



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA CHEMICKÁ

ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE

FACULTY OF CHEMISTRY

INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

## SLEDOVÁNÍ KOMPLEXACE MĚDI S HUMINOVÝMI KYSELINAMI FLUORESCENČNÍ METODOU

FOLLOWING OF COOPER COMPLEXATION WITH HUMIC ACIDS BY FLUORESCENCE  
METHOD

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. TOMÁŠ HLADÍK

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Mgr. NADĚŽDA FASUROVÁ, Ph.D.

BRNO 2009



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

## Zadání diplomové práce

Číslo diplomové práce: **FCH-DIP0307/2008** Akademický rok: **2008/2009**  
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie  
Student(ka): **Bc. Tomáš Hladík**  
Studijní program: Spotřební chemie (N2806)  
Studijní obor: Spotřební chemie (2806T002)  
Vedoucí diplomové práce: **Mgr. Naděžda Fasurová, Ph.D.**  
Konzultanti diplomové práce:

### Název diplomové práce:

Sledování komplexace mědi s huminovými kyselinami fluorescenční metodou

### Zadání diplomové práce:

Vyhodnocení fluorescenčních spekter směsi humátu s ionty  $\text{Cu}(2+)$ . Zjistit, jestli dochází ke zhášení fluorescence vlivem komplexace a v jakém koncentračním rozmezí iontů  $\text{Cu}(2+)$ , resp. soli  $\text{CuCl}(2)$ .

### Termín odevzdání diplomové práce: 22.5.2009

Diplomová práce se odevzdává ve třech exemplářích na sekretariát ústavu a v elektronické formě vedoucímu diplomové práce. Toto zadání je přílohou diplomové práce.

-----  
Bc. Tomáš Hladík  
Student(ka)

-----  
Mgr. Naděžda Fasurová, Ph.D.  
Vedoucí práce

-----  
doc. Ing. Miloslav Pekař, CSc.  
Ředitel ústavu

V Brně, dne 1.10.2008

-----  
doc. Ing. Jaromír Havlica, DrSc.  
Děkan fakulty

## **ABSTRAKT**

Huminové kyseliny jsou schopné vytvářet silné komplexy s měďnatými ionty a tím mohou ovlivňovat jejich toxicitu v životním prostředí. Fluorescenční vlastnosti sodné soli huminové kyseliny, humátu, izolovaného z jihomoravského lignitu a jeho komplexační chování s měďnatými ionty byly pozorovány pomocí emisní, excitační a synchronní fluorescenční spektroskopie. Po přidavku měďnatých iontů dochází ke zhášení intenzity jak emisního tak synchronního spektra humátu, což pravděpodobně nasvědčuje o tvorbě komplexu s mědí. Záměrem práce bylo nalezení optimální koncentrace iontů v přítomnosti humátu pro sledování zhášení fluorescence a nalezení hlavního fluoroforu ve struktuře humátu, který je nejvíce ovlivněn komplexací, pomocí metody synchronní fluorescenční spektroskopie.

## **ABSTRACT**

Humic acids have high ability to form stable complexes with copper ions, which influences their toxicity in environment. Fluorescent properties of sodium salt of humic acid, humate, isolated from South Moravian lignite, and its complexation behaviour with copper ions were investigated using emission, excitation and synchronous fluorescence spectroscopy. Both fluorescence emission and synchronous fluorescence spectra showed that humate form complex with copper since fluorescence intensity was quenched upon addition of copper ions to the humate samples. The aim of the diploma thesis was to found applicable ion concentration to observation fluorescence quenching and to determine the main fluorophore, which is affected by complexation through the use of synchronous fluorescence spectroscopy.

## **KLÍČOVÁ SLOVA**

Komplexace kovů, huminové kyseliny, fluorescence.

## **KEYWORDS**

Metal complexation, humic acids, fluorescence.

HLADÍK, T. *Sledování komplexace mědi s huminovými kyselinami fluorescenční metodou*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2009. 62 s. Vedoucí diplomové práce Mgr. Naděžda Fasurová, Ph.D.

## PROHLÁŠENÍ

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

.....  
Tomáš Hladík

*Děkuji své vedoucí diplomové práce Mgr. Naděždě Fasurové, Ph.D. za poskytnutí cenných rad, připomínek a především čas, který mi při psaní této práce věnovala.*

# OBSAH

1. ÚVOD .....	7
2. TEORETICKÁ ČÁST .....	8
2.1 Huminové látky .....	8
2.1.1 Vznik huminových látek .....	8
2.1.2 Rozdělení huminových látek .....	9
2.2 Huminové kyseliny .....	10
2.2.1 Příprava huminových kyselin .....	10
2.2.2 Struktura a složení huminových kyselin .....	11
2.2.3 Chemické vlastnosti huminových kyselin .....	12
2.2.4 Význam huminových kyselin .....	12
2.3 Komplexace huminových kyselin s kovovými ionty .....	13
2.3.1 Vazebná místa huminových kyselin .....	13
2.3.2 Komplexace měďnatých iontů huminovými kyselinami .....	17
2.4 Fluorescenční spektroskopie .....	18
2.4.1 Fluorescence .....	18
2.4.2 Zhášení fluorescence .....	19
2.5 Studium huminových kyselin pomocí fluorescenční spektroskopie .....	20
2.5.1 Fluorescenční spektroskopie huminových kyselin .....	20
2.5.2 Studium komplexace metodou fluorescenční spektroskopie .....	23
3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....	27
3.1 Použité přístroje a chemikálie .....	27
3.2 Použitý vzorek humátu .....	27
3.2.1 Extrakce huminových kyselin z lignitu a příprava humátu .....	27
3.2.2 Elementární analýza použitého humátu .....	28
3.3 Příprava vzorků na měření .....	28
3.4 Fluorescenční spektroskopie .....	28
3.4.1 Postup při měření .....	28
3.4.2 Podmínky měření .....	29
3.5 Atomová absorpční spektrometrie .....	29
3.5.1 Postup při měření .....	29
3.5.2 Podmínky měření .....	29
3.6 UV-VIS spektrofotometrie .....	30
3.6.1 Postup při měření .....	30
3.6.2 Podmínky měření .....	30
4. VÝSLEDKY A DISKUZE .....	31
4.1 Optimální podmínky pro měření .....	31
4.2 Emisní a excitační spektra humátu .....	32
4.2.1 Excitační spektrum humátu a vliv $\text{Cu}^{2+}$ iontů .....	32
4.2.2 Emisní spektrum humátu a vliv $\text{Cu}^{2+}$ iontů .....	35
4.2.3 Vyhodnocení zhášení emisního spektra $\text{Cu}^{2+}$ ionty .....	38
4.3 Synchronní fluorescenční spektroskopie a vliv $\text{Cu}^{2+}$ iontů .....	40
4.3.1 Synchronní fluorescenční spektroskopie, $\Delta\lambda = 20$ nm .....	40
4.3.2 Synchronní fluorescenční spektroskopie, $\Delta\lambda = 80$ nm .....	44

4.3.3	Hledání vhodného nastavení $\Delta\lambda$ při SFS měření .....	45
4.3.4	Synchronní fluorescenční spektroskopie, $\Delta\lambda = 35$ nm.....	47
4.3.5	Vyhodnocení zhášení synchronního spektra $\text{Cu}^{2+}$ ionty .....	49
4.4	Atomová absorpční spektrometrie .....	52
4.5	Vyhodnocení zhášení fluorescence humátu.....	54
5.	ZÁVĚR.....	56
6.	SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ .....	58
7.	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ.....	62

# 1. ÚVOD

Tato diplomová práce představuje příspěvek ke studiu komplexace huminových kyselin ve formě koloidních roztoků s měďnatými ionty za využití fluorescenční spektroskopie.

Huminové kyseliny jsou látky přírodního původu s velice složitou a heterogenní strukturou. V přírodních systémech vystupují jako půdní stabilizátor, rezervoár živin a vody pro rostliny, jako sorbent těžkých kovových iontů, radionuklidů a organických polutantů a jako chemický pufr s katalytickou aktivitou. K nejvýznamnějším vlastnostem huminových kyselin patří jejich schopnost vytvářet komplexní sloučeniny s kovovými ionty, čímž mohou přispívat ke snižování jejich toxicity v přírodě. Huminové kyseliny vykazují vysokou afinitu obzvláště k měďnatým iontům, se kterými vytváří stabilní komplexy.

Huminové kyseliny vytvářejí multifluoroforní systém, proto lze při jejich studiu využít fluorescenční spektroskopii. Jedná se o velmi citlivou metodu, která je vhodná pro studium interakcí huminových kyselin s jinými substancemi. V našem případě se jedná o interakce s měďnatými ionty. Navázání měďnatých iontů na huminové kyseliny vyvolává zhášení jejich fluorescence. Fluorescenční spektroskopie je výhodná pro studium těchto systémů zejména díky možnosti detekovat nízké koncentrace fluoroforních látek.

Teoretická část předložené práce se zaměřuje na přehled současných poznatků o využití fluorescenční spektroskopie při studiu huminových látek a jejich komplexačních reakcí s kovovými ionty. Experimentální část práce byla orientována na použití dvou metod měření zhášení fluorescence huminových kyselin v přítomnosti měďnatých iontů. Nejprve byla použita metoda emisní fluorescenční spektroskopie, s cílem nalést optimální podmínky pro sledování zhášení fluorescence sodné soli lignitické huminové kyseliny. Druhou použitou metodou pro sledování zhášení byla, při studiu huminových kyselin v posledních letech také často využívaná metoda, synchronní fluorescenční spektroskopie. Záměrem bylo ověřit, zda lze využít i synchronní fluorescenční spektroskopii pro sledování zhášení měďnatými ionty a při jakém optimálním nastavení. Synchronní fluorescenční spektroskopie poskytuje možnost redukce spektrálního překryvu a tedy lepší rozlišení než emisní spektra a nám možnost určit hlavní fluorofor ve struktuře huminové kyseliny, který je v přítomnosti mědi nejvíce ovlivněn.

## 2. TEORETICKÁ ČÁST

### 2.1 Huminové látky

Huminové látky patří mezi nejrozšířenější skupinu organických látek na zemi. Vyskytují se v půdách, rašelinách, mladších druzích uhlí, vodách a vodních sedimentech. Jejich obsah v přírodě kolísá od stopového množství v píscích a jílech, přes jednotky procent v běžných zeminách, až k desítkám procent v hnědém uhlí. Mimořádně vysoký obsah vykazuje lignit, rašelina a oxyhumolit (tj. zoxidované hnědé uhlí), které tvoří hlavní zdroje pro průmyslové využití. Huminové látky vznikají v přírodě procesy degradace organické hmoty (zbytků rostlin, živočichů apod.) a syntetickou činností mikroorganismů, z čehož vyplývá jejich komplikované složení a široký okruh vlastností [1].

Jedná se o směs amorfních, polydisperzních sloučenin žluté až hnědočerné barvy, tvořící součást půdní a vodní organické hmoty. Obecně můžeme na huminové látky nahlížet jako na heterogenní směs makromolekulárních látek, převážně kondenzovaných aromatických systémů, s postranními alifatickými řetězci [2].

Huminové látky mají významnou roli v mnoha důležitých procesech v životním prostředí, ve vytváření a stabilizaci půdních agregátů, při vázání organických sloučenin a polutantů a ve výživě rostlin (čerpání živin z půdy).

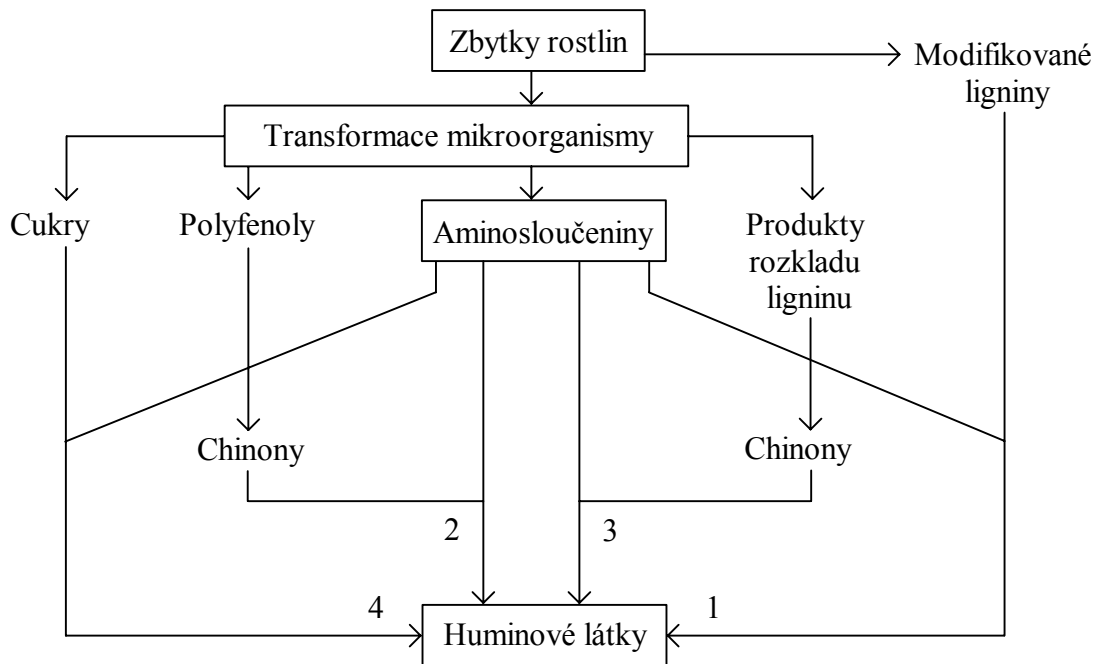
Své využití nacházejí v zemědělství, průmyslu, farmakologii, kosmetologii a v oblasti ochrany životního prostředí. Jejich atraktivita spočívá především v jejich přirozeném původu a dostatečných zásobách v přírodních matricích.

#### 2.1.1 Vznik huminových látek

Přestože přesný mechanismus vzniku huminových látek není dodnes zcela objasněn, existuje několik teorií popisujících jejich vznik při rozkladu zbytků rostlin a živočichů v půdě. Podle Webera [2] jsou nejvíce pravděpodobné čtyři hlavní způsoby, kterými huminové látky vznikají, jak zobrazuje (Obr. 1). Patří k nim ligninová teorie, která považuje huminové látky za modifikované ligniny (dráha 1). V současnosti je všeobecně nejvíce podporován mechanismus zahrnující chinony (dráha 2 a 3). Další možnou cestou jsou aminocukrové kondenzace (dráha 4). Tyto čtyři procesy mohou probíhat ve všech půdách, ale ne ve stejné míře. Ligninová dráha převládá ve slabě vzdušných půdách a vlhkých sedimentech, přičemž syntéza z polyfenolů má významnější roli v některých lesních půdách. Časté a výrazné kolísání teploty, vlhkosti a osvětlení v povrchových půdách kontinentálního klimatu naproti tomu podporuje syntézu aminocukrovou kondenzací.

Při modifikaci ligninu (dráha 1) dochází k oxidaci bočních alifatických řetězců za tvorby COOH skupin a ke ztrátě metoxylových skupin (OCH<sub>3</sub>) za vzniku *o*-hydroxyfenolů. Takto pozměněný materiál podléhá dalším zatím neznámým přeměnám, které poskytují nejprve huminové kyseliny a poté fulvinové kyseliny. Avšak tato ligninová teorie, nazývaná Waksmanova, je dnes považována za překonanou.

V polyfenolové teorii hraje lignin odlišnou roli. V dráze 3 fenolické aldehydy a kyseliny uvolněné během mikrobiologického působení z ligninu se enzymaticky přemění na chinony. Ty společně s chinony z dráhy 2, které vznikly enzymatickou oxidací polyfenolů z neligninových zdrojů uhlíku (např. celulóza), polymerizují a vytváří huminové látky.



**Obr. 1** Mechanismus vzniku huminových látek [2].

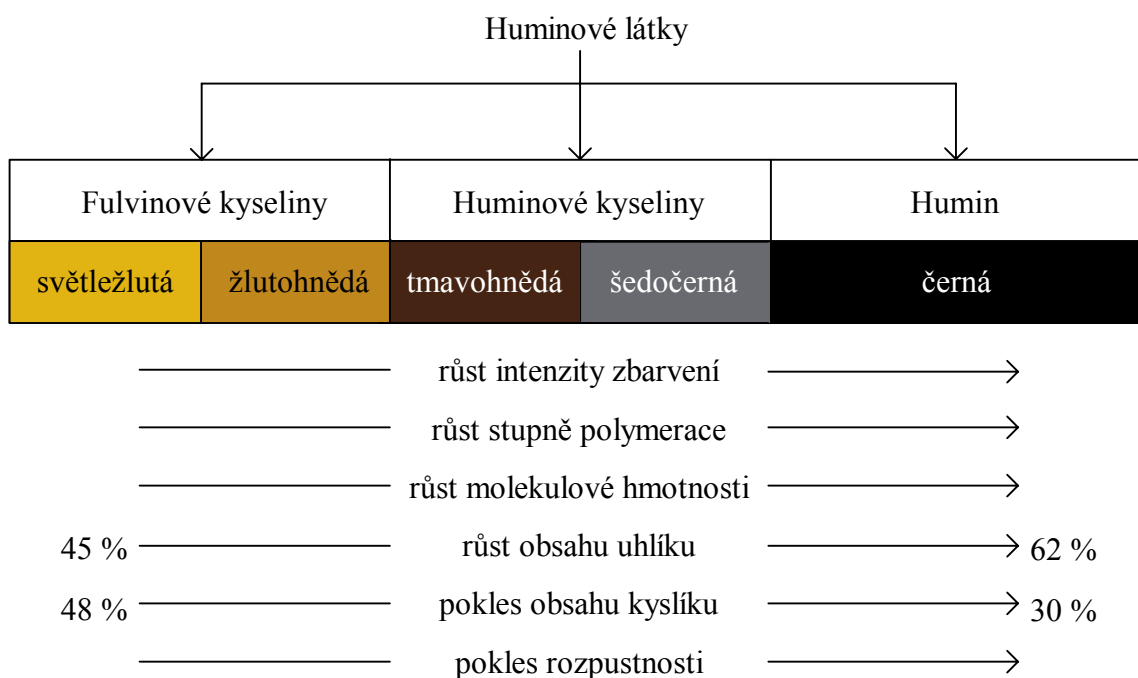
V pojetí čtvrté teorie, aminocukrové kondenzace, redukující cukry a aminokyseliny, vzniklé jako vedlejší produkty mikrobiálního metabolismu, reagují neenzymaticky za vzniku hnědých polymerů obsahujících dusík. Velké množství reaktantů (sacharidy, aminokyseliny, atd.), produkovaných činností mikroorganismů, dodává této teorii atraktivnosti. Hlavní nevýhodou této teorie je dosti pomalý průběh reakce při teplotách obvyklých v běžných půdních podmínkách. Nicméně prudké a časté změny v půdním prostředí (zamrzání a tání, vlhko a sucho), společně se směsí reaktantů a minerálních látek mající katalytické účinky, kondenzaci podporují.

### 2.1.2 Rozdělení huminových látek

Označení huminové látky (HL) je obecně používáno k souhrnnému označení huminových kyselin (HK), fulvinových kyselin (FK) a huminu (HU). HK jsou rozpustné při vyšších hodnotách pH, ale jsou nerozpustné ve vodě při pH menším než 2. FK jsou rozpustné ve vodě při jakékoliv hodnotě pH. Jako huminy je označována ta frakce HL, která není rozpustná ve vodě při žádné hodnotě pH.

HK a FK se kromě rozpustnosti liší také svou molekulovou hmotností, počtem funkčních skupin a stupněm polymerizace. Jejich vlastnosti, jako složení prvků, struktura a počet funkčních skupin jsou závislé na původu, stáří materiálu a také na stupni humifikace.

Předpokládané vztahy zobrazuje (Obr. 2), ze kterého je zřejmé, že obsah uhlíku a kyslíku, kyselost a stupeň polymerizace, se mění v závislosti na zvyšující se molekulové hmotnosti. FK, o nízké molekulové hmotnosti, mají vyšší obsah kyslíku a nižší obsah uhlíku než HK, které jsou vyšší molekulové hmotnosti. Celková kyselost FK je značně vyšší než u HK [2].



**Obr. 2** Rozdělení a vlastnosti huminových látek [2].

## 2.2 Huminové kyseliny

HK patří mezi nejdůležitější frakce humifikované půdní organické hmoty, protože na rozdíl od FK a HU, které se podílejí asi z 8 % na celkovém koloběhu uhlíku, je podíl HK až 16 % [1].

### 2.2.1 Příprava huminových kyselin

HK se dají izolovat extrakcí různými rozpouštědly, z nichž se následným okyselením tyto látky vylučují ve formě sraženin. Extrakční metoda by měla vést k izolaci nepozměněného materiálu (s nezměněnými vlastnostmi), který by neměl obsahovat anorganické nečistoty, jako jsou jíly a vícemocné kationty. Vhodná extrakční metoda by měla zabezpečit, že izolovaný materiál bude obsahovat všechny molekulové hmotnosti. V ideálním případě můžeme takovou metodu použít pro všechny typy půd a zdrojové materiály HL [2].

Nejpoužívanějším extrahovadlem pro extrakci HK z různých substrátů je zředěný roztok NaOH. Nejběžněji se používá jeho vodný roztok o koncentraci 0,1–0,5 mol dm<sup>-3</sup>. Jestliže bychom chtěli zvýšit účinnost extrakce alkalickými činidly, je vhodné vyluhovat půdu kyselinou chlorovodíkovou, která odstraní Ca<sup>2+</sup> a další vícemocné kationty. Použití alkalické extrakce vede k vyextrahování přibližně dvou třetin organické hmoty. Pro získání maximálního výtěžku je potřeba opakovaná extrakce [2].

Alternativou k alkalické extrakci jsou mírnější a selektivnější extraktanty. Jedná se o soli komplexních činidel (Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub> a EDTA), organická komplexotvorná činidla ve vodném prostředí (acetylaceton) a různá organická rozpouštědla. Tyto činidla jsou méně agresivní,

avšak oproti alkalickým také méně účinná. V současné době se rovněž využívají extrakční metody sestávající z posloupnosti extrakčních činidel jak mírnějších, tak alkalických.

Organická hmota je v půdách udržována v nerozpuštěném stavu díky  $\text{Ca}^{2+}$  a dalším vícemocným kationtům ( $\text{Fe}^{3+}$  a  $\text{Al}^{3+}$ ). Použití činidel, která inaktivují tyto kationty tvorbou nerozpustných sraženin nebo rozpustných koordinačních sloučenin, vede k rozpouštění organické hmoty. Mezi tyto činidla patří oxalát amonný, pyrofosforečnan sodný a soli slabých organických kyselin. Nejvíce rozšířeným činidlem je  $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ . Množství vyextrahované organické hmoty je ale podstatně menší než při alkalické extrakci (výtěžek extrakce je méně než 30 %). Pro minimalizaci chemických změn HL se extrakce provádí při neutrálním pH [2].

Více než 55 % půdní organické hmoty z minerálních půd a více než 80 % z kompostu může být vyextrahováno kyselinou mravenčí v přítomnosti LiF, LiBr nebo  $\text{HBrF}_4$  [2].

V posledních letech se po předchozí úpravě půdy okyselením běžně používá kombinace extrakčních činidel hydroxidu sodného a pyrofosforečnanu sodného [3].

### 2.2.2 Struktura a složení huminových kyselin

Elementární složení HK závisí na původu, stáří a stupni humifikace a také způsobu extrakce. HK ve své struktuře obsahují uhlík (50–60 %), kyslík (30–50 %), vodík (3–7 %), dusík, stopová množství síry a fosforu. Často užívanými ukazateli jsou poměry C/O a C/H. Obecně platí, že nižší hodnoty C/O a C/H odpovídají vyššímu zastoupení karboxylových skupin, nízkému aromatickému charakteru a stupni kondenzace.

Ve struktuře HK jsou zastoupeny především kyslíkaté funkční skupiny: karboxylové skupiny, fenolické a alkoholické OH skupiny. Mimo tyto jsou v HK přítomny i jiné, např. enolové, chinonové, hydrochinonové, eterové, laktonové a dokonce v malém množství mohou být zastoupeny také dusíkové, sírové, fosforové funkční skupiny a nebo můstky [1].

V sekundární struktuře můžeme nalézt hydrofobní domény, které mohou být vytvářeny agregací aromatických struktur nebo alifatickými strukturami. Ve struktuře jsou také zastoupeny hydrofilní domény, ty způsobují sorpci polárních částic a kationtů kovů.

V současné době existují tři hlavní pohledy na charakter a strukturu HK. První je považuje za polymery s molekulovou hmotností od 500 až  $10^6$  Da. Druhý, micelární koncept, vychází z amfifilního charakteru HL, který má za následek intra- a intermolekulární agregace, tj. shlukování molekul do útvarů s hydrofobním jádrem obdobně jako micely povrchově aktivních látek [4], [5]. Třetí teorie supramolekulového uspořádání představuje HL jako relativně malé a heterogenní molekuly různého původu, které se samy organizují do supramolekulárních konformací. Tyto supramolekuly relativně malých molekul nejsou asociovány kovalentními vazbami, ale jsou stabilizovány převážně slabými disperzními interakcemi jako jsou  $\pi$ - $\pi$ , CH- $\pi$ , van der Waalsovy a vodíkové můstky. Podle této teorie jsou HK asociace převážně hydrofobních sloučenin, které jsou stabilizovány při neutrálním pH hydrofobními silami. Při nízkém pH jejich konformace roste co do velikosti tvorbou intermolekulárních vodíkových [6].

Struktura přírodních huminových kyselin je vhodná pro sorpční, iontově výměnné a biodegradační procesy. Jeví se také vhodná pro detoxikaci kontaminantů přítomných v životním prostředí, které se tam dostali především jako základní složky dlouhodobě používaných pesticidů [1].

### 2.2.3 Chemické vlastnosti huminových kyselin

Molekulová hmotnost HK se pohybuje v rozmezí 10 000–200 000 g mol<sup>-1</sup> [7]. Jejich rozpustnost je omezená, jsou rozpustné v alkalickém roztoku, ale při nižším pH se vysrážejí. Mají acidobazické vlastnosti v široké oblasti pH a řadu pozoruhodných fyzikálních vlastností, jako jsou agregační schopnosti, schopnost konformačních změn a povrchově aktivní chování [8]. Sodné soli půdních a lignitických HK agregují při neutrálním i alkalickém pH již od velmi malých koncentrací, od 0,001 g dm<sup>-3</sup> [9]. HK mají polyaniontový charakter a můžeme je počítat mezi slaběkyselé polyelektrolyty. Kyselá povaha HK je způsobena především ionizací COOH a fenolických OH skupin [2].

Tyto přírodní organické látky vytváří neobyčejně složitou amorfní směs, vysoce heterogenní a chemicky reaktivní. Kladně nabitě látky mohou interagovat s negativně nabitými HK prostřednictvím elektrostatických interakcí, zatímco nenabitě polární a nepolární látky interagují pomocí hydrofobních interakcí a vodíkových můstků [2]. Při odstraňování toxických kovů, nacházejících se v zemině či vodách, je důležitá tvorba koordinační vazby mezi HK a ionty kovů schopných tento typ vazby vytvářet. Dalším typem vazebné interakce, kterým HK interagují, je kovalentní vazba. Na základě přítomnosti vhodných funkčních skupin v jejich struktuře patří k vazebným možnostem HK tvorba vodíkových můstků. S hydrofobními a alifatickými kontaminanty (např. některé pesticidy) je nejčastěji předpokládaným typem vazebného působení hydrofobní interakce. Tento typ vazby vzniká při kontaktu nepolárních skupin (např. alkylových) nesených molekulami a tyto interakce mohou vycházet např. z působení van der Waalsových sil nebo přesunu  $\pi$  elektronů [8].

Z výše uvedeného plyne, že HK mohou reagovat s polutanty různého charakteru, s organickými látkami, těžkými kovy a pesticidy. A tím mohou HK ovlivnit transport, toxicitu a dostupnost těchto látek v přírodě.

### 2.2.4 Význam huminových kyselin

HK zlepšují strukturu půdy a zabraňují vysokým ztrátám vody. Lehké a písčité půdy chrání před vysokými ztrátami živin a současně je přeměňují na úrodnější svým rozkladem. V těžkých půdách zlepšují provzdušňování půdy. Hlavní polyvalentní kationty odpovědné za vázání HK v půdě jsou Ca<sup>2+</sup>, Fe<sup>3+</sup> a Al<sup>3+</sup>.

Chemicky pozměňují fixační vlastnosti půdy. Neutralizují jak kyselé tak zásadité půdy, regulují tak půdní hodnotu pH. Zlepšují a optimalizují příjem živin a vody rostlinami. Zvyšují také příjem dusíku rostlinami. Obohacují půdu organickými i minerálními látkami, které jsou nezbytné pro růst rostlin. Přítomnost HK by měla mít dokonce vliv na potlačení chlorózy způsobené nedostatkem železa v rostlinách.

HK biologicky stimulují rostliny a aktivitu mikroorganismů. Stimulují rostlinné enzymy a zvyšují jejich produkci. Podporují růst a množení žádoucích mikroorganismů v půdě. Zvyšují přirozenou odolnost rostlin proti chorobám a škůdcům. Podporují růst kořenů a tím umožňují lepší příjem živin. Byl zaznamenán i příznivý vliv HK na klíčivost semen.

V otázce ekologického přínosu HK je nutné jako první zmínit, že půdy s vysokým obsahem HK jsou zárukou nízkého vyplavování dusičnanů a optimální vyživovací schopnosti půdy. HK jsou dále schopny snížit poměrně vysoký obsah solí v půdách po nadměrném použití minerálních hnojiv, a tím snížit jejich toxicitu. V neposlední řadě jsou HK účinným

prostředkem v boji proti půdní erozi. Toho je docíleno zvýšenou vazebnou schopností půdních koloidů a podporou růstu kořenového systému rostlin [2].

## 2.3 Komplexace huminových kyselin s kovovými ionty

Distribuce kovových iontů v životním prostředí je mimořádně složitá a je ovlivněna celou řadou reakcí (iontově výměnné reakce, srážecí a acidobazické rovnováhy, komplexace s organickými a anorganickými ligandy, adsorpční a desorpční procesy). Klíčovou roli v chování kovových iontů hrají především komplexační reakce. Organické sloučeniny, které mohou vytvářet komplexy s kovovými ionty jsou jednak huminové látky, které představují majoritní část organických látek v půdách, a dále organické sloučeniny definované molekulární struktury a chemických vlastností jako jsou alifatické kyseliny, polysacharidy, aminokyseliny, polyfenoly, atd. Dostupnost a transport kovových iontů v půdách je úzce spojen s přítomností organické hmoty. Pokud je v pevném stavu, může zpomalovat transport kovových iontů, naopak jeli rozpuštěná, může zvyšovat mobilitu těchto iontů [10].

Schopnost vázat ionty kovů patří k jedné z nejdůležitějších vlastností huminových kyselin. HL se chovají jako víceligandová komplexační činidla. Hlavní molekulové vlastnosti, které určují jejich komplexační schopnosti jsou polyfunkčnost, polyelektrolytická povaha, hydrofilita, a jejich schopnost vytvářet intermolekulární asociace a měnit molekulární konformaci [11]. Komplexací huminových kyselin s těžkými kovy vznikají relativně stabilní komplexy, což vede ke snížení jejich toxicity (případ iontů mědi) v přírodních systémech. Zabudování těžkých kovů do struktury huminových kyselin tak významnou měrou přispívá k jejich imobilizaci a eliminaci v přírodě. Vazebná schopnost huminových kyselin s kovy klesá v pořadí  $Fe^{2+} > Al^{3+} > Cu^{2+} > Zn^{2+} > Ni^{2+} > Co^{2+} > Mg^{2+}$  [12].

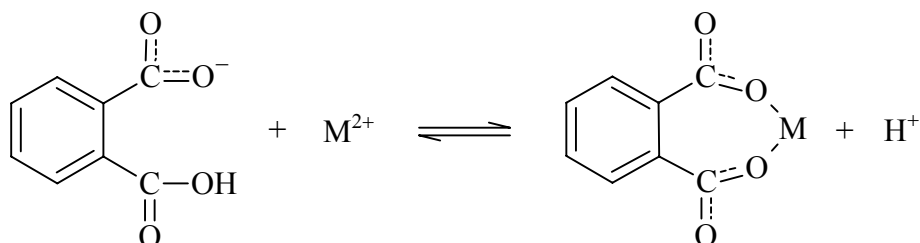
Podle reaktivity s organickými ligandy Buffle [11] rozčlenil anorganické kationty do tří tříd. Kationty první třídy („hard“), jako jsou kovy alkalických zemin  $Ca^{2+}$  a  $Mg^{2+}$ , jsou poutány především elektrostatickými silami a vytváří spíše slabé komplexy vnější sféry a pouze s kyslíkatými ligandy. Kationty druhé třídy („soft“)  $Cd^{2+}$ ,  $Pb^{2+}$  a  $Hg^{2+}$  oplývají silnou tendencí vytvářet kovalentní vazby s N a S ligandy a v půdě se nachází obvykle ve velmi nízkých koncentracích. Afinita k donorovému atomu pro tyto kationty stoupá v pořadí  $O < N < S$ , zatímco pro kationty první třídy je pořadí opačné. Třetí kategorie kationtů („borderline“) zahrnuje většinu přechodných kovů jako jsou  $Fe^{3+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$  a  $Mn^{2+}$ . Svými vlastnostmi leží mezi kationty první a druhé kategorie a vykazují afinitu k oběma typům ligandů. Tyto kationty soupeří o kyslíkatá ligandová místa převážně s kationty první třídy. Ty jsou sice méně silně poutány, ale nachází se v půdě obvykle ve vyšších koncentracích. V menší míře dochází také k soupeření o dusíkatá a sírová vazebná místa s kationty druhé kategorie.

### 2.3.1 Vazebná místa huminových kyselin

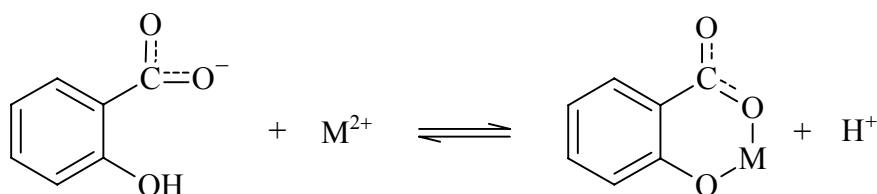
Hlavní funkční skupiny v HK, které mohou vázat ionty kovů jsou skupiny obsahující kyslík, tj. karboxylové skupiny, fenolické, alkoholové a enolové OH skupiny. Amin skupiny a skupiny obsahující síru a fosfor mohou být v menší míře také zapojeny do vázání kovů. Nejběžněji odhadované stechiometrie komplexace HK:kov jsou 1:1 a 2:1.

Interakční procesy mohou být výrazně ovlivněny elektronovými a sterickými podmínkami ligandových míst, fyzikálními a chemickými vlastnostmi okolí, včetně pH, iontové síly a koncentrace kovů. Stejně funkční skupiny mohou být ve struktuře HK navázány na strukturně odlišné alifatické řetězce a aromatické kruhy, to se projeví rozdílnými elektronovými efekty. Sterický efekt je dán prostorovým uspořádáním okolí vazebných míst. To je ovlivněno tvorbou či zánikem vodíkových můstků a kovových můstků, což závisí na pH, iontové síle a koncentraci kovu. Průběh komplexace a stabilita vzniklých komplexů je ovlivněna rovněž hydratací hydrofilních míst a elektrostatickým polem, které je dané mírou ionizace hlavních kyselých funkčních skupin [11].

Nejvýznamnější úlohu při vázání kovových iontů hrají aromatické karboxyly a fenolické skupiny. Vytvářejí cheláty, které mohou být tvořeny dvěma karboxylovými skupinami vzájemně v orto poloze na benzenovém jádře (Obr. 3) a nebo fenolickou a karboxylovou skupinou vzájemně v orto poloze (Obr. 4).

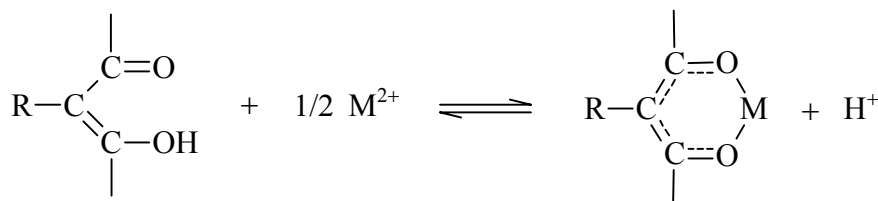


**Obr. 3** Vazebné místo tvořené dvěma karboxylovými skupinami [11].



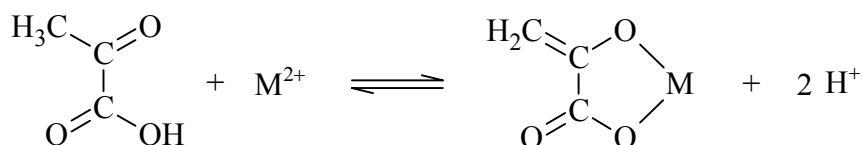
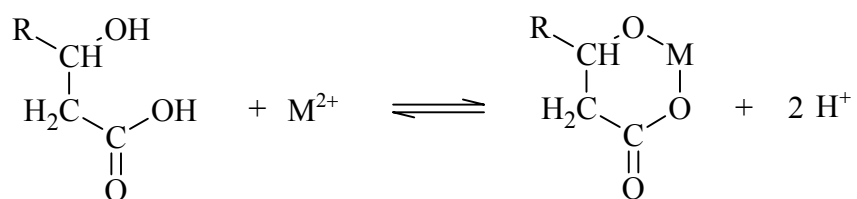
**Obr. 4** Vazebné místo tvořené fenolickou a karboxylovou skupinou [11].

Další možné spojení může zahrnovat fenolické OH skupiny, chinon, NH<sub>2</sub>, SH skupiny a konjugované ketonické skupiny, viz. (Obr. 5).



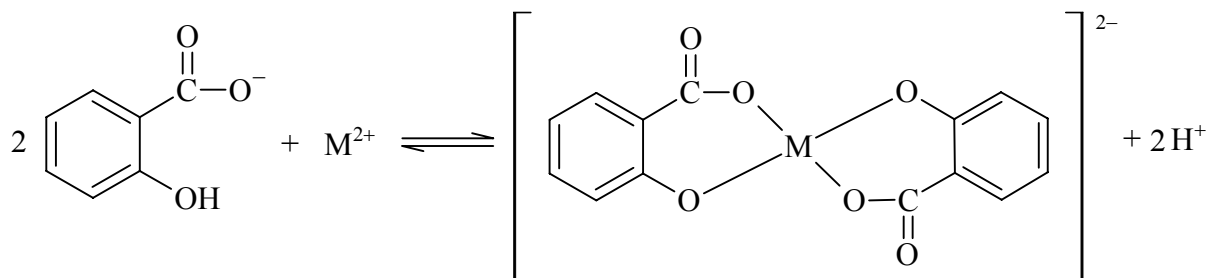
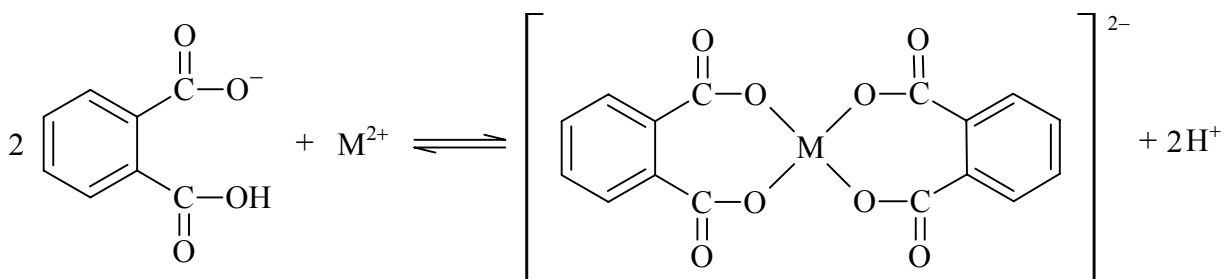
**Obr. 5** Vazebné místo tvořené konjugovanými ketonickými skupinami [11].

Do vázání kovových iontů mohou být zapojeny také nearomatické skupiny, jak naznačují reakční schémata zobrazená na (Obr. 6).

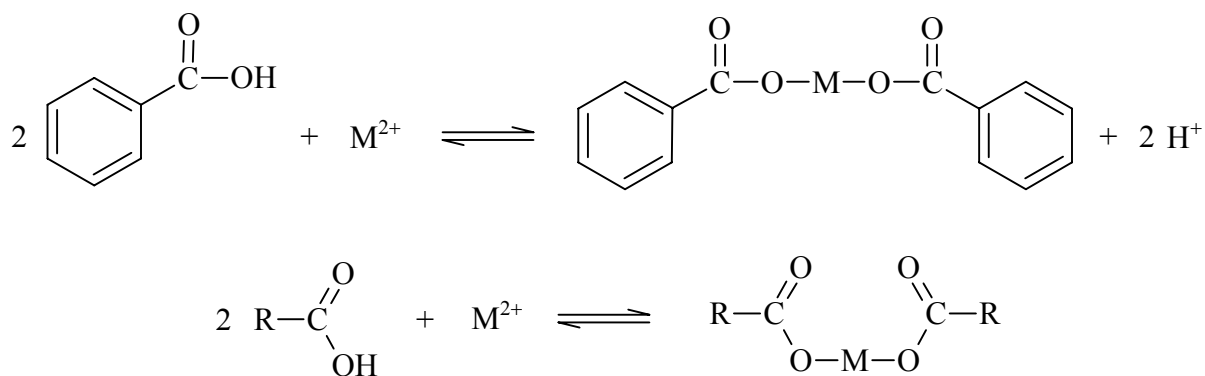


**Obr. 6** Vazebná místa tvořená nearomatickými skupinami [11].

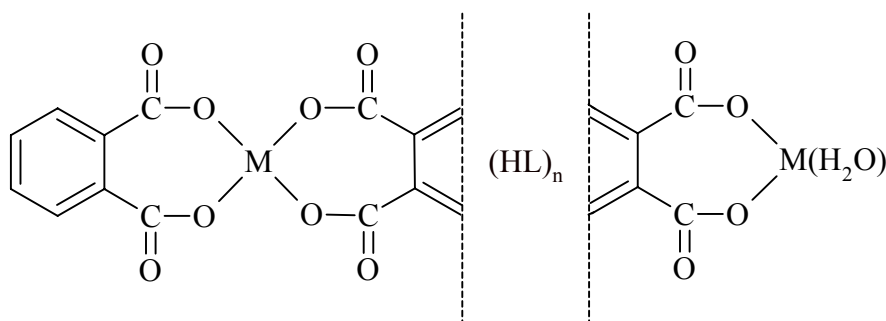
Vazebná místa mohou být tvořena funkčními skupinami, které patří dvěma různým molekulám. Tím dochází k tvorbě chelátů (Obr. 7) nebo komplexů 2:1 (Obr. 8). Případně mohou vznikat řetězové struktury (Obr. 9), které mohou vést až k agregaci a vylučování HK.



**Obr. 7** Vazebná místa tvořená funkčními skupinami dvou různých molekul [11].

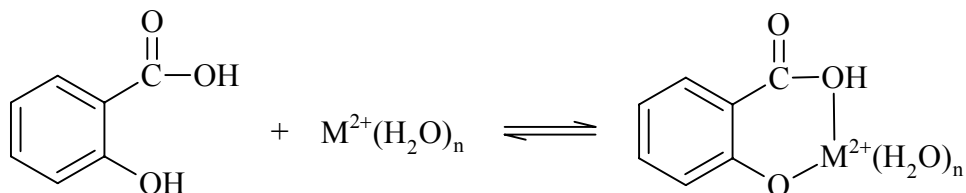


**Obr. 8** Tvorba komplexů 2:1 [11].



**Obr. 9** Tvorba řetězových struktur [11].

Mezi kovovými ionty a HL dochází k tvorbě dvou typů komplexů. Jedná se o komplexy vnitřní sféry, kdy se mezi atomy ligandu a kovovým iontem vytváří vazba kovalentního charakteru a oba jsou zcela nebo částečně dehydratováni. Druhým typem jsou komplexy vnější sféry. V tomto případě se mezi ligandy a kovovým iontem, který zůstává zcela hydratovaný, jedná o elektrostatické přitažlivé síly. Pro jednoduchost všechny reakční schémata popsána na (Obr. 3) až (Obr. 9) představují tvorbu komplexů vnitřní sféry, ale mohou znázorňovat také komplexy vnější sféry, jestliže kation je solvatován, jak naznačuje schéma poslední (Obr. 10).



**Obr. 10** Tvorba komplexu vnější sféry [11].

Komplexace jednoho  $\text{Cu}^{2+}$  iontu může také snižovat schopnost sousedních funkčních skupin vytvořit komplex s dalším iontem. Vazebná afinita některých humátů k  $\text{Cu}^{2+}$  klesá v pořadí půdní HK > rašelinová HK > lignitická HK > půdní FK. Je pozoruhodné, že HK s vyšším obsahem dusíku (půdní a rašelinové HK) vytvářejí silnější komplexy s  $\text{Cu}^{2+}$  ionty [13]. I pomocí metody elektronové spinové rezonance (ESR) bylo zjištěno, že  $\text{Cu}^{2+}$  ionty mohou být silně vázány i do dusíkatých donorových skupin v HL [14].

### 2.3.2 Komplexace měďnatých iontů huminovými kyselinami

Díky své unikátní struktuře mají huminové kyseliny vysokou afinitu k  $\text{Cu}^{2+}$  iontům a tento iont bývá často užíván v experimentech jako modelový.

Mechanismus a rozsah komplexace je funkcí různých faktorů, závisí zejména na pH, iontové síle, povaze kovových iontů, koncentraci a dalších vlastnostech HL. Při kvantitativním popisu komplexace se obvykle používá parametr komplexační kapacita HL, kterou můžeme definovat jako maximální kapacita HL pro navázání kovových iontů. Vliv pH na komplexaci kovů s HL souvisí se změnami ve stupni ionizace karboxylových a fenolických skupin a s hydrolyzou kovového iontu. Při nízkém pH dochází k protonaci ligandů a většímu soupeření protonů a kovových iontů o vazebná místa, při vysokém pH dochází zase k hydrolyze kovových iontů. Komplexační kapacita HL se zvyšuje se zvyšující se hodnotou pH z kyselé oblasti až do neutrální a klesá při vyšší iontové síle [11]. Při hodnotě pH ~ 5 je množství navázaného  $\text{Cu}^{2+}$  nejvyšší [15]. Pro všechny hodnoty pH je iont  $\text{Cu}^{2+}$  vázán více silněji huminovými než fulvinovými kyselinami. Důvodem může být jejich rozdílná struktura. U HK se navíc setkáváme s vyšší pravděpodobností, že na aromatickém kruhu dojde k výskytu sousedních karboxylových a hydroxidových skupin [16].

Při molárním poměru HL:Cu 0,003 je přibližně 60 %  $\text{Cu}^{2+}$  přítomno v roztoku ve formě komplexu s HL a zbytek jako volné ionty  $\text{Cu}^{2+}$  v rozmezí pH od 3 do 7. Při pH vyšším než 7 se vytváří ionty  $\text{Cu}_2(\text{OH})_2^{2+}$ ,  $\text{Cu}(\text{OH})_4^{2-}$ ,  $\text{Cu}(\text{OH})_3^-$  a  $\text{Cu}(\text{OH})_2$ . Při hodnotě molárního poměru HL:Cu 0,6 je dominantní formou komplex s HL až do pH 10. V oblasti pH 10–12 už komplex soupeří s produkty hydrolyzy a při pH vyšším než 12 je převládající formou  $\text{Cu}(\text{OH})_4^{2-}$ . Kyslíkatá ligandová místa z HK nahrazují slabé  $\text{H}_2\text{O}$  ligandy v  $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$ . Podle výsledků ESR spektroskopie při molárním poměru HS:Cu 0,003 se vytváří komplex  $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})_5]\text{L}$  s jedním kyslíkovým donorovým ligandem. Zvýšení poměru na 0,03 vede ke tvorbě  $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})_4]\text{L}_2$  komplexu vnitřní sféry. Dále při hodnotě poměru 0,6 vzniká komplex  $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})_4]\text{L}_4$  [17].

HK mají komplexační kapacitu dvakrát až čtyřikrát menší než by odpovídalo obsahu jejich kyselých funkčních skupin. Z toho vyplývá, že celkové množství funkčních skupin není to jediné co ovlivňuje komplexační kapacitu HK pro  $\text{Cu}^{2+}$  ionty [14]. Ve struktuře huminových kyselin existují dva hlavní typy vazebných míst, na které jsou ionty přechodných kovů vázány. První typ tvoří funkční skupiny schopné odštěpit proton  $\text{H}^+$ . Sem patří zejména OH skupiny karboxylové, fenolické a enolické. Druhým typem mohou být např. aromatické struktury, přičemž menší část iontů může být vázána fyzikálními silami [18]. Na základě měření kinetiky interakcí kovových iontů s HK potenciometricky a konduktometricky [19] je navrhován mechanismus komplexace, který předpokládá relativně rychlé obsazení většiny kyselých skupin měďnatými ionty a následné přeuspořádání struktury tak, aby každý z těchto dvojmocných iontů byl svázán se dvěma vhodnými funkčními skupinami.

Dalším parametrem používaným pro charakteristiku komplexace je konstanta stability komplexu HL s kovem, která poskytuje číselné vyjádření afinity kovového kationtu k ligandu. Zdroj HL a postup použitý při izolaci, koncentrace HL, iontová síla roztoku, pH, teplota a způsob zpracování experimentálních dat pro výpočet konstanty stability mohou ovlivňovat dosažené výsledky [11].

## 2.4 Fluorescenční spektroskopie

### 2.4.1 Fluorescence

Fluorescence je vlastnost některých látek, které jsou následně po absorpci záření schopny emitovat záření vyvolané přechodem mezi elektronovými stavy o stejné multiplicitě. Excitovaného stavu dosáhne molekula elektronovým přechodem po absorpci fotonu. Absorpce fotonu, která nastane v důsledku interakce oscilujícího vektoru elektrického pole elektromagnetického záření s nábojem v molekule (elektronem), může nastat pouze dopadajícím zářením určité vlnové délky. Pokud absorbovaný foton obsahuje více energie než je nezbytné pro elektronový přechod, nadbytek energie je obvykle převeden na vibrační a rotační energii. Avšak při interakci molekuly s fotonem, který nemá postačující energii pro přechod mezi elektronovými stavy, absorpce nenastane. Každý elektronový stav je rozdělen na několik vibračních a rotačních energetických hladin. Základním stavem většiny molekul je elektronový singlet. Při pokojové teplotě má velmi málo molekul dostatek vnitřní energie, aby existovala v jiném stavu než na nejnižší vibrační hladině základního stavu, čili excitace začíná obvykle z této energetické hladiny.

Absorpcí vhodného záření dochází zpravidla k excitaci do jedné z vibračních hladin prvního ( $S_1$ ) nebo druhého ( $S_2$ ) singletového energetického stavu. Okamžitě po absorpci fotonu molekula přechází na nejnižší vibrační hladinu prvního excitovaného stavu vnitřní konverzí a vibrační relaxací. Vnitřní konverze je nezářivý přechod mezi dvěma elektronovými stavy stejné spinové multiplicity. Jestliže by se jednalo o přechod mezi dvěma vibračními hladinami stejné energie, patřící ale elektronovým stavům různé multiplicity, jednalo by se o tzv. mezisystémový přechod. Excitovaná molekula existuje v nejnižším excitovaném singletovém stavu ( $S_1$ ) několik nanosekund než nakonec přejde do základního stavu ( $S_0$ ). Tento přechod je doprovázen emisí fotonu a nazývá se fluorescence. Protože energie vyzářená při fluorescenci je v důsledku neradiačních přechodů menší než při absorpci, bude fluorescenční spektrum posunuto k vyšším vlnovým délkám.

Fluorescenční spektrum zobrazuje rozdělení pravděpodobnosti různých přechodů z nejnižší vibrační hladiny  $S_1$  stavu do různých vibračních hladin  $S_0$  stavu. Existence rotačních a vibračních energetických hladin v každém elektronovém stavu je příčinou tvorby širokých emisních pásů. Emisní spektrum je tak charakteristické pro danou sloučeninu. Emisní spektrum je závislost intenzity fluorescence na vlnové délce při konstantní excitační vlnové délce. Spektrum měřené při konstantní vlnové délce emise a různé vlnové délce excitace se nazývá excitační spektrum.

Emisní a excitační spektra lze snímat pomocí spektrofluorimetrů. Zdrojem světla bývá lampa emitující konstantní proud fotonů. Světelný zdroj konvenčního typu fluorimetru je vysokotlaká xenonová výbojka. Pomocí excitačního monochromátoru je vybrána excitační vlnová délka. Fluorescence je snímána zpravidla v pravém úhlu k dopadajícímu záření a detekována skrze emisní monochromátor fotonásobičem [20].

## 2.4.2 Zhášení fluorescence

Zhášení fluorescence je bimolekulární proces, při kterém dochází ke snižování kvantového výtěžku fluorescence bez změny fluorescenčního emisního spektra. Jedná se o deaktivací mechanismy, které zahrnují přenos energie z jedné molekuly na druhou. Kvantový výtěžek je poměr počtu fotonů emitovaných a absorbovaných fluoroforem za sekundu. Dynamické (srážkové) zhášení nastává, pokud je fluorofor v excitovaném stavu deaktivován při srážce s molekulou zhášeďla. Fluorofor se následně navrácí nezářivě do základního stavu. Molekuly nejsou na rozdíl od statického zhášení při tomto procesu chemicky měněny. Jedním z nejvýznamnějších zhášeďů je molekulový kyslík. V případě statického zhášení se po kontaktu fluoroforu a zhášeďla vytváří nefluoreskující komplex. Možné je také tzv. samozhášení, což je zhášení fluoroforu jím samotným a nastává při jeho vysokých koncentracích.

Pokles fluorescence způsobený dynamickým zhášením popisuje tzv. Stern-Volmerova rovnice:

$$\frac{\phi_0}{\phi} = \frac{I_0}{I} = 1 + k_q \tau_0 [Q] = 1 + K_{sv} [Q], \quad (1)$$

kde  $\phi_0$  a  $\phi$  je kvantový výtěžek fluorescence bez a v přítomnosti zhášeďe,  $I_0$  a  $I$  jsou intenzity fluorescence v ustáleném stavu v nepřítomnosti a v přítomnosti zhášeďe,  $k_q$  je bimolekulární zhášeďecí konstanta,  $\tau_0$  je doba života excitovaného stavu za nepřítomnosti zhášeďe a  $[Q]$  je koncentrace zhášeďe.  $K_{sv}$  je Stern-Volmerova zhášeďecí konstanta.

Statické zhášení předpokládá existenci oblasti účinného zhášení (kdy zhášeď a fluorofor nemění vůči sobě svoji polohu během doby života excitovaného stavu fluoroforu) a nebo vytvoření nefluoreskujícího komplexu v základním stavu.

Předpokládáme-li tvorbu nefluoreskujícího komplexu podle rovnice



fluorescenční intenzita klesá s přidávkem Q. Závislost intenzity fluorescence na koncentraci zhášeďla lze odvodit z disociační konstanty vzniklého komplexu

$$K_s = \frac{[M-Q]}{[M][Q]}, \quad (3)$$

kde  $[M-Q]$  je koncentrace komplexu,  $[M]$  je koncentrace fluoroforu a  $[Q]$  je koncentrace zhášeďe. Celková koncentrace fluoroforu  $[M]_0$  je dána vztahem:

$$[M]_0 = [M] + [M-Q]. \quad (4)$$

Z rovnice (3) a (4) dostáváme:

$$\frac{[M]}{[M]_0} = \frac{1}{1 + K_s [Q]}. \quad (5)$$

Vzhledem k tomu, že intenzity jsou úměrné koncentraci (platí zejména pro zředěné roztoky), můžeme tento poměr přepsat jako

$$\frac{I_0}{I} = 1 + K_s[Q]. \quad (6)$$

Závislost poměru fluorescence na koncentraci zlášeče je lineární, obdobně jako u dynamického zlášení, jen zlášecí konstanta je nahrazena disociační konstantou  $K_s$  [20].

## 2.5 Studium huminových kyselin pomocí fluorescenční spektroskopie

### 2.5.1 Fluorescenční spektroskopie huminových kyselin

HL mají absorpční maximum v UV oblasti kolem 200–230 nm díky přítomnosti aromatických a dalších organických komponent. Hodnota absorbance při 260 nm je obvykle používána ke stanovení relativního obsahu aromatických C=C v přírodní organické hmotě, jelikož v substituovaných benzenech nebo polyfenolech nastávají  $\pi$ – $\pi^*$  přechody v této oblasti vlnových délek. Barevný koeficient  $A_{465}/A_{665}$  je poměr absorbancí vzorku při 465 a 665 nm. Je nezávislý na koncentraci HL, ale je typický pro jednotlivé frakce přírodní organické hmoty nebo HL získané z různých zdrojů. Hodnoty barevného koeficientu jsou pro HK obvykle menší než 5,0 a pro FK se jeho hodnoty pohybují mezi 6,0 až 8,5 [21]. Poměr je závislý na obsahu aromatického uhlíku a odpovídá stupni kondenzace HL. Malá hodnota poměru koresponduje s vysokým stupněm humifikace a signalizuje malý počet alifatických řetězců.

Huminové kyseliny jsou směsí organických látek, které obsahují fluoroforní skupiny a proto lze při jejich studiu použít metodu fluorescenční spektroskopie. Vodné, koloidní roztoky HK fluoreskují přibližně od 350 po 600 nm. Rozsah  $\pi$ -elektronového systému, typ a počet substituentů na aromatickém kruhu významně ovlivňuje intenzitu fluorescence a emisní vlnovou délku. Celkové fluorescenční chování molekuly je výsledkem souhrnných jevů a výsledné spektrum je souhrnem jednotlivých fluoroforů přítomných v molekule. Výsledný záznam spektra je pak tedy funkcí jak primární, tak i sekundární struktury huminových látek.

Jev molekulární fluorescence je založen na emisi fotonu při přechodu excitovaného elektronu z prvního singletového excitovaného stavu do singletového základního stavu. Toto chování předpokládá vybuzení elektronů z molekulových orbitalů základního stavu do excitovaných ne vazebných nebo antivazebných orbitalů. Typický přechod tohoto druhu zahrnuje vybuzení přístupných  $n$  nebo  $\pi$  elektronů do  $\pi^*$  orbitalů. Tento proces je vysoce pravděpodobný v molekulárním systému obsahujícím atomy s volnými elektronovými páry jako O<sub>2</sub> a N nebo aromatickém či alifatickém konjugovaném nenasyceném systému schopném vysokého stupně resonance, tj. elektronové delokalizace. To je právě případ huminových kyselin [22].

Fluorescenční techniky se dají využít k rozlišení jednotlivých frakcí přírodní organické hmoty a k rozlišení HL různého původu a povahy [21], [23]. Fluorescenční spektroskopie je citlivá, nedestruktivní metoda a pro analýzu postačí malé množství vodného vzorku i o nízké koncentraci (<20 mg dm<sup>-3</sup>). Na rozdíl od UV/VIS spektroskopie, ve vlastní fluorescenci HK se odráží informace týkající se struktury, funkčních skupin, konformace a heterogenity, stejně

tak dynamické vlastnosti, které souvisí s jejich intramolekulárními a intermolekulárními interakcemi.

V emisním spektru HK obvykle nalézáme široký emisní pás s maximem okolo 510 nm (při  $\lambda_{\text{ex}} = 340$  nm). Při charakterizaci přírodní organické hmoty Chen a kol. [21] zdůvodňují tuto hodnotu vlnové délky maxima emisního spektra HK přítomností kondenzovaných aromatických kruhů a dalších nenasycených systémů, vysokému stupni konjugace, elektron-akceptorových skupin jako jsou karbonylové a karboxylové funkční skupiny. Vodní přírodní organické hmoty bohaté na sacharidy a polyfenoly vykazují oproti HK emisní maximum při kratší vlnové délce a o vyšší intenzitě. Fluorescence v oblasti 440–480 nm je ovlivněna polykondenzací mezi karbonyly a aminy nebo fenolickými strukturami. Nižší intenzitu fluorescence HK dále přisuzují vysoce substituovaným aromatickým strukturám, jejich inter- a intramolekulárním vazbám a samozhášení mezi huminovými makromolekulami, které je způsobeno větší těsností aromatických chromoforů a tedy vyšší pravděpodobností deaktivace excitovaných stavů vnitřním zhášením. Emisní spektra HK jsou odlišná podle typu přírodního zdroje. Porovnání excitačních a emisních spekter HK je uvedeno ve studii Senesi a kol. [22].

Vyšší hodnoty vlnové délky emisního maxima jsou charakteristické pro HK původem z paleosolu, Leonarditu (lignitu), půdy a rašeliny, které mají frakce s vysokou molekulovou hmotností. Pro FK jsou charakteristická maxima při nižší hodnotě vlnové délky emise a vyšší intenzita fluorescence hlavních fluorescenčních píků oproti HK. Tento rozdíl lze uvést na přítomnost jednodušších strukturních komponent, s nižším stupněm aromatické polykondenzace a nižším stupněm konjugace chromoforů u FK. Přítomnost elektro-donorových substituentů jako jsou hydroxyl, methoxyl a amino skupiny v molekulách o nižší molekulové hmotnosti zvyšuje intenzitu fluorescence zvýšením pravděpodobnosti přechodu mezi singletovým a základním stavem. Je nutné poznamenat, že i další elektronové procesy, jako vnitřní konverze a mezisystémový přechod, a také faktory jako koncentrace, pH, iontová síla a teplota mohou do určité míry ovlivňovat intenzitu fluorescence a vlnovou délku emisního maxima.

Excitační spektrum HL obvykle poskytuje několik píků s relativní intenzitou, které se různí podle typu a zdroje HL. Píky jsou zpravidla lokalizovány ve třech oblastech, při vyšších (440–480 nm), středních (380–400 nm) a nižších (300–360 nm) vlnových délkách ( $\lambda_{\text{em}} = 520$  nm). Jednotlivé HL z různých zdrojů lze rozlišit podle intenzity těchto excitačních píků. Pro většinu půdních HK, lignitické a rašelinové HK jsou charakteristické dva hlavní excitační píky v oblasti vysokých vlnových délek (463–467 a 440–451 nm), často doprovázené menším píkem ve střední oblasti (390–395 nm). Paleosol a terra rossa půdní HK vykazují pouze jeden hlavní excitační pík buď při 466–473 nm nebo 440–447 nm, případně ještě méně intenzivní pík při 450–453 nm nebo při 463 nm a 390–394 nm. Zbývající HK a všechny FK se vyznačují hlavním excitačním maximem ve střední oblasti vlnových délek (388–394 nm) a dalším menším píkem při vyšších či nižších vlnových délkách [22].

Kromě měření emisních a excitačních spekter je v posledních letech značně používanou metodou také synchronní fluorescenční spektroskopie (SFS). Princip měření je takový, že je udržován konstantní rozdíl  $\Delta\lambda$  mezi excitačním a emisním monochromátorem dle rovnice:

$$\Delta\lambda = \lambda_{\text{em}} - \lambda_{\text{ex}} . \quad (7)$$

Synchronní fluorescenční spektroskopie poskytuje vyšší spektrální rozlišení překrývajících se fluorescenčních signálů od jednotlivých komponent, jedná se tedy o citlivější metodu s větším rozlišením píků. Stupeň citlivosti závisí na parametru  $\Delta\lambda$ , který může být zvolen. Optimálně zvolené  $\Delta\lambda$  by mělo odpovídat rozdílu vlnových délek mezi maximem emisního a excitačního spektra [24]. Způsob měření a záznam spektra metodou SFS může být dvojího typu. Sleduje se závislost relativní intenzity fluorescence na excitační (synchronní excitační spektrum) nebo emisní vlnové délce (synchronní spektrum fluorescence).

Při rozlišení vodní organické hmoty Peuravuori a kol. [25] rozdělili synchronní spektrum (pro  $\Delta\lambda = 18$  nm) na několik oblastí, které by měli odpovídat odlišným chromoforům. Maximum soustředěné při  $\lambda_{ex}/\lambda_{em}$  okolo 280/298 nm přiřítají aromatickým aminokyselinám a některým dalším kyselinám obsahující vysoce konjugované alifatické struktury. Potenciálním chromoforem pro  $\lambda_{ex}/\lambda_{em} = 330/348$  nm může být naftalen a jeho deriváty. U frakce HL je tato oblast nevýrazná. Intenzita v oblasti okolo  $\lambda_{ex}/\lambda_{em} = 355/373$  nm odpovídá polycyklickým aromatickým látkám, se třemi až čtyřmi benzenovými kruhy. A oblast  $\lambda_{ex}/\lambda_{em}$  soustředěná kolem 400/418 nm by měla odpovídat polycyklickým aromatickým látkám s pěti benzenovými kruhy. Poslední oblast s maximem pro  $\lambda_{ex}/\lambda_{em}$  při vlnových délkách 460/478 nm pravděpodobně odráží polycyklické látky sestávající se přibližně ze sedmi benzenových kruhů.

Pomocí synchronního excitačního spektra ( $\Delta\lambda = 18$  nm) Senesi a další [22], [24] rozlišují HL. Pro rašelinové, Leonardite (standard lignitické HK) a půdní HK je spektrum charakteristické hlavním píkem při vyšších vlnových délkách, pro půdní okolo 475 nm a Leonardite 480 nm. Spektrum půdní a rašelinové FK je více strukturované s hlavním píkem okolo 457 nm a několika minoritními píky různé intenzity. Hlavní maximum synchronního spektra HK při vyšší vlnové délce a o nižší intenzitě oproti FK potvrdil i Chen a kol. [23] při  $\Delta\lambda = 20$  nm. U půdní HK v synchronním spektru našli tři hlavní píky při 466, 480 a 489 nm, které přisuzují různým elektron-akceptorovým substituentům v HK. Hlavní pík pro půdní FK se nacházelo okolo 400 nm, což podle autorů odpovídá fenolickým fluoroforům. Poloha maxima HK opět nasvědčuje většímu počtu konjugovaných aromatických  $\pi$ -elektronových systémů s elektron-akceptorovými funkčními skupinami. Závislost R.F.I. (relativní intenzita fluorescence) HK na hodnotě pH se ve spektru SFS projevuje výrazněji v oblasti 340–450 nm než v oblasti kolem 470–480 nm. Se zvyšujícím se pH se intenzita spektra zvyšuje. Výraznější ovlivnění oblasti 340–450 nm podle autorů souvisí s ionizací fenolických hydroxidů, snížení asociace a rozpojení makromolekulární struktury.

Intenzita píků může být tedy užita jako indikátor povahy přírodní organické hmoty. Posuny hlavních píků ve spektru směrem k vyšším vlnovým délkám v oblasti 450–480 nm (červený posun) indikují přítomnost polykondenzovaných huminových komponent. Vyšší hodnota R.F.I. odpovídá obsahu komponent o vysoké molekulové hmotnosti. Oproti tomu přítomnost většího počtu jednoduchých a disociovaných fenolických chinonových typů organických sloučenin vede ke zvýšení intenzity fluorescence v oblasti 380–430 nm.

### 2.5.2 Studium komplexace metodou fluorescenční spektroskopie

Vazebná místa, která se nacházejí ve struktuře HL, mají odlišné komplexační vlastnosti. Účinná komplexace mezi kovovým iontem a HL závisí na strukturním a konformačním chemizmu každé jednotlivé molekuly a na uspořádání funkčních skupin jednotlivých vazebných míst [26]. Kovové ionty jsou v HL vázány funkčními skupinami, které obsahují volný elektronový pár a  $\pi$  vazebné elektrony jako jsou COOH, OH a aromatické struktury. Případná komplexace zvyšuje dislokaci elektronů a to má za následek zvýšení absorpance huminového materiálu [27]. Komplexace s kovovým iontem mění elektronovou polarizaci jak kovového iontu tak vazebného místa HL. Vzhledem k fluorescenčním vlastnostem jednotlivých vazebných míst může taková změna vést ke zvýšení či snížení fluorescenční intenzity při určité emisní vlnové délce. Fluorescenční spektrum je pak výsledným součtem intenzit všech fluoroforů. Fluorofory, které jsou spojeny s vazebnými místy, jsou ovlivněny přítomností kovových iontů a jaké povahy bude toto ovlivnění závisí na povaze kovového iontu a samozřejmě do jisté míry i na experimentálních podmínkách [26], [28].

Paramagnetické kovové ionty jako jsou  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Cr}^{3+}$ ,  $\text{Cr}^{4+}$  a  $\text{VO}^{2+}$  mohou efektivně zhaset fluorescenci ligandů HL, přičemž zhasací efekt diamagnetických kovových iontů  $\text{Pb}^{2+}$  a  $\text{Al}^{3+}$  je méně výrazný, dokonce může být u těchto iontů pozorováno i zvýšení fluorescence HL.  $\text{Cd}^{2+}$ , které vytváří slabé komplexy, a kationty jako  $\text{K}^+$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  a  $\text{Ba}^{2+}$  nevykazují zhasací účinek. Větší zhasací schopnost měďnatých iontů  $\text{Cu}^{2+}$  je přisuzována jejich schopnosti vytvářet silné komplexy vnitřní sféry [11], [26], [29]. Přechodné kovy mají energetickou  $d$  hladinu nižší než excitovaný singletový stav HL a proto dokáží účinně zhaset fluorescenci HL ligandů prostřednictvím intermolekulárního přenosu energie [30].

Jak dokládají Lu a Jaffe [28] se svými pokusy s  $\text{Hg}^{2+}$  ionty, zhaset lze i fluorescenci rozpuštěné organické hmoty. Zvyšující se zhasení intenzity emisního spektra se vzrůstající koncentrací  $\text{Hg}^{2+}$  poukazuje na to, že  $\text{Hg}^{2+}$  ionty musí být navázány na fluoroforní skupiny organické hmoty [31]. Přírodní organická hmota je ale směsí mnoha komponent a tedy výsledné zhasení není úměrné všem vazebným místům. Jak je již v kapitole 2.3.2 zmíněno pH ovlivňuje komplexaci kovových iontů. Největší zhasení rozpuštěné organické hmoty lze pozorovat při pH 8. Hydrolyza  $\text{Hg}^{2+}$  patrně způsobuje, že nad pH 8,5 se fluorescence zvyšuje. S poklesem pH od 8 do 3,5 dochází také k čím dál menšímu zhasení emisní fluorescence systému. To je pravděpodobně způsobeno větším soupeřením protonů a  $\text{Hg}^{2+}$  iontů o vazebná místa. Další pokles pH od 3,5 po 2,5 opět vyvolává zvýšení zhasení, možná následkem strukturních změn v rozpuštěné organické hmotě díky protonaci kyselých funkčních skupin. Při pH 2,5 je fluorescenční intenzita emise rozpuštěné organické hmoty s  $\text{Hg}^{2+}$  ionty stejná jako bez přídavku těchto iontů. To by souhlasilo s hypotézou, že při této a nižší hodnotě pH nedochází k významnému vázání iontů a nenavázané kovové ionty nezhasí fluorescenci [28].

Podle práce Monteil-Rivera a kol. [10] svědčí o tvorbě komplexu HL také s ionty kobaltu pokles emisní intenzity HL. Kromě změn v intenzitě fluorescence bývá komplexace HL s některými kovovými ionty doprovázena i změnami v jejich emisním spektru. U  $\text{Co}^{2+}$  iontů lze pozorovat posun maxima emisního spektra HL k nižším vlnovým délkám. Při sledování komplexace pomocí synchronní fluorescence ale není zjištěné zhasení tak jednoznačné. V případě Leonardite HK standardu, při nastavení  $\Delta\lambda = 20$  nm, se hlavní maximum spektra nachází při 463–467 nm. To je s přídavkem  $\text{Co}^{2+}$  iontů zhaseno, avšak postupně s růstem koncentrace iontů nedochází k soustavnému poklesu intenzity fluorescence. Od koncentrace  $5 \cdot 10^{-4}$  mol  $\text{dm}^{-3}$  lze dokonce pozorovat pro HK, o koncentraci  $3,3$  mg  $\text{dm}^{-3}$ , nárůst

fluorescence. Naproti tomu při použití  $\Delta\lambda = 80$  nm dochází k postupnému zhášení maxima synchronního spektra podobně jako u emisního spektra. Při tomto nastavení se hlavní maximum objevuje při jiné vlnové délce než při nastavení  $\Delta\lambda = 20$  nm a synchronní spektra poskytují slabší rozlišení. Při tomto nastavení je dominantní jiný fluorofor než při použití  $\Delta\lambda = 20$  nm [10].

Komplexaci  $\text{Ni}^{2+}$  iontů doprovází pokles intenzity excitačního spektra půdní HK. Nejvíce ovlivněn se jeví fluorofor, který vytváří pík při excitaci 446 nm. Toto maximum bylo ověřeno metodou EEM, kdy spektrum s hlavním maximem  $\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}}$  445/525 nm a méně intenzivním píkem při  $\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}}$  370/495 nm vykazuje v důsledku komplexace iontů nikelnatých pokles intenzity u obou píků.

Obdobné jevy pozorovali ve stejné práci i při komplexaci  $\text{Zn}^{2+}$  iontů, avšak v důsledku rozdílné elektronové konfigurace a rozdílné afinity HK k oběma iontům je zhášení méně výrazné než v případě  $\text{Ni}^{2+}$  [30].

Přidáním  $\text{Al}^{3+}$  iontů k HL dochází jak ke zhášení, tak i ke zvýšení fluorescence, v závislosti na pH prostředí a také na sledovaném fluoroforu a jeho excitační a emisní vlnové délce [26], [29]. Obdobné chování jako v přítomnosti  $\text{Al}^{3+}$  iontů vykazují HL i v přítomnosti  $\text{Be}^{2+}$  [32]. Kromě zvýšení emisní intenzity po přidání  $\text{Al}^{3+}$  iontů pozorovali Zhao a Nelson [33] také změnu fluorescenčního profilu FK, přesněji řečeno červený posun excitačního maxima a modrý posun vlnové délky emisního maxima.

Fluorescenční zhášení souvisí s přítomností nespárovaných elektronů v kovovém iontu. Proto titrace HL  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  a  $\text{La}^{3+}$  ionty nevyvolává žádnou měřitelnou změnu fluorescenčního signálu. Naproti tomu ionty  $\text{Tb}^{3+}$  a  $\text{Cu}^{2+}$  a ještě výrazněji  $\text{Pd}^{2+}$  a  $\text{Fe}^{3+}$  ionty způsobují zhášení HL [33].

Neves a kol. [34] se zabývaly vlivem iontů na strukturu syntetické HK, která byla získána oxidační polymerizací směsi hydrochinonu s *p*-aminobenzoovou kyselinou. Experiment provedli s ionty  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$  a  $\text{Mn}^{2+}$ . Excitační spektra ( $\lambda_{\text{em}} = 500$  nm) v přítomnosti těchto iontů vykazují snížení intenzity v oblasti 200–350 nm, nejvýraznější po přidání  $\text{Cu}^{2+}$ . Snížení fluorescenční intenzity může podle autorů souviset s molekulovou hmotností po zformování komplexu HK s kovovými ionty. Zvýšení intenzity v oblasti 375–460 nm přičítali redukcí karboxylových skupin v molekule po komplexaci. Emisní spektrum ( $\lambda_{\text{ex}} = 330$  nm) komplexů syntetické HK vykazovalo široký pás při 492 nm. Všechna spektra opět vykazují snížení fluorescenční intenzity ve srovnání se vzorky bez přísad iontů. Jedním z vysvětlení může být také těsnější blízkost aromatických chromoforů a tím větší pravděpodobnost deaktivace excitovaných stavů.

V případě  $\text{Cu}^{2+}$  iontů, zvýšení jejich koncentrace v systému fluoreskujících ligandů jako jsou huminové látky, vede k poklesu intenzity jejich fluorescenčního spektra. Spektra fluoreskujících molekulových frakcí, které nevykazují komplexační vlastnosti zůstávají přibližně neměnné [35]. Zhášení fluorescence HL  $\text{Cu}^{2+}$  ionty má povahu statického zhášení, což svědčí o tvorbě komplexu v základním stavu [33]. Nakashima a kol. [36] ze zhášení emisního spektra HK identifikoval dvě vazebná místa, s různou afinitou k  $\text{Cu}^{2+}$  iontům. Smith a Kramer [37] při studiu zhášení fluorescence FK měďnatými ionty zaznamenali zřetelný pokles fluorescence FK při  $\text{Cu}^{2+}$  koncentraci  $10^{-6}$  mol  $\text{dm}^{-3}$  a konstantní zhášení od koncentrace  $10^{-4}$  mol  $\text{dm}^{-3}$ . V EEM spektru lze po přidání  $\text{Cu}^{2+}$  iontů kromě markantního poklesu fluorescenční intenzity, zaznamenat také zřetelný pokles vlnové délky u emisního maxima, přičemž vlnová délka excitačního maxima zůstává neměnná [14].

Pro popis zhášení fluorescence je často využívána Stern-Volmerova rovnice (1), popisující závislost poměru fluorescence zjištěné v přítomnosti a nepřítomnosti zhášedce na jeho koncentraci  $[Q]$ . V případě  $\text{Cu}^{2+}$  iontů závislost poměru fluorescence na koncentraci přidaných iontů není lineární. Možným vysvětlením pro nelineárnost závislosti je existence dvou populací fluoroforu. Jedna je přístupná pro zhášedce a druhá není přístupná. Pouze fluorescence vycházející z přístupného typu fluoroforu má potenciál být zhášena přidáním zhášedce. Důsledkem je pak odchýlení od linearit ve Stern-Volmerově rovnici [33], [38].

Celkovou fluorescenci při absenci zhášedce  $I_0$  můžeme vyjádřit jako fluorescenci vycházející z fluoroforů které mohou vytvořit komplex se zhášedcem  $I_{0a}$  a fluorescenci z nepřístupných fluoroforů  $I_{0b}$ ,

$$I_0 = I_{0a} + I_{0b}. \quad (8)$$

V přítomnosti zhášedce se jen  $I_{0a}$  mění podle Stern-Volmerovy rovnice a zjištěná intenzita fluorescence je dána rovnicí

$$I = \frac{I_{0a}}{1 + K_a [Q]} + I_{0b}, \quad (9)$$

kde  $K_a$  je Stern-Volmerova zhášecí konstanta přístupné frakce a  $[Q]$  je koncentrace zhášedce. Po odečtení rovnice (9) od (8) dostaneme:

$$\Delta I = I_0 - I = I_{0a} \left( \frac{K_a [Q]}{1 + K_a [Q]} \right). \quad (10)$$

Úpravou rovnice (10) získáme upravenou Stern-Volmerovu rovnici:

$$\frac{I_0}{\Delta I} = \frac{1}{f_a K_a [Q]} + \frac{1}{f_a}, \quad (11)$$

kde  $f_a$  představuje část počáteční fluorescence, která je schopna podlehnout zhášení

$$f_a = \frac{I_{0a}}{I_{0a} + I_{0b}}. \quad (12)$$

Parametry  $f_a$  a  $K_a$  můžeme snadno získat z rovnice (11) vynesením závislosti poměru  $I_0/\Delta I$  na  $1/[Q]$  [33]. Tato lineární závislost vymezuje na ose  $y$  úsek, který odpovídá hodnotě  $1/f_a$ . Hodnotu  $K_a$  se pak dá určit ze směrnice této přímky ( $1/f_a K_a$ ) [28]. Konstanta  $K_a$ , zjištěná pomocí upravené Stern-Volmerovy rovnice, odpovídá konstantě stability komplexu, která je určena rovnicí:

$$K_{\text{HKCu}} = \frac{[\text{HK} - \text{Cu}]}{[\text{HK}][\text{Cu}^{2+}]}, \quad (13)$$

kde  $[HK - Cu]$  a  $[HK]$  jsou koncentrace vázaných a nenávaných HK a  $Cu^{2+}$  iontů a  $[Cu^{2+}]$  je koncentrace volných iontů [28], [31], [39], [40]. Zhao a Nelson [33] pokládají  $\log K_a$  za rovný  $\log K_s$  z rovnice (6) a konstanta je ve shodě s hodnotami vypočítanými metodou podle Ryana a Webera [41].

Fluorescenční spektroskopie má při studiu interakcí HL s kovy ve vodném prostředí několik výhod. Jedná se o metodu jednoduchou, nedestruktivní, dosti citlivou a relativně rychlou [14], [28]. Nevyžaduje separaci volných kovových iontů a umožňuje přímé měření komplexní kapacity HL, a proto představuje výborné doplnění k dalším technikám, např. potenciometrie, konduktometrie a další [11].

### 3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

#### 3.1 Použité přístroje a chemikálie

Použité přístroje:

- pH metr Hanna pH 212
- luminiscenční spektrometr Aminco Bowman, Series 2 s programem AB2
- UV/VIS spektrofotometr Varian Cary 50 Probe
- atomový absorpční spektrofotometr Varian SpectrAA-30

Použité chemikálie:

- hydroxid sodný (Normanal,  $0,1 \text{ mol dm}^{-3}$ ), Lach-Ner s.r.o., Neratovice
- kyselina chlorovodíková (Normanal,  $0,1 \text{ mol dm}^{-3}$ ), Lach-Ner s.r.o., Neratovice
- kyselina fluorovodíková (p.a.), Lach-Ner s.r.o., Neratovice
- $\text{Na}_2\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$  (p.a.), Sigma-Aldrich s.r.o.
- roztok pufru pH 7, Labicom s.r.o., Olomouc
- $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (p.a.), Penta, Chrudim
- destilovaná a MiliQ voda
- huminová kyselina HAN, připravena Mgr. Fasurovou, Ph.D.
- humát 22/11/05, připraven Ing. Kučeríkem, Ph.D. a Ing. Čechlovskou, Ph.D.

#### 3.2 Použitý vzorek humátu

Hlavní experimenty nebyly provedeny s huminovou kyselinou, ale s její sodnou solí, humátem, který se pro experimenty v roztoku jevil jako vhodnější. Huminová kyselina by se musela rozpouštět v NaOH a dále upravovat pomocí HCl na pH 7. Práce s humátem byla výhodnější z důvodu jeho snadné rozpustnosti ve vodě.

##### 3.2.1 Extrakce huminových kyselin z lignitu a příprava humátu

Huminová kyselina byla izolována alkalickou extrakcí, standardním postupem IHSS (International Humic Substances Society), z jihomoravského lignitu (Mikulčice). Lignit byl přelit extrakčním činidlem a směs byla třepána 24 hodin pod  $\text{N}_2$  atmosférou. Extrakční činidlo tvořila směs  $0,5 \text{ mol dm}^{-3}$  NaOH a  $0,1 \text{ mol dm}^{-3}$   $\text{Na}_2\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ . Po odstředění pevného podílu byla kapalná fáze okyselená na pH 1–2 přidáním 20 % HCl. Vysrážená HK byla přečištěna směsí HCl a HF. Následovalo odstředění a promytí destilovanou vodou.

Roztok izolované HK v destilované vodě byl upraven pomocí NaOH na pH 7. Vzniklý roztok humátu sodného byl po sedm dní dialyzován (dialyzační membrány Spectrapor 3, molekulová hmotnost MWCO 3500) v destilované vodě, která byla třikrát denně měněna. Poté byl vzorek vymražen při teplotě  $-50 \text{ }^\circ\text{C}$ .

### 3.2.2 Elementární analýza použitého humátu

Vzorek humátu s označením 22/11/05 byl podroben elementární analýze na CHNSO analyzátoru Carlo Erba na ÚSMH AVČR v Praze. Výsledky analýzy jsou uvedeny v následující tabulce (Tab. 1).

*Tab. 1 Elementární analýza použitého lignitického humátu.*

Označení humátu	C [%]	O [%]	H [%]	N [%]	Popel [%]
Humát 22/11/05	58,43	35,89	4,29	1,39	18,16

Výsledky analýzy lignitické huminové kyseliny HAN jsou uvedeny v tabulce (Tab. 2). Protože se jedná o elementární analýzu bezpopelové HK, je zde uveden i obsah popela ve vzorcích.

*Tab. 2 Elementární analýza použité lignitické huminové kyseliny.*

Označení HK	C [%]	O [%]	H [%]	N [%]	Popel [%]
HAN	57,46	34,93	5,08	2,53	15,51

### 3.3 Příprava vzorků na měření

Zásobní roztok humátu byl vždy připraven rozpuštěním příslušné navážky humátu 22/11/05 v MiliQ vodě. Zásobní roztoky  $\text{Cu}^{2+}$  iontů se připravovali rozpuštěním  $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  v MiliQ vodě. Při přípravě vzorků na měření byl k 12,5 ml zásobního roztoku humátu přidán příslušný objem zásobního roztoku  $\text{Cu}^{2+}$  a systém byl doplněn MiliQ vodou na objem 25 ml. Vzorky byly promíchány a uloženy v chladničce. Po 48 hodinách byla měřena fluorescence směsi. Po proměření fluorescence bylo změřeno pH vzorků.

### 3.4 Fluorescenční spektroskopie

Budící záření, produkované xenonovou lampou, prochází excitačním monochromátorem, kde dojde k selekci záření vhodné vlnové délky. Toto excitační záření o přesné vlnové délce dopadá na kyvetu se vzorkem. V kolmém směru k budícímu paprsku je měřeno emitované fluorescenční záření. Emitované záření prochází nejprve emisním monochromátorem, jímž je vybrána požadovaná vlnová délka pro měření, a následně je zachyceno detektorem [42].

#### 3.4.1 Postup při měření

Fluorescence byla měřena pomocí spektrofluorimetru Aminco Bowman, Series 2. Po ustálení teploty, pomocí termostatu, se nejprve zapne xenonová lampa přístroje (150 W). Poté samotný přístroj a PC s programem AB2. Po iniciaci instrumentace je do kyvetového prostoru umístěna kyveta s měřeným vzorkem. Teplota cely s kyvetou je udržována oběhovým termostatem Grant s externím chlazením. Po nastavení parametrů měření

(monochromátory, citlivost, atd.) je provedeno vlastní měření. Získaná data jsou vyhodnocena pomocí programu AB2. Výsledná spektra byla zpracována v programu Origin 8.

### 3.4.2 Podmínky měření

- teplota:  $20 \pm 1$  °C
- kyveta z křemenného skla o tloušťce: 10 mm
- šířka štěrbin excitačního a emisního monochromátoru: 4,0 nm
- krok snímání: 1,0 nm
- citlivost detektoru: 60 %
- rychlost snímání:  $1,0 \text{ nm s}^{-1}$

## 3.5 Atomová absorpční spektrometrie

V atomové absorpční spektrometrii se měřicí systém skládá ze zdroje primárního záření, atomizátoru, sloužícího k převedení vzorku do stavu volných atomů, a zařízení pro selektivní měření neabsorbovaného záření (detektor, výpočetní systém). Zdrojem primárního záření je výbojka s dutou katodou. Jako zdroj záření je použit stejný prvek, jaký je stanovován. Principem atomizace v plameni je převedení roztoku na aerosol ve zmlžovači a smíšení s topným plynem a oxidovadlem. Poté je vzorek vnášen do plamene, kde se atomizuje. Primární záření se průchodem přes atomizátor zeslabí. Neabsorbované záření přechází přes monochromátor a je snímáno detektorem [42].

### 3.5.1 Postup při měření

Množství navázaných  $\text{Cu}^{2+}$  iontů do humátu bylo stanoveno atomovou absorpční spektrometrií s atomizací v plameni přístrojem Varian SpectrAA-30. Po spuštění PC s programem AAS a zapnutí samotného přístroje, se nechá lampa minimálně 20 minut zahřát napájecím proudem. Poté se zavede přívod acetylenu, zapne se proudění vzduchu a zapálí plamen ve spektrofotometru. Měřené vzorky jsou do přístroje nasávány kapilárou. Před měřením samotných vzorků je potřeba provést kalibraci přístroje. Kalibrační křivka byla proměřena pro koncentrace  $\text{Cu}^{2+}$  iontů 1, 2 a  $4 \text{ mg dm}^{-3}$ .

### 3.5.2 Podmínky měření

- složení plamene: acetylen-vzduch
- průtok acetylenu:  $1,5 \text{ dm}^3 \text{ min}^{-1}$
- průtok vzduchu:  $3,5 \text{ dm}^3 \text{ min}^{-1}$
- proud výbojek: 4 mA
- vlnová délka: 324,8 nm
- spektrální šíře štěrbin: 0,5 mm

### 3.6 UV-VIS spektrofotometrie

UV-VIS spektrofotometr je přístroj, který se používá pro měření elektronových absorpčních spekter. Zpravidla je tvořen zdrojem záření (xenonová pulzní lampa), monochromátorem, kyvetovou se vzorkem a detektorem. Pomocí monochromátoru se získá monochromatické záření, které prochází kyvetou s měřeným vzorkem. Po absorpci je primární záření zeslabeno a dopadá na detektor. Zjišťuje se změna jeho intenzity po průchodu měřeným vzorkem [42].

#### 3.6.1 Postup při měření

UV/VIS spektrofotometr Varian Cary 50 Probe byl využit pro sledování absorpce vzorků obsahujících  $\text{Cu}^{2+}$  ionty. Po zapnutí přístroje a zpuštění příslušného programu Cary na PC, byla nastavena rychlost a rozsah snímání. Jelikož se jedná o jednopaprskový spektrofotometr, bylo nutné před vlastním měřením proměřit tzv. blank (srovnávací roztok).

#### 3.6.2 Podmínky měření

- vzorky byly měřeny v křemenné kyvetě o tloušťce: 10 mm
- rychlost snímání:  $300 \text{ nm min}^{-1}$
- rozsah snímání: 1100–200 nm

## 4. VÝSLEDKY A DISKUZE

### 4.1 Optimální podmínky pro měření

V první části práce bylo nutné najít nejvhodnější koncentrační rozpětí pro sledování zhášení pomocí spektrofluorimetru Aminco Bowman, Series 2. Pro experimenty byl vybrán iont  $\text{Cu}^{2+}$ , který je často užívaný jako modelový iont pro komplexační experimenty.

Nejprve byly provedeny experimenty s huminovou kyselinou HAN. Při přípravě vzorků na měření musela být HK nejdříve rozpuštěna v NaOH a následně titrována na pH 7 pomocí HCl. Důsledkem tohoto postupu je zvýšení obsahu dalších iontů v měřeném systému, které by mohly ovlivňovat vlastní experiment, tj. sledování očekávaného zhášení fluorescence  $\text{Cu}^{2+}$  ionty následkem jejich komplexace s HK. Proto byla pro hlavní experimenty vybrána sodná sůl HK, tzv. humát. Při přípravě vzorků na měření byl humát vždy rozpuštěn v MiliQ vodě, a tak výsledný systém neobsahoval nadbytek ostatních iontů, které by mohly ovlivňovat vlastní komplexaci  $\text{Cu}^{2+}$  iontů do struktury humátu a které by sami o sobě mohly mít vliv na intenzitu fluorescence samotného humátu.

Pro měření fluorescence na použitém spektrofluorimetru byla koncentrace humátu 22/11/05 vybrána v rozmezí  $10\text{--}50\text{ mg dm}^{-3}$ . Při koncentraci  $10\text{ mg dm}^{-3}$  jsou naměřené hodnoty R.F.I. humátu relativně nízké, proto se jedná o nejnižší koncentraci humátu použitou pro sledování zhášení. Humát o koncentraci  $50\text{ mg dm}^{-3}$  vykazuje poměrně vysoké hodnoty R.F.I., čímž se stává vhodný pro sledování zhášení fluorescence. Na druhou stranu se již jedná o vysoce koloidní systém, a proto koncentrace  $50\text{ mg dm}^{-3}$  byla maximální použitou koncentrací humátu pro následující experimenty.

Hlavním úkolem této práce bylo nalézt měřitelnou oblast koncentrací  $\text{Cu}^{2+}$  iontů pomocí poměrně citlivé metody, fluorescenční spektroskopie. Z předběžného experimentu zhášení emise humátu ( $10\text{ mg dm}^{-3}$ ) ionty  $\text{Cu}^{2+}$  v rozmezí koncentrací  $10^{-7}\text{--}10^{-1}\text{ mol dm}^{-3}$  vyplývá, že od koncentrace  $\text{Cu}^{2+}$  iontů  $10^{-4}\text{ mol dm}^{-3}$  je intenzita emise systému neměnná a zhášení fluorescence humátu je s dalším přidavkem iontů konstantní. Rozdíl mezi naměřenou hodnotou R.F.I. pro systém humátu s  $\text{Cu}^{2+}$  ionty o koncentraci  $10^{-7}\text{ mol dm}^{-3}$  a hodnotou zjištěnou pro samotný humát je velmi malý. Prokazatelně tak můžeme o zhášení mluvit až od koncentrace  $10^{-6}\text{ mol dm}^{-3}$ , což bylo opakovaným měřením potvrzeno. Koncentrační rozmezí  $\text{Cu}^{2+}$  iontů pro detekci zhášení fluorescence humátu a hlavní experimenty práce bylo vybráno  $10^{-6}\text{--}10^{-4}\text{ mol dm}^{-3}$ .

Z důvodů stability pH, byly provedeny předběžné experimenty také za použití pufrů. Vybrán byl pufr pH 7, kde by ještě nemělo docházet k významnému vzniku hydroxidů s  $\text{Cu}^{2+}$ . Avšak výsledky měření zhášení fluorescence nebylo možno vyhodnotit z důvodu kolísání naměřených hodnot a opakovaně nebylo možné spektra korigovat. Roztok humátu je složitý heterogenní systém a přidavek dalších látek do tohoto systému může ovlivňovat komplexaci  $\text{Cu}^{2+}$  iontů s humátem. Provedené experimenty by pak bylo ještě obtížnější vyhodnotit a tak od úpravy pH vzorků pro měření zhášení fluorescence bylo upuštěno.

Hodnota pH sady vzorků, využitá při sledování zhášení fluorescence (koncentrace humátu  $10\text{--}50\text{ mg dm}^{-3}$  a koncentrace měďnatých iontů  $10^{-6}\text{--}10^{-4}\text{ mol dm}^{-3}$ ), se pohybovala v rozmezí 4 až 6, kdy roztok samotného humátu v MiliQ vodě měl pH  $\sim 6$ .

HL běžně vykazují silnou absorpci v UV oblasti (kolem 210-230 nm) [43]. Pro určení koncentrace  $\text{Cu}^{2+}$  iontů v systému a určení absorpčního maxima byla proměřena absorpční spektra humátu s  $\text{Cu}^{2+}$  ionty a  $\text{Cu}^{2+}$  ve vodě. Jako blank byl použit samotný humát, respektive voda. Experimenty byly provedeny s humátem o koncentraci  $10\text{ mg dm}^{-3}$  a pro koncentrace

$\text{Cu}^{2+}$  iontů v rozmezí  $1 \cdot 10^{-7}$ – $2 \cdot 10^{-1}$  mol  $\text{dm}^{-3}$ . Z výsledků měření je patrné, že  $\text{Cu}^{2+}$  ionty ovlivňují absorpci systému v oblasti 813 nm, tedy VIS oblasti. S rostoucí koncentrací  $\text{Cu}^{2+}$  iontů absorpce v této oblasti roste. Touto metodou jsme schopni zaznamenat pouze koncentrace vyšší než  $1 \cdot 10^{-4}$  mol  $\text{dm}^{-3}$  jak ve vodě tak v humátu. Výsledky měření absorpance vzorků jsou uvedeny v tabulce (Tab. 3). Z důvodu použitých nízkých koncentrací mědi v systému bylo následně použito metody atomové absorpční spektrometrie (AAS).

**Tab. 3** Absorbance směsi humátu s  $\text{Cu}^{2+}$  ionty a  $\text{Cu}^{2+}$  ve vodě při 813 nm.

$\text{Cu}^{2+}$ (mol $\text{dm}^{-3}$ )	$A_{813}$	
	$\text{Cu}^{2+}$ v humátu	$\text{Cu}^{2+}$ ve vodě
$5 \cdot 10^{-3}$	0,009	0,008
$1 \cdot 10^{-2}$	0,118	0,121
$5 \cdot 10^{-2}$	0,634	0,655
$1 \cdot 10^{-1}$	1,369	1,384
$1,5 \cdot 10^{-1}$	2,374	2,334
$2 \cdot 10^{-1}$	2,957	4,360

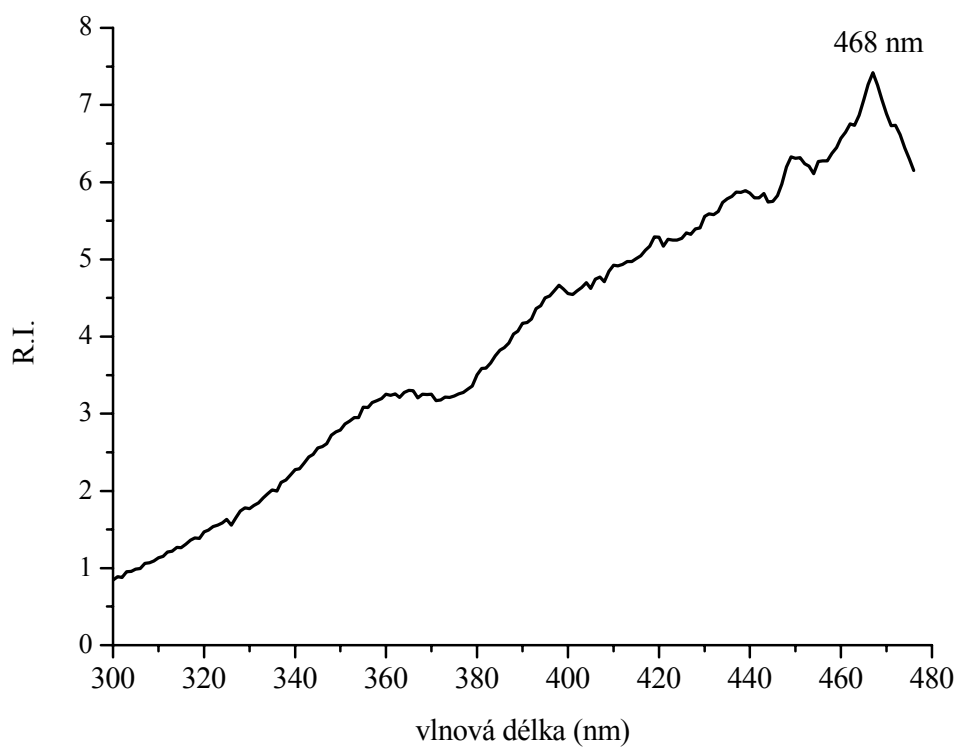
## 4.2 Emisní a excitační spektra humátu

### 4.2.1 Excitační spektrum humátu a vliv $\text{Cu}^{2+}$ iontů

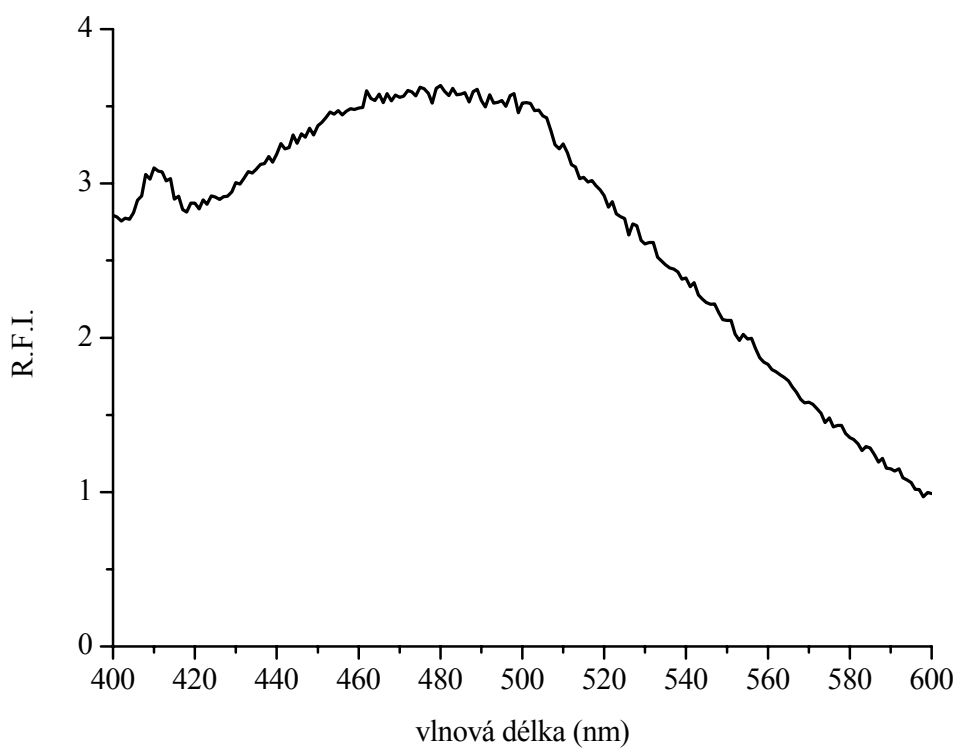
Excitační spektra byla snímána v rozmezí 300–480 nm, při konstantní emisní vlnové délce  $\lambda_{\text{em}} = 500$  nm. Při měření excitačního spektra humátu byl experiment proveden s koncentracemi humátu 10 a 50 mg  $\text{dm}^{-3}$ . Emisní vlnová délka byla vybrána, jelikož v oblasti této vlnové délky leží standardně maximum emisního pásu lignitické HK [21], [22].

Na (Obr. 11) je zobrazeno excitační spektrum samotného humátu 22/11/05 o koncentraci 50 mg  $\text{dm}^{-3}$ . Excitační spektrum samotného humátu vykazuje hlavní maximum při vlnové délce 468 nm. Excitační maximum při této vlnové délce bylo ověřeno pro dvě koncentrace humátu. Kromě hlavního maxima při vlnové délce 468 nm se v excitačním spektru humátu nachází další výraznější pík při 450 nm a méně výrazné píky při 440, 398 nm a rameno při 360 nm. Dvě hlavní excitační maxima při 450 468 nm odpovídají lignitické HK, pro které jsou charakteristická dvě maxima v této oblasti vlnových délek [22].

Na (Obr. 12) je zobrazeno emisní spektrum lignitického humátu 22/11/05 při excitační vlnové délce, která je často používaná při charakterizaci HL [22],  $\lambda_{\text{ex}} = 360$  nm. Ze spektra je zřejmé, že emisní maximum leží v oblasti 500 nm.



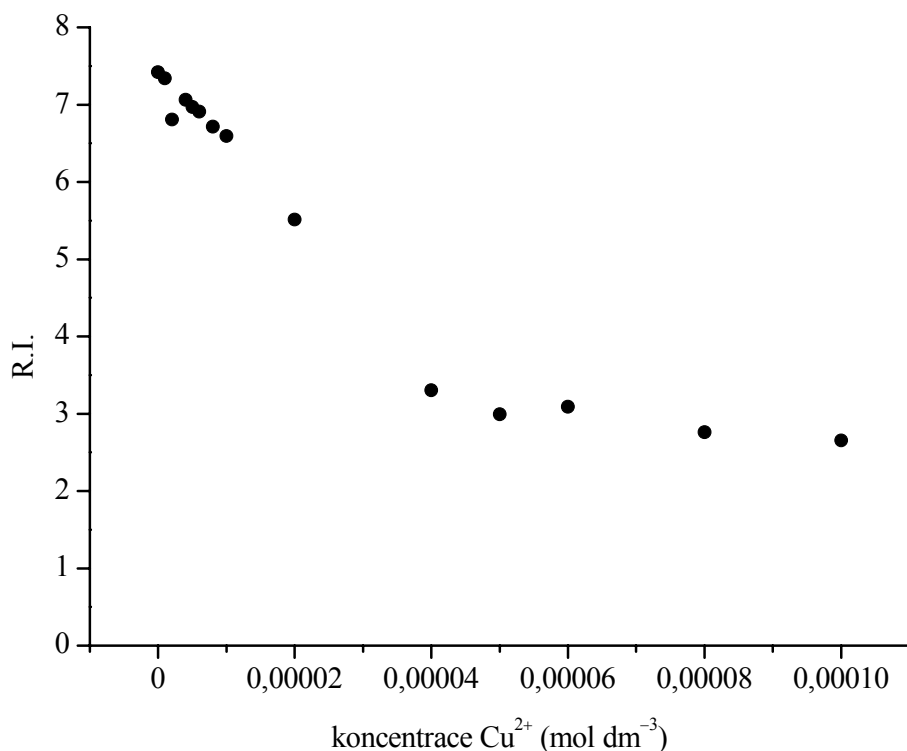
**Obr. 11** Excitační spektrum ( $\lambda_{em} = 500 \text{ nm}$ ) samotného humátu o koncentraci  $50 \text{ mg dm}^{-3}$ .



**Obr. 12** Emisní spektrum ( $\lambda_{ex} = 360 \text{ nm}$ ) samotného humátu o koncentraci  $50 \text{ mg dm}^{-3}$ .

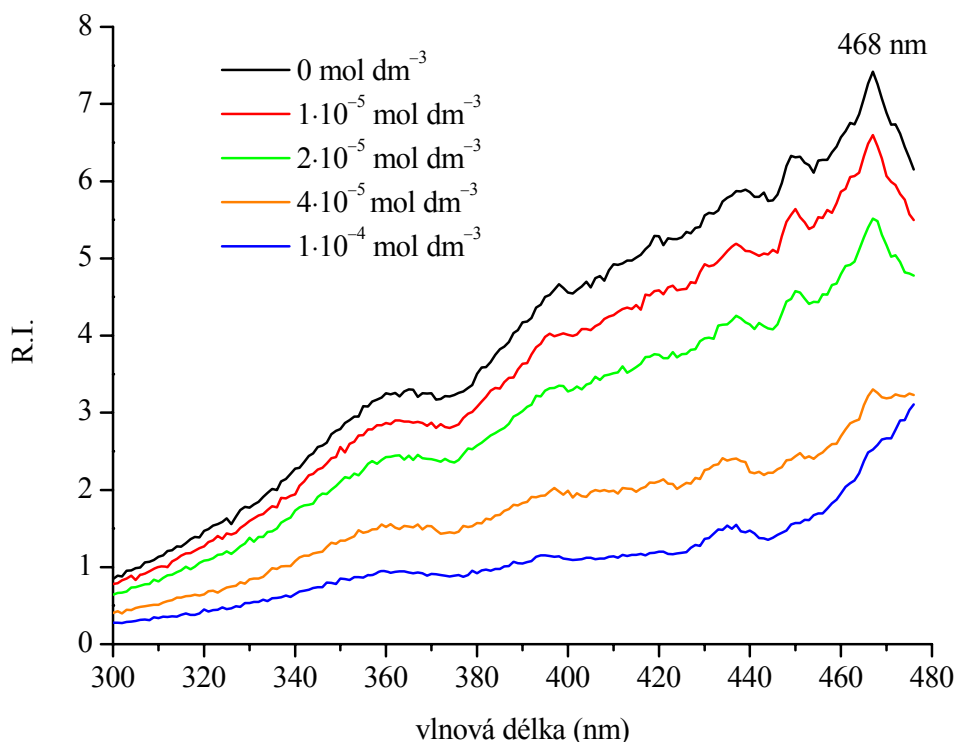
Pro posouzení vlivu  $\text{Cu}^{2+}$  iontů byla proměřena excitační spektra humátu s různým přídatkem  $\text{Cu}^{2+}$  iontů při stejném nastavení jako při snímání excitačního spektra samotného humátu. Koncentrace  $\text{Cu}^{2+}$  iontů se pohybovala v rozmezí  $10^{-6}$ – $10^{-4}$  mol  $\text{dm}^{-3}$  a koncentrace humátu 22/11/05 byla 50 mg  $\text{dm}^{-3}$ .

S rostoucí koncentrací  $\text{Cu}^{2+}$  excitační spektrum měřeného systému vykazuje snižování své intenzity, včetně hlavního excitačního maxima. Ve spektru nebyl pozorován žádný posun vlnové délky excitačního maxima. Hodnoty relativní intenzity (R.I.) maxima excitačního spektra humátu při 468 nm se pohybovaly v rozmezí od 7,42, pro samotný humát, do hodnoty 2,65 pro maximální koncentraci  $\text{Cu}^{2+}$  iontů v systému. Vynesená závislost R.I. humátu 50 mg  $\text{dm}^{-3}$  pro vlnovou délku 468 nm na obsahu  $\text{Cu}^{2+}$  iontů v systému dokládá zhasení excitace, viz. (Obr. 13). Fluorofor určený při  $\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}} = 468/500$  nm je při přidavku měďnatých iontů do systému výrazně zhasen, z čehož vyplývá jeho ovlivnění komplexací s měďnatými ionty.



**Obr. 13** Závislost R.I. maxima excitačního spektra (468 nm) na koncentraci  $\text{Cu}^{2+}$  iontů.

Dále lze pozorovat, že mezi koncentracemi  $\text{Cu}^{2+}$  iontů 2 až  $4 \cdot 10^{-5}$  mol  $\text{dm}^{-3}$  v systému dochází k velkému skoku v intenzitě excitačního spektra humátu. Při vyšších hodnotách koncentrace mědi než  $4 \cdot 10^{-5}$  mol  $\text{dm}^{-3}$  se excitační maximum již úplně ztrácí, jak je vidět na (Obr. 14). Z toho důvodu není vhodné studovat systém lignitických HK v přítomnosti mědi excitačními spektry a je vhodnější měřit emisní spektra, kde je sice pozorovaný emisní pás, avšak lze lépe odečítat hodnoty R.F.I. a studovat zhasení i v přítomnosti vysokých koncentrací mědi.

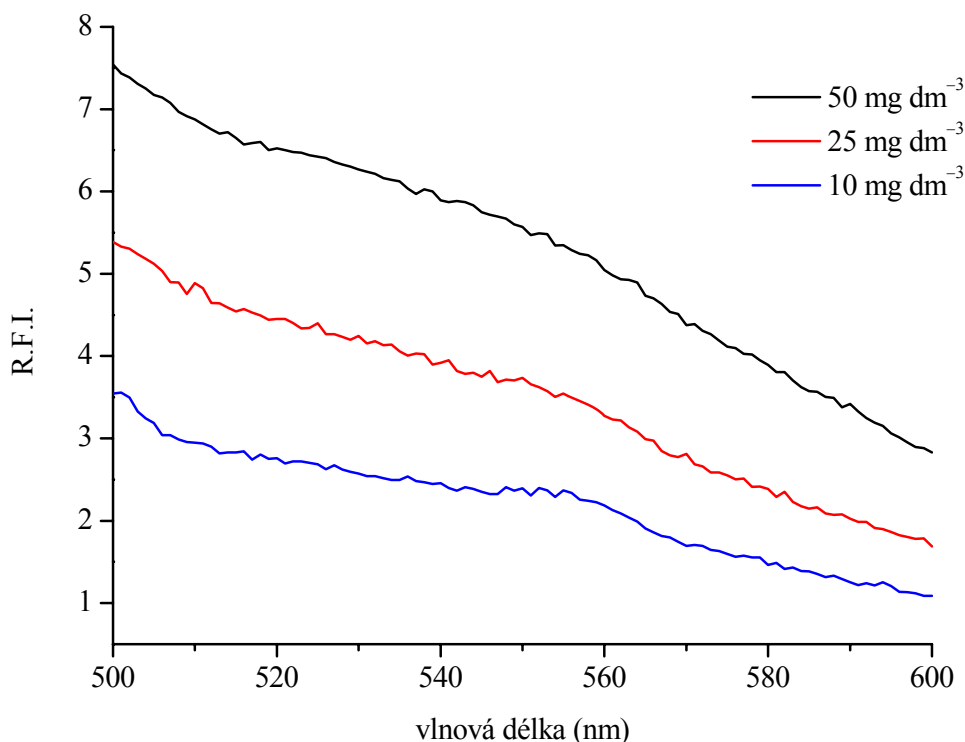


**Obr. 14** Vybraná excitační spektra humátu ( $50 \text{ mg dm}^{-3}$ ) v přítomnosti  $\text{Cu}^{2+}$  iontů.

#### 4.2.2 Emisní spektrum humátu a vliv $\text{Cu}^{2+}$ iontů

V kapitole 4.2.1 bylo identifikováno excitační maximum humátu při vlnové délce 468 nm, proto bylo emisní spektrum snímáno při excitační vlnové délce  $\lambda_{\text{ex}} = 468 \text{ nm}$ . Emisní spektrum humátu 22/11/05 bylo snímáno v rozmezí 500–600 nm. Spektra byla proměřena pro tři různé koncentrace humátu: 10, 25 a  $50 \text{ mg dm}^{-3}$ .

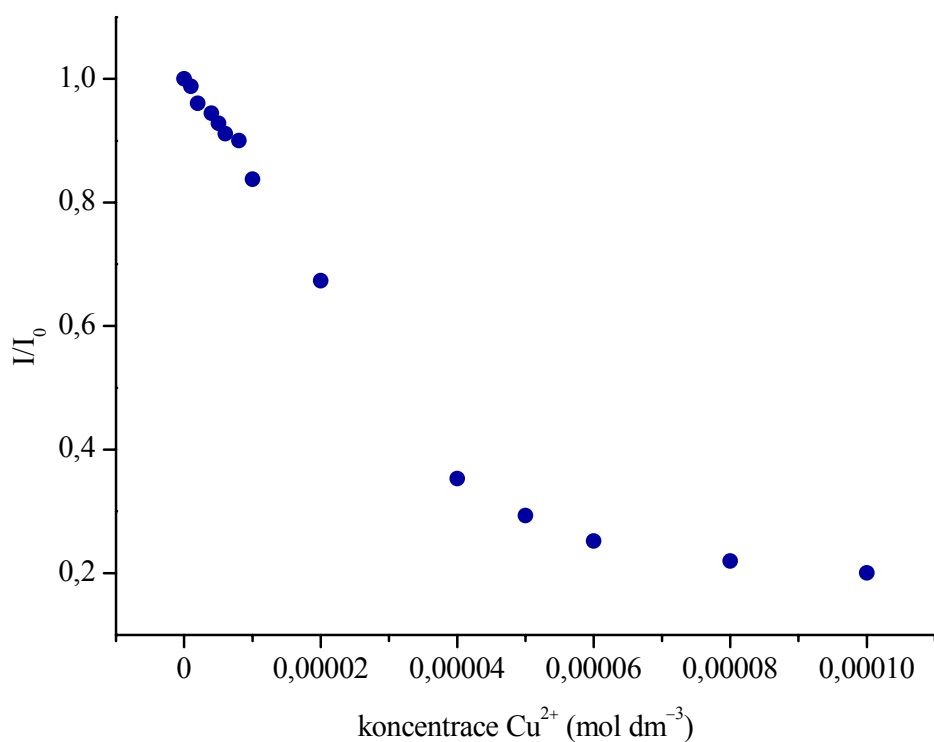
Pro všechny měřené koncentrace vzorků lignitického humátu byly nalezeny v emisním spektru pásy v oblasti 500–560 nm. Z emisních spekter (Obr. 15) je zřejmé, že při zvýšení koncentrace humátu dochází k růstu intenzity fluorescence, což souhlasí s publikovanými výsledky [3]. Senesi a kol. [22] při popisu Leonarditu, což je lignitická huminová kyselina, pozorovali excitační píky při 450 a 465 nm a v emisním spektru delší pás s maximem 510 nm. Při použití excitační vlnové délky 450 nm je pozorována emise kolem 480 nm. Pro excitaci 468 nm byl v literatuře popsán emisní pás v rozmezí vlnových délek 500–550 nm [3].



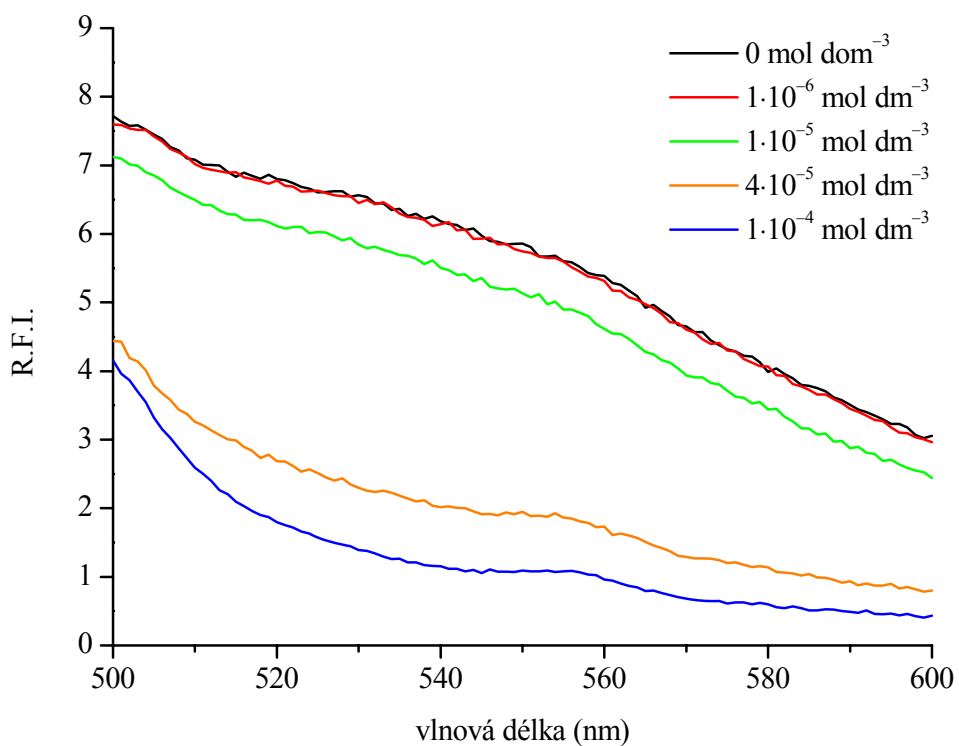
**Obr. 15** Emisní spektrum humátu 22/11/05 pro tři různé koncentrace.

Pro ověření předpokládaného zhášení emisního spektra humátu ve vybraném rozmezí koncentrací  $\text{Cu}^{2+}$  iontů byl použit roztok humátu 22/11/05 o koncentraci  $50 \text{ mg dm}^{-3}$ . Emisní spektrum bylo snímáno v rozmezí vlnových délek 500–600 nm, při excitaci 468 nm. Jak dokládá závislost poměru  $I/I_0$  na koncentraci  $\text{Cu}^{2+}$  iontů (Obr. 16), emisní spektrum humátu je po přidavku  $\text{Cu}^{2+}$  iontů postupně zhášeno. Poměr intenzit  $I/I_0$  je poměr naměřené relativní intenzity vzorku humátu v přítomnosti  $\text{Cu}^{2+}$  iontů proti intenzitě humátu bez přidavku  $\text{Cu}^{2+}$  iontů, odečtených při stejné vlnové délce. Zhášení humátu vyvolané přidavkem  $\text{Cu}^{2+}$  iontů je zřejmě způsobeno komplexací mědi do struktury humátu, podobně jak to popisuje studie [36] a další.

Při vyšších koncentracích  $\text{Cu}^{2+}$  iontů je zhášení humátu výrazné a v emisním spektru lze pozorovat vytvoření výrazného pásu kolem 550 nm, viz. (Obr. 17). Proto při pozorování zhášení emise byla sledována intenzita při této vlnové délce. Mezi koncentracemi  $\text{Cu}^{2+}$  iontů  $1$  až  $4 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$  lze opět pozorovat velmi výrazný skok v hodnotách R.F.I. humátu, viz. (Obr. 16) a (Obr. 17).



**Obr. 16** Zhášení emise lignitického humátu o koncentraci  $50 \text{ mg dm}^{-3}$ .

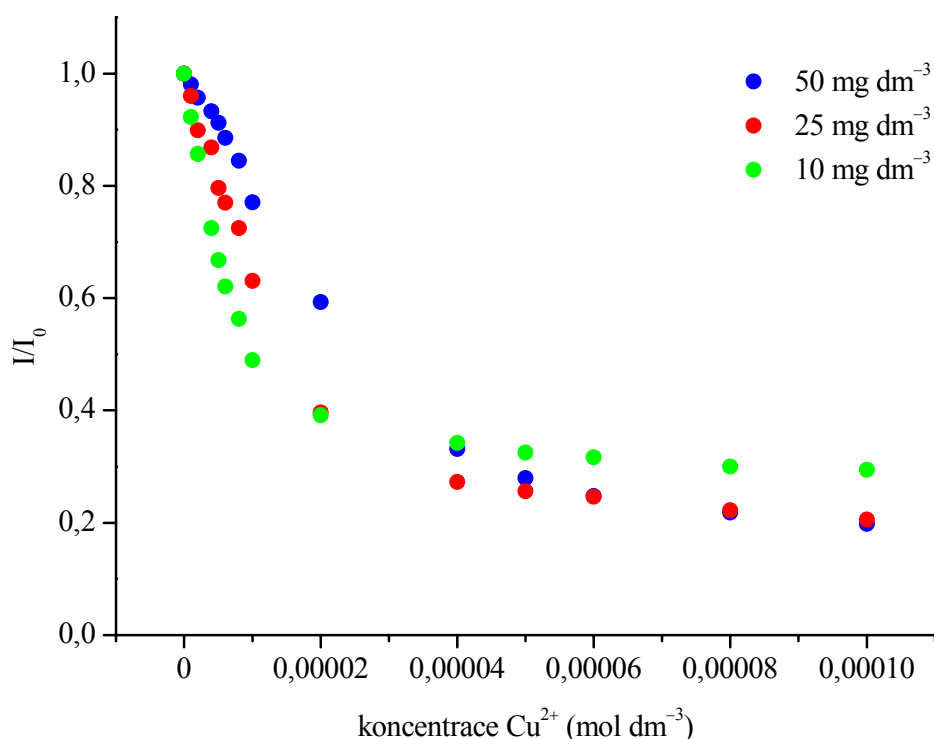


**Obr. 17** Vybraná emisní spektra humátu ( $50 \text{ mg dm}^{-3}$ ) při různých koncentracích  $\text{Cu}^{2+}$  iontů.

### 4.2.3 Vyhodnocení zhášení emisního spektra $\text{Cu}^{2+}$ ionty

Po ověření zhášení emisního spektra lignitického humátu 22/11/05 měďnatými ionty v použité škále koncentrací, byla proměřena emisní spektra pro více koncentrací humátu: 10, 25 a 50  $\text{mg dm}^{-3}$ . Emisní spektra byla měřena při excitační vlnové délce  $\lambda_{\text{ex}} = 468 \text{ nm}$ . Spektrum bylo snímáno v rozmezí vlnových délek 500–600 nm. Použitá škála koncentrací  $\text{Cu}^{2+}$  iontů byla  $1 \cdot 10^{-6} - 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ . Pro každou koncentraci humátu bylo měření nejméně třikrát opakováno.

Tato série experimentů vedla k potvrzení zhášení emise humátu  $\text{Cu}^{2+}$  ionty pro všechny tři použité koncentrace humátu. Závislost poměru  $I/I_0$  na koncentraci  $\text{Cu}^{2+}$  iontů (Obr. 18) představuje průměrné hodnoty zjištěných poměrů intenzity emise pro jednotlivé koncentrace humátu.



**Obr. 18** Závislost poměru  $I/I_0$  na koncentraci  $\text{Cu}^{2+}$  iontů pro tři různé koncentrace humátu.

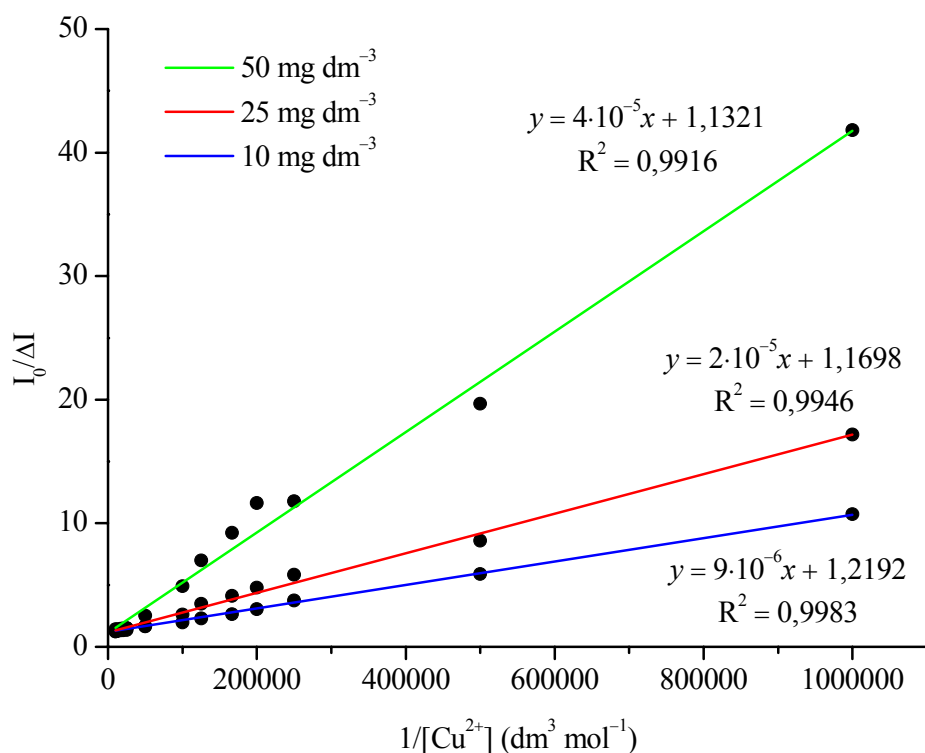
Z prezentovaných závislostí (Obr. 18) lze vyčíst rozdíly v průběhu zhášení pro různé koncentrace humátu. Bylo zjištěno, že při malém přídavku  $\text{Cu}^{2+}$  iontů je nejvíce zhášen humát o nejnižší koncentraci, 10  $\text{mg dm}^{-3}$ . Čím vyšší byla koncentrace humátu, tím méně byl zhášen. Změna v tomto trendu nastává pro koncentrace mědi vyšší než  $4 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ . Nad touto koncentrací je proces zhášení téměř konstantní při koncentraci humátu 10  $\text{mg dm}^{-3}$ . Při měření vyšších koncentrací humátu v přítomnosti měďnatých iontů dochází i v této oblasti nadále ke zhášení fluorescence humátu. Z grafu je patrné, že při maximální koncentraci  $\text{Cu}^{2+}$  iontů ( $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ ) je hodnota poměru  $I/I_0$ , který charakterizuje zhášení humátu, nejnižší pro humát o koncentraci 50  $\text{mg dm}^{-3}$  ( $I/I_0 = 0,19$ ) a čím je koncentrace humátu nižší, tím je hodnota poměru  $I/I_0$  vyšší.

Pokud porovnáme hodnoty naměřených R.F.I., pak lze konstatovat, že při nižších koncentracích humátu jsou relativní intenzity nejnižší a při následném přidavku mědi, kdy dochází k dalšímu poklesu hodnot R.F.I., pak mohou být výsledky zatíženy chybou.

Ze zhášení emise humátu přidavkem měďnatých iontů lze zjistit některé parametry komplexace, viz. kapitola 2.5.2. V této práci jsme využili upravenou Stern-Volmerovu rovnici (11), z níž můžeme vypočítat hodnoty disociační konstanty  $K_a$ , rovnice (13) a parametr  $f_a$ , rovnice (12), který odpovídá fraksi počáteční fluorescence podléhající zhášení. Pro vlastní výpočty jsme použili upravenou Stern-Volmerovu rovnici ve tvaru:

$$\frac{I_0}{\Delta I} = \frac{1}{f_a K_a [\text{Cu}^{2+}]} + \frac{1}{f_a}. \quad (14)$$

Po vynesení závislosti poměru  $I_0/\Delta I$  na převrácené hodnotě molární koncentrace měďnatých iontů, by měly body vynesené závislosti ležet na přímce, která vymezuje na ose  $y$  úsek, který odpovídá hodnotě  $1/f$ . Hodnota  $K_a$  se pak dá určit ze směrnice této přímky ( $1/f_a K_a$ ). Zprůměrované a zlinearizované hodnoty poměru  $I_0/\Delta I$  s vynesenuou přímkou lineární regrese zobrazuje následující obrázek (Obr. 19).



**Obr. 19** Závislost  $I_0/\Delta I$  na převrácené hodnotě molární koncentrace  $\text{Cu}^{2+}$  pro tři koncentrace humátu.

Proložením zprůměrovaných dat přímkou lineární regrese jsme získali rovnici charakterizující zhášení humátu. Vypočítané parametry  $\log K_a$  a  $f_a$  pro jednotlivé koncentrace lignitického humát 22/11/05 jsou zobrazeny v následující tabulce (Tab. 4).

**Tab. 4** Parametry  $\log K_a$  a  $f_a$  vypočítané ze zhášení emisního spektra humátu 22/11/05.

Koncentrace humátu	10 mg dm <sup>-3</sup>	25 mg dm <sup>-3</sup>	50 mg dm <sup>-3</sup>
$\log K_a$	5,13	4,76	4,45
$f_a$	82 %	85 %	88 %

Hodnoty konstanty  $K_a$  (Stern-Volmerova konstanta v tomto případě odpovídá disociační konstantě) zjištěné ze zhášení emise se různí pro jednotlivé koncentrace humátu. Podle uvedených výsledků s rostoucí koncentrací se hodnota  $\log K_a$  snižuje. Hodnota parametru  $f_a$ , odpovídající procentuálnímu podílu fluorescence systému, který je schopen podlehnout zhášení, se u použitých koncentrací humátu jen mírně liší. Vyšší koncentrace humátu odpovídá vyšší hodnotě  $f_a$ . Emise humátu o koncentraci 50 mg dm<sup>-3</sup> může být zhášena až z 88 %.

### 4.3 Synchronní fluorescenční spektroskopie a vliv Cu<sup>2+</sup> iontů

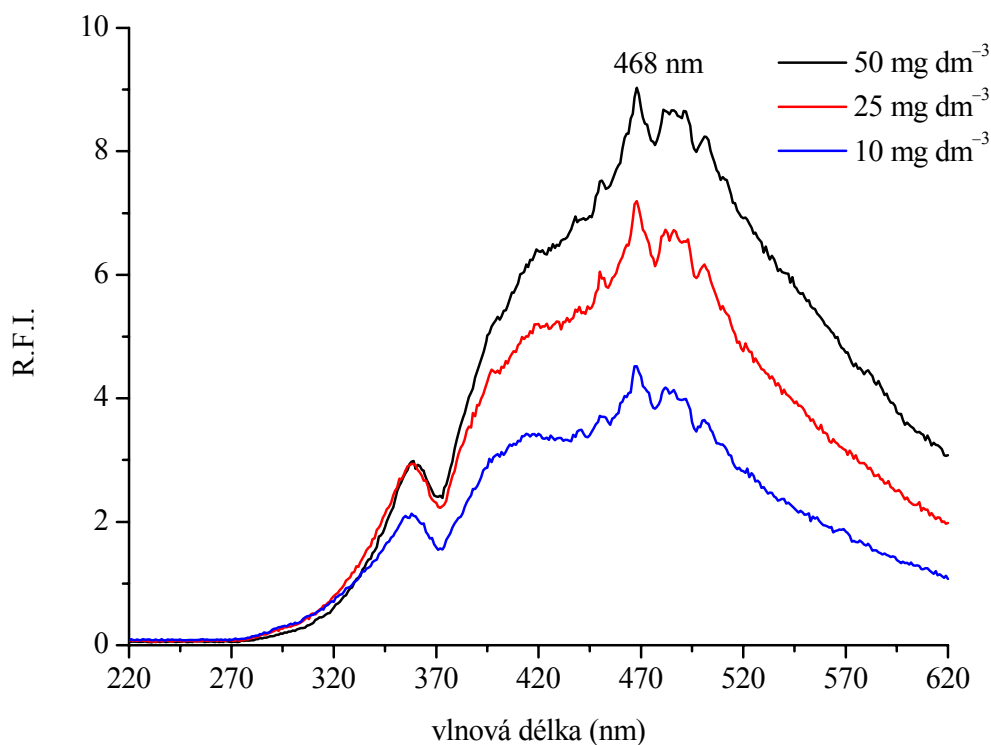
#### 4.3.1 Synchronní fluorescenční spektroskopie, $\Delta\lambda = 20$ nm

Kromě konvenčních technik, měření emisních a excitačních spekter, je v poslední době při studiu HL značně používanou metodou synchronní fluorescenční spektroskopie (SFS). Během měření je udržován konstantní rozdíl  $\Delta\lambda$  mezi excitačním a emisním monochromátorem dle rovnice (7). Pro sledování HL je nejběžněji používaným nastavením  $\Delta\lambda$  18 a 20 nm [22], [23].

Synchronní sken humátu 22/11/05 byl měřen v rozmezí vlnových délek 200–600 nm, při konstantním  $\Delta\lambda = 20$  nm. Spektra byla pořízena pro koncentrace humátu 10, 25 a 50 mg dm<sup>-3</sup>.

Oproti širokému pásu v emisním spektru nabízí synchronní spektrum lepší rozlišení jednotlivých piků, viz. (Obr. 20). V synchronním spektru humátu lze zřetelně identifikovat hlavní emisní maximum při 468 nm. Kromě hlavního maxima lze pozorovat další píky při 358, 450, 482 a 501 nm a široký pás v oblasti 400–440 nm. Podle Peuravuori a kol. [25] můžeme oblasti synchronního spektra přiřadit jednotlivým fluoroforům. Fluorescence v oblasti  $\lambda_{ex}/\lambda_{em}$  330/350 nm je obecně přičítána naftalenu a jeho derivátům, oblast 355/375 polycyklickým aromatickým látkám se třemi až čtyřmi benzenovými kruhy. Pás v oblasti 400/420 nm může odpovídat polycyklickým aromatickým látkám s pěti benzenovými kruhy. Tento pás je pozorován i v námi naměřených spektrech humátu 22/11/05. Oblast s maximem okolo  $\lambda_{ex}/\lambda_{em} = 460/480$  nm odráží pravděpodobně fluorescenci polycyklických látek tvořených sedmi benzenovými kruhy. Ve spektru humátu 22/11/05 jsou píky přítomné v této oblasti vyšších vlnových délek nejintenzivnější. K celkové fluorescenci mohou jednotlivé fluorofory přispět různými způsoby. V úvahu musíme brát složité interakce mezi těmito různými molekulami ve struktuře HL. Popisovaná maxima s největší pravděpodobností nelze

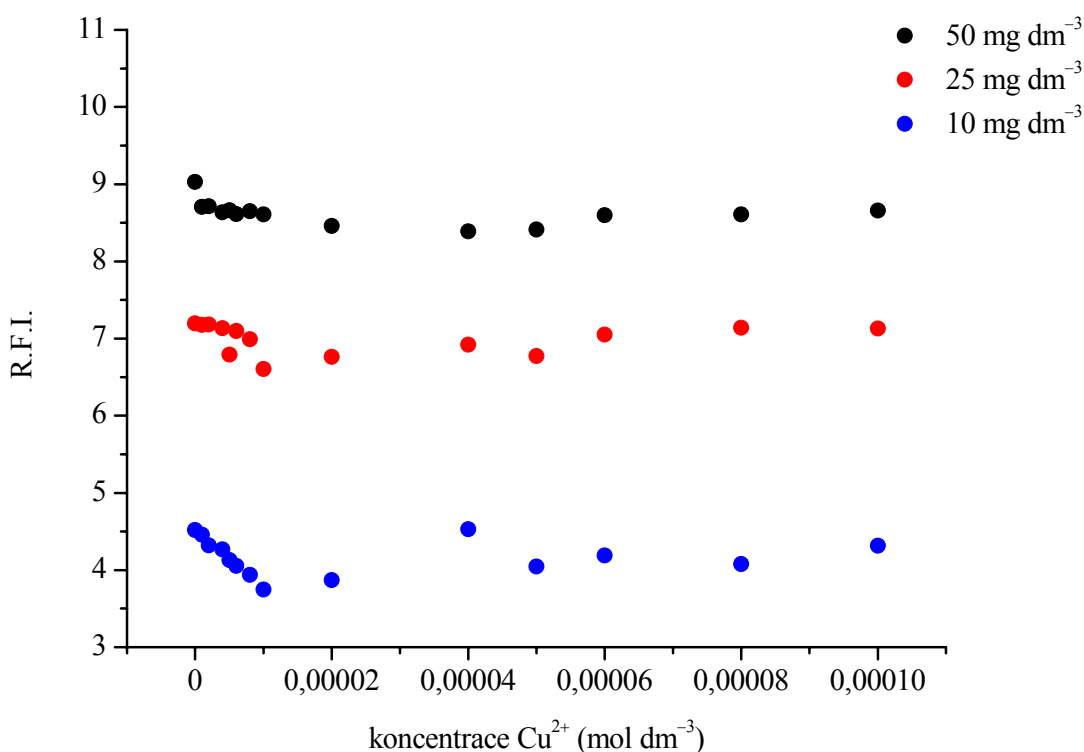
přisoudit jednomu určitému typu struktury, poloha a intenzita maxima může odrážet vzájemné působení více fluoroforů.



**Obr. 20** Synchronní spektrum humátu 22/11/05 pro tři různé koncentrace ( $\Delta\lambda = 20$  nm).

Pro všechny měřené koncentrace humátu mají naměřená synchronní spektra stejnou strukturu a určená maxima při stejných vlnových délkách (hlavní maximum při 468 nm). Obdobně jako u emisních spekter, pozorujeme v případě použitých koncentrací humátu 22/11/05 zvýšení intenzity fluorescence se vzrůstající koncentrací humátu v MiliQ vodě, (Obr. 20).

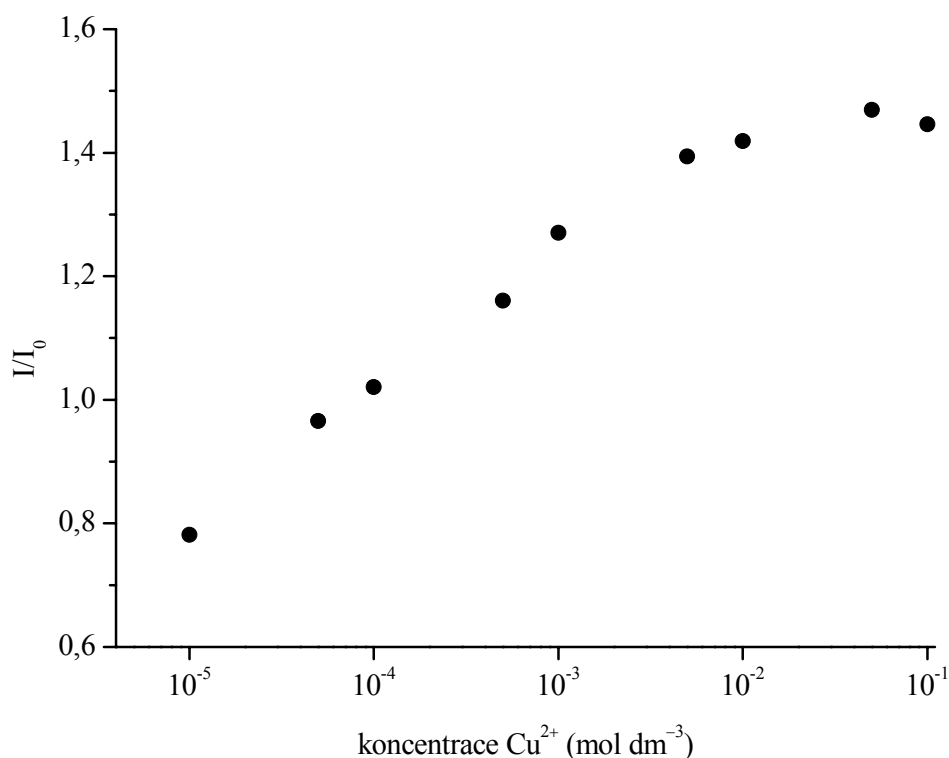
Výsledky z kapitoly 4.2.2 potvrzují zhášení emisního spektra humátu přidávkem  $\text{Cu}^{2+}$  iontů. V měření škále koncentrací mědi jsme tedy schopni zaznamenat změny intenzit spekter humátu. Zda lze ke sledování zhášení fluorescence humátu  $\text{Cu}^{2+}$  ionty použít také metodou SFS, bylo dále zjišťováno. Byly následně proměřeny synchronní spektra pro tři koncentrace humátu 22/11/05 (10, 25 a 50 mg dm<sup>-3</sup>) v přítomnosti  $\text{Cu}^{2+}$  iontů ( $1 \cdot 10^{-6}$ – $1 \cdot 10^{-4}$  mol dm<sup>-3</sup>). Synchronní spektrum bylo snímáno v rozmezí 200–600 nm, pro konstantní  $\Delta\lambda = 20$  nm. Hodnoty R.F.I. byly snímány při hlavním maximu spektra, při 468 nm. Naměřené hodnoty R.F.I. vzorků jsou zobrazeny na následujícím obrázku (Obr. 21).



**Obr. 21** Závislost intenzity maxima synchronního spektra (468 nm) na koncentraci  $\text{Cu}^{2+}$  iontů v systému ( $\Delta\lambda = 20 \text{ nm}$ ).

Všechny tři koncentrace humátu 22/11/05 vykazují obdobné chování po přidavku iontů do systému. Z prezentovaných výsledků je patrné, že s přidavkem  $\text{Cu}^{2+}$  iontů intenzita fluorescence humátu neklesá tak výrazně jako u emisního spektra. Intenzita fluorescence klesá jen do určité míry. V rozmezí koncentrací  $\text{Cu}^{2+}$  iontů  $1 \cdot 10^{-6} - 1 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$  lze pozorovat mírné zhášení fluorescence systému humátu s přidavkem  $\text{Cu}^{2+}$  iontů metodou SFS, při nastavení  $\Delta\lambda = 20 \text{ nm}$ . Od koncentrace  $\text{Cu}^{2+} \sim 1 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$  nedochází k dalšímu zhášení fluorescence humátu, jako u emisního spektra, ale naopak pozorujeme nárůst intenzity fluorescence systému. Tyto výsledky nás přivádí k domněnce, že v synchronním spektru humátu při  $\Delta\lambda = 20 \text{ nm}$  nejsme schopni pozorovat zhášení fluorescence měďnatými ionty v celé škále vybraného koncentračního rozmezí mědi.

V případě vzorků s koncentrací  $\text{Cu}^{2+}$  iontů vyšší než  $10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$  se setkáváme s nárůstem fluorescence humátu nad hodnotu R.F.I. samotného humátu ( $I/I_0 = 1$ ). Toto lze charakterizovat poměrem intenzit maxima spektra  $I/I_0$  (kdy  $I$  a  $I_0$  jsou intenzita humátu v přítomnosti a při absenci  $\text{Cu}^{2+}$  iontů), viz. (Obr. 22). Obdobný jev pozorovali Monteil-Rivera a kol. [10] při měření synchronních spekter při  $\Delta\lambda = 20 \text{ nm}$  u vzorků HK v přítomnosti  $\text{Co}^{2+}$ .



**Obr. 22** Závislost poměru intenzit  $I/I_0$  maxima synchronního spektra (468 nm) na koncentraci  $\text{Cu}^{2+}$  iontů v roztoku humátu o koncentraci  $10 \text{ mg dm}^{-3}$  ( $\Delta\lambda = 20 \text{ nm}$ ).

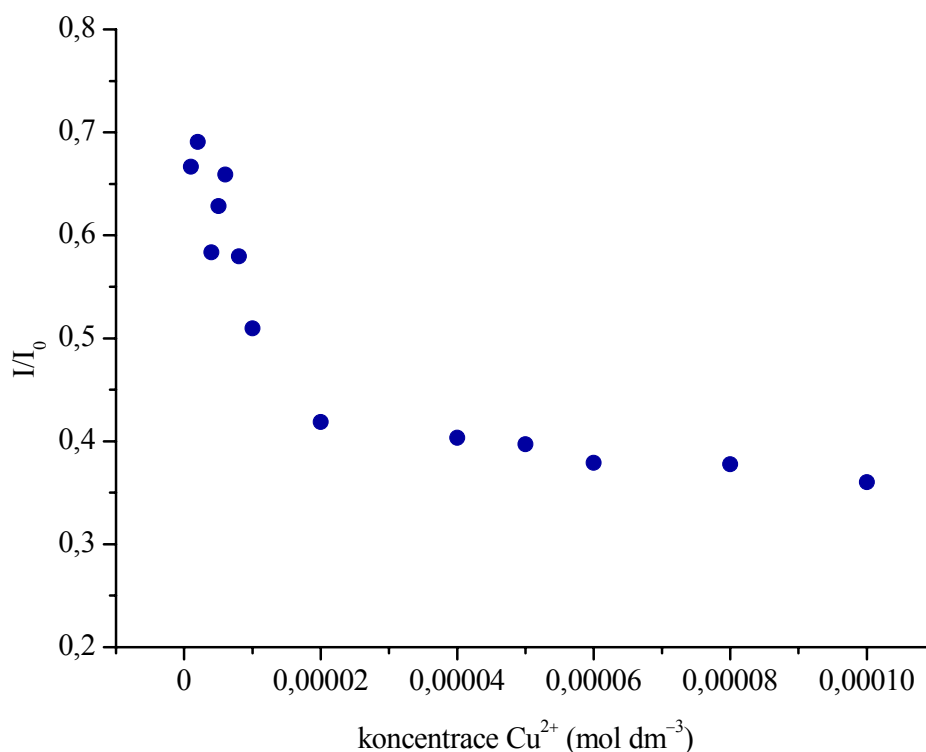
Jelikož pozorujeme zhasnutí fluorescence humátu jen do určité koncentrace přidaných iontů mědi a s dalším nárůstem iontů pozorujeme naopak zvýšení fluorescence, lze předpokládat, že ionty ovlivňují fluorescenci sledovaného maxima (468 nm) jen do určité míry. Naměřená spektra naznačují, že při tomto nastavení synchronního skenu nedochází k přímému ovlivnění sledovaného fluoroforu komplexací s  $\text{Cu}^{2+}$  ionty, ale zdá se být ovlivněn sekundárně, (viz. Obr. 22), kdy intenzita humátu při koncentraci iontů nad  $10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$  je vyšší než hodnota pro samotný humát bez přídavku iontů). V důsledku složité struktury HK dochází k vzájemnému ovlivňování mezi primárními fluorofory a výsledkem může být významné ovlivnění výsledné fluorescence systému v důsledku interakcí jednotlivých fluoroforů. Fluorescenční vlastnosti humátu by mohly být ovlivněny také komponentami, které primárně nefluoreskují. Jejich zapojení do komplexace iontů může ovlivnit fluorofor, který je v daném případě sledován a který sám o sobě není do komplexace zapojen.

Při nastavení  $\Delta\lambda = 20 \text{ nm}$  odráží maximum spektra humátu 22/11/05 fluorofor, který nezhasí svoji fluorescenci. Komplexací s  $\text{Cu}^{2+}$  ionty může docházet ke změnám ve struktuře humátu, což vede k sekundárnímu ovlivnění fluorescenčních vlastností tohoto fluoroforu. Nedochází ke zhasnutí  $\text{Cu}^{2+}$  ionty, ale teoreticky může docházet k omezení samozhasnutí při určité koncentraci  $\text{Cu}^{2+}$  iontů, díky vyvolaným strukturním změnám.

### 4.3.2 Synchronní fluorescenční spektroskopie, $\Delta\lambda = 80$ nm

Z výše popsaných experimentů bylo zjištěno, že nastavení  $\Delta\lambda = 20$  nm v SFS skenu není vhodné pro studium zhášením fluorescence humátu a proto byly provedeny experimenty s nastavením jiného rozdílu mezi emisním a excitačním monochromátorem. Nové rozlišení bylo vybráno při  $\Delta\lambda = 80$  nm. Synchronní spektra byla snímána v rozmezí 200–600 nm pro sadu vzorků o koncentraci humátu  $10 \text{ mg dm}^{-3}$  a koncentrační škále  $\text{Cu}^{2+}$  iontů  $1 \cdot 10^{-6} - 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ .

Z hodnot R.F.I. maxima spektra, odečítaných při 531 nm, byl vypočítán poměr  $I/I_0$  ( $I$  a  $I_0$  jsou intenzity vzorku humátu v přítomnosti a při absenci  $\text{Cu}^{2+}$  iontů) a vyneseno na koncentraci  $\text{Cu}^{2+}$  iontů, viz (Obr. 23). Z vynesené závislosti je zřetelné, že při tomto nastavení lze v synchronním spektru humátu sledovat zhášení fluorescence  $\text{Cu}^{2+}$  ionty v celé použité škále koncentrací iontů. Synchronní spektrum humátu při  $\Delta\lambda = 80$  nm neposkytovalo takové rozlišení jednotlivých píků jako při nastavení  $\Delta\lambda = 20$  nm a naměřené hodnoty R.F.I. byly poměrně nízké. To nás vedlo na myšlenku, hledat nové  $\Delta\lambda$  nastavení, které nám poskytne dobré rozlišení jednotlivých píků v synchronním spektru a tedy možnost sledovat některý z fluoroforů, který bude navíc zhášen vlivem komplexace humátu s  $\text{Cu}^{2+}$  ionty.



**Obr. 23** Závislost poměru intenzit  $I/I_0$  maxima synchronního spektra na koncentraci  $\text{Cu}^{2+}$  iontů v roztoku humátu o koncentraci  $10 \text{ mg dm}^{-3}$  ( $\Delta\lambda = 80$  nm).

### 4.3.3 Hledání vhodného nastavení $\Delta\lambda$ při SFS měření

V této části práce bylo cílem najít lepší nastavení synchronního skenu ( $\Delta\lambda$ ), při kterém by bylo možné pozorovat hlavní fluorofor, který bude zhášen a bude tedy zapojen do komplexace s  $\text{Cu}^{2+}$  ionty. Pro nalezení vhodného  $\Delta\lambda$  byla proměřena synchronní spektra vodného roztoku lignitického humátu o koncentraci  $50 \text{ mg dm}^{-3}$  v rozmezí od 200 do 600 nm, při  $\Delta\lambda$  10 až 80 nm s krokem 5 nm. Získané hodnoty určených maxim pro jednotlivá  $\Delta\lambda$  znázorňuje následující tabulka (Tab. 5).

**Tab. 5** Přehled hlavních maxim synchronního spektra lignitického humátu pro různé  $\Delta\lambda$ .

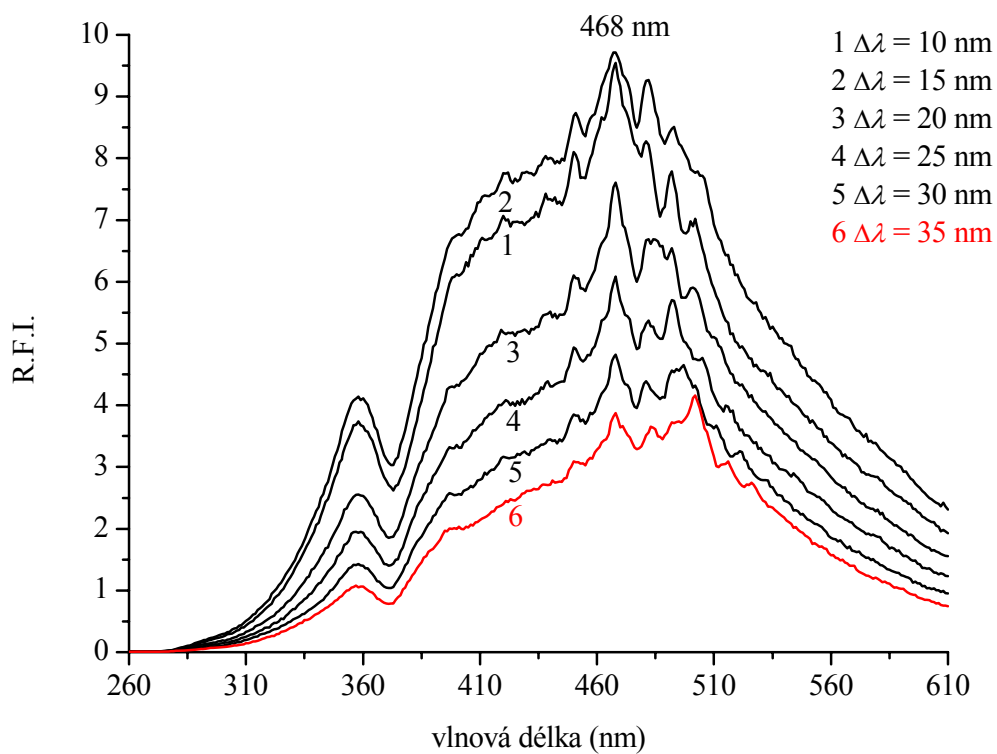
$\Delta\lambda = \lambda_{\text{em}} - \lambda_{\text{ex}}$	$\lambda_{\text{em}}/\lambda_{\text{ex}}$ maxima	R.F.I.
10	468/458	9,55
15	467/452	9,72
20	468/448	7,61
25	468/443	6,09
30	468/438	4,82
35	502/467	4,16
40	507/467	3,65
45	512/467	3,33
50	517/467	3,17
55	522/467	3,03
60	527/467	2,92
65	532/467	2,83
70	537/467	2,69
75	542/467	2,59
80	547/467	2,47

Nejvyšší intenzitu vykazuje maximum synchronního spektra při  $\Delta\lambda = 15 \text{ nm}$ , kterému odpovídá  $\lambda_{\text{em}}/\lambda_{\text{ex}}$  467/452 nm. Dále bylo zjištěno, že při nastavení  $\Delta\lambda$  10 až 30 nm se hlavní fluorofor nachází při emisní vlnové délce 468 nm. Avšak od nastavení  $\Delta\lambda = 35 \text{ nm}$  dochází ke změně hlavního maxima, které se nachází při emisi 502 nm (Obr. 24) a se zvyšující se hodnotou  $\Delta\lambda$  dochází k posunu vlnové délky emise tohoto maxima (Obr. 25). Pro  $\Delta\lambda$  35 až 80 nm se hlavní maximum synchronního spektra posouvá od 502 do 547 nm a postupně klesá jeho relativní intenzita. Excitační vlnová délka maxima zůstává stále stejná  $\sim 467 \text{ nm}$ .

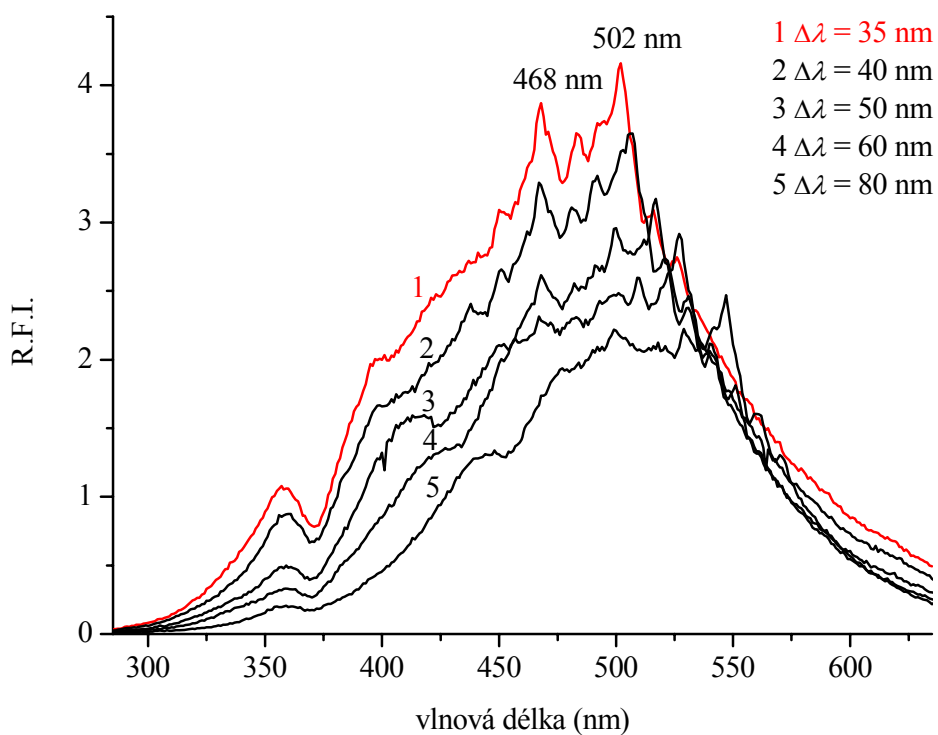
Nalezená excitační maxima při vlnových délkách 452 a 467 nm jsou v souladu se Senesi a kol. [22].

Vzrůstající rozdíl mezi vlnovými délkami na emisním a excitačním monochromátoru vede k postupnému poklesu R.F.I. píku při emisi 468 nm a tento fluorofor přestává být od  $\Delta\lambda = 35 \text{ nm}$  dominantní. U tohoto píku není pozorován posun emisní vlnové délky. Z uvedených grafů je patrné, že SFS metoda nabízí možnost redukce překryvu píků a výhodu identifikace různých komponent ve vzorku.

V našem případě se domníváme, že optimální nastavení pro další experimenty s mědí bude  $\Delta\lambda = 35 \text{ nm}$ . Při tomto nastavení odpovídá maximum synchronního spektra humátu fluoroforu při  $\lambda_{\text{em}}/\lambda_{\text{ex}}$  502/467 nm.



**Obr. 24** Synchronní spektra lignitického humátu 22/11/05 pro  $\Delta\lambda = 10\text{--}35$  nm.



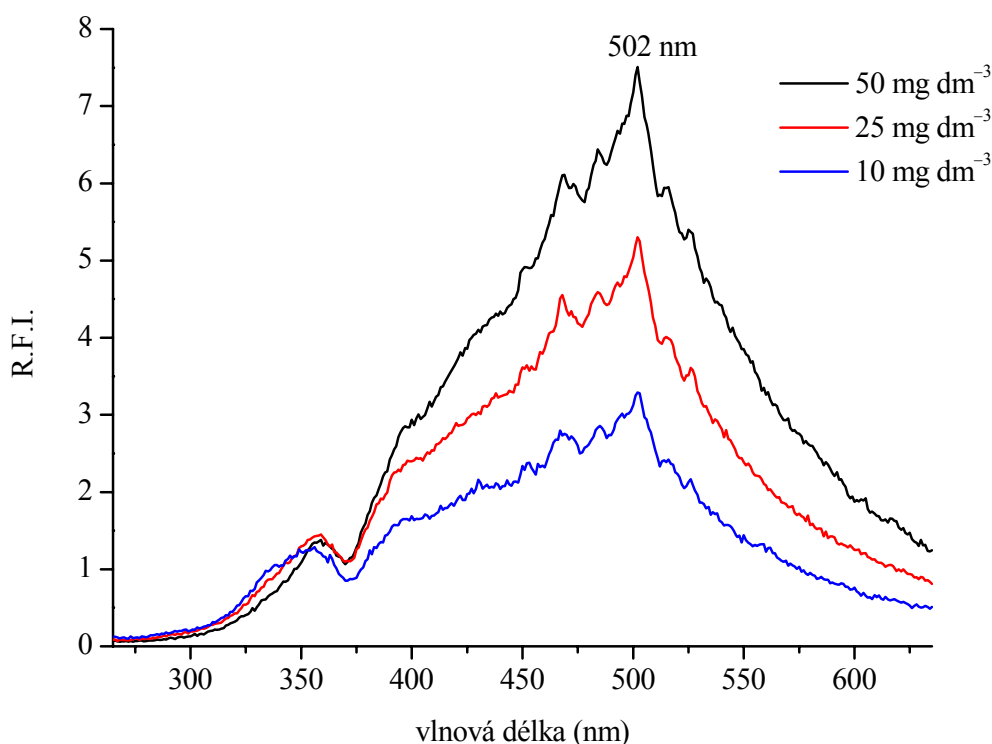
**Obr. 25** Synchronní spektra lignitického humátu 22/11/05 pro  $\Delta\lambda = 35\text{--}80$  nm.

#### 4.3.4 Synchronní fluorescenční spektroskopie, $\Delta\lambda = 35$ nm

Následující měření SFS byla provedena se vzorky lignitického humátu 22/11/05 v rozmezí vlnových délek 200–600 nm, při konstantním  $\Delta\lambda = 35$  nm. Spektra byla pořízena pro koncentrace humátu 10, 25 a 50  $\text{mg dm}^{-3}$ .

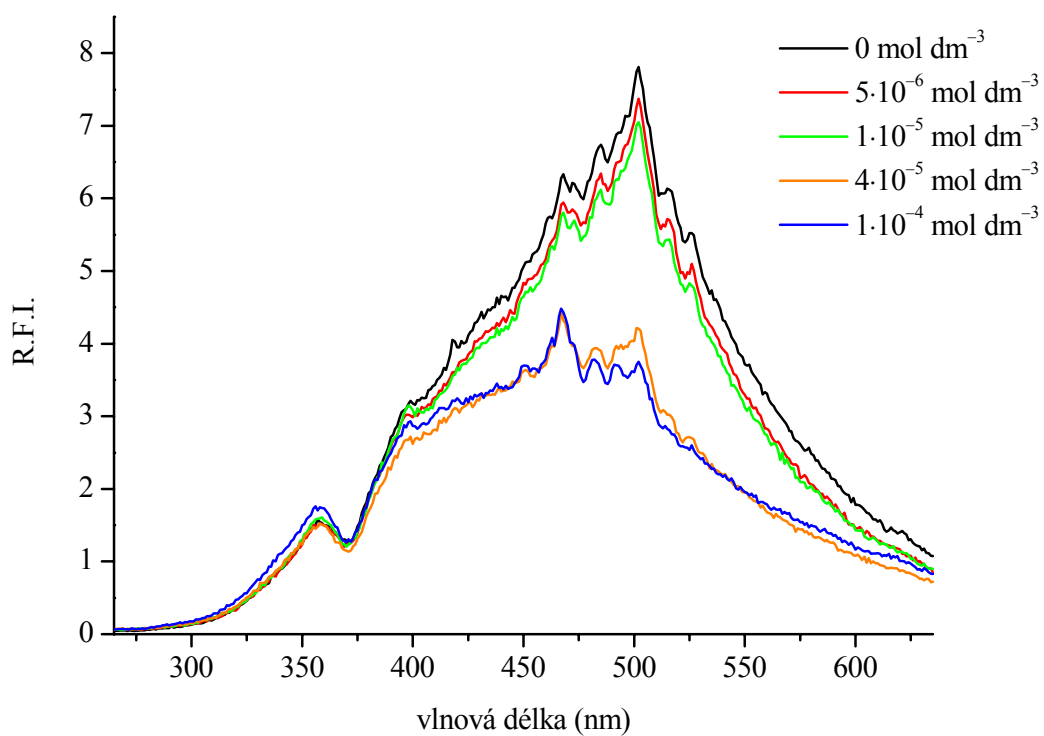
Hlavní maximum synchronního spektra humátu při  $\Delta\lambda = 35$  nm se nachází při vlnové délce emise 502 nm. Poloha hlavního maxima synchronního spektra lignitického humátu při vyšší vlnové délce odpovídá vysokému zastoupení konjugovaných aromatických  $\pi$ -elektronových systémů [23]. Kromě hlavního maxima lze pozorovat další píky při 358, 468 a 484 nm.

Podle očekávání relativní intenzita fluorescence humátu závisí na koncentraci, v použitém rozmezí koncentrací humátu hodnota R.F.I. stoupá s rostoucí koncentrací humátu a není pozorován žádný posun maxima s měnící se koncentrací humátu, viz. (Obr. 26).

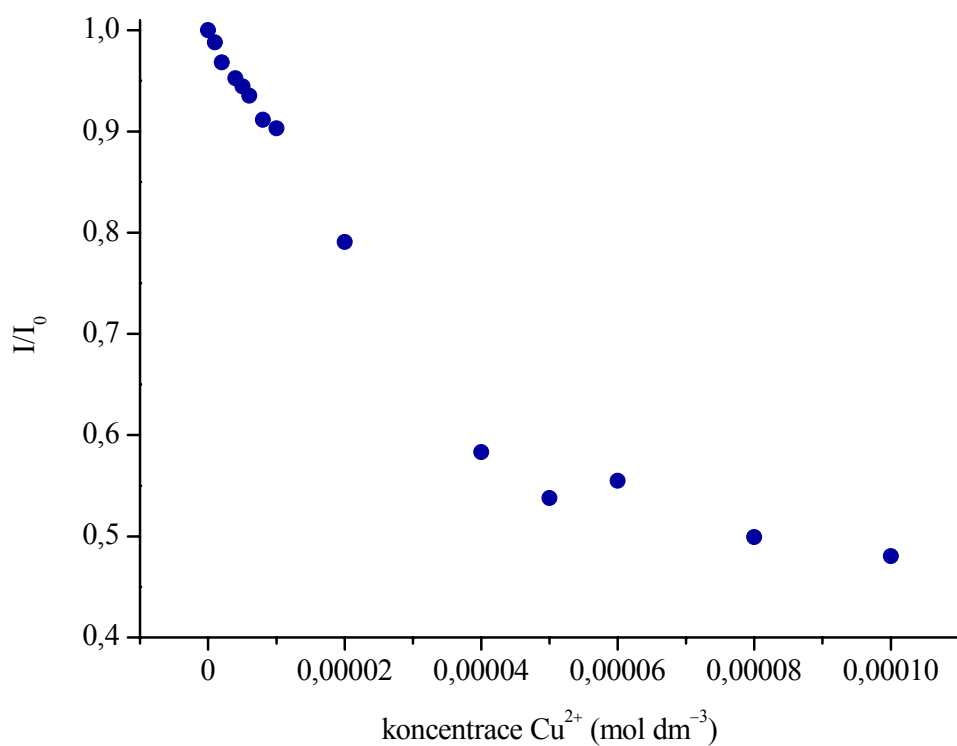


**Obr. 26** Synchronní spektrum humátu 22/11/05 pro tři koncentrace humátu ( $\Delta\lambda = 35$  nm).

V další části práce byly při stejném nastavení synchronního skenu proměřeny vzorky humátu o koncentraci 50  $\text{mg dm}^{-3}$  s obsahem  $\text{Cu}^{2+}$  iontů v intervalu  $1 \cdot 10^{-6}$ – $1 \cdot 10^{-4}$   $\text{mol dm}^{-3}$ . Na následujícím obrázku (Obr. 27) je zobrazeno několik vybraných spekter, ze kterých je zřejmé, že dochází ke zhášení synchronního spektra humátu přidávkou  $\text{Cu}^{2+}$  iontů. Oblast spektra nad 400 nm se zháší, zatímco pík při 358 nm se nezdá být ovlivněn. Nejvíce je ovlivněno hlavní maximum při 502 nm, které je zhášeno v celém použitém rozmezí koncentrací  $\text{Cu}^{2+}$  iontů. Pro koncentrace iontů vyšší než  $4 \cdot 10^{-5}$   $\text{mol dm}^{-3}$  přestává být hlavním maximem a od této koncentrace je nejintenzivnější pík při 468 nm. Pro další sledování zhášení fluorescence byl vybrán pík při 502 nm. Vynesená závislost (Obr. 28) poměru intenzity  $I/I_0$  tohoto maxima dokládá zhášení humátu v použité škále  $\text{Cu}^{2+}$  iontů.



**Obr. 27** Vybraná spektra humátu ( $50 \text{ mg dm}^{-3}$ ) s různým obsahem  $\text{Cu}^{2+}$  iontů ( $\Delta\lambda = 35 \text{ nm}$ ).



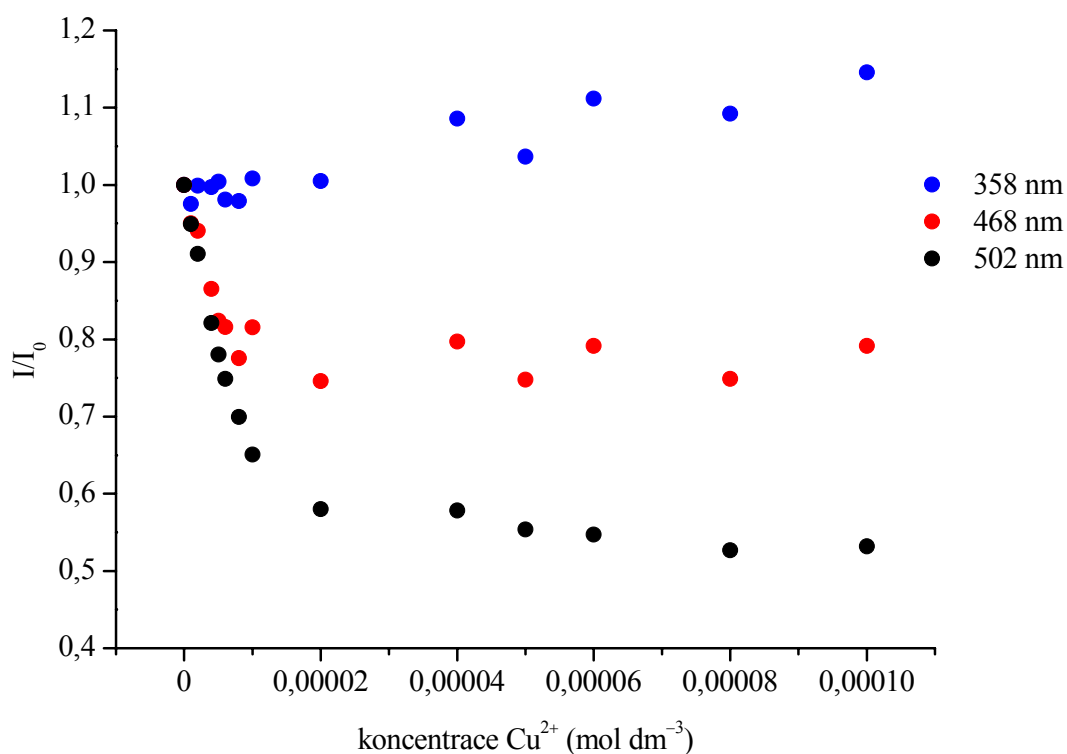
**Obr. 28** Zhášení fluorescence humátu ( $50 \text{ mg dm}^{-3}$ ) vlivem  $\text{Cu}^{2+}$  iontů (při  $502 \text{ nm}$ ).

#### 4.3.5 Vyhodnocení zhášení synchronního spektra $\text{Cu}^{2+}$ ionty

Měření synchronních spekter lignitického humátu při nastavení rozdílu vlnových délek  $\Delta\lambda = 35$  nm (mezi emisním a excitačním monochromátorem) bylo úspěšné. V tomto experimentu byla synchronní spektra měřena při třech různých koncentracích humátu (10, 25 a 50  $\text{mg dm}^{-3}$ ) v přítomnosti měďnatých iontů ( $1 \cdot 10^{-6}$ – $1 \cdot 10^{-4}$   $\text{mol dm}^{-3}$ ). Spektra byla snímána v rozmezí vlnových délek 200–600 nm, při  $\Delta\lambda = 35$  nm. Pro každou sadu vzorků bylo měření minimálně třikrát opakováno.

Pro všechny měřené koncentrace humátu je z naměřených výsledků patrné, že přidavkem  $\text{Cu}^{2+}$  iontů je nejvíce ovlivněn pík při 502 nm, viz. (Obr. 29). Zháší se v celé škále měřených koncentrací  $\text{Cu}^{2+}$  iontů. Domníváme se, že fluorofor při  $\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}}$  467/502 nm je tedy s největší pravděpodobností zapojen do komplexace  $\text{Cu}^{2+}$  iontů. Pokud sledujeme změny ostatních píků, pak pík při 358 nm není zhášen, dokonce jeho intenzita s rostoucí koncentrací iontů mírně vzrůstá. Vedlejší maximum při 468 nm je ovlivněno, ale pokles hodnoty R.F.I. není tak výrazný jako v případě hlavního maxima. Dále bylo zjištěno, že s přidavkem  $\text{Cu}^{2+}$  iontů nedochází k posunům polohy píků humátu.

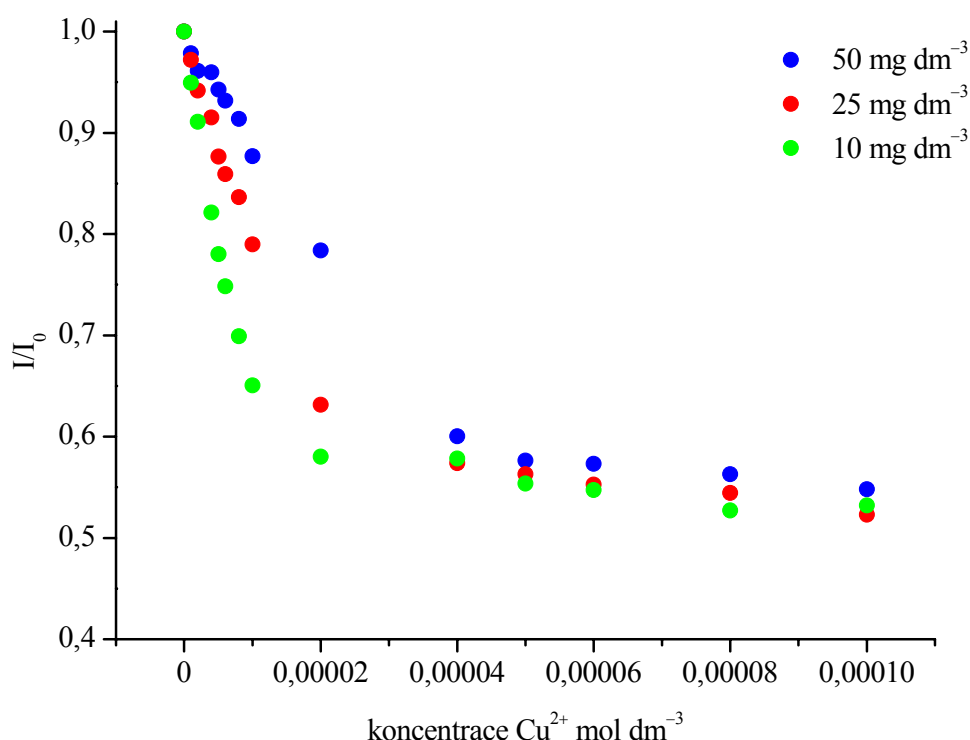
Sledované maximum synchronního spektra humátu přestává být při určité koncentraci iontů v systému nejintenzivnějším píkem. Při koncentraci humátu 10  $\text{mg dm}^{-3}$  dochází k této změně již při koncentraci  $8 \cdot 10^{-6}$   $\text{mol dm}^{-3}$ , u humátu 25  $\text{mg dm}^{-3}$  při  $2 \cdot 10^{-5}$   $\text{mol dm}^{-3}$  a pro případ 50  $\text{mg dm}^{-3}$  až při  $4 \cdot 10^{-5}$   $\text{mol dm}^{-3}$ .



**Obr. 29** Ukázka zhášení jednotlivých píků synchronního spektra humátu pro koncentraci 10  $\text{mg dm}^{-3}$  v závislosti na koncentraci mědi v systému ( $\Delta\lambda = 35$  nm).

Série opakovaných měření vedla k potvrzení zhášení synchronního spektra ( $\Delta\lambda = 35$  nm) humátu  $\text{Cu}^{2+}$  ionty pro všechny tři použité koncentrace humátu. Závislost poměru  $I/I_0$  na koncentraci  $\text{Cu}^{2+}$  iontů (Obr. 30) představuje průměrné hodnoty zjištěných poměrů intenzity maxima 502 nm synchronního spektra pro jednotlivé koncentrace humátu. Nelineárnost průběhu závislosti lze vysvětlit existencí dvou populací jednoho fluoroforu ve struktuře humátu, kdy jedna je přístupná zhášeči a druhá není. Ionty mědi tak zháší jen první typ fluoroforu [33], [38].

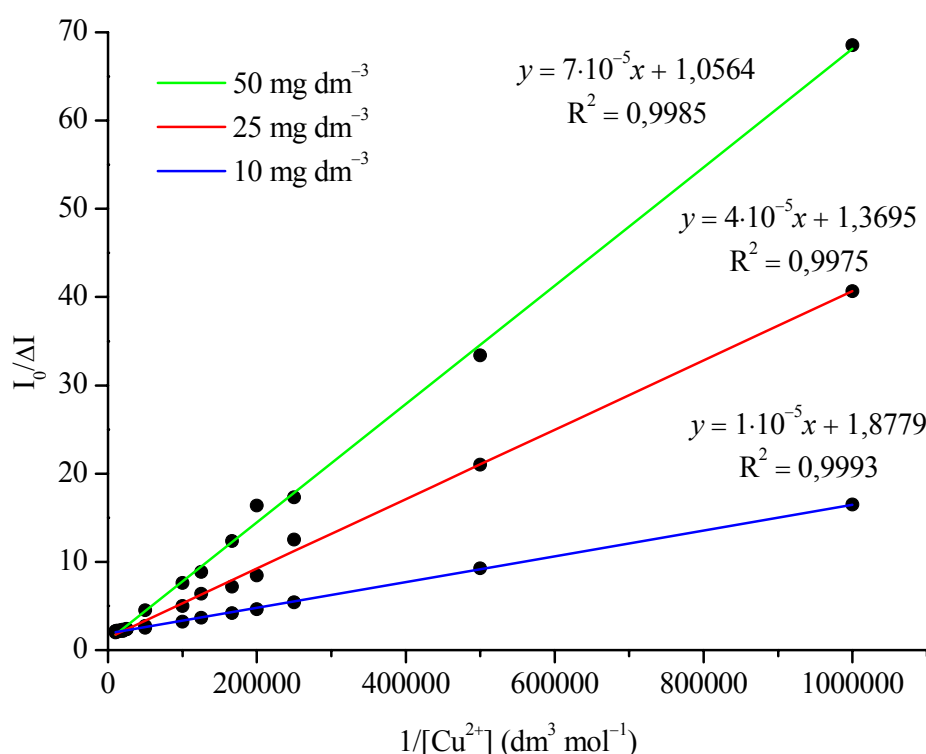
Zjištěné výsledky naznačují, že při nižších koncentracích  $\text{Cu}^{2+}$  iontů v roztoku humátu je více ovlivněna fluorescence systému o nižší koncentraci humátu 22/11/05. Menší přídavek  $\text{Cu}^{2+}$  k humátu vyvolá větší zhášení fluorescence humátu při jeho nižší koncentraci než v koncentrovanějším systému. U vyšší koncentrace humátu ( $50 \text{ mg dm}^{-3}$ ) je situace komplikovanější a nedochází k tak prudkému zhášení jako v případě  $10 \text{ mg dm}^{-3}$ . Chování koncentrovanějšího roztoku humátu může odrážet skutečnost, že se jedná o složitější systém. Po navázání iontů do struktury humátu, existuje ještě dostatek dalších fluoreskujících míst, která nebyla zapojena do komplexačních reakcí a která i nadále vyzařují fluorescenci. Od koncentrace  $4 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$  se fluorescence humátu snižuje pro všechny použité koncentrace humátu obdobně. Při maximální použité koncentraci  $\text{Cu}^{2+}$  iontů dosáhne poměr  $I/I_0$  téměř stejné hodnoty u všech tří koncentrací humátu, při  $10 \text{ mg dm}^{-3}$  koncentrovaném humátu je poměr  $I/I_0$  roven 0,53, při  $25 \text{ mg dm}^{-3}$  0,52 a u humátu  $50 \text{ mg dm}^{-3}$  0,54. Zjištěné hodnoty poměru  $I/I_0$  jsou oproti poměrům určeným při zhášení emisního spektra vyšší.



**Obr. 30** Závislost poměru  $I/I_0$  maxima synchronního spektra (při 502 nm) na koncentraci  $\text{Cu}^{2+}$  iontů, pro tři různé koncentrace humátu ( $\Delta\lambda = 35$  nm).

V oblasti koncentrací  $\text{Cu}^{2+}$  iontů  $1 \cdot 10^{-5}$ – $4 \cdot 10^{-5}$  mol  $\text{dm}^{-3}$  dochází k velké změně ve fluorescenčním chování humátu. Jedná se asi o hodnotu koncentrace  $\text{Cu}^{2+}$  iontů, která ve struktuře humátu způsobuje nějaké významné změny (např. konformační), které mají za následek výraznou změnu fluorescenčního chování humátu.

Linearizace grafické závislosti poměru intenzit fluorescence na převrácené molární koncentraci mědi podle upravené Stern-Volmerovy rovnice (14) nám dovoluje vypočítat hodnoty  $K_a$  a  $f_a$ . Zprůměrované výsledky měření byly vyneseny do grafu a proloženy přímkou lineární regrese (Obr. 31). Lineární závislost  $I_0/\Delta I$  na převrácené hodnotě molární koncentrace mědi  $1/[\text{Cu}^{2+}]$  vymezuje na ose y úsek, který odpovídá hodnotě  $1/f_a$  a hodnota konstanty  $K_a$  se určí ze směrnice závislosti ( $1/f_a K_a$ ).



**Obr. 31** Závislost poměru  $I_0/\Delta I$  (502 nm) na převrácené hodnotě molární koncentrace  $\text{Cu}^{2+}$  pro tři koncentrace humátu ( $\Delta\lambda = 35$  nm).

Hodnoty konstanty  $K_a$  zjištěné ze zhášení maxima synchronního spektra se různí pro jednotlivé koncentrace humátu. S rostoucí koncentrací je hodnota  $\log K_a$  menší. Hodnota  $f_a$ , odpovídající procentuálnímu podílu fluorescence systému, který je schopen podlehnout zhášení, se v případě použitých koncentrací humátu od sebe výrazně liší. Čím je vyšší koncentrace humátu tím je hodnota  $f_a$  vyšší. Dále bylo zjištěno, že fluorescence humátu v roztoku o koncentraci 50  $\text{mg dm}^{-3}$  může být zhášena až z 95 %, zatímco fluorescence humátu s koncentrací 10  $\text{mg dm}^{-3}$  podlehne zhášení pouze z 53 %. Vypočítané parametry pro jednotlivé koncentrace jsou zobrazeny v následující tabulce (Tab. 6).

**Tab. 6** Parametry  $\log K_a$  a  $f_a$  vypočítané pomocí SFS ( $\Delta\lambda = 35 \text{ nm}$ ).

Koncentrace humátu	10 mg dm <sup>-3</sup>	25 mg dm <sup>-3</sup>	50 mg dm <sup>-3</sup>
$\log K_a$	5,27	4,53	4,17
$f_a$	53 %	73 %	95 %

#### 4.4 Atomová absorpční spektrometrie

Vzorky připravené na měření fluorescence byly proměřeny také na atomovém absorpčním spektrofotometru. Proměřeny byly sady vzorků o koncentracích humátu 10, 25 a 50 mg dm<sup>-3</sup> v koncentrační škále Cu<sup>2+</sup> iontů 1·10<sup>-6</sup>–1·10<sup>-4</sup> mol dm<sup>-3</sup>. Připravené vzorky se před vlastním stanovením volných, nenavázaných iontů přefiltrovaly přes filtr 0,45 μm. Po odečtení zjištěných volných iontů od celkového přidaného množství jsme získali množství navázaných Cu<sup>2+</sup> iontů. Pro každou sadu vzorků bylo měření třikrát opakováno, prezentované hodnoty jsou průměrné.

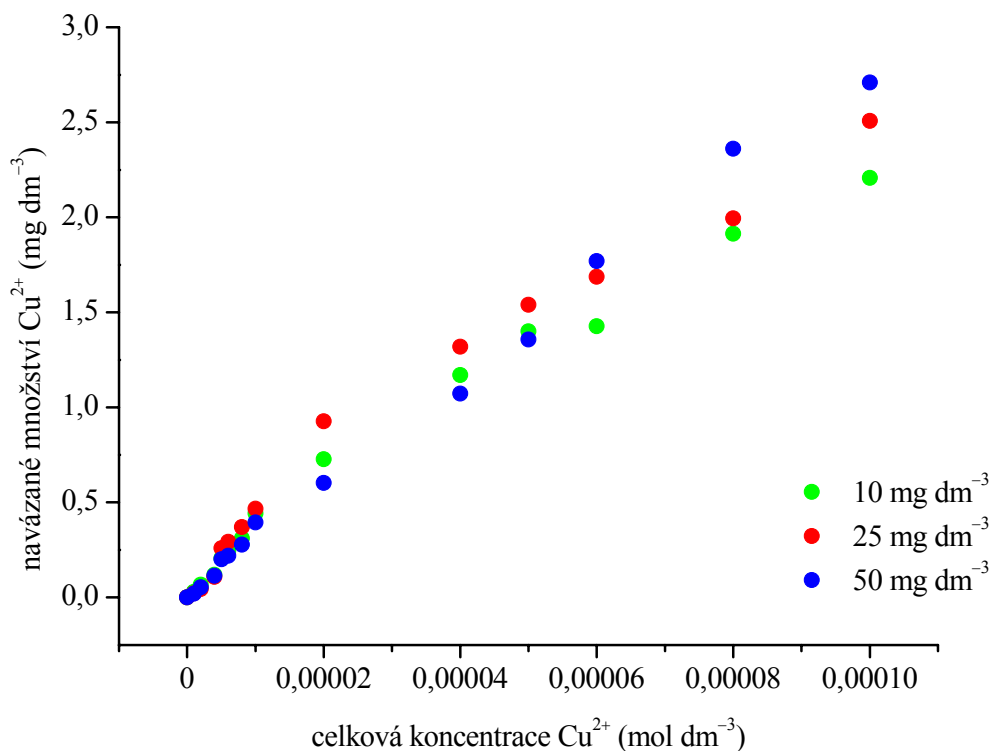
Maximální navázané množství Cu<sup>2+</sup> se různí pro jednotlivé použité koncentrace humátu. Nejvíce se navázalo v případě 50 mg dm<sup>-3</sup> koncentrovaného humátu, viz. (Tab. 7). Nejméně měďnatých iontů se navázalo při koncentraci humátu 10 mg dm<sup>-3</sup>. Tyto výsledky svědčí o vyšší kapacitě vazebných míst pro koncentrovanější roztoky humátu, jak lze předpokládat.

**Tab. 7** Navázané množství Cu<sup>2+</sup> iontů pro 10, 25 a 50 mg dm<sup>-3</sup> koncentrovaný humát.

Přídavek Cu <sup>2+</sup> (mol dm <sup>-3</sup> )	Přídavek Cu <sup>2+</sup> (mg dm <sup>-3</sup> )	Navázané množství Cu <sup>2+</sup> v humátu (mg dm <sup>-3</sup> )		
		10 mg dm <sup>-3</sup>	25 mg dm <sup>-3</sup>	50 mg dm <sup>-3</sup>
1·10 <sup>-6</sup>	0,064	0,029	0,022	0,021
2·10 <sup>-6</sup>	0,127	0,066	0,044	0,054
4·10 <sup>-6</sup>	0,254	0,121	0,109	0,113
5·10 <sup>-6</sup>	0,318	0,206	0,259	0,200
6·10 <sup>-6</sup>	0,381	0,246	0,293	0,219
8·10 <sup>-6</sup>	0,508	0,310	0,371	0,279
1·10 <sup>-5</sup>	0,636	0,442	0,467	0,395
2·10 <sup>-5</sup>	1,270	0,728	0,928	0,602
4·10 <sup>-5</sup>	2,542	1,171	1,320	1,073
5·10 <sup>-5</sup>	3,177	1,400	1,540	1,356
6·10 <sup>-5</sup>	3,813	1,426	1,687	1,771
8·10 <sup>-5</sup>	5,084	1,914	1,995	2,361
1·10 <sup>-4</sup>	6,355	2,209	2,507	2,709

Pokud porovnáme navázané množství iontů mědi (při maximálním studovaném přídavku iontů) a to při různých třech koncentracích humátu lze zjistit, že bylo navázáno 35 % mědi při koncentraci humátu 10 mg dm<sup>-3</sup>. Dále při koncentraci 25 mg dm<sup>-3</sup> bylo navázáno 39 % iontů z celkového množství přidaného množství mědi a při 50 mg dm<sup>-3</sup> humátu 43 %. Závislost navázaného množství Cu<sup>2+</sup> na celkové koncentraci iontů v systému o různé

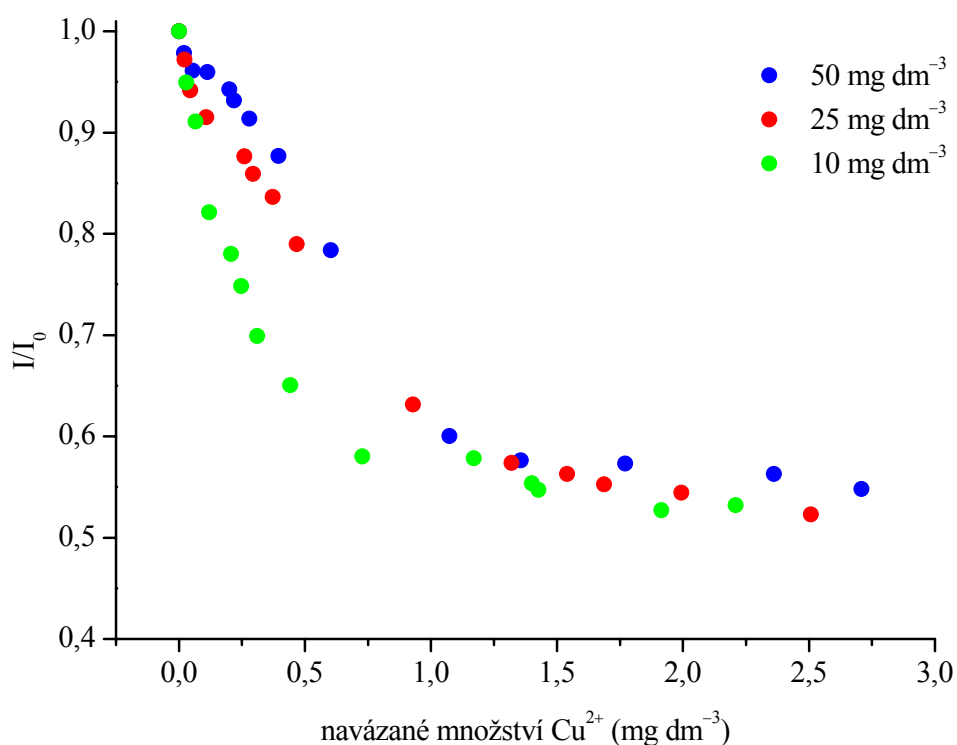
koncentraci humátu je zobrazená na následujícím obrázku (Obr. 32). Bylo zjištěno, že při koncentracích přidaných iontů mědi vyšších než  $1 \cdot 10^{-5}$  dochází ke zlomu v trendu naměřených bodů. Při koncentracích vyšších než  $1 \cdot 10^{-5}$  dochází ke zpomalení nárůstu navázaného množství mědi. Změna je markantnější pro menší koncentrace humátu a nejspíše souvisí se zaplněním snáze přístupných vazebných míst ve struktuře humátu.



**Obr. 32** Závislost navázaného množství  $\text{Cu}^{2+}$  na celkové koncentraci  $\text{Cu}^{2+}$  iontů v roztoku humátu o různých koncentracích.

Dále byly zjištěné hodnoty navázaného množství  $\text{Cu}^{2+}$  iontů vyhodnoceny v závislosti na poměru  $I/I_0$ , charakterizující zhášení (Obr. 33). Čím je koncentrace humátu v systému vyšší, tím navázané  $\text{Cu}^{2+}$  ionty vyvolají menší zhášení fluorescence humátu pro koncentrace do  $\sim 1 \text{ mg dm}^{-3}$  navázaných  $\text{Cu}^{2+}$  iontů. Nad tuto koncentraci je zhášení pro všechny koncentrace humátu přibližně stejné. Z uvedeného grafu je dále patrné, že zhášení fluorescence není přímo úměrné všem vazebným místům, protože ve struktuře humátu existují i jiná vazebná místa, která nefluoreskují. Navíc všechna vazebná místa nemohou být obsazena měďnatými ionty, díky sterickým zábranám v tak složitém a heterogenním systému.

Měření vzorků na atomovém absorpčním spektrofotometru bylo potvrzeno, že  $\text{Cu}^{2+}$  ionty se váží do struktury lignitického humátu.



**Obr. 33** Závislost poměru  $I/I_0$  maxima synchronního spektra na množství navázaných iontů mědi pro tři koncentrace humátu ( $\Delta\lambda = 35 \text{ nm}$ ).

#### 4.5 Vyhodnocení zhášení fluorescence humátu

Parametry charakterizující komplexaci  $\text{Cu}^{2+}$  iontů na lignitický humát, tj. hodnoty  $\log K_a$  a procentuální zastoupení fluoroforu podléhajícího zhášení, byly získány využitím upravené Stern-Volmerovy rovnice (14). K výpočtu byly použity zprůměrované výsledky sérií měření, viz. kapitoly 4.2.3 a 4.3.5, jak z konvenčních emisních spekter tak také ze synchronních spekter. Dosažené výsledky zobrazuje následující tabulka (Tab. 8).

**Tab. 8** Parametry  $\log K_a$  a  $f_a$  vypočítané pro lignitický humát 22/11/05.

Koncentrace humátu	SFS		Emise	
	$\log K_a$	$f_a$	$\log K_a$	$f_a$
10 $\text{mg dm}^{-3}$	5,27	53 %	5,13	82 %
25 $\text{mg dm}^{-3}$	4,53	73 %	4,76	85 %
50 $\text{mg dm}^{-3}$	4,17	95 %	4,45	88 %
průměr	4,66	-	4,78	-

Procentuálně vyjádřený podíl fluorescence systému, který je schopen podlehnout zhášení, se u použitých koncentrací humátu v případě zhášení emise příliš neliší. V případě zhášení maxima synchronního spektra (502 nm, při  $\Delta\lambda = 35$  nm) se hodnota  $f_a$  s měnící se koncentrací humátu podle údajů v předchozí tabulce různí. Čím vyšší je koncentrace humátu v systému, tím hodnota  $f_a$  vzrůstá. Průměrná hodnota  $\log K_a$  získaná ze zhášení synchronních spekter lignitického humátu dosahuje nižší hodnoty než odpovídá průměrné  $\log K_a$  vypočítané ze zhášení emisních spekter.

V této práci bylo dokázáno, že zhášení fluorescence humátu v důsledku komplexace s  $\text{Cu}^{2+}$  ionty lze sledovat metodou synchronní fluorescenční spektroskopie. Dále bylo ověřeno, že pro výpočet disociační konstanty pomocí upravené Stern-Volmerovy rovnice, lze využít zhášení sledované pomocí synchronních spekter. Výsledky získané ze spekter SFS jsou přesnější a lze je úspěšně vyhodnotit oproti metodě emisní fluorescenční spektroskopie.

Při porovnání našich výsledků s údaji v literatuře jsme zjistili, že naše výsledky jsou ve shodě s výsledky Antunes a kol. [40], kteří měřili komplexaci mědi a technické huminové kyseliny Fluka metodou EEM. V jejich práci měřili HK o koncentraci  $40 \text{ mg dm}^{-3}$  a určili hodnoty parametrů:  $\log K_a = 4,83$  a  $f_a = 91 \%$ .

Plaza a kol. [14] stanovili  $\log K$  pro  $15 \text{ mg dm}^{-3}$  koncentrovanou půdní HK v rozmezí 5,14 až 5,36.

Pro HK o  $50 \text{ mg dm}^{-3}$  při konstantním pH 7 vypočítali Esteves da Silva a kol. [35]  $\log K = 5,38$ . V této práci nepoužili pro stanovení konstant Stern-Volmerovu rovnici, ale provedli modelaci měřených spekter.

Hernández a kol. [44] studovali také soustavu HK v přítomnosti mědi a zjistili hodnotu konstanty  $\log K = 5,25$ , což také přibližně odpovídá našim výsledkům.

## 5. ZÁVĚR

Cílem této diplomové práce bylo přispět ke studiu komplexace huminových kyselin s kovovými ionty. Pro experimenty byl vybrán měďnatý iont. Z důvodu snadné rozpustnosti ve vodě a omezení obsahu nadbytečných iontů byly hlavní experimenty provedeny se sodnou solí lignitické huminové kyseliny, tzv. humátem.

Komplexace kovového iontu může vyvolat změnu elektronové polarizace jak kovového iontu, tak vazebného místa. Taková změna vazebného místa může vést ke změně případných fluorescenčních vlastností jednotlivých vazebných míst a fluoroforů, které jsou spojeny s vazebnými místy [26], [28]. Jaké povahy bude ovlivnění fluorescence systému, závisí na povaze kovového iontu. Použitý kationt má částečně zaplněné *d*-orbitaly (elektronová konfigurace  $\text{Cu}^{2+}$  je  $3d^9$ ). Z toho důvodu bylo očekáváno zhášení fluorescence humátu po přidavku  $\text{Cu}^{2+}$  iontů.

Nejprve byla určena vlnová délka maxima excitačního spektra použitého lignitického humátu s označením 22/11/05, ta byla použita pro měření emisních spekter humátu, která vytváří široký emisní pás. Po přidavku měďnatých iontů vykazovala emisní spektra snižování své intenzity. Se vzrůstající koncentrací  $\text{Cu}^{2+}$  iontů ve vodném roztoku humátu docházelo ke zhášení fluorescence jeho emisního spektra, což bylo ověřeno pro tři koncentrace humátu (10, 25 a 50  $\text{mg dm}^{-3}$ ) v rozmezí koncentrací  $\text{Cu}^{2+}$  iontů  $1 \cdot 10^{-6}$ – $1 \cdot 10^{-4}$   $\text{mol dm}^{-3}$ . Pomocí atomové absorpční spektrometrie bylo stanoveno navázané množství iontů a tím ověřeno, že zhášení emisní fluorescence humátu je důsledek navázání měďnatých iontů do struktury humátu. V excitačním spektru lignitického humátu bylo maximum stanoveno při vlnové délce 468 nm. Excitační spektrum i s hlavním maximem bylo také po přidavku iontů zhášeno, z čehož vyplývá, že fluorofor, kterému přísluší excitační vlnová délka  $\lambda_{\text{ex}} = 468$  nm, by měl být ovlivněn komplexací, či dokonce by mohl být do komplexace sám zapojen.

Dalším důležitým cílem bylo vyzkoušet, zda ke sledování zhášení fluorescence humátu měďnatými ionty lze použít i synchronní fluorescenční spektroskopii a případně při jakém nastavení. Synchronní fluorescenční spektroskopie se s výhodou používá k charakterizaci multifluoroforních systémů, jako jsou huminové kyseliny. Poskytuje totiž lepší spektrální rozlišení a tak by tato metoda mohla být využita pro nalezení fluoroforu, který je zhášením nejvíce ovlivněn. Nejprve bylo použito nastavení synchronního skenu při  $\Delta\lambda = 20$  nm, které je velmi často používané při charakterizaci huminových látek. Bylo zjištěno, že se ve spektru humátu vyskytují píky při 358, 450, 468, 482 a 501 nm a široký pás v oblasti 400–440 nm. Hlavní maximum se nachází při 468 nm. Přídavek  $\text{Cu}^{2+}$  iontů ovlivňoval intenzitu maxima, ale nedocházelo k postupnému zhášení jako u emisního spektra. Od určité koncentrace iontů dokonce intenzita fluorescence systému vzrůstala. A proto jsme se zaměřili na hledání vhodnějšího nastavení  $\Delta\lambda$  synchronního skenu, při kterém by se dalo pozorovat zhášení fluorescence humátu ve vybraném rozmezí koncentrací měďnatých iontů od  $1 \cdot 10^{-6}$  do  $1 \cdot 10^{-4}$   $\text{mol dm}^{-3}$ .

Proměřením synchronních spekter humátu při různých  $\Delta\lambda$  jsme zjistili, že vhodnější podmínky pro pozorování zhášení poskytuje nastavení  $\Delta\lambda = 35$  nm. Při tomto nastavení se hlavní maximum spektra humátu objevuje při 502 nm a jeho  $\lambda_{\text{ex}}$  odpovídá 468 nm. Kromě hlavního maxima lze ve spektru pozorovat výrazné píky při 358, 468 a 484 nm. Přítomnost  $\text{Cu}^{2+}$  iontů v celé použitém rozmezí vyvolává postupné zhášení jako u emisních spekter, kdy hlavní maximum spektra (502 nm) je ovlivněno nejvíce. Dále lze pozorovat v rozmezí koncentrací  $\text{Cu}^{2+}$  iontů  $1 \cdot 10^{-5}$ – $4 \cdot 10^{-5}$   $\text{mol dm}^{-3}$  změnu v průběhu zhášení fluorescence

humátu. Z této změny se dá usuzovat, že v této oblasti koncentrací iontů dochází k významné změně ve struktuře humátu, čímž se výrazně ovlivní jeho fluorescenční vlastnosti.

Pozorované zhášení humátu bylo pomocí upravené Stern-Volmerovy rovnice využito k vypočítání komplexačních parametrů jak z emisních, tak i ze synchronních spekter při nastavení  $\Delta\lambda = 35$  nm. Výsledky zjištěné ze zhášení synchronního spektra by měly podle našeho názoru být přesnější, neboť pozorujeme zhášení jednoho určitého maxima (jednoho fluoroforu).

Z naměřených výsledků plyne, že metoda synchronní fluorescenční spektroskopie (SFS) je vhodná pro sledování zhášení fluorescence humátu kovovými ionty a lze ji tedy využít při studiu komplexace huminových látek s  $\text{Cu}^{2+}$  ionty. Nezbytné je ale stanovení vhodného rozdílu  $\Delta\lambda$ .

Námi nalezené nastavení synchronního spektra lignitického humátu,  $\Delta\lambda = 35$  nm, se nejlépe hodí k pozorování zhášení. Díky lepšímu rozlišení, které tato metoda poskytuje, lze identifikovat fluorofor, který je komplexací  $\text{Cu}^{2+}$  iontů přímo ovlivněn. V synchronním spektru lignitického humátu lze podle našich výsledků rozlišit dva hlavní fluorofory, kdy první s emisí při 468 nm ( $\Delta\lambda < 35$  nm) není přímo ovlivněn komplexací s měďnatými ionty a druhý při 502 nm (nastavení  $\Delta\lambda = 35$  nm), který je nejvíce ovlivněn  $\text{Cu}^{2+}$  ionty. Jedná se o fluorofor určený při  $\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}} = 467/502$  nm. Chemická povaha těchto dvou fluoroforů se zdá být odlišná, což potvrzuje jejich rozdílné fluorescenční chování v přítomnosti  $\text{Cu}^{2+}$  iontů. Nicméně identifikace jednotlivých fluoroforů zůstává být i nadále komplikovaná díky složité chemické struktuře huminových kyselin.

## 6. SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- [1] Skokanová, M., Dercová, K.: Humínové kyseliny. Pôvod a štruktúra. *Chemické listy*, 2008, vol. 102, s. 262–268.
- [2] Weber, J.: *Soil humic substances* [online]. 1997, last modified 1997 [cit. 20.11. 2008]. Dostupné z: <<http://www.ar.wroc.pl/~weber/humic.htm#start>>.
- [3] Fasurová, N., Čechlovská, H., Kučerík, J.: A comparative study of south moravian lignite and standard IHSS humic acids' optical and colloidal properties. *Petroleum & Coal*, 2006, vol. 48, no. 2, p. 39–47.
- [4] Engebretson, R. R., v. Wandruszka, R.: The effect of molecular size on humic acid associations. *Organic Geochemistry*, 1997, vol. 26, no. 11–12, p. 759–767.
- [5] v. Wandruszka, R., Engebretson, R. R.: The role of selected cations in the formation of pseudomicelles in aqueous humic acid. *Talanta*, 1997, vol. 44, p. 805–809.
- [6] Piccolo, A.: The supramolecular structure of humic substances: A novel understanding of humic chemistry and implications in soil science. *Advances in Agronomy*, 2002, Vol. 75, p. 57–134.
- [7] *Informace o huminových látkách* [online]. 2005 [cit. 2009-02-26]. Dostupný z WWW: <<http://www.humatex.cz/informace-o-huminovych-latkach.html>>.
- [8] Veselá, L., Kubal, M., Kozler, J., Innemanová, P.: Struktura a vlastnosti přírodních huminových látek typu oxihumolitu. *Chemické listy*, 2005, roč. 99, č. 7, s. 711–717.
- [9] Kučerík, J., Šmejkalová D., Čechlovská H., Pekař, M.: New insights into aggregation and conformational behaviour of humic substances: Application of high resolution ultrasonic spectroscopy. *Organic Geochemistry*, 2007, vol. 38, s. 2098–2110.
- [10] Monteil-Rivera, F., Dumonceau, J.: Fluorescence spectrometry for quantitative characterization of cobal (II) complexation by Leonardite humic acid. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2002, vol. 374, p. 1105–1112.
- [11] Senesi, N., Loffredo, E.: Metal ion complexation by soil humic substances. *Chemical Processes in Soils*, 2005, p. 563–617.
- [12] Mikulášková, B., Lapčík, L., Jr., Mašek, I.: Lignit – struktura, vlastnosti a použití. *Chemické Listy*, 1997, roč. 91, s. 160–168.
- [13] Stevenson, F., J., Chen, Y.: Stability constants of copper(II)-humate complexes determined by modified potentiometric titration. *Soil Science Society of America Journal*, 1991, vol. 55, p. 1586–1591.
- [14] Plaza, C., D'Orazio, V., Senesi, N.: Copper(II) complexation of humic acids from the first generation of EUROSOLS by total luminiscence spectroscopy. *Geoderma*, 2005, vol. 125, p. 177–186.
- [15] Lubal, P., Široký D., Fetsch, D., Havel, J.: The acidobasic and complexation properties of humic acids. Study of complexation of Czech humic acids with metal ions. *Talanta*, 1998, vol. 47, p. 401–412.

- [16] Gondar, D., Iglesias, A., López, R., Fiol, S., Antelo, J., M., Arce, F.: Copper binding by peat fulvic and humic acids extracted from two horizons of an ombrotrophic peat bog. *Chemosphere*, 2006, vol. 63, p. 82-88.
- [17] Lu, X., Q., Johnson, W., D.: The reaction of aquatic humic substances with copper(II) ions: an ESR study of complexation. *The Science of the Total Environment*, 1997, vol. 203, p. 199–207.
- [18] Klučáková, M., Pekař, M.: New model for equilibrium sorption of metal ions on solid humic acids. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 2006, vol. 286, p.126–133.
- [19] Klučáková, M., Žbáňková, P.: Interakce kovových iontů s huminovými kyselinami v roztocích. In *VII Pracovní setkání fyzikálních chemiků a elektrochemiků, Brno, 29.–30. února, 2007*. Přírodovědecká fakulta Masarykovy univerzity v Brně, 2007, s. 85–86.
- [20] Valeur, B.: *Molecular Fluorescence: Principles and Application*. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH 69469, 2002. 402 p. ISBN 3-527-29919-X.
- [21] Chen, J., Gu, B., LeBoeuf, E. J., Pan, H., Dai, S.: Spectroscopic characterization of the structural and functional properties of natural organic matter fractions. *Chemosphere*, 2002, vol. 48, p. 59–68.
- [22] Senesi, N., Miano, T., M., Provenzano, M., R., Brunetti, G.: Characterization, differentiation, and classification of humic substances by fluorescence spectroscopy. *Soil Science*, 1991, vol. 152, no. 4, p. 259–271.
- [23] Chen, J., Leboeuf, E. J., Dai, S., Gu, B.: Fluorescence spectroscopic studies of natural organic matter fraction. *Chemosphere*, 2003, vol. 50, p. 639–647.
- [24] Miano, T. M., Senesi, N.: Synchronous excitation fluorescence spectroscopy applied to soil humic substance chemistry. *The Science of the Total Environment*, 1992, p. 41–51.
- [25] Peuravuori, J., Koivikko, R., Pihlaja, K.: Characterization, differentiation and classification of aquatic humic matter separated with different sorbents: synchronous scanning fluorescence spectroscopy. *Water Research*, 2002, vol. 36, p. 4552–4562.
- [26] Ryan, D. K., Shia, C.-P., O'Connor, D. V.: Fluorescence spectroscopic studies of Al–Fulvic acid complexation in acidic solutions. In *Humic and fulvic acids: Isolation, Structure, and Environmental Role*, American Chemical Society, Washington, DC, Chapter 9, 1996, p. 125–139.
- [27] Bai, Y. C., Wu, F. C., Liu, C. Q., Li, W., Guo, J. Y., Fu, P. Q., Xing, B. S., Zheng, J.: Ultraviolet absorbance titration for determining stability constants of humic substances with Cu(II) and Hg(II). *Analytica chimica acta*, 2008, vol. 616, p.115–121.
- [28] Lu, X., Jaffe, R.: Interaction between Hg(II) and natural dissolved organic matter: A Fluorescence spectroscopy based study. *Water Research*, 2001, vol. 35, no. 7, p. 793–1803.

- [29] Elkins, M. K., Nelson, D. J.: Fluorescence and FT-IR spectroscopic studies of Suwannee river fulvic acid complexation with aluminum, terbium and calcium. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 2001, vol. 87, p. 81–96.
- [30] Provenzano, M. R., D’Orazio, V., Jerzykiewicz, M., Senesi, N.: Fluorescence behaviour of Zn and Ni complexes of humic acids from different. *Chemosphere*, 2004, vol. 55, p. 885–892.
- [31] Fu, P., Wu, F., Liu, C., Wang, F., Li, W., Yue, L., Guo, Q.: Fluorescence characterization of dissolved organic matter in an urban river and its complexation with Hg(II). *Applied Geochemistry*, 2007, vol. 22, p. 1668–1679.
- [32] Hays, M. D., Ryan, D. K., Pennell, S., Milenkovic, L. V.: Data treatment for relating metal-ion binding to fulvic acid as measured by fluorescence spectroscopy. *Humic and fulvic acids: Isolation, Structure, and Environmental Role*, ACS Symposium Series 651, American Chemical Society, Washington DC, Chapter 8, 1996, p. 108–124.
- [33] Zhao, J., Nelson, D. J.: Fluorescence study of the interaction of Suwannee River fulvic acid with metal ions and Al<sup>3+</sup>-metal ion competition. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 2005, vol. 99, p. 383–396.
- [34] Neves, E. A., Barriquello, M. F., Milori, D., Martin-Neto, L.: Fluorescence spectroscopy of a humic acid-like polymers. In *Proceedings of the 13<sup>th</sup> meeting of the IHSS. Karlsruhe, 30 July–4 August, 2006*. Ed. Fritz H. Frimmel, Gurdun Abbt-Braun. Karlsruhe: Universität Karlsruhe, 2006, p. 249.
- [35] Esteves da Silva, J., C., G., Machado, A., A., S., C.: Evolving factor analysis of synchronous fluorescence spectra of humic substances in the presence of Cu(II). *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 1995, vol. 27, p. 115–128.
- [36] Nakashima, K., Xing, S., Gong, Y., Miyajima, T.: Characterization of humic acid by two-dimensional correlation fluorescence spectroscopy. *Journal of Molecular Structure*, 2008, vol. 883–884, p. 155–159.
- [37] Smith, D. S., Kramer, J. R.: Multisite metal binding to fulvic acid determined using multiresponse fluorescence. *Analytica Chimica Acta*, 2000, vol. 416, p. 211–220.
- [38] Milne, P. J., Zika, R. G.: Luminescence quenching of dissolved organic matter in seawater. *Marine Chemistry*, 1989, vol. 27, p. 147–164.
- [39] Esteves da Silva, J. C.G., Tavares, M. J. C. G., Tauler, R.: Multivariate curve resolution of multidimensional excitation-emission quenching matrices of a Laurentian soil fulvic acid. *Chemosphere*, 2006, vol. 64, p. 1939–1948.
- [40] Antunes, M., C., G., Pereira C., C., C., Esteves da Silva, J., C., G.: MCR of the quenching of the EEM of fluorescence of dissolved organic matter by metal ions. *Analytica Chimica Acta*, 2007, vol. 595, p. 9–18.
- [41] Ryan, D. K., Weber, J. H.: Fluorescence quenching titration for determination of complexing capacities and stability constants of fulvic acid. *Analytical Chemistry*, 1982, vol. 54, no. 6, p. 986–990.
- [42] Klouda, P.: *Moderní analytické metody*. 2. vyd. Ostrava: nakladatelství Pavel Klouda, 2003. 132 s. ISBN 80-86369-07-2

- [43] Novotná I.: *Sledování vlastností solí huminových kyselin metodou synchronní fluorescenční spektroskopie*. Diplomová práce na Fakultě chemické Vysokého učení technického v Brně, ústav ÚFSCH. Vedoucí diplomové práce Mgr. Naděžda Fasurová, Ph.D.
- [44] Hernández, D., Plaza, C., Senesi, N., Polo, A.: Detection of copper (II) and zinc (II) binding to humic acids from pig slurry and amended soils by fluorescence spectroscopy. *Environmental Pollution*, 2006, vol. 143, p. 212-220.

## 7. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

HL	humínové látky
HK	humínové kyseliny
FK	fulvínové kyseliny
HU	huminy
pH	záporný dekadický logaritmus aktivity $\text{H}_3\text{O}^+$ iontů
EDTA	etylendiamintetraoctová kyselina
Da	dalton, $1,660\ 53 \cdot 10^{-27}$ kg
ESR	elektronová spinová rezonance
S	singletový energetický stav
nm	jednotka vlnové délky, $10^{-9}$ m
IR	infračervená oblast elektromagnetického záření
$\phi$	kvantový výtěžek fluorescence
$I$	intenzita fluorescence
$k_q$	bimolekulární zhášecí konstanta
$\tau$	doba života fluoroforu v excitovaném stavu
[Q]	koncentrace zhášedla
[M]	koncentrace fluoroforu
$K_{SV}$	Stern-Volmerova zhášecí konstanta
$K_S$	disociační konstanta komplexu
UV	ultrafialová oblast elektromagnetického záření
VIS	viditelná oblast elektromagnetického záření
$A$	absorbance
$\lambda$	vlnová délka
$\lambda_{ex}$	vlnová délka excitace
$\lambda_{em}$	vlnová délka emise
SFS	synchronní fluorescenční spektroskopie
$\Delta\lambda$	rozdíl vlnových délek mezi excitačním a emisním monochromátorem
EEM	excitačně emisní matice
R.F.I	relativní fluorescenční intenzita
$K_a$	Stern-Volmerova konstanta přístupné populace fluoroforů
$f_a$	část fluorescence, která je schopna podlehnout zhášení
AAS	atomová absorpční spektrometrie
R.I.	relativní intenzita
$I/I_0$	poměr intenzit fluorescence v přítomnosti a nepřítomnosti zhášedla
$\mu\text{m}$	jednotka délky, $10^{-6}$ m