



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

MOŽNOSTI VYUŽITÍ VIBRAČNÍ SPEKTROSKOPIE PŘI STUDIU INTERAKCÍ PŘÍRODNÍ ORGANICKÉ HMOTY S MODELOVÝMI POLUTANTY

INVOLVEMENT OF VIBRATIONAL SPECTROSCOPY IN THE STUDY ON INTERACTIONS OF NATURAL ORGANIC MATTER WITH MODEL ENVIRONMENTAL POLLUTANTS.

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Kristína Stehlíková

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

doc. Ing. Petr Sedláček, Ph.D.

BRNO 2023

Zadání diplomové práce

Číslo práce: FCH-DIP1903/2022 Akademický rok: 2022/23
Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií
Studentka: **Bc. Kristína Stehlíková**
Studijní program: Chemie pro medicínské aplikace
Studijní obor: Chemie bioaktivních látek
Vedoucí práce: **doc. Ing. Petr Sedláček, Ph.D.**

Název diplomové práce:

Možnosti využití vibrační spektroskopie při studiu interakcí přírodní organické hmoty s modelovými polutanty

Zadání diplomové práce:

1. Vypracovat literární rešerši na téma: i. metody experimentálního studia strukturních a termodynamických aspektů interakce přírodní organické hmoty (POH) s různými nízkomolekulárními látkami, ii. pokročilé techniky měření a vyhodnocení vibračních spekter při analýze mezimolekulových interakcí v komplexních přírodních matricích.
2. Na základě provedené literární rešerše zvolit jednu nebo více vhodných kombinací modelové komponenty POH a modelového nízkomolekulárního polutantu a dále vhodný postup přípravy komplexů těchto látek.
3. Analyzovat připravené komplexy metodami vibrační spektroskopie. Aplikovat pokročilé techniky zpracování a vyhodnocení spektrálních dat za účelem mapování interakcí zodpovědných za vznik komplexů.
4. Vyhodnotit výhody a limitace technik vibrační spektroskopie při studiu komplexace POH s polutanty. Doporučit optimální postup měření, zpracování a vyhodnocení spektrálních dat.

Termín odevzdání diplomové práce: 8.5.2023:

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

Bc. Kristína Stehlíková
studentka

doc. Ing. Petr Sedláček, Ph.D.
vedoucí práce

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 1.2.2023

prof. Ing. Michal Veselý, CSc.
děkan

ABSTRAKT

Hlavným cieľom tejto diplomovej práce bolo overenie potenciálu využitia pokročilých techník spracovania infračervených spektier, konkrétne analýzy hlavných komponentov (PCA), za účelom sledovania interakcií prírodnej organickej hmoty s organickými polutantmi. Prírodná organická hmota bola reprezentovaná štandardom humínových kyselín IHSS Leonardite a za zástupcov organických iónov boli zvolené aromatické farbivá metylénová modrá a Rhodamin 6G a tiež alifatická látka Septonex. Ich interakcie boli potom sledované pomocou infračervenej spektroskopie, ktorej využitie pre tento účel bolo overené v mojej bakalárskej práci. Na získané infračervené spektrá vytvorených komplexov a pripravených slepých vzoriek bola napokon aplikovaná analýza hlavných komponentov, ktorá pomohla odhaliť spektrálne zmeny na prvý pohľad nerozoznateľné v samotných spektrách. Bolo zistené, že najpravdepodobnejším mechanizmom interakcie humínových kyselín s aromatickými polutantmi sú π - π interakcie, zatiaľ čo pri viazaní alifatických látok je predpokladaná elektrostatická povaha interakcie.

ABSTRACT

The main objective of this diploma thesis was to verify the potential of using advanced infrared spectra processing techniques – specifically the principal component analysis (PCA) – in order to monitor the interaction of natural organic matter with organic pollutants. Natural organic matter was represented by standard IHSS Leonardite humic acid, while the aromatic dyes methylene blue and Rhodamine 6G and the aliphatic substance Septonex were chosen as representatives of organic ions. Their interactions were monitored using Fourier-transform infrared spectroscopy, the use of which for this purpose was verified in my bachelor's thesis. Principal component analysis was finally applied to the obtained infrared spectra of the formed complexes and prepared blank samples, which helped to reveal spectral changes at first glance unrecognizable in the spectra themselves. It was found out that the most likely mechanism of humic acid interaction with aromatic pollutants is a π - π interaction, while the electrostatic nature of the interaction is assumed for the binding of aliphatic substances.

KLÚČOVÉ SLOVÁ

prírodná organická hmota, humínové látky, humínové kyseliny, organické polutanty, organické ióny, metylénová modrá, Rhodamin 6G, Septonex, infračervená spektroskopia, FTIR spektroskopia, analýza hlavných komponentov

KEYWORDS

natural organic matter, humic substances, humic acids, organic pollutants, organic ions, methylene blue, Rhodamine 6G, Septonex, infrared spectroscopy, FTIR spectroscopy, principal component analysis

STEHLÍKOVÁ, Kristína. *Možnosti využití vibrační spektroskopie při studiu interakcí přírodní organické hmoty s modelovými polutanty*. Brno, 2023. Dostupné také z: <https://www.vut.cz/studenti/zav-prace/detail/148678>. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav chemie potravin a biotechnologií. Vedoucí práce Petr Sedláček.

PREHLÁSENIE

Prehlasujem, že som diplomovú prácu vypracovala samostatne a že všetky použité literárne zdroje som správne a úplne citovala. Diplomová práca je z hľadiska obsahu majetkom Fakulty chemickej VUT v Brne a môže byť využitá ku komerčným účelom len so súhlasom vedúceho diplomovej práce a dekana FCH VUT.

.....
Kristína Stehlíková

POĎAKOVANIE

Na tomto mieste by som rada poďakovala vedúcemu mojej diplomovej práce doc. Ing. Petrovi Sedláčkovi, Ph.D. za jeho odborné vedenie, čas a cenné rady poskytnuté pri spracovávaní tejto práce. Tiež by som chcela veľmi pekne poďakovať Ing. Jitke Krouskej, Ph.D. a Ing. Monike Trudičovej za pomoc v experimentálnej časti tejto diplomovej práce. Ďalej patrí veľká vďaka mojej rodine a priateľom za ich podporu počas celého štúdia.

OBSAH

1 Úvod	7
2 Teoretická časť	8
2.1 Prírodná organická hmota	8
2.2 Humínové látky	9
2.2.1 Rozdelenie humínových látok	9
2.2.2 Štruktúra a zloženie humínových látok	10
2.2.3 Využitie humínových látok	12
2.3 Interakcie a väzbové možnosti humínových látok	13
2.3.1 Kovalentná väzba	13
2.3.2 Koordinačná väzba	13
2.3.3 Nekovalentné interakcie	14
2.3.3.1 Van der Waalsove sily a coulombické interakcie	14
2.3.3.2 Vodíkové mostíky	16
2.3.3.3 π efekty	17
2.3.3.4 Hydrofóbny efekt	18
2.4 Vibračná spektroskopia	19
2.4.1 Infračervená spektroskopia	19
2.4.1.1 Typy vibrácií	20
2.4.1.2 Infračervené spektrá a ich interpretácia	21
2.4.1.3 Techniky infračervenej spektroskopie	22
2.4.2 Ramanova spektroskopia	24
3 Súčasný stav riešenej problematiky	26
3.1 Metódy experimentálneho štúdia interakcie prírodnej organickej hmoty s organickými polutantmi	26
3.1.1 UV-VIS spektroskopia	26
3.1.2 Potenciometria a potenciometrická titrácia	27
3.1.3 Difúzne experimenty	27
3.1.4 Izotermická titračná kalorimetria	28
3.1.5 Fluorescenčná spektroskopia	29
3.1.6 FTIR spektroskopia	30
3.1.7 Nukleárna magnetická rezonancia	31
3.2 Využitie vibračnej spektroskopie pri štúdiu nekovalentných interakcií nízkomolekulárnych látok	32
3.3 Pokročilé techniky merania a vyhodnocovania vibračných spektier	33
3.3.1 Dekonvolúcia	33
3.3.2 2D korelačná analýza	34
3.3.3 Analýza hlavných komponentov (PCA)	35
4 Experimentálna časť	36
4.1 Použité pomôcky a prístroje	36
4.2 Použité chemikálie	36
4.3 Príprava vzoriek	36
4.3.1 Zásobné roztoky	36
4.3.1.1 Humínové kyseliny	36
4.3.1.2 Metylénová modrá a Rhodamin 6G	37
4.3.1.3 Septonex	37
4.3.2 Komplexačné roztoky	38
4.3.3 Dialýza	38

4.4	UV-VIS analýza dialyzačných roztokov MB a R6G.....	40
4.5	Potenciometrická titrácia Septonexu	40
4.6	FTIR analýza	40
4.7	PCA analýza	41
5	Výsledky a diskusia	42
5.1	FTIR spektrá humínových kyselín a aktívnych látok	42
5.1.1	Humínové kyseliny	42
5.1.2	Metylénová modrá	44
5.1.3	Rhodamin 6G.....	45
5.1.4	Septonex	47
5.2	Charakterizácia vzniku komplexov	48
5.3	Porovnanie experimentov a výber vhodných koncentrácií komplexov	49
5.4	PCA porovnanie komplexov a slepej vzorky	53
5.4.1	Komplex HK s metylénovou modrou.....	53
5.4.2	Komplex HK s Rhodaminom 6G	56
5.4.3	Komplex HK so Septonexom	59
5.5	PCA porovnanie komplexov pripravených rôznymi spôsobmi dialýzy	62
5.5.1	HK a metylénová modrá.....	62
5.5.2	HK a Rhodamin 6G	64
5.5.3	HK a Septonex.....	66
6	Záver.....	68
7	Zoznam použitých zdrojov	70
8	Zoznam použitých skratiek a symbolov	82
9	Prílohy	83

1 ÚVOD

V súčasnej dobe je čoraz viac skloňovaná otázka ochrany životného prostredia. So stále sa rozvíjajúcou priemyselnou a poľnohospodárskou výrobou sa zvyšuje aj množstvo polutantov nachádzajúcich sa v životnom prostredí, či už ide o rôzne pesticídy, herbicídy, metabolity alebo odpady farmaceutických výrob alebo iných chemických a technologických priemyslov. Keďže sú tieto látky pre živé organizmy často škodlivé a toxické, je veľmi dôležité poznať možnosti, ako je možné ich zo životného prostredia odstrániť alebo zmierniť či úplne potlačiť ich nepriaznivé účinky. Potenciálnym prostriedkom pre efektívne odstraňovanie xenobiotík zo životného prostredia sú humínové látky, ktoré sú prirodzenou súčasťou prírodnej organickej hmoty vo vode a v pôde. Ich využitie pre tento účel je dané najmä tým, že obsahujú veľké množstvo rozličných funkčných skupín a tým pádom sú schopné pomocou rôznych mechanizmov viazať látky rôzneho pôvodu a štruktúry. Práve pochopenie týchto väzobných mechanizmov je kľúčové pre ich efektívne využitie k sanácii prostredia, v ktorom žijeme.

Jedným z cieľov tejto diplomovej práce bolo vypracovať literárnu rešerš na tému metód experimentálneho štúdia interakcií prírodnej organickej hmoty s nízkomolekulárnymi látkami, ktoré by práve mohli predstavovať látky znečisťujúce životné prostredie. Environmentálne polutanty sa môžu v prostredí vyskytovať v rôznych formách, no veľmi často je možné ich nájsť vo forme organických iónov. Tieto látky môžu predstavovať napríklad určité antibiotiká, analgetiká, tenzidy, alebo už spomínané herbicídy a pesticídy. Na základe preskúmania súčasného stavu riešenej problematiky boli za modelové zlúčeniny prírodnej organickej hmoty študované v tejto práci zvolené humínové kyseliny, pričom bola sledovaná ich interakcia a tvorba komplexov s organickými iónmi, ktoré boli zastúpené aromatickými farbivami metylénovou modrou a Rhodaminom 6G a alifatickou dezinfekčnou látkou karbethodendecinium bromid, známou pod komerčným názvom Septonex.

V nadväznosti na moju bakalársku prácu [1] bola za metódu štúdia spomínaných interakcií zvolená infračervená spektroskopia, pričom cieľom bolo hlavne aplikovať na získané dáta pokročilú techniku spracovania spektrálnych dát, akou je napríklad analýza hlavných komponentov a overiť ich využiteľnosť pre mapovanie interakcií medzi zvolenými modelovými zástupcami prírodnej organickej hmoty a organickými polutantmi.

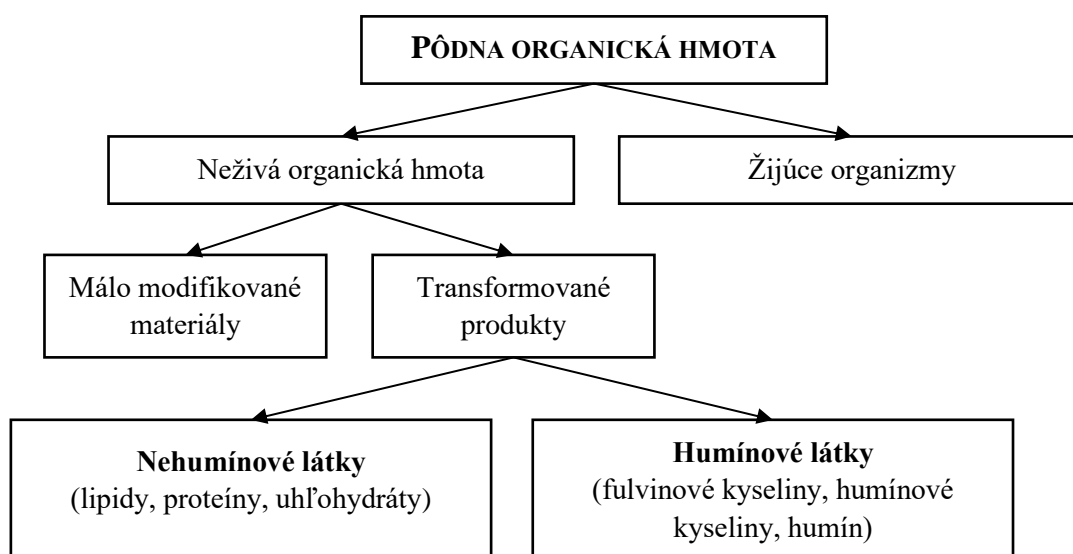
2 TEORETICKÁ ČASŤ

2.1 PRÍRODNÁ ORGANICKÁ HMOTA

Pojem prírodná organická hmota zahŕňa rôzne organické látky nachádzajúce sa v prírodných zdrojoch, ako napríklad v pôde alebo vo vode. Skladá sa z komplexnej zmesi organických látok vrátane uhľovodíkov, lipidov, proteínov alebo humínových látok, pričom jej konkrétne zloženie je veľmi variabilné a závisí napríklad od zdroja organických látok alebo od geografickej polohy. Je tvorená súhrnnou zmesou živých rastlín, živočíchov a mikroorganizmov, alebo ich zvyškami v rôznych štádiách rozkladu alebo humifikácie [2; 3].

Organická hmota vo vodnom prostredí sa mierne líši od pôdnej organickej hmoty. Vo vode sa najviac odlišujú dva typy – buď je zemského pôvodu, alebo pochádza priamo z vodného ekosystému. Môže existovať v rozpustenej, koloidnej alebo časticovej forme. Organická hmota je jedným z najvýznamnejších zdrojov biologicky dostupného organického uhlíka vo vodných ekosystémoch. Keďže je to veľmi komplexná zmes, líši sa vo svojej reaktivite aj v ekologickej úlohe a hrá rozhodujúcu rolu v transporte živín a v dynamike vodného potravinového reťazca. Naopak z hľadiska pitnej vody sa považuje za znepokojujúcu zložku, pretože jej časť môže počas dezinfekcie reagovať a tvoriť vedľajšie produkty, ktoré môžu vo vysokých koncentráciách negatívne ovplyvniť ľudské zdravie [3; 4].

Pôdna organická hmota (POH) je akýkoľvek materiál pôvodne vyprodukovaný živými organizmami, ktorý je navrátený do pôdy a prechádza rozkladným procesom. Vždy sa skladá z rozsahu materiálov od neporušených pôvodných tkanív rastlín a živočíchov po v podstate rozloženú zmes látok známu ako humus. Väčšina pôdnej organickej hmoty pochádza z rastlinných tkanív. Rastlinné zvyšky obsahujú 60-90 % vlhkosti a zvyšná sušina pozostáva z uhlíka, kyslíka, vodíka a malého množstva síry, dusíka, fosforu, draslíka, vápnika a horčíka. Hoci sú tieto živiny prítomné len v malom množstve, sú veľmi dôležité z hľadiska manažmentu úrodnosti pôdy [2]. Celkovo je ale možné rozdeliť POH na žijúce organizmy a neživý organický materiál. Živá frakcia zahŕňa makro a mikroorganizmy a predstavuje približne 4 % organického uhlíka v pôde. Neživá organická hmota môže byť rozdelená na relatívne nezmenený materiál s identifikovateľnou pôvodnou štruktúrou a na transformované produkty, medzi ktoré patria nehumínové (chemicky definované organické zlúčeniny) a humínové látky. Grafické znázornenie tohto rozdelenia je možné vidieť na Obr. 1 [5].



Obr. 1 Schematický prehľad hlavných zložiek pôdnej organickej hmoty [4]

Nehumínové látky zahrňujú veľké množstvo relatívne jednoduchých zlúčenín so známymi štruktúrami, ktoré patria do dobre známych skupín ako sú polysacharidy, proteíny, peptidy, aminokyseliny, tuky, vosky, živice, pigmenty a iné nízkomolekulárne organické látky. Vo všeobecnosti sú tieto zlúčeniny pomerne jednoducho napadnuteľné mikroorganizmami v pôde a majú pomerne krátku dobu rozpadu. Väčšina organického materiálu v pôdach a vodách pozostáva z humínových látok. Sú to amorfné, hnedé alebo čierne, hydrofilné, kyslé, polydisperzné látky s molekulovou hmotnosťou v rozsahu od niekoľkých stoviek do desiatok tisícov, ktoré budú bližšie rozobrané v nasledujúcich kapitolách [6].

Prírodná organická hmota je veľmi významná. Pozitívne ovplyvňuje takmer všetky vlastnosti pôdy a je zodpovedná za jej úrodnosť. Úrodná pôda je potom základom pre zdravé rastliny, živočíchy a ľudí. So znižujúcim sa obsahom pôdnej organickej hmoty sa častejšie objavujú problémy s dostupnosťou vody, zhutňovaním pôdy, eróziou, parazitmi, chorobami alebo hmyzom. POH priamo či nepriamo ovplyvňuje dostupnosť živín pre rastliny. Pri jej rozklade sú živiny prevedené na formy, ktoré sú rastliny schopné prijať. Vďaka svojej kapacite kationovej výmeny je schopná pútať pozitívne nabité živiny, ako napríklad Ca^{2+} , K^+ alebo Mg^{2+} a zabraňuje tým ich odplaveniu hlboko do spodnej pôdy. Ďalej môžu byť pred odplavením živiny chránené aj pomocou chelácie. Nepriamo potom ovplyvňuje dostupnosť živín zlepšovaním štruktúry pôdy, čo má za následok zvýšený prienik vody po dažďoch, zvýšenú schopnosť pôdy zadržiavať vodu alebo je tiež podporený rast koreňov do priepustnejšej pôdy [7].

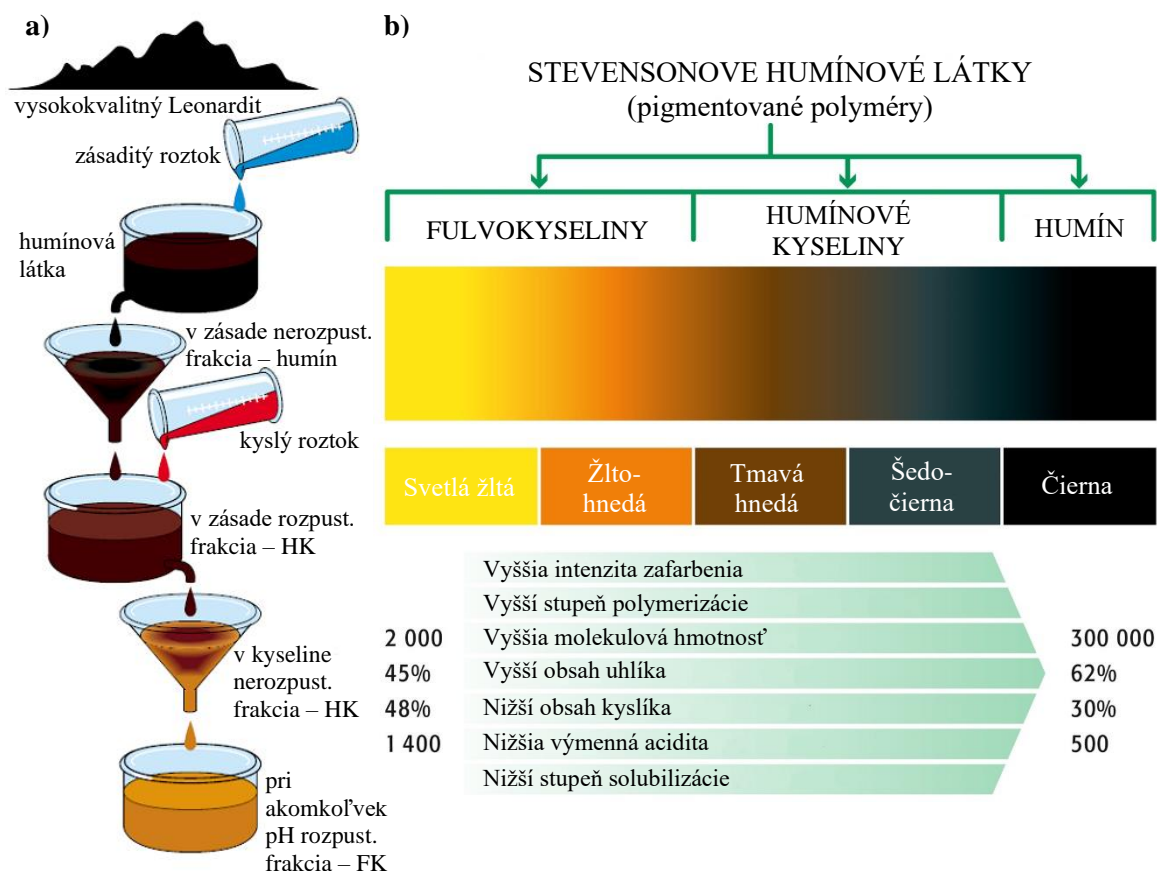
2.2 HUMÍNOVÉ LÁTKY

Dôležitou zložkou prírodnej organickej hmoty vo vode a v pôde sú humínové látky (HL). Tieto komplexné heterogénne zmesi polydisperzných materiálov sú vytvorené biologickými aktivitami mikroorganizmov alebo biochemickými a chemickými reakciami počas humifikácie, čo je pojem pre proces rozkladu mikrobiálnych a rastlinných zvyškov [8]. Je možné ich nájsť vo všetkých typoch pôdy a vody. Pomocou extrakcie môžu byť rozdelené na humín, humínové kyseliny (HK) a fulvinové kyseliny (FK). Ich soli sú potom nazývané humáty alebo fulváty. Humínové kyseliny je možné vo veľmi vysokej koncentrácii nájsť v určitej vrstve mäkkého hnedého uhlia, ktoré ešte nedosiahlo štádium lignitu. Táto vrstva sa nazýva Leonardit a HK sa tu môžu nachádzať v koncentrácii až do 85 % [9]. Leonardit je svojou povahou udržateľná a efektívna surovina, ktorá vzniká zvetrávaním z lignitu a je využiteľná v mnohých odvetviach a priemysloch. Na rozdiel od bežného mäkkého lignitu, Leonardit disponuje vyšším stupňom oxidácie a tým pádom aj väčším podielom humínových kyselín a bioaktívnych karboxylových skupín [10].

2.2.1 ROZDELENIE HUMÍNOVÝCH LÁTOK

Ako už bolo načrtnuté vyššie, humínové látky je možné rozdeliť na tri hlavné skupiny – humínové kyseliny, fulvokyseliny a humín. HK a FK je možné extrahovať do vodného roztoku pomocou silnej zásady (napríklad NaOH alebo KOH), humínové kyseliny sú ale nerozpustné pri nízkom pH a pomocou silnej kyseliny môžu byť vyzrážané. Po odstránení HK okyselením v roztoku zostávajú fulvinové kyseliny, ktorých rozpustnosť vo vodných roztokoch vôbec nie je závislá na pH podmienkach. Humín nie je do vody extrahovateľný ani pomocou silnej zásady, ani silnej kyseliny [8]. Humíny sú zo všetkých humínových látok nachádzajúcich sa v pôde najviac rezistentné voči ďalšej dekompozícii. Sú známe tým, že podporujú schopnosť pôdy zadržiavať vodu, zlepšujú jej úrodnosť, upravujú jej štruktúru, no zachovávajú stabilitu pôdy a môžu sprostredkovať kationovú výmenu [11]. Obr. 2a popisuje extrakciu jednotlivých frakcií humínových látok z Leonarditu a Obr. 2b znázorňuje zmenu vlastností naprieč jednotlivými frakciami [9]. Na tomto obrázku je možné vidieť, že jednotlivé frakcie sa nelíšia len rozpustnosťou, ale aj rôznym zafarbením a inými vlastnosťami. V poradí FK – HK – humín všeobecne stúpa obsah uhlíka alebo stupeň polymerizácie,

zatiaľ čo klesá obsah kyslíka alebo funkčných skupín kyslého charakteru, ako sú napríklad –COOH skupiny [12].



Obr. 2a Extrakcia frakcií humínových látok z Leonarditu [8]. **Obr. 2b** Zmena vlastností humínových látok naprieč jednotlivými frakciami podľa Stevensona [8; 11].

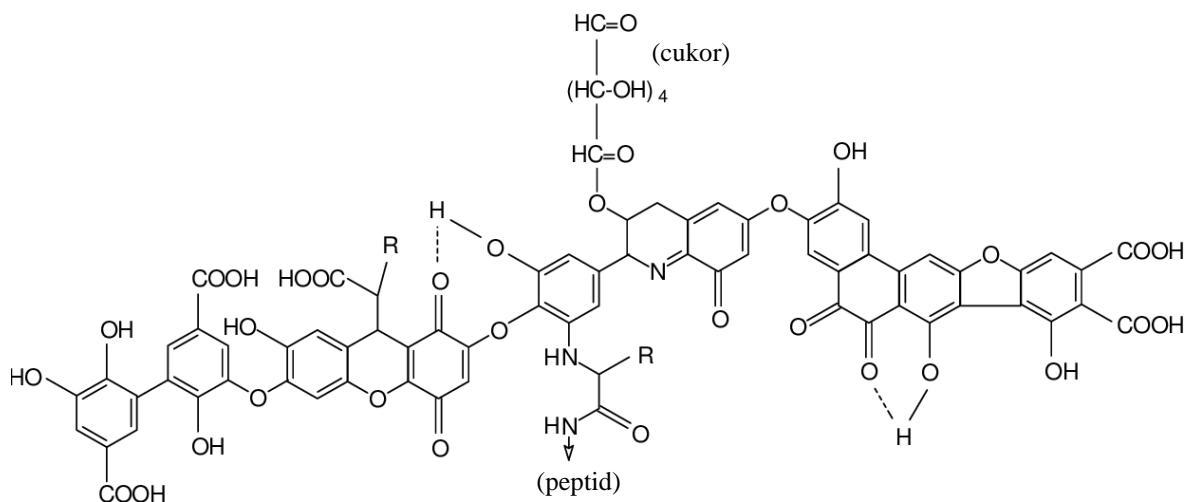
Vo všeobecnosti sa humínové látky vyznačujú svojou vysokou reaktivitou a zároveň odolnosťou voči biologickému rozkladu. Zmienky o humínových kyselinách, fulvokyselinách alebo humíne väčšinou odkazujú na priemerné vlastnosti veľkého súboru zložiek odlišujúcich sa molekulovou hmotnosťou a štruktúrou. Konkrétna štruktúra a vlastnosti jednotlivých HL závisia od presných podmienok ich extrakcie a taktiež od ich zdroja (rôzne typy pôdy alebo vody). Priemerné vlastnosti jednotlivých frakcií humínových látok z rôznych zdrojov sú však mimoriadne podobné [8].

2.2.2 ŠTRUKTÚRA A ZLOŽENIE HUMÍNOVÝCH LÁTOK

Napriek tomu, že štruktúra humínových látok je skúmaná už niekoľko dekád, stále nebola presne objasnená a rôznymi autormi boli navrhnuté rôzne modely štruktúr HL. Pre pochopenie detailnej štruktúry už boli humínové látky skúmané mnohými technikami, medzi ktoré patrí napríklad NMR, hmotnostná alebo röntgenová spektrometria, infračervená spektroskopia a iné. Všeobecne môže byť ale ich štruktúra popísaná ako súbor kovalentne či nekovalentne viazaných aromatických a alifatických súčastí obsahujúcich karboxylové, fenolické alebo alkoxy skupiny prepojené najmä kyslíkovými alebo dusíkovými skupinami. Taktiež môžu humínové látky obsahovať estery sulfátov alebo fosfátov, či alanínové, semichinónové alebo hydrochinónové skupiny [13; 14].

Časom bolo zistené, že humínové látky nie sú samostatné molekuly, ale združenie molekúl mikrobiologického, polyfenolického a lignínového pôvodu a nie je možné ich popísať žiadnym

konkrétnym vzorcom. Röntgenová analýza preukázala, že majú „otvorenú“ flexibilnú štruktúru perforovanú medzerami rôznych veľkostí, ktoré môžu zachytiť alebo fixovať organické či anorganické zlúčeniny, okrem iných napríklad polysacharidy alebo proteíny, ktoré sú k spomínaným medzerám komplementárne svojou veľkosťou a nábojom [13; 14]. Jednotlivé zlúčeniny sú potom do makromolekulárnych agregátov spájané pomocou kombinácie hydrofóbných interakcií, vodíkových väzieb, interakcií s výmenou náboja alebo kovových mostíkov [15]. Niektorí autori tiež uvádzajú, že vo vhodnom vodnom prostredí sú HL schopné organizovať sa do micelárnych štruktúr [16]. Vďaka obsahu veľkého počtu rozličných funkčných skupín majú vzniknuté supramolekulárne agregáty univerzálne väzbové možnosti [17]. Na Obr. 3 je zobrazený model štruktúry humínovej kyseliny navrhnutý Stevensonom [12].



Obr. 3 Modelová štruktúra humínovej kyseliny podľa Stevensona [11; 19]

Čo sa týka prvkového zastúpenia, humínové látky obsahujú ako hlavné prvky uhlík, vodík, dusík, síru a kyslík, pričom uhlík a kyslík sú zastúpené v najväčšom množstve [6]. Konkrétne zastúpenie jednotlivých prvkov sa líši v závislosti od zdroja skúmanej HL, pre predstavu ale Tab. 1 zobrazuje aproximované prvkové zastúpenie modelovej humínovej a fulvinovej kyseliny, získané z priemeru rozsahov prvkových analýz vypočítané Schnitzerom [18]. Humínové kyseliny obsahujú v priemere o 10 % viac uhlíka, ale o 10 % menej kyslíka ako fulvinové kyseliny. Oproti pôdnym humínovým látkam obsahujú väčšinou HL vo vode podstatne menej uhlíka a dusíka [6].

Tab. 1 Percentuálne zastúpenie (v hmotnostných percentách) jednotlivých prvkov a relatívny obsah funkčných skupín v humínových a fulvinových kyselinách [18]

Prvky (hm. %)	HK	FK	Funkčné skupiny (meq/g)	HK	FK
C	56,2	45,7	-COOH	3,6	8,2
O	35,5	44,8	fenol. -OH	3,9	3,0
H	4,7	5,4	alkohol. -OH	2,6	6,1
N	3,2	2,1	-C=O*	2,9	2,7
S	0,8	1,9	-OCH₃	0,6	0,8

* Zahrňuje chinónové aj ketónové C=O skupiny.

Karboxyly, hydroxyly a karbonyly sú hlavné funkčné skupiny obsahujúce kyslík v humínových látkach. V Tab. 1 sú zobrazené analytické dáta zhromaždené Schnitzerom [18] pre tieto skupiny

v modelových humínových a fulvinových kyselinách. Celková acidita (súčet fenolických –OH skupín a –COOH skupín) a najmä obsah –COOH skupín je významne vyšší u modelových FK ako u modelových humínových kyselín. Na jednotku hmotnosti obsahujú obe látky približne rovnaké koncentrácie –C=O, –OCH₃ a fenolických –OH skupín, no koncentrácie alkoholových –OH skupín sú u FK vyššie [6]. Dôležitým rozdielom medzi HK a FK v obsahu funkčných skupín je fakt, že takmer všetok kyslík vo fulvokyselinách je obsiahnutý v skupinách –COOH, –OH a –C=O, no v humínových kyselinách tvorí väčšia časť kyslíka štruktúrnú zložku, napríklad esterové a éterové väzby. Kým v HK je možné nájsť prevažne chinónové –C=O skupiny, u FK je vyšší obsah ketónových –C=O skupín [19].

2.2.3 VYUŽITIE HUMÍNOVÝCH LÁTOK

V súčasnosti majú humínové látky veľmi široké a stále sa rozširujúce využitie, ktoré môže byť rozdelené do štyroch hlavných oblastí: poľnohospodárske, environmentálne, priemyselné a biomedicínske [11].

V poľnohospodárstve hrajú humínové látky dôležitú rolu najmä z dôvodu ich veľkého dopadu na kvalitu, produktivitu a úrodnosť pôdy. Tiež veľmi priaznivo upravujú fyzikálne vlastnosti pôdy a ovplyvňujú jej vlhkosť [11]. HL zvyšujú dostupnosť živín, ktoré sa už nachádzajú v pôde a prirodzene prevzdušňujú pôdu zvnútra. Vedci tiež objavili ich schopnosť tvoriť komplexy s kovmi a rádionuklidmi alebo možnosť ich interakcie s voľnými radikálmi [13]. V posledných rokoch sú humínové látky využívané ako aditíva v hnojivách [20].

HL sú povrchovo aktívne, v jednej molekule je možné nájsť hydrofóbne aj hydrofilné časti a nad kritickou micelárnou koncentráciou sú schopné tvoriť micely. To im dáva schopnosť solubilizácie a transportu hydrofóbnych chemikálií v prírode. Táto schopnosť môže ovplyvniť nielen mobilitu naviazanej molekuly, ale aj rýchlosť chemickej degradácie, fotolýzu, volatilizáciu (premenu polutantov do plynnej formy) alebo biologický príjem. Humínové látky môžu tiež viazať kovové ióny z rozpustených hornín a minerálov alebo môžu viazať rôzne polutanty a biocídy používané pre poľnohospodárske účely, a tým hrajú podstatnú úlohu v ich geologickom cykle alebo pri ich transporte [13].

Priemyselné aplikácie humínových látok sú taktiež veľmi rozšírené. Využívajú sa napríklad ako aditíva v stavebníctve pre ovplyvnenie rýchlosti tuhnutia betónu, v drevárskom priemysle je možné využiť humínové látky ako súčasť farieb rozpustných vo vode používaných na farbenie dreveného nábytku. Tiež môžu byť zúročené v keramickom či papiernickom priemysle alebo pri výrobe plastov [20].

Komerčne produkované humínové látky nachádzajú svoje využitie aj vo veterinárnej alebo humánnej medicíne [20]. Bolo napríklad zistené, že pri preventívnom podávaní humínových kyselín potkanom významne klesá šírenie žalúdočného poškodenia spôsobené etanolom [21]. Iní autori reportovali schopnosť HK interagovať s baktériou *Micrococcus luteus*. Humínová látka v tomto prípade chránila organizmus pred zničením jeho bunkovej steny enzýmom lyzozýmom [22]. V poslednej dekáde bol zvýšený záujem o využitie humínových látok v medicíne a biológii. Boli napríklad študované možnosti využitia komplexov pôdných humínových extraktov s aminokyselinami a analógmi vitamínu B ako základov kozmetických a farmaceutických produktov. Hlavným dôvodom tohto zvýšeného záujmu o humínové látky je ich antivírusová, protizápalová alebo estrogénna aktivita [20; 23].

2.3 INTERAKCIE A VÄZBOVÉ MOŽNOSTI HUMÍNOVÝCH LÁTOK

Ako už bolo spomenuté v predchádzajúcich kapitolách, humínové látky disponujú veľkým množstvom rôznych funkčných skupín, čo im umožňuje využívať viaceré väzobné mechanizmy. Taktiež sú HL privilegovanými prírodnými látkami pre viazanie organických polutantov (OP) vďaka ich fyzikálnym, chemickým, biochemickým a fotochemickým vlastnostiam. Do rôznej miery ovplyvňujú biodegradáciu a detoxifikáciu organických polutantov, ich biologickú dostupnosť, fytoxicitu, či ich hromadenie alebo transport. Pravdepodobne najdôležitejším typom interakcie humínových látok s OP je adsorpcia, ktorá môže byť sprostredkovaná napríklad pomocou iónových, kovalentných, koordinačných alebo vodíkových väzieb, dipól-dipól a Van der Waalsových síl, či pomocou hydrofóbných interakcií [24].

Okrem uvedenia konkrétnych príkladov pozorovaných interakcií humínových látok s rôznymi xenobiotikami sú v tejto kapitole načrtnuté aj všeobecné mechanizmy jednotlivých interakcií, ktorých pochopenie je kľúčové pre využitie celého potenciálu humínových látok, napríklad ako prostriedkov pre odstraňovanie polutantov zo životného prostredia.

2.3.1 KOVALENTNÁ VÄZBA

Mechanizmus tejto väzby je založený na zdieľaní elektrónov medzi atómami pre zaplnenie ich valenčnej vrstvy. Väčšinou ide o väzbu medzi dvomi nekovmi alebo atómami s podobnými hodnotami elektronegativity, ktorá môže byť podľa počtu zdieľaných elektrónov buď jednoduchá alebo násobná, teda dvojité alebo trojitá [25].

Je známe, že medzi humínovými látkami a pesticídmi, alebo ich medziproduktami a produktami ich degradácie, ako sú napríklad anilíny a fenoly, môže byť vytvorená stabilná a často ireverzibilná kovalentná väzba, pričom tento proces je katalyzovaný chemickými, fotochemickými alebo enzymatickými katalyzátormi. Mnoho herbicídov alebo insekticídov v pôde degraduje za uvoľnenia aromatických amínov, ako sú napríklad chloroanilíny [26]. Tieto zvyšky môžu byť potom viazané pôdnou organickou hmotou pomocou karbonylových, chinónových a karboxylových skupín humínových látok za tvorby hydrolyzovateľných alebo nehydrolyzovateľných zlúčenín [27; 28; 29].

Najpravdepodobnejšie sa k humínovým látkam budú kovalentne viazať polutanty, ktoré majú podobné chemické vlastnosti a zloženie ako samotné HL. Keďže molekuly HL sú polymérne a skladajú sa z aromatického jadra obsahujúceho mono-, di- alebo polyfenolické podjednotky, kovalentne sa na ne viažu najmä pesticídy, ktoré sa štruktúrne podobajú na fenolické zlúčeniny. Takto viazané pozostatky sú potom extrémne stabilné a rezistentné voči kyslej alebo zásaditej hydrolýze, pôsobeniu tepla alebo voči mikrobiálnej degradácii [30].

Možnosť vzniku kovalentnej väzby medzi humínovou látkou a kontaminantom je z praktického hľadiska predpokladom k imobilizácii kontaminantu. Tiež je táto väzba dôležitá z hľadiska uzdravenia pôd kontaminovaných napríklad zmesou polyaromatických uhlíkov, pretože ide o stabilnú väzbu na polymérnu štruktúru a bolo dokázané, že je nemutagénna a taktiež niektoré mutagény v jej prítomnosti znižujú svoju mutagenitu [31].

2.3.2 KOORDINAČNÁ VÄZBA

Koordinačná, koordinačne kovalentná, datívna alebo donor-akceptorová väzba je typ kovalentnej väzby, kedy sú zdieľané valenčné elektróny medzi kovom a ligandom, ale ligand je donormom oboch zdieľaných elektrónov. Koordinačná zlúčenina môže byť tiež definovaná ako zlúčenina, ktorej centrálny atóm má vyššie koordinačné číslo ako je jeho oxidačné číslo [32].

Keďže humínové látky obsahujú aj elektrón-deficitné skupiny (napríklad chinóny), aj skupiny bohaté na elektróny (napríklad difenoly), je možná koordinačná väzba medzi humínovými látkami a polutantmi obsahujúcimi buď elektrón-donorové alebo elektrón-akceptorové skupiny [26]. Táto väzba predstavuje najdôležitejší typ väzobnej interakcie medzi HL a iónmi kovov a je predpokladom pre ich imobilizáciu. Tvorba koordinačných väzieb je dôležitá napríklad pri odstraňovaní toxických kovov nachádzajúcich sa v podzemných alebo odpadných vodách [31].

Potenciál k vzniku koordinačných väzieb je u humínových látok daný najmä vysokým zastúpením karboxylových a fenolických skupín. Zastúpenie týchto skupín je potom ovplyvnené hodnotou pH a mierou ich disociácie. V slabo kyslej oblasti sa na vzniku donor-akceptorových väzieb podieľajú hlavne karboxylové skupiny, pričom pri vzraste pH nad hodnotu 7 sa významne pridávajú aj fenolické skupiny, po disociácii protónu z fenolického hydroxyly. Stabilita vznikajúcich komplexov so zvyšujúcim sa pH všeobecne stúpa [31].

2.3.3 NEKOVALENTNÉ INTERAKCIE

Najsilnejšou väzbou medzi atómami alebo molekulami je síce kovalentná väzba, no so zväčšujúcou sa veľkosťou molekúl stúpa aj dôležitosť nekovalentných interakcií [33]. Nekovalentné interakcie môžu byť prítomné v rámci jednej molekuly, ale aj medzi jednotlivými molekulami, pričom táto kapitola je zameraná hlavne na medzimolekulové interakcie. Vo väčšine prípadov sú jednotlivé interakcie spomenuté v tejto kapitole slabé, často však medzi molekulami pôsobí niekoľko nekovalentných mechanizmov naraz a ich sila zásadne rastie.

Nekovalentné interakcie sú okrem iného zodpovedné za štruktúru, stabilitu a funkčnú schopnosť makromolekúl. Intenzita medzimolekulových interakcií je nepriamo úmerná teplote, takže s rastúcou teplotou klesá. Makroskopicky sa to môže prejaviť aj zmenou skupenstva látky. Napríklad pri poklese teploty plynnej látky klesá aj priemerná kinetická energia jej molekúl a pri dostatočne nízkej teplote už jednotlivé molekuly nemajú dostatok energie na prelomenie príťažlivej sily susediacich molekúl. V tomto bode sa molekuly zoskupujú a tvoria malé kvapky kvapaliny – tento jav je známy ako kondenzácia [34].

2.3.3.1 VAN DER WAALSOVE SILY A COULOMBICKÉ INTERAKCIE

Pod pojmom Van der Waalsove sily sa skrývajú interakcie dipól-dipól, dipól-indukovaný dipól alebo disperzné sily. Ióny a dipóly sú potom navzájom priťahované pomocou elektrostatických síl nazývajúcich sa ión-dipól interakcie, ktoré nepatria medzi Van der Waalsove sily. K interakciám dipól-dipól je možné zaradiť aj vodíkové mostíky, ale ide o veľmi silný typ tejto interakcie a podieľajú sa na nej iba niektoré prvky, a preto sú tieto väzby klasifikované v osobitnej kategórii [34]. Všetky tieto sily majú však elektrostatickú povahu a ich princípom sú coulombické príťažlivé sily medzi negatívnymi a pozitívnymi nábojmi. Rozlišujeme úplný elektrický náboj vo forme iónov a čiastočný náboj vo forme dipólov [35].

Interakcie ión-ión

Opačne nabité ióny sa vďaka elektrostatickým interakciám veľmi silno priťahujú. Iónový pár vzniká, keď sú anión a kation v dostatočnej blízkosti na to, aby energia spojená s elektrostatickou príťažlivosťou bola väčšia ako dostupná tepelná energia, ktorá ich rozdeľuje. To znamená, že ióny zostávajú združené dlhšie ako je čas potrebný na oddelenie neinteragujúcich atómov pomocou Brownovho pohybu [36].

Iónové páry je potrebné odlišovať od iónových väzieb v kryštálových mriežkach iónových zlúčenín. Tieto páry sú tvorené najmä v roztokoch a môžu byť nazývané aj solné mostíky. Jedným z príkladov

takejto interakcie sú bočné reťazce aminokyselín v proteínoch, kde sa tvoria páry typu $-\text{COO}^- \cdots ^+\text{NH}_3$. Dôležitosť tejto interakcie sa prejavuje hlavne pri spájaní jednotlivých proteínových podjednotiek v ich kvartérnej štruktúre [35].

Čo sa týka humínových látok, adsorpcia pomocou iónových párov alebo kationovej výmeny môže byť uskutočnená u tých pesticídov, ktoré sú v roztoku v kationovej forme alebo dokážu prijať protón a tým pádom sa dostať do kationovej formy. U HL zahrňuje ionizované, alebo ľahko ionizovateľné karboxylové a fenolické hydroxylové skupiny. Nie všetky negatívne nabité skupiny humínových látok sú však pozíčne dostupné pre viazanie veľkých organických kationov kvôli stérickému bráneniu [26]. Vznik elektrostatickej ión-ión interakcie je možné u HL predpokladať napríklad v prípade alkalických kovov alebo amoniaku [31].

Interakcie ión-dipól

Pokiaľ je medzi atómami v molekule veľký rozdiel elektronegativít a elektróny sú nerovnomerne rozložené, vznikajú dipóly. Pomocou ión-dipól interakcií sú navzájom priťahované ióny (katióny alebo anióny) a polárne molekuly. Keď je nabitá látka rozpustená v rozpúšťadle s dipólovým momentom, elektrické pole spojené s nábojom pôsobí na dipól silou, ktorá orientuje opačne nabitý koniec dipólu k náboju [36]. Sila tejto interakcie je závislá na náboji a veľkosti iónu a tiež na sile dipólového momentu a veľkosti molekuly. Náboje na katiónoch sú zvyčajne koncentrovanejšie, pretože katióny sú vo všeobecnosti menšie ako anióny. Preto s dipólmi silnejšie interagujú katióny ako anióny s rovnakou veľkosťou náboja [34].

Interakcie dipól-dipól

Podobne ako pri interakciách medzi iónom a dipólom, interakcie medzi dvomi dipólmi môžu byť príťažlivé alebo odpudivé. Vo všeobecnosti sú slabšie ako predchádzajúce interakcie a ich sila závisí od orientácie a vzdialenosti dipólov [36]. Taktiež čím väčší je dipólový moment molekuly, tým silnejšie sú tieto elektrostatické interakcie. V pevnej fáze sa molekuly s permanentným dipólovým momentom usporadúvajú tak, aby boli v tesnej blízkosti vždy opačne nabité konce dipólov pre ich maximálnu príťažlivú silu. V kvapalinách nie sú polárne molekuly držané tak pevne ako v pevných látkach, ale majú tendenciu usporiadať sa spôsobom, ktorý v priemere maximalizuje ich príťažlivú silu [34]. Štruktúry s príťažlivými interakciami prevažujú, pretože majú nižšiu energiu [33].

Tieto interakcie sú napríklad zodpovedné za nižšiu prchavosť polárnych látok oproti analogickým nepolárnym látkam. Stabilizujú tiež terciárnu štruktúru proteínov a prispievajú k rozpustnosti polárnych zlúčenín v polárnych rozpúšťadlách [35].

Interakcie ión-indukovaný dipól a dipól-indukovaný dipól

Ak je ión alebo polárna molekula umiestnená do tesnej blízkosti atómu (alebo nepolárnej molekuly), elektrónové rozloženie v atóme (alebo nepolárnej molekule) je narušené pôsobiacou silou iónu/polárnej molekuly. Vzniká indukovaný dipól, pretože oproti molekule s permanentným dipólovým momentom je v tomto prípade separácia pozitívneho a negatívneho náboja indukovaná vloženým elektrickým poľom, teda blízkosťou iónu alebo polárnej molekuly. Rozlišujeme interakcie ión-indukovaný dipól a dipól-indukovaný dipól podľa typu polarizujúcej molekuly [34].

Pravdepodobnosť, že dipól bude v molekule indukovaný nezávisí len od náboja iónu alebo sily dipólu, ale tiež od polarizovateľnosti danej molekuly. Je to veličina, ktorá uvádza, do akej miery je molekula schopná reagovať na vložené elektrické pole, a teda s akou ľahkosťou môže byť upravená elektrónová distribúcia v molekule [34].

Disperzné sily (Londonove sily)

Vznik disperzných síl je dôsledkom nerovnomernej distribúcie elektrónov v molekule v danom časovom okamihu. Tieto sily pôsobia na veľmi krátke vzdialenosti a vznikajú ako dôsledok indukovanej polarizácie elektrónových oblakov molekúl. Jedna strana molekuly môže náhodne získať malý prebytok elektrónov oproti strane druhej, čo molekule udeľuje okamžitý dipólový moment. Tento okamžitý dipól následne indukuje v susediacej molekule dočasný opačný okamžitý dipól, čoho výsledkom je potom slabá elektrostatická príťažlivosť molekúl [33].

Disperzné sily, ktoré sú tiež nazývané Londonove sily, sa zvyčajne zvyšujú s molekulovou hmotnosťou, pretože molekuly s väčšou molárnou hmotnosťou majú zvyčajne viac elektrónov a disperzné sily silnejú s vyšším počtom elektrónov. Taktiež väčšia molárna hmotnosť často znamená väčší atóm, ktorého elektróny sú voľnejšie distribuované, pretože vonkajšie elektróny sú slabšie priťahované jadrom [34].

Okamžité dipóly existujú síce iba veľmi krátko a neustále sa menia, ale kumulatívny efekt veľkého množstva týchto interakcií vytvára dostatočne silné príťažlivé sily na to, aby udržali molekuly v tuhom alebo v kvapalnom stave. Až po dodaní primerane veľkého množstva tepla sú tieto sily prekonané a tuhá látka sa topí alebo kvapalina vrie [33].

Jediné príťažlivé medzimolekulové sily v nepolárnych látkach sú práve disperzné sily. Sú napríklad zodpovedné za zvyšovanie teploty varu so stúpajúcim počtom elektrónov v molekule. Je ale potrebné si uvedomiť, že Londonove sily sú prítomné vo všetkých molekulách, bez ohľadu na ich polaritu [34].

Predpokladá sa, že všeobecne Van der Waalove sily môžu byť dôležité špeciálne u adsorpcie neiónových a nepolárnych pesticídov na humínové látky. Keďže sú tieto sily aditívne, ich príspevok sa zvyšuje s veľkosťou organického polutantu a s jeho schopnosťou prispôbiť sa povrchu molekúl humínových látok [24; 26].

2.3.3.2 VODÍKOVÉ MOSTÍKY

Vodíková väzba, alebo vodíkový mostík, je špeciálny typ dipól-dipól interakcie medzi vodíkovým atómom viazaným polárnou väzbou, ako napríklad N–H, O–H, F–H a voľným elektrónovým párom vysoko elektronegatívneho atómu kyslíka, dusíka alebo fluóru [34]. Zdieľaný elektrónový pár polárnej väzby je silno priťahovaný elektronegatívnym atómom, čo spôsobuje, že vodík má okolo seba len minimálnu elektrónovú hustotu a teda je nositeľom parciálneho pozitívneho náboja. Vďaka tomu je schopný vytvoriť slabú elektrostatickú väzbu s voľným elektrónovým párom elektronegatívneho atómu ďalšej molekuly [35].

Vodíkové väzby zastávajú veľmi dôležitú úlohu v mnohých biologických systémoch. Napríklad vodíkové mostíky medzi hlavnými reťazcami aminokyselín sú zodpovedné za sekundárnu štruktúru bielkovín a podľa ich usporiadania tvoria α -helix alebo β -skladaný list. Taktiež dvojité špirála DNA je stabilizovaná pomocou vodíkových väzieb s dvomi väzbami medzi každým adenínom a tymínom a s tromi väzbami medzi guanínom a cytozínom. Tieto väzby sú tiež podstatou fungovania transkripcie a translácie, či replikácie genetického kódu [37]. Bolo dokázané, že napriek tomu, že ide o slabé interakcie, práve vodíkové väzby sú najdôležitejšími atómovými interakciami, ktoré určujú trojrozmernú štruktúru biologických makromolekúl [38]. Vodíkové väzby sú tiež zodpovedné za zaujímavé vlastnosti vody, akými sú napríklad jej kvapalné skupenstvo pri izbovej teplote a pomerne vysoký bod varu, alebo vyššia hustota kvapalnej vody oproti jej pevnej forme – ľadu.

Prítomnosť veľkého množstva skupín obsahujúcich kyslík alebo hydroxyl u humínových látok poukazuje na vysokú pravdepodobnosť tvorby vodíkových mostíkov s kontaminantmi, ktoré

obsahujú komplementárne skupiny, hoci je očakávaná veľká konkurencia tvorby vodíkových väzieb s molekulami vody [26]. Je možné predpokladať, že sa na vodíkovej väzbe s xenobiotikami môžu podieľať napríklad amidové, laktamové alebo nitrilové skupiny humínových látok. Zastúpenie vodíkových mostíkov na väzobných interakciách HL už bolo preukázané napríklad pre iminoskupiny v molekulách herbicídov [31].

2.3.3.3 π EFEKTY

Vo väčšine nekovalentných interakcií, s výnimkou hydrofóbneho efektu, ktorý je rozobraný v nasledujúcej kapitole, hrajú dominantnú úlohu elektrostatické faktory. Všeobecne sú oblasti s negatívnym nábojom bez ohľadu na jeho pôvod priťahované k oblastiam s kladným nábojom. Jednou z negatívne nabitých oblastí, ktorá sa vyskytuje u veľkého počtu molekúl, sú π systémy, či už v aromatických štruktúrach alebo u jednoduchých alkénov. Interakcie zahrňujúce tieto systémy môžu byť prekvapivo silné, ale naopak aj veľmi slabé [36]. Táto kapitola podrobnejšie rozoberá najbežnejšie formy π interakcií.

Práve π efekty patria k najčastejšie skúmanému mechanizmu interakcie medzi humínovými látkami a organickými polutantmi. Príklady jednotlivých výskumov zaoberajúcich sa touto interakciou je možné nájsť v kapitole 3.1.

Katión- π interakcie

V závislosti na kontexte môže byť sila katión- π interakcie prirovnaná napríklad k sile soľných mostíkov alebo vodíkových väzieb. Je to interakcia medzi katiónom a čelnou stranou jednoduchého π systému, ako napríklad benzénu alebo etylénu. Ako už bolo načrtnuté pri jednoduchých ión-dipól interakciách, sila tejto interakcie je nepriamo úmerná veľkosti katiónu, a teda s narastajúcou veľkosťou katiónu klesá, pretože jeho náboj je čím ďalej tým menej koncentrovaný [36].

Oproti ión-dipól interakciám, benzén alebo etylén nemajú žiadny dipólový moment, ale majú veľký permanentný kvadrupólový moment. Ten je možné zjednodušene vysvetliť ako dva dipóly usporiadané tak, že celkový dipólový moment molekuly je nulový. Neznamená to však, že kvadrupól by nemohol elektrostaticky viazať ión rovnako silno ako dipól a práve týmto mechanizmom môžu byť vysvetľované katión- π interakcie [36].

Katión- π interakcie sú najsilnejšie v plynnej fáze, v polárnych rozpúšťadlách sú mierne oslabené a najslabšie sú vo vodných roztokoch. Sila interakcie však v tomto poradí neklesá tak výrazne, ako napríklad u iónových párov alebo vodíkových mostíkov. Ďalším faktorom, ktorý ovplyvňuje silu týchto interakcií, sú substituenty na aromatickom jadre. Benzén tvorí silnejšie katión- π interakcie ako fenol, čo môže byť prekvapujúce, keďže fenol je bohatší na elektróny vďaka elektrón-donorovej -OH skupine. Je to vysvetľované faktom, že katión- π interakcie sú viac ovplyvnené indukčným efektom substituentu ako dodávaním elektrónov do π systému [36].

Interakcie π systémov s polárnymi molekulami

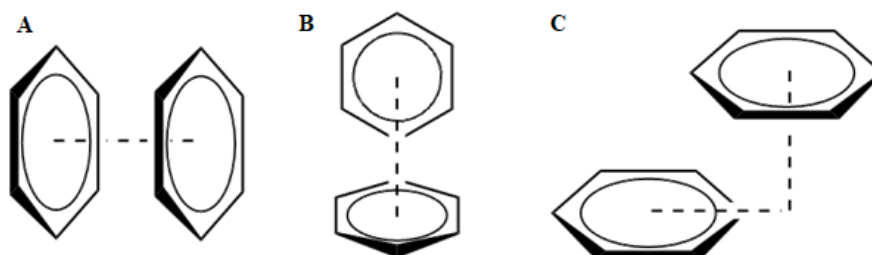
Hoci je benzén nepolárnym rozpúšťadlom, pretože nemá žiadny dipólový moment, disponuje kvadrupólovým momentom, čo mu umožňuje podstupovať podobné interakcie ako práve polárne molekuly. Interakcie, pri ktorých s kvadrupólovým momentom π systému interagujú polárne molekuly, ako napríklad voda alebo amoniak, sa najčastejšie nazývajú „polar- π “ interakcie. Akýkoľvek donor vodíkovej väzby, napríklad amid alebo alkohol, podstúpi preferovanú elektrostatickú interakciu s čelnou stranou benzénového jadra vďaka veľkému dipólu väzby spojenej s týmto donorom. Tieto interakcie sú slabšie ako katión- π interakcie a sú pozorované napríklad

v proteínových štruktúrach a tiež sú dôležitými prispievateľmi k usporiadaniu štruktúr v pevnom stave [36].

Π - π interakcie

π - π interakcie, tiež nazývané aj π *stacking*, sú nekovalentné interakcie elektrostatickej povahy medzi π -orbitálmi dvoch aromatických kruhov. Pojem „stacking“ môže byť v tomto prípade mierne zavádzajúci, pretože implikuje usporiadanie aromatických kruhov v sendvičovej konfigurácii (Obr. 4A), teda skladanie dvoch π systémov na seba, pričom v tejto konfigurácii za normálnych okolností prevládajú odpudivé elektrostatické sily kvôli blízkosti dvoch negatívnych elektrostatických potenciálov benzénu (výnimkou je napríklad skladanie benzénu a hexafluorobenzénu, ktorý má vďaka vysokej elektronegativite fluóru obrátený kvadrupólový moment). Jednou z preferovaných konfigurácií π - π interakcie potom môže byť usporiadanie π systémov do tvaru T (Obr. 4B). Táto geometria umožňuje umiestnenie oblasti s negatívnym elektrostatickým potenciálom (čelná strana benzénu) do kontaktu s oblasťou kladného potenciálu (hrana benzénu) [36].

Druhou stabilnou konfiguráciou tejto interakcie je rovnobežná posunutá konfigurácia, ktorú je možné vidieť na Obr. 4C. V tomto prípade spolu tiež interagujú oblasti s opačným elektrostatickým potenciálom. Táto konfigurácia naberá na dôležitosti najmä u väčších arénov, ako sú napríklad naftalén alebo antracén [36].



Obr. 4 Geometrické konfigurácie π - π interakcií. **A)** sendvičová konfigurácia; **B)** T-tvar; **C)** rovnobežná posunutá konfigurácia [39]

Bolo zistené, že mechanizmus tejto interakcie môže byť uplatnený v rôznych sférach, od materiálových vied až po molekulárnu biológiu. To zahŕňa napríklad sekvenovanie nukleových kyselín, skladanie proteínov, biosenzory, usporiadanie molekúl v kryštálových štruktúrach alebo kontrolované uvoľňovanie liečiv [40].

2.3.3.4 HYDROFÓBNY EFEKT

Všetky doposiaľ diskutované nekovalentné interakcie mali pôvod v elektrostatickej príťažlivosti. Hydrofóbný efekt sa v tomto smere od ostatných interakcií odlišuje. Je hnacou silou zgrupovania nepolárnych látok dohromady vo vodnom prostredí, ktoré, ako už bolo spomenuté v predchádzajúcich kapitolách, okrem disperzných síl nemajú medzi sebou žiadne príťažlivé interakcie [36]. Toto zoskupovanie nepolárnych látok minimalizuje energeticky nevýhodné interakcie medzi vodou a nepolárnymi skupinami [41].

Napriek tomu, že vodíky nepolárnych skupín, ako napríklad metylénové skupiny uhlíkovodíkov, netvoria vodíkové mostíky, ovplyvňujú štruktúru vody, ktorá ich obklopuje. Každá nepolárna molekula je vo vodnom prostredí obklopená solvatačným obalom a molekuly vody prilahlé k hydrofóbnym skupinám majú obmedzený počet stupňov voľnosti, alebo možných orientácií, ktoré by im umožňovali tvorbu maximálneho množstva energeticky výhodných vodíkových väzieb. Maximálna tvorba vodíkových mostíkov môže byť uskutočnená len usporiadaním prilahlých

molekúl vody, čo vedie k zníženiu entropie [41]. Keď však viaceré nepolárne molekuly vytvoria väčší zhluk, je potrebné menšie množstvo solvatačných obalov a viac molekúl rozpúšťadla sa môže voľne pohybovať. Vo všeobecnosti to znamená pokles organizovanosti systému a tým pádom zvýšenie entropie. Práve tento nárast entropie je dostačujúci na to, aby spustil spontánnu asociáciu nepolárnych molekúl v polárnom rozpúšťadle [42].

Hydrofóbny efekt je najčastejšie predpokladanou interakciou humínových látok s hydrofóbnymi a alifatickými kontaminantmi. Je pomocou neho napríklad vysvetľovaná skutočnosť, že insekticíd paratión stráca za prítomnosti humínových látok časť svojej toxicity. Ďalej je pravdepodobne zodpovedný za imobilizáciu atrazínu a hydroxyatrazínu. Hydrofóbne interakcie sú tiež predpokladané v prípade významnej skupiny s-triazínových herbicídov [31]. U humínových látok sa na týchto interakciách pravdepodobne najčastejšie podieľajú alifatické bočné reťazce, zvyšky lipidov alebo časti HL vzniknuté z lignínu, ktoré majú vysoký obsah uhlíka a malý obsah polárnych skupín [26].

2.4 VIBRAČNÁ SPEKTROSKOPIA

Vibračná spektroskopia môže byť definovaná ako nedeštruktívna metóda určená pre identifikáciu molekúl a ich štruktúr, ktorá je založená na meraní vibračnej energie v zlúčenine. Opiera sa o fakt, že v každej molekule atómy a väzby vibrujú v rámci určitých, prísne definovaných frekvencií, ktoré sú charakteristické pre danú molekulu. Tieto špecifické vibračné energie je potom možné považovať za „odtlačok prsta“ molekuly a porovnaním s knižnicou spektier známych zlúčenín je možné určiť napríklad neznámu štruktúru sledovanej látky. Frekvencie týchto molekulových vibrácií sú závislé od hmotností atómov, ich geometrického usporiadania a sily ich chemických väzieb. Spektrálna interpretácia teda poskytuje informácie o molekulovej štruktúre, dynamike a okolitom prostredí molekuly [43; 44].

Pod vibračnou spektroskopiou je ukrytých niekoľko techník, z ktorých najdôležitejšie predstavujú infračervená a Ramanova spektroskopia. V infračervenej spektroskopii sú aktívne iba tie molekulové vibrácie, ktoré produkujú zmenu dipólového momentu molekuly, zatiaľ čo v Ramanovej spektroskopii sú aktívne molekulové vibrácie produkujúce zmenu polarizovateľnosti molekuly [43; 44].

2.4.1 INFRAČERVENÁ SPEKTROSKOPIA

Infračervená spektroskopia, alebo tiež často využívaná infračervená spektroskopia s Fourierovou transformáciou, FTIR (z angl. *Fourier Transform Infrared spectroscopy*), je metóda zaoberajúca sa meraním a vyhodnocovaním spektier látok, ktoré vznikajú po interakcii infračerveného žiarenia so študovanou hmotou. Jej výhodou oproti mnohým spektroskopickým metódam je jej možnosť študovať rôzne typy vzoriek v rôznych skupenstvách, či už ide o roztoky, prášky, pasty, plyny, laky, alebo rôzne povrchy – je potrebné len vybrať správnu techniku. Môže byť využitá pre dôkaz nových zlúčenín, identifikáciu molekúl, výskum chemických rovnováh alebo interakcií látok a okrem iného aj pre výskum kinetiky chemických reakcií [45].

Pod pojmom infračervené žiarenie sa rozumie elektromagnetické žiarenie v rozsahu vlnočtov 12 500 až 10 cm⁻¹, teda v rozsahu vlnových dĺžok približne od 800 nm do 1 000 μm [45]. Vlnočet je najpoužívanejšou jednotkou v infračervenej spektroskopii a jeho vzťah s vlnovou dĺžkou vyjadruje rovnica

$$\tilde{\nu} [\text{cm}^{-1}] = \frac{10\,000}{\lambda [\mu\text{m}]} \quad (1)$$

Infračervené žiarenie je možné rozdeliť na žiarenie v blízkej oblasti nadväzujúce na oblasť viditeľného žiarenia ($12\,500 - 4\,000\text{ cm}^{-1}$), ďalej na žiarenie v strednej oblasti ($4\,000 - 400\text{ cm}^{-1}$), ktorá má najväčší význam pre identifikáciu a určovanie chemickej štruktúry a na žiarenie v ďalekej oblasti ($400 - 10\text{ cm}^{-1}$) [45; 46].

Energia fotónov infračerveného žiarenia nie je postačujúca pre excitáciu elektrónov v molekulových orbitáloch, ale je dostatočná pre zmenu vibračného alebo rotačného stavu molekuly. Zmena vibračného stavu môže predstavovať zväčšenie amplitúdy vibrácie molekuly a zmena rotačného stavu potom zrýchlenie rotácie molekuly. Pri prechode IČ žiarenia vzorkou sa jeho časť s určitou frekvenciou absorbuje a iná časť látkou prejde bez interakcie. Práve absorbované žiarenie spôsobí zmenu vibračných, resp. vibračno-rotačných stavov molekuly. Pokiaľ je táto zmena spojená aj so zmenou dipólového momentu molekuly, prejaví sa v IČ spektre zodpovedajúcim absorpčným pásom [45; 46].

2.4.1.1 TYPY VIBRÁCIÍ

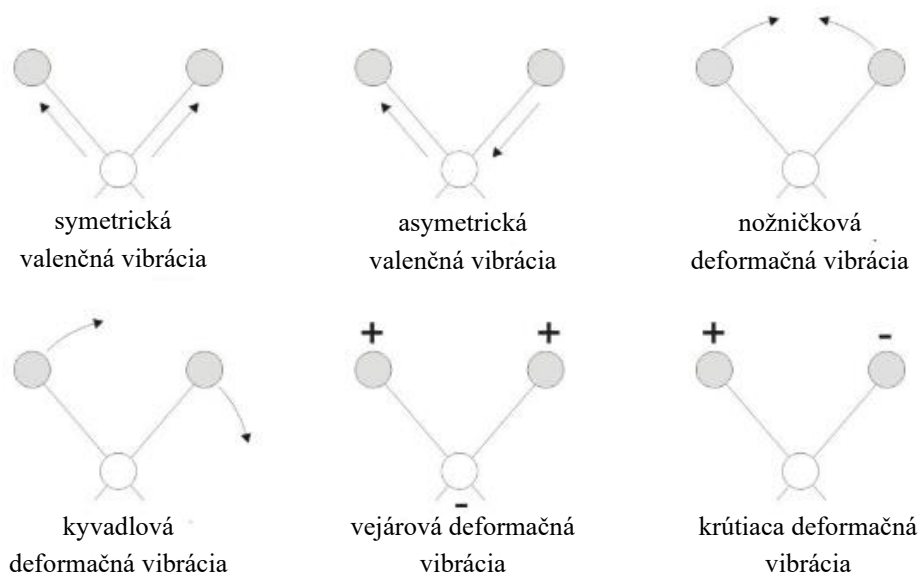
Energia vibrujúcej molekuly nemôže nadobúdať akékoľvek hodnoty, ale je kvantovaná, teda je možné dosiahnuť len určité energetické hladiny. Túto energiu je možné vypočítať zo vzťahu

$$E_{vib} = \left(v + \frac{1}{2} \right) h\nu, \quad (2)$$

kde h je Planckova konštanta, ν je frekvencia vibrujúcej molekuly vyjadrená v hertzoch a v je vibračné kvantové číslo, ktoré môže nadobúdať iba celočíselné hodnoty 0, 1, 2, 3,... Pri meraní študovaných látok pomocou IČ spektroskopie ide teda o určovanie vlnočtov, pri ktorých dochádza k zmene vibračného stavu, napríklad z vibračnej hladiny $v = 0$ na hladinu $v = 1$. Práve vibračné pásy vznikajúce týmto prechodom sú najsilnejšie a nazývajú sa fundamentálne, pretože veľká väčšina molekúl sa nachádza pri izbovej teplote v základnom vibračnom stave $v = 0$. Tiež sú možné aj prechody z excitovaných stavov $v > 0$, ktoré sa označujú ako „horúce“ a ich pravdepodobnosť narastá so stúpajúcou teplotou. Vibračné prechody so zmenou $\Delta v > 1$, teda napríklad pri zmene kvantového čísla $0 \rightarrow 2$ alebo $0 \rightarrow 3$, sa nazývajú overtóny alebo vyššie harmonické frekvencie. Taktiež sa môže súčasne meniť vibračné kvantové číslo niekoľkých vibračných módov (u polyatómových molekúl) a takéto prechody sa nazývajú kombinačné [45; 46].

Rovnica (2) vyjadruje výpočet energetických hladín harmonického oscilátoru, zatiaľ čo reálne molekuly presnejšie popisuje model anharmonického oscilátoru. V tomto prípade rozdiely medzi susednými energetickými hladinami nie sú konštantné, ale zmenšujú sa s rastúcim vibračným kvantovým číslom.

Vibrácie jednotlivých väzieb je možné rozdeliť podľa zmien geometrie do niekoľkých skupín. Základnými skupinami sú valenčné (angl. *stretching*, ν) vibrácie, pri ktorých sa mení dĺžka väzby, a deformačné (*bending*, δ) vibrácie, pri ktorých sa mení valenčný uhol väzieb. Valenčné vibrácie je potom možné rozdeliť na symetrické (ν_s) a asymetrické alebo antisymetrické (ν_{as}). U molekúl alebo skupín atómov s rovinou symetrie je možné rozlišovať deformačné vibrácie rovinné (*in-plane*, δ), a mimorovinné (*out-of-plane*, γ). Obr. 5 zobrazuje možné spôsoby vibrácií pre skupiny $-XY_2$, kde znamienka + a - značia pohyb nad a pod rovinu. Okrem spomenutých je možné ešte deliť rovinné vibrácie na nožničkové (*scissoring*, δ) a kyvadlové (*rocking*, ρ) a mimorovinné na vejárové (*wagging*, ω), ktoré sa u aromatických jadier môžu nazývať aj dáždňikové, a krútiace alebo torzné (*twisting*, τ). Deformačné vibrácie majú nižšiu energiu ako valenčné vibrácie, a preto je možné ich nájsť v spektrách pri nižších vlnočtoch [45]. Súvisí to s tým, že na natiahnutie väzby je potrebná väčšia energia, ako na jej ohnutie [46].



Obr. 5 Znázornenie rôznych typov vibrácií [46]

2.4.1.2 INFRAČERVENÉ SPEKTRÁ A ICH INTERPRETÁCIA

Infračervené spektrá predstavujú závislosť transmitancie T alebo absorpcie A na vlnóte absorbovaného žiarenia. Spektrum je pásové, jednotlivé pásy zodpovedajú rôznym typom vibračných prechodov a sú definované polohou, tvarom a intenzitou. Transmitancia a absorpcia sú vyjadrené nasledovne:

$$T = \frac{\phi}{\phi_0} \quad A = \log \frac{\phi_0}{\phi} = -\log T, \quad (3)$$

kde ϕ_0 a ϕ predstavujú tok žiarenia pred a za kyvetou.

Pri interpretácii IČ spektier je potrebné si uvedomiť, že nie každý pás v spektre je možné priradiť konkrétnej vibrácii. Interpretáciu komplikujú napríklad overtóny, kombinačné pásy, Fermiho rezonancia (zhoda frekvencie niektorého intenzívneho fundamentálneho prechodu s kombinačnou alebo vyššou harmonickou frekvenciou) alebo vodíkové mostíky a menej intenzívne píky nemusia byť diagnosticky významné. Infračervené spektrum je možné rozdeliť na dve základné oblasti:

- Oblasť charakteristických skupinových vibrácií ($4\,000 - 1\,500\text{ cm}^{-1}$), kde sa nachádzajú absorpčné pásy vibrácií rôznych funkčných skupín. Tab. 2 zobrazuje prehľad niektorých vlnóčov charakteristických valenčných vibrácií.
- Oblasť „odtláčku prstov“ ($1\,500 - 400\text{ cm}^{-1}$), kde sa nachádzajú najmä pásy deformačných vibrácií skupín, ktoré sú však silno ovplyvnené okolitými väzbami a celkovou štruktúrou molekuly. Pre každú jednu látku sú spektrá v tejto oblasti jedinečné a porovnaním s elektronickou knižnicou spektier je tak možné identifikovať neznámu látku.

Základný postup interpretácie by mal zahrňovať primárne preskúvanie spektra od najvyšších frekvencií a najintenzívnejších pásov. Rovnako neprítomnosť nejakého charakteristického pásu má identifikačný význam, tak ako jeho prítomnosť a okrem jednotlivých vlnóčov absorpčných pásov by mali byť sledované aj ich tvary a symetria [45; 47].

Tab. 2 Príklady vlnočtov charakteristických valenčných vibrácií niektorých skupín [47]

Skupina	Typ zlúčeniny		Vlnočet (cm ⁻¹)	
C–H	uhl'ovodíky, sp ³ hybr.	–CH ₃ / –CH ₂ –	2 865 – 2 975 / 2 840 – 2 940	
	uhl'ovodíky, sp ² hybr.	>C=CR–H	3 010 – 3 040	2 pásy
	uhl'ovodíky, sp hybr.	≡C–H	3 300 – 3 340	
	arény	Ar–H	3 010 – 3 080	niekoľko pásov
N–H	primárne amíny, amidy	RNH–H, RCONH–H	okolo 3 400	
O–H	alkoholy, fenoly	voľná O–H	3 580 – 3 670	
		s vodíkovými most.	3 450 – 3 550	
	karboxyl	R(C=O)O–H diméry	2 500 – 3 300	
C≡N	nitrily	RCN	2 200 – 2 260	
C≡C	alkíny	R–C≡C–R	2 190 – 2 260	
		R–C≡C–H	2 100 – 2 140	
C=O	aldehydy	R(C=O)H	1 720 – 1 740	
	ketóny	R(C=O)R	1 705 – 1 725	
	estery	R(CO ₂)R	1 725 – 1 750	
	karboxyl	R(CO ₂)H	1 700 – 1 725	
C=C	alkény	R ₂ C=CR ₂	1 620 – 1 680	
		R ₂ C=CH ₂	1 600 – 1 675	
–NO ₂	nitroskupiny	RNO ₂	1 320 – 1 380	1 500 – 1 560

2.4.1.3 TECHNIKY INFRAČERVENEJ SPEKTROSKOPIE

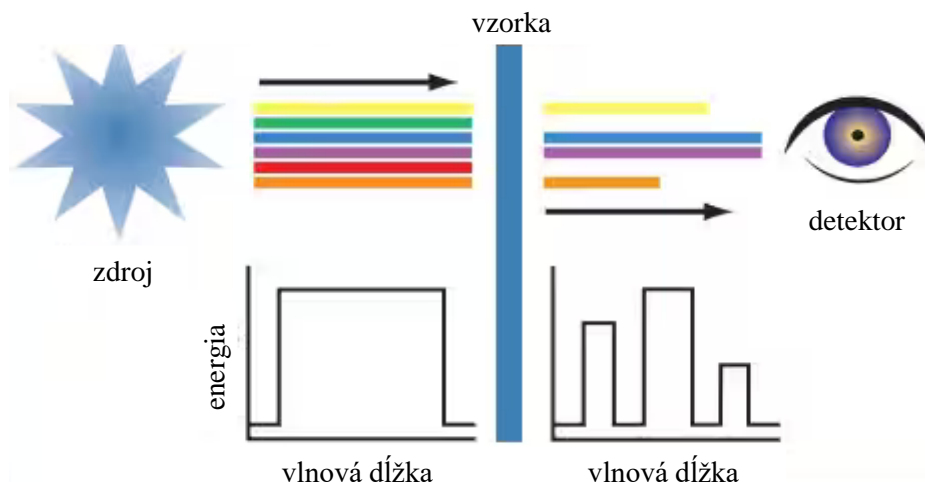
Vlastné vzorky je možné pomocou infračervenej spektroskopie skúmať niekoľkými technikami, ktorých výber závisí najmä od typu vzorky a potrebného rozlíšenia získaného spektra. Tiež je potrebné zabezpečiť, aby počas prípravy a merania vzorky nedochádzalo k jej zmenám alebo reakcii vplyvom prostredia. Tieto techniky sa rozdeľujú na transmisné a reflexné alebo odrazové metódy. Pri transmisných technikách je merané žiarenie prechádzajúce vzorkou a je možné ich s výhodou využiť pri meraní plyných a kvapalných látok, a tiež je možné pomocou nich merať aj tuhé látky, ktoré však často vyžadujú prácnu úpravu vzoriek, napríklad lisovanie KBr tabliet. Naopak reflexné metódy sa používajú v prípadoch, kedy je problematické využitie transmisných techník a ich predmetom záujmu je lúč odrazený od vzorky. Patrí medzi ne napríklad technika difúznej reflektancie (DRIFTS), technika úplného zoslabeného odrazu (ATR) alebo meranie zrkadlového odrazu.

Transmisné techniky

Transmisné metódy sú najtradičnejšími formami merania vzoriek pomocou FTIR spektroskopie. Vzorka je jednoducho umiestnená priamo do infračerveného lúča spektrometru. Ako lúč prechádza vzorkou, je meraná energia, ktorá vzorkou prešla a následne je generované spektrum. Schematické znázornenie tohto princípu je zobrazené na Obr. 6. Je však potrebné, aby boli vzorky pre tieto lúče priepustné [48].

Pri meraní plyných látok je obvykle nutné predĺžiť dráhu svetelného lúča v kyvete, a preto sa pre ich meranie často používajú kyvety s viacnásobným prechodom lúčov. Kvapalné vzorky je potom možné najjednoduchšie merať vo forme kapilárneho filmu, ktorý môže byť vytvorený napríklad nakvapkaním vzorky medzi dve platničky [45]. Je možné získať spektrá výbornej kvality napríklad pre vzorky rozpustných polymérov alebo tenkých polymérových filmov [48].

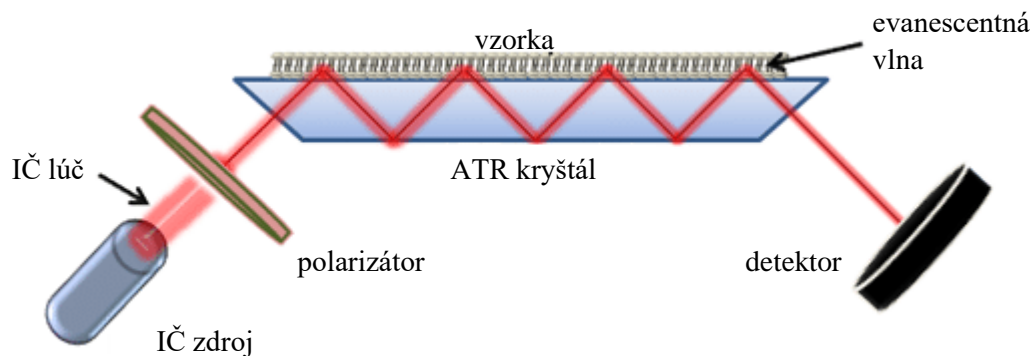
U pevných látok je však príprava častokrát zložitejšia, pretože väčšina z nich absorbuje IČ žiarenie príliš silno a nie je možné vytvoriť z nich takú tenkú vrstvu, aby prepúšťala žiarenie. Pri práškových vzorkách by potom ďalším problémom mohol byť značný rozptyl žiarenia. Najčastejšie sa preto pre pevné látky využíva technika KBr tabliet, ktoré sú zhotovené z homogenizovanej práškovej zmesi vzorky s nadbytkom vyžíhaného KBr (v pomere 1 : 200 až 1 : 300). Po dokonalom zhomogenizovaní zmesi sa v lisovacích formách za použitia vysokého tlaku vylisujú transparentné tablety. Takáto príprava vzorky je však pomerne náročná a výsledná kvalita získaného spektra môže byť ovplyvnená zrnitosťou vzorky a KBr. Taktiež môže pri vysokých tlakoch dochádzať k interakciám KBr a vzorky, čo môže mať za následok zmenu absorpčného spektra [45].



Obr. 6 Schematické znázornenie dráhy lúča pri prechode transmisnou vzorkou [48]

Metóda zoslabenia úplného odrazu (ATR)

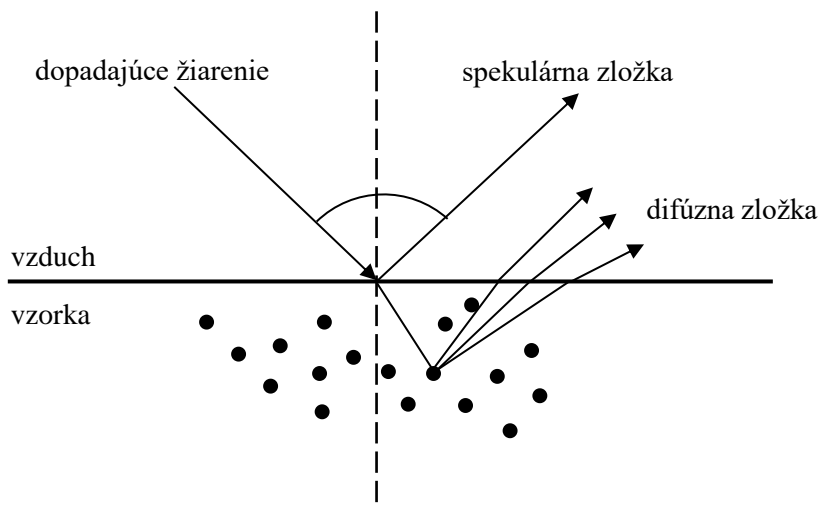
Princípom ATR (z angl. *Attenuated Total Reflection*) techniky je meranie zmien v infračervenom lúči po jeho kontakte so vzorkou. Na kryštál s vysokým indexom lomu (najčastejšie diamant, germánium alebo selenid zinočnatý) je nanosená vzorka a je medzi nimi zabezpečený dokonalý kontakt. Na tento kryštál je následne pod určitým uhlom nasmerovaný infračervený lúč, ktorého vnútorný odraz vytvára evanescentnú vlnu, ktorá prenikne vo vzorke do niekoľkých μm , kde sú absorbované vlničky, ktoré zodpovedajú frekvencii vibrácie molekúl vzorky. Vlna je teda zoslabená o absorbovanú energiu a po návrate do kryštálu smeruje do detektoru [49]. Schematické znázornenie tohto procesu je možné nájsť na Obr. 7 [50]. Táto technika je vhodná pre širokú škálu tuhých látok aj pre niektoré kvapaliny a jej najväčšou výhodou je, že merané vzorky netreba takmer žiadnym spôsobom upravovať.



Obr. 7 Schematické znázornenie ATR-FTIR systému [49]

DRIFTS technika

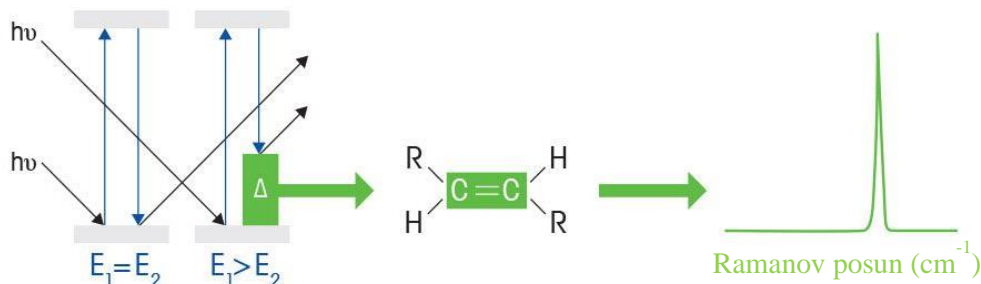
Pri metóde difúznej reflektancie, skrátene DRIFTS (z angl. *Diffuse Reflectance Infrared Fourier Transform Spectroscopy*), je infračervený lúč nasmerovaný do vzorkovacieho tégliku naplneného zhomogenizovanou zmesou vlastnej vzorky a substrátu, najčastejšie KBr. Žiarenie s časticami vzorky interaguje a odráža sa od ich povrchu – jeho časť je teda absorbovaná, časť je rozptýlená, teda difunduje a je označovaná ako difúzna reflektancia a časť je iba odrazená vo forme spekulárnej zložky (Obr. 8). Výstupné zrkadlo potom smeruje rozptýlené žiarenie na detektor. Pre získanie reprodukovateľných výsledkov je potrebné zabezpečiť približne rovnakú veľkosť častíc skúmaných vzoriek, pretože reflektančná a spekulárna zložka sú závislé od veľkosti častíc a distribúcií ich veľkosti [51; 52].



Obr. 8 Schematické znázornenie interakcie IČ žiarenia so vzorkou pri použití DRIFTS techniky [51]

2.4.2 RAMANOVA SPEKTROSKOPIA

Princípom tejto metódy je meranie rozptýleného žiarenia, ktoré vzniká interakciou monochromatického žiarenia z viditeľnej až blízkej infračervenej oblasti s molekulami vzorky za súčasnej zmeny ich vibračných a rotačných stavov [47]. Pri interakcii svetla s molekulami plynu, kvapaliny alebo pevnej látky je väčšina fotónov rozptýlená s rovnakou energiou ako majú dopadajúce fotóny. Tento jav sa nazýva pružný alebo Rayleighov rozptyl. Určitá malá časť rozptýleného žiarenia však po interakcii mení svoj vlnčet. Rozkmitaná molekula sa nevracia na pôvodnú hladinu, ale zaujíma iný vibračný a rotačný stav – tento jav sa nazýva Ramanov rozptyl žiarenia a je znázornený na Obr. 9 [47; 53].

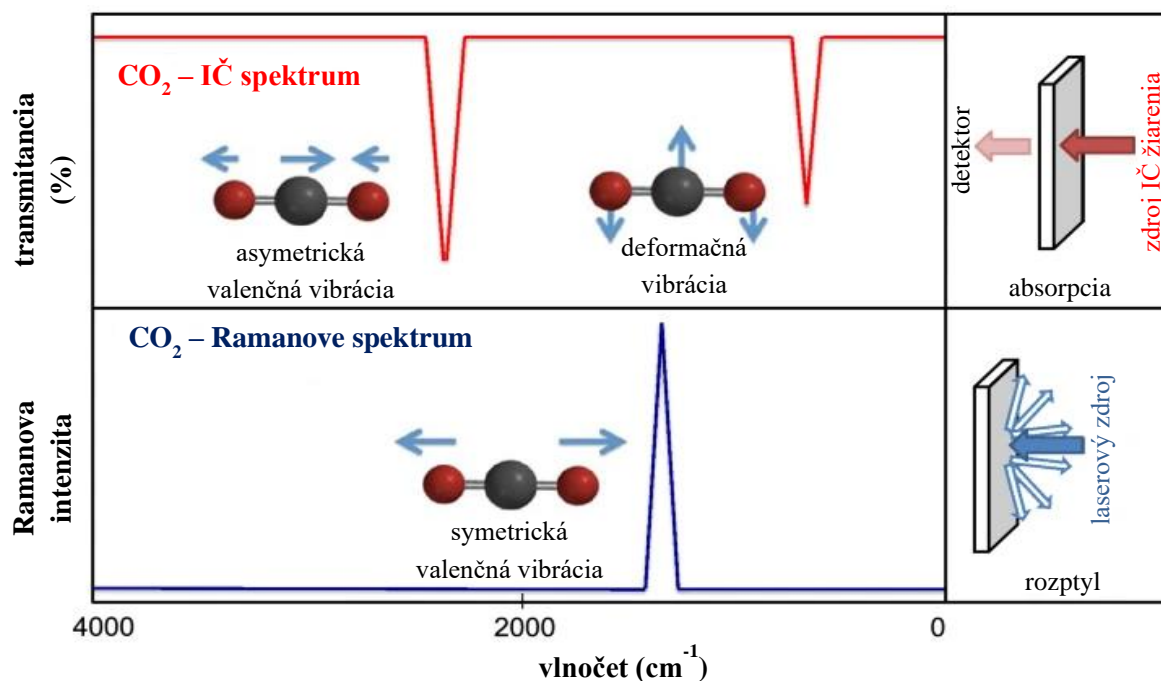


Obr. 9 Schematické znázornenie Ramanovho rozptylu žiarenia [53]

Ak je zmena energie rozptýleného fotónu nižšia ako u dopadajúceho fotónu, teda molekula sa vracia na vyššiu vibračnú hladinu, ako bola pôvodná, rozptyl sa označuje ako Stokesov rozptyl. Tento prípad sa využíva analyticky, pretože pásy s nižším vlnčtom sú intenzívnejšie [47]. Niektoré molekuly sa po prechode na vyšší virtuálny energetický stav môžu uvoľňovať do konečného energetického stavu, ktorý je nižší ako pôvodný stav – v tomto prípade ide o anti-Stokesov rozptyl [53].

Zmena vibračného a rotačného stavu molekuly nastáva pri Ramanovej spektroskopii odlišným spôsobom ako pri infračervenej spektroskopii. U IČ spektrometrie sa tento stav mení absorpciou infračerveného žiarenia v spojení so zmenou dipólového momentu molekuly. Podmienkou aktivity vibrácie u Ramanovej spektroskopie je zmena polarizovateľnosti molekuly, čo je v podstate miera schopnosti posúvať náboje v molekule pôsobením elektrického poľa a teda vytvárať indukovaný dipól. Polarizovateľnosť má tiež úzky vzťah s molekulovými orbitálmi, pretože je spôsobená ich deformáciou [47].

Hlavný rozdiel medzi infračervenou a Ramanovou spektroskopiou môže byť vysvetlený napríklad na molekule oxidu uhličitého. U jeho symetrickej valenčnej vibrácie sa nemení dipólový moment, ale molekulové orbitály všetkých väzieb sa súčasne skracujú, teda sa mení polarizovateľnosť molekuly. V infračervenom spektre sa teda táto vibrácia neprejaví, ale v Ramanovom áno. Naopak je to pri antisymetrickej valenčnej vibrácii – mení sa dipólový moment, ale skracovanie väzieb medzi kyslíkom a uhlíkom na jednej strane je kompenzované predĺžovaním väzieb na druhej strane a polarizovateľnosť molekuly sa nemení [47]. Rozdiel v týchto dvoch spektrách je zobrazený na Obr. 10.



Obr. 10 Infračervené a Ramanove spektrum CO_2 molekuly [43]

3 SÚČASNÝ STAV RIEŠENEJ PROBLEMATIKY

3.1 METÓDY EXPERIMENTÁLNEHO ŠTÚDIA INTERAKCIE PRÍRODNEJ ORGANICKEJ HMOTY S ORGANICKÝMI POLUTANTMI

Existuje mnoho metód, pomocou ktorých sú v súčasnosti skúmané rôzne mechanizmy interakcií humínových látok, alebo celkovo prírodnej organickej hmoty, s organickými polutantmi. V tejto kapitole je uvedený prehľad niektorých z nich, spolu s krátkym zhrnutím vedeckých prác, ktoré danú techniku využívajú práve pre skúmanie spomínaných interakcií.

3.1.1 UV-VIS SPEKTROSKOPIA

Podstatou ultrafialovej a viditeľnej spektrometrie je absorpcia ultrafialového a viditeľného elektromagnetického žiarenia v rozsahu vlnových dĺžok 200 až 800 nm zriedenými roztokmi molekúl. Môže byť nazývaná aj molekulová absorpčná spektrometria a zaoberá sa hlavne meraním a interpretáciou elektrónových spektier týchto molekúl v roztokoch [45; 47].

Pomocou UV-VIS spektrometrie boli napríklad študované interakcie medzi Fe-kyanidovými komplexmi a humínovými látkami. Osud kyanidov v pôde je silno ovplyvnený tvorbou Fe-kyanidových komplexov, ktoré dokážu interagovať s organickými a anorganickými koloidmi a vyzrážať sa ako stabilné látky. Bolo dokázané, že interakcia medzi humínovou kyselinou a ferrokyanidovým komplexom viedla k tvorbe ferrokyanid-humínových micel, pričom táto interakcie nespôsobila zmeny v pôvodnej štruktúre ferrokyanidu [54].

V ďalšej štúdií bola využitá UV-VIS spektrometria v kombinácii a potenciometrickou titráciou a fluorescenčnou spektroskopiou pre skúmanie interakcie Ca^{2+} iónov a pôdnych humínových kyselín. Výsledky nasvedčujú, že mechanizmus interakcie Ca^{2+} a HK je kombináciou adsorpcie a komplexácie, pričom adsorpcia bola dominantným mechanizmom a komplexácia bola pozorovaná iba pri nízkych koncentráciách Ca^{2+} [55].

Táto metóda bola využitá aj na štúdium interakcie iónu $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$ s humínovou kyselinou. Boli zmerané UV-VIS spektrá čistého iónu, čistej humínovej kyseliny a ich komplexu. Bolo pozorované, že absorpčné pásy štruktúr aromatických kruhov v komplexoch $\text{HK-Cr}_2\text{O}_7^{2-}$ znížili svoju intenzitu a indikovali zmenu v distribúcii π väzieb u humínových kyselín. Celkovo bolo v tejto štúdií vypozerované, že vo väzobnom procese je zapojených niekoľko medzimolekulových síl (vodíkové mostíky, hydrofóbne a elektrostatické sily) a tiež že interakcia medzi $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$ a HK nie je silná [56].

Zhu a spol. sa pomocou UV-VIS spektroskopie v kombinácii s NMR snažili dokázať π - π donor-akceptorové interakcie medzi modelovými π -donormi a π -akceptorovými skupinami v prírodnej organickej hmote, ktoré boli zastúpené modelovými humínovými podjednotkami. V UV-VIS spektrách zmesí π akceptorov a donorov boli pozorované absorpčné pásy patriace interakciám s prenosom náboja π - π komplexov. Tiež bolo pozorované, že s rastúcou deprotonizáciou π -akceptoru sa znižuje intenzita tejto interakcie [57].

Iní autori sledovali pomocou *in situ* UV-VIS absorpčnej spektroskopie viazanie Al^{3+} a Fe^{3+} na prírodnú organickú hmotu pri rôznych hodnotách pH. Bolo dokázané, že spektrálny parameter, ako napríklad diferenčná absorbancia, je schopný kvantifikovať množstvo Al^{3+} alebo Fe^{3+} naviazaného na POH. Takýmto spôsobom je teda možné viditeľne preukázať konkurenciu medzi Al^{3+} a Fe^{3+} pri viazaní na POH pomocou vyhodnotenia diferenčných absorpčných spektier a tiež je možné sledovať reakčnú kinetiku tejto interakcie [58].

3.1.2 POTENCIOMETRIA A POTENCIOMETRICKÁ TITRÁCIA

Potenciometria je elektrochemická metóda založená na meraní rovnovážneho napätia galvanického článku. Ten je zostavený z mernej a referenčnej elektródy, pričom potenciál mernej elektródy je závislý na koncentrácii sledovanej látky, zatiaľ čo potenciál referenčnej elektródy je konštantný. Mierou koncentrácie je rovnovážne napätie, ktoré je rozdielom týchto dvoch potenciálov [47].

Pre študovanie interakcií humínových látok s organickými polutantmi je potenciometrická titrácia jednou z najdôležitejších metód. Je to totiž hodnotný nástroj pre získanie množstva informácií o povrchu a sorpčných vlastnostiach humínových látok. Široké možnosti potenciometrických titrácií u HL sú dosiahnuté tým, že molekuly humínových látok obsahujú veľký počet funkčných skupín s rôznou aciditou [59].

Potenciometrická titrácia bola využitá pre sledovanie viazania ortuti na komerčné a prírodné humínové kyseliny. Boli pozorované dve funkčné skupiny, na ktoré sa Hg^{2+} ióny mohli viazať. Najsilnejšie väzobné funkčné skupiny sú pravdepodobne karboxylové a amínové skupiny v molekule humínovej kyseliny, zatiaľ čo slabšie interakcie boli sledované u fenolických skupín [60].

Lubal a spol. využili potenciometrické merania pre sledovanie komplexácie humínových kyselín s uranylom. Pre meranie bola využitá špecifická elektróda selektívna pre uranylový ión a bola pozorovaná tvorba 1:1 a 1:2 (kov:ligand) komplexov uranylu s rôznymi HK. Boli tiež vypočítané stabilítne konštanty naznačujúce možné využitie imobilizovaných HK pre odstránenie stôp uranylu z odpadových vôd [61].

Aj komplexácia Cu^{2+} iónu s humínovými látkami bola sledovaná pomocou potenciometrie, pričom HL boli zastúpené tromi rôznymi fenolickými kyselinami ako modelovými ligandami humínových látok. Zo získaných dát môže byť vyhodnotené, že fenolické kyseliny majú dôležitú úlohu v komplexačných vlastnostiach humínových látok a to najmä vďaka prítomnosti katecholovej skupiny [62].

V ďalšej štúdií bola potenciometrická titrácia aplikovaná na sledovanie väzby iónových surfaktantov na humínové a fulvinové kyseliny. Bolo sledované viazanie aniónových surfaktantov na HL za dvoch rôznych pH podmienok a iónových síl surfaktantu a tiež bolo porovnané viazanie dvoch štruktúrne podobných kationových povrchovo aktívnych látok (PAL) s rozdielnou polárnou hlavičkou na modelové humínové látky. Za vysokého pH a nízkej iónovej sily aniónových PAL nebola pozorovaná žiadna interakcia na rozdiel od podmienok s nízkym pH a vysokou iónovou silou. Tiež bolo zistené, že polárna hlavička kationových PAL je jedným z faktorov ovplyvňujúcich ich interakciu s HL [63].

3.1.3 DIFÚZNE EXPERIMENTY

Pre štúdium interakcií medzi makromolekulami, teda napríklad humínovými látkami, a nízkomolekulárnymi látkami je možné využiť difúzne experimenty. V tomto type experimentu sa využívajú napríklad difúzne cely, ktoré predstavujú systém dvoch komôr oddelených semipermeabilnou membránou. Vplyvom koncentračného gradientu prebieha difúzia medzi roztokmi v komorách, až kým sa v nich nevyrovná koncentrácia voľných molekúl difúznej sondy, čo je označenie pre látku, ktorej difúzia cez membránu je sledovaná. Celková koncentrácia difúznej sondy v oboch komorách však po skončení experimentu nie je rovnaká, pretože jej časť je naviazaná na makromolekuly. Vďaka tomu je možné stanoviť rovnovážnu alebo väzobnú konštantu sledovaného systému [64].

Sedláček a spol. sledovali pomocou difúzných experimentov vplyv interakcie s humínovými kyselinami na mobilitu iónových farbív v hydrogélach. Boli využité dve metódy experimentu – difúzne cely [65] a nestacionárna difúzia [66]. Pomocou metódy difúzných ciel bola sledovaná difúzia metylénovej modrej vo vodných roztokoch a v agarózových géloch bez prídavku a s prídavkom humínovej kyseliny. Výsledky dokazujú imobilizujúci efekt HK na transport metylénovej modrej v géloch [65]. Pre získanie presnejších výsledkov boli v ďalšej štúdií prevedené experimenty nestacionárnej difúzie, ktoré sú založené na priamom stanovení koncentrácie rozpustenej látky pri rôznej vzdialenosti v difúznom médiu, čo umožňuje jednoduché rozlíšenie medzi difúznymi a rozdeľovacími efektami. Aj tieto výsledky potvrdili vplyv prítomnosti humínových kyselín na molekulárny transport kationových látok, pričom v systéme s vyšším obsahom HK bol pozorovaný väčší pokles mobility kationov. Prevedené experimenty poukázali na fakt, že ich interakcie sú komplexné a nemali by byť považované len za jednoduché elektrostatické interakcie [66].

Smilek a spol. študovali interakcie humínových kyselín s organickými farbivami metylénovou modrou a Rhodaminom 6G pomocou difúzných a sorpčných experimentov. Pre overenie vplyvu karboxylových funkčných skupín na interakciu boli prevedené experimenty s originálnymi aj so selektívne metylovanými humínovými kyselinami. Bolo prekvapivo zistené, že tieto interakcie nezahŕňujú karboxylové skupiny do takej miery, ako bolo očakávané. Výsledky implikujú, že interakcia medzi aromatickými súčasťami v molekulovej štruktúre rozpustenej látky a HL hrá dôležitejšiu úlohu ako jednoduchá elektrostatická príťažlivosť medzi opačne nabitými látkami [17].

Iní autori merali difúzne koeficienty pre odhalenie medzimolekulových interakcií medzi kladne a záporne nabitým surfaktantom a rôznymi humínovými látkami. Výsledky ich práce naznačujú, že u negatívne nabitých PAL humínové látky zvyšujú jej agregáciu pred tvorbou micel, s výraznejším účinkom u hydrofóbnejších humínových materiálov. Pod hodnotou kritickej micelárnej koncentrácie však aj negatívne nabití surfaktanty interagujú s HL. Pozitívne nabitá PAL tvorí s humínovými látkami stabilné iónové páry [67].

3.1.4 IZOTERMICKÁ TITRAČNÁ KALORIMETRIA

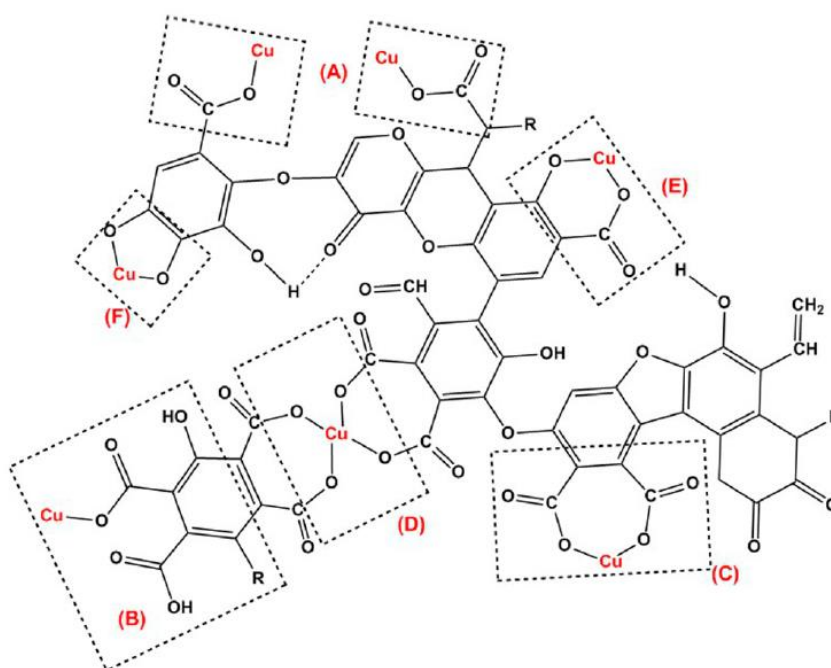
Pomocou izotermickej titračnej kalorimetrie (ITK) je merané uvoľnené alebo spotrebované teplo v priebehu medzimolekulových interakcií, pričom z nameraných dát je možné stanoviť hlavné termodynamické a väzobné parametre interakcie – stechiometriu, rovnovážnu konštantu, či zmenu Gibbsovej energie, entalpie alebo entropie. Princípom tejto metódy je titrácia roztoku ligandu k roztoku makromolekuly za využitia titračného mikrokolorimetru, ktorý obsahuje mernú a referenčnú celu, ktoré sú tepelne izolované od okolia. Merná cela je podľa povahy interakcie vždy ochladzovaná alebo dohrievaná na teplotu referenčnej cely, zatiaľ čo je zaznamenávaný entalpogram, čo je grafická závislosť tepelného toku na čase merania [68].

Izotermická titračná kalorimetria bola využitá napríklad pre štúdium interakcií rôznych hmotnostných pomerov humínových kyselín a proteínu lyzozýmu za rozličných pH podmienok s rôznym prídavkom KCl. Za prvých sledovaných podmienok bola HK nabitá negatívne a lyzozým mal pozitívny náboj. V neprítomnosti soli boli tvorené pozitívne nabité komplexy HK s lyzozýmom, ktoré po prídavku KCl silno agregovali. Tvorba týchto komplexov bola poháňaná entalpicky a má elektrostatický charakter. V blízkosti izoelektrického bodu však bola pozorovaná tvorba komplexov a agregátov takmer bez zmeny entalpie a proces bol poháňaný entropicky, čo poukazuje na interakciu vedenú hydrofóbnym efektom [69].

V ďalšej štúdií bola ITK využitá na sledovanie interakcie medzi TiO₂ nanočasticami a humínovými kyselinami. Výsledky naznačujú, že TiO₂-HK interakcie sú entropicky aj entalpicky priaznivé

s exotermickou povahou interakcie. Poradie zmiešavania zložiek je tiež dôležitým faktorom. Pri vysokých koncentráciách HK bola pozorovaná homoaglomerácia a entalpicky poháňaný proces asociácie. Taktiež van der Waalsove sily hrajú v týchto interakciách dôležitú úlohu vďaka amfifilnému charakteru humínových látok [70].

Pomocou ITK bolo analyzované aj viazanie protónov a medi k humínovým kyselinám. Merania odhalili, že viazanie Cu k deprotonovaným karboxylovým skupinám je poháňané entropicky, zatiaľ čo jej viazanie k deprotonovaným fenolickým skupinám je riadené entropiou a entalpiou. Taktiež boli v práci vytipované rôzne spôsoby viazania Cu ku karboxylovým a fenolickým skupinám HK (Obr. 11) a bolo zistené, že dominantným spôsobom tejto interakcie je tvorba bidentátových (na jednu molekulu ligandu pripadajú dve donorové skupiny) Cu komplexov s karboxylovými skupinami. Príklad takejto interakcie je možné vidieť na Obr. 11C [71].



Obr. 11 Navrhnuté štruktúry Cu komplexov s karboxylovými a fenolickými skupinami HK [71]

Izotermická titračná kalorimetria bola ďalej aplikovaná na štúdium interakcie humínových kyselín s arzenitom. Reakčné teplá a získaná zmena entalpie naznačujú, že vodíkové mostíky sú dominantným mechanizmom interakcie a viazanie arzenitu na HK je exotermický, spontánny a entalpicky poháňaný proces. Termodynamické a reakčné parametre jasne indikujú, že arzenit–HK komplexy sú v pôde tvorené za bežných hodnôt pH a potvrdzujú možnosť vplyvu humínových kyselín na zvýšenú mobilitu a zníženú biologickú dostupnosť arzenu [72].

3.1.5 FLUORESCENČNÁ SPEKTROSKOPIA

Humínové látky vykazujú fluorescenčné vlastnosti vďaka ich špecifickej štruktúre a obsahu chemických skupín nazývaných fluorofóry, ako sú napríklad katecholové, chinónové, fenolické, aminové alebo salicylové skupiny. Ich častice môžu byť excitované pri absorpcii žiarenia s krátkou vlnovou dĺžkou a absorbovanú energiu môžu potom vyžiariť vo forme fluorescencie. Fluorescencia je pri nízkych koncentráciách fluorofórov priamo úmerná koncentrácii celej fluoreskujúcej látky [59].

Už v minulosti sa niekoľko autorov zaoberalo štúdiom interakcií humínových látok pomocou fluorescenčnej spektroskopie [73; 74; 75; 76], pričom v nasledujúcich odstavcoch sú podrobnejšie rozobrané niektoré novšie štúdie.

Karbamazepín je populárne liečivo, ktoré bolo detegované v prírodnom prostredí a pomocou fluorescenčnej spektroskopie bola študovaná jeho interakcia s humínovými látkami. Vlastná fluorescencia humínových látok bola po prídavku karbamazepínu zhasaná pomocou statického zhasania ako primárneho mechanizmu. Hlavnou silou viazania karbamazepínu na HL by mohla byť hydrofóbná adsorpcia. Naviazanie karbamazepínu na HL môže výrazne znížiť koncentrácie voľného karbamazepínu a zvýšiť jeho rozpustnosť a mobilitu v prírodnom prostredí [77].

Pomocou fluorescenčnej spektroskopie boli tiež skúmané interakcie medzi pesticídom rotenónom a humínovými kyselinami z rôznych zdrojov; dve vzorky HK boli izolované s rozličných pôd (HK 1 a HK 2) a jedna humínová kyselina bola izolovaná z vodného prostredia (HK 3). Vzorka HK 1 sa vyznačovala vysokým stupňom aromaticity a nízkou polaritou oproti vzorke HK 2 a vzorku HK 3 charakterizovali najmä alifatické a kyslé skupiny. Získané dáta preukazujú, že rotenón bol na jednotlivé vzorky absorbovaný pomocou hydrofóbných interakcií, pričom ich sila klesá v poradí $HK\ 1 > HK\ 2 \ggg HK\ 3$, zatiaľ čo v opačnom poradí sú dominantným väzobným mechanizmom vodíkové mostíky [78].

Inhibíciou aktivity enzýmu tyrozinázy je možné kontrolovať hndnutie ovocia a zachovať chuť a nutričnú hodnotu jedla. Pomocou fluorescenčnej spektroskopie a ďalších metód bol sledovaný vplyv humínových a fulvinových kyselín na aktivitu tyrozinázy. Termodynamické parametre ukázali, že vodíkové mostíky a hydrofóbne interakcie hrajú hlavnú úlohu v interakciách medzi HK, FK a tyrozinázou. Fluorescenčné experimenty demonštrovali zmeny v terciárnej štruktúre tyrozinázy. HK nedokázali porušiť sekundárnu štruktúru tohto enzýmu, no FK mali zásadný vplyv aj na sekundárnu štruktúru tyrozinázy, pravdepodobne kvôli tvorbe vodíkových väzieb s enzýmom. Obe látky však môžu tyrozinázu inhibovať, hoci každá iným mechanizmom [79].

3.1.6 FTIR SPEKTROSKOPIA

Ako už bolo načrtnuté v kapitole 2.4.1, infračervená spektroskopia je vhodnou technikou pre sledovanie interakcií, pretože vďaka charakteristickým IČ spektrám je možné identifikovať jednotlivé funkčné skupiny analyzovanej látky a tiež je možné určiť väzby medzi jednotlivými atómami. Podobne ako pri fluorescenčnej spektroskopii, aj táto metóda je využívaná už dlhé roky a niektoré štúdie interakcií humínových látok pomocou FTIR sa datujú ešte do 20. storočia [80; 81; 82; 83; 84].

V jednej z novších štúdií boli skúmané interakcie medzi antibiotikom tetracyklínom (TET) a humínovými kyselinami. Boli pozorované spektrá čistej HK, čistého tetracyklínu a ich komplexov v rôznych molárnych pomeroch. FTIR merania odhalili, že pri vzraste pomeru HK:TET z 1:0,4 na 1:1 bola znížená intenzita absorpčných pásov pri $1\ 104 - 1\ 040\ \text{cm}^{-1}$ (valenčné vibrácie fenolických C–O a O–H väzieb), čo poukazuje na fakt, že fenolické hydroxylové a karboxylové skupiny sa podieľajú na viazaní tetracyklínu. Okrem toho, mierny nárast píkovo pri $1\ 454$ a $1\ 356\ \text{cm}^{-1}$ (valenčné vibrácie C–N a torzné vibrácie N–H väzieb) dokázal tvorbu TET-HK komplexov [85].

Pomocou FTIR spektroskopie boli študované aj interakcie humínovej kyseliny s nanočasticami anorganických oxidov. Na základe posunov a zmien intenzity niektorých absorpčných pásov po interakcii HK a nano-oxidov bolo zistené, že za výmenu ligandov s nano-TiO₂ boli zodpovedné fenolické –OH skupiny, zatiaľ čo –COOH skupiny humínových kyselín boli zodpovedné za výmenu ligandov s nano-ZnO. Na tejto interakcii s nano-Al₂O₃ sa podieľali ako –COOH, tak aj fenolické a alifatické –OH skupiny humínových kyselín [86].

V ďalšom výskume bola popri iných metódach využitá infračervená spektroskopia pre skúmanie interakcie inhibítorov 4-hydroxyfenylpyruvát dioxxygenázy, ktoré sú využívané ako herbicídy, s humínovými kyselinami. Na základe zmien FTIR spektier HK po interakcii s herbicídmi bolo pozorované, že tieto herbicídy obsadili aromatické kruhy a alkylové skupiny – teda hydrofóbne skupiny – a exponovali karboxylové skupiny, čo značí, že najsilnejšou väzobnou interakciou HK a týchto herbicídov je hydrofóbny efekt [87].

FTIR spektroskopia bola využitá aj pre výskum mechanizmu chelácie humínových kyselín a chrómu. Posuny charakteristických karboxylátových absorpčných pásov indikujú, že za viazanie chrómu humínovými kyselinami sú zodpovedné práve tieto skupiny. Na základe separácie pík $-\text{COO}^-$ symetrických a asymetrických vibrácií bolo možné odlišiť aj jednotlivé typy komplexácie a boli rozlíšené nekomplexné, monodentátové a bidentátové karboxylátové skupiny [88].

3.1.7 NUKLEÁRNA MAGNETICKÁ REZONANCIA

NMR spektroskopia je pomerne univerzálna nerádioaktívna metóda, ktorá využíva magneticky aktívne atómové jadrá vhodných izotopov ako lokálne sondy v skúmanej látke. Základnou podmienkou, ktorú musia sledované atómové jadrá spĺňať, je ich nenulový vlastný moment hybnosti, teda jadrový spin, s ktorým súvisí nenulový magnetický dipólový moment. Ide najmä o nerádioaktívne izotopy, ako napríklad ^1H , ^{13}C , ^{31}P , ^{55}Mn , ^{57}Fe a mnoho ďalších, pričom ich voľba pre experiment je daná tým, ktoré prvky meraná látka obsahuje [89]. Vo vonkajšom magnetickom poli sa tieto jadrá orientujú do polôh, ktorým zodpovedajú určité energetické hladiny. Absorpciou elektromagnetického žiarenia v oblasti krátkych rádiových vln potom dochádza k prechodu jadra na vyššiu energetickú hladinu. Pri návrate na nižšiu hladinu je uvoľnená energia s rovnakou frekvenciou, ktorá je však priamoúmerná sile aplikovaného vonkajšieho magnetického poľa. Táto emitovaná frekvencia je zaznamenávaná vo forme spektra [47]. NMR spektroskopia je vhodnou metódou pre určenie štruktúry látky a taktiež pre štúdium intra- a intermolekulárnych interakcií [45]. Na základe prevedenej rešerše je možné skonštatovať, že práve táto metóda je najčastejšie využívanou metódou pre štúdium interakcií humínových látok s rôznymi environmentálnymi polutantmi.

NMR spektroskopia bola napríklad využitá pre štúdium kovalentných a nekovalentných interakcií peptidov s humínovými kyselinami. Zároveň bol pozorovaný vplyv aromaticity a alifaticity na tieto interakcie. Bolo skúmané viazanie ^{15}N -značených peptidov s rôznymi aromatickými a alifatickými vlastnosťami na HK s rôznym stupňom aromaticity, pričom bolo zistené, že peptidy obsahujúce primárne aromatické aminokyseliny sa kovalentne a nekovalentne viazali najmä na aromaticky bohaté HK. Na druhej strane, peptidy skladajúce sa z alifatických aminokyselín boli viazané len na HK bohaté na alifatické skupiny [90].

Estrogény, konkrétne sledované estradiol a estriol, sú v životnom prostredí všadeprítomné a pre zdravie môžu predstavovať závažné riziko. Ich sorpcia na rozpustenú organickú hmotu (zastúpenú humínovými kyselinami) ovplyvňuje ich koncentráciu a účinky, a práve pre pochopenie jej mechanizmu bola táto interakcia skúmaná pomocou NMR. Výsledky naznačujú, že väzba medzi estrogénmi a HK nastáva primárne na aromatickom kruhu ($\pi-\pi$ interakcia) a vzniká aj pri relatívne nízkych koncentráciách HK [91].

Pomocou tejto metódy boli sledované aj nekovalentné interakcie medzi HK a monoaromatickými látkami. Bolo zistené, že tieto interakcie sú závislé od pH, stupňa aromaticity HK a od monoaromatickej funkčnej skupiny. Benzén interagoval s rozpustenou HK za akýchkoľvek pH podmienok, ale sila interakcie stúpala s klesajúcim pH a stúpajúcim stupňom aromaticity. Pyridín sa správal podobne ako benzén, ale boli detegované až dva spôsoby jeho interakcie s HK; väzba

s voľným elektrónovým párom pyridínového dusíku a π - π interakcie medzi aromatickým kruhom pyridínu a aromatickými komponentmi HK, ktoré boli preferované pri vysokej aromaticite a nízkom pH roztoku [92].

Mazzei a spol. študovali pomocou NMR interakcie medzi nitrifikačnými inhibítormi a modelovými humínovými a fulvinovými kyselinami. Výsledky dokázali interakciu s oboma typmi kyselín, pričom HK vykazovali výrazne vyššiu afinitu. Pri interakcii HK s modelovým inhibítormi bola dokázaná významná úloha aromatického signálu, zatiaľ čo u FK boli v interakcii zahrnuté najmä alkylové skupiny [93].

V ďalšej štúdií bolo pomocou NMR sledované viazanie 2,6-difluorobenzoovej kyseliny a benzoovej kyseliny na vodné humínové kyseliny. Bola potvrdená micelárna povaha interakcie, čo poukazuje na možnosť enkapsulácie malých molekúl. Taktiež bolo zistené, že vo väzobnom mechanizme medzi benzoovou kyselinou a HK hrajú dôležitú úlohu karboxylové skupiny. Na rozdiel od toho, u F-substituovanej benzoovej kyseliny boli $-\text{COOH}$ skupiny orientované počas interakcie preč od HK. Navyše výsledky naznačujú vyššiu silu interakcie halogenovanej kyseliny s HK oproti jej nesubstituovanému analógu [94].

Ako už bolo spomenuté vyššie, NMR je naozaj často využívanou metódou pre štúdium interakcií humínových látok a práce spomenuté v tejto kapitole predstavujú len zlomok dostupnej literatúry zaoberajúcej sa touto problematikou. Ďalšími príkladmi môžu byť potom okrem iných aj štúdie [95; 96; 97].

3.2 VYUŽITIE VIBRAČNEJ SPEKTROSKOPIE PRI ŠTÚDIU NEKOVALENTNÝCH INTERAKCIÍ NÍZKOMOLEKULÁRNYCH LÁTOK

Už v predchádzajúcej kapitole bolo predstavených niekoľko štúdií, ktoré využili infračervenú spektroskopiu pre študovanie interakcií medzi humínovými látkami a rôznymi xenobiotikami. Keďže je táto práca prednostne zameraná práve na sledovanie nekovalentných interakcií pomocou vibračnej spektroskopie, v nasledujúcich odstavcoch sú uvedené niektoré ďalšie príklady podobnej aplikácie tejto metódy, tentokrát bez konkrétneho zamerania na humínové látky.

Pomocou vibračnej spektroskopie boli napríklad sledované účinky dipólovej interakcie a solvatácie na pás valenčných vibrácií $\text{C}=\text{O}$ NdMA (N,N-dimetylacetamidu) v cyklohexáne, n-hexáne a CCl_4 pri rôznych koncentráciách. Bolo zistené, že vlnočty valenčných vibrácií $\text{C}=\text{O}$ u IČ, izotropickej a anizotropickej Ramanovej spektroskopie sa nezhodujú. Posun $10,8 \text{ cm}^{-1}$ medzi izotropickými a anizotropickými komponentmi indikuje, že čistá kvapalina NdMA interaguje sama so sebou pomocou permanentných dipólov a je indukovaná lokálna orientácia molekúl. Bolo zistené, že pozorovaný asymetrický pás $\text{C}=\text{O}$ valenčných vibrácií u $0,46\text{M}$ n-hexánového a $0,33\text{M}$ cyklohexánového roztoku je spojený s medzimolekulovými interakciami medzi molekulami NdMA, ktoré sa strácajú pri koncentrácii $0,023 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ [98].

Ďalej boli pomocou FTIR spektroskopie sledované rozdiely v spektrách metylénovej modrej v plynnej fáze, v hydratovanom kryštalickom stave a vo vysušenom roztoku MB. O prítomnosti monomérov MB v študovanej vzorke svedčili absorpčné pásy $=\text{N}^+(\text{CH}_3)_2$ pri $1\ 640 - 1\ 650 \text{ cm}^{-1}$ a C-S-C väzieb pri $625 - 615 \text{ cm}^{-1}$ a $1\ 095 \text{ cm}^{-1}$. Bolo potvrdené, že funkčná skupina $=\text{N}^+(\text{CH}_3)_2$ sa podieľa na tvorbe jednej mostíkovej vodíkovej väzby s $-\text{OH}$ skupinami rozpúšťadla, keďže bol pozorovaný pokles intenzity jej absorpčného pásu spolu s nárastom frakcií dimérov a H-agregátov MB. Pozorované správanie heterocyklických C-H ($3\ 050 - 3\ 015 \text{ cm}^{-1}$), C=C, C=N ($1\ 600 - 1\ 595 \text{ cm}^{-1}$), C-C a C-N ($1\ 564 - 1\ 546 \text{ cm}^{-1}$) vibrácií je prejavom π - π interakcií

aromatických kruhov iónovej formy MB⁺ heterocyklu pri sebazdružovaní molekúl metylénovej modrej [99].

Ďalší výskum sa zaoberal študovaním medzimolekulových interakcií C=O skupín amidov v roztokoch pomocou FTIR spektroskopie. Boli pozorované lineárne závislosti medzi absorpčnými frekvenciami C=O skupín N,N-dimetylacetamidu a N,N-dimetylformamidu a medzi N-metylformamidom a N-metylacetamidom v rôznych rozpúšťadlách. Pri pozorovaní týchto frekvencií u prvej dvojice však nebola nájdená žiadna lineárna závislosť, čo poukazuje na rôzne typy solvatačných efektov v rôznych médiách. Výsledky tiež naznačujú schopnosť báz tvoriť silné vodíkové väzby s N–H skupinami amidov [100].

FTIR spektroskopia bola využitá aj na štúdium interakcie o-nitrofenolu a metylacetátu v benzéne. Pre zhodnotenie možností medzimolekulových interakcií za konkrétnych koncentrácií boli zaznamenané FTIR spektrá čistého o-nitrofenolu, čistého metylacetátu a ich ekvimolárnej zmesi. Bol pozorovaný posun silného C=O píku pri 1 754 cm⁻¹ u čistého metylacetátu k 1 745 cm⁻¹ u ekvimolárnej zmesi a široký pás O–H valenčných vibrácií pri 3 384 cm⁻¹ u čistého o-nitrofenolu bol v ekvimolárnej zmesi posunutý k 3 253 cm⁻¹. Predpokladá sa, že tieto posuny boli spôsobené vodíkovými väzbami v zmesi [101].

S využitím modelového minerálu kalcitu boli skúmané kation- π interakcie s adsorbovanými molekulami benzénu, toluénu a etylbenzénu (BTE) pomocou ATR-FTIR spektroskopie. Bolo pozorované, že prítomnosť kalcitu zvyšuje energiu potrebnú k excitácii symetrických deformačných vibrácií C–H väzieb BTE molekúl. Výsledky tiež naznačujú, že posun v excitačnej energii aromatických C–H deformačných vibrácií môže byť využitý ako dôkaz kation- π interakcií na povrchu minerálov. Detegovateľnosť posunov v IČ spektrách je vyššia u nesubstituovaných aromatických kruhov, pretože alkylová substitúcia znižuje citlivosť IČ kvôli indukčivému elektrón-donorovému efektu [102].

Pomocou FTIR boli sledované aj konformačné zmeny lipidových membrán po interakcii s liečivom fluoxetín. Konformačné zmeny lipidovej štruktúry boli objasnené cez vibračnú frekvenciu CH₂ skupín acylových reťazcov (2 800 – 3 000 cm⁻¹) a pomocou PO₂⁻ valenčných pásov lipidovej polárnej hlavičky (1 000 – 1 300 cm⁻¹). Z FTIR meraní vyplynulo, že pri nízkych koncentráciách elektrolytu sa fluoxetín nachádzal na rozhraní dvojvrstvy vďaka elektrostatickej interakcii medzi NH₃⁺ skupinou fluoxetínu a OH⁻ skupinou fosfolipidovej hlavičky. Oproti tomu, vyššie koncentrácie NaCl môžu pravdepodobne uľahčiť prienik fluoxetínu do hlbších častí lipidovej dvojvrstvy, čo má za následok konformačné zmeny celej fosfolipidovej dvojvrstvy [103].

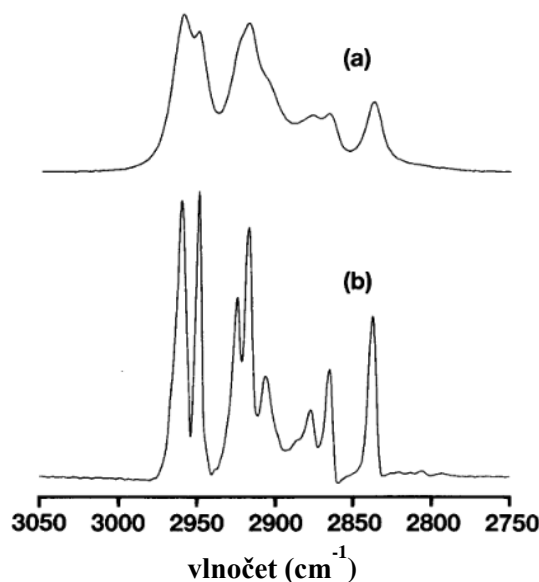
3.3 POKROČILÉ TECHNIKY MERANIA A VYHODNOCOVANIA VIBRAČNÝCH SPEKTIER

V predchádzajúcich kapitolách už bolo spomenutých niekoľko prác, ktoré využívali infračervenú spektroskopiu napríklad aj pre sledovanie interakcií. Najmä pri tejto aplikácii metódy je veľmi dôležité odhaliť aj spektrálne vlastnosti, ktoré nie sú pri vizuálnej analýze spektra ľahko viditeľné. Preto je infračervená spektroskopia často využívaná spolu s ďalšími metódami, či už matematickými alebo štatistickými, ktoré pomáhajú odhaliť napríklad prekrývajúce sa pásy v zložitých spektrách alebo sú schopné vyznačiť dôležité píky, na ktoré je možné sa potom v ďalšej analýze zamerať. Príklady takýchto metód sú uvedené práve v tejto kapitole.

3.3.1 DEKONVOLÚCIA

Prvou pokročilou metódou vyhodnocovania vibračných spektier je metóda dekonvolúcie, alebo FSD (z angl. *Fourier self-deconvolution*). Nežiaducou vlastnosťou FTIR spektier je, že mnoho

absorpčných pásov je veľmi širokých a prilahlé pásy majú tendenciu sa viac či menej prekrývať. Niekedy môže byť z takýchto pásov dokonca vytvorená „obálka“, ktorá pozostáva z mnohých prekrývajúcich sa píkov a sama o sebe nemá takmer žiadnu výpovednú hodnotu. Preto je potrebná metóda, ktorá tieto jednotlivé pásy rozlíši. FSD je matematická metóda, ktorá znižuje efekty rozširujúcich sa absorpčných pásov pomocou manipulácie dát vo Fourierovej doméne, teda pred samotnou Fourierovou transformáciou. Porovnanie spektra pred a po dekonvolúcií je možné vidieť na Obr. 12. Pomocou tejto metódy je tiež možné získať presnejšie informácie o polohe a intenzite jednotlivých pásov, čo umožňuje prevádzanie kvantitatívnych meraní [104].



Obr. 12 Dekonvolúcia oblasti C–H valenčných vibrácií polypropylénu: **a)** originálne dáta, **b)** výsledok po dekonvolúcii [104]

Dekonvolúcia je naozaj často využívanou metódou pri prevádzaní FTIR analýz. Z vyššie uvedených prác využili autori dekonvolúciu v prípade výskumu [102] a medzi ďalšie príklady jej použitia patria okrem iného štúdie [105; 106; 107]. Táto metóda bola tiež využitá aj v mojej bakalárskej práci [1].

3.3.2 2D KORELAČNÁ ANALÝZA

2D korelačná analýza, alebo tiež 2D korelačná spektroskopia je matematická technika využívaná pre študovanie korelácie medzi dvomi spektroskopickými signálmi ako funkcie času alebo iných externých parametrov. Často je využívaná napríklad v spojení s infračervenou alebo Ramanovou spektroskopiou pre odhalenie spektrálnych znakov, ktoré sú ťažko odhaliteľné konvenčnou metódou. Študovaná vzorka je vystavená perturbácii (systematická a kontrolovaná zmena nejakého parametru), ako napríklad zmene teploty, pH, chemickej reakcii, zatiaľ čo ostatné parametre sledovaného systému zostávajú rovnaké. Spektrá sú zaznamenávané ako funkcia tohto meneného parametru. Zmeny intenzity spektrálnych signálov sú potom systematicky analyzované pomocou krížovej korelácie. Získané korelačné intenzity môžu byť buď pozitívne alebo negatívne a sú zobrazené vo forme 2D mapy, ktorá je definovaná dvomi nezávislými spektrálnymi osami. Pomocou tejto techniky je napríklad možné rozlíšiť, ktoré zmeny v sledovanej vzorke sa dejú zároveň a ktoré v rôznych časoch, je možné určiť postupnosť spektrálnych zmien alebo tiež identifikovať rôzne medzimolekulové interakcie [108; 109].

Taktiež táto technika bola využitá pre pokročilú interpretáciu FTIR spektier už vo vyššie spomenutých prácach, konkrétne napríklad v štúdiách [85; 87; 100].

3.3.3 ANALÝZA HLAVNÝCH KOMPONENTOV (PCA)

PCA (z angl. *Principal Component Analysis*), alebo analýza hlavných komponentov je matematická metóda využívaná pre reorganizovanie informácií v súbore údajov rôznych vzoriek. Môže byť využitá, keď súbor obsahuje len niekoľko premenných, ale stáva sa veľmi užitočnou najmä pri analýze veľkého množstva premenných, ako napríklad v spektroskopických dátach. Služi k redukcii počtu premenných bez podstatnej straty informácie. Vytvára nové premenné, nazývané hlavné komponenty (PC, z angl. *Principal Components*), ktoré predstavujú väčšinu variability dát. To nám umožňuje popísať danú informáciu pomocou zásadne menšieho množstva premenných. Prvý hlavný komponent prechádza dátami vždy v smere najväčšej variability, druhý a nasledujúce komponenty musia byť potom kolmé na predchádzajúci komponent [110]. Nové premenné vznikajú vždy lineárnou kombináciou všetkých premenných a variabilita klesá zostupne od prvého komponentu. Lineárne koeficienty spätného vzťahu hlavných komponentov s pôvodnými premennými sú potom nazývané *loadingy* komponentu a hodnoty, ktoré reprezentujú jednotlivé vzorky v priestore definovanom novými hlavnými komponentami sa nazývajú skóre komponentov [111].

ATR-FTIR v kombinácii s PCA analýzou bolo využité napríklad pre identifikáciu polymorfných foriem Cimetidínu v komerčne predávaných tabletách. Pre optimalizáciu metódy bolo skúmaných 12 vzoriek obsahujúcich známy polymorf a boli sledované rôzne kombinácie PCA komponentov, pričom za najvhodnejšiu bola zvolená kombinácia, ktorá umožňovala rozdelenie vzoriek jednotlivých polymorfov do zreteľne oddelených regiónov a *loadingsy* zvolených komponentov obsahovali typické píky všetkých polymorfných foriem. Po následnej validácii metódy boli skúmané vlastné vzorky spolu so vzorkami, ktoré boli pri optimalizácii metódy použité ako štandardy. V grafe zobrazujúcom skóre PC2 a PC3 boli vlastné vzorky jednoznačne zaradené do oblasti zoskupujúcej vzorky obsahujúce polymorfnú formu A [112]. Podobným spôsobom bola PCA v kombinácii s FTIR aplikovaná napríklad pre identifikáciu vybraných minerálov [113], či pre identifikáciu pôvodu a spôsobu izolácie lignínov z rôznych zdrojov [114].

Práce spomenuté v predchádzajúcom odstavci využívali PCA analýzu primárne pre zaradenie vzoriek do určitých skupín, no túto metódu je možné využiť aj pre sledovanie interakcií. V jednej štúdií bola napríklad využitá pre sledovanie zosieťovania polyvinylalkoholových filmov v prítomnosti benzoátu sodného za pôsobenia ultrafialového žiarenia. Hoci komponent PC2 predstavoval len 6,89 % variability spektra, práve táto variabilita súvisela s chemickou modifikáciou sledovaných filmov po ožiarení. V *loadingu* tohto komponentu je potom možné vidieť píky pri $1\,383\text{ cm}^{-1}$ (C–H väzby), $1\,427$ a $1\,335\text{ cm}^{-1}$ (OH skupiny a CH_2 valenčné vibrácie) s kladnými hodnotami a tiež píky pri $1\,119$ a $1\,065\text{ cm}^{-1}$ (C–O väzba) s negatívnymi hodnotami. To značí, že po ožiarení klesá intenzita pásov prislúchajúcich C–H a O–H väzbám a zároveň sú tvorené nové C–O väzby [115].

V ďalšej štúdií bol pomocou PCA-FTIR sledovaný vplyv prídavku rôznych rastlinných extraktov na chitosanový film. Na prvý pohľad sa zdalo, že tento prídavok nie je možné pozorovať v FTIR spektrách jednotlivých vzoriek. Pre odhalenie efektu jednotlivých extraktov však bola na získané spektrá aplikovaná PCA analýza, ktorá jednoznačne rozdelila vzorky do oddelených klastrov. Napríklad, vzorky s rôznymi koncentraciami čučoriedkového extraktu boli oddelené hlavne na základe komponentu PC2. Z *loadingu* tohto komponentu potom vyplýva, že zvýšenie obsahu čučoriedkového extraktu je spojené so znížením signálu kyseliny mliečnej alebo jej soli. Na druhej strane, negatívny *loading* koreluje s obsahom čučoriedkového extraktu. Podobné trendy boli sledované aj u ostatných skúmaných extraktov [116].

Ďalšie práce využívajúce PCA analýzu v kombinácii s infračervenou spektroskopiou pre štúdium interakcií alebo štruktúrnych zmien sú potom napríklad [117] a [118].

4 EXPERIMENTÁLNA ČASŤ

4.1 POUŽITÉ POMÔCKY A PRÍSTROJE

- Analytické váhy, Denver Instrument
- Magnetická miešačka, ThermoFisher Scientific
- Lyofilizátor VirTis BenchTop K, BioTrade s.r.o.
- Spektrometer FT-IR Nicolet iS50, ThermoFisher Scientific
- UV-VIS spektrofotometer U-3900H, Hitachi
- Automatický titrátor 888 Titrando, Metrohm
- Dialyzačná membrána Spectra/Por®, Spectrum Laboratories, Inc.
 - MWCO: 100-500 Da
 - Plošná šírka: 31 mm
 - Priemer: 20 mm
 - Objem/dĺžka: 3,1 ml/cm
 - Dĺžka: 10 m
- Dialyzačná membrána Spectra/Por®, Spectrum Laboratories, Inc.
 - MWCO: 100-500 Da
 - Plošná šírka: 16 mm
 - Priemer: 10 mm
 - Objem/dĺžka: 0,79 ml/cm
 - Dĺžka: 10 m
- Bežné laboratórne sklo a pomôcky

4.2 POUŽITÉ CHEMIKÁLIE

- Hydroxid sodný 0,1M (N/10), Lach:Ner; š. PP/2020/05389
- Štandard humínových kyselín IHSS Leonardite; š. 1S104H-5
- Metylénová modrá, Penta; š. 1801300113
- Rhodamin 6G, Sigma Aldrich; š. BCBH1723V
- Septonex, GNB chem, a.s.; š. 706SEP003
- Dodecylsírán sodný, Lach:Ner; š. PP/2017/10925
- Destilovaná voda

4.3 PRÍPRAVA VZORIEK

Celkovo boli prevedené tri rôzne experimenty, počas ktorých boli pripravené komplexy s rôznymi koncentraciami nízkomolekulárnych organických iónov. Pri každom experimente boli všetky zásobné roztoky okrem roztoku NaOH pripravené nanovo. Boli teda 3× pripravené zásobné roztoky HK s koncentráciou vždy 0,1 g/l v 0,01M hydroxide sodnom a roztoky metylénovej modrej, Rhodaminu 6G a Septonexu v destilovanej vode s tromi rôznymi koncentraciami bližšie opísanými v nasledujúcich odstavcoch. Následne boli z pripravených zásobných roztokov vytvorené komplexy dvomi rôznymi spôsobmi – dialýzou zmesi HK a organickej látky proti destilovanej vode a dialýzou roztoku samotnej humínovej kyseliny proti roztoku organickej látky. Získané vzorky komplexov boli nakoniec vysušené pomocou lyofilizácie.

4.3.1 ZÁSObNÉ ROZTOKY

4.3.1.1 HUMÍNOVÉ KYSELINY

Pred prípravou samotného zásobného roztoku HK bol v prvom rade pripravený roztok hydroxidu sodného s koncentráciou 0,01 mol/dm³. Normálny NaOH určený pre prípravu 0,1M roztoku bol

kvantitatívne prevedený do 1 000ml odmernej banky, ktorá bola doplnená destilovanou vodou po rysku. Z takto pripraveného roztoku bolo odpipetovaných 50 ml do 500ml odmernej banky, ktorá bola znovu doplnená po rysku destilovanou vodou pre získanie roztoku NaOH s koncentráciou $0,01 \text{ mol/dm}^3$.

Následne bolo navážených 0,025 g štandardu humínových kyselín IHSS Leonardite, navážka bola kvantitatívne prevedená do 250ml odmernej banky a bola rozpustená v potrebnom množstve $0,01 \text{ M}$ roztoku NaOH pre získanie roztoku s koncentráciou $0,1 \text{ g/l}$. Roztok bol potom 24 hodín miešaný na magnetickej miešačke. Tento postup bol celkovo zopakovaný trikrát, raz pri príprave každého experimentu.

4.3.1.2 METYLÉNOVÁ MODRÁ A RHODAMIN 6G

1. experiment – roztoky s koncentráciou $0,025 \text{ g/l}$ v destilovanej vode

Na analytických váhach bolo navážených $0,0125 \text{ g}$ každého farbiva a navážky boli kvantitatívne prevedené do 500ml odmerných bánk. Banky boli destilovanou vodou doplnené po rysku a roztoky boli po dobu 24 hodín miešané na magnetickej miešačke.

2. experiment – roztoky s koncentráciou $0,25 \text{ g/l}$ v destilovanej vode

Po prevedení prvého experimentu bolo zistené, že je postačujúci menší objem zásobných roztokov a na základe prvotnej analýzy výsledkov získaných z prvého experimentu bola zvolená $10\times$ vyššia koncentrácia organických látok. Na analytických váhach bolo navážených $0,025 \text{ g}$ MB aj R6G a navážky boli kvantitatívne prevedené do 100ml odmerných bánk. Banky boli destilovanou vodou doplnené po rysku a roztoky boli po dobu 24 hodín miešané na magnetickej miešačke.

3. experiment – roztoky s koncentráciou $0,125 \text{ g/l}$ v destilovanej vode

Po predbežnom zanalyzovaní výsledkov získaných v druhom experimente bola pre posledný experiment zvolená stredná koncentrácia organických farbív, teda $5\times$ vyššia ako v prípade prvého experimentu. Na analytických váhach bolo navážených $0,0125 \text{ g}$ metylénovej modrej aj Rhodaminu 6G a navážky boli kvantitatívne prevedené do 100ml odmerných bánk. Banky boli destilovanou vodou doplnené po rysku a roztoky boli po dobu 24 hodín miešané na magnetickej miešačke.

4.3.1.3 SEPTONEX

1. experiment – roztok s koncentráciou $0,2 \text{ g/l}$ v destilovanej vode

Na analytických váhach bolo navážených $0,1 \text{ g/l}$ Septonexu a navážka bola kvantitatívne prevedená do 500ml odmernej banky. Banka bola po rysku doplnená destilovanou vodou a obsah bol 24 hodín miešaný na magnetickej miešačke.

2. experiment – roztok s koncentráciou 2 g/l v destilovanej vode

Rovnako pri príprave tohto roztoku bol postačujúci menší objem ako v prípade prvého experimentu a taktiež bola zvolená $10\times$ vyššia koncentrácia Septonexu ako pri prvom experimente. Na analytických váhach bolo navážených $0,2 \text{ g/l}$ Septonexu a navážka bola kvantitatívne prevedená do 100ml odmernej banky. Banka bola destilovanou vodou doplnená po rysku a obsah bol 24 hodín miešaný na magnetickej miešačke.

3. experiment – roztok s koncentráciou 1 g/l v destilovanej vode

Podobne ako pri príprave roztokov MB a R6G, aj pre roztok Septonexu bola v treťom experimente zvolená $5\times$ vyššia koncentrácia ako v prípade prvého experimentu. Na analytických váhach bolo

navážených 0,1 g/l Septonexu a navážka bola kvantitatívne prevedená do 100ml odmernej banky. Banka bola destilovanou vodou doplnená po rysku a obsah bol 24 hodín miešaný na magnetickej miešačke.

4.3.2 KOMPLEXAČNÉ ROZTOKY

Pre následnú dialýzu proti destilovanej vode boli v objeme 20 ml vytvorené komplexačné roztoky zmiešaním zásobných roztokov HK s roztokmi MB/R6G/Septonexu alebo s destilovanou vodou (slepá vzorka) v objemovom pomere 1 : 1, pričom každý komplex bol pripravený v troch opakovaniach. Tento postup bol zopakovaný pri príprave každého experimentu. V každom experimente bolo teda do 12 nádobiek odpipetovaných po 10 ml zásobného roztoku HK, ku ktorým bolo do troch nádobiek pridaných po 10 ml zásobného roztoku MB, do ďalších troch po 10 ml R6G, do ďalších troch po 10 ml roztoku Septonexu (vždy príslušnej koncentrácie) a do posledných troch nádobiek bolo pridaných po 10 ml destilovanej vody, pričom práve tieto posledné roztoky slúžia ako referenčné alebo slepé vzorky.

Pri dialýze HK proti roztokom jednotlivých organických iónov boli komplexy tvorené priamo počas dialýzy, takže v rámci prípravy bolo iba nachystaných 9 nádobiek s odpipetovanými 10 ml roztoku humínových kyselín.

4.3.3 DIALÝZA

V ďalšom kroku prípravy vzoriek bola dvomi rôznymi spôsobmi prevedená rovnovážna dialýza. V prvom prípade išlo o dialýzu roztokov komplexov proti destilovanej vode, ktorej účelom bolo zabezpečiť odstránenie veľkého množstva voľných (nenaviazaných) nízkomolekulárnych látok z komplexačných roztokov. V druhom prípade bol dialyzovaný roztok čistých humínových kyselín proti roztoku danej nízkomolekulárnej organickej látky, pričom cieľom bolo najmä porovnať koncentráciu organických iónov v dialyzačnom roztoku pred dialýzou a po dialýze a pokúsiť sa tak určiť zdanlivú rovnovážnu konštantu tohto procesu. Vo všeobecnosti sa pri dialýze využíva polopriepustná membrána, ktorá prepúšťa len molekuly menšie ako je jej *cut-off* hodnota (MWCO, z angl. *Molecular Weight Cut-off*), pričom molekuly, ktoré sú schopné prejsť membránou, sú poháňané koncentračným gradientom až do vyrovnania koncentrácie voľných molekúl v okolitom roztoku a vnútri membrány. Schematické znázornenie porovnania oboch použitých spôsobov dialýzy je možné vidieť na Obr. 13.

Dialýza komplexačných roztokov proti destilovanej vode

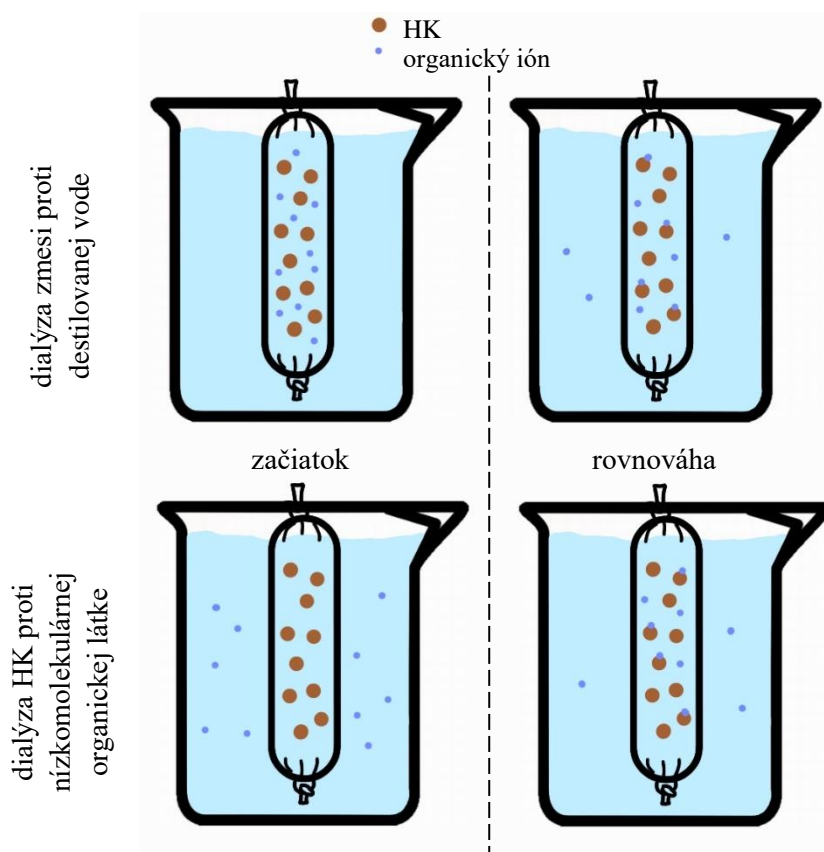
Z dialyzačnej membrány s nominálnou šírkou 31 mm bolo odstrihnutých približne 23 cm a na jednej strane bol urobený pevný uzol pre vytvorenie dialyzačného črievka. Do takto pripravenej membrány bol pomocou lievika prevedený pripravený komplexačný roztok. Z črievka boli nad roztokom odstránené vzduchové bubliny a na hornom konci bolo uzavreté klipsom. Pripravené črievko bolo následne vložené do 5 000ml nádoby obsahujúcej 4 000 ml destilovanej vody, kde prebiehala samotná dialýza. Postup bol opakovaný pre všetkých 12 komplexov v každom experimente, pričom pre každý druh komplexu bola použitá iná nádoba na dialýzu – celkovo boli teda použité 4 nádoby pre každý experiment, v ktorých boli dialyzované vždy po 3 rovnaké komplexy. Dialýza prebiehala približne 48 hodín.

Dialýza roztoku HK proti roztoku nízkomolekulárnym organickým iónom

V troch kadičkách boli pripravené dialyzačné roztoky (dialyzáty) organických látok riedené v pomere 1 : 1 s destilovanou vodou. Do kadičky bolo odpipetovaných vždy 50 ml roztoku nízkomolekulárnej organickej látky, 50 ml destilovanej vody a roztoky boli premiešané. Týmto spôsobom bolo zabezpečené, že pri použití dvojnásobku dialyzátu oproti dialyzovanému roztoku HK

bol zachovaný rovnaký pomer látkových množstiev jednotlivých zložiek ako v prípade dialýzy komplexačných roztokov proti destilovanej vode.

Z takto pripravených dialyzačných roztokov bolo odpipetovaných po 20 ml vždy do troch úzkych plastových nádobiek, v ktorých nakoniec prebiehala dialýza. Dialyzačné črievko bolo pripravené rovnakým postupom ako pri predchádzajúcom spôsobe dialýzy, pomocou lievika do neho bolo prevedených nachystaných 10 ml roztoku humínovej kyseliny a namiesto uzavretia klipsom bolo črievko v hornej časti previazané špagátom. Následne bolo črievko vložené do pripravenej nádoby s dialyzačným roztokom a postup bol opakovaný 3× pre každý druh komplexu. Celkovo bolo teda týmto spôsobom pripravených 9 vzoriek v každom experimente. Dialýza taktiež prebiehala približne 48 hodín. Dialyzačné roztoky po skončení dialýzy boli uchované pre neskoršie UV-VIS meranie.



Obr. 13 Schematické znázornenie použitých dialýz

Po ukončení dialýzy boli roztoky prevedené z dialyzačných črievok do plastových nádobiek a boli uložené do laboratórnej mrazničky. Po kompletnom zmrazení boli následne vzorky lyofilizované pre získanie suchej vzorky bez obsahu vody.

Poznámka: počas prípravy druhého experimentu bola spotrebovaná celá dialyzačná membrána s nominálnou šírkou 31 mm a experiment bol dokončený s membránou s plošnou šírkou 16 mm (s rovnakou hodnotou *cut-off*). Táto membrána bola použitá aj pri treťom experimente a keďže má užší priemer, pri dialýze HK proti organickým iónom v treťom experimente bolo možné použiť úzke skúmavky a dialyzovať 10 ml roztoku HK proti 10 ml dialyzátu, teda roztoky organických iónov už pri tomto spôsobe dialýzy neboli riedené v pomere 1 : 1 s destilovanou vodou. Všetky ostatné body postupu zostali nezmenené.

4.4 UV-VIS ANALÝZA DIALYZAČNÝCH ROZTOKOV MB A R6G

Roztoky metylénovej modrej a Rhodaminu 6G v prípade dialýzy proti roztokom organických iónov boli uchované pre ich následnú UV-VIS analýzu. Z každého experimentu bola teda odložená vzorka roztoku pred začiatkom dialýzy a taktiež všetky dialyzačné roztoky po jej ukončení. Tieto roztoky boli premerané pomocou UV-VIS spektrometrie za použitia prístroja U-3900H od spoločnosti Hitachi. Do kyvety bol prevedený vždy približne 1 ml skúmanej látky a bolo premerané jej absorpčné spektrum. Následne boli zo získaných dát odčítané hodnoty absorbancie v absorpčnom maxime látky a ich príslušné vlnové dĺžky. Známa koncentrácia dialyzátu pred začiatkom dialýzy bola použitá ako jednobodová kalibračná závislosť, ktorou boli prenášobené získané pomery absorbancií roztokov po ukončení dialýzy a pred jej začiatkom a v každom roztoku po dialýze tak bola vypočítaná koncentrácia voľných iónov farbiva. Za predpokladu dosiahnutia rovnováhy sa potom táto hodnota rovná aj koncentrácii voľných iónov farbiva v dialyzačnom črievku. Z týchto hodnôt bola následne vypočítaná zdanlivá rovnovážna konštanta a množstvo naviazaného farbiva na jednotku hmotnosti humínovej kyseliny. Výsledky sú potom diskutované v kapitole 5.2.

4.5 POTENCIOMETRICKÁ TITRÁCIA SEPTONEXU

Keďže Septonex nie je farebná zlúčenina, ktorá by dobre absorbovala UV-VIS žiarenie, pre stanovenie koncentrácie iónov Septonexu v dialyzačných roztokoch, a teda aj rovnovážnych parametrov jeho interakcie s HK musela byť použitá iná metóda. Podobne ako u roztokov v predchádzajúcej kapitole, aj roztoky Septonexu pred začiatkom dialýzy a po jej ukončení (pri dialýze roztoku HK proti roztoku Septonexu) boli uchované pre následnú analýzu. V tomto prípade bola využitá metóda potenciometrickej titrácie s iónovo selektívnou elektródou (ISE) pre tenzidy za použitia automatického titrátoru 888 Titrando od spoločnosti Metrohm. Princípom tejto metódy je zaznamenávanie rozdielu elektrického napätia medzi dvomi elektródami – pracovnou ISE pre tenzidy a referenčnou argentochloridovou elektródou, ktoré sú ponorené v roztoku kladne nabitého Septonexu, ktorý je titrovaný opačne nabitým aniónovým tenzidom SDS s koncentráciou 10 mmol/dm³. Táto metóda bola optimalizovaná v rámci práce [119], kde je uvedený aj konkrétny postup merania. Výstupom tejto analýzy je zisk presných koncentrácií Septonexu v dialyzačných roztokoch po ukončení dialýzy, a teda za predpokladu rovnováhy aj jeho koncentrácie voľných iónov v dialyzačnom črievku. Z týchto hodnôt bola vypočítaná koncentrácia naviazaných iónov Septonexu na HK a následne aj zdanlivá rovnovážna konštanta tejto interakcie a množstvo naviazaného tenzidu na jednotku hmotnosti humínovej kyseliny. Výsledky sú tiež diskutované v kapitole 5.2.

V rámci tejto analýzy bol pripravený roztok SDS s koncentráciou 10 mM použitý ako titračné činidlo. 2,8838 g dodecylsírany sodného bolo navážených na analytických váhach, navážka bola kvantitatívne prevedená do 1000ml odmernej banky a banka bola po rysku doplnená destilovanou vodou. Následne bol roztok miešaný na magnetickej miešačke až do úplného rozpustenia aniónového tenzidu.

4.6 FTIR ANALÝZA

Hlavnou experimentálnou náplňou tejto diplomovej práce bolo meranie pripravených vzoriek pomocou FTIR spektroskopie a následná analýza získaných spektier. Na všetky merania bol využitý prístroj FT-IR Nicolet iS50 od firmy ThermoFisher Scientific a vzorky boli analyzované v rozmedzí vlnočtu 4 000 – 400 cm⁻¹. Jednotlivé vzorky boli analyzované vždy technikou ATR s využitím jednodrazového kryštálu z technického diamantu, s rozlíšením 4 cm⁻¹ a s celkovým počtom akumulovaných skenov 32.

Pred každým meraním bol v prvom rade kryštál a prítlačný kužel očistený destilovanou vodou a následne etanolom. Pred prvým meraním a potom každých približne 45 minút bolo zmerané

pozadie, ktoré predstavoval atmosférický vzduch. Potom bolo na kryštál nanosené malé množstvo vzorky, vzorka bola na povrch kryštálu pritlačená vstupným momentovým prítlakom a bolo prevedené vlastné meranie. Každá pripravená vzorka bola odmeraná 5×, pričom vždy bolo na kryštál nanosené malé množstvo z rôznych náhodných miest vzorky. Z FTIR merania každého experimentu bolo teda získaných 15 spektier pre každý pripravený komplex. Opakované merania boli prevádzané najmä z dôvodu zisku veľkého množstva dát pre možnosť prevedenia PCA analýzy. Týmto postupom boli teda odmerané všetky komplexy po lyofilizácii pripravené v rámci troch rôznych experimentov a taktiež jednotlivé čisté látky, čiže štandard humínových kyselín IHSS Leonardite, metylénová modrá, Rhodamin 6G aj Septonex. Získané spektrá boli nakoniec spracovávané v programe OMNIC od spoločnosti ThermoFisher Scientific a do výslednej grafickej podoby boli upravované v softvéri Origin od spoločnosti OriginLab Corporation. Všetky FTIR spektrá zobrazené v nasledujúcich kapitolách sú priemernými spektrami jednotlivých meraní, získané v softvéri OMNIC pomocou funkcie *Statistical spectra (average)*.

4.7 PCA ANALÝZA

Po získaní FTIR spektier všetkých experimentov bola na dáta aplikovaná analýza hlavných komponentov. Táto analýza bola prevádzaná v domácom programe určenom pre PCA analýzu, ktorý bol napísaný pomocou softvéru MATLAB (MathWorks, USA) na Ústave prístrojovej techniky Akadémie vied Českej republiky [120].

Spektrá z každého experimentu boli osobitne otvorené v tomto programe, rozdelené do skupín podľa druhov jednotlivých komplexov a normalizované na absorpčný pás pri $1\ 013\ \text{cm}^{-1}$, ktorý sa nachádzal s podobnou intenzitou vo všetkých vzorkách komplexov a slepej vzorky (patrí pravdepodobne vibráciám Si-O väzieb anorganických komponentov HK, vid' kapitola 5.1.1). Následne bola prevedená samotná PCA analýza pre určité dvojice alebo trojice komplexov – hlavnou náplňou tejto diplomovej práce bolo vyhodnotenie PCA analýzy dvojice jednotlivých komplexov dialyzovaných proti destilovanej vode a slepej vzorky, ale tiež bola prevedená napríklad súčasná PCA analýza komplexov dialyzovaných oboma spôsobmi a slepej vzorky. Všetky výsledky sú potom diskutované v nasledujúcej kapitole.

5 VÝSLEDKY A DISKUSIA

5.1 FTIR SPEKTRÁ HUMÍNOVÝCH KYSELÍN A AKTÍVNYCH LÁTOK

Hoci hlavnou experimentálnou náplňou tejto diplomovej práce je overenie využitia analýzy hlavných komponentov ako pokročilej techniky spracovania a vyhodnotenia spektrálnych dát (ktorá bola vybraná na základe prevedenej literárnej rešerše s uvažovaním, že metóda dekonvolúcie bola už využitá v mojej BP [1]), a to najmä za účelom sledovania interakcií zodpovedných za vznik komplexov, v prvom rade bola potrebná pomerne podrobná interpretácia jednotlivých FTIR spektier. Práve táto kapitola rozoberá priradenie absorpčných pásov nachádzajúcich sa v spektrách jednotlivých čistých látok použitých pre prípravu komplexov konkrétnym vibráciám väzieb a funkčných skupín.

5.1.1 HUMÍNOVÉ KYSELINY

V tejto kapitole je interpretované získané FTIR spektrum humínových kyselín, a to ako čistých IHSS Leonardite štandardov, tak spektrum „slepej vzorky“, ktorá bola pripravená rovnakým postupom ako všetky komplexy analyzované v nasledujúcich kapitolách. Pri príprave slepej vzorky bol teda štandard HK najskôr rozpustený v roztoku NaOH, následne bol roztok dialyzovaný proti destilovanej vode a nakoniec bola vzorka lyofilizovaná. Tento postup ovplyvnil aj výsledné FTIR spektrum HK, pričom rozdiely medzi jednotlivými spektrami sú diskutované nižšie.

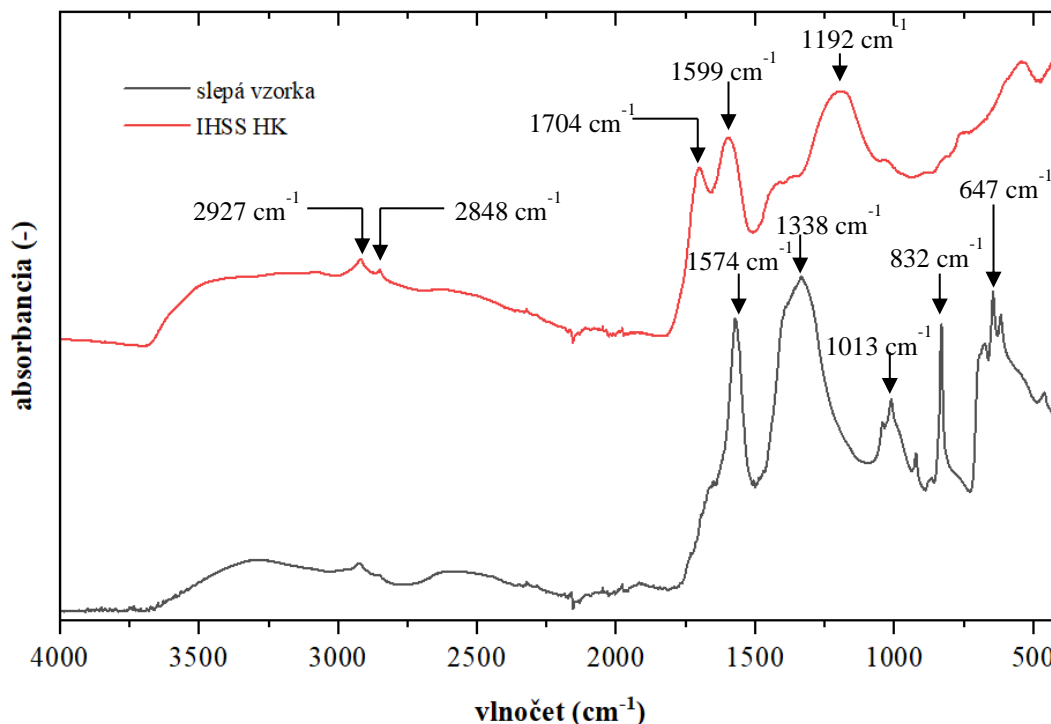
Na základe prác [121; 122] a tabuľky vlnočtov charakteristických vibrácií [46] boli priradené absorpčné pásy v spektre IHSS Leonardite HK vibráciám konkrétnych skupín a tabuľkový prehľad všetkých charakteristických vibrácií je možné nájsť v prílohách (Príloha 1). Na Obr. 14 je možné si všimnúť, že všetky pásy v spektre IHSS HK (červená krivka) sú oblé a pomerne široké, čo by mohlo indikovať príspevok viacerých vibrácií v jednom absorpčnom maxime a taktiež by sa tam mohlo nachádzať viacero prekrývajúcich sa pík. Najširšie absorpčné pásy sú však viditeľné pri $3\,550 - 3\,000\text{ cm}^{-1}$ a pri približne $2\,650 - 2\,450\text{ cm}^{-1}$, pričom prvý patrí valenčným vibráciám O–H väzieb karboxylových kyselín, fenolov, prípadne alifatických alkoholov, s malým príspevkom vibrácií väzieb N–H, zatiaľ čo druhý z vymenovaných pásov patrí overtónovým a kombinačným pásom O–H väzieb karboxylových skupín. Nadmerná šírka týchto pásov je dôsledkom viazania týchto väzieb vodíkovými mostíkmi. Medzi spomenutými širokými pásmi sa nachádzajú dva pomerne ľahko rozlíšiteľné píky, pri $2\,927\text{ cm}^{-1}$ patriaci asymetrickým valenčným vibráciám C–H väzby v skupinách $-\text{CH}_2-$ a pri $2\,848\text{ cm}^{-1}$ patriaci symetrickým valenčným vibráciám týchto skupín.

V oblasti spektra pod $1\,800\text{ cm}^{-1}$ je potom viditeľných niekoľko ďalších absorpčných pásov. Najvýraznejšie sa nachádzajú pri $1\,704\text{ cm}^{-1}$ (valenčné vibrácie C=O väzieb $-\text{COOH}$ skupín, s príspevkom aldehydov, ketónov a v podobe slabých ramien pri vyšších vlnočtoch prípadne tiež karboxylových skupín esterov), pri $1\,599\text{ cm}^{-1}$ (valenčné vibrácie aromatických C=C väzieb) a široký pík pri $1\,192\text{ cm}^{-1}$ (valenčné vibrácie C–O a deformačné vibrácie $-\text{OH}$ väzieb primárne v karboxylových skupinách, opäť s príspevkom ďalších kyslíkatých skupín v štruktúre HK).

Pri priblížení spektra v oblasti $1\,750 - 700\text{ cm}^{-1}$ v softvéri na spracovanie spektier, akým je napríklad používaný program OMNIC, je možné nájsť ešte ďalšie náznaky jednotlivých pík, ktoré pri prvom pohľade na celé spektrum nie sú úplne viditeľné. Jedným z takýchto pík je napríklad absorpčný pás pri $1\,650\text{ cm}^{-1}$, ktorý by mal patriť valenčným vibráciám C=O väzieb amidických skupín, s príspevkom chinónov a konjugovaných ketónov. Ďalej je možné nájsť malé píky pri $1\,414\text{ cm}^{-1}$ (deformačné vibrácie C–H väzieb v $-\text{CH}_2$ a $-\text{CH}_3$ skupinách), pri $1\,365\text{ cm}^{-1}$ (symetrické deformačné vibrácie C– CH_3 alifatických skupín, prípadne symetrické valenčné vibrácie skupiny

–COO⁻) a pri 1 036 cm⁻¹ (valenčné vibrácie C–C väzieb alifatických reťazcov, prípadne C–O väzby alkoholov a alifatických esterov).

V oblasti pod 1 000 cm⁻¹ je potom možné nájsť pásy prislúchajúce mimorovinným deformačným vibráciám aromatických C–H väzieb, ktorých náznaky je možné vidieť pri 888, 832 a 763 cm⁻¹, pričom pri nižších vlnočtoch sa nachádzajú vibrácie menej substituovaných aromatických kruhov.



Obr. 14 Porovnanie FTIR spektier humínovej kyseliny IHSS Leonardite a slepej vzorky

Ako už bolo načrtnuté vyššie, v spektre slepej vzorky je jasne viditeľných niekoľko zmien oproti spektru štandardu humínovej kyseliny. V nasledujúcich riadkoch je dokázané, že tieto spektrálne zmeny naznačujú najmä disociáciu veľkej časti –COOH skupín humínových kyselín na karboxylátové anióny po interakcii humínovej kyseliny s rozpúšťadlom NaOH.

V oblasti spektra 3 550 – 2 450 cm⁻¹ sú viditeľné iba minimálne zmeny oproti spektru IHSS štandardu, a to najmä v tvare širokých píkov skupín viazaných vodíkovými mostíkmi. Všetky absorpčné maximá sa nachádzajú na približne rovnakom mieste ako v spektre štandardu, píky sa však zdajú byť obľejšie a užšie, čo by mohlo naznačovať menší počet väzieb viazaných vodíkovými mostíkmi. Je to prvý zo znakov poukazujúcich na disociáciu niekoľkých karboxylových skupín.

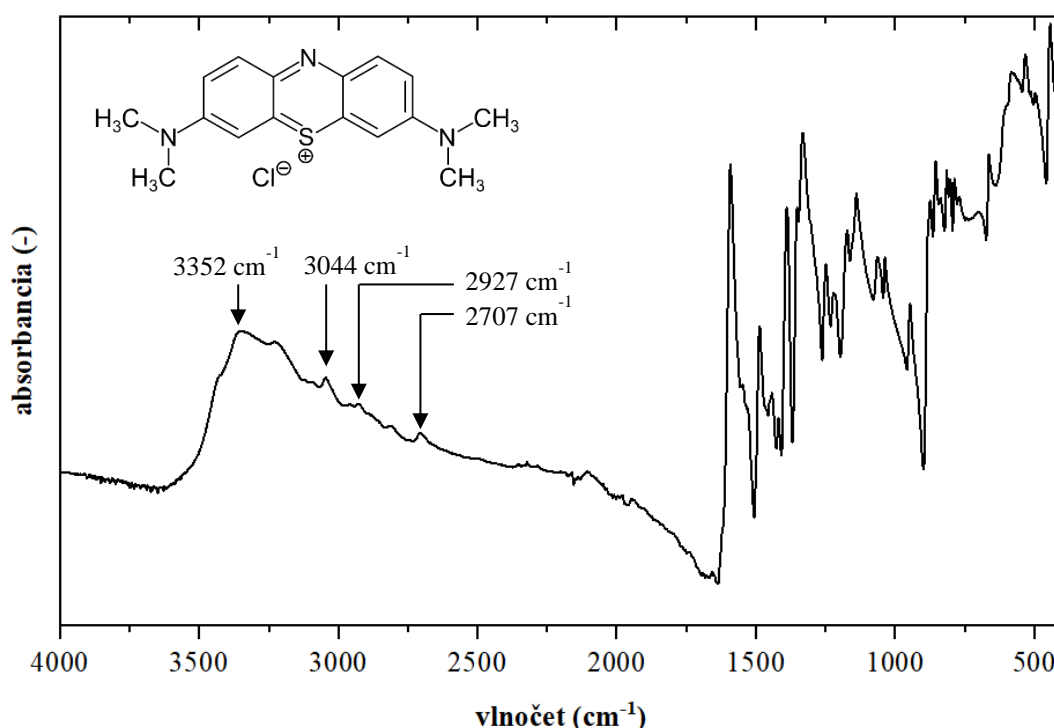
Veľkou zmenou v spektre pri nižších vlnočtoch je zdanlivá absencia píku pri 1 704 cm⁻¹, teda vibrácií najmä C=O karboxylových skupín. Tento pík je pravdepodobne potlačený veľmi vysokou intenzitou píku pri 1 574 cm⁻¹, ktorý predstavuje práve asymetrické valenčné vibrácie aniónu –COO⁻. Naľavo od tohto maxima je však možné vidieť rameno píku medzi 1 700 – 1 640 cm⁻¹, v ktorom sú pravdepodobne obsiahnuté pásy nachádzajúce sa v tejto oblasti u čistých IHSS štandardov, majúce však v spektre slepej vzorky oveľa nižšiu intenzitu.

Pri 1 338 cm⁻¹ je možné nájsť maximum širokého píku, ktorý je vyvolaný hlavne symetrickými valenčnými vibráciami –COO⁻ skupín. Tento pás pravdepodobne ukrýva aj druhý pík valenčných asymetrických vibrácií –COO⁻ skupín medzi 1 412 – 1 390 cm⁻¹ [122] predstavujúcich jeho rameno.

V oblasti pod $1\,045\text{ cm}^{-1}$ je potom možné nájsť píky, ktoré už boli opísané v spektre štandardu humínovej kyseliny, väčšina z nich sa však javí v spektre slepej vzorky intenzívnejšie. Okrem toho je tu viditeľný tiež pás pri $1\,013\text{ cm}^{-1}$, ktorý pravdepodobne patrí vibráciám Si-O väzieb anorganických komponentov humínových kyselín. Tento pík sa potom nachádza aj v spektrách všetkých sledovaných komplexov.

5.1.2 METYLÉNOVÁ MODRÁ

Metylénová modrá bola vybraná ako jeden z modelových zástupcov heterocyklických aromatických zlúčenín. Jej infračervené spektrum a štruktúru je možné vidieť na Obr. 15 a kvôli väčšej prehľadnosti je priložený aj Obr. 16 zobrazujúci oblasť spektra v rozmedzí $1\,700 - 400\text{ cm}^{-1}$, kde sa nachádza veľké množstvo píkov. FTIR spektrum tejto látky bolo interpretované najmä na základe práce [99] a jednotlivé vibrácie priradené konkrétnym vlnčotom je možné nájsť tiež v tabuľke v prílohách (Príloha 1).

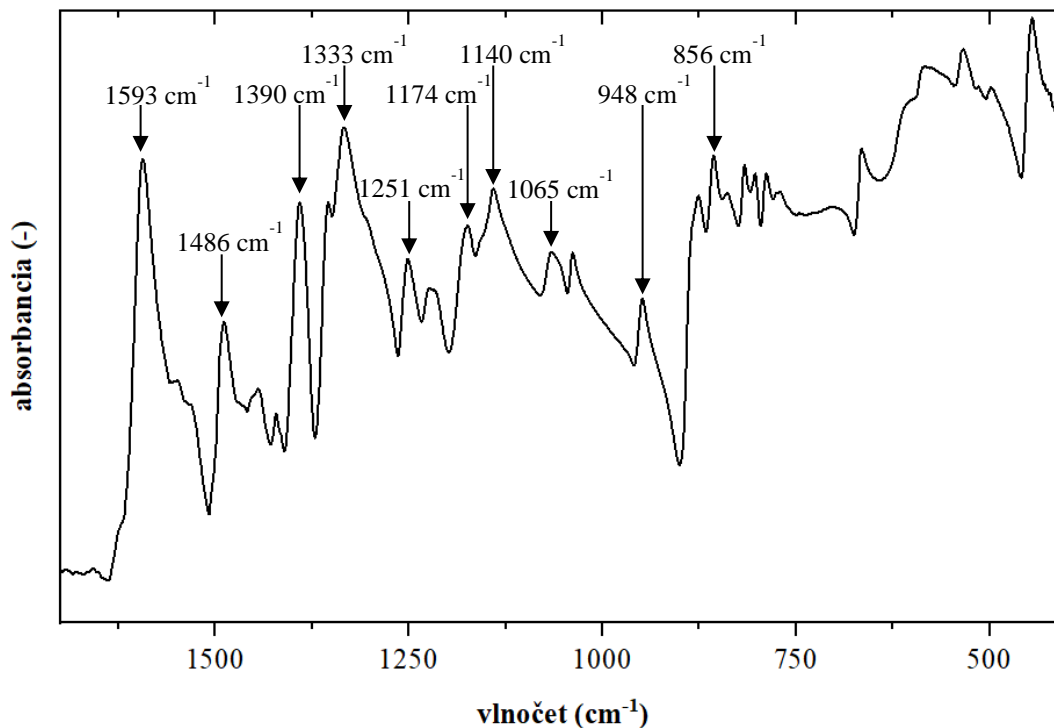


Obr. 15 FTIR spektrum a štruktúra metylénovej modrej

Hoci táto látka nedisponuje žiadnymi O-H skupinami, v oblasti spektra medzi $3\,430 - 3\,160\text{ cm}^{-1}$ je viditeľný široký absorpčný pás valenčných vibrácií O-H skupín, ktoré sú pravdepodobne viazané s atómami dusíka dimetylaminu skupiny alebo heterocyklu pri tvorbe hydrátov metylénovej modrej. Vlnčot $3\,044\text{ cm}^{-1}$ je asociovaný s valenčnými vibráciami heterocyklických C-H väzieb a malé píky pri $2\,927$ a $2\,887\text{ cm}^{-1}$ potom patria asymetrickým a symetrickým valenčným vibráciám $-\text{CH}_3$ skupín. Pri vlnčotoch $2\,815$ a $2\,707\text{ cm}^{-1}$ je možné nájsť píky vyvolané vibráciou N-C väzieb v skupinách $-\text{N}-(\text{CH}_3)_2$, pričom pík pri nižšom vlnčote predstavuje tieto väzby viazané vodíkovými mostíkmi.

V oblasti spektra pod $1\,600\text{ cm}^{-1}$ sa nachádza veľké množstvo absorpčných pásov, ktoré sú najlepšie viditeľné na Obr. 16. Prvým z nich je takmer najintenzívnejší pík pri $1\,593\text{ cm}^{-1}$, ktorý prislúcha heterocyklickým valenčným vibráciám C=N a C=C väzieb. Ďalšie pásy vyvolané vibráciami heterocyklického jadra je potom možné nájsť pri $1\,486$ a $1\,354\text{ cm}^{-1}$ (C=S⁺), $1\,223$ a 816 cm^{-1} (C-C), $1\,140\text{ cm}^{-1}$ (C-N) a pri 948 , 876 a 856 cm^{-1} vibrujú dusíkové atómy heterocyklu viazané

vodíkovými väzbami k OH skupinám. V spektre je obsiahnutých aj množstvo pásov patriacich rôznym vibráciám rôznych C–H väzieb – napríklad pri 1 446, 1 390, 1 251, 1 174 alebo 802 cm^{-1} . Konkrétny typ jednotlivých vibrácií je možné nájsť v prehľadovej tabuľke v prílohách (Príloha 1). Pri vlnótoch 1 065 a 1 038 cm^{-1} absorbujú väzby C–S–C a konkrétne ide o ich asymetrické valenčné vibrácie.



Obr. 16 FTIR spektrum metylénovej modrej v oblasti 1 700 – 400 cm^{-1}

5.1.3 RHODAMIN 6G

Rhodamin 6G je organické farbivo a bol vybraný ako ďalší modelový zástupca aromatických organických iónov. Jeho FTIR spektrum a štruktúru je možné vidieť na Obr. 17 a priblíženie spektra v oblasti 1 800 – 400 cm^{-1} je zobrazené na Obr. 18. Toto spektrum bolo interpretované na základe prác [123; 124; 125] a tabuľky vlnótoch charakteristických vibrácií [46] a všetky priradené absorpčné pásy sú okrem bližšej analýzy nižšie uvedené aj v prehľadovej tabuľke v prílohách (Príloha 2).

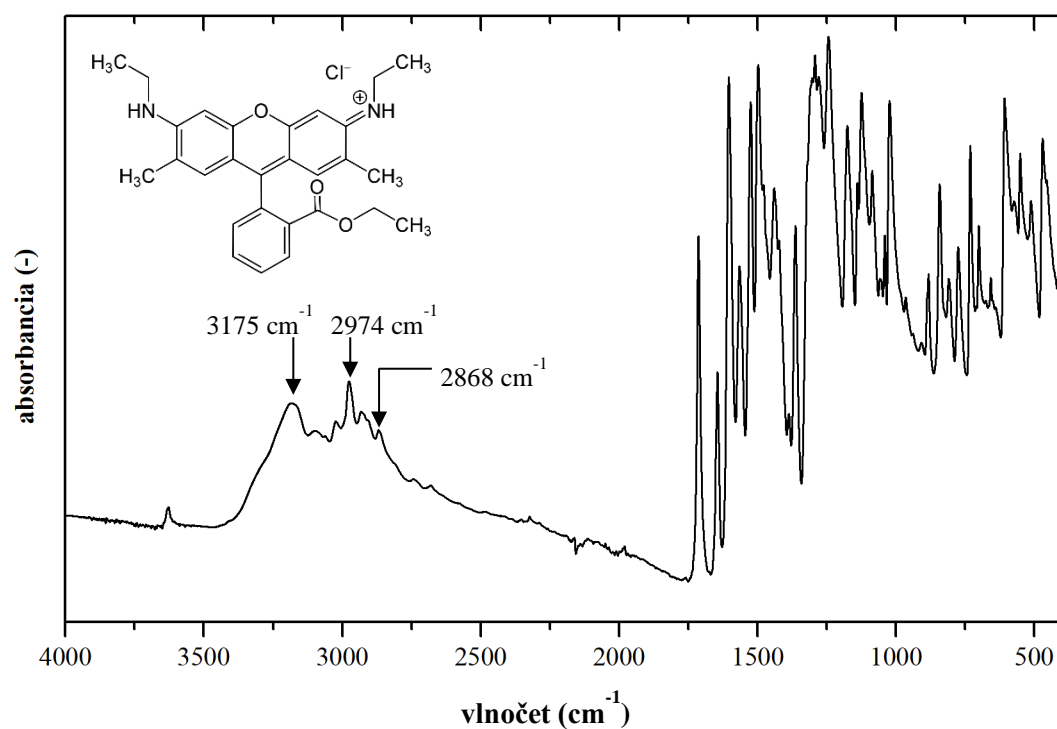
V oblasti vysokých vlnótoch je možné nájsť široký absorpčný pás s maximom pri 3 175 cm^{-1} patriaci valenčným vibráciám N–H väzby. Tento pás je rozšírený z dôvodu viazania týchto väzieb vodíkovými mostíkmi. Ďalej sa tu tiež nachádzajú píky rôznych valenčných vibrácií C–H väzieb, ktoré boli popísané už aj pri predchádzajúcich látkach, a to konkrétne pri 3 020, 2 974, 2 925 a 2 868 cm^{-1} .

Pri nižších vlnótoch zobrazených na Obr. 18 je prvým významným píkom pás pri 1 713 cm^{-1} patriaci valenčným vibráciám C=O väzby v esterových väzbách. Ďalšie vibrácie esterových väzieb je potom možné nájsť pri 1 279, 1 243 či 1 176 cm^{-1} . Taktiež pri 1 023 cm^{-1} absorbuje väzba C–O, tentokrát však ide o jednoduchú väzbu nezahrňujúcu karbonylový uhlík.

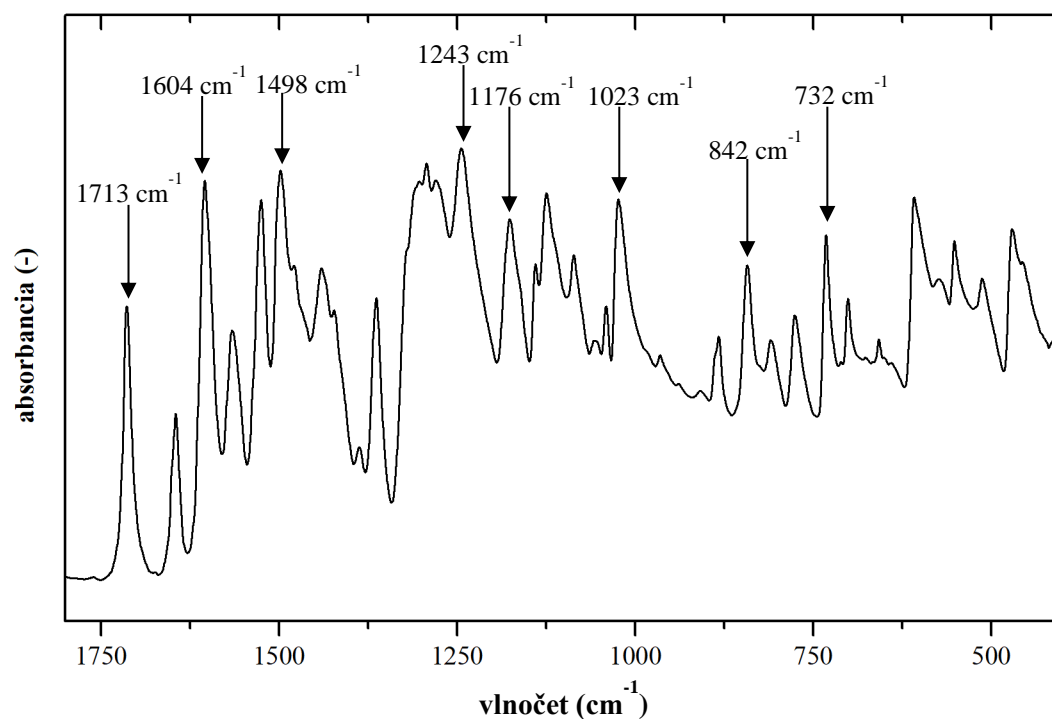
Veľmi výrazné sú v spektre vibrácie kostry aromatického kruhu, teda najmä C=C väzieb, ktoré absorbujú pri 1 604, 1 565, 1 498 a 1 440 cm^{-1} . Vibrácie aromatických C–H väzieb sa potom nachádzajú pri 1 086 cm^{-1} a pri ostatných vlnótoch pod 1 000 cm^{-1} .

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Okrem už spomenutých absorpčných pásov spektrum Rhodaminu 6G obsahuje ešte absorpčné pásy vyvolané valenčnými (pri $1\,302\text{ cm}^{-1}$) a rovinnými deformačnými ($1\,525\text{ cm}^{-1}$) vibráciami C–N väzby a pík nožničkových deformačných vibrácií skupiny NH_2 je možné vidieť pri $1\,645\text{ cm}^{-1}$.



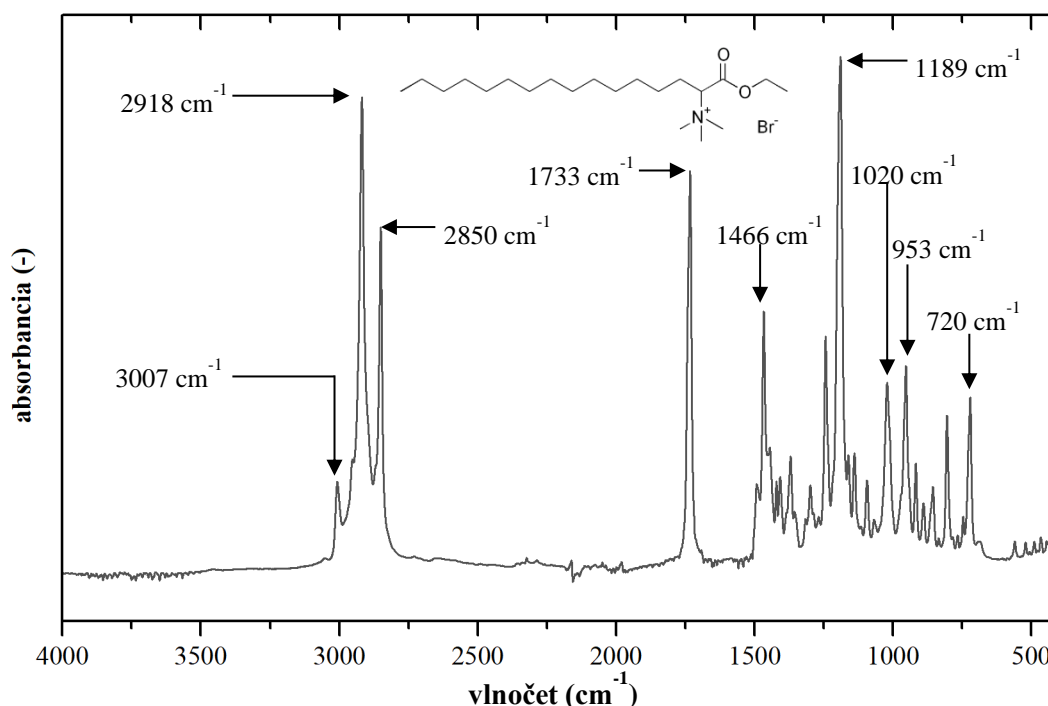
Obr. 17 FTIR spektrum a štruktúra Rhodaminu 6G



Obr. 18 FTIR spektrum Rhodaminu 6G v oblasti $1\,800\text{--}400\text{ cm}^{-1}$

5.1.4 SEPTONEX

Septonex, alebo tiež *karbethopendecinium bromid*, je povrchovo aktívna látka, konkrétne kvartérna amóniová zlúčenina, ktorá sa využíva ako antiseptikum alebo dezinfekčná látka. V tejto diplomovej práci bol zvolený ako zástupca alifatického organického kationu. Obr. 19 zobrazuje celé FTIR spektrum a štruktúru tejto zlúčeniny a prehľadová tabuľka charakteristických vibrácií je priložená v prílohách (Príloha 2). Táto kapitola sa venuje interpretácii infračerveného spektra Septonexu, ktorá bola vypracovaná s prihliadnutím k prácam [126; 127; 128] a [46].



Obr. 19 FTIR spektrum a štruktúra Septonexu

Prvým píkom viditeľným v spektre Septonexu je pás pri $3\,007\text{ cm}^{-1}$ patriaci asymetrickým valenčným vibráciám (N–CH₃) väzieb. Vedľa neho sa nachádzajú typické píky alifatických C–H väzieb, ktoré boli opisované už aj v predchádzajúcich kapitolách, u Septonexu sa však vyznačujú svojou veľmi vysokou intenzitou. Konkrétne ide teda o malý pík pri $2\,954\text{ cm}^{-1}$ a ďalej spomínané intenzívne píky pri $2\,918$ a $2\,850\text{ cm}^{-1}$.

Ďalšie charakteristické znaky infračerveného spektra Septonexu tvorí esterová väzba, so silným píkom valenčných vibrácií C=O pri $1\,733\text{ cm}^{-1}$ a s taktiež pomerne intenzívnymi píkami C–O väzby pri $1\,247$, $1\,189$ a $1\,094\text{ cm}^{-1}$ (symetrické aj asymetrické valenčné vibrácie).

Septonex sa potom vyznačuje aj ďalšími absorpčnými pásmi, ako napríklad pri $1\,494\text{ cm}^{-1}$ (deformačné vibrácie väzby N–CH₃), $1\,466\text{ cm}^{-1}$ (nožničkové deformačné vibrácie CH₂ skupiny), $1\,444$ a $1\,409\text{ cm}^{-1}$ (postupne deformačné vibrácie C–CH₃ a N–CH₃ väzieb), pri $1\,367\text{ cm}^{-1}$ sa nachádzajú vejárové vibrácie CH₂ a valenčné vibrácie väzby C–N je možné nájsť pri $1\,020$ a 917 cm^{-1} . Pri vlnochte 720 cm^{-1} sa potom nachádza absorpčný pás kyvadlových deformačných vibrácií CH₂ skupín, ktorý je typický pre uhlíkovíky s dlhým uhlíkovým reťazcom.

5.2 CHARAKTERIZÁCIA VZNIKU KOMPLEXOV

Pomocou UV-VIS analýzy a potenciometrickej titrácie boli charakterizované rovnovážne parametre komplexov pripravených dialýzou roztoku HK proti roztokom jednotlivých organických polutantov (iónov). Medzi stanovované parametre patrí napríklad ich zdanlivá rovnovážna konštanta pri rôznych použitých koncentráciách organických iónov, alebo množstvo naviazanej organickej látky na jednotku hmotnosti humínovej kyseliny. Výsledky tejto analýzy sú uvedené v Tab. 3, pričom priemerné hodnoty aj smerodajná odchýlka (STD) boli počítané vždy z troch meraní.

V prípade UV-VIS analýzy boli zo známej molárnej koncentrácie dialyzačného roztoku pred začiatkom dialýzy a nameranej absorbancie všetkých roztokov metylénovej modrej a Rhodaminu 6G pred dialýzou aj po jej ukončení vypočítané koncentrácie voľnej organickej látky v dialyzačnom roztoku, a teda aj v roztoku humínovej kyseliny vnútri dialyzačného črievka, keďže bolo predpokladané dosiahnutie rovnovážneho stavu. Rovnako sa postupovalo aj v prípade potenciometrickej titrácie roztokov Septonexu, tu však bola získaná priamo koncentrácia voľných iónov v roztoku, ktorá nemusela byť prepočítavaná cez nameranú absorbanciu. Následne bola vypočítaná koncentrácia organickej látky naviazanej na HK podľa vzťahu (4) a z týchto hodnôt bola nakoniec získaná aj zdanlivá rovnovážna konštanta K_{app} podľa rovnice (5).

$$c_{\text{viazané}} = \frac{c_1 \cdot V_1 - c_{\text{voľné}} \cdot (V_1 + V_2)}{V_2}, \quad (4)$$

kde c_1 je známa koncentrácia dialyzačného roztoku pred začiatkom dialýzy, V_1 je objem dialyzačného roztoku a V_2 je objem roztoku HK v dialyzačnom črievku.

$$K_{app} = \frac{c_{\text{viazané}}}{c_{\text{voľné}}}. \quad (5)$$

Zdanlivá rovnovážna konštanta teda vyjadruje pomer koncentrácie naviazaných a voľných iónov v roztoku humínových kyselín po dialýze.

Tab. 3 Vypočítané rovnovážne parametre pripravených komplexov

komplex	experiment	K_{app} (-)		(g OP)/(1 g HK)	
		priemer	STD	priemer	STD
HK + MB	1.	100,5	26,3	0,2	$1,6 \cdot 10^{-3}$
	2.	2,1	1,1	1,0	0,3
	3.	2,8	0,4	0,8	$4,6 \cdot 10^{-2}$
HK + R6G	1.	0,9	0,5	0,1	$2,4 \cdot 10^{-2}$
	2.	0,8	1,1	0,4	0,6
	3.	0,8	$7,2 \cdot 10^{-3}$	0,4	$2,4 \cdot 10^{-3}$
HK + Septonex	1.	11,3	5,0	1,4	0,1
	2.	0,8	0,2	5,1	1,3
	3.	1,4	$5,6 \cdot 10^{-2}$	4,7	0,1

Zo získaných výsledkov je možné vyčítať niekoľko zaujímavých informácií. V prvom rade bolo dokázané, že sa na humínové látky naozaj určité množstvo organických iónov viaže a sú tvorené komplexy. Zároveň je možné vidieť, že HK majú vyššiu afinitu k metylénovej modrej ako k Rhodaminu 6G. U výsledkov tretieho experimentu, teda experimentu s prostrednou koncentráciou organických iónov, boli získané najnižšie smerodajné odchýlky, čo značí, že výsledky boli najreprodukovateľnejšie. Napríklad z tohto experimentu vyplýva, že pri rovnakej počiatkovej koncentrácii zásobných roztokov MB a R6G, konkrétne 0,125 g/l, sa pri tvorbe komplexov na 1 g HK naviazalo 0,8 g metylénovej modrej, ale iba 0,4 g rhodaminu. Taktiež zdanlivé rovnovážne konštanty sú u metylénovej modrej vyššie ako konštanty Septonexu a najmä R6G a zároveň sú vyššie

ako 1, čo poukazuje na fakt, že je vo finálnom roztoku viac látky naviazanej ako voľnej. Veľký rozdiel medzi hodnotou rovnovážnej konštanty pri jednotlivých koncentráciách u MB značí, že na začiatku reakcie sú pravdepodobne využité najdostupnejšie väzobné miesta a teda po naviazaní určitého počtu molekúl sa už MB nedokáže na HK viazať tak jednoducho, ako na začiatku reakcie.

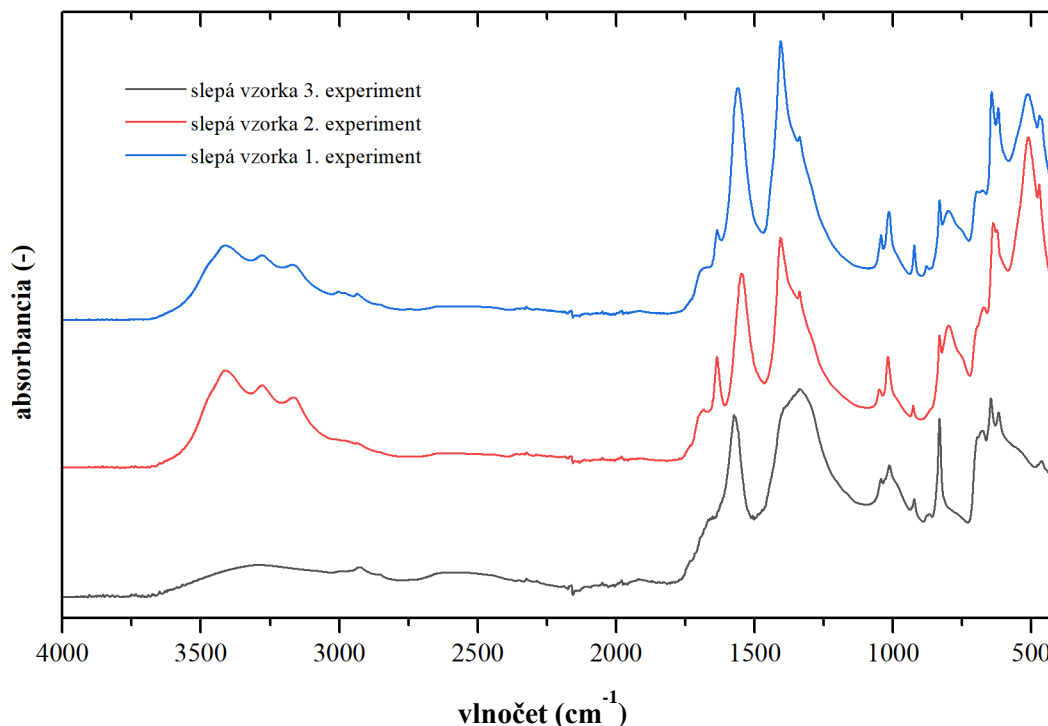
Tiež u komplexu so Septonexom je možné vidieť pomerne vysoké zdanlivé rovnovážne konštanty (najmä v prípade prvého a tretieho experimentu), ktoré tiež klesajú so stúpajúcou koncentráciou. Pri strednej koncentrácii Septonexu (1 g/l) je na jeden gram humínovej kyseliny naviazaných až 4,7 g Septonexu, no pri koncentrácii 2 g/l už je to iba o 0,4 g viac, a teda 5,1 g Septonexu na gram HK.

Analýza prevedená v tejto kapitole bola využitá pre stručnú charakterizáciu tvorby komplexov a najmä pre overenie potenciálu odhalenia interakcií vo vytvorených komplexoch, ktorý bol potvrdený. Je možné zhodnotiť, že interakcie by mali byť určite pozorovateľné u komplexov s metylénovou modrou a so Septonexom, zatiaľ čo u komplexov s Rhodaminom 6G by mohli byť pozorovateľné len do menšej miery, pretože sa vo vzorkách nachádza viac nenviazaných ako viazaných iónov rhodaminu. Tiež z týchto meraní vyplýva, že pre podrobnejšiu analýzu by mali byť najvhodnejšie vzorky so strednou koncentráciou pripravené v treťom experimente, pretože predstavujú vhodný balans medzi množstvom naviazanej a voľnej látky vo vzorke. Pre získanie štatisticky významných výsledkov by však bolo potrebné experimenty previesť vo viacerých opakovaniach a taktiež optimalizovať postup dialýzy a overiť, či bola v jednotlivých systémoch naozaj dosiahnutá rovnováha.

5.3 POROVNANIE EXPERIMENTOV A VÝBER VHODNÝCH KONCENTRÁCIÍ KOMPLEXOV

Z čistých látok, ktorých infračervené spektrá boli interpretované v predchádzajúcej kapitole, boli vytvorené komplexy vždy s tromi rôznymi koncentraciami nízkomolekulárneho organického iónu. Napriek tomu, že okrem rozdielnej navážky bol pri každom experimente zachovaný rovnaký postup, jednotlivé získané spektrá sa naprieč experimentami líšia, a to v znakoch, ktoré nie sú typické iba pre zvyšujúcu sa koncentráciu.

Táto nezhoda medzi jednotlivými spektrami je najlepšie pozorovateľná na spektrách slepej vzorky, ktoré boli pripravené rovnakým spôsobom pri príprave každého experimentu, a teda bolo získaných 9 vzoriek pripravených podľa rovnakého postupu v troch rôznych dňoch. Každá vzorka bola pomocou FTIR spektroskopie premeraná 5× a následne bolo z každého experimentu (teda vždy z 15 vzoriek) vypočítané priemerné spektrum. Tieto priemerné spektrá je možné vidieť na Obr. 20 a je na prvý pohľad zrejmé, že sa medzi sebou líšia.



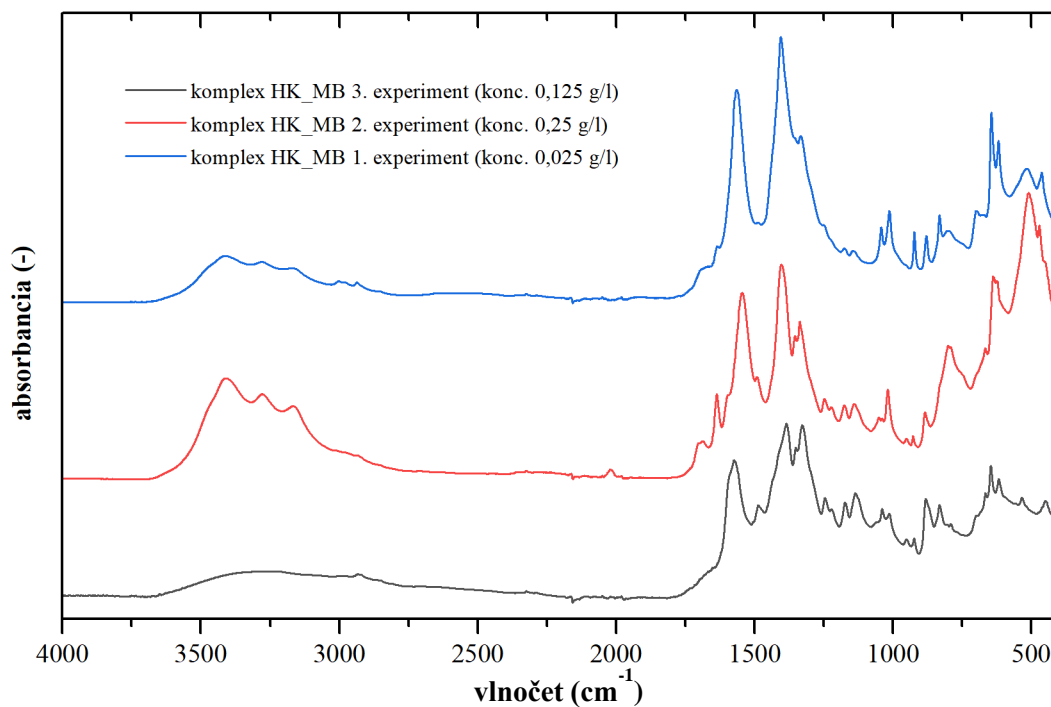
Obr. 20 FTIR spektrá slepých vzoriek získaných v rámci jednotlivých experimentov

Najväčší rozdiel je medzi spektrom získanom v treťom experimente a zvyšnými dvomi vzorkami. Napriek tomu bolo zhodnotené, že práve spektrum získané v 3. experimente je pre nasledujúce analýzy najvhodnejšie. U spektier získaných v prvých dvoch experimentoch je ich zvláštnym znakom trojica oblúkov v širokom absorpčnom páse pri 3 500 – 3 100 cm⁻¹, pričom podobný trend bol sledovaný aj u spektier všetkých komplexov. Je to znakom proteínových štruktúr, ktoré sa buď z nejakého dôvodu odkrývajú zo supramolekulovej štruktúry humínových látok, alebo sú spôsobené určitou mikrobiálnou kontamináciou. Taktiež je v spektre slepej vzorky 3. experimentu pozorovaná absencia píku pri 1 638 cm⁻¹, čo je ale podobne ako vzhľad spomínaného širokého absorpčného pásu nad 3 000 cm⁻¹ v súlade s výsledkami získanými už v bakalárskej práci [1], kde bola vzorka pripravovaná rovnakým spôsobom. S najväčšou pravdepodobnosťou teda ide o mikrobiálnu kontamináciu a v budúcnosti by jej bolo možné zamedziť napríklad prídavkom azidu sodného k pripravovaným vzorkám. Pre vylúčenie vplyvu spôsobu prípravy vzorky na pozorované spektrá boli premerané tiež FTIR spektrá používanej dialyzačnej membrány a buničiny, ktorá bola používaná na prekrytie vzorky počas lyofilizácie. Tieto spektrá sú priložené v prílohách (Príloha 3) a je možné z nich vyčítať, že na vznik vyššie popisovaných štruktúr vplyv použité materiály nemali.

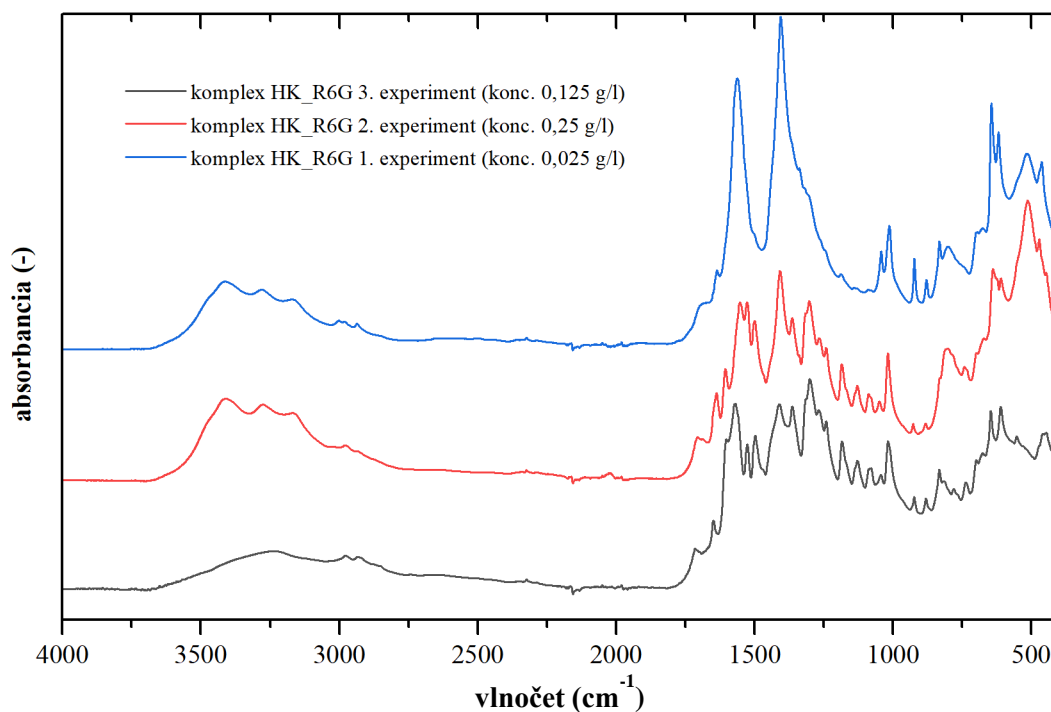
Ako už bolo spomenuté, podobné znaky boli sledované aj u vzoriek komplexov a je to jeden z dôvodov, prečo bola za najvhodnejšiu koncentráciu pre podrobnejšiu interpretáciu zvolená prostredná koncentrácia a teda vzorky pripravené v treťom experimente. V nasledujúcich obrázkoch sú porovnané komplexy pripravené v rámci jednotlivých experimentov, pričom u všetkých je možné pozorovať, že pri najmenšej koncentrácii sú v spektre absorpčné pásy patriace nízkomolekulárnej organickej látke len veľmi málo rozoznateľné. Práve preto bola po prvom experimente koncentrácia zdvihnutá 10× a čo sa týka samotných FTIR spektier, experimenty s najvyššou a strednou koncentráciou dali okrem už popisovaných problémov veľmi porovnateľné výsledky.

Aj samotná PCA analýza rozobraná v nasledujúcich kapitolách potvrdila, že interpretácia výsledkov je najlepšie aplikovateľná na spektrá komplexov so strednou koncentráciou organického iónu. V tejto kapitole sú pre prehľadnosť uvedené iba spektrá komplexov pripravených dialýzou proti destilovanej

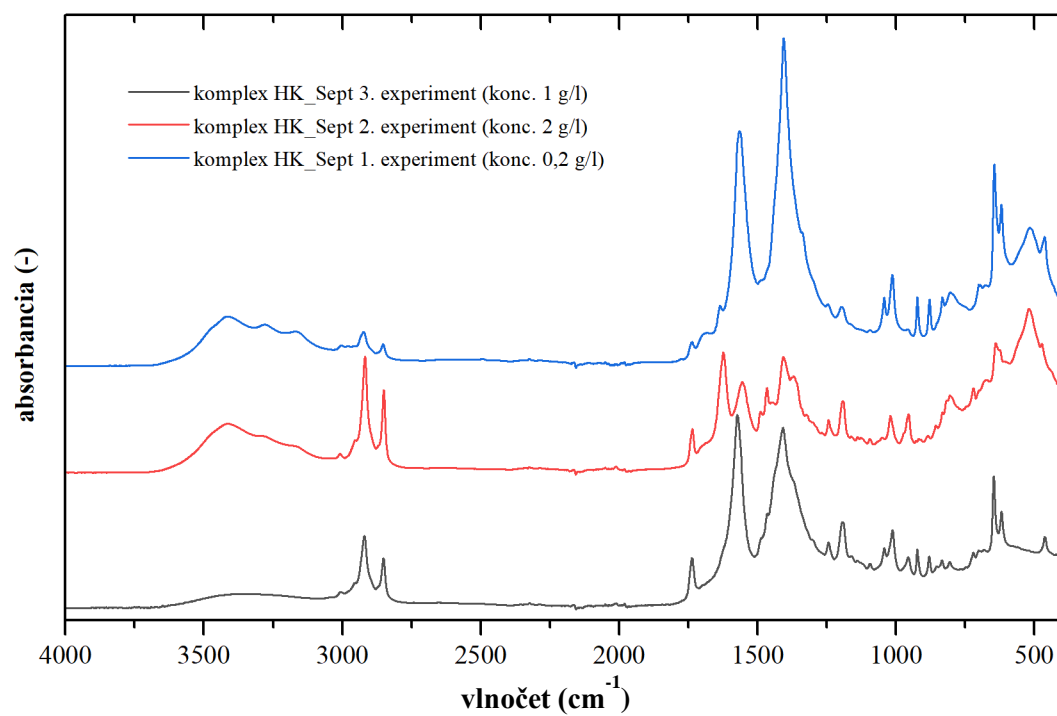
vode, pričom obdobné grafy pre komplexy dialyzované proti organickým iónom sú uvedené v prílohách (Príloha 4 – Príloha 6).



Obr. 21 Porovnanie FTIR spektier komplexov HK a MB pripravených dialýzou proti vode s rôznymi koncentraciami organického iónu



Obr. 22 Porovnanie FTIR spektier komplexov HK a R6G pripravených dialýzou proti vode s rôznymi koncentraciami organického iónu



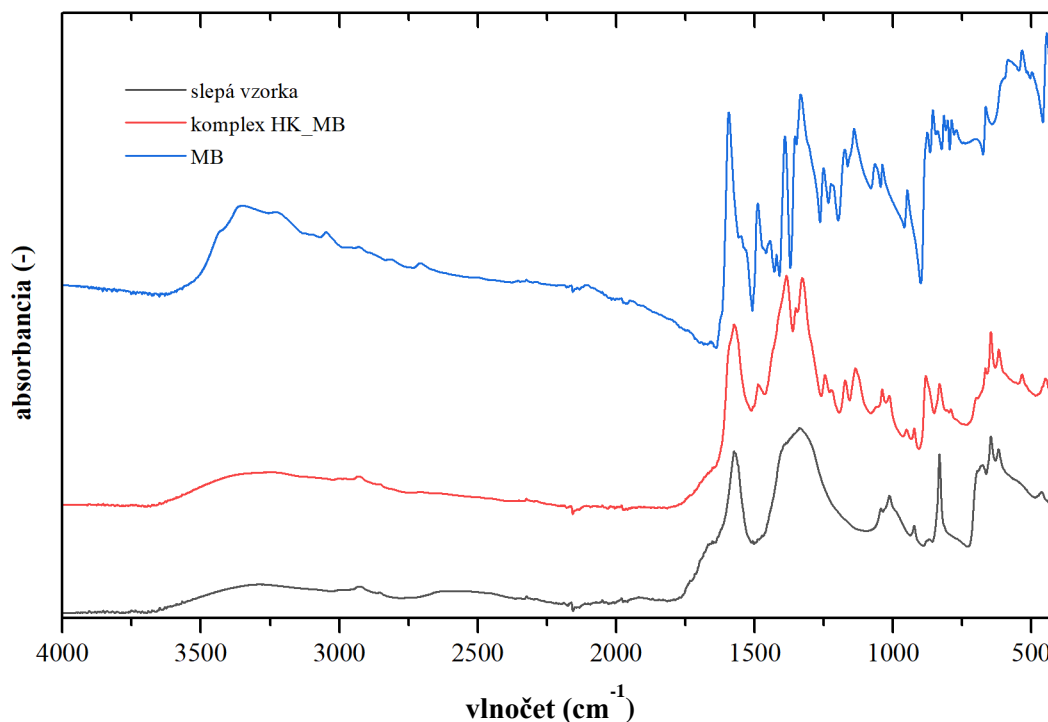
Obr. 23 Porovnanie FTIR spektier komplexov HK a Septonexu pripravených dialýzou proti vode s rôznymi koncentraciami organického iónu

5.4 PCA POROVNANIE KOMPLEXOV A SLEPEJ VZORKY

Hlavnou náplňou experimentálnej činnosti tejto diplomovej práce bolo prevedenie analýzy hlavných komponentov na získaných spektrách. PCA bola teda aplikovaná na všetky spektrá, pričom vždy boli porovnávané vhodné dvojice látok. Táto kapitola, z ktorej je možné vyvodit' najzaujímavejšie závery, sa zaoberá porovnávaním vždy jednotlivého komplexu HK a organickej látky pripraveného dialýzou proti destilovanej vode so slepou vzorkou (samotnou HK po podstúpení rovnakého postupu prípravy ako komplexy). Ako už bolo opísané v predchádzajúcej kapitole, získané dáta v rámci jednotlivých prevedených experimentov sa z rôznych dôvodov mierne líšia, preto sú analyzované najmä výsledky experimentu so strednou koncentráciou organických látok – teda 0,125 g/l u MB a R6G a 1 g/l u Septonexu. Výsledky pre ostatné koncentrácie sú uvedené v prílohách (Príloha 7 – Príloha 16).

Spektrá jednotlivých čistých látok už boli interpretované v kapitole 5.1 a preto je táto kapitola zameraná výhradne na interpretáciu výsledkov PCA analýzy a jej využitie pre sledovanie interakcií v komplexných zlúčeninách. Pre väčšiu prehľadnosť bola PCA v tejto kapitole prevedená v dvoch rôznych častiach spektra, v rozsahu 600 – 1 800 cm^{-1} a 2 200 – 3 600 cm^{-1} .

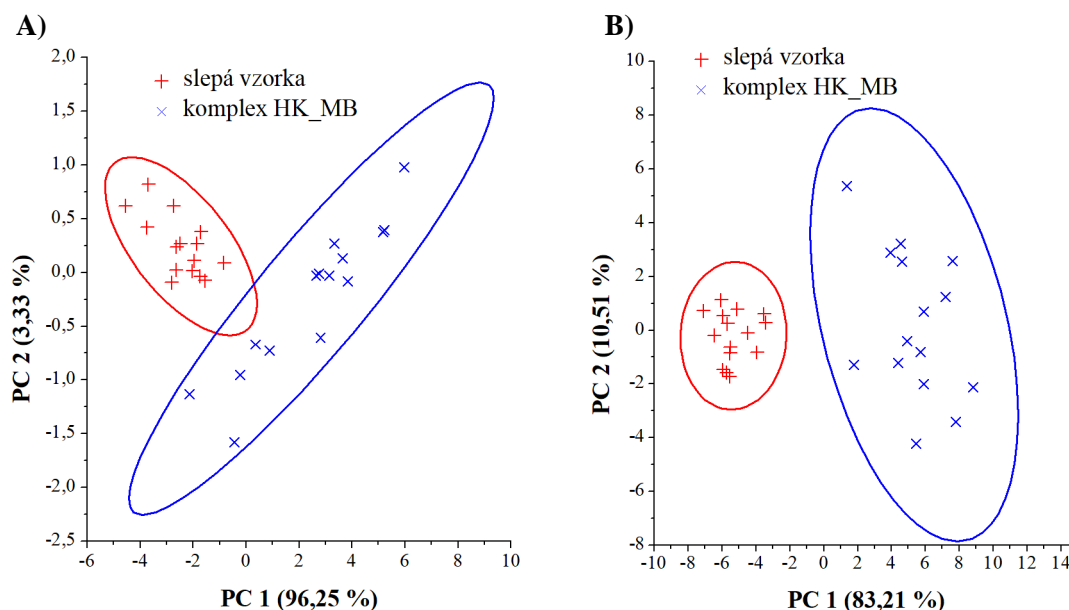
5.4.1 KOMPLEX HK S METYLÉNOVOU MODROU



Obr. 24 FTIR spektrá slepej vzorky, komplexu HK s MB (konc. 0,125 g/l) a čistej metylénovej modrej

Porovnanie celých spektier komplexu, slepej vzorky aj čistej metylénovej modrej je zobrazené na Obr. 24. Na Obr. 25 je potom možné vidieť, že v oboch oblastiach sa po PCA analýze spektrá slepej vzorky a komplexu rozdeľujú hlavne na základe hodnoty PC1 komponentu. V oblasti vysokého vlnočtu boli pomocou PCA analýzy odhalené príspevky MB, ktoré v FTIR spektre nie sú na prvý pohľad viditeľné. V tejto oblasti sa nachádzajú veľmi široké prekrývajúce sa absorpčné pásy kvôli vodíkom mostíkom a je obtiažne rozlíšiť jednotlivé absorpčné maximá. V pozitívnom loadingu PCA komponentu 1 na Obr. 26 je však možné vidieť píky pri 2 713, 2 812, 3 052, 3 211 a 3 371 cm^{-1} pochádzajúce z metylénovej modrej. Taktiež je možné si všimnúť klesajúci široký pás medzi 2 400 – 2 600 cm^{-1} , ktorého maximum bolo v spektre čistej humínovej kyseliny pri 2 600 cm^{-1} a

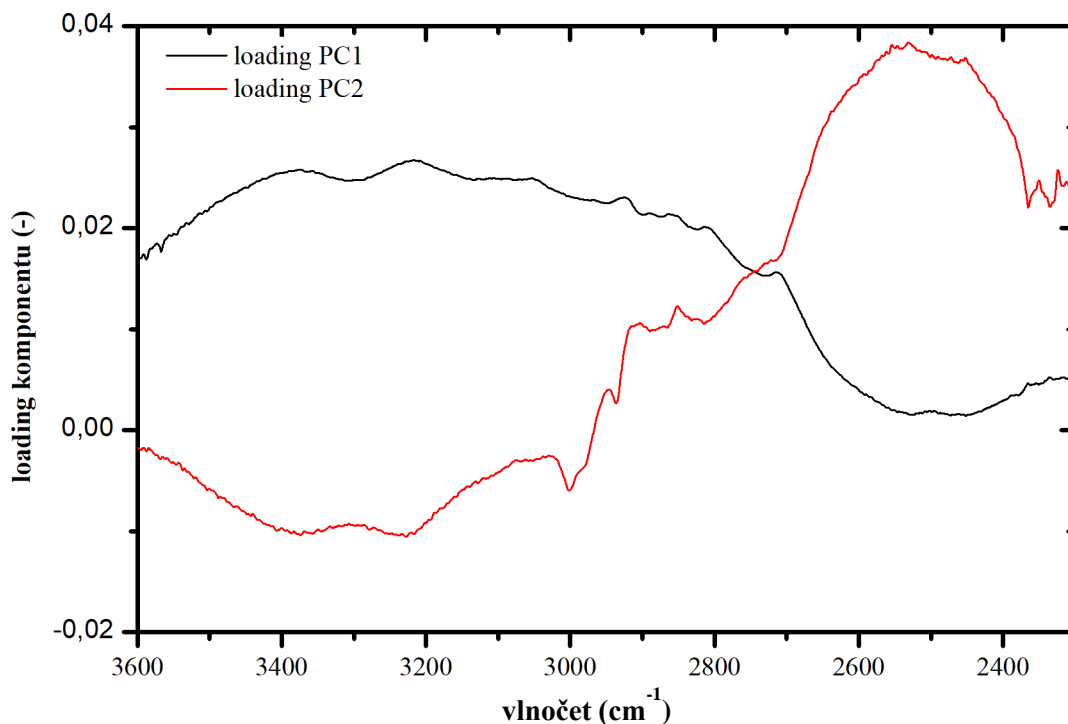
bolo priradené kombinačným a overtónovým pásom O–H väzby v –COOH skupine, ktorá je viazaná vodíkovými mostíkmi.



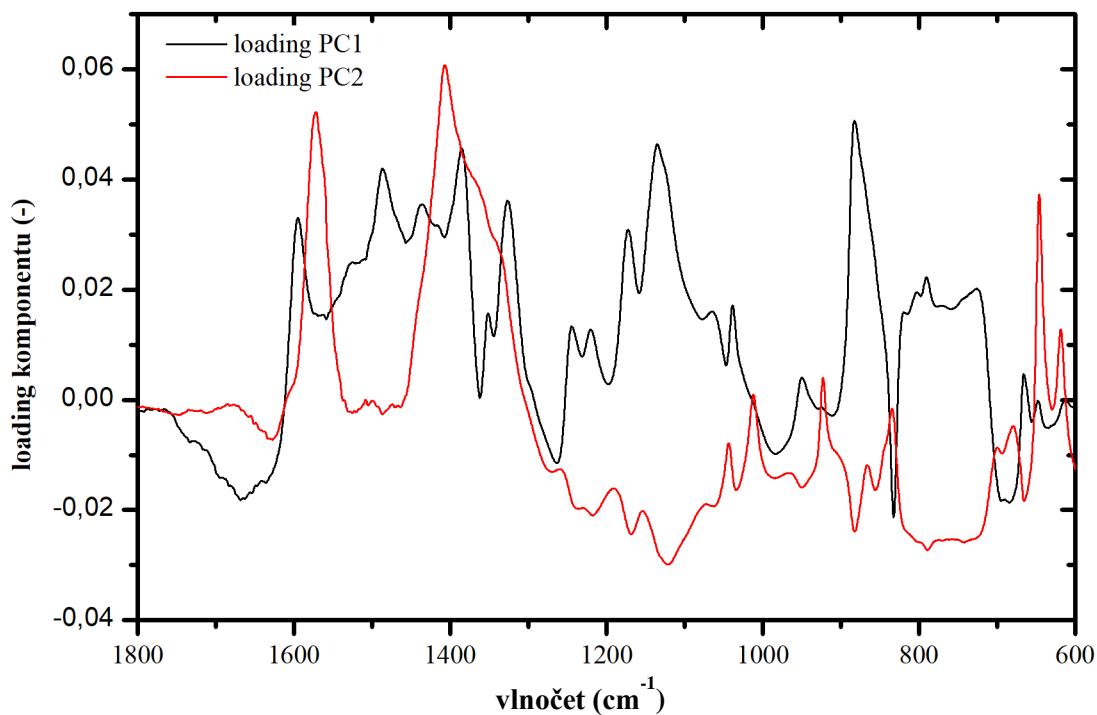
Obr. 25 Grafy zobrazujúce skóre komponentov PC1 a PC2 FTIR spektier slepej vzorky a komplexu HK s MB s konc. 0,125 g/l. **A)** Analyzované spektrá v rozsahu 2 300 – 3 600 cm^{-1} . **B)** Analyzované spektrá v rozsahu 600 – 1 800 cm^{-1} .

Z analýzy spektra v oblasti 600 – 1 800 cm^{-1} je možné vyčítať niekoľko zaujímavých vecí. Naviazanie MB na HK je spojené so silným nárastom signálu pri 883, 1 135, 1 326, 1 385, 1 486 a 1 595 cm^{-1} (pozitívny loading PC1 na Obr. 27). Píky pri 883 a 1 385 cm^{-1} sú pravdepodobne vyvolané vibráciami rôznych typov C–H väzieb, pričom pre vlnočty pod 1 000 cm^{-1} sú typické mimorovinné deformačné vibrácie aromatických C–H väzieb. K vlnočtu pri 883 cm^{-1} by tiež mohla prispievať aj vibrácia dusíkového atómu heterocyklu zapojená vo vodíkových väzbách s OH skupinami [99]. Zvyšné absorpčné pásy pravdepodobne patria vibráciám rôznych väzieb v heterocyklickej štruktúre metylénovej modrej, pri 1 135 cm^{-1} konkrétne vibráciám C–N a C–S–C väzieb, pri 1 326 a 1 486 cm^{-1} vibráciám C–N a C=S⁺ väzieb a pri 1 595 cm^{-1} vibráciám C=N a C=C väzieb v heterocykle. Práve fakt, že väčšina odhalených absorpčných pásov patrí vibráciám heterocyklu poukazuje na zapojenie heterocyklickej štruktúry v interakcii s humínovou kyselinou a predpokladaným mechanizmom by teda mohli byť π – π interakcie.

Zároveň je tiež možné vidieť výrazný pokles signálu niekoľkých absorpčných pásov slepej vzorky, najmä teda v okolí 684, 833, 1 262 a 1 668 cm^{-1} . Prvé dva spomenuté píky môžu byť priradené aromatickým C–H väzbám a pás pri 1 668 cm^{-1} pravdepodobne patrí vibráciám C=O väzby amidov alebo chinónov.



Obr. 26 Loadiny komponentov 1 a 2 v oblasti spektra 2 300 – 3 600 cm^{-1} (PCA analýza na Obr. 25A)



Obr. 27 Loadiny komponentov 1 a 2 v oblasti spektra 600 – 1 800 cm^{-1} (PCA analýza na Obr. 25B)

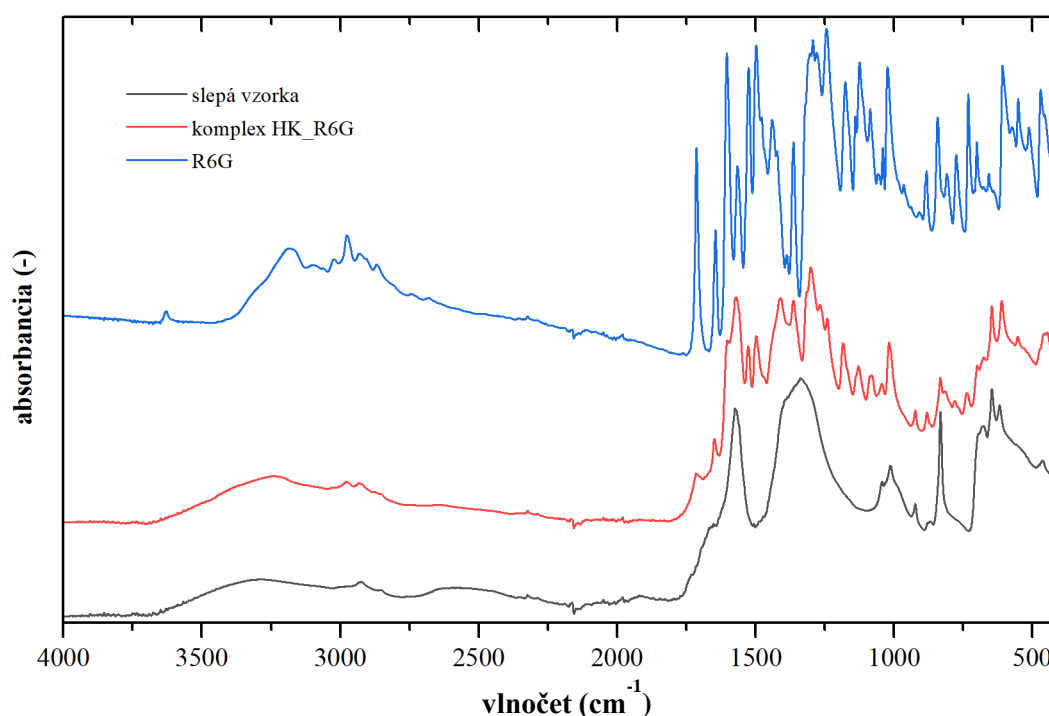
Okrem podrobnej analýzy loadingov pre komplex s koncentráciou 0,125 g/l uvedenej vyššie bola PCA analýza prevedená aj pre ostatné koncentrácie. Bolo zistené, že v prípade najnižšej koncentrácie, konkrétne 0,025 g/l, nebolo možné previesť PCA so smerodajnými výsledkami

v žiadnej časti spektra, pretože spektrá komplexu aj slepej vzorky boli natoľko podobné, že sa skóre jednotlivých komponentov oboch vzoriek takmer úplne prekrývali. Grafy zobrazujúce skóre komponentov pre obe zvyšné koncentrácie sú uvedené v prílohách, pričom u koncentrácie 0,25 g/l sú uvedené aj loadings PC1 a PC2 (Príloha 7 – 9). V Tab. 4 sú potom porovnané výsledky PCA analýzy rôznych koncentrácií komplexov, pričom bola sledovaná najmä poloha jednotlivých absorpčných pásov. Na základe týchto výsledkov je možné skonštatovať, že u väčšiny pásov sa ich poloha s meniacou sa koncentráciou aktívnej látky nemení konzistentne, no zaujímavé sú posuny napríklad u pásov pri 877 cm⁻¹ a 1 595 cm⁻¹, kde sa posun zvyšuje so stúpajúcou koncentráciou. Najmä u píku pri 877 cm⁻¹ je posun už pomerne významný, konkrétne u koncentrácie 0,125 g/l bol pozorovaný posun o 6 cm⁻¹ oproti čistej metylénovej modrej a u koncentrácie 0,25 g/l až o 8 cm⁻¹.

Tab. 4 Prehľad polôh zaujímavých absorpčných pásov komplexu HK s MB získaných PCA analýzou a ich posun oproti polohe v pôvodnom spektre čistej látky

pôvod		c _{MB} = 0,125 g/l		c _{MB} = 0,25 g/l	
poloha (cm ⁻¹)	látka	poloha (cm ⁻¹)	posun (cm ⁻¹)	poloha (cm ⁻¹)	posun (cm ⁻¹)
877	MB	883	+6	885	+8
1 141	MB	1 135	-6	1 137	-4
1 392	MB	1 385	-7	1 396	+4
1 488	MB	1 486	-2	1 488	0
1 593	MB	1 595	+2	1 598	+5

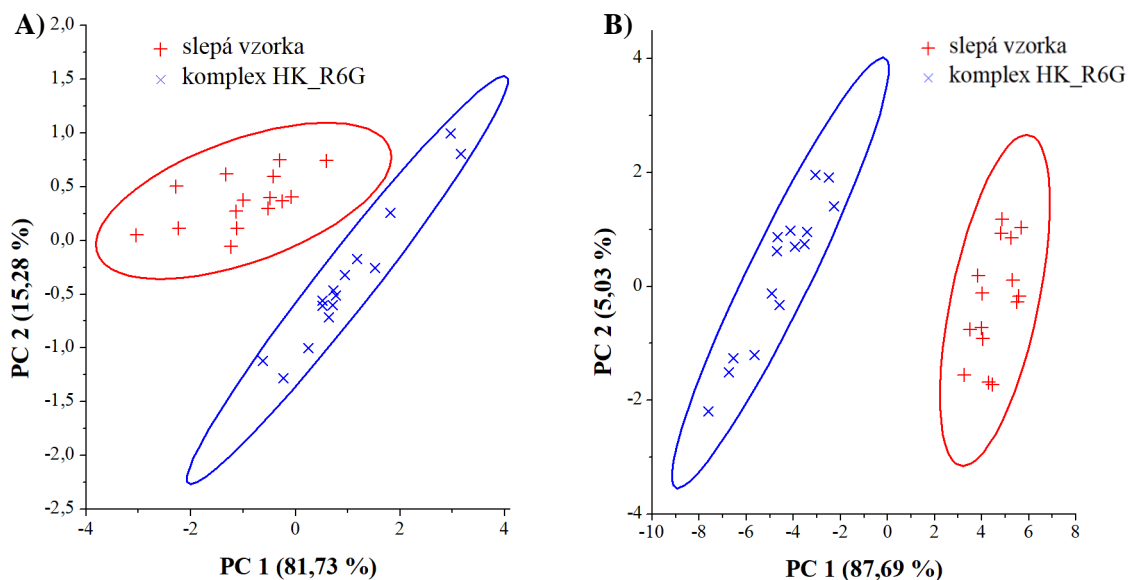
5.4.2 KOMPLEX HK S RHODAMINOM 6G



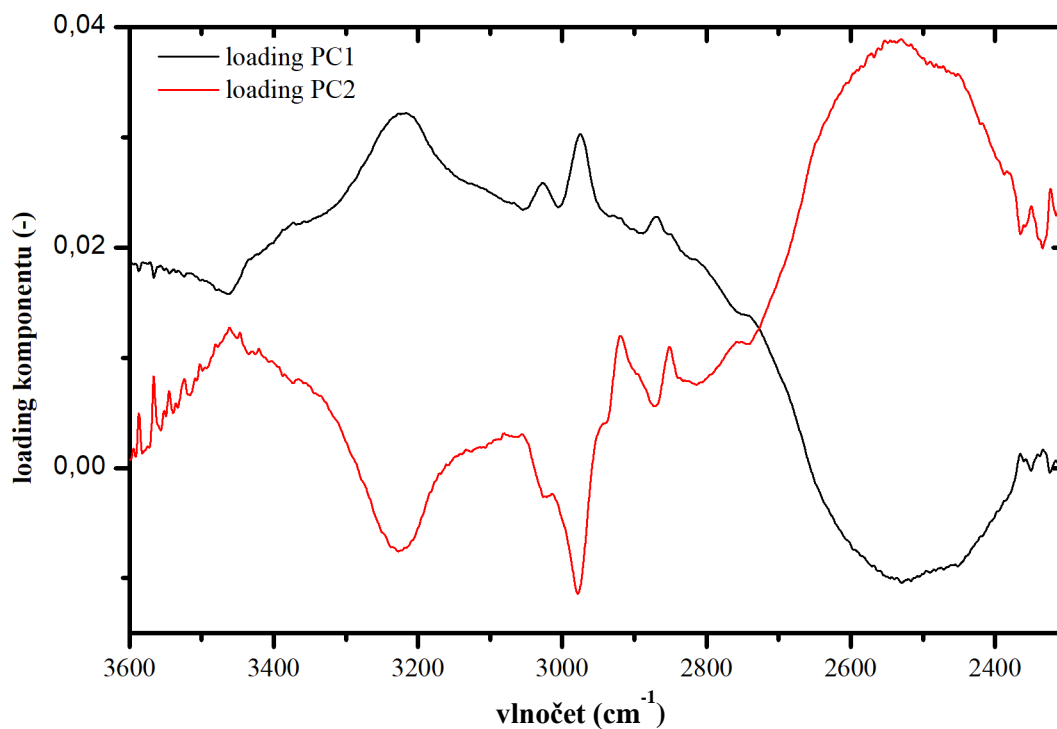
Obr. 28 FTIR spektrá slepej vzorky, komplexu HK s R6G (konc. 0,125 g/l) a čistého Rhodaminu 6G

Porovnanie celých spektier komplexu HK s Rhodaminom 6G, slepej vzorky aj čistého rhodaminu je možné vidieť na Obr. 28. V oboch analyzovaných rozsahoch spektra sú jednotlivé komplexy rozdelené na základe skóre PCA komponentu 1, no vo vysokých vlnôčoch patria komplexu kladné hodnoty skóre a v nízkych vlnôčoch naopak záporné skóre (Obr. 29). Analýza PCA v rozsahu

spektra $2\ 200 - 3\ 600\ \text{cm}^{-1}$ dáva podobné výsledky ako u komplexu s MB. Je viditeľný klesajúci signál vo vlnočte $2\ 400 - 2\ 600\ \text{cm}^{-1}$ (negatívny loading na Obr. 30) a v pozitívnom loadingu je možné nájsť píky zodpovedajúce spektru rhodaminu, ktoré sú v FTIR spektre horšie rozoznateľné. Konkrétne sa jedná teda o píky pri $2\ 872$, $2\ 975$, $3\ 026$, $3\ 220\ \text{cm}^{-1}$.



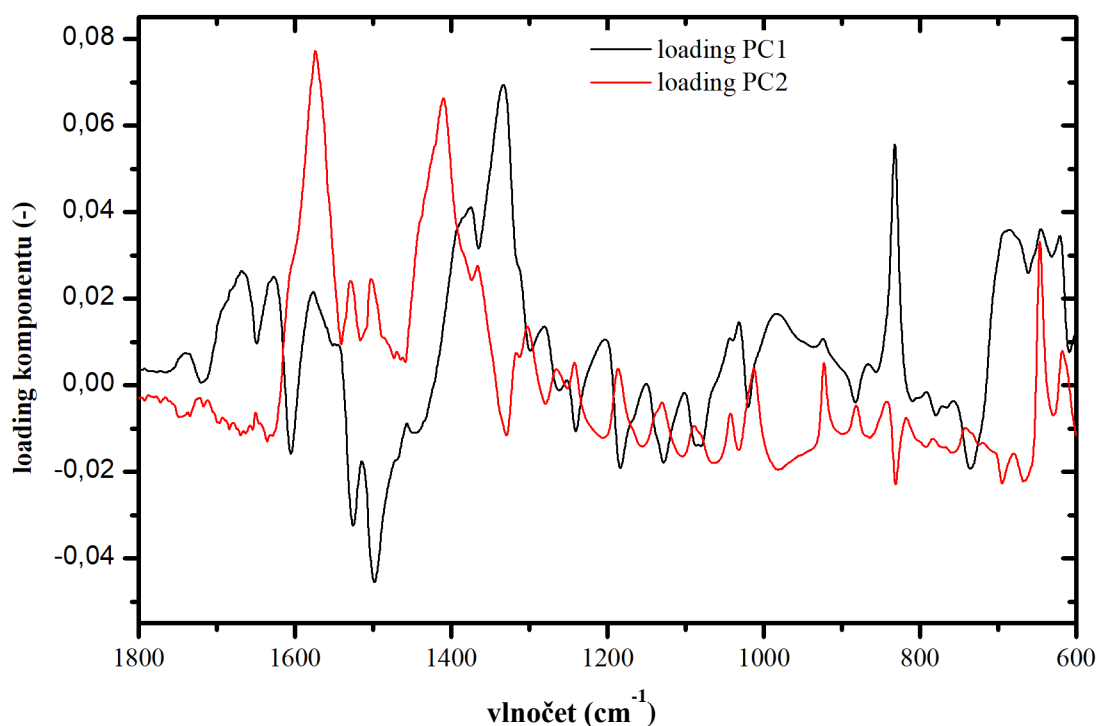
Obr. 29 Grafy zobrazujúce skóre komponentov PC1 a PC2 FTIR spektier slepej vzorky a komplexu HK s R6G s konc. 0,125 g/l. **A)** Analyzované spektrá v rozsahu $2\ 300 - 3\ 600\ \text{cm}^{-1}$. **B)** Analyzované spektrá v rozsahu $600 - 1\ 800\ \text{cm}^{-1}$.



Obr. 30 Loadiny komponentov 1 a 2 v oblasti spektra $2\ 300 - 3\ 600\ \text{cm}^{-1}$ (PCA analýza na Obr. 29A)

V loadingu PC1 komponentu v rozsahu $600 - 1800 \text{ cm}^{-1}$ je viditeľných mnoho absorpčných pásov. Po interakcii HK s R6G výrazne klesá signál slepej vzorky pri 832 , 1332 a 1375 cm^{-1} (pozitívny loading na Obr. 31). Pík pri 832 cm^{-1} patrí aromatickým C–H väzbám HK, pričom pôvod zvyšných spomenutých absorpčných pásov je pomerne ťažké identifikovať, keďže v spektre slepej vzorky je v rozmedzí $1250 - 1450 \text{ cm}^{-1}$ len jeden široký pás pravdepodobne ukrývajú niekoľko prekrývajúcich sa pík. Jeho maximum je však v pôvodnom FTIR spektre slepej vzorky možné nájsť pri 1338 cm^{-1} a tento vlnočet zodpovedá symetrickým valenčným vibráciám $-\text{COO}^-$ skupiny.

Naopak je možné v PC1 loadingu vidieť, že po interakcii HK s R6G rastie signál prislúchajúci typickým vibráciám rhodaminu. Najvýraznejší pík je možné nájsť pri 1498 cm^{-1} , ktorý patrí C=C vibráciám kostry aromatického kruhu. Ďalšie píky sa potom nachádzajú pri 738 a 1079 cm^{-1} , patriace tentokrát deformačným vibráciám C–H väzieb aromatického kruhu a pri 1128 , 1182 a 1240 cm^{-1} , čo by mohli byť rôzne typy vibrácií jednoduchých väzieb esterovej skupiny. Tiež je možné si všimnúť píky pri 1524 a 1604 cm^{-1} , ktoré by mohli byť priradené postupne rovinným deformačným vibráciám C–N väzby a znovu C=C vibráciám kostry aromatického kruhu. Z týchto výsledkov by znovu mohlo vyplývať, že keďže píky s najväčšou intenzitou patria práve heterocyklickým vibráciám, heterocyklus sa pravdepodobne podieľa na interakcii farbiva s humínovou kyselinou.



Obr. 31 Loadingy komponentov 1 a 2 v oblasti spektra $600 - 1800 \text{ cm}^{-1}$ (PCA analýza na Obr. 29B)

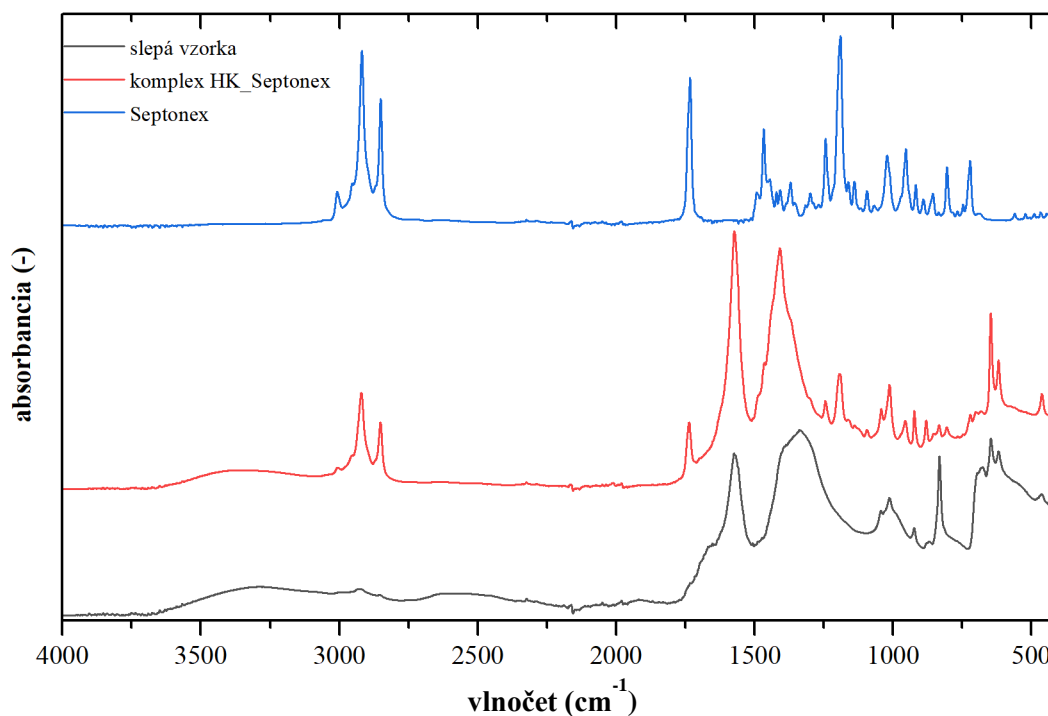
Podobne ako u komplexu s metylénovou modrou, aj v prípade rhodaminu sa pri PCA analýze komplexov s najnižšou koncentráciou ($0,025 \text{ g/l}$) skóre komponentov slepej vzorky aj vzorky komplexu takmer úplne prekrývali, a teda nebolo možné získať smerodajné výsledky. Porovnanie polôh absorpčných pásov v loadingoch pri analýze komplexov so strednou a najvyššou koncentráciou oproti polohám týchto pásov v čistých zložkách je uvedené v Tab. 5. Znovu je možné vidieť, že posuny neboli naprieč koncentraciami príliš konzistentné, a teda na základe tejto analýzy nie je možné vyvodit' jednoznačné závery. Pomerne významný posun je vidieť len u pásu pri

1 175 cm^{-1} , ktorý sa v komplexe s koncentráciou 0,125 g/l posunul o 7 cm^{-1} a pri koncentrácii 0,25 g/l o 8 cm^{-1} . Tento pás bol priradený symetrickým valenčným vibráciám C–O–C väzieb v esterovej skupine. Veľmi výrazný posun pásu pri 3 182 cm^{-1} (valenčné vibrácie N–H väzieb rhodaminu) pravdepodobne vznikol kombináciou tohto pásu so širokým pásom valenčných O–H vibrácií humínových kyselín. Grafy zobrazujúce skóre komponentov PC1 a PC2 po prevedení celospektrálnej PCA analýzy pre ostatné koncentrácie je možné nájsť v prílohách, taktiež spolu s loadingami komponentov PC1 aj PC2 u koncentrácie 0,025 g/l (Príloha 10 – 12).

Tab. 5 Prehľad polôh zaujímavých absorpčných pásov komplexu HK s R6G získaných PCA analýzou a ich posun oproti polohe v pôvodnom spektre čistej látky

pôvod		$c_{R6G} = 0,125 \text{ g/l}$		$c_{R6G} = 0,25 \text{ g/l}$	
poloha (cm^{-1})	látka	poloha (cm^{-1})	posun (cm^{-1})	poloha (cm^{-1})	posun (cm^{-1})
1 087	R6G	1 083	-4	1 088	+1
1 123	R6G	1 128	+5	1 127	+4
1 175	R6G	1 182	+7	1 183	+8
1 245	R6G	1 240	-5	1 241	-4
1 498	R6G	1 498	0	1 497	-1
1 605	R6G	1 604	-1	1 605	0
2 868	R6G	2 869	+1	2 873	+5
2 975	R6G	2 975	0	2 977	+2
3 025	R6G	3 026	+1	3 024	-1
3 182	R6G	3 215	+33	3 216	+34

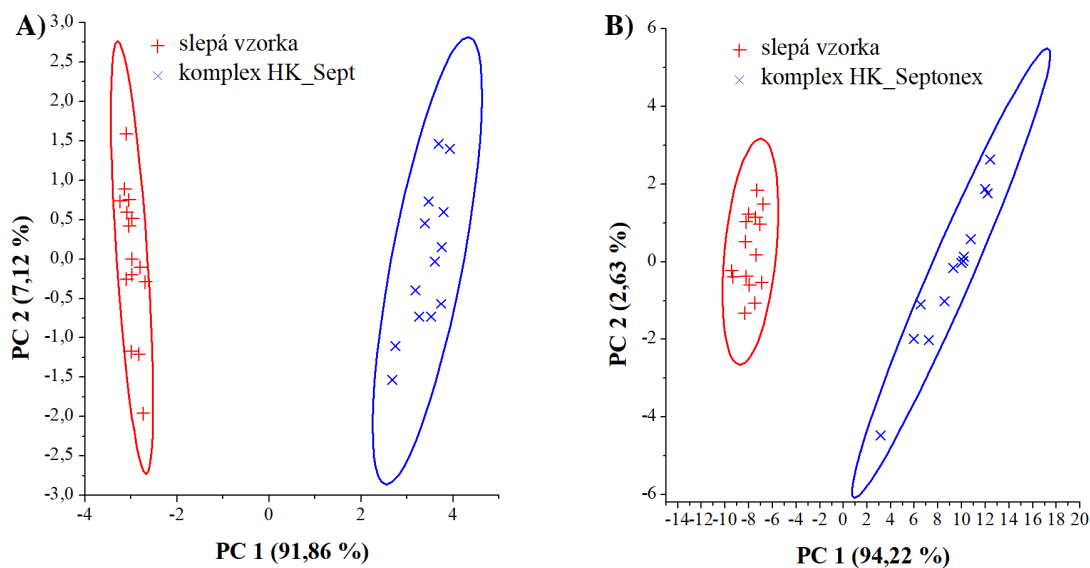
5.4.3 KOMPLEX HK SO SEPTONEXOM



Obr. 32 FTIR spektrá slepej vzorky, komplexu HK so Septonexom (konc. 1 g/l) a čistého Septonexu

V tejto kapitole je diskutovaná PCA analýza komplexu HK so Septonexom a slepej vzorky, pričom porovnanie celých FTIR spektier týchto látok a tiež aj čistého Septonexu je možné nájsť na Obr. 32.

V oboch analyzovaných rozsahoch vlnočtov sa vzorky komplexu a slepej vzorky od seba odlišujú na základe komponentu PC1, pričom v oboch prípadoch komplex zaujíma pozitívne skóre (Obr. 33). V rozsahu $2\ 300 - 3\ 600\ \text{cm}^{-1}$ je sledovaný rovnaký trend ako v predchádzajúcich komplexoch, teda je sledovaný zvýšený signál pochádzajúci z nízkomolekulárnej organickej látky. V prípade Septonexu sa v tejto oblasti nachádzajú veľmi výrazné pásy alifatických C–H väzieb, ktoré sú viditeľné aj v spektre loadingu s vysokou intenzitou (Obr. 34). Naopak je tu sledovaný mierny pokles signálu slepej vzorky medzi $3\ 300 - 3\ 000$ a $2\ 650 - 2\ 400\ \text{cm}^{-1}$, pričom intenzívny signál alifatických skupín Septonexu pravdepodobne mierne prebija absorpciu valenčných O–H vibrácií humínových kyselín. Tieto pásy Septonexu však nie sú oproti ich polohe v čistej látke nijak posunuté, takže podľa všetkého s nimi súvisiace väzby nie sú zapojené v interakcii.



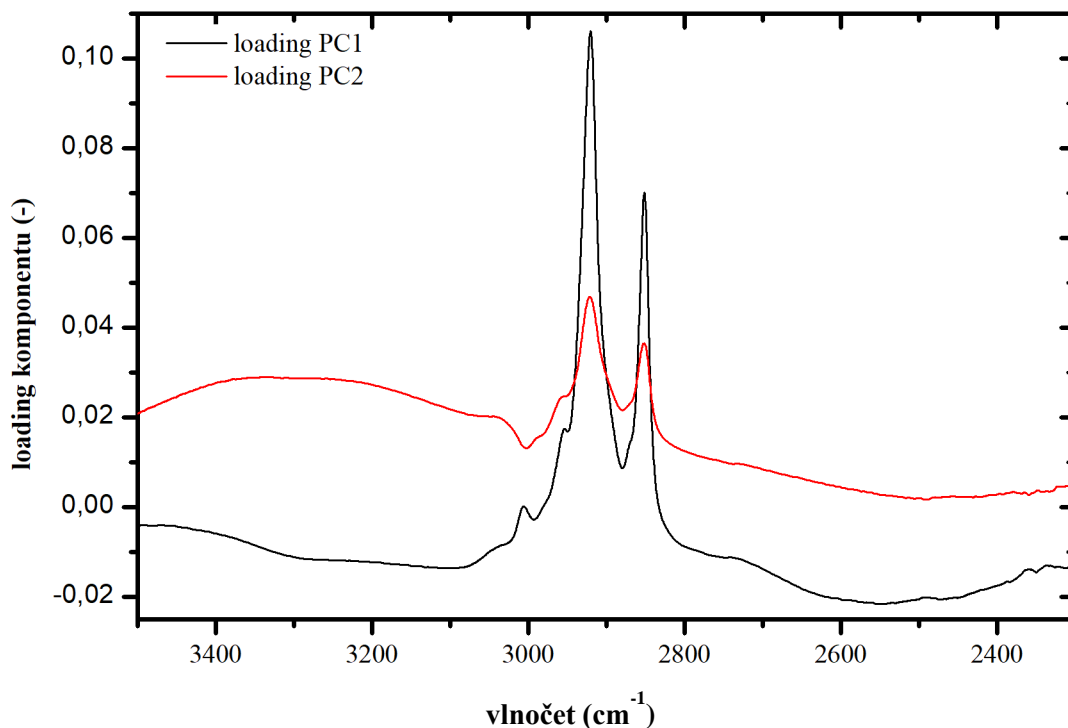
Obr. 33 Grafy zobrazujúce skóre komponentov PC1 a PC2 FTIR spektier slepej vzorky a komplexu HK so Septonexom s konc. 1 g/l. **A)** Analyzované spektrá v rozsahu $2\ 300 - 3\ 600\ \text{cm}^{-1}$. **B)** Analyzované spektrá v rozsahu $600 - 1\ 800\ \text{cm}^{-1}$.

Najvyšší signál v rozsahu vlnočtov $1\ 800 - 600\ \text{cm}^{-1}$ (pozitívny loading PC1 na Obr. 35) vykazujú píky pri $1\ 410$ a $1\ 574\ \text{cm}^{-1}$, ktoré celkom jednoznačne prislúchajú asymetrickým valenčným vibráciám $-\text{COO}^-$ skupín. Oproti doposiaľ pozorovaným trendom tento fakt predstavuje zmenu, pretože tieto píky majú určité pôvod v spektre slepej vzorky. V predchádzajúcich komplexoch bol v príslušných loadingoch pozorovaný rastúci signál vždy iba nízkomolekulárnej organickej látky.

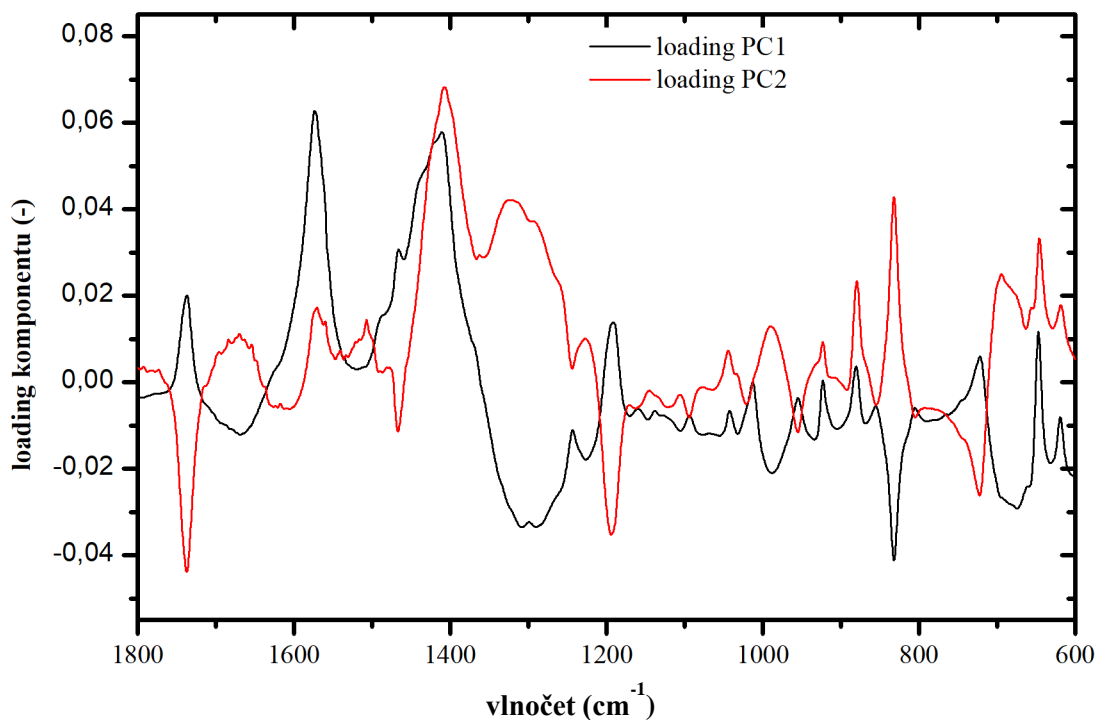
Taktiež je možné v tejto oblasti nájsť píky s pomerne nízkou intenzitou pri 722 , 923 a $1\ 011\ \text{cm}^{-1}$ (zvýšený signál Septonexu v pozitívnom loadingu PC1) a tiež sa tu nachádzajú absorpčné pásy pri $1\ 191$ a $1\ 737\ \text{cm}^{-1}$ patriace vibráciám esterovej skupiny. V negatívnom loadingu je naopak možné pozorovať zníženie signálu slepej vzorky pri $833\ \text{cm}^{-1}$ (aromatické mimorovinné vibrácie C–H) a v oblasti $1\ 290 - 1\ 307\ \text{cm}^{-1}$, v ktorej však v spektre čistej IHSS humínovej kyseliny alebo slepej vzorky nebol pozorovaný žiadny významný absorpčný pás. Na rozdiel od predchádzajúcich aromatických komplexov, výsledky rozobrané v tejto kapitole poukazujú na elektrostatický mechanizmus interakcie medzi humínovými kyselinami a Septonexom zahrňujúci karboxylové alebo karboxylátové skupiny.

Tab. 6 potom zobrazuje prehľad polôh jednotlivých absorpčných pásov v loadingoch komplexov pri rôznych koncentráciách, pričom v tomto prípade bolo v určitých častiach spektra možné previesť PCA analýzu aj pre najnižšiu koncentráciu ($0,2\ \text{g/l}$), takže sú porovnávané všetky tri skúmané koncentrácie komplexov. Výsledky PCA analýzy pre najnižšiu a najvyššiu koncentráciu sú uvedené

v prílohách (Príloha 13 – 16). Výsledky uvedené v Tab. 6 znovu poukazujú, že v spektrách komplexov nie sú žiadne významné posuny, avšak extrémne výrazný posun sa prejavuje u absorpčných pásov karboxylátových iónov u komplexu s koncentráciou Septonexu 2 g/l. Tieto pásy sú posunuté až o 46 – 56 cm^{-1} a dôvodom môže byť väčšie množstvo disociovaných $-\text{COO}^-$ skupín v štruktúre slepej vzorky a teda aj následného komplexu.



Obr. 34 Loadingy komponentov 1 a 2 v oblasti spektra 2 300 – 3 600 cm^{-1} (PCA na Obr. 33A)



Obr. 35 Loadingy komponentov 1 a 2 v oblasti spektra 600 – 1 800 cm^{-1} (PCA na Obr. 33B)

Tab. 6 Prehľad polôh zaujímavých absorpčných pásov komplexu HK so Septonexom získaných PCA analýzou a ich posun oproti polohe v pôvodnom spektre čistej látky

pôvod		c _{Sept} = 0,2 g/l		c _{Sept} = 1 g/l		c _{Sept} = 2 g/l	
poloha (cm ⁻¹)	látka	poloha (cm ⁻¹)	posun (cm ⁻¹)	poloha (cm ⁻¹)	posun (cm ⁻¹)	poloha (cm ⁻¹)	posun (cm ⁻¹)
722	Sept	-	-	721	-1	720	-2
1 189	Sept	1 194	+5	1 191	+2	1 189	0
1 410	HK	1 406	-4	1 410	0	1 466	+56
1 574	HK	1 569	-5	1 574	0	1 620	+46
1 733	Sept	1 739	+6	1 737	+4	1 736	+3
2 850	Sept	2 850	0	2 850	0	2 850	0
2 920	Sept	2 920	0	2 920	0	2 920	0
3 006	Sept	3 006	0	3 006	0	3 006	0

5.5 PCA POROVNANIE KOMPLEXOV PRIPRAVENÝCH RÔZNYMI SPÔSOBAMI DIALÝZY

V tejto kapitole boli pomocou celospektrálnej PCA analýzy porovnávané komplexy pripravené dvomi spôsobmi dialýzy – zmes humínovej kyseliny a organickej látky dialyzovaná proti destilovanej vode a čistý roztok HK dialyzovaný proti roztoku organickej látky. Oba spôsoby prípravy komplexu boli porovnávané zároveň aj so setom spektier patriacich slepej vzorke. V nasledujúcich odstavcoch sú interpretované výsledky najmä pre experiment so strednými koncentraciami organických iónov, konkrétne koncentrácie 0,125 g/l pre MB a R6G a 1 g/l pre Septonex, z dôvodov bližšie opísaných už v kapitole 5.3. Okrem toho, pri tejto koncentrácii tvorili jednotlivé porovnávané skupiny v PCA grafoch zobrazujúcich skóre komponentov PC1 a PC2 vždy samostatné zhľuky a bolo možné porovnať medzi sebou všetky skupiny.

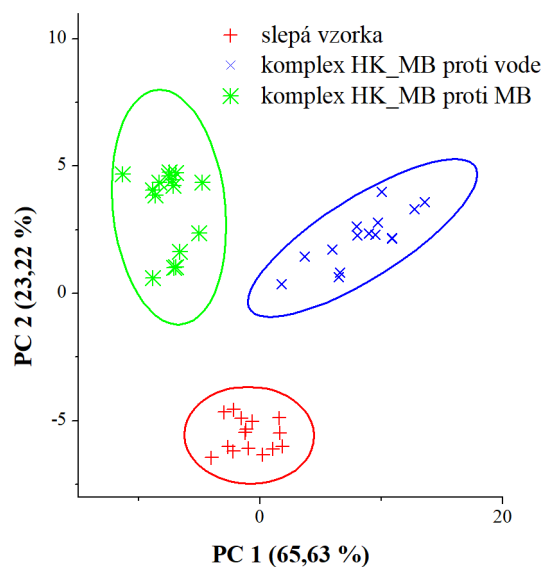
Výsledky PCA pre ostatné koncentrácie sú potom uvedené v prílohách (Príloha 17 – Príloha 24) a je možné si v nich všimnúť, že pri súčasnom porovnávaní slepej vzorky a dvoch komplexov dialyzovaných rôznymi spôsobmi sa jednotlivé oblasti v grafoch zobrazujúcich skóre PCA komponentov takmer úplne prekryvali.

5.5.1 HK A METYLÉNOVÁ MODRÁ

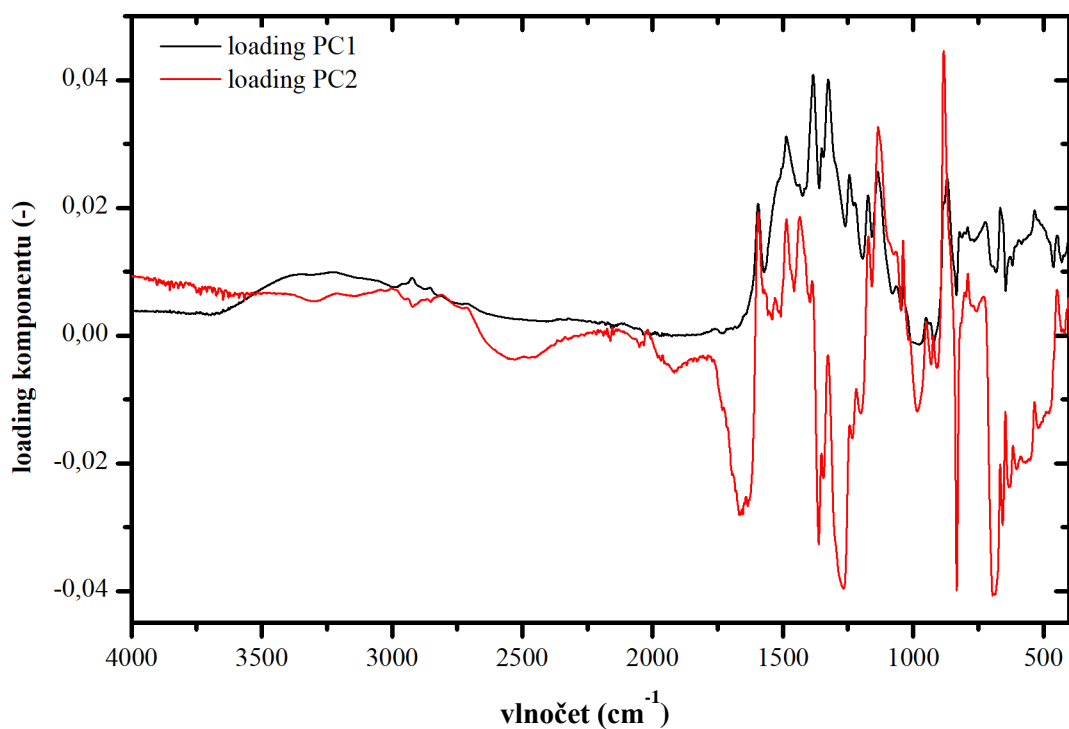
V grafe zobrazujúcom skóre PCA komponentov 1 a 2 na Obr. 36 je možné vidieť, že komplexy HK s MB pripravené rôznymi spôsobmi dialýzy sa od seba odlišujú hlavne na základe komponentu PC1, zatiaľ čo oba tieto komplexy sa líšia od slepej vzorky v hodnotách komponentu PC2. Je teda možné nájsť jednoznačné rozdiely v spektrách dvoch komplexov, ale taktiež sú tieto komplexy veľmi odlišné od slepej vzorky. Ktorými vlastnosťami sa od seba líšia potom prezrádzajú loadings jednotlivých komponentov.

Z loadingu PC1 na Obr. 37 je možné vyčítať rozdiely medzi rozlične pripravenými komplexmi. V pozitívnom loadingu sú viditeľné spektrálne znaky prevládajúce u spektier komplexu dialyzovaného proti destilovanej vode. V podstate sa tu nachádzajú všetky absorpčné pásy typické pre metylénovú modrú a je možné vidieť, že v komplexe pripravenom touto dialýzou je jednoznačne vyšší príspevok organickej látky. Je možné tu nájsť široký pík pri 3 500 – 2 800 cm⁻¹ s maximami pri 3 211 a 2 921 cm⁻¹ (postupne O–H väzby viazané vodíkovými mostíkmi a valenčné vibrácie –CH₃ skupín). Jednoznačne najvýraznejší signál vykazujú pásy pri 1 385 a 1 328 cm⁻¹, pričom prvý patrí deformačným vibráciám C–H väzby –CH₃ skupiny a druhý valenčným vibráciám C–N

v skupine N-CH₃. Ďalšie píky prislúchajúce heterocyklickým väzbám s pomerne silným signálom sú pri 1 595, 1 132 a 1 487 cm⁻¹. Pri vlnócte 1 241 cm⁻¹ je potom možné nájsť ďalšie pásy patriace deformačným vibráciám C-H väzieb a pozitívny signál je možné nájsť aj pri vlnócte 867 cm⁻¹. Jediné píky v negatívnom loadingu, aj to vykazujúce minimálny signál, je možné vidieť pri 976 a 922 cm⁻¹. Tieto absorpčné pásy majú pravdepodobne pôvod v spektre slepej vzorky.



Obr. 36 Graf zobrazujúci skóre komponentov PC1 a PC2 FTIR spektier slepej vzorky a komplexov HK s MB s konc. 0,125 g/l pripravených rôznymi spôsobmi dialýzy

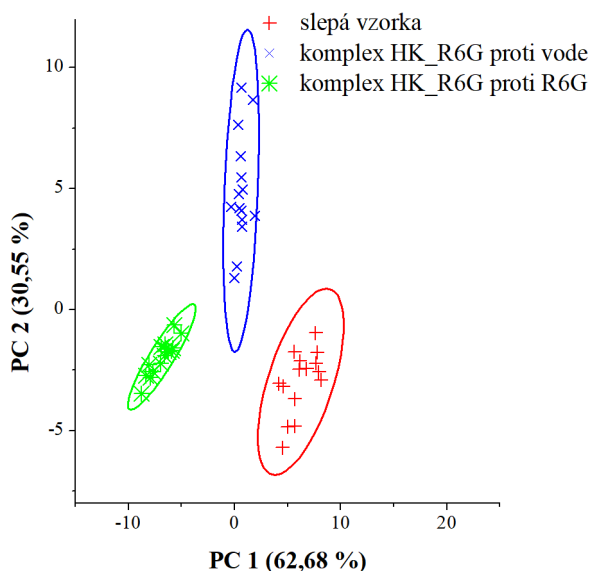


Obr. 37 Loadings komponentov PC1 a PC2 (PCA analýza na Obr. 36)

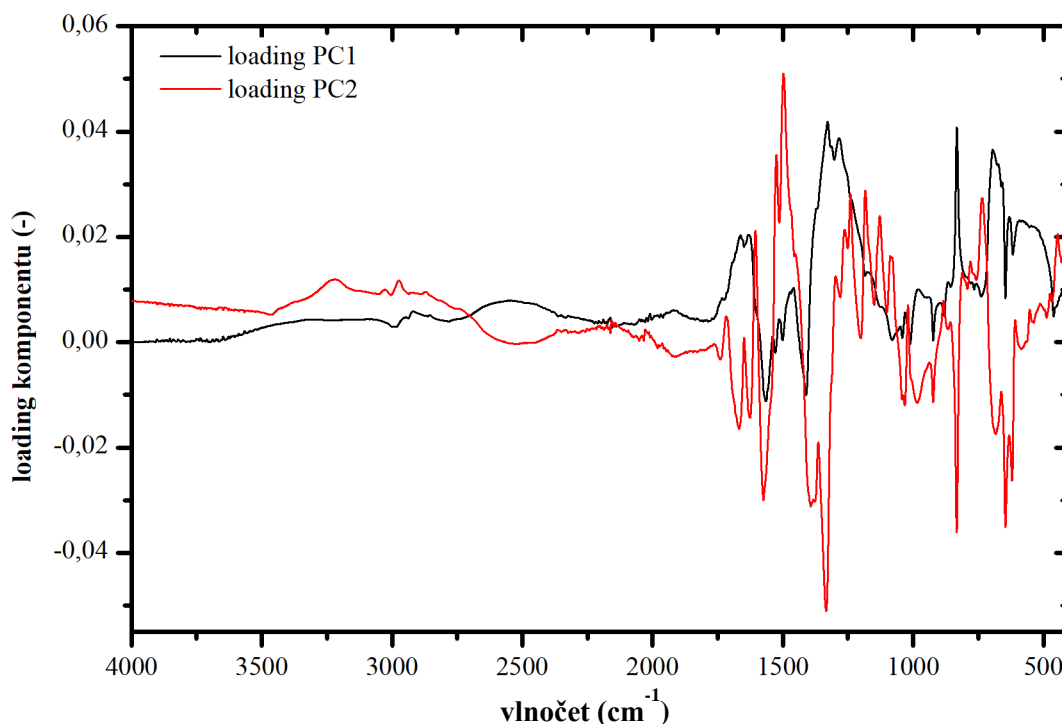
V loadingu komponentu PC2 je naopak možné nájsť rozdiely medzi komplexami a slepou vzorkou. Klesajúci signál slepej vzorky v negatívnom loadingu dobre súhlasí s trendom pozorovaným v predchádzajúcej kapitole. Po interakcii HK a metylénovej modrej teda klesá signál pásov pri 1 662, 1362, 1 267, 832 a 694 cm^{-1} . Sú to vibrácie najmä aromatických C–H väzieb, pík pri 1 362 cm^{-1} by mohol patriť symetrickým valenčným vibráciám $-\text{COO}^-$ skupiny a pri 1 662 cm^{-1} zas C=O skupinám amidových alebo chinónových štruktúr. Na druhej strane, v pozitívnom loadingu PC2 sa nachádzajú skupiny významné pre komplex HK a MB a taktiež sú výsledky tejto analýzy porovnateľné s výsledkami spomínanými v prechádzajúcej kapitole. Znovu je možné nájsť tu veľmi intenzívny pík pri 883 cm^{-1} patriaci mimorovinným deformačným vibráciám aromatických C–H väzieb alebo vibráciám heterocyklického dusíkového atómu viazaného vo vodíkových mostíkoch a tiež iné pásy prislúchajúce rôznym typom C–H vibrácií, napríklad pri 1 432 cm^{-1} . Absorpčné pásy patriace heterocyklickým vibráciám majú tiež pomerne silnú intenzitu a sú výrazné hlavne pri 1 595, a 1 484 a 1 132 cm^{-1} .

5.5.2 HK A RHODAMIN 6G

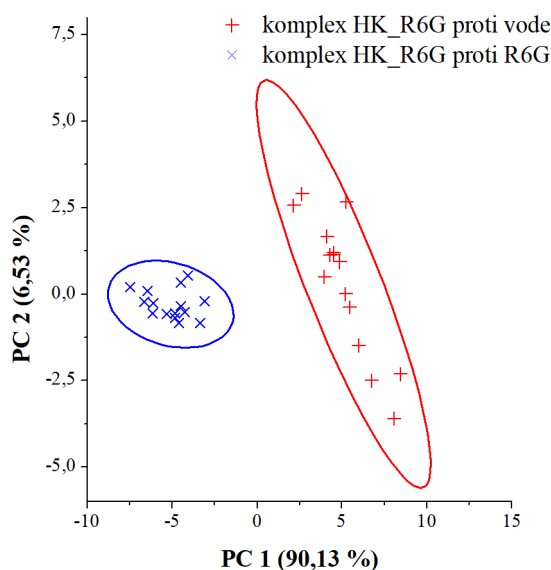
Pri súčasnej PCA analýze oboch komplexov HK s Rhodaminom 6G a slepej vzorky už neboli získané jednoznačne čitateľné výsledky ako u komplexov s metylénovou modrou. V grafe hodnôt hlavných komponentov PC1 a PC2 sú síce zreteľne oddelené jednotlivé komplexy, ale na základe komponentu PC1, ktorý predstavuje 62,7 % variability, sa od seba najviac odlišujú komplex HK s R6G pripravený dialýzou HK proti roztoku rhodaminu a slepá vzorka (komplex pripravený dialýzou proti vode sa nachádza presne v strede pri nulových hodnotách PC1). Celý graf na Obr. 38 spolu s loadingami na Obr. 39 nám naznačujú, že nie je možné vyhodnotiť, že by bola väčšia podobnosť medzi jednotlivými komplexmi ako medzi niektorým z komplexov a slepou vzorkou, pretože na základe komponentu PC2 sa odlišuje práve komplex HK s R6G dialyzovaný proti destilovanej vode od ostatných dvoch vzoriek. Tieto výsledky nie sú v súlade s výsledkami pozorovanými pri ostatných komplexoch a sú veľmi náročné na interpretáciu, a preto bola prevedená taktiež analýza hlavných komponentov samotných komplexov, pre odhalenie najvýraznejších rozdielov medzi nimi (Obr. 40).



Obr. 38 Graf zobrazujúci skóre komponentov PC1 a PC2 FTIR spektier slepej vzorky a komplexov HK s R6G s konc. 0,125 g/l pripravených rôznymi spôsobmi dialýzy



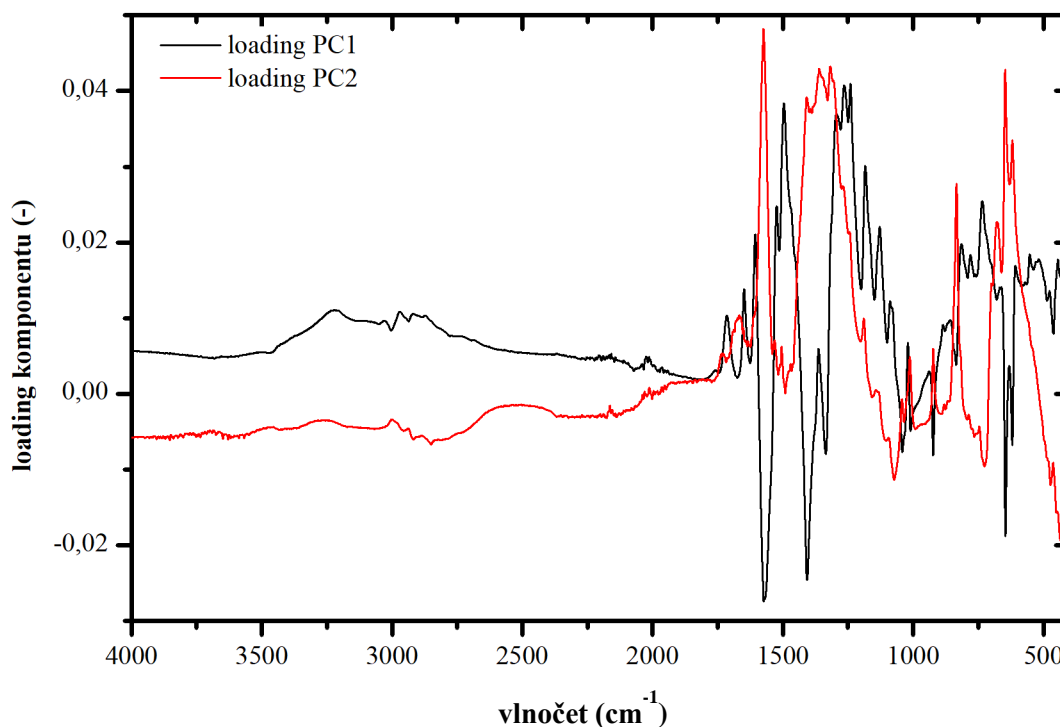
Obr. 39 Loadings komponentov PC1 a PC2 súčasnej analýzy oboch komplexov a slepej vzorky (PCA analýza na Obr. 38)



Obr. 40 Graf zobrazujúci skóre komponentov PC1 a PC2 FTIR spektier komplexov HK a R6G s konc. 0,125 g/l pripravených rôznymi spôsobmi dialýzy

Na Obr. 40 je možné vidieť, že jednotlivé komplexy sa od seba odlišujú v hodnotách komponentu PC1. Z loadingu tohto komponentu na Obr. 41 je možné vyčítať podobné výsledky ako u komplexu HK s MB, a teda že v komplexe pripravenom dialýzou proti vode jednoznačne prevláda príspevok organického iónu, konkrétne ide najmä o vibrácie aromatických väzieb pri 1 607, 1 496 a 734 cm^{-1} a väzieb v esterovej skupine pri 1 240 – 1 260, 1 185 a 1 129 cm^{-1} . V negatívnom loadingu je možné vidieť najmä skupiny slepej vzorky, alebo skupiny typické pre humínové kyseliny, ako napríklad rôzne vibrácie $-\text{COO}^-$ skupiny pri 1 573, 1 409 a 1 333 cm^{-1} , vibrácie alifatických C–C väzieb alebo

C–O väzieb alkoholov pri $1\,041\text{ cm}^{-1}$ a v oblasti pod $1\,000\text{ cm}^{-1}$ pásy typické pre deformačné mimorovinné vibrácie C–H väzieb.



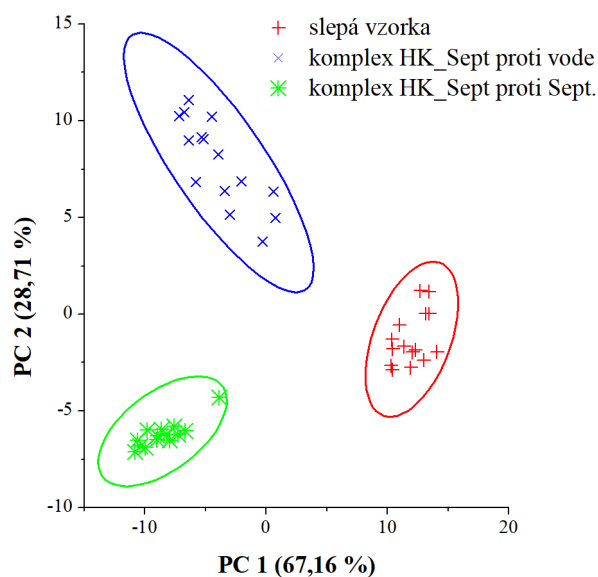
Obr. 41 Loadiny komponentov PC1 a PC2 PCA analýzy komplexov pripravených rôznou dialýzou (PCA analýza na Obr. 40)

5.5.3 HK A SEPTONEX

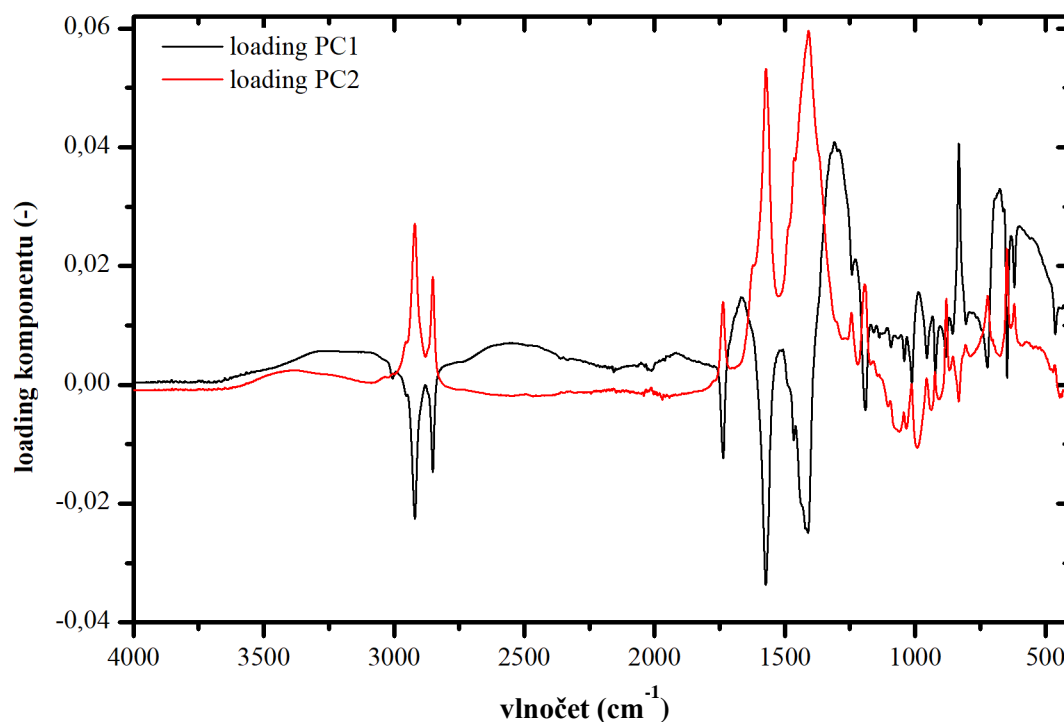
Výsledky súčasnej PCA analýzy komplexov humínovej kyseliny so Septonexom pripravených rôznymi spôsobmi a slepej vzorky vykazujú podobný trend ako u komplexu HK s metylénovou modrou – komplexy majú podobné hodnoty komponentu PC1, v ktorých sa líšia od slepej vzorky. Naopak na základe komponentu PC2 sa rozdeľujú práve jednotlivé komplexy a slepá vzorka sa tu nachádza v okolí nulových hodnôt. Graf zobrazujúci skóre komponentov PC1 a PC2 je možné vidieť na Obr. 42.

Obr. 43 potom zobrazuje loading komponentu PC1, v ktorom je možné nájsť spektrálne rozdiely medzi komplexmi a slepou vzorkou. V negatívnom loadingu sú premietnuté pásy patriace Septonexu (najmä píky esterovej skupiny pri $1\,737$ a $1\,190\text{ cm}^{-1}$ a symetrické a asymetrické vibrácie CH_2 skupín prejavujúce sa pri $2\,919$ a $2\,851\text{ cm}^{-1}$) alebo také pásy, ktoré po interakcii so Septonexom zvyšujú svoju intenzitu, ako píky pri $1\,410$ a $1\,573\text{ cm}^{-1}$ patriace vibráciám skupiny $-\text{COO}^-$. Naopak po interakcii HK so Septonexom klesá signál slepej vzorky s najväčšou intenzitou pri $1\,309$ a 833 cm^{-1} , a potom pri $1\,662$, 990 či 672 cm^{-1} .

Z loadingu hlavného komponentu 2 na Obr. 43 je možné odhaliť rozdiely medzi jednotlivými komplexmi a vyplýva z neho, že komplex HK a Septonexu pripravený dialýzou proti destilovanej vode má jednoznačne intenzívnejšie všetky absorpčné pásy patriace Septonexu (vrátane vysokej intenzity vibrácií karboxylátových skupín) a v jeho spektrách je teda väčší príspevok organickej látky a taktiež intenzívnejšie interakcie ako u komplexu pripravenom dialýzou HK proti roztoku Septonexu.



Obr. 42 Graf zobrazujúci skóre komponentov PC1 a PC2 FTIR spektier slepej vzorky a komplexov HK so Septonexom s konc. 1 g/l pripravených rôznymi spôsobmi dialýzy



Obr. 43 Loadings komponentov PC1 a PC2 súčasnej analýzy oboch komplexov a slepej vzorky (PCA analýza na Obr. 42)

V závere tejto kapitoly je teda možné zhodnotiť, že všetky komplexy pripravené dialýzou zmesi HK a organickej látky proti destilovanej vode obsahujú väčší podiel organickej látky, a teda sú aj vhodnejšie pre sledovanie jednotlivých interakcií. Je tiež nutné podotknúť, že píky patriace nízkomolekulárnym organickým látkam nie sú svojim tvarom a intenzitou v komplexoch zhodné s týmito píkami v spektrách ich čistých látok, a teda naozaj poukazujú na určitú interakciu (nie sú pravdepodobne vyvolané len voľnými atómami čistých nízkomolekulárnych látok vo vzorkách). Zároveň sa však aj jednotlivé komplexy na základe jedného z hlavných komponentov dostatočne odlišujú od slepej vzorky, vďaka čomu boli potvrdené výsledky opísané už v predchádzajúcej kapitole.

6 ZÁVER

Táto diplomová práca bola zameraná na možnosti využitia vibračnej, alebo konkrétne infračervenej spektroskopie pri štúdiu interakcií prírodnej organickej hmoty s organickými polutantmi. Prvým cieľom tejto práce bolo vypracovanie literárnej rešerše na tému metód experimentálneho štúdia štruktúrnych a termodynamických aspektov spomínanej interakcie. Bolo zistené, že asi najčastejšie využívanou metódou pre tento účel je nukleárna magnetická rezonancia, no medzi iné metódy patria aj potenciometria, difúzne experimenty, či rôzne typy spektroskopii – UV-VIS, fluorescenčná alebo infračervená spektroskopia. Pre štúdium termodynamických parametrov interakcie je často využívaná izotermická titračná kalorimetria. Taktiež bolo pri preskúmaní súčasného stavu riešenej problematiky zistené, že pomocou týchto metód bolo identifikovaných mnoho mechanizmov interakcií prírodnej organickej hmoty s rôznymi xenobiotikami, pričom najčastejšie ide o rôzne typy nekovalentných interakcií ako vodíkové mostíky, hydrofóbne efekty alebo π - π interakcie.

Druhou témou literárnej rešerše boli pokročilé techniky merania a vyhodnocovania vibračných spektier za účelom analýzy medzimolekulových interakcií v komplexných prírodných maticiach. Znovu existuje niekoľko metód, ktoré je možné aplikovať na spektrálne dáta pre získanie presnejších a podrobnejších informácií, ako pri ich vizuálnej analýze. Medzi tieto techniky patria okrem iného dekonvolúcia, 2D korelačná analýza alebo analýza hlavných komponentov (PCA), ktorá bola vybraná ako hlavný predmet záujmu tejto diplomovej práce.

Interakcie prírodnej organickej hmoty s organickými polutantmi boli študované prostredníctvom vybraných modelových zástupcov týchto dvoch skupín. Modelové zložky POH boli zastúpené štandardnými humínovými kyselinami IHSS Leonardite a predstaviteľmi aromatických organických polutantov boli farbivá metylénová modrá a Rhodamin 6G, zatiaľ čo alifatickú časť organických látok reprezentoval Septonex.

V experimentálnej časti práce boli z modelových látok vytvorené komplexy. Prvým krokom ich analýzy bola charakterizácia ich rovnovážnych parametrov, ako napríklad stanovenie zdanlivej rovnovážnej konštanty alebo určenie množstva naviazanej organickej látky na jeden gram humínovej kyseliny. Z týchto meraní bolo zistené, že HK majú pri rovnakej koncentrácii vyššiu afinitu k MB ako k rhodaminu, ale taktiež bolo potvrdené, že určité množstvo organického iónu je na humínovú kyselinu naviazané pri každej sledovanej látke a koncentrácii, a teda že by teoreticky malo byť možné sledovať ich interakcie pomocou ďalších metód. Bolo zhodnotené, že tieto interakcie by mohli byť výraznejšie u komplexov s MB a Septonexom, ako u komplexu s Rhodaminom 6G.

Na základe týchto poznatkov boli následne prevedené FTIR merania a boli interpretované infračervené spektrá čistých modelových látok. Hlavnou časťou tejto diplomovej práce však bola aplikácia PCA analýzy na získané spektrálne dáta a overenie jej využitia za účelom mapovania interakcií zodpovedných za vznik komplexov. Bolo potvrdené, že PCA analýza je skutočne vhodným prostriedkom pre sledovanie interakcií v spektrálnych dátach a ponúka hlbší pohľad na zmeny v infračervených spektrách po interakcii látok. Najväčšiu výpovednú hodnotu majú pri PCA loadings jednotlivých komponentov, ktoré predstavujú informáciu o tom, z akých pôvodných premenných sa skladajú novovytvorené hlavné komponenty. Práve v týchto loadings bolo možné nájsť znaky poukazujúce na interakcie vo vytvorených komplexoch. U komplexov s aromatickými organickými iónmi prevládali v loadings vysoké signály aromatických a heterocyklických väzieb po vytvorení komplexu humínovej kyseliny s metylénovou modrou alebo s Rhodaminom 6G. To naznačuje, že hlavným väzobným mechanizmom by mohli byť π - π interakcie, a teda že interakcia prebieha najmä medzi aromatickými kruhmi jednotlivých zložiek. To je v súlade s výsledkami získanými v predchádzajúcich prácach zaoberajúcich sa podobnou problematikou, ako napríklad [1; 64; 129; 130].

Naopak u komplexov humínových kyselín so Septonexom, ktorý neobsahuje žiadne aromatické súčasti, boli najmä na základe výrazne sa zvyšujúcej intenzity pásov karboxylátových iónov v komplexoch (ktoré taktiež samotný Septonex neobsahuje) za najpravdepodobnejšie interakcie určené elektrostatické interakcie zahrňujúce práve karboxylové skupiny humínových látok. Tieto výsledky sa mierne líšia od trendov pozorovaných v predchádzajúcich prácach, ako napríklad od výsledkov dekonvolúcie spektier prevedenej v mojej bakalárskej práci [1] alebo od práce [131], ktoré u tejto dvojice predpokladali najmä kation- π interakcie. Je však tiež možné, že so stúpajúcou koncentráciou Septonexu stúpa aj dôležitosť elektrostatických interakcií. Práve tu je možné odhaliť najväčšiu limitáciu využitia PCA metódy, a to že nebolo možné rovnakým spôsobom aplikovať túto metódu na spektrá všetkých sledovaných koncentrácií, pretože pri nízkych koncentráciách nízkomolekulárnych látok sa skóre hlavných komponentov do značnej miery prekrývali. To však mohlo byť spôsobené aj nedokonalou optimalizovanou prípravou jednotlivých vzoriek, pretože ako bolo opísané v kapitole 5.3, napriek zachovaniu rovnakého postupu pri príprave všetkých experimentov sa spektrá jednotlivých komplexov s rôznymi koncentraciami líšili aj v znakoch, ktoré nevykazovali pôvod iba v rozličnej koncentrácii organického iónu. Ďalšou miernou nevýhodou PCA analýzy je, že neodkáže jednoznačne oddeliť prekrývajúce sa absorpčné pásy, z čoho môže vyplývať, že sa časť dôležitej informácie v spektrách stráca. V budúcnosti by preto bolo možno vhodné využiť túto metódu napríklad aj kombináciou s inými pokročilými technikami spracovania spektier, akou je napríklad už spomínaná dekonvolúcia.

Odporúčanie pre nasledujúce pokračovanie výskumu by teda mohlo byť v prvom rade overenie neúplne korelujúcich dát naprieč rôznymi koncentraciami komplexov a taktiež objasnenie proteínových absorpčných pásov objavujúcich sa v spektrách získaných najmä v prvom a druhom experimente. Prvým krokom by mohla byť príprava vzoriek s prídavkom azidu sodného, ktorý by mal vylúčiť akúkoľvek mikrobiálnu kontamináciu. Taktiež by bolo vhodné pomocou vyhovujúcej metódy premetať destilovanú vodu po ukončení dialýzy a overiť, či sa v nej nenachádzajú frakcie humínových látok, ktoré by sa mohli po interakcii s organickými iónmi uvoľňovať zo supramolekulárnej štruktúry HK, v dôsledku čoho by mohli byť odkrývané proteínové štruktúry ukryté v humínových látkach. Ďalej by mohli byť vzorky počas prípravy dialyzované dlhší čas (v kombinácii s prídavkom azidu sodného pre zamedzenie kontaminácie), čím by malo byť overené, že bola skutočne dosiahnutá rovnováha a humínové látky na seba nie sú schopné naviazať viac nízkomolekulárnych organických iónov, ako bolo demonštrované v tejto práci.

7 ZOZNAM POUŽITÝCH ZDROJOV

- [1] STEHLÍKOVÁ, Kristína. *Využití vibrační spektroskopie při studiu interakce huminových látek s organickými ionty*. Brno, 2021. Bakalárska práca. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická. Vedoucí práce Ing. Petr Sedláček, Ph.D.
- [2] BOT, Alexandra a José BENITES. *The importance of soil organic matter: key to drought-resistant soil and sustained food production*. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2005. ISBN 92-510-5366-9. ISSN 0253-2050.
- [3] What is organic matter?. In: *U. S. Geological Survey* [online]. Organic Matter Research Laboratory [cit. 2023-02-03]. Dostupné z: <https://www.usgs.gov/labs/organic-matter-research-laboratory/what-organic-matter-0>
- [4] BECKETT, Ronald a James RANVILLE. Natural organic matter. *Interface Science in Drinking Water Treatment - Theory and Application*. Elsevier, 2006, 299-315. Interface Science and Technology. ISBN 9780120883806. Dostupné z: doi:10.1016/S1573-4285(06)80086-4
- [5] SANTÍN NUÑO, Cristina. Characterization of Humic Substances in Salt Marsh Soils. In: OTERO PÉREZ, Xosé Luis a Felipe MACÍAS VAZQUEZ, ed. *Biogeochemistry and Pedogenetic Process in Saltmarsh and Mangrove Systems*. 1. New York: Nova Science Publishers, Inc., 2010, s. 109-127. ISBN 978-1-61728-269-0.
- [6] CHOUDHRY, Ghulam Ghaus. *Humic Substances: Structural, photophysical, photochemical and free radical aspects and interactions with environmental chemicals*. 1. United Kingdom: Gordon and Breach Science Publishers, 1984. ISBN 0-677-06440-3.
- [7] MAGDOFF, Fred a Harold VAN ES. *Building Soils for Better Crops: Ecological management for healthy soils*. Štvrté vydanie. College Park: Sustainable Agriculture Research and Education, 2021. ISBN 978-1-888626-19-3.
- [8] What Are Humic Substances. In: *International Humic Substances Society* [online]. Colorado: IHSS, 2019 [cit. 2023-02-17]. Dostupné z: <http://humic-substances.org/what-are-humic-substances-2/>
- [9] What are Humic Acids?. In: *Humintech* [online]. Nemecko: Humintech, 2018 [cit. 2023-02-26]. Dostupné z: <https://www.humintech.com/agriculture/information/what-are-humic-acids>
- [10] What is Leonardite?. In: *Humintech* [online]. Nemecko: Humintech, 2018 [cit. 2023-02-26]. Dostupné z: <https://www.humintech.com/agriculture/information/what-ist-leonardite>
- [11] KUMAR GAUTAM, Rajneesh, Dimuth NAVARATNA, Shobha MUTHUKUMARAN, Amarendra SINGH, ISLAMUDDIN a Nandkishor MORE. *Humic Substances: Its Toxicology, Chemistry and Biology Associated with Soil, Plants and Environment. Humic Substance [Working Title]*. IntechOpen, 2021. Dostupné z: doi:10.5772/intechopen.98518
- [12] STEVENSON, F. J. *Humus chemistry: genesis, composition, reactions*. 2nd ed. New York: Wiley, 1994. ISBN 978-0-471-59474-1.

- [13] KHANNA, Rajesh, S. P. AGARWAL a R. K. KHAR. *Humic substances in drug development*. New Delhi: Studium Press (India), 2009. ISBN 978-81-907577-1-3.
- [14] SCHNITZER, M. Humic Substances: Chemistry and Reactions. In: SCHNITZER, M. a S. U. KHAN, ed. *Soil Organic Matter*. 1. New York: Elsevier Science Publishers B.V., 1978, s. 1-64. ISBN 0-444-41610-2.
- [15] SIMPSON, André J., William L. KINGERY, Michael H. HAYES et al. Molecular structures and associations of humic substances in the terrestrial environment. *Naturwissenschaften*. 2002, **89**(2), 84-88. ISSN 0028-1042. Dostupné z: doi:10.1007/s00114-001-0293-8
- [16] SUTTON, Rebecca a Garrison SPOSITO. *Molecular Structure in Soil Humic Substances: The New View*. 2005, **39**(23), 9009-9015. ISSN 0013-936X. Dostupné z: doi:10.1021/es050778q
- [17] SMILEK, Jiří, Petr SEDLÁČEK, Michal KALINA a Martina KLUČÁKOVÁ. On the role of humic acids' carboxyl groups in the binding of charged organic compounds. *Chemosphere*. 2015, **138**, 503-510. ISSN 00456535. Dostupné z: doi:10.1016/j.chemosphere.2015.06.093
- [18] SCHNITZER, M. Recent findings on the characterization of humic substances extracted from soils from widely differing climatic zones. In: *Soil Organic Matter Studies*. Vienna: International Atomic Energy Agency, 1977, s. 117-132. ISBN 92-0-010177-1.
- [19] SKOKANOVÁ, Marianna a Katarína DERCOVÁ. Humínové kyseliny. Pôvod a štruktúra. *Chemické Listy*. 2008, **102**(4), 262-268.
- [20] PEÑA-MÉNDEZ, Eladia M., Josef HAVEL a Jiří PATOČKA. Humic substances - compounds of still unknown structure: applications in agriculture, industry, environment, and biomedicine. *Journal of Applied Biomedicine*. 2005, **3**(1), 13-24. ISSN 1214021X. Dostupné z: doi:10.32725/jab.2005.002
- [21] BRZOZOWSKI, T., A. DEMBIŃSKI a S. KONTUREK. Influence of Tołpa Peat Preparation on gastroprotection and on gastric and duodenal ulcers. *Acta Pol Pharm*. 1994, **51**(1), 103-107.
- [22] PFLUG, W. a W. ZIECHMANN. Humic acids and the disruption of bacterial cell walls by lysozyme. *Soil biology and biochemistry*. 1982, **14**(2), 165-166.
- [23] YAMADA, Etsu, Takashi OZAKI a Machiko KIMURA. Determination and Behavior of Humic Substances as Precursors of Trihalomethane in Environmental Water. *Analytical Sciences*. 1998, **14**(2), 327-332.
- [24] SENESI, Nicola a Elisabetta LOFFREDO. Soil Humic Substances. In: STEINBÜCHEL, A., ed. *Biopolymers: Lignin, Humic Substances and Coal*. Volume 1. Weinheim: Wiley-VCH, 2001, s. 247-299. ISBN 3-527-30220-4.

- [25] GOLDBERG, David Elliott. *Fundamentals of Chemistry*. 5th ed. New York: McGraw-Hill, 2007. ISBN 9780072828504.
- [26] SENESI, Nicola. Binding mechanisms of pesticides to soil humic substances. *The Science of the Total Environment*. Amsterdam: Elsevier Science Publishers, 1992, (123124), 63-76.
- [27] THORN, Kevin A., Penny J. PETTIGREW, Wayne S. GOLDENBERG a Eric J. WEBER. Covalent Binding of Aniline to Humic Substances. 2. ¹⁵N NMR Studies of Nucleophilic Addition Reactions. *Environ. Sci. Technol.* 1996, **30**(9), 2764-2775. ISSN 0013-936X. Dostupné z: doi:10.1021/es9509339
- [28] PARRIS, George E. Covalent binding of aromatic amines to humates. 1. Reactions with carbonyls and quinones. *Environ. Sci. Technol.* 1980, **14**(9), 1099-1106. ISSN 0013-936X. Dostupné z: doi:10.1021/es60169a016
- [29] HSU, Tsung-Shih a Richard BARTHA. Hydrolyzable and nonhydrolyzable 3,4-dichloroaniline-humus complexes and their respective rates of biodegradation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 1976, **24**(1), 118-122. ISSN 0021-8561. Dostupné z: doi:10.1021/jf60203a021
- [30] BOLLAG, Jean-Marc, Carla J. MYERS a Robert D. MINARD. Biological and chemical interactions of pesticides with soil organic matter. *Science of The Total Environment*. 1992, 123-124, 205-217. ISSN 00489697. Dostupné z: doi:10.1016/0048-9697(92)90146-J
- [31] VESELÁ, Lenka, Martin KUBAL, Josef KOZLER a Petra INNEMANOVÁ. Struktura a vlastnosti přírodních huminových látek typu oxihumolitu. *Chemické listy* [online]. 2005, **99**(10), 711-717 [cit. 2023-02-28]. Dostupné z: <http://www.chemicke-listy.cz/ojs3/index.php/chemicke-listy/article/view/1987/1987>
- [32] PFENNING, Brian William. *Principles of inorganic chemistry*. 1st ed. New Jersey: John Wiley and Sons, Inc., 2015. ISBN 978-1-118-85910-0.
- [33] MCMURRY, John. *Organická chemie*. V Brně: VUTIUM, 2007. Překlady vysokoškolských učebnic. ISBN 978-80-214-3291-8.
- [34] CHANG, Raymond. *General chemistry: the essential concepts*. 5th ed. Boston: McGraw-Hill, 2007. ISBN 978-0-07-110226-1.
- [35] TÁBORSKÁ, Eva a Jaromír SLÁMA. *Medical chemistry*. 5. české vyd., 1. v nakl. Galén. Brno: Masarykova univerzita, 2006. Překlady vysokoškolských učebnic. ISBN 80-210-4091-2.
- [36] ANSLYN, Eric V. a Dennis A. DOUGHERTY. *Modern physical organic chemistry*. Sausalito: University Science Books, 2006. ISBN 18-913-8931-9.
- [37] ALLEN, James P. *Biophysical Chemistry*. 1. Chichester, UK: Blackwell Publishing, 2008. ISBN 978-1-4051-2436-2.
- [38] JEFFREY, G. A. a W. SAENGER. *Hydrogen Bonding in Biological Structures*. 1. Berlín, Nemecko: Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 1991. ISBN 3-540-50839-2.

- [39] Pi-Stacking (chemistry). In: *Wikipedia* [online]. 2021 [cit. 2023-03-03]. Dostupné z: [https://en.wikipedia.org/wiki/Pi-Stacking_\(chemistry\)](https://en.wikipedia.org/wiki/Pi-Stacking_(chemistry))
- [40] CHEN, Tao, Meixiu LI a Jingquan LIU. π - π Stacking Interaction: A Nondestructive and Facile Means in Material Engineering for Bioapplications. 2018, **18**(5), 2765-2783. ISSN 1528-7483. Dostupné z: doi:10.1021/acs.cgd.7b01503
- [41] MURRAY, Robert K., Daryl K. GRANNER, Peter A. MAYES a Victor W. RODWELL. *Harper's Illustrated Biochemistry*. 26th ed. USA: McGraw-Hill Companies, 2003. ISBN 0-07-138901-6.
- [42] ATKINS, P. W. a Julio DE PAULA. *Atkins' Physical chemistry*. 8th ed. Oxford: Oxford University Press, 2006. ISBN 978-019-8700-722.
- [43] CAMPANELLA, B., V. PALLESCHI a S. LEGNAIOLI. Introduction to vibrational spectroscopies. *ChemTexts*. 2021, **7**(1), 1-21. ISSN 2199-3793. Dostupné z: doi:10.1007/s40828-020-00129-4
- [44] Theory of Vibrational Spectroscopy. In: NYQUIST, Richard Allen. *Interpreting Infrared, Raman, and Nuclear Magnetic Resonance Spectra*. 1. Elsevier Inc., 2001, s. 1-24. ISBN 978-0-12-523475-7.
- [45] MILATA, Viktor a Peter SEGĽA. *Vybrané metódy molekulovej spektroskopie*. Bratislava: STU, 2007. ISBN 978-80-227-2618-4.
- [46] KANIA, Patrik. *Infračervená spektrometrie*. In: VŠCHT Praha [online]. Praha [cit. 2023-04-13]. Dostupné z: <https://www.vscht.cz/files/uzel/0005766/Infra%C4%8Derven%C3%A1+spektrometrie.pdf?redirected>
- [47] KLOUDA, Pavel. *Moderní analytické metody*. 2., upr. a dopl. vyd. Ostrava: Pavel Klouda, 2003. ISBN 80-863-6907-2.
- [48] The FT-IR Transmission Technique for Measuring Polymers. In: *ThermoFisher Scientific* [online]. [cit. 2023-04-15]. Dostupné z: <https://www.thermofisher.com/blog/materials/the-ft-ir-transmission-technique-for-measuring-polymers/>
- [49] FTIR Sample Techniques: Attenuated Total Reflection (ATR). In: *ThermoFisher Scientific* [online]. Thermo Fisher Scientific Inc. [cit. 2023-04-15]. Dostupné z: <https://www.thermofisher.com/sk/en/home/industrial/spectroscopy-elemental-isotope-analysis/spectroscopy-elemental-isotope-analysis-learning-center/molecular-spectroscopy-information/ftir-information/ftir-sample-handling-techniques/ftir-sample-handling-techniques-attenuated-total-reflection-atr.html>
- [50] AUSILI, Alessio, Marina SÁNCHEZ a Juan C. GÓMEZ-FERNÁNDEZ. Attenuated total reflectance infrared spectroscopy: A powerful method for the simultaneous study of structure and spatial orientation of lipids and membrane proteins. *Biomedical Spectroscopy and Imaging*. 2015, **4**(2), 159-170. ISSN 22128794. Dostupné z: doi:10.3233/BSI-150104

- [51] MACHOVIČ, Vladimír a František NOVÁK. Difuzně-reflexní infračervená spektroskopie půdních bitumenů z oblasti Šumavy. *Chemické Listy*. 1998, **92**(2), 151-156.
- [52] FTIR Sample Techniques - Diffuse Reflectance (DRIFTS) [online]. In: *ThermoFisher Scientific*. [cit. 2023-04-15]. Dostupné z: <https://www.thermofisher.com/cz/en/home/industrial/spectroscopy-elemental-isotope-analysis/spectroscopy-elemental-isotope-analysis-learning-center/molecular-spectroscopy-information/ftir-information/ftir-sample-handling-techniques/ftir-sample-handling-techniques-diffuse-reflectance-drifts.html>
- [53] Ramanova spektroskopie: Hlubší pochopení chemických reakcí. In: *Mettler Toledo* [online]. [cit. 2023-04-15]. Dostupné z: https://www.mt.com/cz/cs/home/applications/L1_AutoChem_Applications/Raman-Spectroscopy.html
- [54] ARČON, Iztok, Arnold PASTRELLO, Laura CATALANO, Maria DE NOBILI, Pierpaolo CANTONE a Liviana LEITA. Interaction between Fe-cyanide complex and humic acids. *Environmental Chemistry Letters*. 2006, **4**(4), 191-194. ISSN 1610-3653. Dostupné z: doi:10.1007/s10311-006-0044-3
- [55] TANG, Haiming, Baohua XIAO a Peiwen XIAO. Interaction of Ca²⁺ and soil humic acid characterized by a joint experimental platform of potentiometric titration, UV–visible spectroscopy, and fluorescence spectroscopy. *Acta Geochimica*. 2021, **40**(3), 300-311. ISSN 2096-0956. Dostupné z: doi:10.1007/s11631-021-00453-7
- [56] GU, Yun-Lan, Ming-Xing YIN, Hong-Mei ZHANG, Yan-Qing WANG a Jing-hua SHI. Study on the binding interaction of chromium(VI) with humic acid using UV–vis, fluorescence spectroscopy and molecular modeling. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 2015, **136**, 1702-1709. ISSN 13861425. Dostupné z: doi:10.1016/j.saa.2014.10.069
- [57] ZHU, Dongqiang, Seunghun HYUN, Joseph J. PIGNATELLO a Linda S. LEE. Evidence for π – π Electron Donor–Acceptor Interactions between π -Donor Aromatic Compounds and π -Acceptor Sites in Soil Organic Matter through pH Effects on Sorption. *Environ. Sci. Technol.* 2004, **38**(16), 4361-4368. ISSN 0013-936X. Dostupné z: doi:10.1021/es035379e
- [58] XIE, Yaping, Zengfu GUAN, Jixia CHENG, Yuxuan ZHOU a Mingquan YAN. Competition between Al(III) and Fe(III) for binding onto natural organic matter: In situ monitoring by UV–Vis absorbance spectroscopy. *Chemosphere*. 2021, **270**. ISSN 00456535. Dostupné z: doi:10.1016/j.chemosphere.2020.128655
- [59] BOGUTA, Patrycja a Zofia SOKOŁOWSKA. *Interactions of humic acids with metals*. Acta Agroph. Monogr. 2013, 2, 1-113. ISSN 2084-3429.
- [60] GISMERA, M. Jesús, Jesús R. PROCOPIO a M. Teresa SEVILLA. Characterization of Mercury – Humic Acids Interaction by Potentiometric Titration with a Modified Carbon Paste Mercury Sensor. *Electroanalysis*. 2007, **19**(10), 1055-1061. ISSN 10400397. Dostupné z: doi:10.1002/elan.200603821

- [61] LUBAL, P., D. FETSCH, D. ŠIROKÝ, M. LUBALOVÁ, J. ŠENKÝR a J. HAVEL. Potentiometric and spectroscopic study of uranyl complexation with humic acids. *Talanta*. 2000, **51**(5), 977-991. ISSN 00399140. Dostupné z: doi:10.1016/S0039-9140(00)00281-2
- [62] BORGES, F, C GUIMARAES, J LIMA, I PINTO a S REIS. Potentiometric studies on the complexation of copper(II) by phenolic acids as discrete ligand models of humic substances. *Talanta*. 2005, **66**(3), 670-673. ISSN 00399140. Dostupné z: doi:10.1016/j.talanta.2004.12.012
- [63] YEE, Min Min, Tohru MIYAJIMA a Noboru TAKISAWA. Study of ionic surfactants binding to humic acid and fulvic acid by potentiometric titration and dynamic light scattering. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 2009, **347**(1-3), 128-132. ISSN 09277757. Dostupné z: doi:10.1016/j.colsurfa.2009.02.010
- [64] FRYŠOVÁ, Eva. *Vliv chemické modifikace huminových kyselin na jejich interakce s organickými ionty*. Brno, 2017. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická. Vedoucí práce Ing. Petr Sedláček, Ph.D.
- [65] SEDLÁČEK, Petr, Jiří SMILEK a Martina KLUČÁKOVÁ. How the interactions with humic acids affect the mobility of ionic dyes in hydrogels – Results from diffusion cells. *Reactive and Functional Polymers*. 2013, **73**(11), 1500-1509. ISSN 13815148. Dostupné z: doi:10.1016/j.reactfunctpolym.2013.07.008
- [66] SEDLÁČEK, Petr, Jiří SMILEK a Martina KLUČÁKOVÁ. How the interactions with humic acids affect the mobility of ionic dyes in hydrogels – 2. Non-stationary diffusion experiments. *Reactive and Functional Polymers*. 2014, **75**, 41-50. ISSN 13815148. Dostupné z: doi:10.1016/j.reactfunctpolym.2013.12.002
- [67] OTTO, William H., Danny J. BRITTEN a Cynthia K. LARIVE. NMR diffusion analysis of surfactant–humic substance interactions. *Journal of Colloid and Interface Science*. 2003, **261**(2), 508-513. ISSN 00219797. Dostupné z: doi:10.1016/S0021-9797(03)00062-6
- [68] KROUSKÁ, Jitka. *Využití mikrokolorimetrie při studiu vazebných a fázových rovnováh biomolekul: Návod pro praktikum z instrumentální analýzy*. VUT Brno, 2022.
- [69] TAN, Wen Feng, Luuk K. KOOPAL a Willem NORDE. *Interaction between Humic Acid and Lysozyme, Studied by Dynamic Light Scattering and Isothermal Titration Calorimetry*. 2009, **43**(3), 591-596. ISSN 0013-936X. Dostupné z: doi:10.1021/es802387u
- [70] LOOSLI, Frédéric, Leticia VITORAZI, Jean-François BERRET a Serge STOLL. Isothermal titration calorimetry as a powerful tool to quantify and better understand agglomeration mechanisms during interaction processes between TiO₂ nanoparticles and humic acids. *Environmental Science: Nano*. 2015, **2**(5), 541-550. ISSN 2051-8153. Dostupné z: doi:10.1039/C5EN00139K
- [71] XU, Jinling, Luuk K. KOOPAL, Linchuan FANG, Juan XIONG a Wenfeng TAN. Proton and Copper Binding to Humic Acids Analyzed by XAFS Spectroscopy and Isothermal Titration Calorimetry. *Environ. Sci. Technol.* 2018, **52**(7), 4099-4107. ISSN 0013-936X. Dostupné z: doi:10.1021/acs.est.7b06281

- [72] ČOKEŠA, Đuro, Svjetlana RADMANOVIĆ, Nebojša POTKONJAK, Mirjana MARKOVIĆ a Snežana ŠERBULA. Soil humic acid and arsenite binding by isothermal titration calorimetry and Dynamic Light Scattering: Thermodynamics and aggregation. *Chemosphere*. 2023, **315**. ISSN 00456535. Dostupné z: doi:10.1016/j.chemosphere.2022.137687
- [73] CHEN, S., W. P. INSKEEP, S. A. WILLIAMS a P. R. CALLIS. Complexation of 1-Naphthol by Humic and Fulvic Acids. *Soil Science Society of America Journal*. 1992, **56**(1), 67-73. ISSN 03615995. Dostupné z: doi:10.2136/sssaj1992.03615995005600010011x
- [74] MORRA, M. J., M. O. CORAPCIOGLU, R. M. A. VON WANDRUSZKA, D. B. MARSHALL a K. TOPPER. Fluorescence Quenching and Polarization Studies of Naphthalene and 1-Naphthol Interaction with Humic Acid. *Soil Science Society of America Journal*. 1990, **54**(5), 1283-1289. ISSN 03615995. Dostupné z: doi:10.2136/sssaj1990.03615995005400050014x
- [75] LU, X. Interaction between Hg(II) and natural dissolved organic matter: a fluorescence spectroscopy based study. *Water Research*. 2001, **35**(7), 1793-1803. ISSN 00431354. Dostupné z: doi:10.1016/S0043-1354(00)00423-1
- [76] SPARK, K.M. a R.S. SWIFT. Investigation of the interaction between pesticides and humic substances using fluorescence spectroscopy. *Science of The Total Environment*. 1994, **152**(1), 9-17. ISSN 00489697. Dostupné z: doi:10.1016/0048-9697(94)90546-0
- [77] BAI, Yingchen, Fengchang WU, Congqiang LIU, Jianyang GUO, Pingqing FU, Wen LI a Baoshan XING. INTERACTION BETWEEN CARBAMAZEPINE AND HUMIC SUBSTANCES: A FLUORESCENCE SPECTROSCOPY STUDY. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 2008, **27**(1), 07-013. ISSN 0730-7268. Dostupné z: doi:10.1897/07-013.1
- [78] CAVOSKI, Ivana, Valeria D'ORAZIO a Teodoro MIANO. Interactions between rotenone and humic acids by means of FT-IR and fluorescence spectroscopies. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2009, **395**(4), 1145-1158. ISSN 1618-2642. Dostupné z: doi:10.1007/s00216-009-3026-z
- [79] TAHERKHANI, Negar, Azadeh HEKMAT, Hossein PIRI a Kamahldin HAGHBEEN. Structural and inhibitory effects of fulvic and humic acids against tyrosinase. *Journal of Food Biochemistry*. 2022, **46**(10), 1-12. ISSN 0145-8884. Dostupné z: doi:10.1111/jfbc.14279
- [80] BURNS, Ian G., Michael H. B. HAYES a Manaurice STACEY. Spectroscopic Studies on the Mechanisms of Adsorption of Paraquat by Humic Acid and Model Compounds. *Pestic. Sci.* 1973, (4), 201-209.
- [81] KHAN, S. U. Adsorption of Bipyridylum Herbicides by Humic Acid. *Journal of Environmental Quality*. 1974, **3**(3), 202-206.

- [82] SENESI, Nicola, Ciro TESTINI a Teodoro M. MIANO. Interaction mechanisms between humic acids of different origin and nature and electron donor herbicides: A comparative IR and ESR study. *Org. Geochem.* 1987, **11**(1), 25-30.
- [83] PICCOLO, A. a G. CELANO. Hydrogen-bonding interactions between the herbicide glyphosate and water-soluble humic substances. *Environmental Toxicology and Chemistry.* 1994, **13**(11), 1737-1741.
- [84] CELI, Luisella, Mara GENNARI, Shahamat U. KHAN a Morris SCHNITZER. Mechanisms of Acifluorfen Interaction with Humic Acid. *Soil Science Society of America Journal.* 1997, **61**(6), 1659-1665. ISSN 03615995. Dostupné z: doi:10.2136/sssaj1997.03615995006100060017x
- [85] YANG, Bo, Chengjin WANG, Xin CHENG et al. Interactions between the antibiotic tetracycline and humic acid: Examination of the binding sites, and effects of complexation on the oxidation of tetracycline. *Water Research.* 2021, **202**. ISSN 00431354. Dostupné z: doi:10.1016/j.watres.2021.117379
- [86] YANG, Kun, Daohui LIN a Baoshan XING. Interactions of Humic Acid with Nanosized Inorganic Oxides. *Langmuir.* 2009, **25**(6), 3571-3576. ISSN 0743-7463. Dostupné z: doi:10.1021/la803701b
- [87] CHEN, Panpan, Mengchen SHI, Xina LIU, Xiaoyu WANG, Mengling FANG, Zhuorui GUO, Xiangwei WU a Yi WANG. Comparison of the binding interactions of 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase inhibitor herbicides with humic acid: Insights from multispectroscopic techniques, DFT and 2D-COS-FTIR. *Ecotoxicology and Environmental Safety.* 2022, **239**. ISSN 01476513. Dostupné z: doi:10.1016/j.ecoenv.2022.113699
- [88] AHMED, Zakiuddin, G. H. JHATIAL a Nadir BUKSH. FTIR - A didactic approach for the study of humic acid - Chromium chelation during the environmental remediation. *Pakistan Journal of Scientific and Industrial Research Series A: Physical Sciences.* 2013, **56**(1), 1-5.
- [89] NMR. In: *Fyzikální sekce Matematicko-fyzikální fakulty Univerzity Karlovy* [online]. Praha: Univerzita Karlova [cit. 2023-03-28]. Dostupné z: <https://physics.mff.cuni.cz/kfnt/pec/NMR.pdf>
- [90] HSU, Pang-Hung a Patrick G. HATCHER. Covalent coupling of peptides to humic acids: Structural effects investigated using 2D NMR spectroscopy. *Organic Geochemistry.* 2006, **37**(12), 1694-1704. ISSN 01466380. Dostupné z: doi:10.1016/j.orggeochem.2006.07.026
- [91] BEDARD, Mary, Kelly A. GIFFEAR, Lisa PONTON, Karl D. SIENERTH a Victoria DEL GAIZO MOORE. Characterization of binding between 17 β -estradiol and estriol with humic acid via NMR and biochemical analysis. *Biophysical Chemistry.* 2014, **189**, 1-7. ISSN 03014622. Dostupné z: doi:10.1016/j.bpc.2014.02.001
- [92] NANNY, Mark A. a Jesus P. MAZA. Noncovalent Interactions between Monoaromatic Compounds and Dissolved Humic Acids: A Deuterium NMR T1 Relaxation Study. *Environ. Sci. Technol.* 2001, **35**, 379-384. Dostupné z: doi:10.1021/es0012927

- [93] MAZZEI, Pierluigi, Silvana CANGEMI, Ali MALAKSHAHI KURDESTANI, Torsten MUELLER a Alessandro PICCOLO. Quantitative Evaluation of Noncovalent Interactions between 3,4-Dimethyl-1 H -pyrazole and Dissolved Humic Substances by NMR Spectroscopy. *Environ. Sci. Technol.* 2022, **56**(16), 11771-11779. ISSN 0013-936X. Dostupné z: doi:10.1021/acs.est.2c00900
- [94] CHAUBEY, Bhawna, Pooja SINGH a Samanwita PAL. Solution-state NMR evaluation of molecular interaction between monoaromatic carboxylic acids and dissolved humic acid. *Environmental Science and Pollution Research*. 2021, **28**(14), 17775-17788. ISSN 0944-1344. Dostupné z: doi:10.1007/s11356-020-12092-1
- [95] THORN, K. A. a K. R. KENNEDY. *15 N NMR Investigation of the Covalent Binding of Reduced TNT Amines to Soil Humic Acid, Model Compounds, and Lignocellulose*. 2002, **36**(17), 3787-3796. ISSN 0013-936X. Dostupné z: doi:10.1021/es011383j
- [96] BOLLAG, Jean-Marc a Jerzy DEC. Characterization of the Interaction between Xenobiotic Residues and Humic Substances. In: *Humic Substances and Chemical Contaminants*. 1. Madison, WI, USA: Soil Science Society of America, 2001, s. 155-164. ISBN 9780891188759. Dostupné z: doi:10.2136/2001.humicsubstances.c9
- [97] SIMPSON, Myrna J., André J. SIMPSON a Patrick G. HATCHER. NONCOVALENT INTERACTIONS BETWEEN AROMATIC COMPOUNDS AND DISSOLVED HUMIC ACID EXAMINED BY NUCLEAR MAGNETIC RESONANCE SPECTROSCOPY. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 2004, **23**(2), 03-217. ISSN 0730-7268. Dostupné z: doi:10.1897/03-217
- [98] KATSUMOTO, Yukiteru, Takeyuki TANAKA, Yukihiro OZAKI a Shinzo HOSOI. Effects of dipole interaction and solvation on the CO stretching band of N,N-dimethylacetamide in nonpolar solutions: Infrared, isotropic and anisotropic Raman measurements. *Vibrational Spectroscopy*. 2009, **51**(1), 119-124. ISSN 09242031. Dostupné z: doi:10.1016/j.vibspec.2008.11.009
- [99] OVCHINNIKOV, Oleg V., Anna V. EVTUKHOVA, Tamara S. KONDRATENKO a Mikhail S. SMIRNOV. Manifestation of intermolecular interactions in FTIR spectra of methylene blue molecules. *Vibrational Spectroscopy*. 2016, **86**, 181-189. Dostupné z: doi:https://doi.org/10.1016/j.vibspec.2016.06.016
- [100] RAKIPOV, Ilnaz T., Artem A. PETROV, Aydar A. AKHMADIYAROV, Artashes A. KHACHATRIAN a Mikhail A. VARFOLOMEEV. FTIR spectral study of intermolecular interactions of C=O groups of amides in solution. *Journal of Molecular Liquids*. 2022, **354**. ISSN 01677322. Dostupné z: doi:10.1016/j.molliq.2022.118838
- [101] UDAYASEELAN, J., M. ARAVINTHAJ, F. LIAKATH ALI KHAN a C.P. DEVIPRIYA. The non-covalent interaction studies of o-nitrophenol and methyl acetate in benzene: By ultrasonics, FTIR and DFT methods. *Materials Today: Proceedings*. 2021, **47**, 4527-4532. ISSN 22147853. Dostupné z: doi:10.1016/j.matpr.2021.05.420

- [102] WANG, Haitao, Daniel J. GRANT, Peter C. BURNS a Chongzheng NA. Infrared Signature of the Cation- π Interaction between Calcite and Aromatic Hydrocarbons. *Langmuir*. 2015, **31**(21), 5820-5826. ISSN 0743-7463. Dostupné z: doi:10.1021/acs.langmuir.5b00610
- [103] DO, Tien T.T., Uyen P.N. DAO, Huong T. BUI a Trang T. NGUYEN. Effect of electrostatic interaction between fluoxetine and lipid membranes on the partitioning of fluoxetine investigated using second derivative spectrophotometry and FTIR. *Chemistry and Physics of Lipids*. 2017, **207**, 10-23. ISSN 00093084. Dostupné z: doi:10.1016/j.chemphyslip.2017.07.001
- [104] TOOKE, P.B. Fourier self-deconvolution in IR spectroscopy. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 1988, **7**(4), 130-136. ISSN 01659936. Dostupné z: doi:10.1016/0165-9936(88)87010-9
- [105] KOTOV, Nikolay, Vladimír RAUS a Jiří DYBAL. Non-covalent interactions of imidazolium-based ionic liquids with model pyrrolidones revealed by FTIR spectroscopy and quantum chemical model calculations. *Journal of Molecular Liquids*. 2020, **312**. ISSN 01677322. Dostupné z: doi:10.1016/j.molliq.2020.113445
- [106] WU, Ke, Fei MA, Zhenwang LI, Cuilan WEI, Fangqun GAN a Changwen DU. In-situ rapid monitoring of nitrate in urban water bodies using Fourier transform infrared attenuated total reflectance spectroscopy (FTIR-ATR) coupled with deconvolution algorithm. *Journal of Environmental Management*. 2022, **317**. ISSN 03014797. Dostupné z: doi:10.1016/j.jenvman.2022.115452
- [107] ORTUSO, Roberto D., Niccolò RICARDI, Thomas BÜRGI, Tomasz A. WESOŁOWSKI a Kaori SUGIHARA. The deconvolution analysis of ATR-FTIR spectra of diacetylene during UV exposure. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 2019, **219**, 23-32. ISSN 13861425. Dostupné z: doi:10.1016/j.saa.2019.04.030
- [108] Two-dimensional correlation analysis. In: *Wikipedia* [online]. 2023 [cit. 2023-04-15]. Dostupné z: https://en.wikipedia.org/wiki/Two-dimensional_correlation_analysis
- [109] NODA, Isao. *Generalized Two-Dimensional Correlation Spectroscopy*. *Frontiers of Molecular Spectroscopy*. Elsevier, 367-381. ISBN 9780444531759. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-444-53175-9.00013-1
- [110] DAVIES, A.M.C. a Tom FEARN. Back to basics: the principles of principal component analysis. In: *Spectroscopy Europe* [online]. 2004 [cit. 2023-04-15]. Dostupné z: <https://www.spectroscopyeurope.com/td-column/back-basics-principles-principal-component-analysis>
- [111] SHARMA, Vishal, Rohini CHAUHAN a Raj KUMAR. Spectral characteristics of organic soil matter: A comprehensive review. *Microchemical Journal*. 2021, **171**. ISSN 0026265X. Dostupné z: doi:10.1016/j.microc.2021.106836
- [112] CALVO, Natalia L., Teodoro S. KAUFMAN a Rubén M. MAGGIO. A PCA-based chemometrics-assisted ATR-FTIR approach for the classification of polymorphs of cimetidine: Application to physical mixtures and tablets. *Journal of Pharmaceutical and*

- Biomedical Analysis*. 2015, **107**, 419-425. ISSN 07317085. Dostupné z: doi:10.1016/j.jpba.2015.01.016
- [113] RITZ, Michal, Lenka VACULÍKOVÁ a Eva PLEVOVÁ. APPLICATION OF INFRARED SPECTROSCOPY AND CHEMOMETRIC METHODS TO IDENTIFICATION OF SELECTED MINERALS. *Acta Geodyn. Geomater.* 2011, **1**(161), 47-58.
- [114] COTRIM, A. R., A. FERRAZ, A. R. GONCALVES, F. T. SILVA a R. E. BRUNS. Identifying the origin of lignins and monitoring their structural changes by means of FTIR-PCA and -SIMCA. *Bioresource Technology*. 1999, **68**, 29-34.
- [115] MIRANDA, Teresa MR, Adilson R GONÇALVES a MT Pessoa AMORIM. Ultraviolet-induced crosslinking of poly(vinyl alcohol) evaluated by principal component analysis of FTIR spectra. *Polymer International*. 2001, **50**(10), 1068-1072. ISSN 09598103. Dostupné z: doi:10.1002/pi.745
- [116] DORDEVIC, Simona, Dani DORDEVIC, Petr SEDLACEK et al. Incorporation of Natural Blueberry, Red Grapes and Parsley Extract By-Products into the Production of Chitosan Edible Films. *Polymers*. 2021, **13**(19). ISSN 2073-4360. Dostupné z: doi:10.3390/polym13193388
- [117] PERERA, Kalindu D.C., Geethika K. WERAGODA, Rukshani HAPUTHANTHRI a Sanjeewa K. RODRIGO. Study of concentration dependent curcumin interaction with serum biomolecules using ATR-FTIR spectroscopy combined with Principal Component Analysis (PCA) and Partial Least Square Regression (PLS-R). *Vibrational Spectroscopy*. 2021, **116**. ISSN 09242031. Dostupné z: doi:10.1016/j.vibspec.2021.103288
- [118] PERISIC, Nebojsa, Nils Kristian AFSETH, Ragni OFSTAD a Achim KOHLER. Monitoring Protein Structural Changes and Hydration in Bovine Meat Tissue Due to Salt Substitutes by Fourier Transform Infrared (FTIR) Microspectroscopy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2011, **59**(18), 10052-10061. ISSN 0021-8561. Dostupné z: doi:10.1021/jf201578b
- [119] BĚLUŠOVÁ, Anna. *Vliv methylace huminových kyselin na interakci s povrchově aktivními látkami*. Brno, 2021. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická. Vedoucí práce Ing. Jiří Smilek, Ph.D.
- [120] MLYNÁRIKOVÁ, Katarína, Ota SAMEK, Silvie BERNATOVÁ et al. Influence of Culture Media on Microbial Fingerprints Using Raman Spectroscopy. *Sensors*. 2015, **15**(11), 29635-29647. ISSN 1424-8220. Dostupné z: doi:10.3390/s151129635
- [121] TATZBER, Michael, Michael STEMMER, Heide SPIEGEL, Christian KATZLBERGER, Georg HABERHAUER, Axel MENTLER a Martin H. GERZABEK. FTIR-spectroscopic characterization of humic acids and humin fractions obtained by advanced NaOH, Na4P2O7, and Na2CO3 extraction procedures. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*. 2007, **170**(4), 522-529. ISSN 14368730. Dostupné z: doi:10.1002/jpln.200622082

- [122] NOVÁK, František, Vladimír MACHOVIČ, Hana HRABALOVÁ a Miroslava NOVOTNÁ. Kvantitativní FTIR spektrometrie huminových látek. *Chemické Listy*. 2017, **111**(6), 363-373.
- [123] REN, Hui, Dhaval D. KULKARNI, Rajesh KODIYATH, Weinan XU, Ikjun CHOI a Vladimír V. TSUKRUK. Competitive Adsorption of Dopamine and Rhodamine 6G on the Surface of Graphene Oxide. 2014, **6**(4), 2459-2470. ISSN 1944-8244. Dostupné z: doi:10.1021/am404881p
- [124] RAO, Parvathy a Venkateswara RAO. Luminiscent dye Rhodamine 6G doped monolithic and transparent TEOS silica xerogels and spectral properties. *Science and Technology of Advanced Materials*. 2003, **4**(2), 121-129. ISSN 1468-6996. Dostupné z: doi:10.1016/S1468-6996(02)00042-6
- [125] OU, Jun, YanBing HU, LanZhen HUANG, Rui ZHANG, Tao XU a Jing ZHAO. PH-sensitive nanocarriers for Ganoderma applanatum polysaccharide release via host-guest interactions. *Journal of Materials Science*. 2018, **53**(11), 7963-7975. ISSN 0022-2461. Dostupné z: doi:10.1007/s10853-018-2091-0
- [126] BANJARE, Ramesh Kumar, Manoj Kumar BANJARE a Sandhyarani PANDA. Effect of Acetonitrile on the Colloidal Behavior of Conventional Cationic Surfactants: A Combined Conductivity, Surface Tension, Fluorescence and FTIR Study. *Journal of Solution Chemistry*. 2020, **49**(1), 34-51. ISSN 0095-9782. Dostupné z: doi:10.1155/2012/903272
- [127] VIANA, Rommel B., Albérico B. F. DA SILVA a André S. PIMENTEL. Infrared Spectroscopy of Anionic, Cationic, and Zwitterionic Surfactants. *Advances in Physical Chemistry*. 2012, 1-14. ISSN 1687-7985. Dostupné z: doi:10.1155/2012/903272
- [128] ANASTASSOPOULOU, Jane D., Manoj Kumar BANJARE a Sandhyarani PANDA. Mass and FT-IR Spectra of Quaternary Ammonium Surfactants: A Combined Conductivity, Surface Tension, Fluorescence and FTIR Study. *Chemistry and Properties of Biomolecular Systems*. Dordrecht: Springer Netherlands, 1991, **49**(1), 1-9. Topics in Molecular Organization and Engineering. ISBN 978-94-010-5606-9. ISSN 0095-9782. Dostupné z: doi:10.1007/978-94-011-3620-4_1
- [129] RYBÁRIK, Jan. *Strukturní a termodynamické aspekty interakcí biopolymerů s organickými ionty*. Brno, 2017. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická. Vedoucí práce Ing. Petr Sedláček, Ph.D.
- [130] PRISAŽNÝ, Adam. *Využití spektroskopických metod při studiu interakce přírodní organické hmoty s organickými ionty*. Brno, 2019. Bakalářská práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická. Vedoucí práce Ing. Petr Sedláček, Ph.D.
- [131] PRISAŽNÝ, Adam. *Strukturní aspekty interakce huminových látek s iontovými organickými xenobiotiky*. Brno, 2021. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická. Vedoucí práce Ing. Petr Sedláček, Ph.D.

8 ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK A SYMBOLOV

alif	alifatický		
ar	aromatický		
ATR	úplný zoslabený odraz		
DRIFTS	difúzna reflektancia		
FK	fulvokyselina		
FSD	Fourier self-deconvolution		
FTIR	infračervená spektroskopia s Fourierovou transformáciou		
het	heterocyklus		
HK	humínová kyselina		
HL	humínová látka		
IČ	infračervený		
IHSS	Medzinárodná spoločnosť pre humínové látky		
ISE	iónovo selektívna elektróda		
ITK	izotermická titračná kalorimetria		
MB	metylénová modrá		
MWCO	molecular weight cut-off		
NMR	jadrová magnetická rezonančná spektroskopia		
OP	organický polutant		
PAL	povrchovo aktívna látka		
PC	hlavný komponent		
PCA	analýza hlavných komponentov		
POH	pôdna/prírodná organická hmota		
R6G	rhodamin 6G		
SDS	dodecylsírany sodný		
STD	smerodajná odchýlka (<i>standard deviation</i>)		
UV	ultrafialový		
UV-VIS	ultrafialová a viditeľná časť spektra		
A	absorbancia	ν_s	symetrická valenčná vibrácia
T	transmitancia	ν_{as}	asymetrická valenčná vibrácia
$\tilde{\nu}$	vlnčet		deformačná, rovinná deformačná
λ	vlnová dĺžka	δ	alebo nožničková vibrácia
ϕ_0	tok žiarenia pred kyvetou	γ	mimorovinná deformačná vibrácia
ϕ	tok žiarenia za kyvetou	ρ	kyvadlová vibrácia
ν	frekvencia vibrujúcej molekuly	ω	vejárová vibrácia
h	Planckova konštanta	τ	krútiaca (torzná) vibrácia
ν	vibračné kvantové číslo	K_{app}	zdanlivá rovnovážna konštanta
ν	valenčná vibrácia		

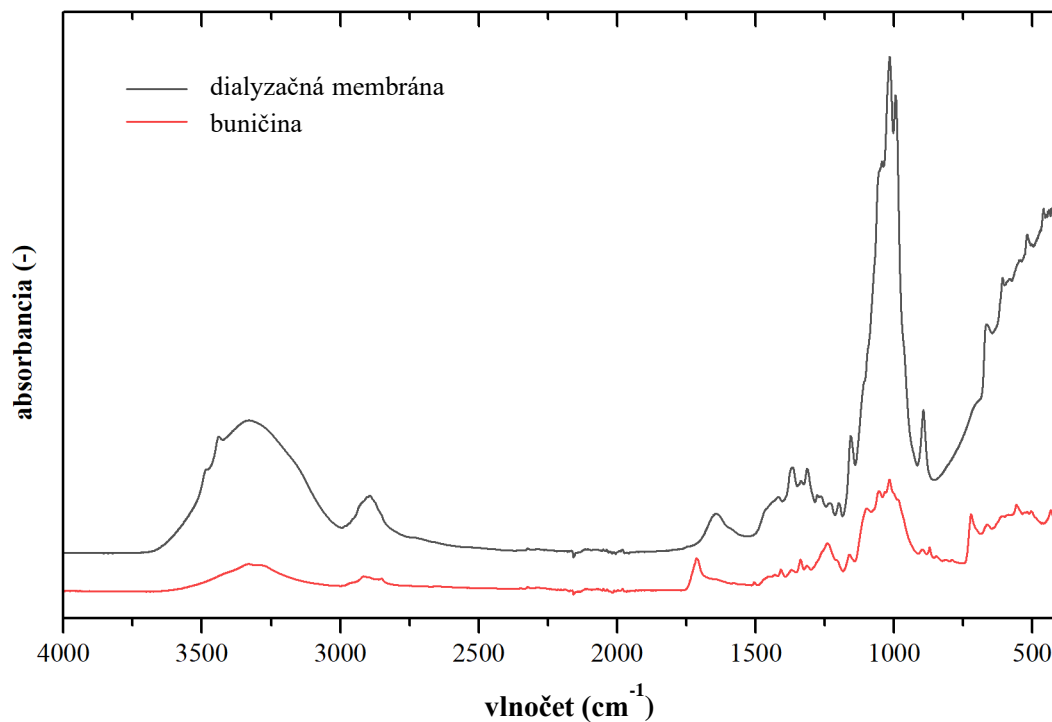
9 PRÍLOHY

Príloha 1 Prehľadová tabuľka charakteristických vibrácií IHSS humínovej kyseliny (vrátane slepej vzorky) a metylénovej modrej

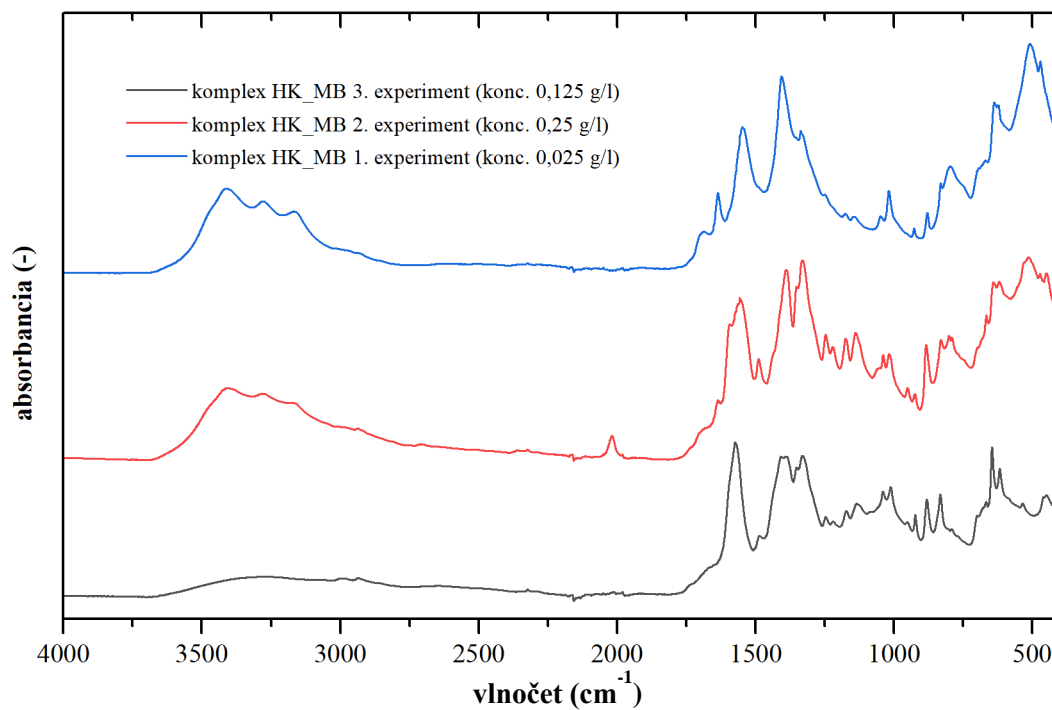
Humínové kyseliny [121; 122]		Metylénová modrá [99]	
Vlnočet (cm ⁻¹)	Vibrácia	Vlnočet (cm ⁻¹)	Vibrácia
3 550 – 3 000	$\nu(\text{O-H, N-H})$	3 430 – 3 160	$\nu_{\text{väzb.}}(\text{O-H})$
2 927	$\nu_{\text{as}}(\text{C-H})$ v $-\text{CH}_2-$ a $-\text{CH}_3$	3 044	$\nu_{\text{het}}(\text{C-H})$
2 848	$\nu_{\text{s}}(\text{C-H})$ v $-\text{CH}_2-$	2 927	$\nu_{\text{as}}(\text{CH}_3)$
2 600	$\nu(\text{O-H})$ v $-\text{COOH}$	2 887	$\nu_{\text{s}}(\text{CH}_3)$
1 704	$\nu(\text{C=O})$	2 815	$\nu(-\text{N}-(\text{CH}_3)_2)$
1 650	$\nu(\text{C=O})$	2 707	$\nu(-\text{N}-(\text{CH}_3)_2)$
1 600	$\nu_{\text{ar}}(\text{C=C})$	1 593	$\nu_{\text{het}}(\text{C=N, C=C})$
1 574	$\nu_{\text{as}}(-\text{COO}^-)$	1 486	$\nu_{\text{het}}(\text{C=S}^+)$
1 414	$\delta(\text{C-H}), \nu_{\text{as}}(-\text{COO}^-)$	1 446	ν_{as} a $\nu_{\text{s}}(\text{C-H})$
1 365	$\delta(\text{C-CH}_3), \nu_{\text{s}}(-\text{COO}^-)$	1 390	ν_{as} a $\nu_{\text{s}}(\text{C-H})$
1 338	$\nu_{\text{s}}(-\text{COO}^-)$	1 354	$\nu_{\text{het}}(\text{C=S}^+)$
1 192	$\nu(\text{C-O}), \delta(\text{OH})$ v $-\text{COOH}$	1 333	$\nu(\text{C-N})$ v N-CH_3
1 036	$\nu_{\text{alif}}(\text{C-C})$	1 251	$\delta(\text{CH}), \pi(\text{C-H})$
1 013	$\nu(\text{Si-O})$	1 223	$\nu_{\text{het}}(\text{C-C})$
888	$\gamma_{\text{ar}}(\text{C-H})$	1 174	$\delta_{\text{het}}(\text{CH})$
832	$\gamma_{\text{ar}}(\text{C-H})$	1 140	$\delta_{\text{het}}(\text{C-N})$
763	$\gamma_{\text{ar}}(\text{C-H})$	1 065	$\nu_{\text{as}}(\text{C-S-C})$
		1 038	$\nu_{\text{as}}(\text{C-S-C})$
		948	$\text{N}_{\text{het}}\cdots\text{HO}$
		876	$\text{N}_{\text{het}}\cdots\text{HO}$
		856	$\text{N}_{\text{het}}\cdots\text{HO}$
		816	$\delta_{\text{het}}(\text{C-C})$
		802	$\gamma(\text{C-H}); \omega(\text{C-H})$ a $\tau(\text{C-H})$
		788	v $\text{N}(\text{CH}_3)$

Príloha 2 Prehľadová tabuľka charakteristických vibrácií Rhodaminu 6G a Septonexu

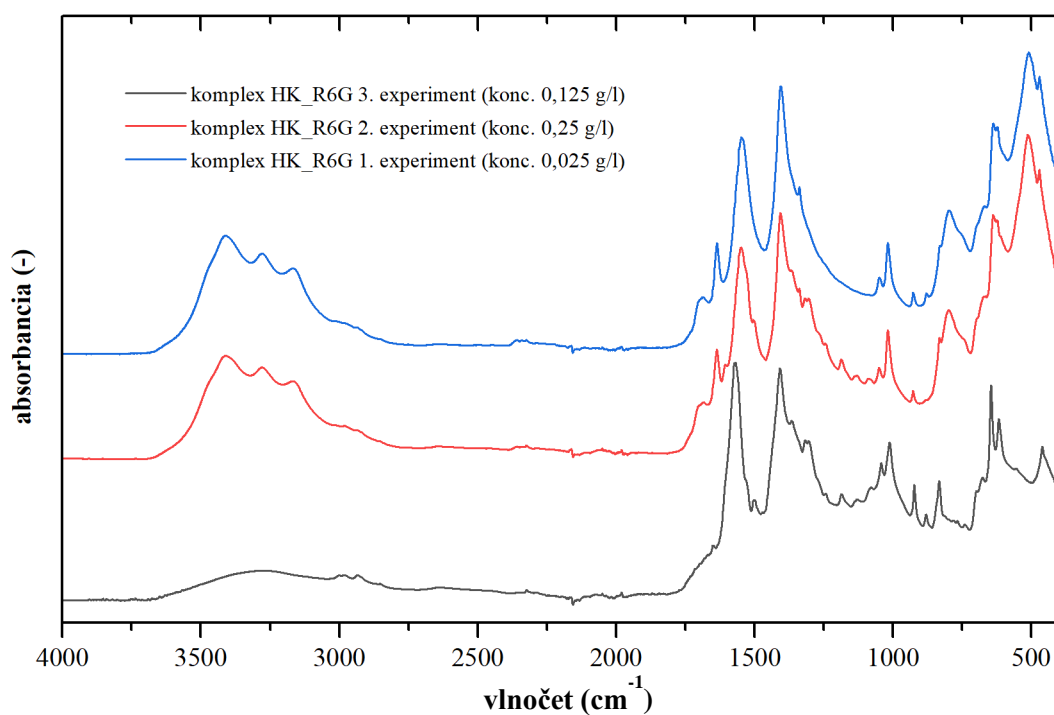
Rhodamin 6G [123; 124; 125]		Septonex [126; 127; 128]	
Vlnočet (cm⁻¹)	Vibrácia	Vlnočet (cm⁻¹)	Vibrácia
3 175	$\nu(\text{N-H})$	3 007	$\nu_{\text{as}}(\text{N-CH}_3)$
3 020	$\nu_{\text{het}}(\text{C-H})$	2 954	$\nu_{\text{as}}(\text{C-H})$ v CH_3 , $\nu_{\text{s}}(\text{N-CH}_3)$
2 974	$\nu_{\text{as}}(\text{C-H})$ v CH_3	2 918	$\nu_{\text{as}}(\text{CH}_2)$
2 925	$\nu_{\text{as}}(\text{C-H})$ v $-\text{CH}_2-$ a CH_3	2 850	$\nu_{\text{s}}(\text{CH}_2)$
2 868	$\nu_{\text{s}}(-\text{CH}_2)$	1 733	$\nu(\text{C=O})$ ester
1 713	$\nu(\text{C=O})$ ester	1 494	$\delta(\text{N-CH}_3)$
1 645	$\delta(\text{NH}_2)$	1 466	$\delta(\text{CH}_2)$
1 604	$\nu_{\text{ar}}(\text{C=C})$	1 444	$\delta(\text{C-CH}_3)$
1 565	$\nu_{\text{ar}}(\text{C=C})$	1 409	$\delta(\text{N-CH}_3)$
1 525	$\delta(\text{C-N})$	1 367	$\omega(\text{CH}_2)$
1 498	$\nu_{\text{ar}}(\text{C=C})$	1 247	$\nu_{\text{as}}(\text{C-O-C})$ ester
1 440	$\nu_{\text{ar}}(\text{C=C, C-N})$	1 189	$\nu_{\text{s}}(\text{C-O-C})$ ester
1 363	$\delta(\text{C-H})$ v $-\text{CH}_3$	1 094	$\nu_{\text{s}}(\text{C-O-C})$ ester
1 302	$\nu(\text{C-N})$	1 020	$\nu(\text{C-N})$
1 279	$\nu_{\text{as}}(\text{C-O-C})$ ester	953	$\delta(\text{N}^+(\text{CH}_3)_3)$
1 243	$\nu(\text{C-O})$	917	$\nu(\text{C-N})$
1 176	$\nu_{\text{s}}(\text{C-O-C})$ ester	720	$\rho(\text{CH}_2)$ v $-(\text{CH}_2)_n-$, $n > 4$
1 140	$\delta(\text{C-H})$, $\nu(\text{C-C})$		
1 086	$\gamma(\text{C-H})$		
1 023	$\nu(\text{C-O})$		
882	$\gamma(\text{C-H})$		
842	$\gamma(\text{C-H})$		
775	$\gamma(\text{C-H})$		
732	$\gamma(\text{C-H})$		
701	$\delta(\text{C-H})$		



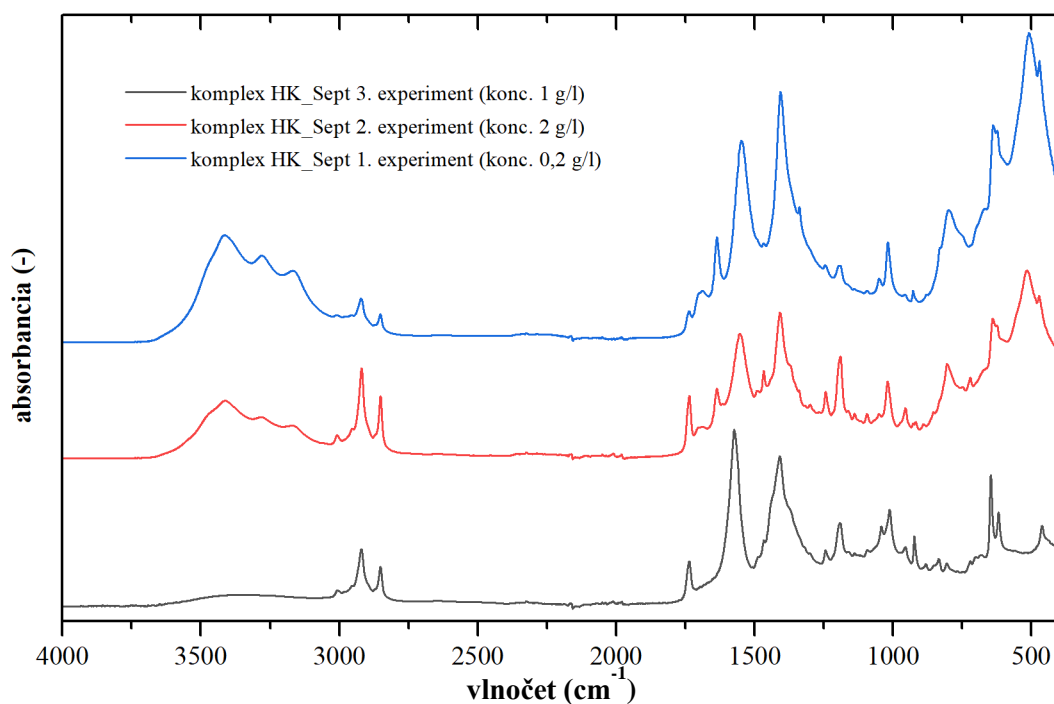
Príloha 3 FTIR spektrá dialyzačnej membrány a buničiny používaných pri príprave vzoriek



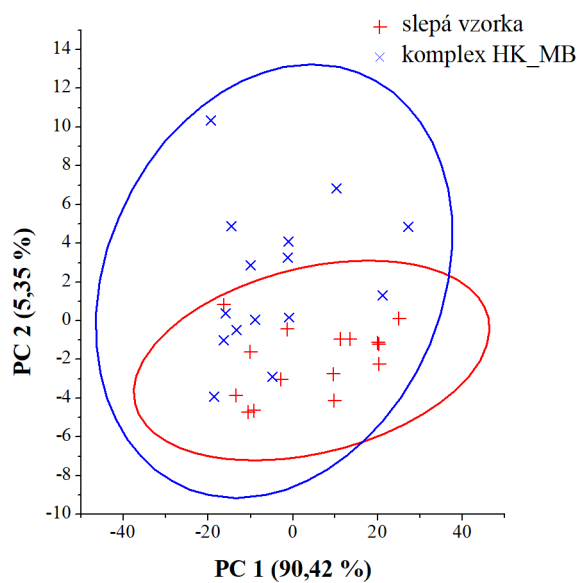
Príloha 4 Porovnanie FTIR spektier komplexov HK a MB pripravených dialýzou proti MB s rôznymi koncentraciami organického iónu



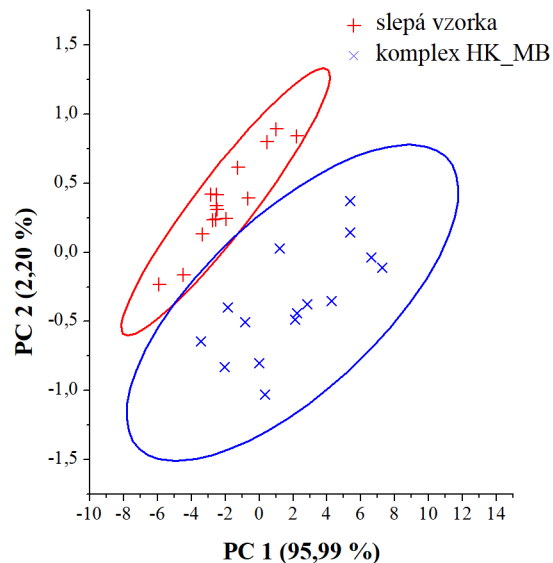
Príloha 5 Porovnanie FTIR spektier komplexov HK a R6G pripravených dialýzou proti R6G s rôznymi koncentraciami organického iónu



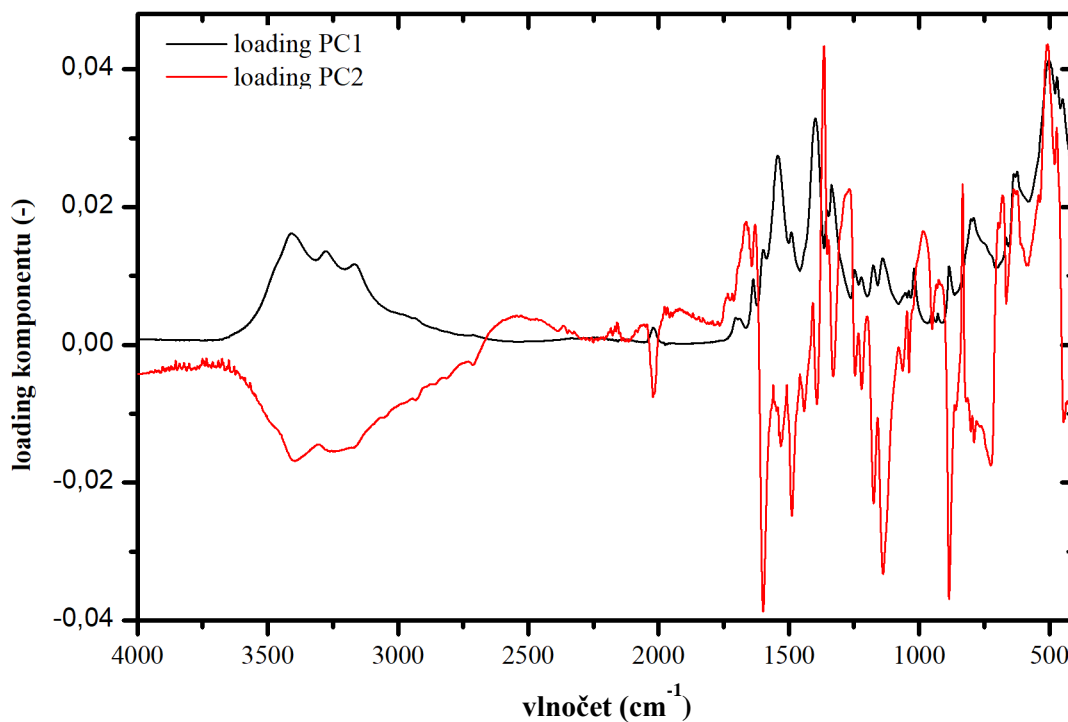
Príloha 6 Porovnanie FTIR spektier komplexov HK a Septonexu pripravených dialýzou proti Septonexu s rôznymi koncentraciami organického iónu



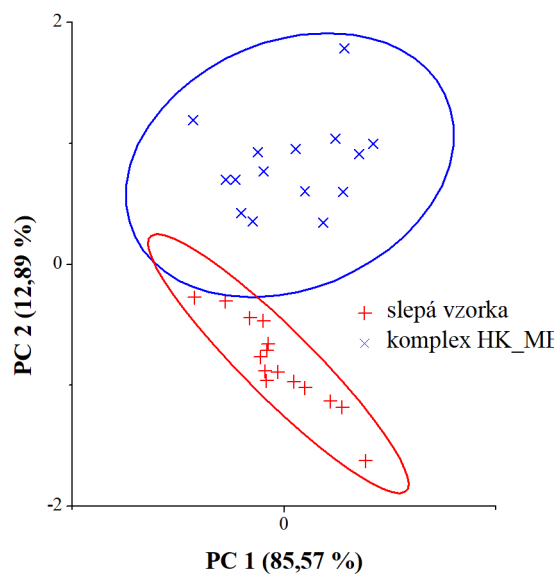
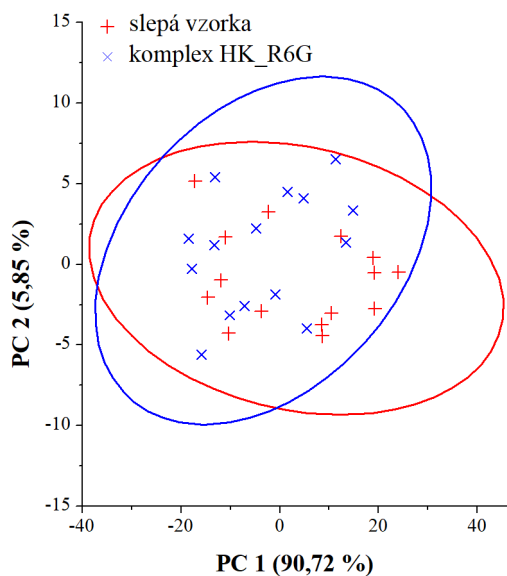
Príloha 7 Skóre komponentov PC1 a PC2 pre PCA analýzu spektier komplexov HK a MB s koncentráciou 0,025 g/l



Príloha 8 Skóre komponentov PC1 a PC2 pre PCA analýzu spektier komplexov HK a MB s koncentráciou 0,25 g/l

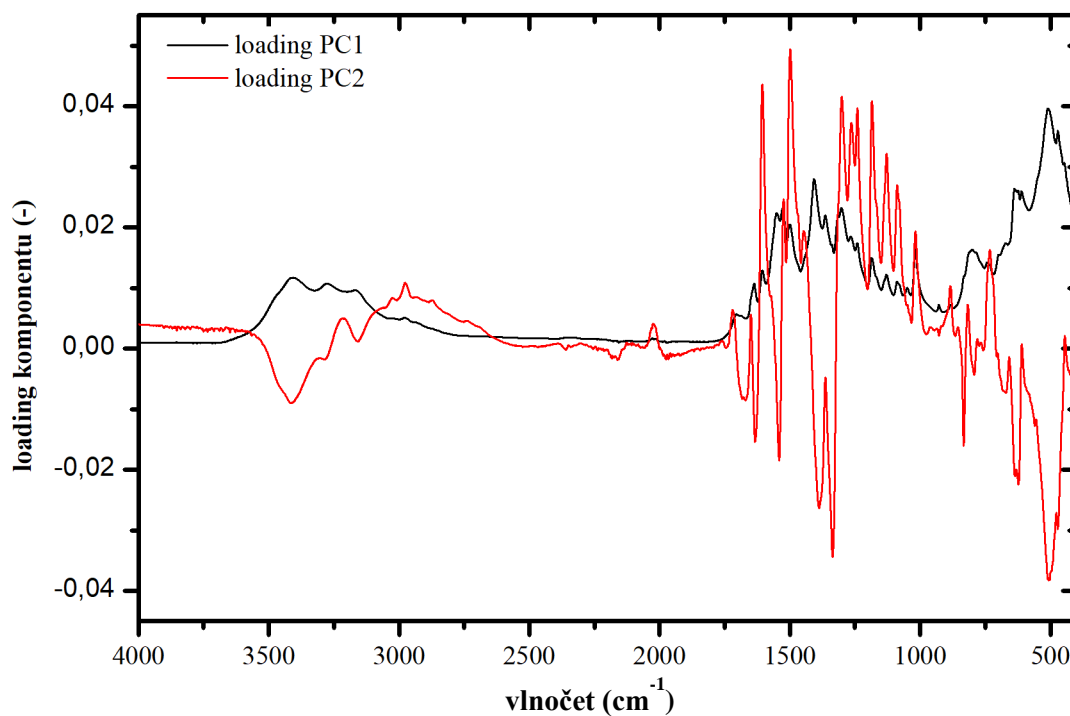


Príloha 9 Loading komponentov PC1 a PC2 PCA analýzy (Príloha 8) komplexu HK a MB s konc. 0,25 g/l

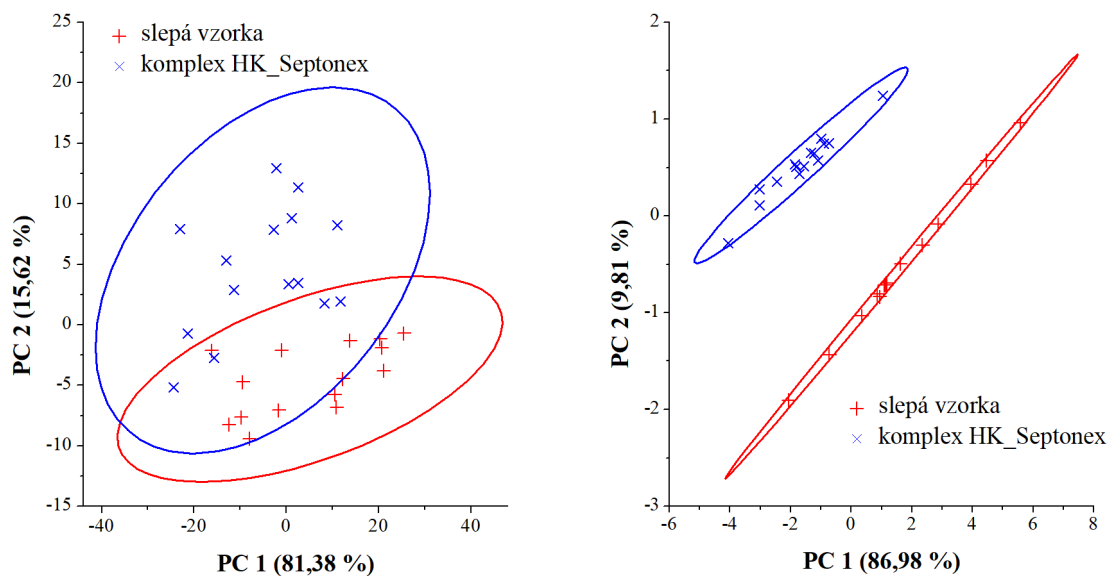


Príloha 10 Skóre komponentov PC1 a PC2 pre PCA analýzu spektier komplexov HK a R6G s koncentráciou 0,025 g/l

Príloha 11 Skóre komponentov PC1 a PC2 pre PCA analýzu spektier komplexov HK a R6G s koncentráciou 0,25 g/l

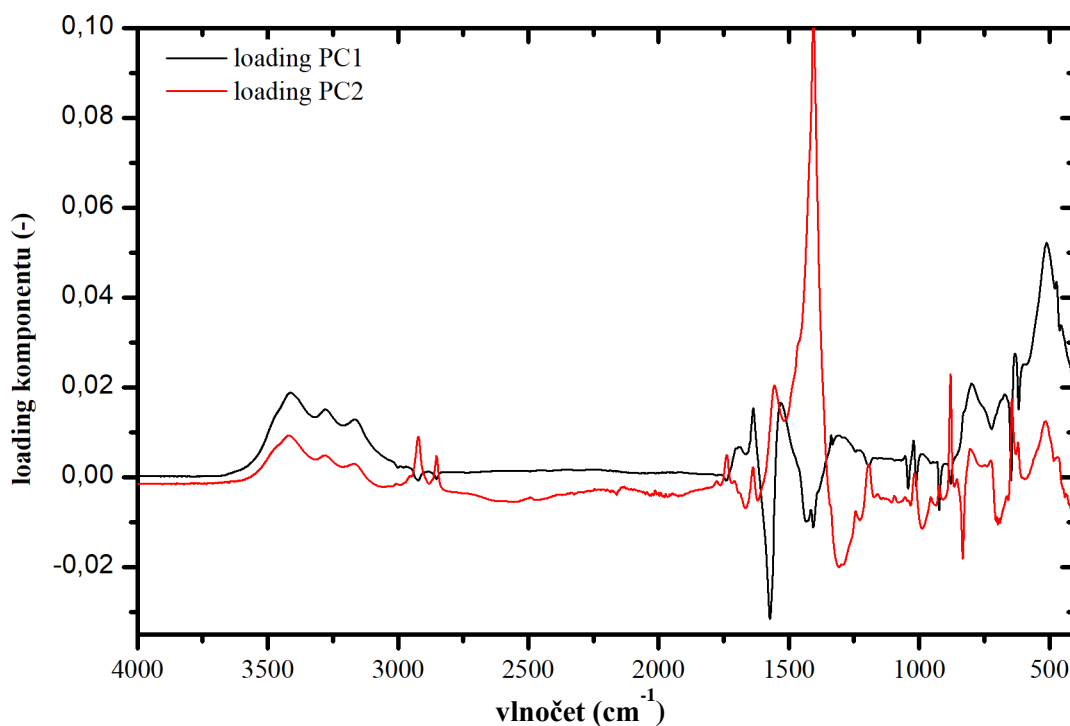


Príloha 12 Loading komponentov PC1 a PC2 PCA analýzy (Príloha 11) komplexu HK a R6G s konc. 0,25 g/l

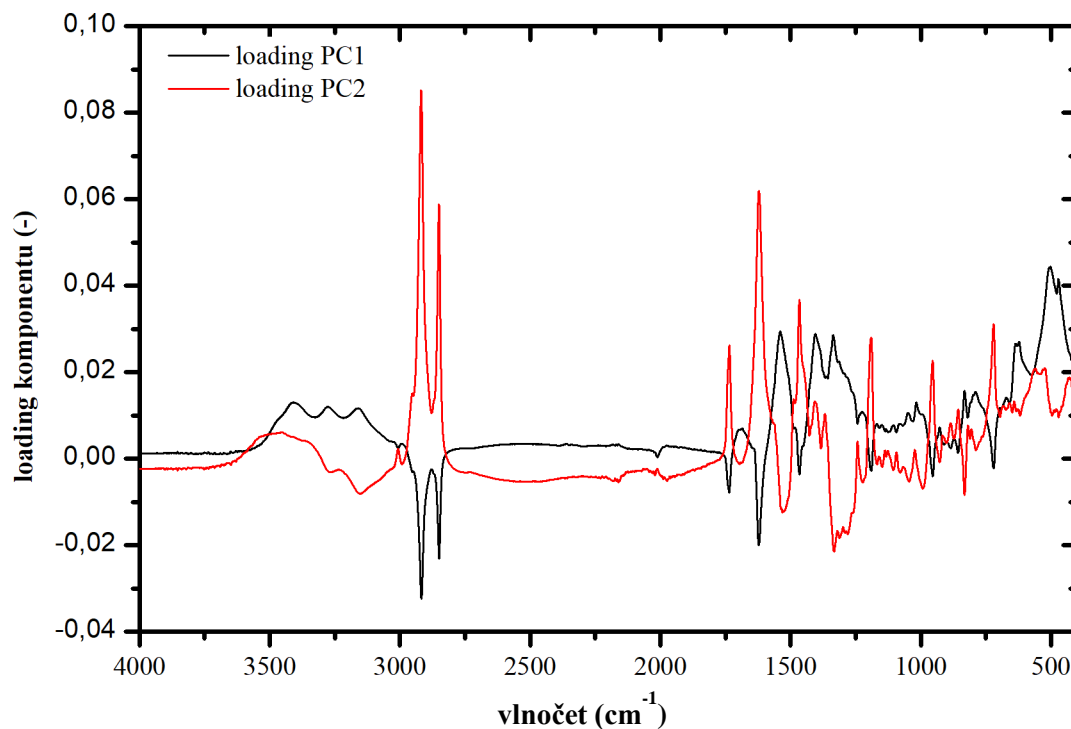


Príloha 13 Skóre komponentov PC1 a PC2 pre PCA analýzu spektier komplexov HK a Septonexu s koncentráciou 0,2 g/l

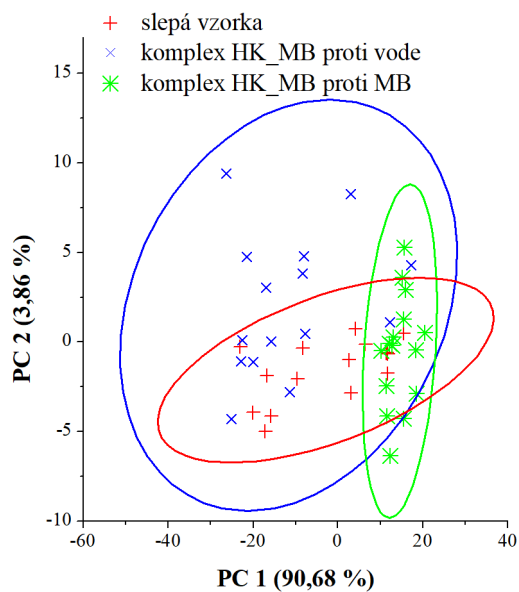
Príloha 14 Skóre komponentov PC1 a PC2 pre PCA analýzu spektier komplexov HK a Septonexu s koncentráciou 2 g/l



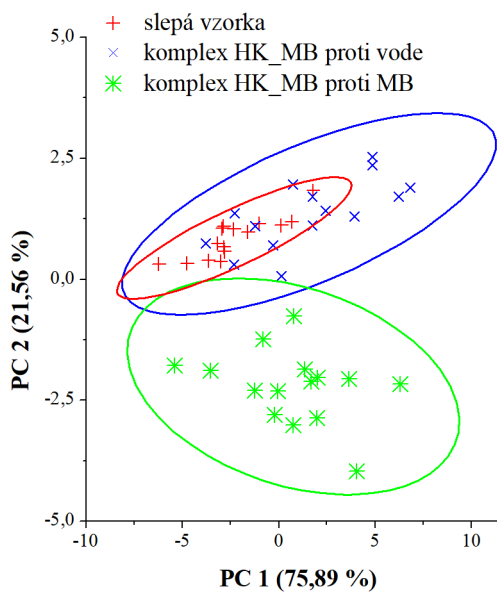
Príloha 15 Loading komponentov PC1 a PC2 PCA analýzy (Príloha 13) komplexu HK a Septonexu s konc. 0,2 g/l



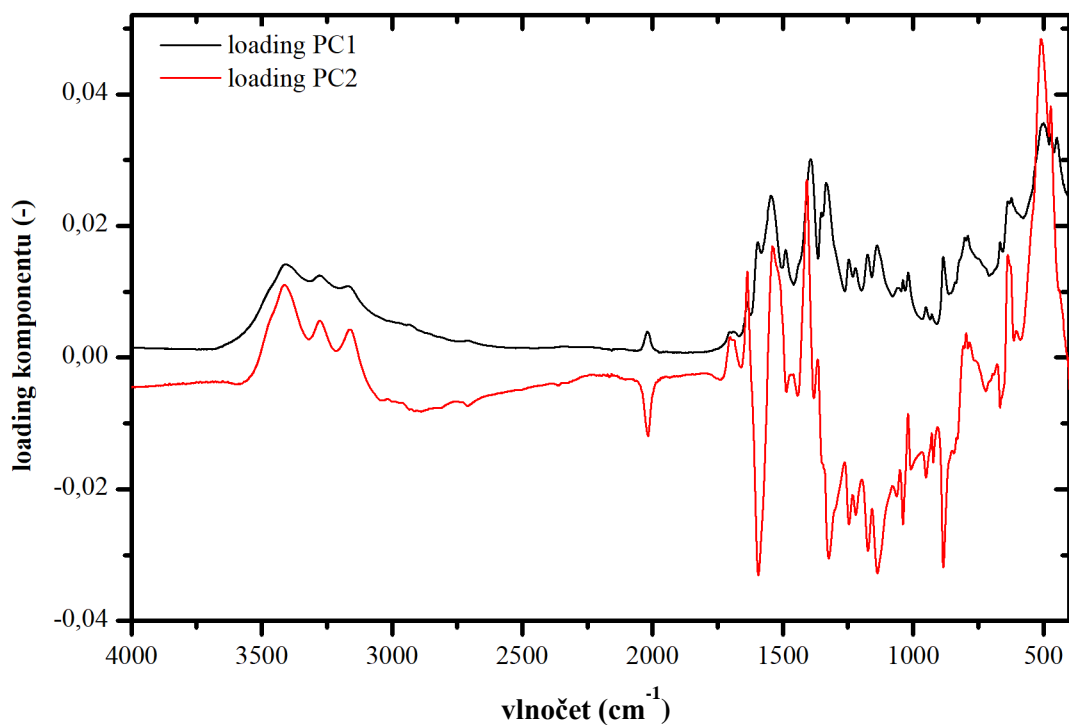
Príloha 16 Loading komponentov PC1 a PC2 PCA analýzy (Príloha 14) komplexu HK a Septonexu s konc. 2 g/l



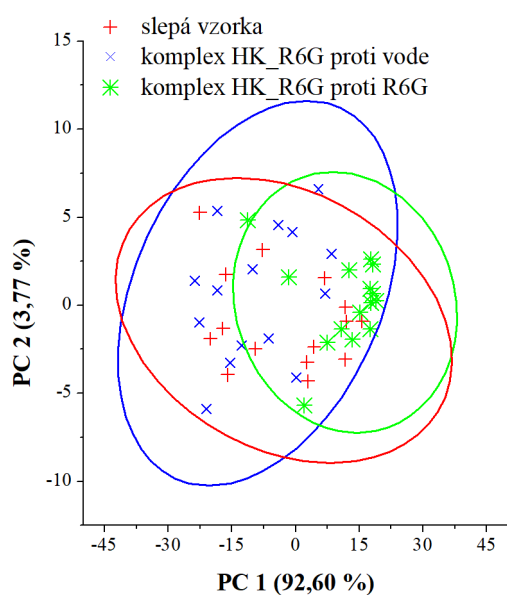
Príloha 17 Skóre komponentov PC1 a PC2 pre PCA analýzu spektier komplexov HK a MB pripravených oboma spôsobmi dialýzy s koncentráciou 0,025 g/l a slepej vzorky



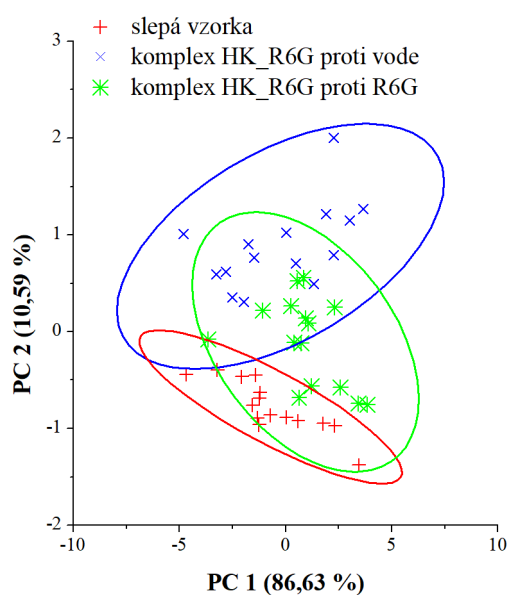
Príloha 18 Skóre komponentov PC1 a PC2 pre PCA analýzu spektier komplexov HK a MB pripravených oboma spôsobmi dialýzy s koncentráciou 0,25 g/l a slepej vzorky



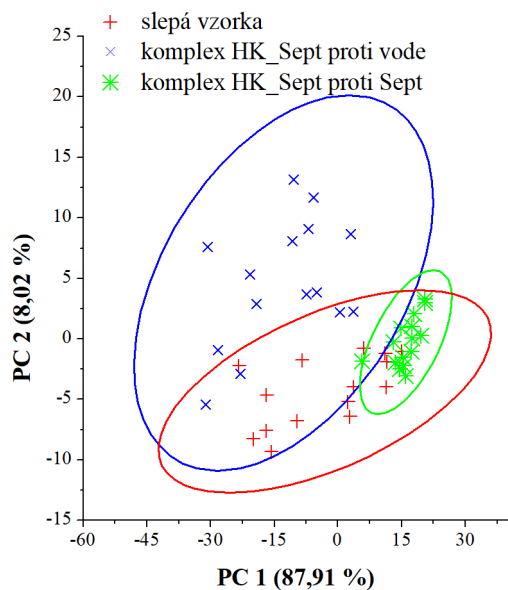
Príloha 19 Loadiny komponentov PC1 a PC2 PCA analýzy (Príloha 18) spektier komplexov HK a MB pripravených obomi spôsobmi dialýzy s koncentráciou 0,25 g/l a slepej vzorky



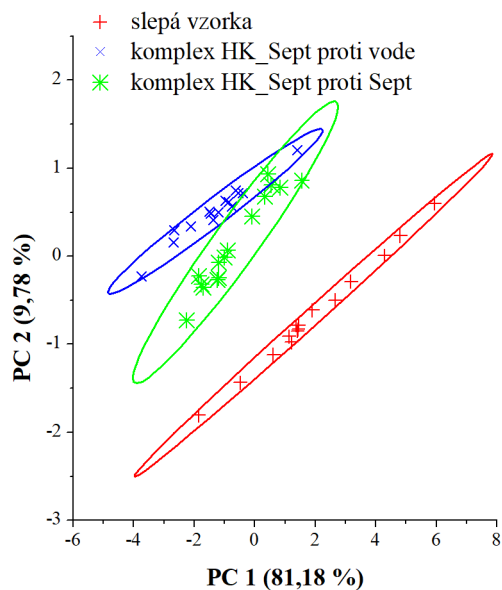
Príloha 20 Skóre komponentov PC1 a PC2 pre PCA analýzu spektier komplexov HK a R6G pripravených obomi spôsobmi dialýzy s koncentráciou 0,025 g/l a slepej vzorky



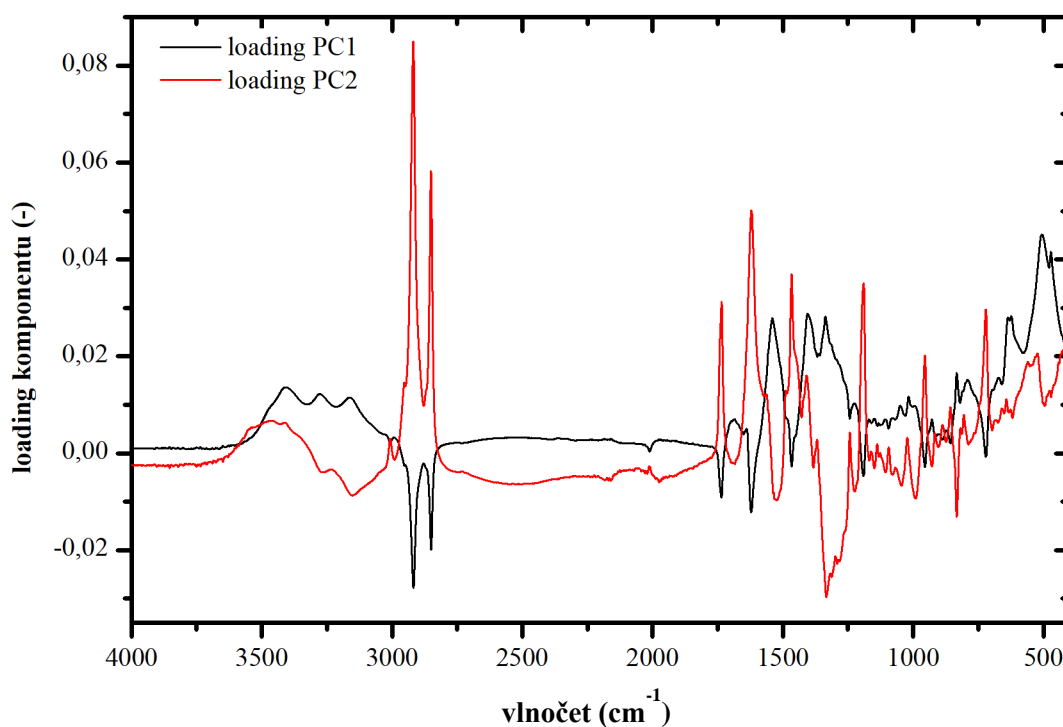
Príloha 21 Skóre komponentov PC1 a PC2 pre PCA analýzu spektier komplexov HK a R6G pripravených obomi spôsobmi dialýzy s koncentráciou 0,25 g/l a slepej vzorky



Príloha 22 Skóre komponentov PC1 a PC2 pre PCA analýzu spektier komplexov HK a Septonexu pripravených obomi spôsobmi dialýzy s koncentráciou 0,2 g/l a slepej vzorky



Príloha 23 Skóre komponentov PC1 a PC2 pre PCA analýzu spektier komplexov HK a Septonexu pripravených obomi spôsobmi dialýzy s koncentráciou 2 g/l a slepej vzorky



Príloha 24 Loadingy komponentov PC1 a PC2 PCA analýzy (Príloha 23) spektier komplexov HK a Septonexu pripravených obomi spôsobmi dialýzy s koncentráciou 2 g/l a slepej vzorky