlíku. Vznikají rozkladem a přeměnou zbytků z rostlinné a bakteriální biomasy, čemuž se říká humifikace. Nejdůležitějšími látkami, které se účastní humifikace, jsou lignin, polysacharidy, melanin, lipidy, nukleové kyseliny aj. Jen v půdních uhlíkatých sloučeninách je vázáno přibližně 3,3krát více uhlíku než v atmosféře a 4,5krát více než v živých organismech [1]. Jsou to složité vysokomolekulární polycyklické sloučeniny s relativní molekulovou hmotností v rozmezí několika desítek až stovek tisíců Daltonů. Ve vodných roztocích se vyskytují jako samostatné molekuly, ale mnohem častěji jsou vzájemně spojeny slabými vazebnými interakcemi do supramolekulárních struktur [2]. HL zásadním způsobem ovlivňují život na Zemi – určují kvalitu půd, vod a také složení atmosféry [1].

Tab. 1 – Obsah huminových látek ve vybraných přírodních materiálech [3]

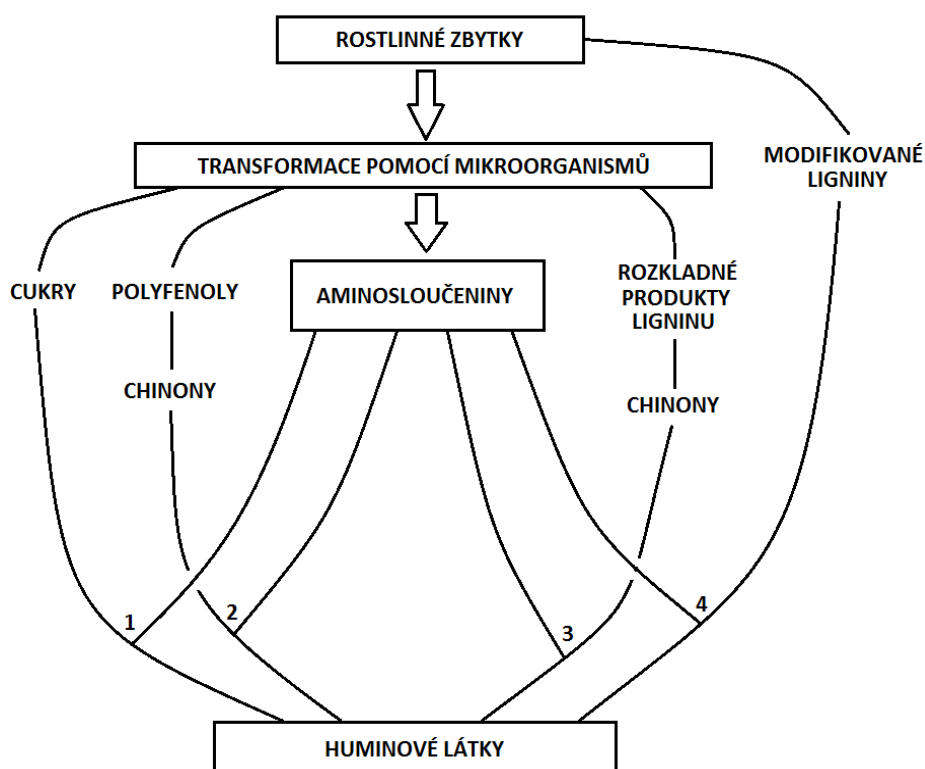
Přírodní zdroj	Obsah huminových kyselin a fulvokyselin [hm. %]
Leonardit/lignit	40–85
Černá rašelina	10–40
Sapropelová rašelina	10–20
Hnědé uhlí	10–30
Hnůj	5–15
Kompost	2–5
Půda	1–5
Černé uhlí	0–1

V Tab. 1 – Obsah huminových látek ve vybraných přírodních materiálech [3] je pro přehlednost uveden obsah huminových kyselin a fulvokyselin ve vybraných přírodních materiálech [3].

2.1.1 Vznik huminových látek

Existuje několik teorií, které popisují jednotlivé předpokládané mechanismy vzniku HL. Lignin-proteinová teorie uvažuje lignin jako hlavní zdroj HL (Obr. 1 – Vznik huminových látek, cesta č. 4). Polyfenolová teorie zahrnuje polyfenoly a chinony, které jsou získány buď z ligninu (Obr. 1 – Vznik huminových látek, cesta č. 3), nebo jsou syntetizovány mikroorganismy (Obr. 1 – Vznik huminových látek, cesta č. 2). Poslední cestou je kondenzace cukry s aminy, které vznikají jako produkty mikrobiálního metabolismu (Obr. 1 – Vznik huminových látek, cesta č. 1) [4]. Je pravděpodobné, že výše uvedené mechanismy vzniku HL existují vedle sebe a mohou se v závislosti na podmínkách, při jakých děje probíhá, různě prolínat [2].

Obecně se procesu vzniku HL říká humifikace a tento proces zahrnuje velké množství následných biochemických reakcí [5].



Obr. 1 – Vznik huminových látek [4]

Lignin-proteinová teorie

Díky této teorii (též degradační teorie) byl lignin dlouhá léta považován za hlavní zdroj huminových látek. Podle této teorie je lignin neúplně rozložen mikroorganismy. Během tohoto procesu lignin ztrácí methoxylové funkční skupiny (OCH_3), nebo dochází k oxidaci alifatických řetězců na karboxylovou skupinu (COOH) [4]. V podstatě jde o rozklad odumřelého rostlinného materiálu, kdy se z ligninu, kutinu, nebo melaninu vytváří vysokomolekulární huminy. Ty podléhají oxidaci a jsou postupně transformovány na huminové kyseliny, fulvokyseliny a dále až na finální produkty oxidace, což jsou nízkomolekulární anorganické molekuly – oxid uhličitý a voda [2].

Kondenzace cukrů s aminy

Tato teorie zahrnuje neenzymatickou kondenzaci redukujícího cukru s aminosloučeninou. Tato aminosloučenina je vedlejším produktem mikrobiálního metabolismu [4].

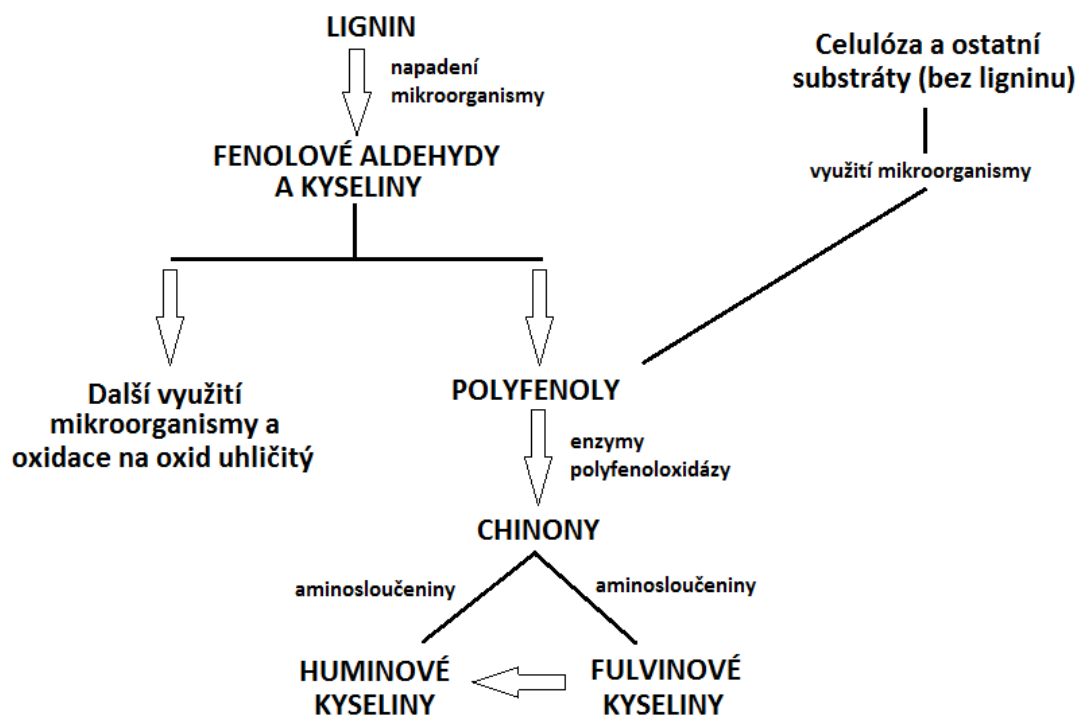
Iničiační reakce zahrnuje kondenzaci aminoskupiny, kterou poskytne aminokyselina s aldehydickou skupinou redukujícího cukru. Postupným přeskupováním a reakcemi dochází k fragmentaci, odštěpení molekuly vody a tvorbě tříuhlíkatých molekul aldehydů a ketonů (např. acetol, glyceraldehyd a dihydroxyaceton). Všechny tyto sloučeniny jsou vysoce reaktivní a v přítomnosti aminosloučeniny mohou snadno polymerizovat na hnědě zbarvený produkt, který je podobný huminovým látkám [4].

Podle této teorie mohou být HL vytvořeny čistě jen chemickými reakcemi bez účasti mikroorganismů, tedy až na tvorbu cukrů z uhlíkatých látek a tvorbu aminokyselin z proteinů. Ačkoli jsou tedy reaktanty reakce vytvořeny pomocí mikroorganismů, kondenzační reakce probíhá pomaleji při běžných půdních teplotách. Souhrnně vzato, tato reakce se vyskytuje

v půdách s nízkým obsahem ligninu a prostředích, kde jsou půdy vystaveny drastickým změnám jako například mrazu, suchu apod. [4].

Polyfenolová teorie

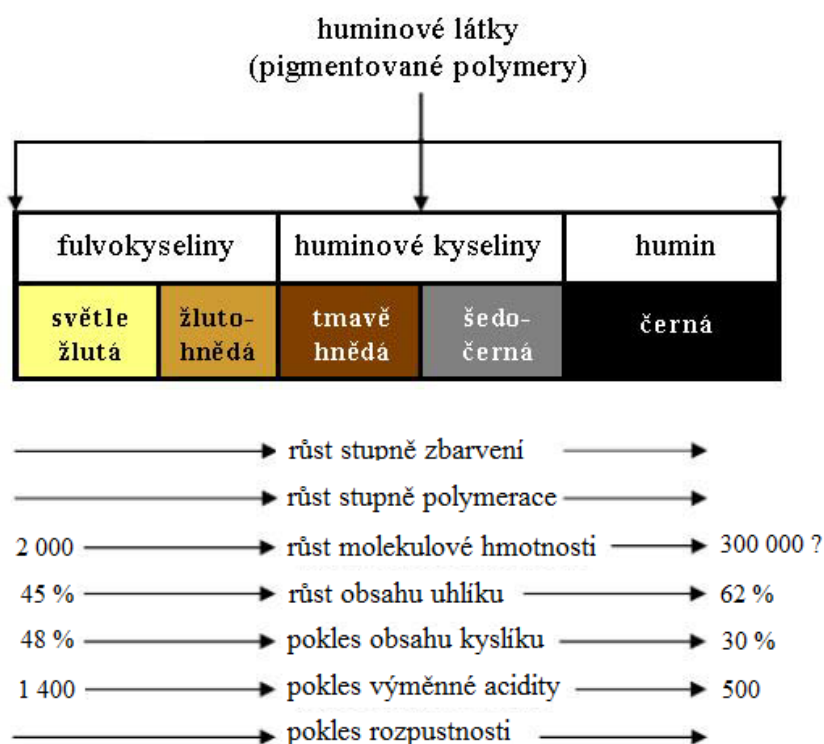
V současnosti je nejvíce akceptována teorie popisující vznik huminových látek z polyfenolů, které mohou pocházet jednak z ligninu, ale také mohou být syntetizovány mikroorganismy. Nejdříve musí dojít k rozkladu všech rostlinných biopolymerů na monomerní jednotky. Poté, co se přeruší vazba mezi ligninem a celulózą během rozkladu rostlinných zbytků, jsou postranní řetězce stavebních jednotek oxidovány a demethylovány, což produkuje polyfenoly, které jsou dále přeměněny na chinony pomocí enzymů polyfenoloxidázy. Chinony vzniklé z ligninu, a pravděpodobně i z jiných zdrojů, dále reagují se sloučeninami obsahujícími dusík a polymerizují za tvorby HL s rostoucí složitostí. Nejdříve by tedy vznikaly fulvinové kyseliny, poté huminové kyseliny a nakonec huminy [4].



Obr. 2 – Polyfenolová teorie [4]

2.1.2 Dělení huminových látek

Huminové látky představují heterogenní polydisperzní směs látek, jejichž molekulové hmotnosti se pohybují přibližně v rozmezí od 2 000 do 200 000 Da. Obecně lze huminové látky rozdělit na tři základní frakce – huminové kyseliny, fulvokyseliny a huminy [6].



Obr. 3 – Dělení huminových látek [7]

Humínové kyseliny

Humínové kyseliny představují frakci HL, která není rozpustná v kyselých a neutrálních roztocích, ale je rozpustná při vyšších hodnotách pH. Tyto kyseliny mohou být získány alkalickým loužením vzorku půdy, nebo obecně vzorku organické hmoty, a následným okyselením výluhu [6].

Tab. 2 – Prvkové složení huminových kyselin [8]

Prvek	Obsah [hm. %]
C	52–62
H	2,8–5,8
O	31–39
N	1,7–4,9

Elementární složení (Tab. 2 – Prvkové složení huminových kyselin [8]) je závislé na zdroji huminových látek, chemickém složení organických zbytků a podmínkách humifikace. Jsou to látky tmavé barvy a hromadí se většinou na místě vzniku. Charakteristické jsou svojí dobrou rozpustností v louhu a roztocích hydrolytický zásaditých solí. Základní složkou je aromatické jádro fenolického nebo chinoidního typu a dalších cyklických i alifatických dusíkatých sloučenin. V rozpustném stavu se lehce srážejí vodíkem a dvoj či trojmocnými kationty (Ca^{2+} , Mg^{2+} , Fe^{3+} , Al^{3+}). Černozemní HK jsou nejvíce obohaceny uhlíkem. Celkově obsahují 1–10 % popelovin (Si, Al, Fe, S, P, Ca, Mg, K, Na, aj.), což ale také závisí na způsobu izolace a přečištění. Kyselý charakter těchto sloučenin je dán přítomností kyselých funkčních skupin, ze kterých jsou nejdůležitější karboxylové (COOH) a fenolické (OH). Vodíkové ionty těchto funkčních skupin mohou být nahrazeny jinými ionty. V neutrálním prostředí má výměnná kapacita vodíku kyselých funkčních skupin HK hodnotu

250–500 mmol/100g huminové kyseliny (tzv. celková kyselost). HK se rovněž díky své heterogenní pórovité struktuře vyznačují vysokou sorpční schopností [8].

Obecně jsou HK považovány za nejhodnotnější produkt humifikačních procesů v půdě, výrazně ovlivňují půdní vlastnosti podmiňující vysokou úrodnost. Ovlivňují zejména kationtovou výměnnou kapacitu a strukturu půd. V nasyceném stavu jsou stálé a vysoce odolné vůči mineralizaci [8].

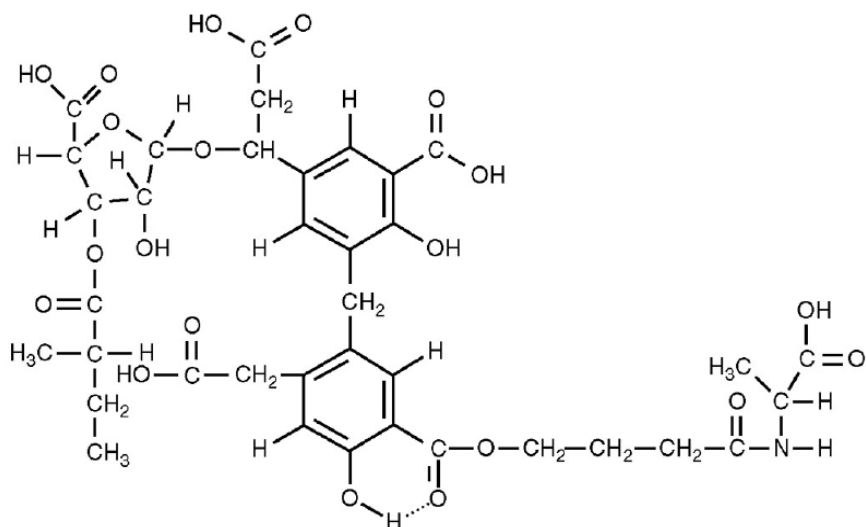
Fulvokyseliny

Fulvokyseliny jsou látky žluté až hnědé barvy, které jsou díky své poměrně malé velikosti molekuly vysoce mobilní (zejména v půdním profilu). Na rozdíl od huminových kyselin jsou charakteristické dobrou rozpustností ve vodě a minerálních kyselinách, ale také v loužích i v roztocích hydrolyticky zásaditých solí. Od HK se liší jednodušší stavbou makromolekuly i celkovým složením, které je pro přehlednost uvedeno v Tab. 3 – Prvkové složení fulvokyselin [8] [8].

Tab. 3 – Prvkové složení fulvokyselin [8]

Prvek	Obsah [hm. %]
C	40–52
H	4–6
O	40–48
N	2–6

Kyselý charakter FK je dán hlavně přítomností karboxylových funkčních skupin. Výměnná kapacita vodíku kyselých funkčních skupin FK má hodnotu 600–900 mmol/100 g fulvokyselin. Molekulová hmotnost těchto látek se pohybuje v rozmezí od 200 do 50 000 Da. V důsledku silně kyselé reakce a dobré rozpustnosti ve vodě jsou velmi agresivní na minerální část půdy, kterou zároveň ochuzují o živiny [8].



Obr. 4 – Hypotetický strukturní vzorec fulvokyseliny podle Buffla [6]

Huminy

Jedná se pravděpodobně o silně karbonizovanou organickou hmotu, pevně vázanou na minerální podíl půdy, a proto se nedá získat ani mnohonásobnou extrakcí alkáliemi z dekalcinované půdy. Barevně se jeví jako černé. Často jsou charakterizovány jako nerozpustné formy huminových kyselin. Humusové uhlí se vyskytuje v půdním humusu jako nejstarší složka produktů humifikace. Podle Najmra je humusové uhlí tmavá, zuhelnatělá, na uhlík a dusík bohatá hmota, která nepeptizuje, nerozpouští se, nehydrolyzuje, nezúčastňuje se půdotvorného procesu, a proto ztratila funkci pravého humusu [8].

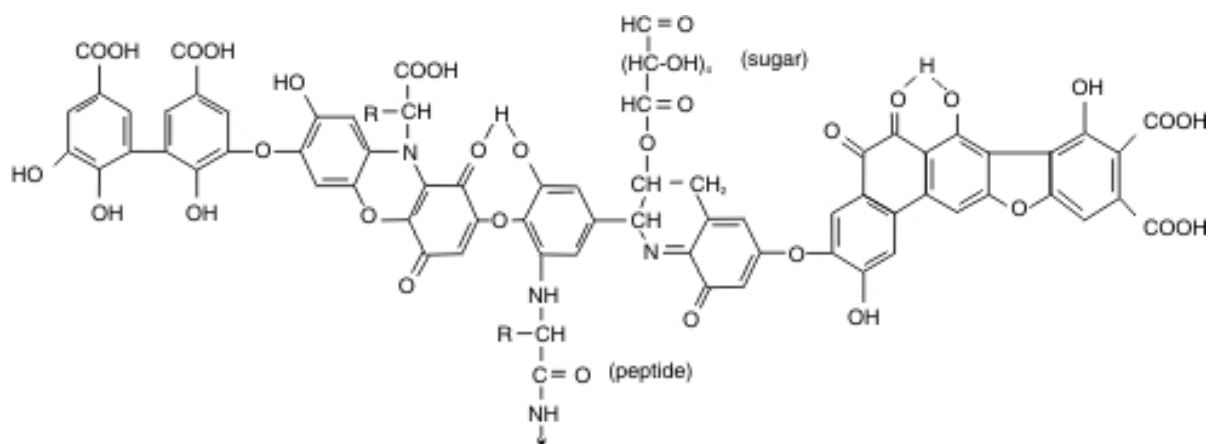
2.1.3 Struktura a vlastnosti

Struktura huminových kyselin a celkově huminových látek je velmi složitá. Stanovení opravdové molekulové hmotnosti je centrálním problémem výzkumu HL. Molekulová hmotnost určuje konformační strukturu (velikost a tvar) a dokonce i jejich reaktivitu. Řada názorů různých autorů (Clapp, De Nobili, Stevenson, Swift, atd.) opakovaně prokázala, že není prakticky žádná shoda mezi hodnotami molekulových hmotností HK získaných různými metodami. Zde je ovšem vždy nutno brát v potaz vysokou heterogenitu huminových kyselin a rovněž způsob stabilizace jejich struktury. Z toho je zřejmé, že rozdíly ve stanovených molekulových hmotnostech huminových kyselin ze značné míry souvisí právě se špatně zvolenou metodou stanovení [9].

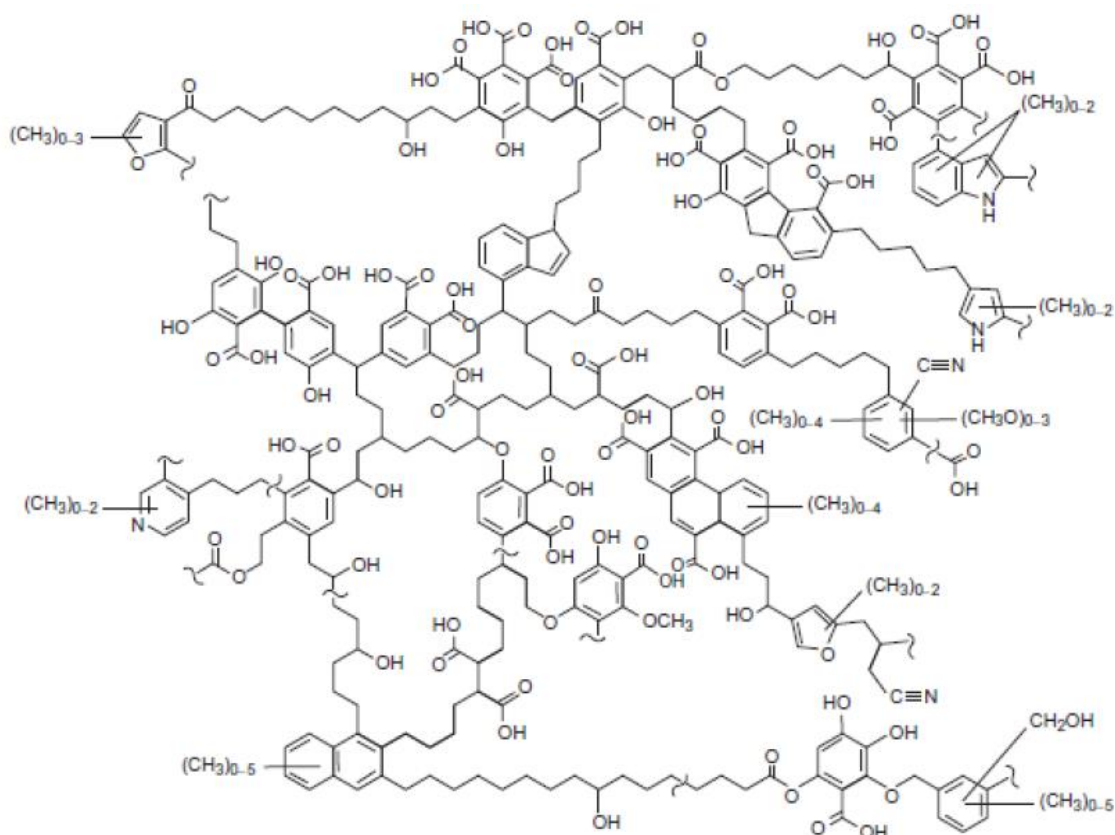
Právě nevhodně zvolené způsoby stanovení molekulové hmotnosti pomocí měření sedimentační rychlosti a ultracentrifugace jsou zodpovědné za velké rozdíly ve stanovených molekulových hmotnostech HK, které byly publikovány mezi roky 1950 až 1970. Tento stav nastal i přes jasné známky toho, že semiempirické metody nejsou vhodné pro polydisperzní systémy z důvodu různých difúzních koeficientů a usazovacích konstant různých velikostí částic. V těchto letech byly publikovány studie, které ukazovaly na rozsah molekulových hmotností od 25 000 do více než 200 000 Da (Stevenson, Flaig) [9].

Cameron, Thornton a kol. [9] ve snaze redukovat polydisperzitu huminových látek frakcionovali huminové kyseliny získané z půd ultrafiltrací a gelovou permeací. Výsledné frakce byly sice více homogenní než nefrakcionovaný roztok, ale stále nebyly monodisperzní. Získané molekulové hmotnosti se pohybovaly od 2 600 do 1 360 000 Da.

Celkově vzato, HL jsou strukturně velmi složité a ne zcela přesně popsané, dokonce ani molekulová hmotnost není jednoznačně určena. Znalost jejich strukturního složení je ale nezbytná pro pochopení jejich možných fyzikálně-chemických interakcí s látkami přítomnými v životním prostředí. Vůbec první návrhy struktury byly předloženy Stevensonem a Harworthem v 70. letech minulého století. Předpokládalo se, že ve strukturní síti jsou primárně zabudovány polyaromatické uhlovodíky. V následujících dvou desetiletích došlo k řadě objevů ve struktuře, a to zejména díky pokrokům v oblastech instrumentální analýzy. Tyto objevy objasnily, že ve struktuře jsou zabudovány aromatické a hydroaromatické di-, tri- a tetra- kyseliny [6].



Obr. 5 – Struktura HK podle Stevensona [10]



Obr. 6 – 2D struktura podle Schnitzera a Schultena [10]

Obecně jsou HK definovány jako komplexní aromatické makromolekuly, kde spojení mezi aromatickými skupinami zajišťují aminokyseliny, aminocukry, peptidy a alifatické sloučeniny. Struktura na Obr. 5 – Struktura HK podle Stevensona [10] obsahuje volné a vázané fenolické skupiny, chinonové struktury, dusíkové a kyslíkové atomy ve funkci můstků a karboxylové skupiny na aromatických kruzích. Huminové kyseliny tedy vykazují polyaniontový charakter a mohou vázat ionty chemickými i fyzikálními mechanismy [6]. Schopnosti, jako jsou rozpustnost ve vodě, agregace, disociace, nebo schopnost vytvářet komplexy s kovovými ionty, úzce souvisí se složením, které je ovlivněno humifikačními procesy [2].

Jak je zřejmé, existuje mnoho studií zabývajících se strukturou HK a jejich agregačními a degradačními procesy probíhajícími ve vodných roztocích. Zejména z důvodu velké rozmanitosti huminových kyselin získaných z jednotlivých zdrojových materiálů a rovněž vysoké polydisperzity těchto látek není možné identifikovat jednu molekulu, která by mohla plnit roli základního stavebního bloku struktury HK. Podle Stevensona by se na každou frakci mělo nahlížet jako na frakci složenou z řady různých molekul [11].

Vazebné možnosti huminových kyselin

Organické hmoty (platí rovněž pro HK, jakožto hlavní složku organické hmoty) obecně v přírodě interagují s anorganickými látkami, jako jsou jíl, oxidy, oxohydroxidy kovů, vápenec a jiné horniny, ale také s živinami a toxickými látkami. Právě huminové kyseliny, reaktivní část organické hmoty, jsou zodpovědné za transformaci, reaktivitu a transportní jevy, které probíhají v těchto přírodních matricích. Lze předpokládat několik typů vazebných interakcí HL s cizími látkami: [6,7,12]

Van der Waalsovy interakce

Tento typ velmi slabé nevazebné interakce ($2\text{--}4\text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$) existuje mezi všemi atomy, které nejsou přímo spojeny kovalentní vazbou. Atom zde figuruje jako dočasný oscilující dipól vzniklý nahodilým pohybem atomů a molekul ve strukturách, polarizuje sousední atomy a spřahuje je oscilací za vzniku slabých přitažlivých sil. Na velmi krátké vzdálenosti vykazují kterékoli dva atomy tuto nevazebnou interakci, ale pokud se přiblíží na limitní vzdálenosti, velmi silně se odpuzují. Tento typ interakce působí například při adsorpcích. Významná je tato interakce při adsorpci nepolárních látek na HK, nebo při interakci organické hmoty s vysokomolekulárními proteiny a sacharidy [7,13].

Iontová výměna

Iontová výměna představuje běžný mechanismus interakce mezi nabitou organickou molekulou a souhlasně nabitým iontem, kterým je nasycen povrch minerálu. Může dojít k interakci kladně nabitých skupin, nebo záporně nabitých skupin, což je ale méně časté [14].

Vodíkové můstky

Jsou to slabé polární vazby ($2\text{--}4\text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$) mezi vodíkem s elektronegativnějším donorem elektronů (O, N, P). Vznikají tehdy, jestliže se atom vodíku dostane mezi dva elektronegativnější atomy. Ve vodném roztoku jsou vodíkové můstky poměrně slabé. Vodíková vazba se výrazně podílí na tvorbě interakcí při adsorpci organických molekul na huminové kyseliny [13,14].

Koordinační vazba

Tento typ vazby je významný z hlediska vázání těžkých kovů na huminové látky a jejich následné odstraňování z půd a vod. Do této interakce se nejvíce zapojují karboxylové a fenolické skupiny HL. Tvorbu těchto vazeb a jejich stabilitu ovlivňuje hodnota pH. Ve slabě kyselém prostředí se na vazbě podílí hlavně karboxylové skupiny a při alkalickém pH tvoří koordinační vazby i fenolické skupiny. Stabilita komplexů s kovy obecně roste se zvyšujícím se pH [14].

Hydrofobní interakce

Hydrofobní interakce jsou řízeny entropicky, tedy při vzniku interakce dochází k poklesu entropie systému. Tento druh interakcí je spojen se vzájemným působením částic a jejich prostředí. Entropická změna je spojena s eliminací molekul vody, která tvořila solvatační vrstvu původních částic, které byly rozptýleny v rozpouštědle. Hydrofobní interakce vznikají například při adsorpci nepolárních organických látek na organickou hmotu v půdách a sedimentech [14].

2.1.4 Extrakce, frakcionace, purifikace

Huminové látky se ve svých zdrojových matricích (půda, lignit, rašelina, kompost, atd.) nacházejí jako součást komplexního systému, ve kterém reagují s ionty kovů, minerálními koloidy a nehumifikovanými organickými materiály, takže aby bylo možné studovat jejich strukturní, chemické a fyzikální vlastnosti, je nutné je ze své zdrojové matrice izolovat. Prvním krokem bývá izolace HL z anorganické matrice a následné oddělení od ostatních sloučenin. Dalším krokem je frakcionace, která je důležitá ke snížení fyzikální a chemické heterogenity. Konečným krokem je purifikace, která slouží k eliminaci nečistot a dalších vyextrahovaných materiálů [4].

Extrakce

Každý pokus o vytvoření efektivního postupu pro izolaci HL ze zdrojové organické matrice by měl brát na zřetel vlastnosti použitých extrakčních činidel, materiálů k extrakci a všech asociací, které se v půdě vyskytují. Ideální extrakční metoda by podle Stevensona [10] měla splňovat tyto požadavky:

- extrakcí nedojde ke změně fyzikálních a chemických vlastností
- extrahované huminové látky neobsahují žádné anorganické nečistoty jako je jíl a vícevazné kationty
- extrakce je kompletní, izolovaný vzorek obsahuje frakce všech molekulových hmotností
- metoda se dá aplikovat pro izolaci HL z různých zdrojů

Podle Stevensona je možné pro izolaci HL použít následující extrakční činidla:

- NaOH – výtěžek do 80 % organické hmoty
- $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ – do 30 %
- organické cheláty (acetylaceton, hydroxychinolin, kupferron) – do 30 %
- HCOOH – do 55 %
- DMSO – do 23 %
- Pyridin – do 36 %
- EDA (vodný roztok) – do 63 %
- EDA (bezvodý) – do 5 %
- a další

Alkalická rozpouštědla jsou vůbec nejstarší činidla, která se kdy používala pro extrakci huminových látek a dodnes zůstávají nejvíce účinná a používaná. Ukazuje se, že nejúčinnější pro extrakci je hydroxid sodný (NaOH) o koncentraci od $0,1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ až do $0,5 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$

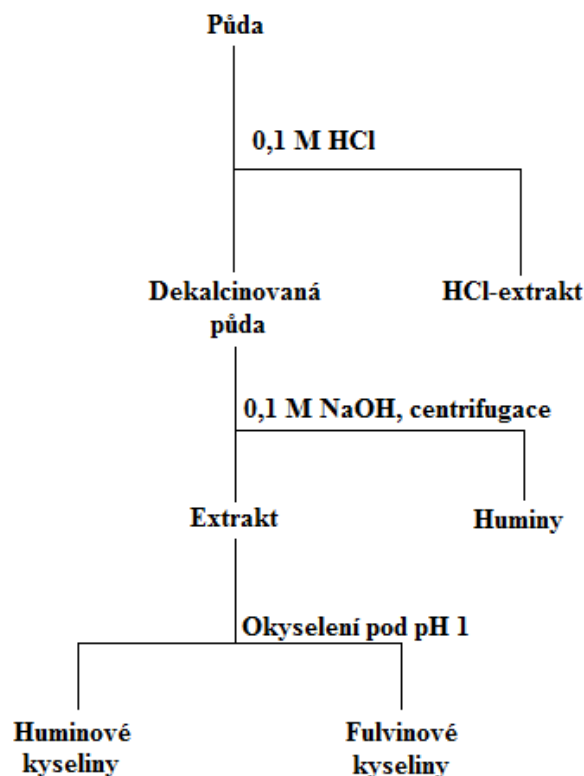
(nebo EDA – ethylendiamin ve vodě) při pH 12,6. Běžně se používá poměr půdy k extrakčnímu činidlu od 1:2 do 1:5 (v g·cm⁻³). Doporučovaná je opakovaná extrakce. Následuje přečištění půdy (dekalcinace) zředěnou kyselinou chlorovodíkovou (HCl) nebo směsí zředěné HCl a HF, což odstraní vápník a další vícevazné kationty. Výsledkem pak je zvýšení účinnosti alkalické extrakce, nicméně je také odstraněno malé procento (obvykle 1–5 %) nízkomolekulárních frakcí HL. Čím více použijeme alkalického činidla a čím delší je extrakční doba, tím vyšší je výtěžnost reakce. Na druhou stranu ovšem může docházet k chemickým změnám získaného materiálu (např. oxidaci). Ty se ale dají minimalizovat, když je alkalická extrakce prováděna v přítomnosti inertního plynu (N₂).

Jako další extrakční činidla je možné využít například vodný roztok EDA, který má výtěžnost až 63 %, dále HCOOH s výtěžností do 55 %, pyridin, DMSO, nebo Na₄P₂O₇. Dobře využitelný je také roztok 0,5 mol·dm⁻³ NaOH a 0,5 mol·dm⁻³ Na₄P₂O₇. Tato směs významně zkracuje dobu extrakce. Nicméně i s nejvyšší výtěžností vodného roztoku EDA, žádné z těchto dalších rozpouštědel není tak efektivní jako NaOH [4,7,10].

Frakcionace

Humínové látky jsou složeny z širokého spektra látek různých velikostí. Je tedy důležité tyto různorodé směsi molekul dále roztřídit. Frakcionační procesy jsou obvykle používány jako předběžné kroky k následným fyzikálním, chemickým a fyzikálně-chemickým analýzám a měřením. Tento proces zahrnuje spousty metod, ale mezi jedny z nejrozšířenějších patří rozdíly v rozpustnosti, reakcích s kovovými ionty, molekulové velikosti, náboji nebo adsorpčních vlastnostech.

Nejčastěji se využívá frakcionace na základě změny pH, protože hlavní frakce obsahují HK (rozpustné v alkalických roztocích, sráží se v prostředí s pH 2–1), FK (rozpustné při všech hodnotách pH) a humin (nerozpustný jak v kyselých tak v alkalických prostředích). Frakce huminových a fulvinových kyselin je velmi heterogenní a každá z nich obsahuje přechodné formy, jejichž vlastnosti se překrývají [4,7,15].



Obr. 7 – Frakcionace půdy na jednotlivé huminové složky [7]

Na Obr. 7 – Frakcionace půdy na jednotlivé huminové složky [7] je uveden celý postup při získávání jednotlivých frakcí HL. Nejdříve dojde pomocí $0,1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ HCl k dekalcinaci a odstranění vícevazných iontů, dále po přidání $0,1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ NaOH, nebo $0,5 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ NaOH s $0,5 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$, dojde k oddělení frakce s huminy a vzniklý roztok je okyselen na pH menší než 1. Tím po několika hodinách dojde k vysrážení HK, zatímco FK zůstanou rozpuštěné v supernatantu [4,7,15].

Purifikace

Anorganické (soli, jíly, aj.) i organické (proteiny, lipidy, aj.) nečistoty musí být ze surových frakcí huminových látek odstraněny. Frakce huminových kyselin lze čistit opakovaným alkalickým rozpouštěním, následnou centrifugací a opět vysrážením v kyselém prostředí. K takovému čištění lze použít $0,1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ KOH s přidavkem NaCl.

Lepší způsob čištění je ale realizován přidavkem směsi $0,1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ HCl s $0,3 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ HF s následnou centrifugací. Poté se HK dialyzují a mražením vysuší [4,15].

2.1.5 Využití huminových kyselin

Již řadu desítek let jsou HL předmětem intenzivního vědeckého zájmu a to zejména kvůli jejich zajímavým fyzikálně-chemickým vlastnostem. V důsledku tak HK nacházejí využití v zemědělství, v průmyslu, v oblasti ochrany životního prostředí, ve farmakologii a využívají se také jako palivo [6].

Huminové kyseliny (i fulvinové kyseliny) jsou příčinou kyselosti rašelinných vod. Karboxylové skupiny mají poměrně silně kyselý charakter, fenolové skupiny mají jen slabě kyselý charakter. Roztoky huminových kyselin mají v závislosti na koncentraci hodnoty pH

kolem 3,5, roztoky FK jsou ještě kyselejší. Jejich přítomnost ve vodách se projevuje žlutým až žlutohnědým zbarvením vody, ale barva se značně mění s hodnotou pH vody v důsledku změny disociačního stupně karboxylových skupin. Kromě toho ale souvisí barevnost se složením HL, které může být v různých povrchových vodách odlišné. Vzhledem k uvedeným vlastnostem jsou tyto látky v pitných, užitkových a provozních vodách nežádoucí. Vadí zejména v odvětvích průmyslu, kde mohou znehodnocovat kvalitu výrobků jejich zbarvením (textilní a papírenský průmysl). Ze zdravotního hlediska jsou samy o sobě v podstatě nezávadné [16].

Zemědělství

Huminové kyseliny jsou v zemědělství velmi prospěšné, konkrétně ovlivňují stabilitu půdních agregátů, transport, sorpci hydrofobních organických sloučenin a tvoří komplexy s kovy přítomnými v prostředí. Také ale poskytují energii pro prospěšné půdní organismy, ovlivňují kapacitu zadržování půdní vody, strukturu půdy, uvolňování rostlinných živin z půdních minerálů a jako hnojiva v podobě humátů zkvalitňují úrodnost půdy [17].

Průmysl

V průmyslu jsou HK využívány jako součást uhlí k výrobě energie. Také jsou využívány jako hydrofobní plniva cementů, protože ovlivňují vlastnosti cementů jako smáčivost, disperzitu a vytvrzování. Obdobně jsou využívány také v keramice [18].

Huminové látky by také mohly ovlivňovat plasticitu surové hmoty (těsta), ze které se ve stavebním průmyslu dále vypalují cihly a stavební bloky, protože jsou přítomny v jílech, které se používají jako základ surových hmot ve výrobě.

Ochrana životního prostředí

V této oblasti jsou využitelné sorpční schopnosti HL vůči běžným polutantům. Jsou schopné na sebe vázat těžké kovy, detergenty, pesticidy, barviva aj. Tyto škodliviny jsou nejdříve imobilizovány huminovými kyselinami a po vhodných úpravách půdy (izolace a extrakce) dále odstraněny z přírodního ekosystému [18].

Farmacie a biochemie

Huminové kyseliny nachází také využití v oblastech farmacie a biochemie. Svým působením se tyto látky podobají účinkům heparinu, estrogeneru a řada derivátů byla označena jako terapeutika. Dalšího využití se dosáhlo v oblasti kosmetiky, kde jsou používány k bahenním lázním a léčebným zábalům. Bylo také zjištěno, že právě HK mohou být využity při léčbě vybraných druhů rakovinných onemocnění [18].

2.2 Metody studia supramolekulární struktury

Jak již bylo řečeno v kapitole 2.1.3, stanovení absolutní hodnoty molekulové hmotnosti HK je centrálním problémem celého výzkumu huminových látek. Právě molekulová hmotnost určuje konformační strukturu a s ní rovněž související reaktivitu HL ve svých zdrojových maticích a obecně v životním prostředí [9].

Ke studiu supramolekulární struktury huminových látek se obecně využívají metody jako NMR, LC-MS, GC-MS, SEC-MALS, FT-IR, techniky rozptylu světla, metody termické

analýzy (TGA, DSC), UV-VIS, atd. [29–34]. V rámci této bakalářské práce jsou pro tyto účely využívány následující metody:

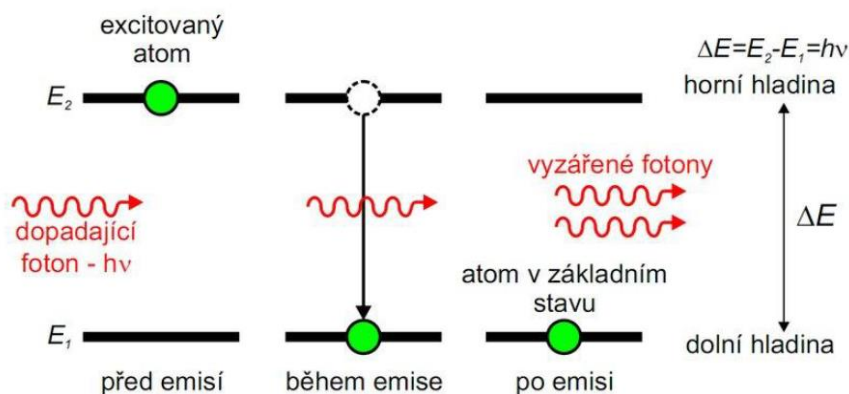
- UV-VIS spektrometrie
- Dynamický rozptyl světla (DLS – Dynamic Light Scattering)
- Elektroforetický rozptyl světla (ELS – Electrophoretic Light Scattering)
- Velikostně vylučovací chromatografie (GPC – Gelová permeační chromatografie, SEC – Size Exclusion Chromatography) s následnou detekcí pomocí UV-VIS, MALS, dRI a dVI

2.2.1 UV-VIS spektrometrie

Podstatou ultrafialové a viditelné spektrometrie je absorpce ultrafialového a viditelného záření (200–800 nm) zředěnými roztoky molekul. Dochází tu k výměně energie mezi částicemi a hmotou tak, že při absorpci dochází k excitaci valenčních elektronů, tj. ke změně rotačně vibračních energetických stavů molekuly, které jsou součástí molekulových orbitalů. Proto molekulová absorpční spektra v UV a viditelné oblasti jsou svou podstatou elektronová spektra [19,20].

Princip

Při běžné laboratorní teplotě jsou molekuly v základní elektronové i vibrační hladině. Při pohlcení fotonu přechází molekula do excitovaného stavu s vyšší energií, kde zůstává asi jen 10^{-9} s. Funkční skupiny v molekule, které tuto absorpci způsobují, se nazývají chromofory. Potom nezářivými či zářivými deexcitačními pochody přechází do základního stavu – udržuje se rovnováha ve prospěch molekul. Návrat do základního stavu nás ale v absorpčních technikách nezajímá [19,20].



Obr. 8 – Interakce elektromagnetického záření s látkou [20]

Analytické využití této metody spočívá buď v kvalitativní analýze, kdy se pomocí spekter dají identifikovat neznámé organické látky porovnáním s již známými spektry (není to ale dostatečné k učinění závěru o jednoznačné průkaznosti identifikace), nebo v kvalitativní analýze. Tady se absorbance využívá k určení koncentrace sloučenin s chromofory. Pracujeme obvykle metodou kalibrační křivky. Měření je prováděno buď při vhodné vlnové délce, nebo jsou snímána celá spektra v krátkých časových intervalech [19,20].

Absorpční pás

Jeden pás odpovídá jednomu typu přechodů v molekule do excitovaného stavu. Polohu píku určuje $\lambda_{\max}$, což je vlnová délka maxima pásu, při níž je absorpce nejvyšší.

Transmittance a absorbance

Transmittance je poměr zářivého toku prošlého k dopadajícímu:

$$T = \frac{I}{I_0} \quad (1)$$

Absorbance je pak definována jako záporný dekadický logaritmus transmittance:

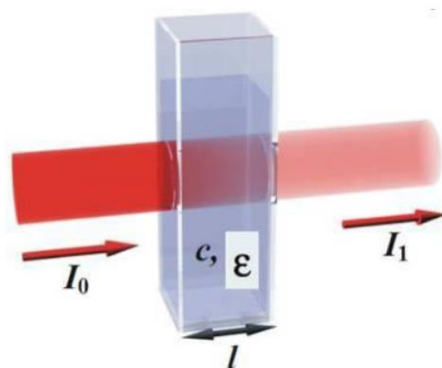
$$A = -\log T = \log \frac{I_0}{I} \quad (2)$$

Lambert-Beerův zákon

Tento zákon říká, že absorbance je přímo úměrná koncentraci absorbující látky a tloušťce absorbující vrstvy:

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

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



Obr. 9 – Průchod záření kyvetou [20]

Absorbance je aditivní veličina, což znamená, že je součtem dílčích složek, které se při dané vlnové délce absorbují: [19,20]

$$A = \sum_{i=1}^n A_i = \sum_{i=1}^n \varepsilon_{\lambda,i} \cdot c_i \cdot l \quad (4)$$

2.2.2 Dynamický rozptyl světla

Dynamický rozptyl světla, nebo také foton korelační spektroskopie (PCS – Photon Correlation Spectroscopy), je velmi populární metodou pro pozorování difúze částic látek ať už v roztoku, nebo suspenzi. Makromolekuly, nebo koloidní částice, rozpuštěné nebo dispergované v rozpouštědle podléhají Brownovu pohybu, což je nahodilý pohyb částic. Světelné paprsky rozptýlené v daném čase různými částicemi jsou do určité míry fázově

posunuty a vzájemně interferují. Tato interference může být buď pozitivní, nebo negativní, což záleží na vzájemné poloze částic. Po nějakém čase se částice přesune na jiné místo a intenzita světla dopadajícího na detektor je jiná, protože je jiná také vzájemná pozice částic a tím je jiný i fázový posun světelných paprsků. Vzdálenost mezi jednotlivými částicemi v roztoku se mění s časem, což způsobuje fluktuace v intenzitě rozptýleného světla a tyto fluktuace odráží pohyb částic. V případě velkých částic, které se pohybují pomalu, intenzita rovněž fluktuuje pomalu, v případě malých částic opačně. To znamená, že fluktuace intenzity nesou informace o pohybujících se částicích. Základním výstupem této metody je intenzitní distribuce velikosti částic a ta se dá snadno převést na distribuci objemovou (početní) [21].

Výhodou této metody je, že nepotřebuje velké množství vzorku. Horní mez měřitelnosti velikosti je řádově několik jednotek mikronů v závislosti na hustotě materiálu a střední viskozitě, a dolní mez se pohybuje v oblasti desetin až jednotek nanometrů v závislosti na rozdílu indexu lomu mezi částicemi a roztokem [22].

Během měření dochází k interakci laserového zdrojového záření s částicemi ve vzorku. Poté co je vzorek osvětlen monochromatickým světelným paprskem, dochází z důvodu Brownova pohybu u kulovitých částic k Dopplerově posuvu při dopadu světla na tuto částici. Následně pak dochází ke změně vlnové délky dopadajícího světla, což souvisí s velikostí částic. Časové měřítko rozptýlených kolísání intenzity světla je analyzováno matematickým procesem zvaným autokorelace. Pomocí autokorelační funkce jsme pak schopni vypočítat distribuci velikosti částic a popsat také pohyb částice v médiu měřením difúzního koeficientu částice. Velikost částice může být determinovaná ze Stokes-Einsteinovy rovnice:

$$D = \frac{k_B \cdot T_K}{6 \cdot \pi \cdot \eta \cdot d_H}, \quad (5)$$

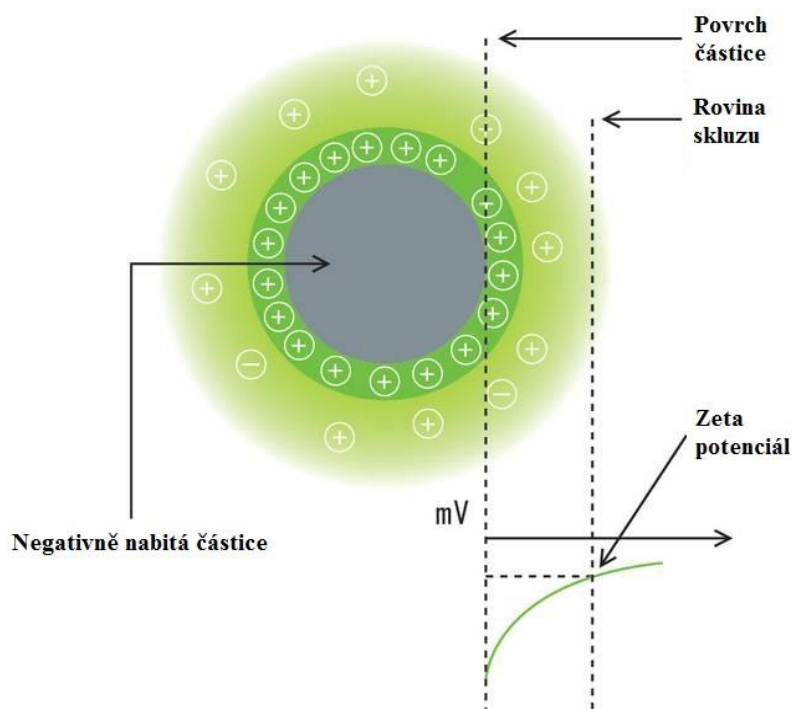
kde k_B je Boltzmannova konstanta, T je teplota, η dynamická viskozita rozpouštědla (disperzního prostředí) a d_H je hydrodynamický poloměr (odpovídá poloměru koule, která by měla za stejných podmínek stejný difúzní koeficient, jaký je naměřen) [21,22].

2.2.3 Elektroforetický rozptyl světla

Na rozdíl od analýzy velikosti částic se metoda elektroforetického rozptylu světla (ELS) používá k charakterizaci povrchového náboje koloidních částic (mikrometrové a nanometrové částice) v kapalném disperzním prostředí. Výraznou vlastností koloidních částic je, že v porovnání s velkými částicemi, nebo sypkými materiály, mají obrovské specifické povrchové plochy, což znamená, že rozhraní částice a kapaliny může silně ovlivnit fyzikální vlastnosti koloidních disperzí např. dispergovatelnost a stabilita [22].

Účinkem elektrického napětí, vloženého na koloidní roztok, putují nabitě koloidní částice, v závislosti na znaménku náboje, ke kladné nebo záporné elektrodě. Tento jev nazýváme elektroforézou. Elektrický náboj na povrchu koloidních částic vytváří elektrické pole, jehož vlivem dochází v těsné blízkosti částice k uspořádání opačně nabitých iontů a vzniká tak elektrická dvojvrstva. Vnitřní část dvojvrstvy přiléhá k povrchu koloidní částice a její náboj je neutralizovaný opačným nábojem vnější vrstvy. Nabité částice vnější vrstvy nejsou vždy nehybně poutány k opačně nabitým částicím vnitřní vrstvy, ale mohou konat běžný

tepelný (Brownův) pohyb. Stav vnější vrstvy je proto určen rovnováhou mezi elektrostatickými silami a tímto pohybem. Opačně nabité ionty jsou přitahovány k vnitřní vrstvě, jejich koncentrace v její blízkosti je proto vyšší než dále od povrchu částice. Při pohybu koloidní částice v elektrickém poli se s ní pohybují pouze ty ionty dvojvrstvy, které jsou k ní poutány dostatečně velkými silami. Difúzní část vnější vrstvy se může pohybovat s disperzním prostředím, tedy k opačné elektrodě než částice. Dvojvrstva se tedy při pohybu částice rozdělí na část pevně ulpělou na povrchu částice a část zůstávající v kapalném prostředí, přičemž obě části nesou náboj opačného znaménka. Mezi těmito částmi vzniká potenciálový rozdíl, který se nazývá elektrokinetickým nebo ζ -potenciálem. Jeho znaménko je určeno znaménkem náboje vnitřní vrstvy. S rostoucí koncentrací elektrolytu přecházejí opačně nabité ionty z difúzní části elektrické dvojvrstvy blíže k vnitřní části elektrické dvojvrstvy – difúzní část se tak zmenšuje, což vede ke snížení hodnoty ζ -potenciálu a tím i ke ztrátě stability koloidních částic. Pokud tedy všechny částice mají vysoký kladný nebo záporný potenciál, budou se odpuzovat navzájem a nebudou se shlukovat, což vede ke stabilnímu systému. Přidáním elektrolytu dochází ke stlačení elektrické dvojvrstvy a tím ke snížení hodnoty ζ -potenciálu. Je-li koncentrace elektrolytu dostatečná, je překročen koagulační práh, dojde k destabilizaci koloidních částic a ty se začnou shlukovat [23].



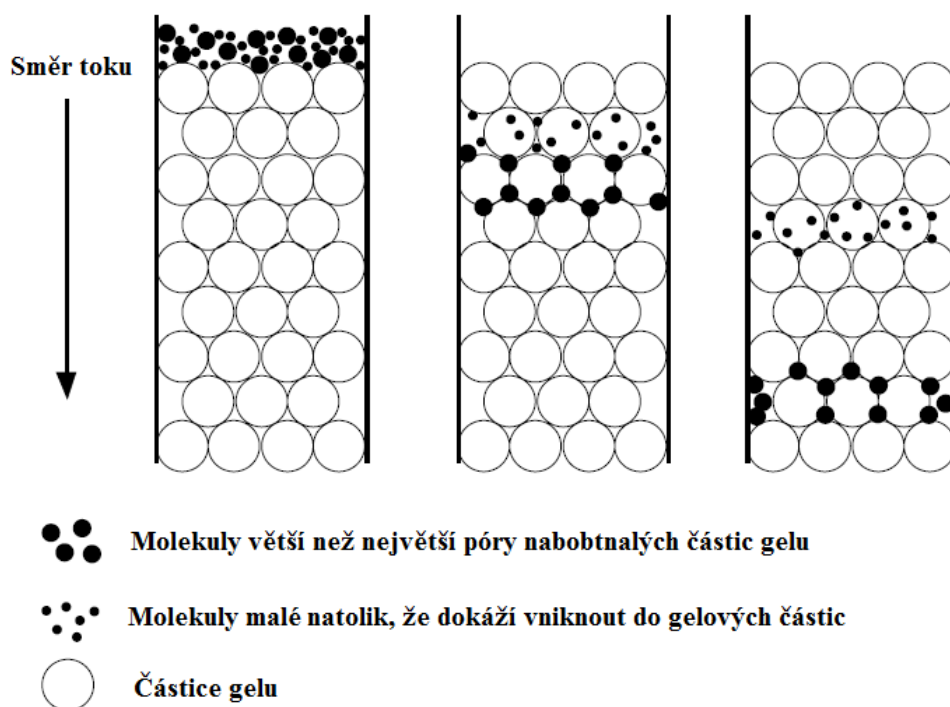
Obr. 10 – Schématické znázornění zeta potenciálu [24]

Obecná hranice mezi stabilní a nestabilní suspenzí se zpravidla bere $|\pm 30 \text{ mV}|$. Částice se ζ -potenciálem větším než $+30 \text{ mV}$, nebo menším než -30 mV se považují za stabilní. Nejdůležitější faktor, který ζ -potenciál ovlivňuje je pH. Bez uvedení hodnoty pH je ζ -potenciál prakticky bezvýznamný. Základem měření je cela s elektrodami na každém konci, na které je aplikovaný potenciál. Částice se pohybují směrem k elektrodě s opačným nábojem, měří se jejich rychlost, a ta se vyjádří v jednotkách intenzity pole [25].

2.2.4 Velikostně vylučovací chromatografie

Dřívější termín pro tuto chromatografii byl gelová permeační chromatografie, ale dnes se používá termín velikostně vylučovací chromatografie (SEC). Tuto metodu lze využít ke stanovení molekulové hmotnosti, i když není molekulová hmotnost měřena přímo. Je to speciální případ sloupcové chromatografie, speciální ve smyslu, že neexistují interakce mezi analytem a stacionární fází. V důsledku dochází touto metodou k separaci molekul studovaného analytu čistě jen podle velikosti částic v roztoku. SEC se stala nejpopulárnější metodou ke stanovení molekulové hmotnosti a v kombinaci s měřením rozptylu světla a viskozimetrickými detektory nám může poskytnout také informace o konformaci a větvení látek [21].

Pro velikostně vylučovací separaci analytu se používá chromatografická kolona, která je naplněna malými částicemi porézního materiálu a prostor mezi částicemi a póry je vyplněn mobilní fází. Stěny pórů ovšem musí být inertní tak, aby se na nich molekuly neadsorbovaly. Vzorek je nejdříve nastříknut ve formě zředěného roztoku ve stejném rozpouštědle, jako je mobilní fáze. Koncentrace eluovaných molekul z kolony je sledována koncentračním detektorem (např. diferenční refraktometr). Malé částice pronikají hlouběji do pórů a zdrží se v koloně déle, než velké částice, které projdou kolonou daleko rychleji, protože se do pórů nedostanou. Velké částice tedy z kolony vychází jako první a jsou následovány dalšími částicemi v pořadí podle klesající velikosti částic. Tento princip je obecně znám jako sterická exkluze. Pomocí této metody je tedy možné separovat molekuly, které se liší svou velikostí a dobře se rozpouštějí v nějakém rozpouštědle. Výhodou je, že separace závisí pouze na velikosti molekul a ne na chemické povaze [19,21].



Obr. 11 – Separace molekul pomocí velikostně vylučovací chromatografie [26]

Velikostně vylučovací chromatografií dojde k separaci analytu a takto předseparovaný materiál většinou následně vstupuje do detektoru pro další analýzu. Nejčastěji se používá detekce pomocí UV-VIS (viz kapitola 2.2.1), měření rozptylu světla (např. MALS detektor), diferenčního viskozimetru (dVI), fluorescenčního detektoru, resp. diferenčního refraktometru (dRI), infračerveného refraktometru (IR), detektorů založených na NMR atd. [19,21].

UV-VIS detektor

Tento detektor je nejběžněji používaný v kapalinové chromatografii a je použitelná pro sloučeniny obsahující dvojnou vazbu, konjugované dvojné vazby, aromatický kruh, karbonylovou skupinu nebo nitroskupinu. Detekce je limitována faktem, že spousty důležitých polymerů v UV oblasti absorbují jen velmi slabě nebo vůbec [21].

Princip UV-VIS spektrometrie je blíže popsán v kapitole 2.2.1.

Diferenční refraktometr (dRI) – koncentrační detektor

Nejběžněji používaný detektor ve velikostně vylučovací chromatografii. Je univerzální pro všechny sloučeniny s nenulovým přírůstkem specifického refrakčního indexu. Pro sloučeniny, které hodně absorbují v UV oblasti (např. s aromatickými kruhy), může být citlivost tohoto detektoru podstatně nižší než v případě UV-VIS detektoru. Na druhou stranu, pro spousty neabsorbujících látek je dRI detektor jedinou možností. V porovnání právě s UV-VIS detektorem je dRI detektor vysoce citlivý na teplotu a kolísání průtoku. Aby se eliminoval vliv teploty, je cela včleněna do masivního termostabilního bloku z kovu. Většina dRI detektorů nemá ochlazovací schopnost, takže operační teplota musí být přibližně o 10 °C vyšší, než je teplota v místnosti. Eluát prochází relativně dlouhou ocelovou tubou, aby se vyrovnala teplota s průtokovou celou, než do ní eluát dorazí. Detektory jsou velice citlivé na jakoukoli změnu složení eluátu a zabere celé hodiny propláchnout kolonu a stabilizovat signál [21].

Diferenční viskozimetr (dVI)

Diferenční viskozimetr je používán výhradně v kombinaci s velikostně vylučovací chromatografií. Je často uváděn jako detektor molární hmotnosti, ačkoliv primární měřená veličina je specifická viskozita, ne molární hmotnost. Pomocí koncentrace, která byla získána koncentračním detektorem, je následně specifická viskozita přepočítána na skutečnou (vnitřní) viskozitu a s ní je už možné vyčíst molární hmotnost z kalibrační závislosti. Stejně jako u SEC je tato metoda citlivá na výkyvy teplot, výkyvy v toku, účinnost kolony, atd. Online viskozimetr měří tlakové ztráty mezi roztokem polymeru a čistým eluátem. Podle Poiseuilleova zákona pro laminární tok, může být měření viskozity nahrazeno měřením tlakového rozdílu:

$$\dot{V} = \frac{\Delta P \cdot \pi \cdot R^4}{8 \cdot \eta \cdot L}, \quad (6)$$

kde $\dot{V}$ je objemový tok, ΔP je tlakový rozdíl v koloně, R je poloměr kolony, η je viskozita a L je délka kolony.

Skutečná (vnitřní) viskozita je jednou ze základních vlastností polymerních materiálů. Její praktická aplikace spočívá ve spojení s molární hmotností, hlavně pro charakterizaci makromolekulární velikosti a větvení polymeru. To znamená, že nejúčinnější aplikace viskozimetrického detektoru je ve spojení s detektorem pro měření světelného rozptylu, který měří molární hmotnost přímo bez potřeby kalibrace [21].

Detektor pro měření rozptylu světla

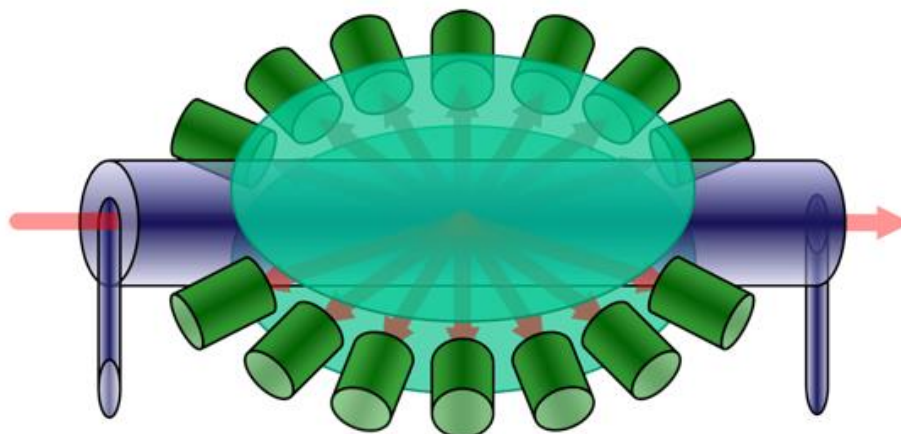
V zásadě je možné tento detektor použít v kombinaci i s jinými typy kapalinové chromatografie, ale téměř výhradně je detektor používán v kombinaci s velikostně vylučovací chromatografií. Detektor rozptylu světla poskytuje informace, které nám klasická SEC nemůže poskytnout, a protože není potřeba kalibrace kolony, jsou tyto detektory nejlepší pro velikostně vylučovací chromatografii. Existují tři typy těchto detektorů, které se liší ve způsobu stanovení molární hmotnosti:

LALS (Low-Angle Light Scattering) detektor využívá úhel dostatečně nízký na to, aby se dalo předpokládat, že je funkce rozptylu částic rovna jedné, ale pro velké molekuly může značně klesnout pod jedničku i při malých úhlech.

RALS (Right-Angle Light Scattering) detektor, který také může být použit pro malé molekuly, kdy je funkce rozptylu světla rovna jedné, nebo také jako součást systému „trojitě detekce“, který se někdy označuje jako SEC³ a jde o sestavu tří detektorů – RALS, dVI a dRI [21].

MALS (Multi-Angle Light Scattering) detektor umožňuje extrapolaci intenzity rozptylu světla měřeného v různých úhlech až do nulového úhlu, ve kterém je funkce rozptylu částic jednotková.

Po dopadu laserového paprsku na makromolekuly v nich oscilující elektrické pole světla vyvolá oscilující dipól, který znovu vyzařuje světlo. Intenzita vyzařovaného světla závisí na velikosti tohoto dipólu. Čím je makromolekula polarizovatelnější, tím je větší i intenzita rozptýleného světla. Takže je nutné nejdříve znát polarizovatelnost pozorovaných makromolekul, aby na nich bylo možné charakterizovat rozptyl. Intenzita rozptýleného světla je přímo úměrná koncentraci makromolekul v roztoku [27].



Obr. 12 – Rozptyl světla snímáný detektory v různých úhlech – zde uvedeno uspořádání pro MALS detektor [28]

Nejdříve dojde k separaci molekul pomocí SEC a separované molekuly následně vstupují do MALS detektoru, kde jsou ozářeny světelným paprskem. Součástí systému MALS je hned několik detektorů statického rozptylu světla, které snímají intenzitu rozptýleného světla v různých úhlech. Obecně se předpokládá, že čím vyšší je počet detektorů, tím je vyšší přesnost experimentu. Právě na systém SEC-MALS bývají často napojeny i jiné detektory, například viskozimetr, který měří změny tlaku, a také poskytuje informace o molekulové hmotnosti. Jednou z výhod techniky SEC-MALS je fakt, že poskytuje absolutní měření, protože nevyžaduje srovnání s molárními hmotnostmi standardů ani kalibraci [28].

3 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

Znalost struktury huminových kyselin je velmi důležitá, abychom lépe rozuměli tomu, jak tyto organické systémy interagují s přírodními ekosystémy. Na téma struktury huminových kyselin bylo v minulosti provedeno mnoho výzkumů a byla publikována celá řada prací, nicméně dodnes stále neexistuje žádné univerzálně platné řešení. Dřívější studie, založené na studiu chování HL v roztocích, navrhovaly, že tyto látky jsou tvořeny z komplexních směsí různých makromolekul, jejichž fyzikálně-chemické vlastnosti jsou kvalitativně podobné. Nedávné studie, založené na vysokotlaké velikostně vylučovací chromatografii, indikují, že HK jsou tvořeny supramolekulárními strukturami, které vznikají z relativně malých molekul propojených slabými nevazebnými interakcemi [29].

V kapitole 2.1.3 bylo řečeno, že autoři Stevenson, Swift, Flaig, Schulten a další se snažili objasnit strukturu HK. V podstatě všechny jejich závěry vedly ke vzniku polymerního pochopení struktury huminových kyselin, jelikož i přes všechny použité metody (elementární analýza, gelová permeace, ultrafiltrace aj.) dostali molekulové hmotnosti v rozsahu od několika tisíc daltonů až do stovek tisíc, či milionu daltonů. Musíme však vzít v úvahu technické omezení, které v době jejich výzkumů panovalo oproti dnešní době. V posledních letech s rozvojem sofistikovanějších analytických metod jako jsou velikostně vylučovací chromatografie, dynamický rozptyl světla, nukleární magnetická rezonance aj. jsou však měření daleko přesnější. Díky těmto metodám nastává odklon od polymerního modelu struktury HK ve prospěch novějších supramolekulárních teorií.

Autoři Gonzáles-Gaitano a García-Mina zkoumali strukturu HL pomocí dynamického rozptylu světla. V práci byly studovány vzorky HK jednak v alkalickém prostředí (roztok NaOH) a rovněž také v kyselém pH (pH bylo sníženo pomocí kyseliny chlorovodíkové, šťavelové resp. citronové. Při frakcionaci použili 0,1 μm a 0,2 μm filtry. Ve zkoumaných systémech našli významnou molekulární agregaci, která byla způsobena okyselením kyselinou chlorovodíkovou, což je pravděpodobně následek vytvoření vodíkových můstků a hydrofobních interakcí. Když ale použili k okyselení šťavelovou a citronovou kyselinu, tak tyto agregace nenalezli, což může být důsledek molekulární solvatace HK molekulami těchto organických kyselin, které předchází vytvoření vodíkových můstků a hydrofobních interakcí. Autoři práce dále kyselé vzorky opětovně realkalizovali. Získané distribuce velikostí částic byly obdobné s daty naměřenými pro původní vzorky v NaOH, došlo jen ke zmizení malé frakce větších molekul. [29]

Simpson a jeho kolegové použili ke studiu struktury různé techniky nukleární magnetické rezonance. Bylo zajímavé, že dva vzorky huminových látek získané z různých půd, měly podobné strukturní jednotky. Výsledky prokázaly přítomnost molekul s molekulovou hmotností od 500 Da do 2 000 Da, které spolu mohou agregovat do objemnější strukturní jednotky. Kromě toho byly odhaleny interakce ve strukturních meziprostorech molekul, ale pouze mezi molekulami stejného typu (cukry s cukry, aminokyseliny s aminokyselinami, atd.) a ne mezi strukturami v různých kategoriích, jak by se očekávalo u zesíťovaných makromolekul. [30]

V literatuře [31] uvádí autoři, že při použití měkkých ionizačních technik, jako například elektrosprejová ionizace (ESI-MS) a ionizace laserovou desorpcí (LDI-MS), ve hmotnostní spektrometrii bylo dosaženo průměrných molekulových hmotností 1 000–2 000 Da (ESI-MS) a 500–1 000 Da (LDI-MS). Tyto analytické techniky hmotnostní spektrometrie podporují, stejně jako ostatní, koncept huminových kyselin tvořených různě malými molekulami s nízkou molekulovou hmotností, které mohou dále interagovat do supramolekulárních struktur zapojením slabých nevazebných interakcí.

Baigorri a kol. využili SEC a DLS. Výsledkem jejich experimentu byly tři frakce různých molekulových hmotností. Po okyselení roztoků kyselinou octovou a chlorovodíkovou ale došlo k velkému nárůstu nejmenší frakce, která čítala molekuly menší než 5 000 Da. [32]

Schaumann navrhl supramolekulární strukturu v podstatě jako micelární strukturu, kdy nepolární části jsou orientovány dovnitř a polární funkční skupiny jsou orientovány ven. Právě hydrofobní část zvyrazňuje prostorovou heterogenitu struktury a na různé části huminových kyselin se tak mohou vázat různé látky, jako voda, kovy aj. [33]

Piccolovy práce se dají považovat za shrnutí výsledků všech uvedených autorů, sám použil k výzkumu velikostně vylučovací chromatografii i dynamický rozptyl světla. Výsledky jeho experimentů, stejně jako výsledky ostatních, ukazují, že HK nelze chápat jako polymery, ale spíše mohou být interpretovány jako volně vázané huminové supramolekulární asociáty. V tomto konceptu si lze huminové kyseliny představit jako relativně malé molekuly různého původu, které se samovolně organizují do supramolekulárních struktur. Tyto huminové suprastruktury nejsou propojeny kovalentními vazbami, ale jsou stabilizovány slabými nevazebnými interakcemi, jako jsou hydrofobní interakce, van der Waalsovy síly, π - π vazby a CH- π vazby. Dále se také při nízkých hodnotách pH uplatňují vodíkové můstky. Hydrofilní a hydrofobní domény k sobě mohou přiléhat a ve vodě vytváří velké molekulární asociace. Intermolekulární síly určují konformační strukturu a složitost nekovalentních interakcí kontroluje jejich reaktivitu v životním prostředí. Pro posouzení konceptu supramolekulárních asociací musí být klasická definice jak HK, tak FK přehodnocena. Fulvinové kyseliny mohou být považovány za sdružení malých hydrofilních molekul, které obsahují dostatečné množství kyselých funkčních skupin, aby se zachovaly fulvinové shluky dispergované v roztoku při jakékoli hodnotě pH. Huminové kyseliny budou tedy převážně hydrofobní sloučeniny (polymethylenové řetězce, mastné kyseliny, steroidní sloučeniny), které jsou stabilizovány při neutrálním pH hydrofobními disperzními silami (van der Waalsovy síly, π - π vazby, CH- π vazby). Jejich supramolekulární struktury progresivně rostou do větších velikostí tím víc, čím víc se dále formují intermolekulární vodíkové vazby při nižších hodnotách pH, dokud nedojde ke koagulaci. [34]

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Použité chemikálie

- Huminové kyseliny, různé zdroje, bližší popis v Tab. 4 – Popis použitých huminových kyselin.
- Hydroxid sodný, p.a., Penta s.r.o.
- Dihydrogenfosforečnan sodný, p.a., Penta s.r.o.
- Dusičnan stříbrný
- Kyselina fluorovodíková 38–40% p.a., Lach-Ner s.r.o.
- Kyselina chlorovodíková 35% p.a., Penta s.r.o.
- Pyrofosfát sodný, ≥99% p.a., Sigma-Aldrich
- Destilovaná voda

4.2 Použité přístroje

- Hitachi U3900H (Hitachi High Technologies America, Inc)
- Centrifuga (Hettich Rotina 46R)
- Třepačka (Heidolph Vibramax 100)
- pH metr (Mettler Toledo)
- Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments)
- CHNS/O elementární analyzátor (Euro EA3000, EuroVector)
- Termický analyzátor (TGA Q5000, TA Instrument)
- Velikostně-vylučovací chromatografie (SEC-MALS-dVI-dRI systém, kombinace od výrobců Agilent Technologies a Wyatt Technology)

4.3 Příprava huminových kyselin

4.3.1 Extrakce huminových kyselin

Jednotlivé zdrojové matrice použité k izolaci HK jsou sumarizovány v Tab. 4.

Tab. 4 – *Popis použitých huminových kyselin.*

Huminová kyselina	Popis huminové kyseliny
IHSS	Huminový standard (č. 1S104H) zakoupený od Mezinárodní huminové společnosti (IHSS). Zdrojem tohoto standardu je oxidovaný lignit, tzv. leonardit.
KHK	Komerční produkt typu Černý drak od Centrální kompostárny v Brně.
LHHK	Komerční vzorek lignohumátu od firmy Amagro s.r.o.
LHK_HA1	Jihomoravské lignity z dolu Mír v lokalitě Mikulčice.
LHK_HA2	
RHK	Komerční vzorek rašeliny od firmy Agro-Profi s.r.o.
SHK_HA1	Půdní vzorek Luvické černozemě z lokality Praha-Ruzyně.
SHK_HA2	Půdní vzorky (Kambizem) z lokality Ratiškovice (okres Hodonín). Vzorky s označením HA2 a HA4 jsou kontrolní vzorky čistých půd, zbylé dva vzorky jsou pak půdy, které byly ošetřeny aplikací hydrosorbentu.
SHK_HA3	
SHK_HA4	
SHK_HA5	
SHK_HA6	Kambizem, lokalita Březová nad Svitavou.

Všechny huminové kyseliny byly připraveny alkalickou extrakcí z namletého a homogenizovaného vzorku zdrojové organické hmoty (lignit, půda, kompost, rašelina, lignohumát). Nejdříve bylo naváženo 30 g organické hmoty a ten pak byl smíchán s 1 dm³ 0,1 mol·dm⁻³ roztoku kyseliny chlorovodíkové. Suspenze byla ponechána hodinu na třepačce kvůli dekalcinaci. Lignit byl dále promýván dostatečným množstvím destilované vody, odstředován (20 minut, 4000 RPM, 15 °C) a dekantován až do odstranění chloridových iontů (zkouška pomocí dusičnanu stříbrného). Takto předupravený vzorek byl převeden do plastové nádoby s extrakčním činidlem (celkem 2 dm³ 0,1 mol·dm⁻³ NaOH a 0,1 mol·dm⁻³ Na₄P₂O₇) a ponechán přes noc na třepačce. Získaná suspenze byla odstředěna při stejných parametrech nastavení centrifugy. Pevný podíl byl opět podroben extrakci stejným způsobem. Kapalný podíl (roztok huminových a fulvinových kyselin) byl přefiltrován přes filtrační papír filtrační za sníženého tlaku a okyselen koncentrovanou kyselinou chlorovodíkovou na hodnotu pH menší než 1. Po dvou hodinách došlo k vysrážení huminových kyselin, které byly odděleny centrifugací (parametry centrifugy jako v předchozím případě) a převedeny do plastové nádoby s 1 dm³ 0,5 obj. % roztoku kyseliny chlorovodíkové a fluorovodíkové. Nádoba byla ponechána 2 dny na třepačce. Suspenze byla poté odstředěna a pevný podíl byl převeden do dialyzačních membrán a dialyzován proti destilované vodě po dobu 3 týdnů až do vymytí chloridových iontů (zkouška pomocí dusičnanu stříbrného). Po dialýze byl vzorek HK lyofilizován.

4.3.2 Příprava roztoků HK

V rámci bakalářské práce bylo studováno chování všech použitých vzorků huminových kyselin vždy ve třech prostředích – 0,1 mol·dm⁻³ NaOH, 0,1 mol·dm⁻³ fosfátový pufr PBS (pH 7 a 3,5). Jednotlivá prostředí byla zvolena tak, aby byla pokryta co nejširší oblast pH, ve které jsou HK rozpustné. Snahou tedy bylo, aby bylo možné následnou charakterizaci použitým souborem měřících metod poskytnout, co nejkomplexnější popis strukturních změn a chování HK ve vodných roztocích.

Pro samotnou přípravu jednotlivých vzorků byla vždy pevná navážka HK rozpuštěna v malé vialce v 5 ml příslušného prostředí tak, aby finální koncentrace HK ve vzorku byla 0,6 g·dm⁻³. V případě použití rozpouštědel NaOH a PBS (pH 7) byly navážky HK rozpuštěny přímo, ale v případě PBS (pH 3,5) byly navážky nejdříve rozpuštěny ve 4 cm³ PBS (pH=7). Následně byl vzorek titrován 1 mol·dm⁻³ kyselinou chlorovodíkovou na pH 3,5 a doplněn destilovanou vodou na objem 5 cm³. Všechny roztoky byly ponechány přes noc (minimálně 12 hodin) na míchačce.

Takto připravené vzorky HK byly podrobeny následné charakterizaci pomocí UV-VIS spektrometrie, DLS, ELS a SEC-MALS.

4.4 Nastavení přístrojů

4.4.1 Elementární a termogravimetrická analýza

Elementární složení všech studovaných huminových kyselin bylo zjištěno pomocí CHNS/O elementárního analyzátoru Euro EA3000.

Huminové kyseliny použité v této práci byly také termogravimetricky analyzovány na TGA Q5000 v kyslíkové atmosféře (25–1 000 °C). Ze získaných dat byl určen obsah nespálitelného podílu (popela) a celková vlhkost.

4.4.2 UV-VIS spektrometrie

Nejprve byla na přístroji Hitachi U3900H provedena korekce na baselinu pomocí prostředí, ve kterém byly huminové kyseliny rozpuštěny. Měření bylo prováděno v křemenných kyvetách od 850 nm do 200 nm. Z naměřených spekter byly odečteny absorbance při 465 nm a 665 nm, ze kterých byl vypočítán poměr E_4/E_6 (tzv. absorpční koeficient).

4.4.3 Dynamický rozptyl světla

Distribuce velikosti částic byla naměřena pomocí přístroje Zetasizer Nano ZS v plastových kyvetách. Jednotlivá měření byla vždy třikrát zopakována. Každé opakování pak představuje průměrnou distribuci velikosti částic získanou z 15 měření. Výsledky uvedené dále v bakalářské práci představují vždy průměrné distribuce velikosti částic z těchto tří dílčích měření.

4.4.4 Elektroforetický rozptyl světla

Pomocí elektroforetického rozptylu světla byla zkoumána stabilita vzorků huminových kyselin na přístroji Zetasizer Nano ZS. Pro získání zeta potenciálu a konduktivity byly použity vzorky připravené pro měření dynamického rozptylu světla. Hodnoty uvedené dále jsou vždy průměrné hodnoty získané z pěti opakování měření zeta potenciálu respektive konduktivity.

4.4.5 Velikostně vylučovací chromatografie

Pro stanovení molekulových hmotností jednotlivých vzorků HK byla využita metoda SEC. Měřeno bylo na chromatografu s UV-VIS, dVI, dRI a MALS detektory. Chromatografická část (od firmy Agilent Technologies) se skládá z izokratické pumpy, degaseru, autosampleru, kolony (BioSep-SEC-s2000 600×7,8 mm s předkolonou BioSepGUARD SEC-s2000 35×7,8 mm) a detektoru UV-VIS. Další detektory (od firmy Wyatt Technology) jsou DAWN HELEOS II (víceúhlový rozptyl světla – MALS), VISCOSTAR II (diferenční viskozimetr – dVI) a OPTILAB T-REX (diferenční refraktometr – dRI).

Mobilní fází byl 0,1 mol·dm⁻³ fosfátový pufr s přísadkou azidu sodného (10 mmol·dm⁻³). Průtok byl nastaven na 0,6 cm³·min⁻¹ a objem nástřiku každého vzorku do systému na 100 mm³. Všechny vzorky byly před měřením vždy přefiltrovány přes stříkačkový filtr (0,45 μm).

Signály z jednotlivých detektorů byly zaznamenány pomocí programu Astra (Agilent Technologies, verze softwaru 6.1). Molekulová hmotnost byla stanovena výpočtem ze signálu z UV-VIS detektoru metodou kalibrační křivky pomocí programu Origin (Origin Lab, verze softwaru 7.5853). Kalibrační křivka byla získána měřením vzorků polystyrenových standardů (střední molekulové hmotnosti použitých standardů MW = 1530, 16000, 34700, 57500, 70000 a 505100 Da).

5 VÝSLEDKY A DISKUZE

5.1 Charakterizace HK a UV-VIS spektrometrie

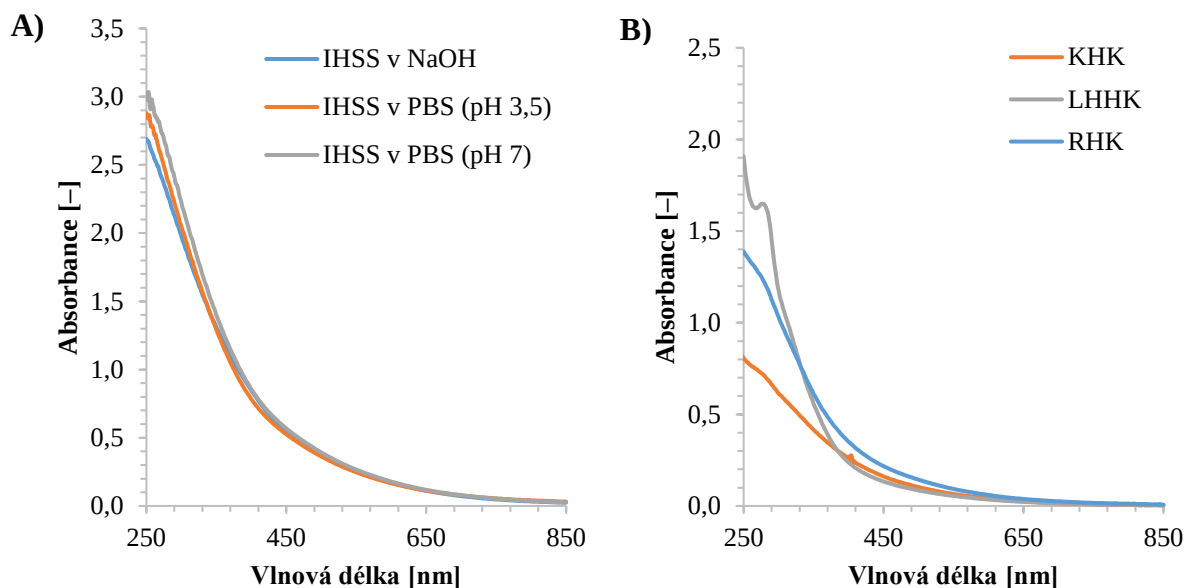
HK využitě v bakalářské práci byly podrobeny základní charakterizaci. Výsledky elementární analýzy určují zastoupení základních prvků C, H, N, S, O a termické analýzy určující obsah popela a celkovou vlhkost. Z naměřených UV-VIS spekter roztoků v PBS (pH 7) byly odečteny hodnoty absorbance při 465 nm (E_4) a při 665 nm (E_6), ze kterých byly vypočteny humifikační indexy (poměr E_4/E_6). Veškeré výsledky jsou uvedeny v Tab. 5 – Obsah popela, vlhkost a elementární složení použitých HK.

Tab. 5 – Obsah popela, vlhkost a elementární složení použitých HK (vztaženo na suchý vzorek bez popela)

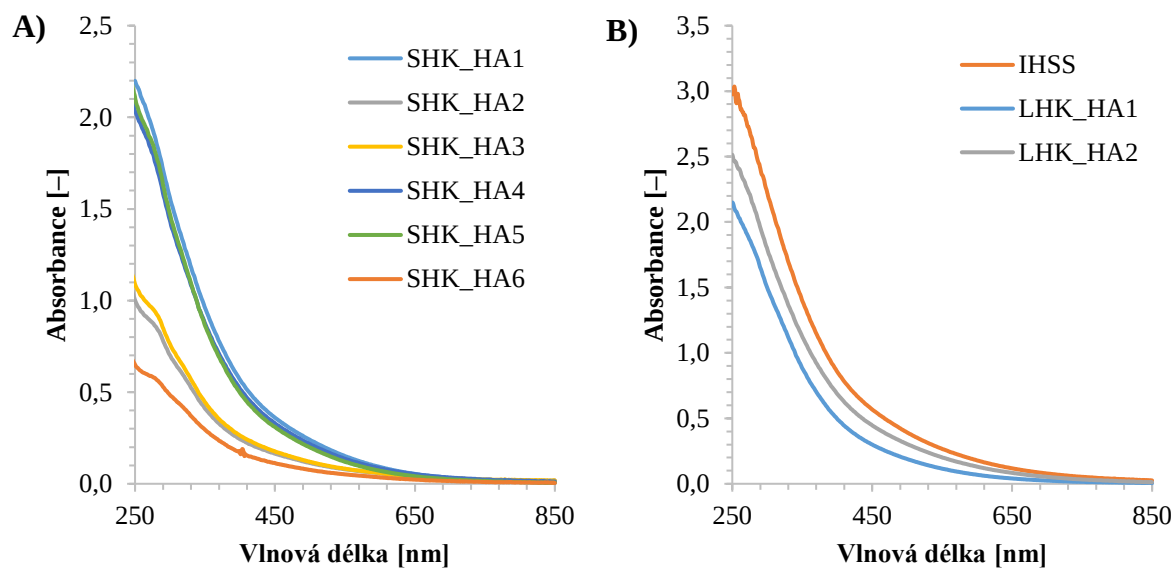
Huminová kyselina	NaOH							
	Elementární analýza (at. %)					Popel (hm.%)	Vlhkost (hm.%)	E_4/E_6
	C	H	N	S	O			
IHSS	48,10	33,20	0,80	0,20	17,70	2,42	8,17	4,90
KHK	37,70	43,20	3,60	-	15,50	1,41	6,04	6,71
LHHK	38,90	43,10	3,60	0,80	13,60	33,38	6,38	5,85
LHK_HA1	42,00	38,50	0,80	0,30	18,50	1,83	6,35	7,46
LHK_HA2	43,90	40,20	0,70	0,20	15,00	1,98	5,41	5,45
RHK	36,70	46,80	1,00	-	15,50	0,16	6,50	5,79
SHK_HA1	40,10	39,00	2,70	0,20	13,30	1,92	5,91	6,96
SHK_HA2	35,50	51,20	2,30	-	11,10	3,40	5,28	4,23
SHK_HA3	35,60	49,00	1,80	-	13,60	2,61	6,26	4,27
SHK_HA4	42,40	42,90	0,80	-	13,90	1,09	6,72	6,35
SHK_HA5	42,00	41,30	0,70	-	15,90	1,24	6,31	7,77
SHK_HA6	35,30	47,30	2,70	-	14,70	7,35	4,56	5,26

Použité huminové kyseliny vykazují běžné zastoupení základních prvků. V porovnání se od ostatních HK nejvíce liší LHHK, což souvisí s tím, že to není klasická huminová kyselina, ale lignohumát, což je komerčně vyráběný syntetický produkt. Z hlediska popela – tedy nespalitelného zbytku (anorganické příměsi, soli), který zůstává po termické analýze – je jasné, že LHHK vykazoval nejvyšší znečištění, jelikož je to komerční vzorek, který se používá bez dalších předúprav. Ostatní HK se běžně získávají alkalickou extrakcí, takže také obsahují okolo 30 hm. % popelovin, ale v rámci BP byly dále vzorky přečišťovány, proto je obsah popelovin výrazně nižší.

Poměr E_4/E_6 je parametr sloužící k charakterizaci HK, nezávisle na zdrojové matici. Není závislý na koncentraci, ale je závislý na hodnotě pH, kdy je maximum dosaženo většinou v neutrální oblasti, proto jsou uvedené poměry vypočítané z roztoků HK v PBS při pH 7. U všech vzorků HK byly hodnoty humifikačního indexu větší než 4, což je ukazatel nízké kondenzace aromatického jádra HK a tato hodnota je charakteristická pro hnědé huminové kyseliny s nižší molekulovou hmotností. Vysoká hodnota humifikačního indexu (6, 7) ukazuje na podobnost s fulvinovými kyselinami a na nízký stupeň humifikace a aromaticity, což znamená vyšší obsah alifatických částí. Naopak nízká hodnota indexu (okolo 2) indikuje černé až hnědé HK s vyšší aromaticitou a kondenzací aromatických jader [10].



Obr. 14 – **A)** UV-VIS spektra IHSS v $0,1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ NaOH a $0,1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ PBS (pH 7 a 3,5)
B) UV-VIS spektra HK získaných z různých zdrojových matric v $0,1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ PBS (pH 7)



Obr. 13 – **A)** UV-VIS spektra půdních HK v $0,1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ PBS (pH 7)
B) UV-VIS spektra lignitických HK v $0,1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ PBS (pH 7)

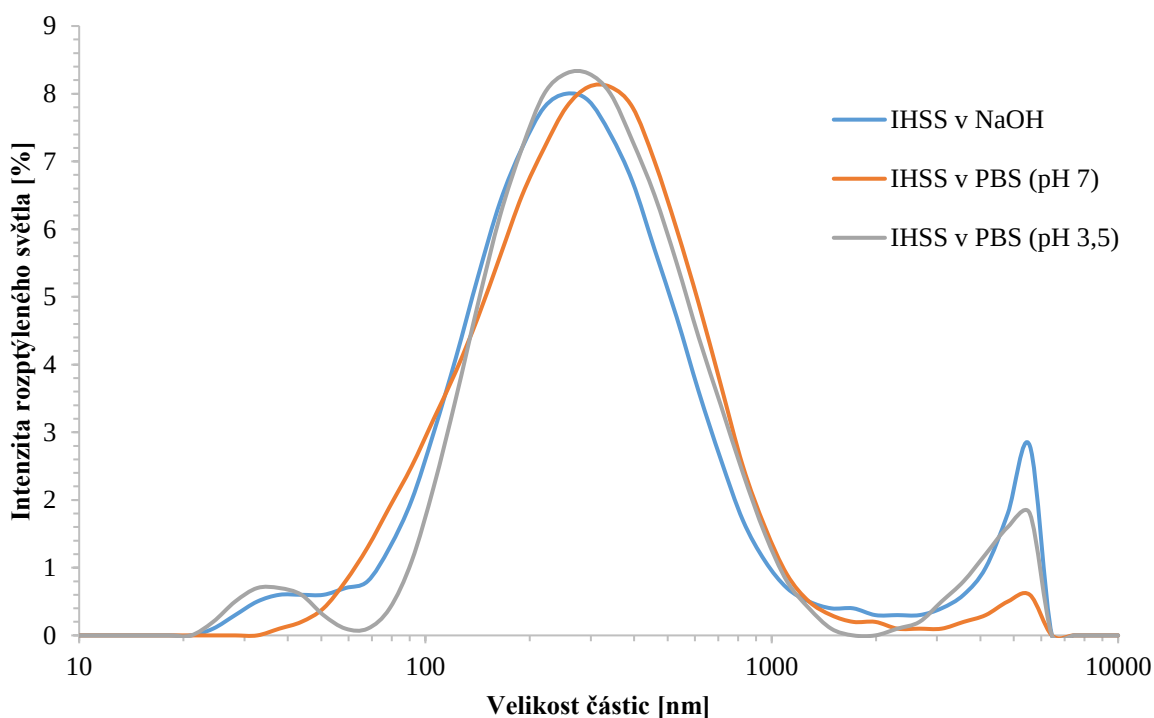
Z Obr. 14 – **A)** UV-VIS spektra IHSS v $0,1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ NaOH a $0,1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ PBS (pH 7 a 3,5) vlevo (graf A) je zřejmé, že HK v různých prostředích mají obdobná absorpční spektra. Podobné výsledky byly získány i pro ostatní vzorky HK použité v této BP.

Na Obr. 14 vpravo (graf B) a na Obr. 13 (graf A a B) lze pozorovat, že naměřená spektra mají typický průběh pro huminové kyseliny, kdy nad 800 nm dosahují prakticky nulové absorbance a s klesající vlnovou délkou dochází k výraznému růstu absorbance. Absorpční maximum huminových kyselin se pohybuje okolo 210 nm, ale v rámci BP bylo měřeno pouze v rozsahu od 250 nm do 850 nm, tudíž toto maximum nebylo detekováno.

Všechny vzorky HK měly podobná absorpční spektra, dokonce i ve všech prostředích, což značí, že navzdory tomu, že byly použity různé zdrojové matrice, tak základní struktura HK je podobná, tedy že tyto látky absorbují podobně. Jediný rozdíl je zřejmý v případě vzorku LHHK, protože jak již bylo zmíněno výše, lignohumát je komerční synteticky připravený produkt a tyto výsledky naznačují mírně odlišnou strukturu tohoto materiálu, odrážející se v jiném absorpčním spektru.

5.2 Dynamický rozptyl světla

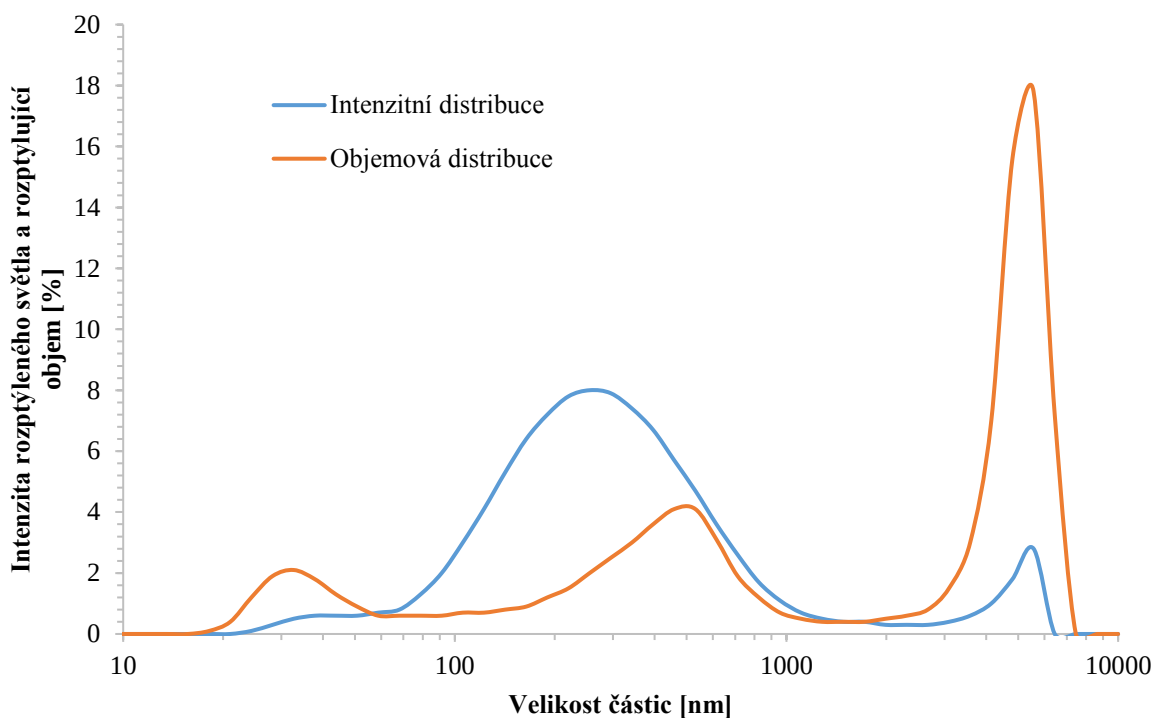
U všech studovaných vzorků huminových kyselin byly proměřeny distribuce velikosti částic. Byly využity techniky rozptylu světla, zejména tedy dynamický rozptyl světla. Výstupem těchto měření je intenzitní a objemová distribuce velikosti částic. V této bakalářské práci jsou pro další diskuzi a porovnání jednotlivých vzorků HK využity intenzitní distribuce.



Obr. 15 – Intenzitní distribuce velikosti částic IHSS v $0,1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ NaOH a $0,1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ PBS (pH 7 a 3,5)

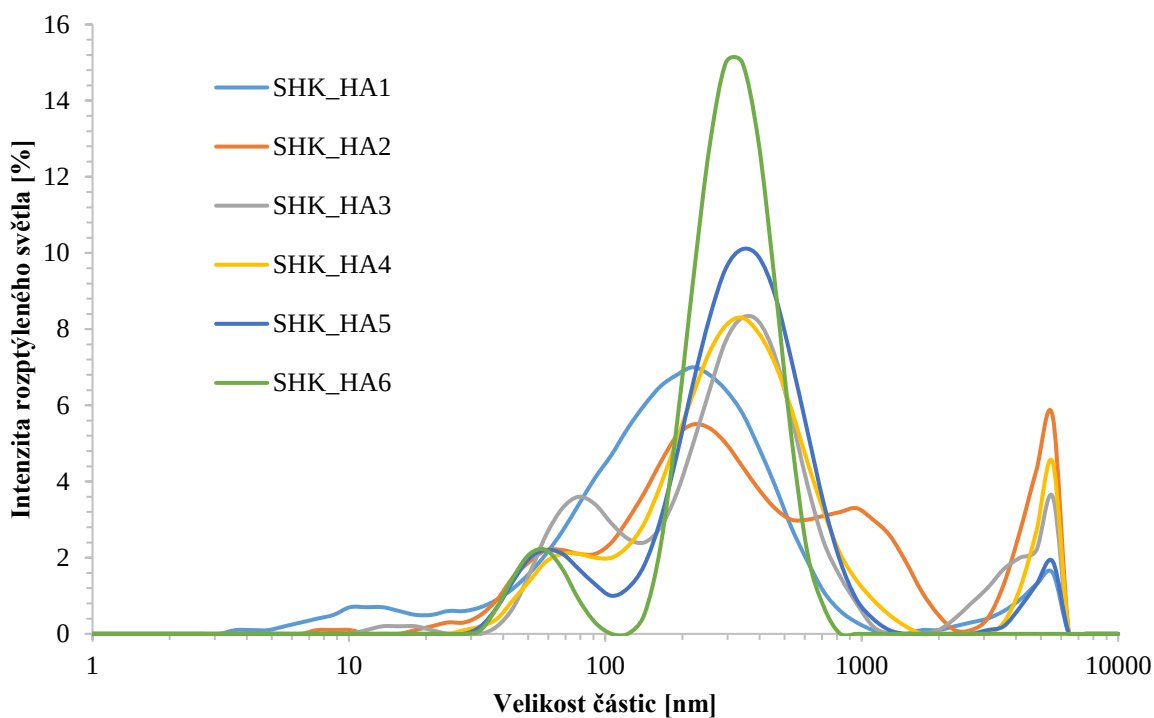
Na Obr. 15 – Intenzitní distribuce velikosti částic IHSS v $0,1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ NaOH a $0,1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ PBS (pH 7 a 3,5) jsou uvedeny intenzitní distribuce pro studovanou huminovou kyselinu IHSS ve všech třech prostředích využívaných v této práci ke studiu. Když se zaměříme na oblast malých molekul (20–60 nm), je patrné, že je nejvyšší intenzita v kyselém prostředí, což souvisí s tím, že po přidavku HCl došlo k odštěpení malých částí z původní supramolekuly. Tato oblast lze přisoudit neagregovaným a neasociovaným molekulám HK. Nicméně, tato intenzita není nijak vysoká, což je ukazatelem buď stále vysokého pH studovaného roztoku, nebo není kyselina chlorovodíková nejvhodnější pro rozštěpení molekuly. Nejspíše by bylo lepší použít organickou kyselinu, například kyselinu octovou, nebo citrónovou. Ve středové oblasti (100–1000 nm) je intenzita částic nejvyšší. Podle

supramolekulární teorie tvoří HK ve vodných prostředích různé asociáty, které jsou spojené slabými nevazebnými interakcemi, což by šlo přirovnat právě k této středové oblasti. Poslední oblasti jsou molekuly větší než 1000 nm. V této oblasti jsou patrně zastoupeny právě agregáty HK, které zůstaly nerozpuštěny a jsou tvořeny buď samotnými huminovými kyselinami, nebo HK adsorbovaným na anorganické materiály, které nebyly v izolačním a purifikačním procesu odstraněny, zejména se jedná o křemičitany a hlinito-křemičitany.

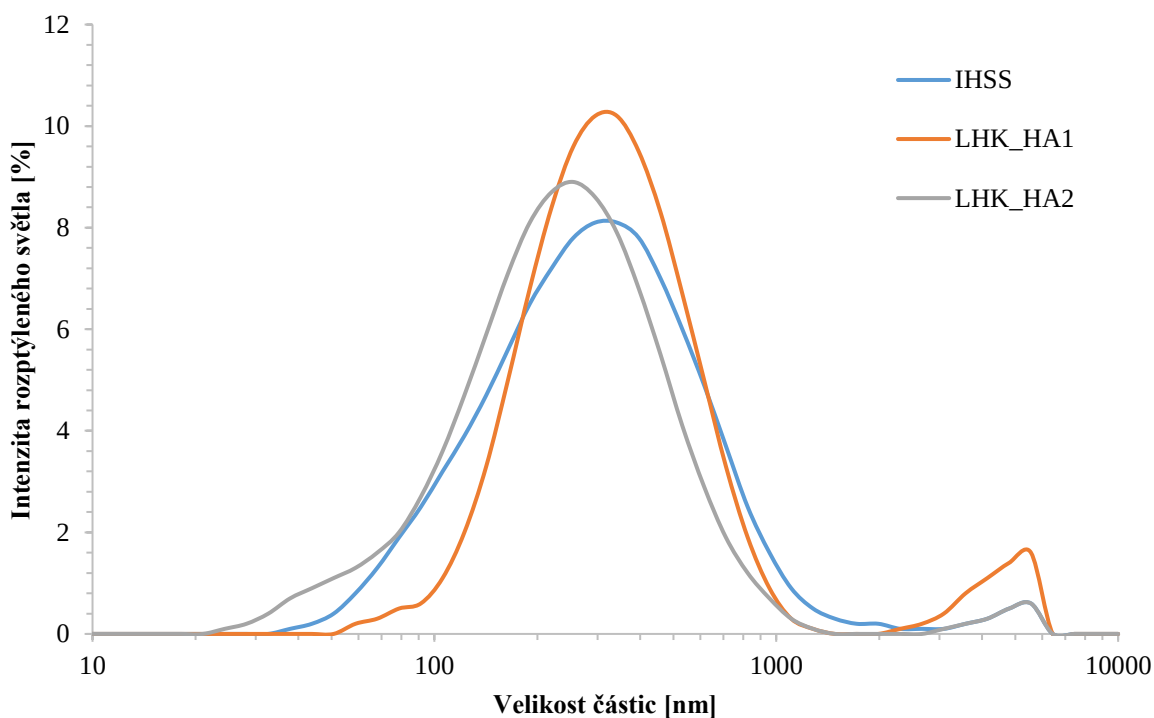


Obr. 16 – Srovnání intenzitní a objemové distribuce IHSS v $0,1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3} \text{ NaOH}$

Na Obr. 16 – Srovnání intenzitní a objemové distribuce IHSS v $0,1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3} \text{ NaOH}$ je uvedeno srovnání intenzitní a objemové distribuce IHSS v prostředí $0,1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3} \text{ NaOH}$. Intenzitní distribuce říká, jak intenzivně jsou jednotlivě velké molekuly zastoupeny v roztoku, kdežto objemová distribuce (pouze matematický přepočet) ukazuje, jaký objem různě velké molekuly zabírají. Nejpatrnější je tento rozdíl v oblasti velkých molekul. Intenzitní distribuce ukazuje, že oproti oblasti různých asociátů (100–1000 nm) je relativně nízké zastoupení velkých agregátů HK (oblast nad 1000 nm). Objemová distribuce zase říká, že i když je intenzitní zastoupení velkých agregátů HK relativně malé, tak právě tyto agregáty zabírají největší část objemu studovaného roztoku. Přesto, co do počtu musí být těchto velkých agregovaných molekul ve vzorku stopové množství, v opačném případě by se totiž výrazněji projevil v intenzitní distribuci.



Obr. 17 – Intenzitní distribuce velikosti částic půdních vzorků HK v $0,1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ PBS (pH 7)

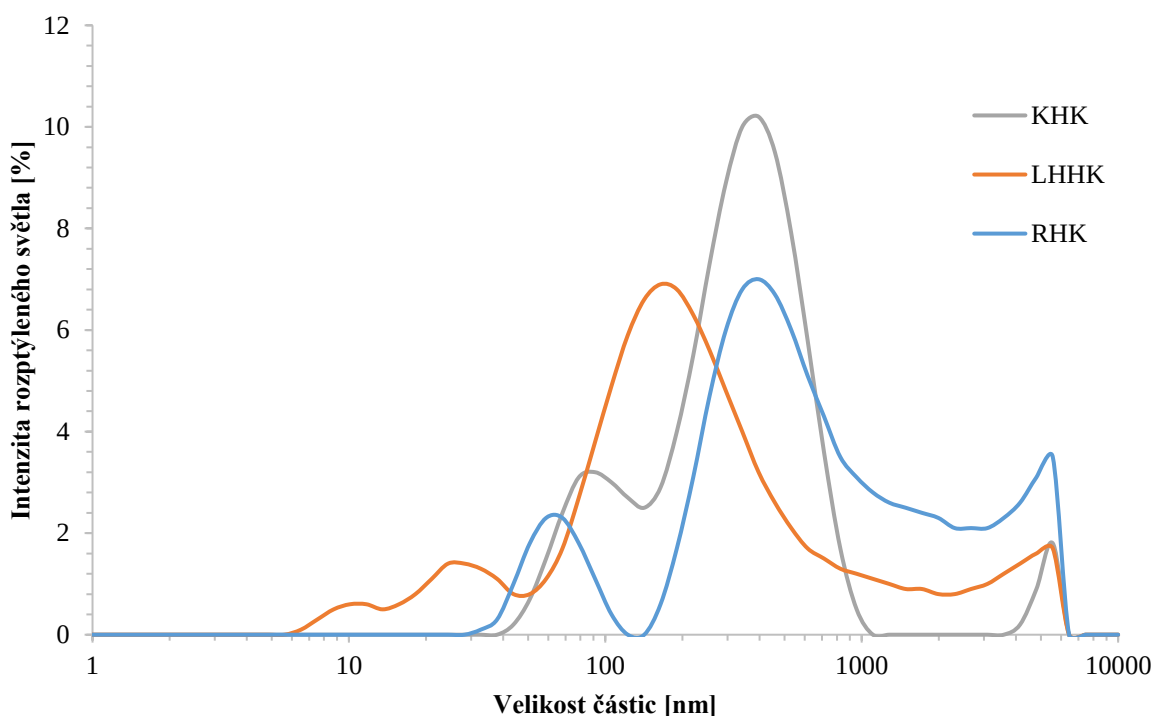


Obr. 18 – Intenzitní distribuce velikosti částic lignitických vzorků HK v $0,1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ PBS (pH 7)

V lignitických HK lze vidět, že pík odpovídající malým molekulám do 100 nm je prakticky o nulové intenzitě, což značí, že jsou hodně asociované, resp. agregované oproti půdním HK, kde lze nalézt větší intenzitu připadající na molekuly do 100 nm, což naznačuje, že v půdních HK jsou více zastoupeny volné neasociované molekuly HK. Při srovnání s intenzitními

distribucemi na Obr. 19 lze usuzovat, že vzorky RHK a KHK jsou svými distribucemi bližší půdním HK než lignitickým, tudíž je v nich jistě větší podíl malých neasociovaných molekul.

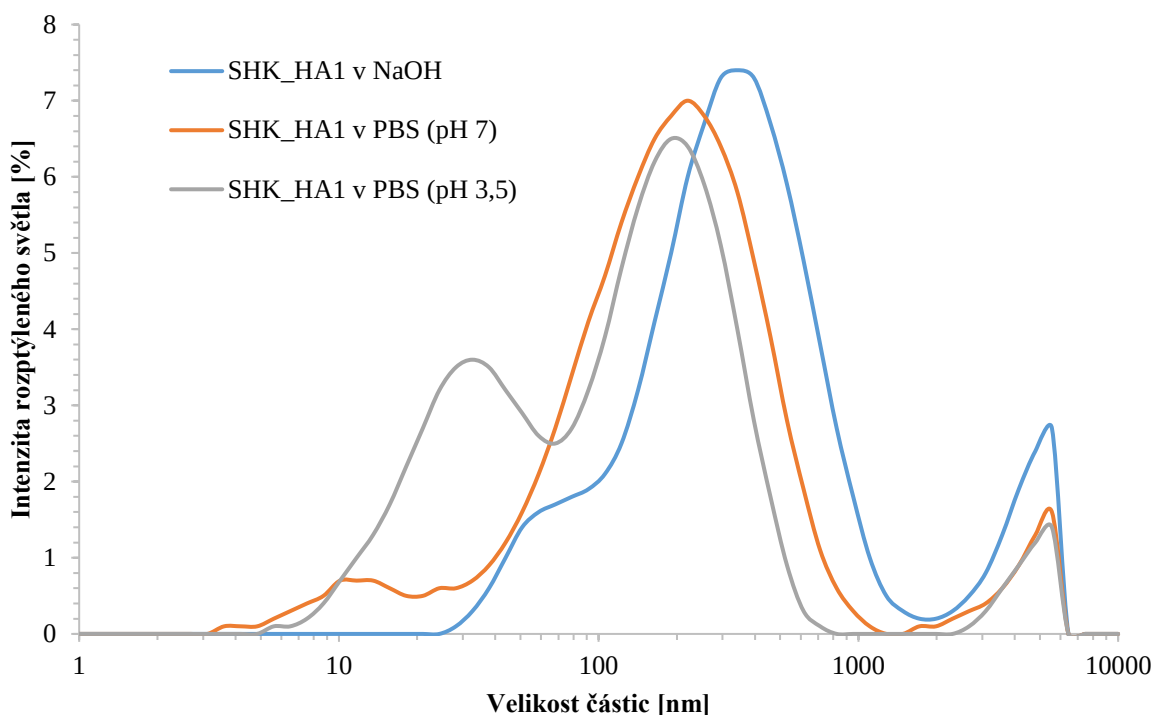
V prostředí neutrálního pufru PBS, jak je možné vidět na Obr. 17 – Intenzitní distribuce velikosti částic půdních vzorků HK v $0,1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ PBS (pH 7), Obr. 18 – Intenzitní distribuce velikosti částic lignitických vzorků HK v $0,1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ PBS (pH 7) a Obr. 19 – Intenzitní distribuce velikosti částic ostatních vzorků HK v $0,1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ PBS (pH 7), lze pozorovat velmi podobné intenzitní distribuce jako v případě zásaditého prostředí NaOH. Nicméně, například u vzorku SHK_HA6 je zřetelně vyšší intenzita supramolekulárních asociátů v porovnání s ostatními huminovými kyselinami a v grafu není pozorovatelná oblast velkých agregátů HK.



Obr. 19 – Intenzitní distribuce velikosti částic ostatních vzorků HK v $0,1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ PBS (pH 7)

V zásaditém prostředí NaOH byly všechny intenzitní distribuce velikosti částic velmi podobné a podporovaly supramolekulární teorii HK. Z grafů intenzitních distribucí šly vždy vypočítat všechny tři výše zmiňované oblasti. Oblast malých, samostatných a neagregovaných molekul, která byla s nejvyšší intenzitou nejvíce zřetelná u vzorku LHHK, protože lignohumát má obecně malé molekuly. Dále následovala oblast supramolekulárních asociátů, která byla u všech vzorků zastoupena prakticky stejnými intenzitami, a oblast velkých agregátů HK. V kyselém prostředí PBS okyseleném kyselinou chlorovodíkovou jsou již více zastoupeny oblasti samostatných, neagregovaných molekul, jak se molekula HCl dostala hlouběji do struktury huminové kyseliny a tuto strukturu narušila. Intenzita však stále není nijak vysoká, při použití organických kyselin (např. kyseliny octové) by se intenzita neasociovaných molekul nejspíše zvýšila, protože molekula takovéto organické kyseliny by se lépe inkorporovala do struktury supramolekul huminových kyselin a více by ji narušila [34]. Nejzajímavější výsledky byly pozorovány u vzorku LHHK, kde v kyselém

prostředí intenzita neasociovaných samostatných molekul vzrostla a naopak intenzita supramolekulárních asociátů klesla. Ve výsledku byly intenzity obou píků na prakticky stejných hodnotách.



Obr. 20 – Intenzitní distribuce velikosti částic SHK_HA1 v $0,1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ NaOH a $0,1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ PBS (pH 7 a 3,5)

Podobné výsledky jako u vzorku LHHK lze pozorovat u vzorku SHK_HA1 na Obr. 20 – Intenzitní distribuce velikosti částic SHK_HA1 v $0,1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ NaOH a $0,1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ PBS (pH 7 a 3,5), kde je viditelný malý posun intenzit k menším molekulám při změně prostředí ze zásaditého na neutrální. V kyselém prostředí je už zřetelněji viditelná oblast malých a neasociovaných molekul v důsledku použití kyseliny chlorovodíkové, která z části dokázala narušit supramolekulární strukturu HK. Molekula přidané kyseliny dokáže narušit strukturu HK a rozrušit ji na menší fragmenty molekuly, nicméně HK jsou v kyselém prostředí nerozpustné, tudíž by spíše mělo docházet k nárůstu velikosti částic v důsledku agregace, k čemuž by patrně došlo při dalším snížení hodnoty pH vzorku.

5.3 Elektroforetický rozptyl světla

Hodnota zeta potenciálu udává, jak jsou roztoky HK stabilní vůči vzájemné agregaci částic. Pokud je hodnota zeta potenciálu vyšší než 30 mV , částice mají dostatečný náboj, aby se odpuzovaly, tudíž jsou vůči agregaci stabilní. Zeta potenciál také souvisí s konduktivitou, mění se s ní nepřímo úměrně, tudíž pokud dojde ke snížení konduktivity, dojde i ke zvýšení hodnoty zeta potenciálu, což potvrzují i naměřené výsledky uvedené v Tab. 6. S přidáním nízkomolekulárního elektrolytu dochází podle teorie elektrické dvojvrstvy k růstu konduktivity, odstínuje se náboj na koloidu a tím pádem dochází k poklesu absolutní hodnoty zeta potenciálu k nule. V případě provedených ELS měření studovaných

vzorků HK se ovšem spíše než vliv iontové síly na stabilitu vzorků HK projevil výrazněji vliv pH.

Tab. 6 – Stanovené průměrné hodnoty konduktivity a zeta potenciálů jednotlivých HK

Humínová kyselina	NaOH		PBS (pH=7)		PBS (pH=3,5)	
	ζ [mV]	κ [mS·cm ⁻¹]	ζ [mV]	κ [mS·cm ⁻¹]	ζ [mV]	κ [mS·cm ⁻¹]
IHSS	-34,62 ± 1,89	17,56 ± 0,36	-27,22 ± 1,06	5,81 ± 0,22	-27,20 ± 0,62	6,26 ± 0,35
KHK	-29,54 ± 0,94	19,16 ± 0,44	-29,08 ± 2,24	7,56 ± 0,33	-21,64 ± 1,81	7,36 ± 0,48
LHHK	-35,56 ± 0,98	16,52 ± 0,08	-28,34 ± 1,26	7,36 ± 0,20	-27,14 ± 1,60	7,35 ± 0,50
LHK_HA1	-36,58 ± 0,93	14,96 ± 0,17	-31,34 ± 1,70	6,85 ± 0,14	-25,04 ± 1,22	6,39 ± 0,20
LHK_HA2	-37,34 ± 1,30	17,24 ± 0,34	-24,04 ± 1,48	5,79 ± 0,25	-24,64 ± 1,35	6,67 ± 0,18
RHK	-28,24 ± 1,31	17,52 ± 0,20	-18,98 ± 1,01	6,17 ± 0,05	-14,74 ± 0,97	6,95 ± 0,23
SHK_HA1	-44,46 ± 1,84	16,56 ± 0,22	-28,40 ± 2,46	6,61 ± 0,47	-24,58 ± 0,47	6,55 ± 0,19
SHK_HA2	-22,38 ± 2,09	14,16 ± 0,76	-21,20 ± 0,75	6,66 ± 0,25	-13,36 ± 1,19	6,45 ± 0,28
SHK_HA3	-24,74 ± 0,57	17,78 ± 0,22	-22,43 ± 1,16	6,27 ± 0,28	-14,20 ± 1,26	6,68 ± 0,54
SHK_HA4	-32,32 ± 2,53	15,64 ± 0,95	-32,32 ± 1,15	7,13 ± 0,31	-24,50 ± 1,80	6,30 ± 0,42
SHK_HA5	-33,06 ± 1,34	17,90 ± 0,41	-29,98 ± 1,03	7,52 ± 0,12	-25,60 ± 1,09	6,76 ± 0,31
SHK_HA6	-26,66 ± 0,81	19,18 ± 0,33	-23,16 ± 1,79	7,56 ± 0,29	-16,46 ± 1,01	7,33 ± 0,38

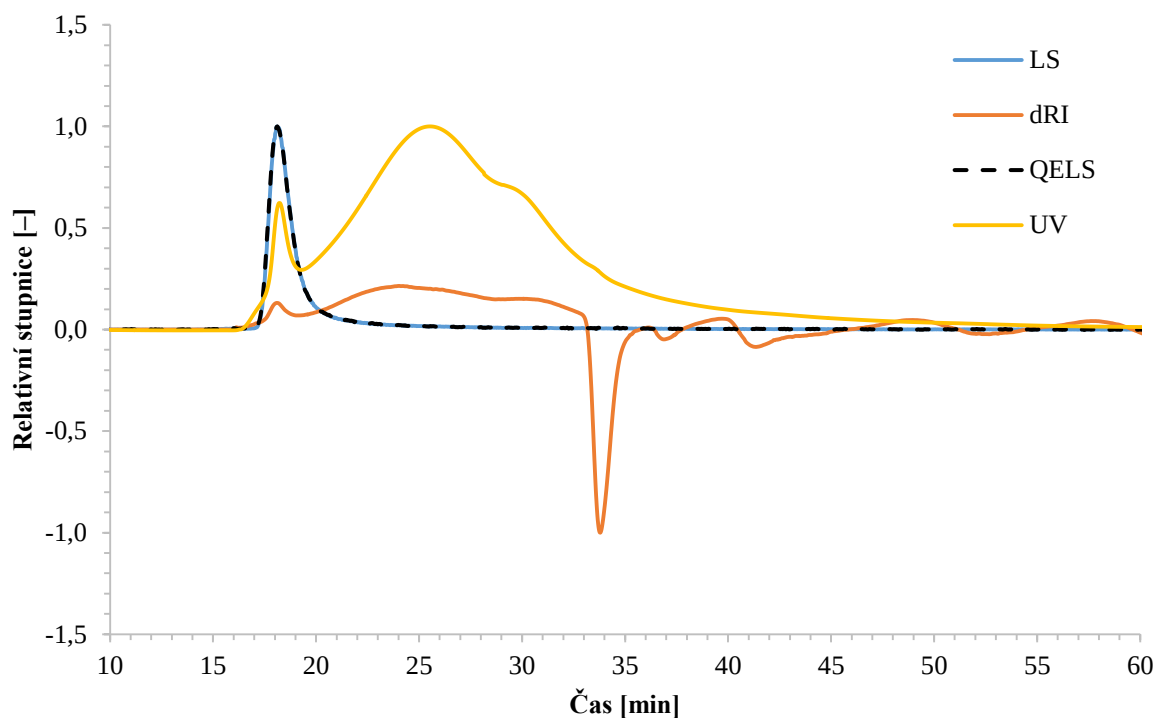
Dle naměřených výsledků v Tab. 6 – Stanovené průměrné hodnoty konduktivity a zeta potenciálů jednotlivých HK je dobře viditelné, že v zásaditém prostředí NaOH jsou téměř všechny vzorky HK stabilní, až na tři půdní vzorky SHK_HA2, SHK_HA3 a SHK_HA6. Další vzorky KHK a RHK jsou na hranici stability. V neutrálním i kyselém prostředí jsou hodnoty zeta potenciálu už velmi podobné, nicméně tu už ve většině případů dochází k destabilizaci, ale například LHK_HA1 zůstává i v neutrálním prostředí stále stabilní a některé další HK (KHK, LHHK, SHK_HA5) zůstávají na hranici stability. Obecně ovšem s klesající hodnotou pH lze u všech studovaných vzorků pozorovat pokles absolutní hodnoty zeta potenciálu směrem k nule, tedy postupnou destabilizaci vzorků.

5.4 Velikostně vylučovací chromatografie

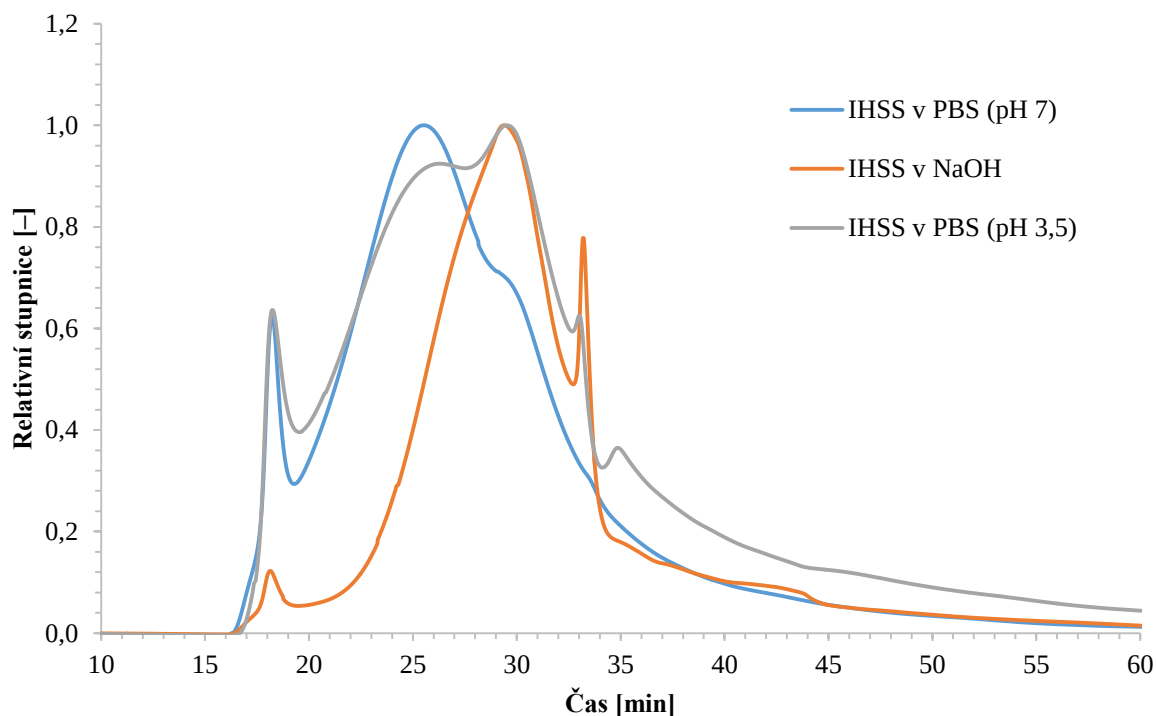
Pro stanovení molekulových hmotností byla využita SEC a sestava čtyř detektorů – dRI, QELS, MALS a UV (příklad všech signálů z detektorů pro vzorek IHSS v neutrálním prostředí PBS je na Obr. 21). Molekulová hmotnost jednotlivých vzorků byla stanovena z naměřených signálů z UV-VIS detektoru. Výsledné molekulové hmotnosti byly vypočítány metodou kalibrační křivky (přepočet pomocí kalibrační křivky PS standardů – více detailů viz kap. 4.4.5) pomocí programu OriginLab Pro 8. Všechny vypočítané molekulové hmotnosti jsou uvedeny v Tab. 7, Tab. 8 a Tab. 9.

Z grafu na Obr. 21 lze vypožorovat, že nejdříve z kolony vycházejí velké agregáty, které jsou ve stacionární fázi zadrženy nejkratší dobu a odpovídá jim pík v rozmezí elučního času 17–20 min, poté vychází supramolekulární asociáty molekul, kterým zase odpovídá pík v rozmezí 32–40 min a někdy při nižší koncentraci vzorku se objevuje i další pík, který reprezentuje malé neasociované molekuly, nicméně ten na tomto chromatogramu není vidět.

Všechny získané chromatogramy potvrzují supramolekulární teorii HK a jsou v souladu s daty získanými z DLS měření pro všechny vzorky HK.



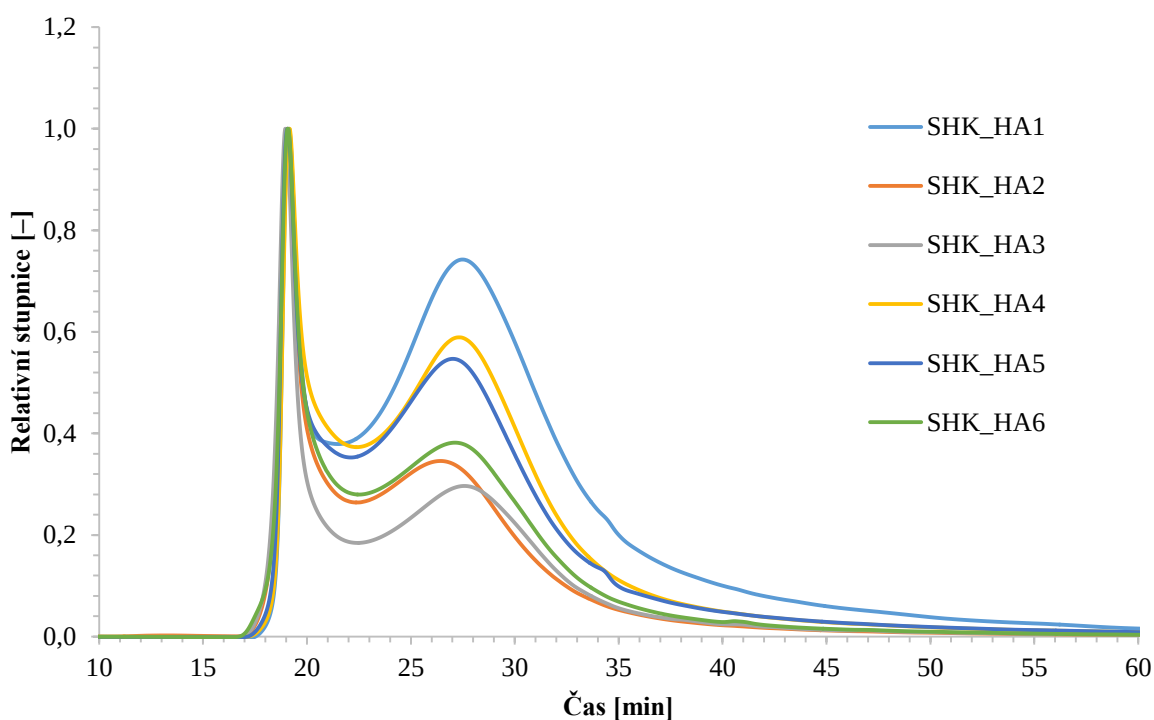
Obr. 21 – Příklad signálů ze všech detektorů velikostně vylučovací chromatografie pro vzorek IHSS v neutrálním prostředí $0,1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ PBS. (Signály z LS a QELS se překrývají.)



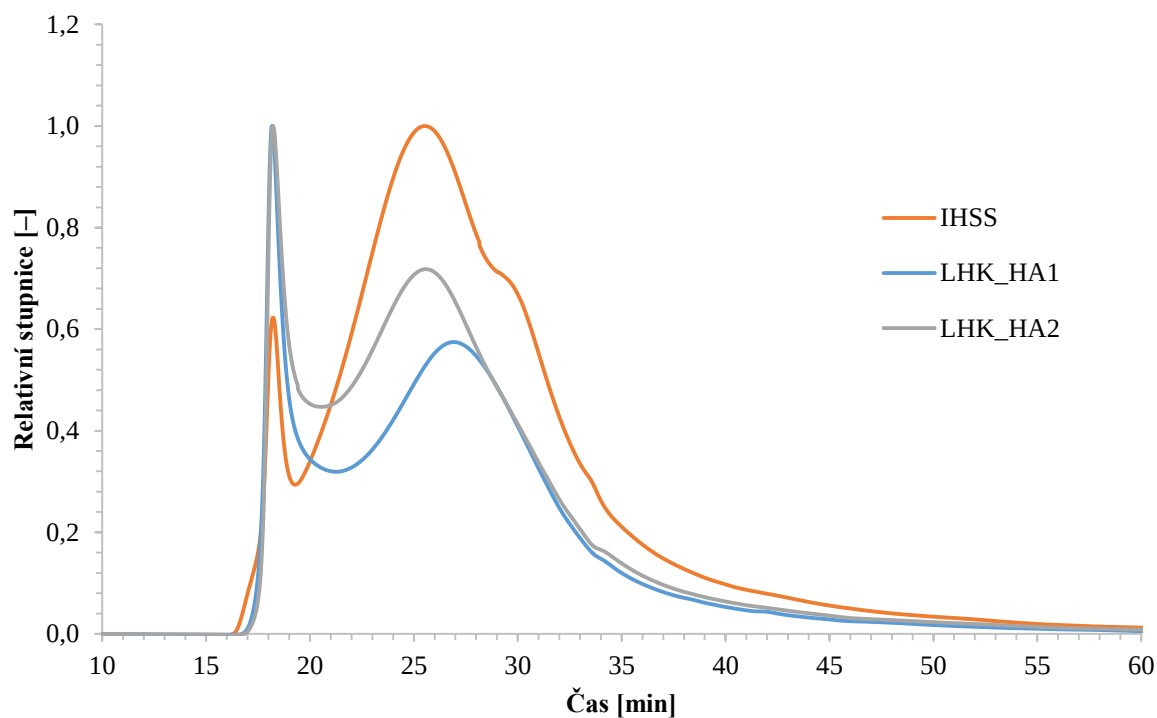
Obr. 22 – Porovnání signálů z UV detektoru vzorku IHSS v $0,1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ NaOH a $0,1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ PBS (pH 7 a 3,5)

Na Obr. 22 je zobrazeno porovnání UV signálů IHSS v různých prostředích. Pokud vezmeme v potaz, že v zásaditém pH jsou kyselé funkční plně disociované, tím pádem tam je nábojová repulze na řetězcích a molekuly jsou více natažené, tudíž mají supramolekulární asociáty menší molekulovou hmotnost. V neutrální oblasti je tato disociace menší, tím pádem i nábojová repulze je menší a tvoří se klubka supramolekul HK podobné micelám, které jsou stabilizované vodíkovými vazbami a tím se v neutrální oblasti posouvá distribuce hmoty do větších supramolekul tvaru klubka. S klesajícím pH jsou kyselé funkční skupiny stále méně disociované, postupně se rozpadají supramolekuly a nakonec nastává agregace HK (hlavně od pH okolo 2) [35].

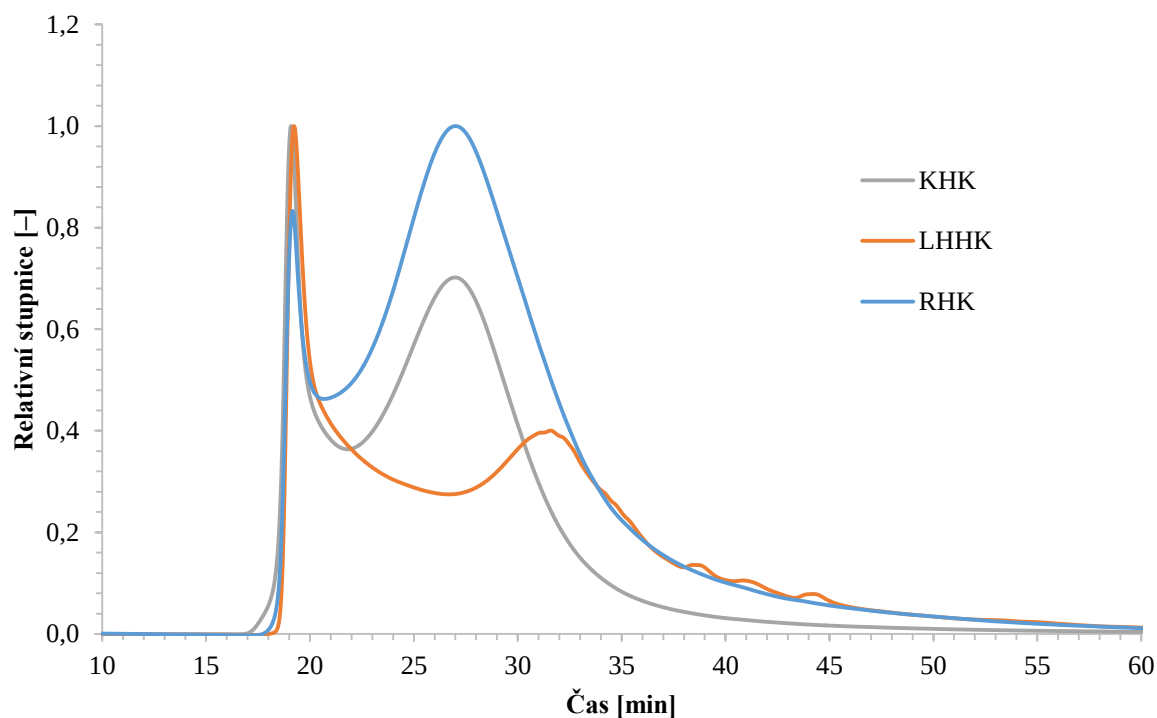
Můžeme si všimnout, že v zásaditém prostředí NaOH jsou nejméně zastoupeny právě agregáty HK, které kolonou prochází v nejkratším čase, zato v kyselém a neutrálním prostředí PBS jich je daleko více. Je zajímavé, že právě v zásaditém prostředí je charakteristický pík pro supramolekulární asociáty na UV signálu posunut k vyššímu retenčnímu času, tudíž se dá usuzovat, že právě v tomto prostředí mají asociáty nejnižší molekulovou hmotnost. V kyselém prostředí PBS je zase viditelný malý pík v nejpozdějším retenčním čase, takže je pravděpodobné, že použití HCl způsobilo odštěpení malých molekul, které se v koloně zadržely nejdéle a jsou tímto píkem zřejmě reprezentovány. Potom by jejich molekulová hmotnost dosahovala hodnot v rozmezí 150–200 Da. Nicméně pravděpodobně, že by se neasociované molekuly zadržely ve stacionární fázi daleko déle a tento pík je stále jakýmsi signálem pro opožděné supramolekulární asociáty.



Obr. 23 – Signály z UV detektoru pro půdní vzorky HK v $0,1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ PBS (pH 7)



Obr. 24 – Signály z UV detektoru pro lignitické vzorky HK v $0,1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ PBS (pH 7)



Obr. 25 – Signály z UV detektoru pro ostatní vzorky HK v $0,1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ PBS (pH 7)

Z UV signálů zobrazených na Obr. 23, Obr. 24 a Obr. 25 je vidět, že píky charakteristické jak pro agregáty HK, tak pro supramolekulární asociáty jsou prakticky ve stejných retenčních časech, tudíž mají v tomto neutrálním prostředí PBS prakticky stejné molekulové hmotnosti. Výjimku ovšem tvoří vzorek LHHK, který má obecně menší velikost molekul, než ostatní

vzorky HK, což dokazuje i vyšší hodnota retenčního času pro supramolekulární asociáty, jelikož se tyto menší molekuly zadržely ve stacionární fázi kolony déle.

Tab. 7 – Vypočítané molekulové hmotnosti HK v prostředí 0,1 mol·dm⁻³ NaOH

Huminová kyselina	Agregáty HK		Supramolekulární asociáty	
	M _w [kDa]	PDI [–]	M _w [kDa]	PDI [–]
IHSS	55,822 ± 4,143	1,035 ± 0,007	1,673 ± 0,259	2,750 ± 0,071
KHK	51,950 ± 0,289	1,045 ± 0,007	3,361 ± 0,060	3,575 ± 0,078
LHHK	44,387 ± 1,240	1,035 ± 0,007	0,823 ± 0,042	2,025 ± 0,007
LHK_HA1	55,333 ± 5,310	1,030 ± 0,017	2,849 ± 0,348	4,320 ± 0,400
LHK_HA2	55,858 ± 6,374	1,030 ± 0,014	2,260 ± 0,213	3,655 ± 0,318
RHK	53,462 ± 5,133	1,040 ± 0,017	3,580 ± 0,370	4,610 ± 0,386
SHK_HA1	53,995 ± 4,473	1,037 ± 0,015	2,479 ± 0,212	3,850 ± 0,226
SHK_HA2	53,177 ± 0,610	1,055 ± 0,007	3,330 ± 0,006	4,045 ± 0,021
SHK_HA3	52,737 ± 0,148	1,055 ± 0,007	3,075 ± 0,110	3,960 ± 0,099
SHK_HA4	54,897 ± 0,169	1,035 ± 0,007	3,633 ± 0,021	4,570 ± 0,099
SHK_HA5	54,702 ± 0,099	1,045 ± 0,007	3,142 ± 0,015	4,400 ± 0,014
SHK_HA6	52,454 ± 1,136	1,055 ± 0,007	3,625 ± 0,084	3,730 ± 0,141

Tab. 8 – Vypočítané molekulové hmotnosti HK v prostředí 0,1 mol·dm⁻³ PBS (pH 7)

Huminová kyselina	Agregáty HK		Supramolekulární asociáty	
	M _w [kDa]	PDI [–]	M _w [kDa]	PDI [–]
IHSS	47,615 ± 3,161	1,040 ± 0,014	5,014 ± 0,401	6,515 ± 1,280
KHK	47,850 ± 0,016	1,025 ± 0,007	3,759 ± 0,133	2,200 ± 0,057
LHHK	39,440 ± 2,672	1,065 ± 0,021	0,647 ± 0,059	2,645 ± 0,007
LHK_HA1	44,216 ± 6,689	1,065 ± 0,049	2,965 ± 0,076	3,435 ± 0,191
LHK_HA2	42,420 ± 0,622	1,035 ± 0,007	3,542 ± 0,218	3,645 ± 0,035
RHK	44,149 ± 4,268	1,060 ± 0,052	4,345 ± 1,082	4,027 ± 0,952
SHK_HA1	43,114 ± 2,601	1,040 ± 0,009	3,437 ± 0,205	4,010 ± 0,057
SHK_HA2	49,651 ± 0,299	1,035 ± 0,007	3,806 ± 0,033	2,260 ± 0,537
SHK_HA3	51,601 ± 0,954	1,035 ± 0,008	3,084 ± 0,128	2,080 ± 0,141
SHK_HA4	45,709 ± 0,448	1,038 ± 0,006	3,069 ± 0,041	2,265 ± 0,163
SHK_HA5	48,207 ± 0,049	1,025 ± 0,007	3,730 ± 0,005	2,265 ± 0,049
SHK_HA6	48,102 ± 0,241	1,045 ± 0,011	3,255 ± 0,038	2,340 ± 0,283

Tab. 9 – Vypočítané molekulové hmotnosti HK v prostředí 0,1 mol·dm⁻³ PBS (pH 3,5)

Humínová kyselina	Agregáty HK		Supramolekulární asociáty	
	M _w [kDa]	PDI [–]	M _w [kDa]	PDI [–]
IHSS	42,542 ± 0,223	1,045 ± 0,009	3,845 ± 0,023	7,650 ± 0,240
KHK	48,784 ± 0,132	1,030 ± 0,008	3,132 ± 0,231	2,545 ± 0,049
LHHK	42,876 ± 0,013	1,030 ± 0,002	0,735 ± 0,052	1,790 ± 0,085
LHK_HA1	46,407 ± 0,263	1,040 ± 0,010	2,623 ± 0,013	4,120 ± 0,014
LHK_HA2	40,173 ± 1,431	1,070 ± 0,028	0,436 ± 0,020	1,670 ± 0,028
RHK	44,915 ± 0,918	1,050 ± 0,014	2,205 ± 0,119	3,490 ± 0,085
SHK_HA1	39,954 ± 0,331	1,055 ± 0,007	2,930 ± 0,125	4,980 ± 0,014
SHK_HA2	-	-	0,589 ± 0,002	2,055 ± 0,007
SHK_HA3	-	-	0,379 ± 0,009	4,965 ± 0,009
SHK_HA4	44,686 ± 1,648	1,035 ± 0,007	2,997 ± 0,086	2,500 ± 0,085
SHK_HA5	45,858 ± 0,303	1,035 ± 0,009	2,604 ± 0,144	2,375 ± 0,148
SHK_HA6	-	-	0,523 ± 0,030	1,275 ± 0,021

Vypočítané molekulové hmotnosti v prostředí NaOH jsou uvedeny v Tab. 7. Lze pozorovat, že velké agregáty HK mají velmi podobné hodnoty molekulové hmotnosti, které se pohybují v desítkách tisíc Daltonů. Molekulární hmotnosti supramolekulárních asociovaných komplexů se pohybují v rozmezí 1–4 kDa. Jedinou výjimku tvoří vzorek LHHK (lignohumát). U tohoto vzorku byla pozorována rozdílná distribuce již během měření metodou DLS. Obdobně jako v předchozím případě vzorek LHHK vykazuje posun v distribuci hmoty směrem k menším molekulám o menší molekulové hmotnosti. Molekulové hmotnosti v neutrálním prostředí se velmi podobají těm v zásaditém prostředí, včetně výjimky v podobě vzorku LHHK, jehož hmotnost supramolekulárních asociátů opět nedosáhla ani 1 kDa.

V kyselém prostředí již ale hodnoty molekulových hmotností obecně poklesly. Velké agregáty huminových kyselin mají stále hodnoty pohybující se okolo 40 kDa, nicméně intenzita píku odpovídající těmto agregátům je v chromatografických signálech nižší, což se dá vysvětlit tím, že velká část agregátů ještě více zagregovala a vzhledem k tomu, že se vzorky filtrovaly přes 0,45 μm, tak byly tyto velké agregáty pravděpodobně ze vzorku odfiltrvány. U poloviny půdních vzorků (SHK_HA2, SHK_HA3 a SHK_HA6) dokonce nebyly velké agregáty zjištěny vůbec, což si vysvětlují tak, že byly tyto velké agregáty odfiltrvány. Je to velmi zvláštní, protože pH 3,5 by nemělo způsobit tak velkou agregaci, možná byla kyselina chlorovodíková přidána příliš rychle, nebo ve větším množství, tudíž došlo nejspíše k lokálnímu poklesu pH a tím pádem i k agregaci. Hodnoty molekulových hmotností supramolekulárních asociátů mají oproti ostatním prostředím také nižší hodnoty. U vzorku LHHK opět, že hodnoty nedosáhly ani 1 kDa, ale ještě nižších hodnot dosáhl lignitický vzorek LHK_HA2. Tři již zmíněné půdní vzorky, u kterých nebyly pozorovány agregáty HK, mají také velmi nízké hodnoty molekulových hmotností supramolekulárních asociátů, což si vysvětlují opět ze stejného důvodu, a to, že byly zagregované molekuly odfiltrvány.

6 ZÁVĚR

Úkolem této bakalářské práce bylo prostudovat supramolekulární strukturu huminových kyselin na řadě vzorků s rozdílnou zdrojovou maticí a také prozkoumat vliv prostředí s rozdílnou hodnotou pH na stabilitu a strukturu HK.

Byla provedena charakterizace HK pomocí metod elementární analýzy, termogravimetrické analýzy a UV-VIS spektrometrie, ze kterých bylo zjištěno zastoupení jednotlivých prvků, obsah spalín a humifikační index.

Následně byla zkoumána struktura HK v jednotlivých prostředích pomocí metod dynamického a elektroforetického rozptylu světla a velikostně vylučovací chromatografie. Pomocí DLS bylo zjištěno, že v každém prostředí a téměř ve všech vzorcích jsou přítomny velké agregáty HK, supramolekulární asociáty a malé neasociované molekuly. V zásaditém prostředí NaOH a neutrálním prostředí PBS byly naměřené intenzitní distribuce velikosti částic podobné, ale v kyselém prostředí PBS, zprostředkovaném přídavkem HCl, byla o něco výraznější oblast neasociovaných molekul. Pozorované chování HK ve vzorcích okyselených přídavkem HCl je v souladu s výsledky publikovanými v literatuře. Přídavek HCl způsobí pouze destabilizaci supramolekul změnou pH. Případný rozpad supramolekul HK na jednotlivé samostatné molekuly by byl dále pozorován až po přídavku organické kyseliny. Další alternativou by bylo výraznější snížení pH vzorků, pak už by ovšem v souvislosti s nerozpustností HK v kyselých roztocích celkově hrozila celková koagulace HK.

Pomocí ELS byla dále zkoumána stabilita a konduktivita vzorků HK v různých prostředích. Bylo zjištěno, že zeta potenciál souvisí s konduktivitou, pokud došlo ke snížení konduktivity, došlo ke snížení zeta potenciálu. U zkoumaných vzorků nebyl na stabilitu takový vliv iontové síly jako pH prostředí, to mělo daleko větší vliv. V zásaditém prostředí byly záporné hodnoty zeta potenciálu nejnižší, a tudíž byly vzorky nejvíce stabilní vůči vzájemné agregaci. S poklesem pH prostředí rostla hodnota zeta potenciálů, takže klesala stabilita roztoků vůči agregaci.

Vypočítané molekulové hmotnosti ze signálů UV detektoru SEC chromatografie potvrzují přítomnost velkých agregátů HK a supramolekulárních asociátů, nicméně malé neasociované molekuly už objeveny nebyly. Nejspíše se ztratily v signálu z detektoru mezi supramolekulárními asociáty. Také z tohoto důvodu bude do budoucna lepší prozkoumat vliv nižšího pH prostředí a organické kyseliny na supramolekulární strukturu. Z výsledků byl ale pozorován pokles molekulových hmotností v kyselém prostředí oproti zásaditému a neutrálnímu, jak byly supramolekulární agregáty po vzájemné agregaci odfiltrovány z roztoku.

Použitými metodami bylo potvrzeno supramolekulární chování huminových kyselin a také, že chování HK v roztocích je nezávislé na zdrojové maticí až na drobné posuny v naměřených distribucích směrem k větším částicím o větší molekulové hmotnosti a naopak. Dále byl studován vliv pH a bylo zjištěno, že v měřeném rozsahu nedochází k nějak výrazným změnám, jen v kyselé oblasti lze pozorovat drobné odchylky, kdy u některých vzorků byla pozorována počínající agregace. Nicméně tento fakt bude ještě třeba lépe prozkoumat v navazujících pracích.

7 POUŽITÁ LITERATURA

- [1] NOVÁK, F., HRABAL, R. Kvantitativní ¹³ C NMR spektroskopie huminových látek. *Chemické Listy*. 1110, 105(10), 752-760 [cit. 2016-10-30]. ISSN 00092770.
- [2] PIVOKONSKÝ, M., PIVOKONSKÁ, L., BUBÁKOVÁ, P., JANDA, V. Úprava vody s obsahem huminových látek. *Chemicke Listy*. 1011, 104(11), 1015-1022 [cit. 2016-10-30]. ISSN 00092770.
- [3] SKOKANOVÁ, M., DERCOVÁ, K. Humínové kyseliny : Interakcie humínových kyselin s kontaminantami. *Chemické listy*. 2008, č. 102 [cit. 2016-11-02], s. 338-345. Dostupný z WWW: <http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2008_05_338-345.pdf>. ISSN 1213-7103.
- [4] STEINBÜCHEL, A., HOFRICHTER, M. *Biopolymers*. Chichester: Wiley-VCH, 2003. ISBN 3527302301.
- [5] SKOKANOVÁ, M., DERCOVÁ, K. Humínové kyseliny. Pôvod a štruktúra. *Chemicke Listy*. 0804, 102(4), 262-268 [cit. 2016-10-30]. ISSN 00092770.
- [6] VESELÁ, L. a kol. Struktura a vlastnosti přírodních huminových látek typu oxihumolitu. *Chemické listy*. 2005, roč. 99 [cit. 2016-10-30], s. 711-717. Dostupný z WWW: <http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2005_10_711-717.pdf>. ISSN 1213-7103.
- [7] WEBER, J.: *Definition of soil organic matter*, Humintech. 2002 [citováno: 2016-11-06]. Dostupné z: <<http://www.humintech.com/001/>>.
- [8] JANDÁK, J., PRAX, A., POKORNÝ, E. *Půdoznalství*. 3. vyd. Brno: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, 2007. 142 s. ISBN 978-80-7157-559-7.
- [9] 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.
- [10] STEVENSON, F. *Humus chemistry: genesis, composition, reactions*. 2nd Ed. New York: John Wiley and Sons, c1994, xiii, 496 s. ISBN 04-715-9474-1.
- [11] GHABBOUR, E. A. *Humic Substances: Structures, Models and Functions*. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 2001, 387 s. ISBN 08-540-4811-1.
- [12] PICCOLO, A. *Humic substances in terrestrial ecosystems*. New York: Elsevier, 1996, 675 s. ISBN 0444815163.
- [13] VOET, D., VOETOVÁ, J. G. *Biochemie*. Praha: VICTORIA PUBLISHING, 1995, 1325 s. ISBN 80-85605-44-9.
- [14] KALINA, M. *Využití difuzních technik při studiu reaktivity biokoloidů*. Vysoké učení technické v Brně. Fakulta chemická, 2015, 166 stran.
- [15] KALINA, M. *Difúze měďnatých iontů v huminovém gelu = Diffusion of cupric ions in humic gel*. Brno: Vysoké učení technické, Fakulta chemická, 2008.
- [16] PITTEr, P.: *Hydrochemie*, 3. vydání. VŠCHT v Praze, 1999, p. 327–333.3.

- [17] OUNI, Y., GHNAYA, T., MONTEMURRO, F., ABDELLY, CH., LAKHDAR, A. The role of humic substances in mitigating the harmful effects of soil salinity and improve plant productivity. *International Journal Of Plant Production*. 2014, vol. 8, no. 3, p. 353-374.
- [18] LAŠTŮVKOVÁ, M. *Studium transportu huminových látek skrz rostlinné kutikuly*. Brno: Vysoké učení technické v Brně. Fakulta chemická, 2014, 94 l. : il.
- [19] KLOUDA, P. *Moderní analytické metody*. 2., upr. a dopl. vyd. Ostrava: Pavel Klouda, 2003, 132 s. ISBN 80-863-6907-2.
- [20] NOVOTNÁ, R., ŠILHA, T., TRÁVNÍČEK, Z. *Spektrální metody studia chemických látek*. Olomouc, 2011.
- [21] PODZIMEK, Š. *Light scattering, size exclusion chromatography, and asymmetric flow field flow fractionation: powerful tools for the characterization of polymers, proteins, and nanoparticles*. Hoboken: Wiley, c2011, xii, 359 s. ISBN 978-0-470-38617-0.
- [22] XU, R. *Particle characterization: light scattering methods*. Dordrecht; Kluwer Academic, 2000. Powder technology series, v.13. ISBN 07-923-6300-0.
- [23] PEKAŘ, M. *Fyzikální chemie a fotochemie: praktikum*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2003, 114 s. ISBN 80-214-2470-2.
- [24] Zeta Potential. *Horiba scientific*. [cit. 2016-11-11]. Dostupné z: <http://www.horiba.com/scientific/products/particle-characterization/technology/zeta-potential/>
- [25] Oddělení strukturní analýzy, katedra fyziky kondenzovaných látek MFF UK: Dynamický rozptyl světla. <Http://www.xray.cz/>. 2008 [cit. 2016-11-11]. Dostupné z: <http://www.xray.cz/kfkl-osa/eng/zetasizer/dls.htm>
- [26] Thin Layer Chromatography. *DRGP Institute*. 2014 [cit. 2016-11-13]. Dostupné z: <https://drgpinstitute.wordpress.com/category/chemistry/page/3/>
- [27] Intensity of Scattered Light and Molar Mass. *WYATT Technology Europe*. © 2014 [cit. 2015-01-28]. Dostupné z: http://www.wyatt.eu/index.php?id= molar_mass.
- [28] KRATOCHVÍL, Z. *Studium stability biopolymerů pomocí technik rozptylu světla*. Brno: Vysoké učení technické v Brně. Fakulta chemická, 2015, 54 listů.
- [29] GONZÁLES-GAITANO, M., GARCÍA-MINA, J.: The Macromolecular Or Supramolecular Nature Of Humic Substances: A Dynamic Light Scattering. In *Humic Substances: Nature's most Versatile Materials*. Ed. E. A. GHABBOUR, G. DAVIES, Francis & Taylor, New York, 2004, s. 263 - 274.
- [30] SIMPSON, A. J. a kol. Molecular structure and associations of humic substances in terrestrial environment. *Naturwissenschaften*. 2002, vol 89, s 84-88.
- [31] SUTTON, R., SPOSITO, G. Molecular Structure in Soil Humic Substances: The New View. *American Chemical Society*. 2005, no. 23, vol. 39, s. 9009-9015.

- [32] BAIGORRI, R., FUENTES, M., GONZÁLEZ-GAITANO, G., GARCÍA-MINA, J. M. Analysis of molecular aggregation in humic substances in solution. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. Elsevier B.V, 2007, **302**(1), 301-306 [cit. 2016-11-20]. DOI: 10.1016/j.colsurfa.2007.02.048. ISSN 09277757. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com.ezproxy.lib.vutbr.cz/science/article/pii/S0927775707001628>
- [33] SCHAUMANN, G. E. Review Article - Soil organic matter beyond molecular structure Part I: Macromolecular and supramolecular characteristics. *J. Plant Nutr. Soil Sci.*, 2006, vol. 169, s. 145-156.
- [34] PICCOLO, A. The supramolecular structure of humic substances. *Soil Science*. 2001,no. 11, vol. 166, s. 810-832.
- [35] DE MELO, B. A. G., MOTTA, F. L., SANTANA, M. H. A. Humic acids: Structural properties and multiple functionalities for novel technological developments. *Materials Science and Engineering: C*. 2016, 62, 967-974 [cit. 2017-04-29]. DOI: 10.1016/j.msec.2015.12.001. ISSN 09284931. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0928493115306123>

8 SEZNAM ZKRATEK

Zkratka	Vysvětlení zkratky
DLS	dynamic light scattering (dynamický rozptyl světla)
dRI	differential refractive index (diferenční index lomu)
DSC	differential scanning calorimetry
dVI	differential viscosimetric index (diferenční viskozimetr)
ELS	electrophoretic light scattering (elektroforetický rozptyl světla)
ESI-MS	electrospray ionization-mass spectrometry (elektrosprejová ionizace-hmotnostní spektrometrie)
FK	fulvinové kyseliny
FT-IR	infračervená spektrometrie s Fourierovou transformací
GC-MS	gas chromatography-mass spectrometry (plynová chromatografie-hmotnostní spektrometrie)
GPC	gelová permeační chromatografie
HK	humínové kyseliny
HL	humínové látky
LC-MS	liquid chromatography-mass spectrometry (kapalinová chromatografie-hmotnostní spektrometrie)
LDI-MS	laser desorption ionization-mass spectrometry (ionizace laserovou desorpce-hmotnostní spektrometrie)
LALS	low-angle light scattering (nízkoúhlý rozptyl světla)
MALS	multi-angle light scattering (víceúhlý rozptyl světla)
NMR	nukleární magnetická rezonance
PCS	photon correlation spectroscopy (fotonová korelační spektroskopie)
QELS	quasi-elastic light scattering
RALS	right-angle light scattering (pravoúhlý rozptyl světla)
SEC	size exclusion chromatography (velikostně vylučovací chromatografie)
TGA	thermogravimetric analysis (termogravimetrická analýza)
UV	ultraviolet (ultrafialová)
UV-VIS	ultrafialová-viditelná spektrometrie

9 SEZNAM SYMBOLŮ

Symbol	Popis veličiny
A	absorbance
C	koncentrace
d_H	hydrodynamický poloměr
D	velikost částic
ε_λ	molární absorpční koeficient
I	prošlý zářivý tok
I_0	dopadající zářivý tok
κ	konduktivita
k_B	Boltzmannova konstanta
l	tloušťka absorbující vrstvy
L	délka kolony
$\lambda_{\max}$	vlnová délka maxima pásu
M_N	střední číselná molekulová hmotnost
M_w	střední hmotnostní molekulová hmotnost
η	dynamická viskozita
ΔP	tlakový rozdíl v koloně
R	poloměr kolony
T	transmittance
T_K	teplota
ζ	zeta potenciál