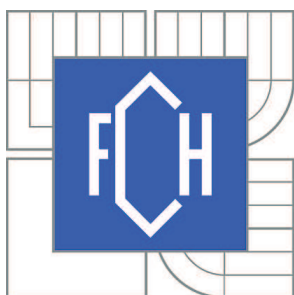


VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA CHEMICKÁ

ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE

FACULTY OF CHEMISTRY

INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

STUDIUM REAKTIVITY BIOPOLYMERŮ V GELOVÉ FÁZI

REACTIVITY-MAPPING STUDIES ON BIOPOLYMERS IN HYDROGEL FORMS

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

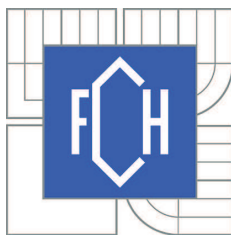
Bc. JIŘÍ SMILEK

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. PETR SEDLÁČEK, Ph.D.

BRNO 2012



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

Zadání diplomové práce

Číslo diplomové práce:	FCH-DIP0676/2011	Akademický rok: 2011/2012
Ústav:	Ústav fyzikální a spotřební chemie	
Student(ka):	Bc. Jiří Smilek	
Studijní program:	Spotřební chemie (N2806)	
Studijní obor:	Spotřební chemie (2806T002)	
Vedoucí práce	Ing. Petr Sedláček, Ph.D.	
Konzultanti:		

Název diplomové práce:

Studium reaktivity biopolymerů v gelové fázi

Zadání diplomové práce:

1. Zpracovat literární rešerši se zaměřením na metody experimentálního studia reaktivity biopolymerů.
2. Na základě literární rešerše vybrat vhodný modelový biopolymer (biopolymery) a charakterizovat jej standardními fyzikálně-chemickými metodami.
3. Navrhnout a optimalizovat metodiku studia reaktivity biopolymerů prostřednictvím difúzních experimentů v gelové fázi.
4. Pro zvolené kombinace biopolymer/difúzní sonda stanovit zvolené difúzní charakteristiky (difúzní koeficienty). Diskutovat vliv interakce mezi biopolymerem a difúzní sondou na stanovené difúzní charakteristiky.

Termín odevzdání diplomové práce: 11.5.2012

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

Bc. Jiří Smilek
Student(ka)

Ing. Petr Sedláček, Ph.D.
Vedoucí práce

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
Ředitel ústavu

V Brně, dne 16.1.2012

prof. Ing. Jaromír Havlica, DrSc.
Děkan fakulty

ABSTRAKT

Náplní předložené diplomové práce je studium interakce biopolymerů s modelovými sondami (organická barviva) prostřednictvím difúzních procesů v gelové fázi. Hlavními cíly, kterých bylo úspěšně dosaženo, byla optimalizace a otestování metodiky difúzních cel a neustálené difúze v nekonečném prostředí za účelem studia interakcí zvolených kombinací biopolymer/sonda. Jako modelové reaktivní biopolymery byly zvoleny anionaktivní huminové kyseliny a kationaktivní chitosan, jako modelové sondy methylenová modř resp. methylenová oranž. Nezbytnou součástí předložené práce je také podrobná charakterizace výchozích biopolymerů a použitých gelových materiálů pomocí široké škály analytických a fyzikálně-chemických metod (reometrie, UV-VIS, FT-IR). Kromě celé řady nových experimentálních poznatků o konkrétních studovaných systémech tkví význam této diplomové práce v tom, že slouží jako odrazový můstek pro vývoj nových difúzních technik jako univerzálních, inovativních a plně automatizovaných nástrojů pro charakterizaci reaktivity biopolymerů.

ABSTRACT

The important content of this diploma thesis is study of interaction of biopolymers with model probes (organic dyes) in the gel through diffusion processes. The main aims were optimization and testing of diffusion cell's method together with unsteady diffusion. These experiments were realized because of study interaction of chosen biopolymers with organic dyes (probes). Anion active biopolymer (humic acids) and cation active biopolymer (chitosan) were chosen as model specimens. As model probe was chosen methylene blue in case of humic acids or methylene orange in case of chitosan. Very important part of this work was also characterization of biopolymers and gels of these materials by wide range of analytical and physic-chemical methods (rheometry, UV-VIS, FT-IR etc.). The main importance of this diploma thesis is explanation and clarification of new diffusion techniques. New experimental results about studied gel's materials are also reported. This diploma thesis should be theoretical and also practical basis for universal, innovative and full-automated apparatus for characterization of reactivity of biopolymers.

KLÍČOVÁ SLOVA:

difúze; difúzní koeficient; huminové kyseliny; chitosan; reaktivita biopolymerů; hydrogely

KEY WORDS:

Diffusion; diffusion coefficient; humic acids; chitosan; reactivity of biopolymers; hydrogels

SMILEK, J. *Studium reaktivity biopolymerů v gelové fázi*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2010. 94 s. Vedoucí diplomové práce Ing. Petr Sedláček, Ph.D.

PROHLÁŠENÍ

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

.....
Bc. Jiří Smilek

Můj vřelý dík patří především vedoucímu diplomové práce Ing. Petrovi Sedláčkovi, Ph.D. za neutuchající entuziasmus, vynaložený čas, stejně tak jako za poskytnuté připomínky k vypracování diplomové práce. Spolupráce s Ing. Petrem Sedláčkem, Ph.D. pro mě byla vždy motivací. Můj dík patří také zahraniční studentce Clémence Cordier, se kterou jsem spolupracoval během letního semestru akademického roku 2011/2012. Všem ostatním, kteří mne podporovali během mého studia upřímný dík.

Tato práce byla podpořena projektem „Centrum materiálového výzkumu na FCH VUT v Brně“ č. CZ.1.05/2.1.00/01.0012 z ERDF.

OBSAH

1	ÚVOD	6
2	CÍL PRÁCE	7
3	TEORETICKÁ ČÁST	8
3.1	HUMINOVÉ LÁTKY	8
3.2	CHITOSAN	14
3.3	AGARÓZA	17
3.4	GELOVÉ SYSTÉMY	18
3.5	DIFÚZNÍ PROCESY	24
4	SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	33
4.1	INTERAKCE BIOPOLYMERŮ S POLUTANTY	33
4.2	DIFÚZE V GELOVÝCH FÁZÍCH	35
5	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	40
5.1	POUŽITÉ CHEMIKÁLIE	40
5.2	POUŽITÉ PŘÍSTROJE A ZAŘÍZENÍ	40
5.3	CHARAKTERIZACE POUŽÍVANÝCH MATERIÁLŮ	40
5.4	PŘÍPRAVA HYDROGELOVÝCH VZORKŮ PRO DIFÚZNÍ EXPERIMENTY	45
6	DISKUZE A VÝSLEDKY	49
6.1	CHARAKTERIZACE BIOPOLYMERNÍCH MATERIÁLŮ A AGARÓZOVÝCH HYDROGELŮ	49
6.2	DIFÚZNÍ EXPERIMENTY	64
7	ZÁVĚR	86
8	POUŽITÁ LITERATURA	87
9	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ	92
9.1	POUŽITÉ ZKRATKY	92
9.2	POUŽITÉ SYMBOLY	93
10	SEZNAM PUBLIKACÍ	94
11	SEZNAM PŘÍLOH	94

1 ÚVOD

Huminové kyseliny jsou biopolymerní sloučeniny, které společně s ostatními frakcemi (fulvinové kyseliny a huminy) lze řadit do široké skupiny látek označované jako huminové látky. Unikátní vlastnosti huminových látek, konkrétně pak huminových kyselin, jsou známy již poměrně dlouho. Některé z vlastností huminových kyselin jsou poměrně dobře prozkoumány, vzhledem k tomu, že existuje velké množství publikací zabývajících se studiem huminových kyselin. Základní nedostatky ve výzkumu huminových kyselin spočívají především v objasnění jejich chemické reaktivity a struktury. Obecně lze říci, že znalosti v oblasti fyzikálně-chemické charakterizace jsou oproti jiným biopolymerním sloučeninám (například biopolymerům živočišného původu) nedostačující.

Huminové kyseliny se ve svém přirozeném prostředí vyskytují v různých formách. Jednak se huminové kyseliny mohou v přírodě vyskytovat ve formě koloidního roztoku (např. jako hlavní frakce rozpuštěného organického uhlíku – DOM), nebo se v přirozených systémech nacházejí v pevné, nerozpuštěné formě, která může v systémech o vysokém obsahu vlhkosti nabývat formy nabobtnaných hydrogelů. Pro studium reaktivity huminových kyselin v laboratorním prostředí se s výhodou používá poslední zmíněná forma huminových kyselin, forma hydrogelová, vzhledem k tomu, že disperzní prostředí (voda) tvoří až 90 hm. % hydrogelu, čímž lze účelně simulovat podmínky, ve kterých se huminové kyseliny přirozeně vyskytují. Tato forma se tedy jeví jako velmi vhodná pro studium transportních jevů na molekulární úrovni (difúzních procesů), což je jeden ze způsobů, jakým lze charakterizovat huminové kyseliny rozmanitého původu. Další neoddiskutovatelnou předností hydrogelové formy huminových kyselin je poměrně lehká příprava tohoto disperzního systému.

Studium difúzních procesů probíhajících v gelových systémech s obsahem huminových kyselin sebou nese několik výhod, které vyplývají z obecných vlastností gelových systémů. Difuzivita nízkomolekulárních látek je prakticky stejná (nebo jen o něco málo nižší) jako v případě původního solu, ze kterého byl hydrogelový systém připraven. Díky síťovité struktuře gelových systémů není difuzivita nízkomolekulárních látek natolik ovlivňována tepelnými konvekce jako v případě solu. V neposlední řadě, práce s polotuhým hydrogelem umožňuje připravit systém s přesně definovanou velikostí a tvarem, což je také nezbytné pro správný matematický popis probíhajících difúzních procesů.

Reaktivitu huminových kyselin, stanovenou prostřednictvím studia difuzivity huminových hydrogelů, lze poté porovnávat s jinými biopolymerními látkami, což je jedním z hlavních cílů této diplomové práce.

Teoretická část této diplomové práce je zaměřena především na komplexní náhled problematiky difúze v gelových systémech. Nemalá část je taktéž věnována základním vlastnostem a použití materiálů, se kterými bylo pracováno (huminové kyseliny, chitosan, agaróza).

Experimentální část se poté zabývá samotným studiem reaktivity vybraných biopolymerů. Ověřovány jsou základní parametry, které zásadním způsobem ovlivňují probíhající difúzi, například teplota. Jedna z pasáží této části je také věnována základní charakterizaci zkoumaných materiálů. Jednotlivé hydrogely byly zkoumány a charakterizovány z pohledu mechanických vlastností (reometrie), studována byla také síla a typ vazeb vyskytujících se v připravených vzorcích pomocí metody infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací (FT-IR). V neposlední řadě byly zkoumané vzorky porovnávány podle sušících

charakteristik. Stanovována byla také kyselost používaných materiálů pomocí potenciometrické a konduktometrické titrace aj.

Použitou analytickou metodou pro studium reaktivity huminových kyselin a chitosanu v agarózových gelech byla UV-VIS spektroskopie. Reaktivita těchto biopolymerů je poté popisována prostřednictvím efektivní hodnoty difúzního koeficientu, vypočtené z experimentálně stanovených difúzních toků a koncentračních profilů. Následně je také diskutován vliv jednotlivých parametrů ovlivňujících difúzní procesy v gelových systémech s přidavkem daného biopolymeru. V budoucnu by tato práce měla sloužit jako základ pro vývoj univerzální a plně automatizované metody určené pro charakterizaci reaktivity biopolymerů.

2 CÍL PRÁCE

Hlavním cílem této diplomové práce je navrhnout a optimalizovat metodiku studia reaktivity vybraných biopolymerů (huminové kyseliny a chitosan) pomocí difúzních experimentů. Na základě literární rešerše poté provést sérii experimentů pro vhodně zvolené biopolymery, porovnat reaktivitu kationaktivních a anionaktivních biopolymerů difúzními technikami a charakterizovat všechny zkoumané materiály pomocí základních fyzikálně-chemických a analytických metod.

Hlavní cíle této diplomové práce jsou shrnuty v následujících bodech:

- Navrhnout a otestovat (optimalizovat) metodu studia reaktivity biopolymerů formou difúzních procesů v difúzní cele a z nekonečného zdroje formou „difúze v květech“ v inertních gelových maticích.
- Zvolit vhodné zástupce kationaktivního a anionaktivního biopolymerů a charakterizovat je běžnými fyzikálně-chemickými a analytickými metodami.
- Zvolit vhodnou inertní gelovou matici pro studium reaktivity vybraných biopolymerů.
- Optimalizovat postup přípravy gelové formy s přidavkem vybraného biopolymeru.
- Stanovit základní difúzní charakteristiky kombinací kationaktivního biopolymeru a anionaktivní sondy, respektive anionaktivního biopolymeru a kationaktivní sondy (organické barvivo).
- Ověřit a diskutovat vliv základních parametrů na probíhající difúzní procesy.
- Diskutovat vliv reaktivity na stanovené charakteristiky a použitelnost metody pro další biopolymerní systémy.

3 TEORETICKÁ ČÁST

3.1 Huminové látky

3.1.1 Úvod do problematiky huminových látek

Pod pojem huminové látky lze zahrnout širokou škálu sloučenin a přírodních látek, z valné většiny aromatického charakteru. Huminové látky tvoří základní organickou hmotu půdy, vyskytují se nejčastěji v *kaustobiolitech* (hořlavé sedimenty organogenního původu) [1], jejich výskyt je prokázán například v rašelině, hnědém či černém uhlí, lignitu nebo ropě. Látky huminového charakteru se v nižších koncentracích vyskytují také ve vodě a sedimentech [2]. Díky výše zmíněným skutečnostem lze huminové látky řadit mezi nejrozšířenější produkty přírodního charakteru na zemi. Huminové látky vznikají složitými procesy zahrnujícími chemickou či biologickou přeměnu organické hmoty půdy, která je podporována činností mikroorganismů. Tento proces, probíhající v přírodě samovolně, je nazýván humifikace [3].

Obsah huminových látek v přírodních matricích kolísá od stopových množství (písky a jíly), přes jednotky procent (běžné zeminy) až k desítkám procent (hnědé uhlí). Mimořádně vysoký obsah huminových látek vykazuje lignit a rašelina (až 85 hm. %) [4], proto se uvedené materiály jeví jako vhodné alternativní zdroje huminových látek pro celou řadu aplikací. Potenciální využití huminových látek je uvedeno v kapitole 3.1.7.

V odborné literatuře [5] je uváděno, že celkový obsah uhlíku ve formě huminových látek dosahuje až $6 \cdot 10^{12}$ tun, což ve srovnání s celkovým obsahem uhlíku v živých organismech ($7 \cdot 10^{11}$ tun) převyšuje téměř desetkrát. I přesto, že v posledních několika dekádách let je ve vědecké společnosti huminovým látkám – především pak huminovým kyselinám – věnována poměrně velká pozornost a vychází o nich velké množství publikací, se huminové látky řadí k nejméně prostudovaným přírodním materiálům.

3.1.2 Rozdělení huminových látek

Poprvé byly huminové látky klasifikovány švédským chemikem Berzelieusem roku 1839, který huminové látky rozdělil do tří kategorií podle rozpustnosti jednotlivých frakcí huminových látek v alkalickém či kyselém prostředí [6]. Na práci tohoto švédského chemika navázal Mulder, který doplnil jeho teorii o rozdělení huminových látek, o vlastnosti popisující barevnost jednotlivých frakcí a jejich rozpustnost v příslušných rozpouštědlech. Dnešní dělení huminových látek je propracovanější alternativou původního rozdělení dle Berzelieuse.

Dle acidobazické rozpustnosti resp. nerozpustnosti lze huminové látky (HL) rozdělit do následujících kategorií (frakcí):

- *fulvinové kyseliny* (FK), tato frakce huminových látek je rozpustná jak v kyselém, tak v zásaditém vodném prostředí, čili v okyseleném roztoku nedochází k precipitaci,
- *huminové kyseliny* (HK), které jsou velmi dobře rozpustné v roztocích alkalického charakteru, ale naopak nerozpustné v silně kyselých roztocích při $pH < 2$, v kyselějších roztocích poté dochází ke koagulaci huminových kyselin z roztoku,
- *huminy* (HU), které nelze převést do roztoku kyselými ani zásaditým roztoky, tato frakce tedy zůstává nerozpustná v jakémkoliv prostředí, nezávisle na pH roztoku.

I když je chemická struktura jednotlivých frakcí huminových látek dosti podobná, liší se tyto frakce poměrně výrazně fyzikálními a chemickými vlastnostmi [7], jak je naznačeno výše. Základní rozdíly ve fyzikálních vlastnostech frakcí HL vystihuje obrázek 1.

Huminové látky				
fulvinové kyseliny		huminové kyseliny		huminy
2 000	nárůst molekulové hmotnosti			30 000
45 %	nárůst obsahu uhlíku			62 %
48 %	pokles obsahu kyslíku			30 %
	pokles kyselosti			
	pokles stupně rozpustnosti			

Obrázek 1: *Vlastnosti jednotlivých frakcí huminových látek* [3].

Na první pohled je patrné, že jednotlivé frakce HL se liší zbarvením. FK jsou žluté až žlutohnědé, na rozdíl od HK, které vynikají hnědou respektive šedou barvou. Nerozpustná frakce HL – huminy – disponují černou barvou. Dalším markantním rozdílem ve vlastnostech frakcí HL je jejich molekulová hmotnost. Molekulová hmotnost FK se pohybuje okolo 2 000 Da, čili FK disponují nejnižší molekulovou hmotností ze všech frakcí huminových látek, což je způsobeno rozdílem v počtu kondenzovaných aromatických cyklů a charakteristických funkčních skupin (karboxylové, fenolické ...) v jejich struktuře. Lze tedy říci, že s rostoucím množstvím cyklů a funkčních skupin ve struktuře jednotlivých frakcí úměrně roste i molekulová hmotnost. FK lze tedy řadit mezi nízkomolekulární látky, na rozdíl od HK a HU, které jsou vysokomolekulárními frakcemi HL. Z obrázku 1 je dále patrné, že různé frakce HL se také liší procentuálním zastoupením uhlíku a kyslíku. Zatímco obsah uhlíku roste od FK směrem k HU tak, jak to odpovídá rostoucímu zastoupení cyklů v základním skeletu molekul, obsah kyslíku naopak roste opačným směrem, protože FK disponují ve své struktuře vyšším obsahem karboxylových skupin, které jsou zodpovědné za vyšší celkovou kyselost této nízkomolekulární frakce huminových látek ve srovnání s HK a HU.

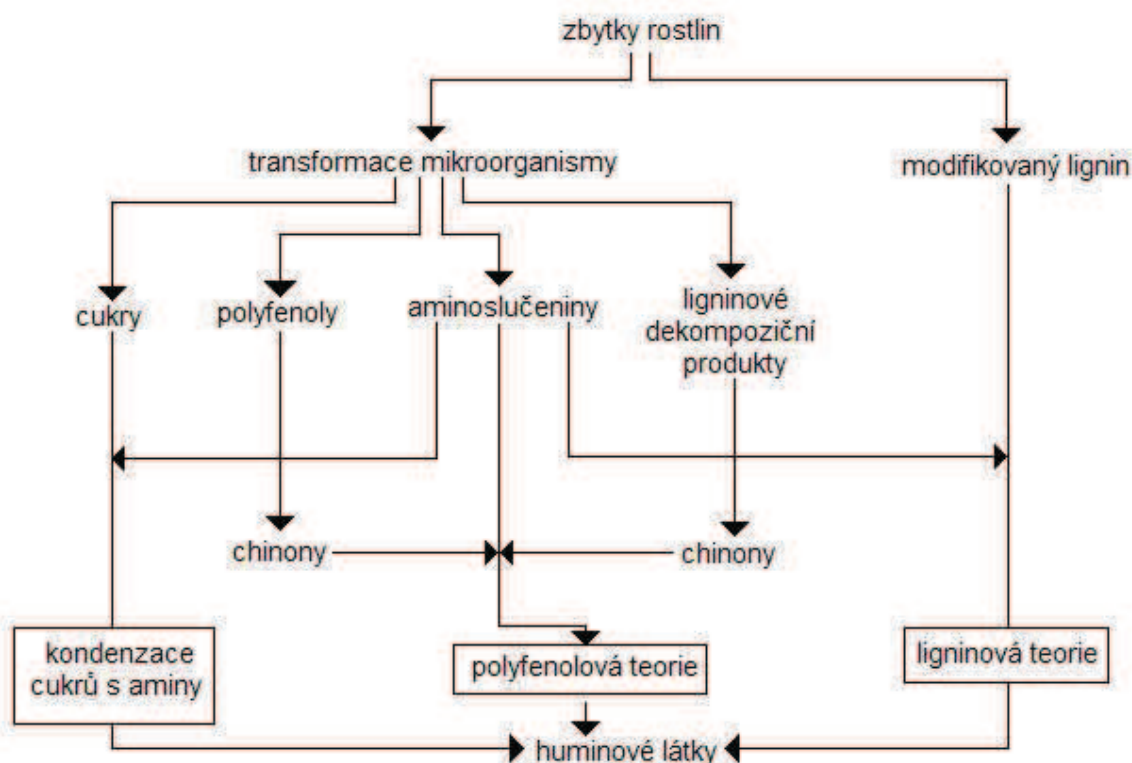
Jak již bylo zmíněno výše, dvě z frakcí HL – konkrétně HK a FK – jsou rozpustné v alkalickém prostředí, i přesto, že základní strukturní podobnost s nerozpustnou frakcí HL (huminy) je zřejmá. HK nejsou rozpustné v roztocích kyselého charakteru, což je způsobeno tím, že při nízkém *pH* je většina karboxylových a fenolických funkčních skupin ve struktuře HK naprotonizována, vyskytují se tedy v nedisociované formě. S rostoucím *pH* dochází nejprve k disociaci karboxylových skupin a následně také fenolických skupin. Rozpustnost HK je tedy úzce spojena s mírou disociace funkčních skupin.

Procentuální zastoupení jednotlivých frakcí HL v půdě se liší podle toho, o jaký typ půdy se jedná a v jaké oblasti se tato půda nachází. Například humus pralesních půd je poměrně bohatý na FK, zatímco humus rašelinišť a lučních půd je tvořen převážně HK a procento

zastoupení FK je mizivé. Poměr obsahu HK a FK v půdě také většinou klesá s hloubkou odběru vzorku půdy [8].

3.1.3 Vznik huminových látek

I když se výzkumu vzniku HL věnuje celá řada vědeckých institucí, není doposud znám jeho přesný mechanismus. Proces humifikace lze popsat několika teoriemi, z nichž budou v následujícím odstavci zmíněny základní tři. Jedna z prvních teorií vzniku HL tvrdila, že HL vznikají z lignifikovaných pletiv rostlinných zbytků degradačním způsobem (*ligninová teorie*). Tato prapůvodní teorie byla formulována již roku 1932 Waksmanem. Další přijímanou teorií vzniku HL je *teorie polyfenolová*, která je v dnešní době nejhojněji využívána pro popis vzniku HL v odborných a vědeckých publikacích. Poslední hypotetickou teorií vzniku HL je *teorie kondenzace sacharidů s aminy*, ve které vznikají nejprve nízkomolekulární organické látky, ze kterých jsou HL formovány následnou oxidací, kondenzací a polymerizací [3]. S jistotou lze konstatovat pouze to, že žádná z dosud známých teorií vzniku huminových látek není zcela univerzální, lze tedy předpokládat, že všechny přijímané teorie se navzájem kombinují s různou důležitostí podle druhu půdy.



Obrázek 2: Přijímané teorie vzniku huminových látek [3].

3.1.4 Huminové kyseliny

HK jsou jednou ze základních stavebních složek organické hmoty půdy. Jedná se o směs látek vyskytujících se přirozeně v půdě, které disponují podobnými vlastnostmi. Konkrétně se jedná o sloučeniny, které jsou rozpustné v roztocích alkalického charakteru a naopak

nerozpustné v roztocích silně kyselých ($pH < 2$). Hlavními prvky, ze kterých jsou huminové kyseliny tvořeny jsou uhlík, dusík, kyslík a vodík. I když jsou huminové kyseliny hojně využívány jak v průmyslovém měřítku, tak také ve vědeckých a výzkumných oblastech, stále ještě není objasněna exaktní struktura těchto látek. Hypotézy o struktuře huminových kyselin přináší kapitola 3.1.6. Jak již bylo zmíněno výše, v případě HK nelze říci, že je to jedna konkrétní sloučenina, proto i HK pocházející z různých zdrojů se budou poměrně výrazně lišit svými vlastnostmi, i když základní charakteristika zůstává stejná. Jedním ze základních kritérií, jak charakterizovat HK je prvkové složení (viz tabulka 1).

Tabulka 1: Prvkové zastoupení v huminových a fulvinových kyselinách (uvedeno v hm. %) [16].

prvkové složení	huminové kyseliny	fulvinové kyseliny
uhlík	53,8 – 58,7	40,7 – 50,6
kyslík	32,8 – 38,3	39,7 – 49,8
vodík	3,3 – 6,2	3,8 – 7,0
dusík	0,8 – 4,3	0,9 – 3,3

Dalším způsobem jak charakterizovat a porovnávat HK a jejich kvalitu vzhledem k původu, je zastoupení funkčních skupin v jejich struktuře (viz tabulka 2). Zastoupení karboxylových skupin ovlivňuje celkovou kyselost HK, která je nižší než v případě FK.

Vzhledem k tomu, že huminové kyseliny jsou pravděpodobně nejrozšířenější přírodní organické sloučeniny na zemském povrchu, je nutno věnovat jejich studiu a výzkumu nemalé prostředky. Jedná se bez pochyby o nejdůležitější zdroj organického uhlíku v půdě.

Tabulka 2: Procentuální zastoupení funkčních skupin v huminových kyselinách [16].

funkční skupina	procentuální zastoupení [hm. %]
karboxylová (–COOH)	4,4
alkoholová hydroxylová (–OH)	3,3
fenolová hydroxylová (–OH)	1,9
keto skupina (C=O)	1,2
methoxy skupina (–OCH ₃)	0,3

3.1.5 Extrakce huminových kyselin

Pro využití respektive studium HK v laboratorním prostředí je nutno tyto látky oddělit od širokého spektra ostatních látek vyskytujících se v půdě. Pro extrakci huminových kyselin lze použít několik metod, které budou diskutovány níže. Všechny extrakční metody ovšem musí splňovat následující požadavky: použitými chemikáliemi pro extrakci nesmí docházet ke změně chemických či fyzikálních vlastností HK, extrahované HK by neměly obsahovat anorganické kontaminanty, vzorek musí obsahovat frakce všech molekulových hmotností a používaná metoda by měla být aplikovatelná na extrakci HK z různých zdrojů [17].

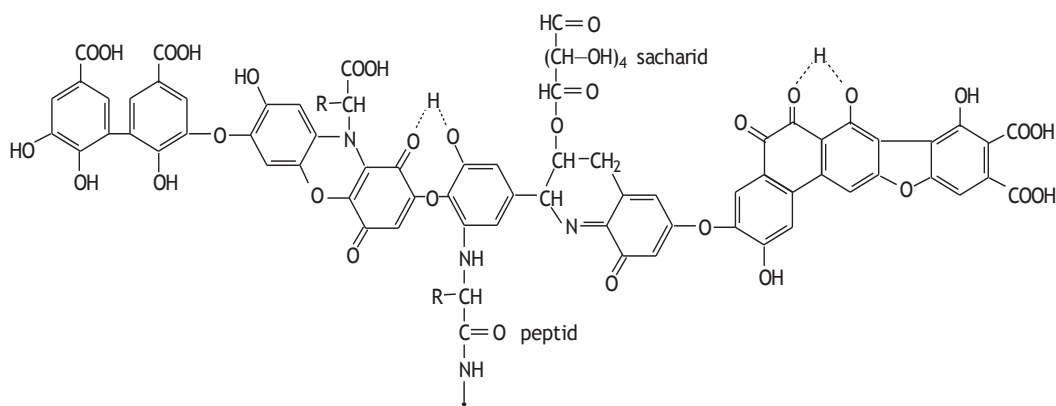
Extrakce HK lze rozdělit do několika skupin (dělení dle Stevenson, 1982 [16]): alkalické extrakce (výtěžek až 80 hm. % organické hmoty půdy), neutrální extrakce (výtěžek do 30 hm. %) a organické extrakce (výtěžek také do 30 hm. %). Mezi nejpoužívanější způsoby

extrakce HK z půdních vzorků spadají alkalické extrakce. Pro tento způsob extrakce je znám přesný postup definovaný podle IHSS [18]. Jako extrakční činidlo se v tomto případě používá směs hydroxidu sodného s pyrofosfátem sodným. Přestože bylo podrobně zkoumáno velké množství alternativních extrakčních činidel, směs hydroxidu sodného s pyrofosfátem sodným se stále jeví jako nejvhodnější pro extrakci HK z půdních vzorků, jelikož tímto způsobem extrakce lze dosáhnout výtěžku až 2/3 původní organické hmoty. Jako srážecí činidlo je většinou používána kyselina chlorovodíková. Po extrakci a purifikaci následuje dialyzace, která slouží k odstranění nízkomolekulárních iontů a nízkomolekulárních frakcí HK. Pro dialyzaci HK se využívá speciálních dialyzačních membrán s přesně definovanou velikostí pórů (*cut off*). Dialyzace probíhá do té doby, dokud zkoumaný vzorek nevykazuje negativní test na chloridové ionty. Tento test je prováděn pomocí srážecí reakce za použití dusičnanu stříbrného. V případě, že v dialyzovaném roztoku jsou přítomny chloridové ionty, vytvoří se po přidání dusičnanu stříbrného bílá nerozpustná sraženina chloridu stříbrného. Dialyzované HK jsou následně lyofilizovány. Postup purifikace a lyofilizace může být několikrát opakován k docílení požadovaných vlastností HK. Opětovnou purifikací lze ovlivnit finální vlastnosti získaných materiálů, jako je obsah popela či vlhkost HK.

3.1.6 Struktura huminových kyselin

Pochopení molekulární struktury HK patří již od objevení těchto látek k základním směrům výzkumu mnohých vědeckých skupin. Nutno říci, že objasnění struktury HK patří pravděpodobně k nejsložitějším oblastem v půdní chemii [4], ovšem pro pochopení významu těchto látek v jejich přirozeném prostředí je nezbytné.

V posledních několika desetiletích byla vytvořena spousta teorií o struktuře a charakteru HK. Za nejpravděpodobnější hypotetický model struktury huminových kyselin byl z historického hlediska považován Stevensonův model [16], který pohlížel na HK jako na látky s makromolekulární strukturou. Dalším modelem akceptovaným v dřívější době na základě polymerního konceptu je model dle Kickutha [19]. Polymerní koncepty uvažovaly HK jako ohebné polyelektroloty, zaujímající konformaci náhodného klubka různých tvarů a velikostí v závislosti na okolním prostředí (aktuální *pH* roztoku, náboj na řetězci ...). V zásaditém prostředí byl předpokládán protáhlý tvar polymerního klubka, vzhledem k tomu, že dochází k disociaci karboxylových skupin, zatímco v silně kyselém prostředí, kde dochází k protonizaci a následné koagulaci HK z roztoku byl předpokládán klubkovitý tvar.



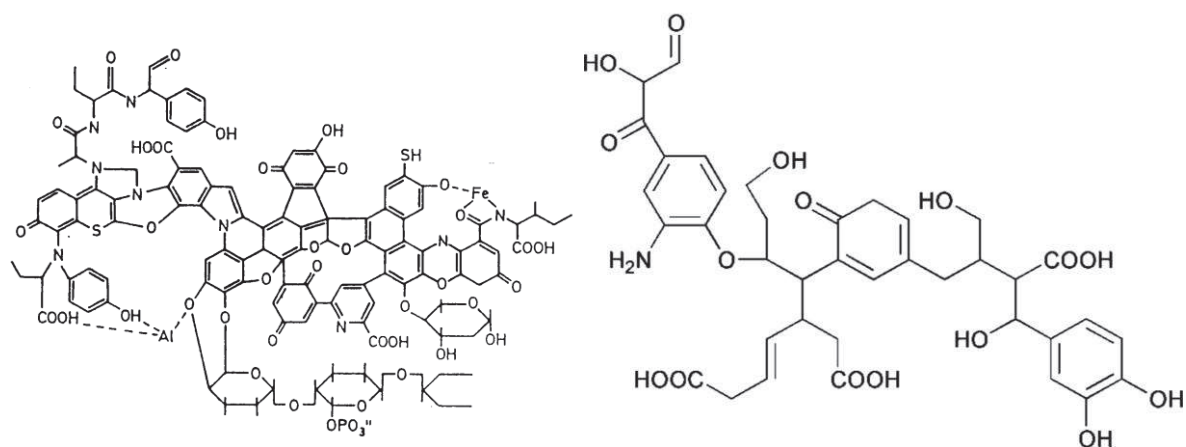
Obrázek 3: Hypotetická struktura huminových kyselin dle Stevensona (1982) [16].

HK tvoří poměrně složité komplexy aromatických makromolekul s aminokyselinami, cukry a peptidy, které se podílejí na spojování jednotlivých aromatických sekvencí. Ve struktuře HK

jsou přítomny karboxylové skupiny, které jsou zodpovědné za celkovou kyselost zkoumaného materiálu. Právě přítomnost těchto karboxylových skupin je pravděpodobně zodpovědná za jednu z nejcennějších vlastností HK – schopnost tvořit s běžnými polutanty stabilní komplexní sloučeniny vedoucí až k jejich imobilizaci. Struktura HK se také odvíjí od místa naleziště, zdroje (lignit, půda, rašelina, písek) a v neposlední řadě také od způsobu extrakce [3].

S rozvojem analytických metod a výzkumu v oblasti HK byl polymerní koncept postupně zahrnut, vzhledem k tomu, že nově získaná experimentální data byla v nesouladu s polymerní představou HK [20]. Podle dalšího přijímaného konceptu jsou HK *supramolekulární agregáty nízkomolekulárních substancí*, které jsou poutány nekovalentními interakcemi (slabé fyzikální interakce, komplexace s vícemocnými ionty) [21]. Příklad jednoho z modelů zastupujících teorii HK coby supramolekulárních agregátů je uveden na obrázku níže (viz obrázek 4).

Nutno dodat, že všechny zmíněné strukturální modely HK jsou pouze teoretický náznak toho, jak skutečně HK vypadají. Tyto hypotetické modely jsou odvozeny na základě elementárního složení HK, přítomnosti funkčních skupin a v neposlední řadě také na fyzikálních vlastnostech zkoumaného materiálu. Vzhledem k tomu, že pod pojmem HK se neskrývá pouze jedna konkrétní látka, je znalost exaktní struktury prakticky nedosažitelná. Pro charakterizaci a popis HK se zatím tedy nejvíce využívá prvkové složení zkoumaných materiálů, z čehož lze také usuzovat o výsledných vlastnostech těchto materiálů.



Obrázek 4: Hypotetická struktura huminových kyselin podle Kickutha (1976) (vlevo) a Steelinkiv model huminových kyselin (vpravo) [19].

3.1.7 Využití huminových kyselin

HK nacházejí uplatnění v širokém množství oborů, ať již se jedná o průmysl, zemědělství či jiná spotřebitelská odvětví. Dříve byly HK hojně využívány v energetickém průmyslu coby zdroj energie. V současné době, při rozvoji jiných zdrojů tepla a elektřiny (jaderná energetika) a alternativních zdrojů (sluneční, větrné či vodní elektrárny), je proces spalování uhlí v uhelných elektrárnách co nejvíce omezován a to hlavně z ekologických důvodů. Nutnost nahradit fosilní paliva ekologičtějšími zdroji energie vedla vědeckou společnost k rozsáhlému výzkumu, věnovanému dalším alternativním možnostem uplatnění HL. Mezi hlavní odvětví, ve kterých lze využít vlastnosti HL jsou řazeny následující oblasti [9]:

Zemědělství

Lidstvo využívalo potenciálu HK již od pradávna, aniž by mělo ponětí, že právě HK jsou zodpovědné za zlepšování kvality půdy či zvyšování úrodnosti pěstovaných rostlin. V zemědělství je využíváno pozitivního vlivu HK především na obsah živin a zadržování vody v půdě. HK jsou používány v zemědělství coby aditivum k běžně používaným hnojivům, především ve formě humátu sodného nebo draselného. V neposlední řadě přispívají k vývoji mikroflóry či vzniku pórů v půdě. Potenciální využití v zemědělství tkví také v aplikaci HK coby přísad do krmiv pro hospodářská zvířata, jelikož byl zjištěn pozitivní vliv na růst a váhu dobytka, vzhledem k tomu, že HK mají schopnost optimalizace pH v jejich trávicím traktu [9].

Průmysl

Tradiční využití HL v průmyslovém měřítku bylo donedávna spjata s uhlím v průmyslu energetickém. V posledních desetiletích bylo zjištěno, že zásoby fosilních paliv na naší planetě rapidně klesají, proto bylo nutností nahradit nynější fosilní paliva ekologičtější a pokud možno stejně výhřevnou variantou, jako je uhlí. Nemalé prostředky byly věnovány rozsáhlému výzkumu HL v této oblasti, jelikož kombinace ekologických paliv s potenciálem HL se zdá být na určitou dobu řešením.

Další využití HL v průmyslovém měřítku lze nalézt například ve stavebnictví. V tomto oboru se HL využívají coby plniva do cementů, které umožňují řízení vytvrzování tohoto materiálu, smáčivost připravených povrchů a jiné finální vlastnosti. Na závěr nelze opomenout využití HL v průmyslu keramickém. Zde se používají jako stabilizátory keramických suspenzí při manipulaci, převozu a výrobě finálních keramických produktů [23].

Ochrana životního prostředí

HL, konkrétně pak HK jako jedna z jejich frakcí, jsou schopny tvořit díky své struktuře a vysoké afinitě vůči běžným polutantům s ionty těžkých kovů poměrně stabilní komplexní sloučeniny a tím omezovat jejich migraci, biologickou dostupnost a potenciální znečištění půdy. Potenciální využití ve formě imobilizantů iontů těžkých kovů je testováno především na měďnatých iontech, které jsou díky své afinitě a barevnosti solí považovány za exemplární polutant, se kterým se HK v jejich přirozeném prostředí mohou setkat.

Farmacie a biomedicína

Ve farmaceutickém a biomedicínském průmyslu je v posledních několika letech těžištěm zájmu využívání hydrogelových forem reaktivních biopolymerů k řízenému uvolňování látek do těla pacienta. HK mají oproti ostatní biopolymerům jednu nevýhodu, limitujícím faktorem v použití HK ve farmaceutickém průmyslu v širokém měřítku je jejich zbarvení, které nelze odstranit klasickými bělicími prostředky za současného zachování vlastností HK.

Běžně se ovšem HK využívají při bahenních lázních či léčebných bahenních zábalech. Všechny tyto procedury jsou založeny na bázi HL. Velmi dobré review o aplikaci HK ve farmaceutickém a biomedicínském průmyslu přináší reference [24].

3.2 Chitosan

Chitosan je částečně deacetylovaný biopolymer *N*-acetyl glukosaminu. Jedná se v podstatě o kopolymer složený z dvou základních podjednotek spojených $\beta(1-4)$ vazbou [25]. Jedná se o lineární polysacharid, nerozpustný ve vodě, ale rozpustný ve slabých kyselinách (podle

stupně deacetylace) jako jsou kyselina mravenčí, kyselina octová aj. Podjednotky, ze kterých je složen jsou následující: 2-acetamido-2-deoxy-D-glukopyranózu a 2-amido-2-deoxy-D-glukopyranózu [25].

Chitosan je většinou získáván a také průmyslově vyráběn z hojně se vyskytujícího lineárního polysacharidu – z chitinu ($\beta(1-4)$ -*N*-acetyl-D-glukosamin) – metodou alkalické *N*-deacetylace (účinkem 50 % hydroxidu sodného) [28]. V případě chitinu je nutno říci, že se jedná o druhý nejrozšířenější polysacharid na zemském povrchu (ihned po celulóze). Chitin se přirozeně vyskytuje v kutikulách hmyzu a buněčných stěnách hub a tvoří základní složku ulit korýšů (krabi, raci, krevety ...).

Chitosan patří po strukturní stránce mezi unikátní polysacharidy, jelikož jako jeden z mála se chová ve vodných roztocích jako polykationt. Tento iontový charakter je způsoben tím, že chitosan ve své struktuře obsahuje volné aminoskupiny, které se ve slabě kyselých vodných roztocích protonizují [27]. Chitosan se díky své struktuře (viz obrázek 5), funkčním skupinám a jeho charakteru ve vodných roztocích dostává do popředí zájmů mnoha vědeckých a výzkumných institucí. Je hojně využíván i v průmyslovém měřítku v širokém spektru aplikačních sfér. Stručný přehled aplikací chitosanu je uveden v kapitole 3.2.2.

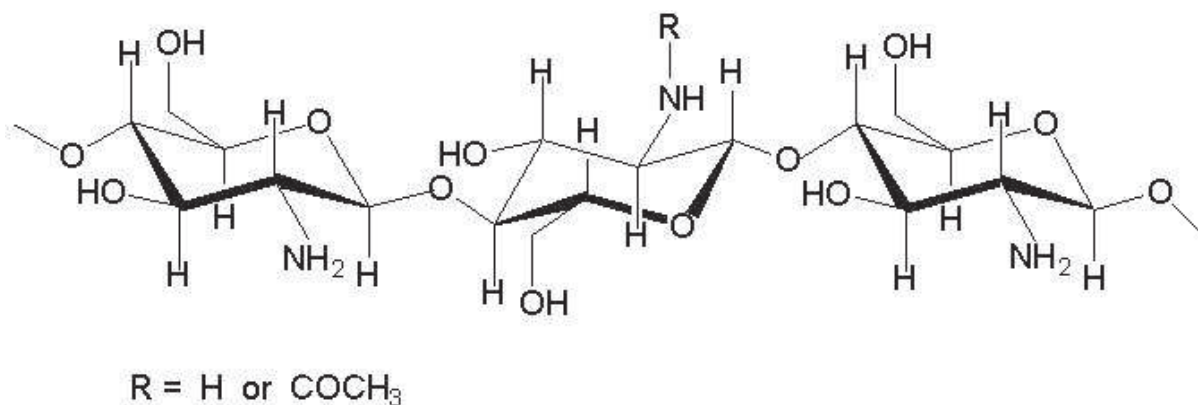
3.2.1 Vlastnosti a struktura chitosanu

Jak již bylo zmíněno výše, chitosan je ceněn a hojně využíván v průmyslovém měřítku v širokém spektru průmyslových odvětví hlavně díky svým unikátním vlastnostem. Fyzikální i chemické vlastnosti chitosanu jsou úzce spjaty s jeho strukturou. Jak již bylo zmíněno, chitosan ve své struktuře disponuje volnými aminovými skupinami, což z něj činí ve vodných roztocích polykationt. Díky tomuto faktu se vyznačuje velkou a velmi dobře probádanou schopností kompletní aniontové sloučenin. I přesto, že ve vodných roztocích při fyziologickém *pH* disponuje kladným nábojem, zachovává si chitosan důležitou vlastnost – bioadhezivitu [26]. Stručný přehled vlastností a způsobu jejich využití je uveden v tabulce níže (viz tabulka 3).

Tabulka 3: *Specifické vlastnosti chitosanu* [26].

specifická vlastnost	aplikační oblast
bioaktivita	prevence proti mikrobiálnímu růstu
biodegradabilita	zdroj uhlíku pro bioinženýrství
reaktivita aminoskupin	imobilizace enzymů
filmotvorné vlastnosti	textilní produkty s řízenou propustností
chelační, adsorpční vlastnosti	čištění odpadních vod

Hlavní aplikační sféry jsou poté uvedeny v následující kapitole 3.2.2, pojednávající o využití tohoto biopolymeru. Nutno dodat, že v přírodě neexistuje čistý, 100 % acetylovaný chitin ani 100 % neacetylovaný chitosan, vždy se vyskytuje ve formě kopolymeru acetylovaných a neacetylovaných glukosaminových jednotek. Běžné procentuální zastoupení *N*-acetylglukosaminových jednotek v přírodě je 70 – 90 %.



Obrázek 5: Strukturální vzorec chitosanu [31].

3.2.2 Využití chitosanu

Chitosan díky svým vlastnostem nachází uplatnění v širokém spektru aplikací, počínaje farmacií a biomedicínou přes textilní průmysl až po zemědělství. V lékařských a farmaceutických odvětvích je chitosan ceněn hlavně díky jeho biokompatibilitě a biodegradabilitě [26]. Není potom divu, že nemalé procento bandáží, lokálních očních implantátů nebo i tělních implantátů má základ právě v chitosanu. Další, neméně důležité použití chitosanu ve farmaceutickém průmyslu je ve formě kapsulí s řízeným uvolňováním obsahu. Zde se využívá jeho postupné biodegradability, kdy s postupem času dochází k rozkladu chitosanové schránky transportovaného léčiva a do těla se poté postupně (řízeně) uvolňují účinné látky. V biomedicínských aplikacích je chitosan hojně využíván coby obvazový materiál vzhledem k tomu, že podporuje hojení ran a chrání rány před mechanickým poškozením, znečištěním a infekcí. V poslední době se na biomedicínském trhu objevují také samovstřebávací chirurgické nitě [30][32], které jsou na jednu stranu pevné a pružné, ale na druhou stranu nezanechávají stehy, vzhledem k tomu, že jsou opět vyrobeny na bázi chitosanu, který je s postupem času biodegradabilní. Chitosan se využívá také jako antikoagulant [30], tedy jako látka zabraňující srážení krve. Na tento účel se využívá speciálně modifikovaného chitosanu, konkrétně karboxymethylovaného [30]. Chitosan se také s oblibou využívá na tvorbu kontaktních čoček, vzhledem k tomu, že je biokompatibilní a lidské tělo ho poměrně lehce přijímá.

Samostatnou kapitolou v oblasti aplikace chitosanu v biomedicínském odvětví tvoří tzv. *scaffoldy*. Tento pojem spadá do oblasti tkáňového inženýrství a využívá chitosanu coby nosného média („lešení“), sloužícího jako matrice pro růst nových buněk, tkání či dokonce orgánů. Kmenové buňky bez rozlišení působnosti jsou umístěny na *scaffold*, s výhodou se využívá chitosanu pro tvorbu tohoto *scaffoldu*, vzhledem k tomu, že chitosan podporuje růst buněk a jejich výživu. Tímto způsobem lze tedy uměle vypěstovat poškozenou část lidského organismu. Pro tento způsob aplikace se nevyužívá čistý chitosan, ale většinou kompozitní materiál (kompozit chitosanu a hydroxyapatitu) [34].

Chitosan je díky svým vlastnostem také hojně využíván v kosmetickém průmyslu, vzhledem k tomu, že disponuje fungicidním a antibakteriálním efektem, dokáže zvlhčovat pokožku a zlepšovat penetraci lipofilních látek přes lidskou kůži. Běžně je využíván ve vlasové kosmetice. Potenciální využití chitosanu lze nalézt v potravinářském průmyslu [29]. Teoreticky lze říci, že chitosan v případě požití je schopen vázat v lidském žaludku tuky, tím pádem by mohl fungovat jako odstraňovač tuků, ovšem toto využití chitosanu ještě nebylo

dostatečně experimentálně potvrzeno ani vyvráceno. V potravinářském průmyslu ovšem nachází chitosan také své uplatnění především coby konzervant potravin.

Chitosanové přípravky jsou využívány také v ostatních odvětvích jako je zemědělství či ochrana životního prostředí. Zvyšují odolnost rostlin proti houbové, mikrobiální a virové infekci. Dále lze na bázi chitosanu připravit různě modifikované sorbenty, vzhledem k tomu, že chitosan disponuje poměrně vysokou afinitou vůči iontům těžkých kovů a tím pádem je schopen tyto ionty imobilizovat a omezovat tak jejich biologickou aktivitu a dostupnost. Dokonce lze říci, že chitosan disponuje lepšími sorpčními schopnosti vůči běžným polutantům než zeolity [29].

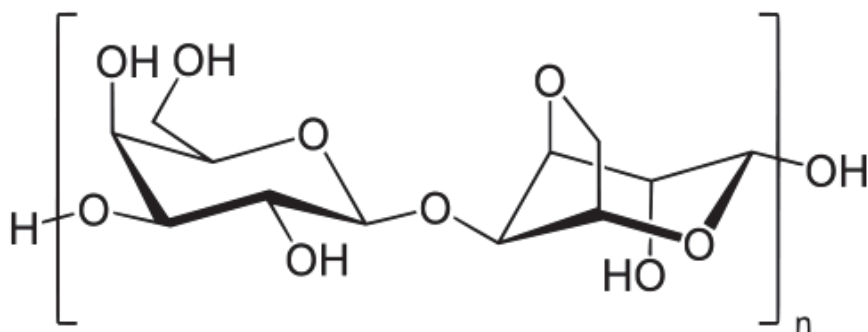
3.3 Agaróza

Agaróza s jejími výjimečnými vlastnostmi je známa již od počátku 17. století, kdy byl objeven v Japonsku právě díky jeho schopnosti gelovatění. Agaróza je lineární polysacharid tvořený opakujícími se monomerními jednotkami agarobiózy. Agarobióza je disacharid tvořený střídajícími se galaktózovými a 3,6-anhydrogalaktózovými podjednotkami. V podstatě se dá říci, že se jedná o zcela nenabíтый polysacharid, nicméně může obsahovat příměsi nabitých sulfátových a pyruvátových skupin.

Agaróza je získávána z mořských řas typu Agarophyte, což je typicky červená řasa, která ve své buněčné stěně vytváří hydrokoloidní formu agaru. Agaróza coby biopolymer vykazuje zajímavé vlastnosti především z pohledu termických vlastností, vzhledem k tomu, že se jedná o termoreverzibilní polysacharid, to znamená, že vykazuje tzv. hysterezi při změně teploty.

Co se týče vlastností, je známo, že agaróza je velmi dobře rozpustná ve vodném prostředí při teplotě nad 85°C a naopak nerozpustná v chladné vodě. Agaróza je schopna tvořit termoreverzibilní hydrogel. Při chlazení zahřátého roztoku agarózy dochází k tuhnutí (v teplotním rozsahu 30 – 40 °C) a vytváří se polotuhá gelová hmota [36]. Následným zahřáním nad teplotu tání agarózy dojde k opětovnému převedení do roztoku – gelace agarózy je termoreverzibilní. Hysterezní chování, které je pozorováno při teplotě tání korespondující gel-sol procesu a také hysterezní chování při teplotě tuhnutí odpovídající sol-gel procesu je funkcí chemické struktury [37]. Agaróza zaujímá jednoduchou nebo dvojitou helikální konformaci v pevném stavu. Ke gelaci dochází při agregaci dvojitých helikálních struktur, při teplotě, která značně závisí na obsahu methoxylových a sulfátových skupin, které jsou schopny ovlivňovat teplotu gelace agarózových gelů. Třidimenzionální síť, jejíž základem je asociace dvojitých helikálních struktur je stabilizována vodíkovými vazbami. Rozsáhlejší studium problematiky vzniku třidimenzionálních sítí agarózových hydrogelů přináší reference [38]. Agarózové gely vykazují, jako spousty jiných gelových systémů, jednu ze základních vlastností charakterizující gelové materiály – synereze. Termín synereze je spjat se samovolným vytlačováním přebytečné kapaliny (disperzního prostředí) z nově vzniklého disperzního systému, k němuž dochází v důsledku smršťování síťovité struktury při stárnutí gelu. Tento jev se hojně vyskytuje u nových systémů, které ještě nejsou v termodynamické rovnováze. Je podporován zvýšením teploty a v mnohých případech také přidávkem elektrolytu.

Vzhledem k tomu, že teplota tuhnutí agarózy se pohybuje relativně blízko běžné teplotě lidského těla, z tohoto důvodu je agaróza hojně využívána pro biomedicínké účely.



Obrázek 6: *Strukturní vzorec lineárního polysacharidu agarózy* [35].

3.3.1 Využití agarózy

Agaróza, coby lineární polysacharid nachází mnoho uplatnění v biomedicínkách aplikacích a její příhodné vlastnosti jsou také široce využívány v potravinářském průmyslu. Ucelený přehled aplikací tohoto přírodního polysacharidu poskytují reference [40], [41]. Jednoduše řečeno, agaróza může být použita v následujících odvětvích spotřebního průmyslu: farmacie, potravinářství, biomedicínské aplikace, dále jako separační médium, purifikační médium aj. Separační a purifikační využití agarózy představuje samostatnou kapitolu ve využití tohoto materiálu, vzhledem k tomu, že agaróza se hojně využívá ke gelové permeační chromatografii (GPC). Další využití tkví v gelové elektroforéze, kde agaróza působí jako vhodné médium, či lépe řečeno vhodný nosič pro elektricky nabitě molekuly. Gelovou elektroforézou za použití agarózy lze například separovat jednotlivé nukleové kyseliny ze struktury lidské DNA. Principem gelové elektroforézy je pohyb záporně nabitých molekul DNA v elektrickém poli směrem k anodě.

Agaróza je také rozšířena jako médium pro růst mikroorganismů, což je úzce spjato s využitím tohoto materiálu v biomedicínských aplikacích. Zatímco v potravinářském průmyslu jsou preferovány agarózové gely s nižší koncentrací, v biomedicínských aplikacích jsou vyžadovány hydrogely s vyšší mechanickou odolností, a tudíž se používají koncentrovanější agarózové gely. V biomedicínských aplikacích je agaróza nejvíce ceněna z pohledu tkáňového inženýrství, jak již bylo zmíněno výše, jeví se jako vhodné médium pro růst mikroorganismů či například lidských tkání. Z tohoto důvodu lze agarózové gely využívat, stejně jako dříve zmiňovaný chitosan, při přípravě bioinženýrských *scaffoldů*.

3.4 Gelové systémy

3.4.1 Úvod do problematiky gelových disperzních systémů

Pod pojmem disperzní soustava se skrývá termodynamický systém tvořený minimálně dvěma vzájemně nemísitelnými fázemi. Jedna z fází se nazývá disperzní prostředí (*dispersens*), která zaujímá většinový podíl celkového objemu či hmotnosti disperzní soustavy. Druhou fází je disperzní podíl (*disperzum*), což jsou pevné, kapalné či plynné částice rozptýlené právě v disperzním prostředí.

Dělení disperzních soustav

Existuje velké množství disperzních soustav klasifikovaných dle různých kritérií. Tato kapitola by měla přinést ucelený pohled na dělení disperzních soustav. Disperzní soustavy mohou být děleny dle [39]:

- podle počtu fází systému
 - homogenní – disperzní podíl i disperzní prostředí tvoří jednu fázi
 - heterogenní – disperzní podíl je od disperzního prostředí oddělen mezifázovým rozhraním;
- podle velikosti částic disperzního podílu
 - hrubě disperzní – lineární rozměr částic větší než 500 nm (někdy se uvádí hranice 1 000 nm),
 - koloidně disperzní – lineární rozměr částic v rozmezí 1 – 500 nm (resp. 1 000 nm),
 - analyticky disperzní – lineární rozměr částic menší než 1 nm;
- podle tvaru částic
 - globulárně disperzní – soustavy s izometrickými částicemi,
 - laminárně disperzní – soustavy s anizometrickými, jejich rozměr je řádově menší než ostatní,
 - fibrilárně disperzní – s anizometrickými částicemi, jejichž jeden rozměr je řádově větší než ostatní;
- podle skupenství disperzního prostředí (viz. tabulka 4)

Tabulka 4: Dělení disperzních soustav dle skupenství disperzního prostředí [39].

disperzní prostředí	disperzní podíl	disperze	
		koloidní	hrubě disperzní
plynné	plynný	–	–
	kapalný	aerosoly (mlha)	děšť
	pevný	aerosoly (dým)	kouř
kapalné	plynný	pěny	bublina, pěna
	kapalný	emulze	emulze
	pevný	lyosoly	suspenze, gel
pevné	plynný	tuhé pěny	minerály s uzavřenými plyny
	kapalný	tuhé emulze	minerály s uzavřenými kapičkami
	pevný	tuhé soly	eutektika

- podle struktury disperzního podílu
 - systémy s disperzním podílem ve formě částic,
 - systémy s částicemi disperzního podílu vytvářející souvislou prostorovou síť, která prostupuje kapalně disperzní prostředí (gely);
- podle rozdělení velikosti částic
 - monodisperzní (uniformní) – částice stejné velikosti,

- paucidisperzní – systémy obsahující několik diskretních velikostních frakcí částic,
- polydisperzní (neuniformní) – obsahuje částice mnoha různých velikostí.

Koloidní disperze

Jedná se o heterogenní disperzní soustavu obsahující disperzní podíl o velikosti koloidních částic (1 – 500 nm). Pod pojmem heterogenní disperze se skrývá systém, v němž disperzní podíl a disperzní prostředí představují dvě různé fáze, vzájemně nemísitelné. Disperzní podíl i disperzní prostředí jsou od sebe odděleny mezifázovým rozhraním, které výrazně ovlivňuje finální vlastnosti dané koloidní soustavy. Jsou připravovány buď z velkých částic dispergací nebo z pravých roztoků kondenzací. Disperzní soustavy jsou termodynamicky nestabilní, samovolně zanikají. Složením a přípravou se podobají hrubým disperzím, liší se však rozměrem částic.

Koloidní disperze jsou disperzní soustavy s velikostí dispergovaných částic viditelných ultramikroskopem (lze pozorovat *Brownův pohyb*) nebo elektronovým mikroskopem. Jejich lineární rozměr je natolik malý, že prakticky nesedimentují. Co se týče difúze, tak procházejí běžnými filtry, ovšem neprocházejí běžnými semipermeabilními membránami, na to je jejich poloměr moc velký. Jednou z dalších unikátních vlastností je, že rozptylují procházející světlo, což zapříčiňuje vznik tzv. *Tyndallového efektu*. Jedná se o difúzní rozptyl světla, který vzniká, pokud paprsek prochází prostředím, které málo absorbuje mikroskopické částičky, které odklánějí procházející světlo, čímž se paprsky stávají viditelnými v podobě kužele.

Koloidní soustavy lze rozdělit dle vztahu disperzních částic k disperznímu prostředí na lyofilní a lyofobní. Lyofilní soustavy jsou charakteristické tím, že disperzní částice vykazují určitou afinitu k částicím disperzního prostředí. Lze tedy říci, že disperzní částice jsou solvatovány na svém povrchu molekulami disperzního prostředí. Většinou se jedná o reverzibilní (vratné) disperzní soustavy. Jako příklad lze uvést bílkoviny, polysacharidy či mýdla. Naopak tzv. lyofobní koloidní disperze nevykazují afinitu vůči molekulám disperzního prostředí, jsou tedy v daném disperzním prostředí nerozpustné. Jsou připravovány uměle. Jedná se o ireverzibilní (nevratné) soustavy, které jsou velmi citlivé na jakékoliv vnější zásahy, například přidáním malého množství elektrolytu dochází ke koagulaci a vzniku vločkovitých agregátů.

3.4.2 Využití gelů

S pojmem gel se setkáváme dnes a denně, aniž bychom o tom vůbec věděli. Gel, konkrétně hydrogel se vyskytuje také ve velké míře v lidském těle (pojivové tkáň, oko ...), pravděpodobně z tohoto důvodu je lidské tělo tvořeno ze dvou třetin vodou.

Gely jsou disperze pevných látek v kapalném prostředí. Dispergované látky jsou v tomto případě tuhé látky, jejich spojováním vzniká síťovaná struktura obvykle koloidní velikosti (1 – 500 nm). Gely jsou z velké části tvořeny disperzním prostředím, v případě hydrogelů se jedná o vodu. Tvorbou souvislé struktury dojde k omezení pohyblivosti disperzního podílu, který může vykonávat pouze vibrační pohyb [42]. Lze je tedy považovat za jakousi nádrž na vodu či vodný roztok. I přesto, že jsou tvořeny prakticky většinovým podílem disperzního prostředí, vynikají některými unikátními vlastnostmi. Z tohoto důvodu hrají hydrogely velmi důležitou roli v oblasti hospodaření s vodou v živých organismech, stejně tak v oblastech neživé přírody. Se studiem a využitím gelů se lze setkat v mnohých oborech lidské činnosti. Na

bázi hydrogelů je založeno spousty průmyslových a environmentálních aplikací, počínaje kontrolovaným uvolňováním vody v zemědělských aplikacích přes lékařské a zdravotnické využití v podobě různých suprasorbentů coby zdravotnických textilií. Dobré review o aplikačních formách hydrogelů nabízí reference [43]

3.4.3 Vznik gelových systémů

Gel je z hlediska struktury trojrozměrná nekončená síť, která vytváří souvislou strukturu propustující celým disperzním prostředím. Spojité je nejen disperzní prostředí, ale také disperzní podíl. Jak již bylo zmíněno výše, disperzní částice jsou upevněny v disperzním prostředí a jsou schopny vykonávat pouze vibrační pohyby, nejsou schopny se samovolně pohybovat mezi molekulami disperzního prostředí (odlišnost od kapaliny). Síly poutající disperzní částice mezi molekulami disperzního prostředí se nazývají *adhezí síly* a mají původ buď ve fyzikální či chemické podstatě.

Gely vznikají procesem zvaným *gelace*. Jedná se o proces, při němž se spojováním koloidních částic disperzního podílu v souvislou strukturu vytváří a postupně zpevňuje prostorová síť – vzniká gel [39]. Proces gelace může být způsoben jedním z následujících procesů: změnou fyzikálního stavu roztok, tímto způsobem vznikají fyzikálně síťované gely; chemickou reakcí, čímž lze připravit gely kovalentní; bobtnáním xerogelu, což lze realizovat pouze u hydrogelů reverzibilních přidáním disperzního prostředí, v případě hydrogelu, přidáním vody.

Proces gelace je charakterizován tzv. *bodem gelace* [44]. Bodem gelace je nazýván poměrně krátký časový úsek, při němž je vytvořena nekonečná trojrozměrná síť, což lze charakterizovat tím, že nově vytvořená trojrozměrná síť má rozměry totožné s makroskopickou gelovou fází.

3.4.4 Klasifikace gelových systémů

Nejběžnější dělení gelů je dle jejich chování či charakteru ve vysušeném stavu [43]. Odstraněním disperzního prostředí vzniká z původního lyogelu tzv. *xerogel*, což představuje pouze pevný zbytek z původního gelu (sušina). Podle charakteru chování zmíněného xerogelu lze tedy gely rozdělit následovně:

- *reverzibilní gely* – tento typ gelů při vysoušení zmenšuje svůj objem, až dojde k úplnému odstranění volného disperzního prostředí a vzniku kompaktního xerogelu. Tyto kompaktní xerogely jsou poté schopny přecházet do původního stavu lyogelu procesem zvaným bobtnání, v podstatě se jedná o přijímání disperzního prostředí do struktury xerogelu.
- *ireverzibilní gely* – tento typ gelů je charakteristický tím, že si při vysoušení si udržuje prakticky stejný objem jako původní lyogel. Tento typ gelů ve většině případů vzniká gelatinizací lyofobních solů. Při styku s disperzním prostředím je sice schopen xerogel z ireverzibilního gelu částečně nabobtnat a nasorbovat určité množství disperzního prostředí, ovšem do původního stavu lyogelu se již nevrací.

3.4.5 Vlastnosti gelových disperzních soustav

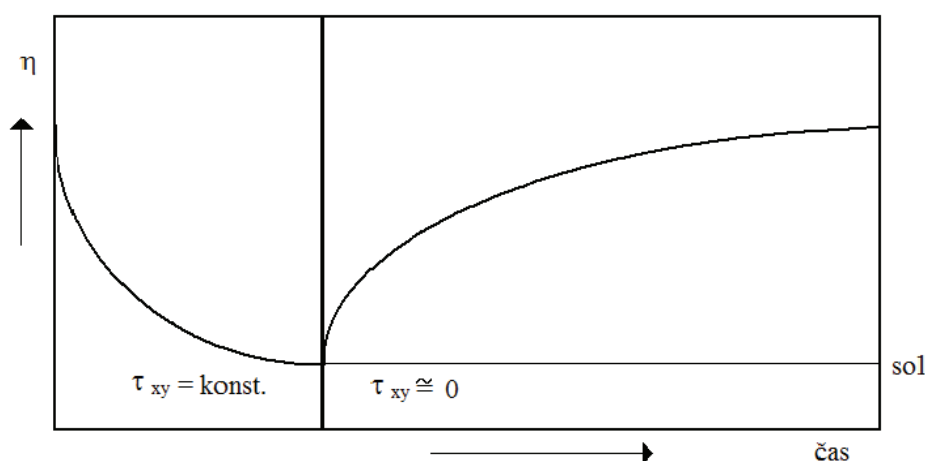
Mechanické vlastnosti

Jak již bylo zmíněno výše, gel je disperze pevných částic (disperzní částice) v kapalném disperzním prostředí. I přes tento fakt mají gelové systémy některé vlastnosti typické pro tuhé

stav. Jedněmi z těchto vlastností jsou mechanické vlastnosti. Gelové systémy odolávají určitému mechanickému napětí až do určité hodnoty tečného napětí (hodnota kritického napětí) a pod touto hodnotou se tedy chovají jako tuhá elastická tělesa. Po překročení hodnoty kritického tečného napětí dojde k nevratné deformaci vnitřní struktury gelu a gel se tedy poté chová jako viskózní kapalina. Proto lze říci, že gelové systémy vykazují typické chování viskoelastického charakteru.

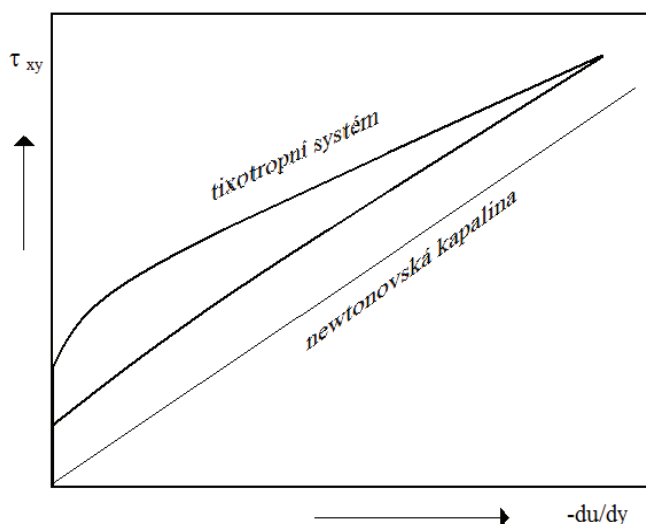
Při nízkých smykových rychlostech se gel chová jako modelové kapalné těleso, čili jeho viskozita je prakticky konstantní (nemění se s proměnnou smykovou rychlostí), ovšem při vyšších smykových rychlostech dojde ke změně chování gelového systému, takový systém se začne chovat jako tuhé elastické těleso, což potvrzuje pokles viskozity se stoupající smykovou rychlostí.

Kritická hodnota tečného napětí se liší vzorek od vzorku. Hlavními faktory, které ji ovlivňují, je především koncentrace vzorku a také pevnost uzlů daného materiálu. Gely obsahující ve své struktuře menší počet vazeb jsou obvykle značně elastického charakteru. Některé plastické a pseudoplastické gely se při smykovém namáhání vyznačují *tixotropními vlastnostmi* [44]. Smykovým namáháním je rozuměno třepání, míchání, odstředování apod. Zpočátku jsou gely s tixotropními vlastnostmi charakteristické vysokou zdánlivou viskozitou, která se postupně s působícím smykovým namáháním snižuje. Pokud je gel ponechán v klidu, původní struktury se opět obnovují a zdánlivá viskozita takového gelu se zvyšuje a asymptoticky se přibližuje hodnotě zdánlivé viskozity původního gelu. Tixotropní vlastnosti vykazují gely s různou pevností uzlů ve své struktuře, jelikož při mechanickém namáhání se začnou nejprve porušovat nejméně pevné vazby a soustava se tím pádem rozpadá na velké celky, které se již nejsou schopny spojit do původní struktury a vytvořit tak gel s původními vlastnostmi. U některých gelů nastává opačný jev zvaný *reopexie*, mechanické namáhání podporuje vznik gelu [45]. Tixotropní chování některých gelových systémů je naznačeno na obrázku níže (viz obrázek 7).



Obrázek 7: *Tixotropické vlastnosti gelových systémů* [46].

Na tokové křivce těchto systémů se objevuje hysterezní smyčka – průběh naměřené křivky při pravidelném zvyšování napětí se neshoduje s průběhem naměřeným při jeho snižování, jak je zřejmé z [45].



Obrázek 8: Průběh tokové křivky pro tixotropní a newtonovskou kapalinu [46].

Zřetelné tixotropní vlastnosti lze pozorovat u některých reverzibilních a nereverzibilních gelů poutaných fyzikálními spoji. Jsou-li síly poutající původní disperzní částice do síťované struktury velmi slabé, je možno gel více či méně prudkým protřepáváním převést opět do stavu sol, mechanickými účinky se ruší slabé vazby mezi částicemi. Zůstane-li tekutý sol stát v klidu, vazby mezi částicemi se opět začnou obnovovat, dochází opět ke zgelovatění takového systému a viskozita postupně nabývá původní hodnoty.

Anizotropie gelů

Většina gelů přirozeně se vyskytujících v rostlinách a živočišném těle vykazuje anizotropii, která vychází z podmínek tvorby těchto gelů. Příčinou anizotropie uměle připravených gelů je obvykle jejich nerovnoměrná deformace při tvorbě nebo nerovnoměrná objemová kontrakce při vysoušení. U těchto gelů jsou vlastnosti jako roztažnost při bobtnání, smršťování při sušení a také optické či mechanické vlastnosti různé v různých směrech [21].

Synereze

U čerstvých gelů, reverzibilních i nereverzibilních, dochází k řadě samovolných jevů, neboť tyto systémy nejsou v termodynamické rovnováze. Při tomto ději, který se nazývá synereze neboli stárnutí, roste počet styčných bodů, síťovitá struktura se smršťuje a s ní i celý gel. Část disperzního prostředí je vytlačována a vyměšována ze struktury gelu [47]. Děj synereze je podporován zvýšením teploty a u mnohých gelů, ať už reverzibilních či ireverzibilních také přidávkem elektrolytu.

Elektrická vodivost a difuzivita

Elektrická vodivost gelových systémů, jejichž disperzní prostředí obsahuje disociované nízkomolekulární elektrolyty, zůstává téměř vždy stejně vysoká jako v solu, vzhledem k tomu, že malé molekuly a ionty rozpuštěných látek se pohybují v disperzním prostředí v prostorách mezi disperzním podílem téměř stejně rychle jako v odpovídajícím solu.

Taktěž difuzivita nízkomolekulárních látek v gelu je jen o něco málo menší, než v původním solu, z něhož gel vznikl. Tento fakt je dodržen i přesto, že při gelaci prudce vzrůstá viskozita soustavy. Díky síťovité struktuře není difuzivita nízkomolekulárních iontů

v gelech téměř ovlivňována prouděním ani tepelnými konvekcemi. Nerušená difúze v gelech umožňuje vznik tzv. *Liesegangových obrazců*. Jestliže do gelu, který obsahuje nějakou nízkomolekulární látku, difunduje další látka, která s ní může tvořit nerozpustnou sloučeninu, probíhá srážecí reakce jen v určitých zónách soustavy, které se střídají se zónami, v nichž se sraženina netvoří [39].

3.5 Difúzní procesy

3.5.1 Obecné principy difúze

Difúzi lze považovat za proces samovolného vyrovnávání koncentrací v prostředí obsahujícím koncentrační gradient. V podstatě se jedná o samovolný pohyb molekul či částic z jednoho místa na druhé v navenek nehybném prostředí. Tento mikroskopický transport částic je způsoben tzv. *Brownovým pohybem* [48]. Lze tvrdit, že pohyb každé molekuly je zcela nahodilý, čili částice se nepohybují po předem přesně daných trajektoriích. Toto tvrzení lze akceptovat pouze z pohledu mikroskopického měřítka. V pohledu makroskopickém lze pozorovat pouze pohyb částic (molekul) z prostředí s nižší koncentrací do prostředí s vyšší koncentrací [49].

Hlavní hnací silou difúzních procesů je rozdíl koncentrací transportované složky ve dvou místech. Spojením prvních dvou základních termodynamických zákonů vyplývá, že při konstantním tlaku a teplotě je změna Gibbsovy energie je rovna maximální práci (jiný typ práce než objemová) [49], kterou může vykonat jeden mol látky při transportu z místa s chemickým potenciálem μ do místa s chemickým potenciálem $\mu+d\mu$. V případě, že uvažujeme systém, ve kterém je chemický potenciál závislý na x (prostorová souřadnice), poté dostáváme rovnici (1) dle [50]:

$$dw = \left(\frac{\partial \mu}{\partial x} \right)_{p,T} dx, \quad (1)$$

pokud poté porovnáme výše uvedenou rovnici (1) s teoretickým předpokladem vyjádření práce:

$$dw = -Fdx, \quad (2)$$

kde symbol F představuje sílu, působící v opačném směru. Spojením dvou výše uvedených rovnic (1) a (2) lze tvrdit, že gradient chemického potenciálu při konstantním tlaku a teplotě, lze interpretovat jako sílu působící v opačném směru na 1 mol částic. Jelikož platí rovnice (3).

$$F = - \left(\frac{\partial \mu}{\partial x} \right)_{p,T} dx \quad (3)$$

Tato síla vyjadřuje spontánní tendenci částic k rozptýlení. Její podstata je podle druhého termodynamického zákona v tom, že chemický systém vždy zvyšuje svou entropii neboli míru neuspořádanosti, čímž dospěje ke stavu s nejnižší vnitřní energií [8].

Samotná rychlost difúzních procesů je přímo úměrná velikosti částic a naopak nepřímo závislá na odporu prostředí, ve kterém difúze probíhá. Dalšími aspekty, které ovlivňují průběh difúze, jsou samozřejmě tlak a teplota a v neposlední řadě také velikost transportovaných částic a viskozita. Obecně lze ale říci, že difúze je v porovnání s jinými molekulárními procesy méně teplotně závislá [17].

3.5.2 Fickovy zákony

Difúzní procesy jsou způsobeny neuspořádaným pohybem molekul, jak již bylo zmíněno výše. Stejně tak transport tepla kondukcí má základ ve stejném principu jako difúze. Souvislostí mezi těmito dvěma ději si poprvé všimnul německý fyzik Adolf Eugene Fick, který jako první položil základ a popsal elementárně princip difúze. Teoretické předpoklady difúze v isotropních mediích vychází z toho, že celkový jednorozměrný difúzní tok skrz jednotkovou plochu je přímo úměrný koncentračnímu gradientu dle rovnice (4) [49].

$$J_1 = A \cdot j_1 = A \cdot D_1 \cdot \frac{\partial c_1}{\partial x}, \quad (4)$$

symbol A představuje velikost plochy, přes kterou daná látka difunduje, symbol j_1 charakterizuje difúzní tok přes jednotkovou plochu, c_1 představuje molární koncentraci dané látky a konečně symbol x je vzdálenost. Koeficient D_1 charakterizuje míru mobility molekul v dané látce, často je označován jako *difúzní koeficient* nebo také *difuzivita*. Jedná se o velmi důležitý parametr v porovnávání difúzních procesů. Rozměrově se jedná o veličinu s jednotkou $\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$.

Pokud chceme mluvit o difúzních procesech, musíme si uvědomit, že při difúzi nedochází pouze k difúzi jedné látky (z koncentrovanějšího prostředí do méně koncentrovaného). Difúze se týká všech látek v systému, které se v daném systému mohou pohybovat. V tomto textu budou vždy uvedeny pouze rovnice pro jednu difundující látku, ovšem je potřeba si uvědomit, že tyto rovnice nepopisují celý systém. V případě, že uvažujeme systém s dvěma látkami, pro popis systému jsou tedy nezbytné dvě rovnice popisující difúzní tok, z nichž každá z nich popisuje difúzní tok jedné látky. Je nutné si uvědomit, že difúzní toky obou látek jsou vzájemně spřažené. Pokud existuje difúzní tok složky 1, způsobený jejím koncentračním gradientem, musí existovat i stejně velký difúzní tok složky 2, způsobený opačným koncentračním gradientem složky 2 oproti složce 1 [51]. Z tohoto důvodu je jedna rovnice popisující difúzní tok jedné látky v systému dostačující.

Difúzní procesy jsou popsány a charakterizovány základními difúzními zákony – Fickovy zákony. První Fickův zákon (FZ) lze popsat níže uvedenou rovnicí:

$$j_1 = -D_1 \cdot \text{grad } c_1. \quad (5)$$

Difúzní tok má v této rovnici charakter vektorové veličiny a odpovídá množství difundované látky přes jednotkovou plochu systému za jednotkový čas. Jednotkou difúzního toku je $\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$. Difúze probíhá proti směru koncentračního gradientu, z tohoto důvodu se na pravé straně rovnice (5) vyskytuje znaménko mínus.

V případě difúze, která probíhá ve směru jedné osy (stacionární difúze), lze rovnici (5) upravit do jednoduššího tvaru:

$$J_1 = -D_1 \cdot \frac{\partial c_1}{\partial x}, \quad (6)$$

hnačí silou v případě stacionární difúze, kterou popisuje rovnice (6) je koncentrační gradient pouze ve směru osy x .

K popisu nestacionární difúze velmi dobře poslouží *Druhý Fickův zákon*. Narozdíl od výše uvedeného Prvního Fickova zákona bere Druhý Fickův zákon v úvahu změnu koncentrace

v průběhu času [45]. V případě platnosti nezávislosti difúzního koeficientu na koncentraci, má Druhý Fickův zákon pro nestacionární difúzi tvar rovnice (7).

$$\frac{\partial c_1}{\partial t} = \text{div}(D_1 \cdot \text{grad } c_1) = D_1 \cdot \text{div grad } c_1. \quad (7)$$

Jako v případě rovnice (5), lze i výše uvedenou rovnici pro Druhý Fickův zákon zjednodušit v tom smyslu, že difúze probíhá pouze ve směru osy x .

$$\frac{\partial c_1}{\partial t} = D \cdot \frac{\partial^2 c_1}{\partial x^2}, \quad (8)$$

výše uvedená rovnice (8) je analogická k rovnici vedení tepla viz reference [52]. Proto při řešení velké většiny difúzních experimentů lze hledat analogii s problematikou vedení tepla, v případě, že jsou zadány počáteční a okrajové podmínky celého experimentu.

3.5.3 Jednoduché difúzní modely

Konkrétní řešení jednotlivých difúzních problémů je ve většině případů značně komplikované. Proto byla vytvořena databáze difúzních modelů řešících problematiku difúzních experimentů. Valnou většinu těchto modelů publikoval fyzik a matematik britského původu John Crank [53].

Jedny z nejjednodušších řešení difúzní problematiky se velmi často dva modely: model *difúze skrz tenký film* a model *volné difúze*. Zmíněné dva modely stojí na okrajích širokého spektra všech základních difúzních modelů.

Difúze skrz tenký film

Tento model předpokládá jednosměrnou difúzi ve směru osy x mezi dvěma dobře míchanými roztoky o různých koncentracích c_1 a c_2 skrz tenkou difúzní bariéru. Předpokladem pro tento model je fakt, že difúze probíhá dostatečně dlouhou dobu. Pokud jsou splněny výše uvedené podmínky pro tento model, lze tvrdit, že nedochází k akumulaci látky na fázovém rozhraní (tenká difúzní bariéra), lze tedy tvrdit, že nedochází v tenké difúzní bariéře k akumulaci difundované látky, tok látky do bariéry je tedy stejný, jako tok látky z bariéry. V tomto případě se tedy jedná o difúzi *ustálenou*. Druhý Fickův zákon poté přejde do tvaru rovnice (9).

$$0 = D \cdot \frac{\partial^2 c_1}{\partial x^2}, \quad (9)$$

difúzní koeficient D je v tomto případě konstantní. Následnými úpravami výše uvedené rovnice a zavedením okrajových podmínek $c_1 = c_{10}$ pro $x = 0$ a $c_1 = c_{1l}$ pro $x = l$ získáváme modifikovaný Druhý FZ ve tvaru (viz rovnice 10):

$$\frac{c_1 - c_{10}}{c_{1l} - c_{10}} = \frac{x}{l}. \quad (10)$$

Z rovnice (10) je patrné, že koncentrační profil ve filmu je lineární a závisí pouze na okrajových koncentracích a podmínkách a na tloušťce filmu l . Protože difúzní tok není časově závislý, celkové množství látky, transportované skrz tenkou vrstvu, roste s časem lineárně [55]. Rovnici (10) lze poté upravit do tvaru pro difúzní tok látky 1 tenkou difúzní bariérou.

Tato rovnice má poté tvar (11):

$$J_1 = -D_1 \cdot \frac{\partial c_1}{\partial x} = \frac{D_1}{l} \cdot (c_{10} - c_{1l}). \quad (11)$$

Volná difúze

V tomto difúzním modelu lze předpokládat difúzní proces, který začíná na rozhraní a částice difundují do „nekonečného“ prostoru. Difúzní prostor je tak dlouhý, že částice nedosáhnou jeho konce v měřeném čase.

Na počátku obsahuje médium konstantní koncentraci substance 1. Náhlým zvýšením její koncentrace na rozhraní dojde k vytvoření lokálního koncentračního gradientu a látka započne difúzi hlouběji do média. Změna koncentrace na rozhraní tedy způsobí vznik časově proměnného koncentračního profilu látky 1 v médiu. Cílem řešení problému je zjistit, jak se mění koncentrační profil difundující látky se změnou její koncentrace na rozhraní a s časem [55].

Řešení volné difúze lze získat z diferenciální rovnice (8) pro okrajové podmínky, uvedené níže:

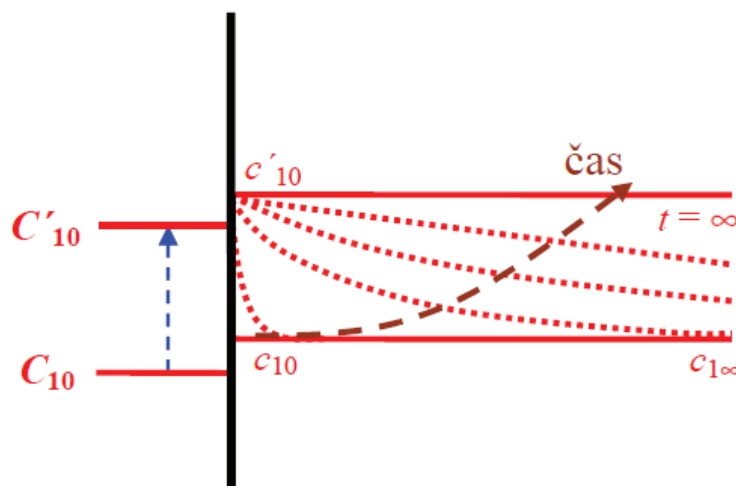
$t = 0$	všechna x	$c_1 = c_{1\infty}$
$t > 0$	$x = 0$	$c_1 = c_{10}$
	$x = \infty$	$c_1 = c_{1\infty}$

Matematickou úpravou Fickových zákonů lze poté získat následující rovnice (12) a (13) [53]

$$\frac{c_1 - c_{10}}{c_{1\infty} - c_{10}} = \operatorname{erf} \frac{x}{\sqrt{4D_1 t}} \quad (12)$$

$$j = \sqrt{\frac{D_1}{\pi \cdot t}} \cdot (c_{10} - c_{1\infty}) \cdot \exp\left(-\frac{x^2}{4 \cdot D_1 \cdot t}\right). \quad (13)$$

Z rovnice (13) je patrné, že difúzní tok charakterizující volnou difúzi je funkcí plochy a času. Narozdíl od difúze v tenkém filmu, kde zdvojnásobením hodnoty difúzního koeficientu vzroste difúzní tok dvakrát, v případě volné difúze dojde při zdvojnásobení difúzní koeficientu ke vzrůstu difúzního toku pouze na hodnotu $\sqrt{2}$ násobku.



Obrázek 9: Koncentrační profil pro případ volné difúze [8].

3.5.4 Složitější difúzní modely

Difúze s chemickou reakcí

Ve všech výše zmíněných případech bylo předpokládáno, že substance difundující do prostředí je v tomto prostředí chemicky inertní. Často ovšem dochází při difúzních experimentech k chemické reakci mezi difundující látkou a okolím. V případě difúze s chemickou reakcí je nutností vyjádřit časovou změnu koncentrace difundující látky 1 (14) [52].

$$\frac{\partial c_1}{\partial t} = -\frac{\partial j_1}{\partial x} + r_1. \quad (14)$$

Dosazením difúzního toku do rovnice (6) dostáváme tvar rovnice (15):

$$\frac{\partial c_1}{\partial t} = D_1 \cdot \frac{\partial^2 c_1}{\partial x^2} + r_1, \quad (15)$$

kde r_1 představuje rychlost zániku substance 1 (nebo vzniku látky 2) způsobeným chemickými reakcemi v daném systému, pokud uvažujeme jednotkový objem a proces trvající jednotku času. Zmíněná rychlost vzniku látky 2 či rychlost zániku látky 1 lze vyjádřit reakcí prvního řádu (např. vznik komplexů v gelech huminových kyselin) rovnicí (16).

$$r_1 = -\frac{\partial c_1}{\partial t} = \frac{\partial c_2}{\partial t} = k \cdot c_1, \quad (16)$$

kde k představuje rychlostní konstantu reakce prvního řádu. Dosazením za výraz r_1 do rovnice (14) získáváme následující rovnici (17)

$$\frac{\partial c_1}{\partial t} = D_1 \cdot \frac{\partial^2 c_1}{\partial x^2} - \frac{\partial c_2}{\partial t} = D_1 \cdot \frac{\partial^2 c_1}{\partial x^2} - k \cdot c_1. \quad (17)$$

Za předpokladu, že reakce, v jejímž důsledku dochází k imobilizaci difundující látky, probíhá velmi rychle v porovnání s rychlostí difúze, lze předpokládat vznik lokální rovnováhy mezi volnými a imobilizovanými frakcemi difundující látky

$$c_2 = K \cdot c_1. \quad (18)$$

Za tohoto předpokladu poté rovnice (17) přechází do následujícího tvaru

$$\frac{\partial c_1}{\partial t} = D \cdot \frac{\partial^2 c_1}{\partial x^2} - K \cdot \frac{\partial c_1}{\partial t}, \quad (19)$$

$$\frac{\partial c_1}{\partial t} = \frac{D}{K+1} \cdot \frac{\partial^2 c_1}{\partial x^2}, \quad (20)$$

což je obdoba rovnice druhého Fickového zákona pro difúzi. Substitucí za výraz $\frac{D}{K+1}$, získáváme vztah pro efektivní hodnotu difúzního koeficientu. Pod tímto pojmem se skrývá hodnota zdánlivého difúzního koeficientu, pod nímž je zahrnuta chemická reakce a jiné vlivy. Chemická reakce v tomto případě nemění matematický popis difúzních procesů, pouze upravuje velikost difúzního koeficientu.

3.5.5 Difúzní koeficient

I přes fakt, že stanovení přesné hodnoty difúzního koeficientu je poměrně náročné, co se týče přesnosti, lze pomocí některých vybraných difúzních technik stanovit difúzní koeficient s odchylkou od skutečné hodnoty v rozmezí 5 – 10 %. V této kapitole budou zmíněny některé z nenáročných a lehce realizovatelných difúzních technik, pomocí nichž lze stanovit difúzní koeficient. Budou zmíněny především ty metody, které se vyznačují nějakou specifickou vlastností či některými specifickými výhodami.

Co se týče analytické metody použité ke stanovení změny koncentrace, z které lze následně vypočítat rychlost difúze, difúzní koeficient aj. a tímto způsobem charakterizovat celý difúzní proces, tak jako nejvhodnější a nejelegantnější se jeví klasické spektrometrické či optické metody. S oblibou jsou tedy pro difúzní procesy používány substance, které jsou schopny absorbovat určitou část spektra. Přehledné review týkající se analytických metod používaných pro difúzní experimenty přináší reference [61] a [62].

Stanovení difúzního koeficientu metodou Stokesovy diafragmové cely

Zmíněná metoda se vyznačuje poměrně velkou přesností, v určitých případech se dá dosáhnout snížení relativní chyby až na hodnotu 0,2 %. Bezsporu další výhodou této metody je fakt, že se jedná o poměrně levnou metodu pro studium difúzních procesů, především z tohoto důvodu se jeví stanovení difúzního koeficientu metodou Stokesovy diafragmové cely jako běžná startovní metoda pro nástřelové experimenty týkající se ať již difúze kapalin či difúze plynů. Pravděpodobně největší nevýhodou této techniky se poměrně velká spotřeba difundujících roztoků skrz porézní přepážku.



Obrázek 10: Diafragmová difúzní cela (PermeGear, Inc.).

Jak je patrné z výše uvedeného obrázku 10, diafragmová difúzní cela obsahuje dvě oddělené komory, horizontálně uspořádané, které jsou běžně odděleny skleněnou fritou či porézní přepážkou s požadovaným vzorkem, přes který probíhá difúze kapalně či plynně látky. Každá z komor difúzní cely je naplněna roztokem o různé koncentraci (běžně se jedna komora plní koncentrovaným roztokem a druhá komora destilovanou vodou, aby gradient koncentrací

byl co nejvyšší). Vybranou analytickou metodou lze poté měřit změnu koncentrace v přijímací komoře (původně destilovaná voda) v určitém časovém horizontu. Difúzní koeficient lze poté vypočítat z následujícího vztahu (viz rovnice 21)

$$D = \frac{1}{\beta \cdot t} \ln \left[\frac{(c_{1, \text{zdrojová}} - c_{1, \text{přijímací}})_0}{(c_{1, \text{zdrojová}} - c_{1, \text{přijímací}})_t} \right], \quad (21)$$

kde symbol β představuje konstantu aparatury, jednotky jsou cm^{-2} a lze vypočítat pomocí níže uvedeného vztahu (rovnice 22) [8]

$$\beta = \frac{A \cdot \varepsilon}{l} \ln \left(\frac{1}{V_{\text{zdrojová}}} + \frac{1}{V_{\text{přijímací}}} \right), \quad (22)$$

kde A představuje plochu, přes kterou látka difunduje, ε značí rozdělovací koeficient na rozhraní, l je efektivní tloušťka membrány a V je celkový objem difúzní cely. Tato konstanta musí být stanovena experimentálně, protože výrazně závisí na vlastnostech membrány, jako je velikost pórů aj. Velmi vhodné se jeví použití menších pórů, jelikož při použití menších pórů se snižuje riziko konvekčního míchání v membráně. Na druhou stranu použití menších pórů sebou nese také několik nevýhod, pravděpodobně největší nevýhodou je doba experimentu. S použitím takto uspořádané difúzní cely se lze setkat například v referencích kolektivu autorů vedených A. Lakatosem [63] a [64].

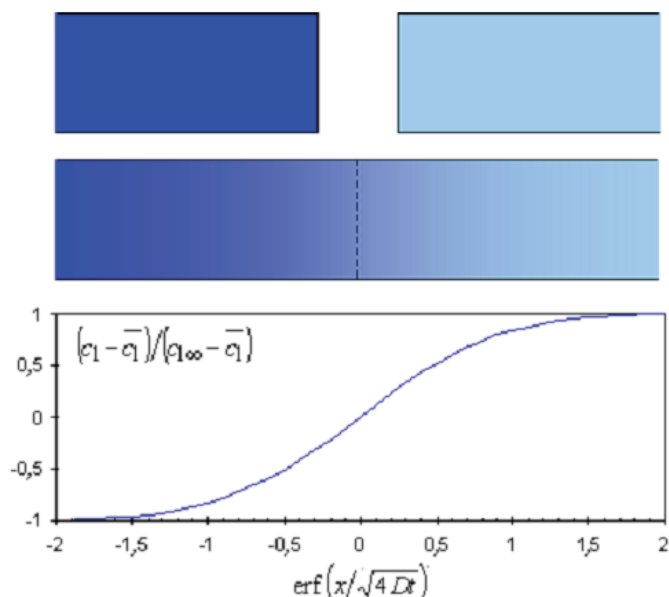
Metoda nekonečného páru

Tato metoda stanovení difúzního koeficientu je použitelná pouze pro pevné substance. Vzorek se skládá ze dvou částí, o různé koncentraci difundující látky. Velmi důležitým faktorem je teplota, která výrazným způsobem ovlivňuje rychlost difúze a z tohoto důvodu musí být udržována na konstantní hodnotě, stejně tak jako vzorek musí být co nejrychleji zahřán na teplotu experimentu. Na začátku experimentu jsou obě části spojeny tak, aby mohli probíhat samovolná difúze. Po námi zvoleném čase jsou květy (vyrobené z plastu či skla), ve kterých je umístěn vzorek rozpojeny a následně je změřen úbytek respektive nárůst koncentrace látky v různých polohách měřicí aparatury. Z tvaru koncentračního profilu numericky a z celkového množství transportovaného skrz rozhraní mezi vzorky analyticky je možné určit hodnotu difúzního koeficientu a tím pádem charakterizovat celý difúzní systém. Pro stanovení hodnoty difúzního koeficientu jsou zapotřebí následující vztahy:

$$\frac{c_1 - c_1}{c_\infty - c_1} = \text{erf} \frac{x}{\sqrt{4 \cdot D \cdot t}}, \quad (23)$$

$$n_1 = \frac{\sqrt{4 \cdot D \cdot t_0}}{\pi} \cdot (c_r - c_{1\infty}), \quad (24)$$

kde symbol $c_{1\infty}$ představuje původní koncentraci v přijímací části difúzní aparatury, c_r je konečná koncentrace na rozhraní (daná aritmetickým průměrem $c_1 - c_\infty$), n_1 je celkové množství transportované látky skrz rozhraní za určitý čas t_0 .



Obrázek 11: Metoda nekonečných difúzních párů

Metoda konstantního zdroje

Tato metoda stanovení difúzního koeficientu předpokládá, že dostatečně velké difúzní medium je v kontaktu se zdrojem difundující látky o neměnné (nevyčerpatelné) koncentraci c_0 . Jedná se o hojně využívanou metodu v praktických a technických úlohách. V praxi je princip neměnné koncentrace zajištěn například pravidelným přidáváním difundující látky do zdrojového roztoku. Například přídavek pevné látky do nasyceného roztoku elegantně zajistí fakt, že koncentrace zůstane vždy stejná (koncentrace nasyceného roztoku). Dalším předpokladem pro použití metody konstantního zdroje je fakt, že difundující látka v průběhu experimentu nedosáhne konce difúzního media.

Pro tuto difúzní metodu platí několik předpokladů a okrajových podmínek, které jsou uvedeny níže (viz tabulka 5).

Tabulka 5: Okrajové podmínky pro metodu konstantního zdroje

$t = 0$	$x > 0$	$c_1 = 0$
$t = 0$	$x = 0$	$c_1 = c_{10}$
$t > 0$	$x = 0$	$c_1 = c_{10}$

Následné řešení druhého FZ má v tomto případě následující tvar, který je uveden v rovnici (25).

$$\frac{c_1}{c_{10}} = \operatorname{erfc} \frac{x}{\sqrt{4 \cdot D \cdot t}} = 1 - \operatorname{erf} \frac{x}{\sqrt{4 \cdot D \cdot t}} \quad (25)$$

Celkové množství látky prošlé rozhraním za určitý čas t jednotkovou plochou lze poté vyjádřit rovnicí (26) jako

$$n_1 = 2 \cdot c_{10} \cdot \sqrt{\frac{D \cdot t}{\pi}} \quad (26)$$

Metoda okamžitého plošného zdroje

Použití této metody je následující: tenký film namočený v difúzním roztoku je nanesen na rovný povrch mezi dvě stejná difúzní prostředí. Příkladem této metody může být namočený filtrační papír v difúzním roztoku, který je vložen mezi dvě skleněné trubičky naplněné difúzním prostředím. V takovém případě je šířka počátečního pulzu velmi malá a proto má charakter *Diracovy funkce* [8]. Počáteční podmínky jsou tedy následující (viz tabulka 6):

Tabulka 6: Počáteční podmínky pro metodu okamžitého plošného zdroje

$t = 0$	$x = 0$	$c_1 = \frac{n_{\text{tot}}}{\delta(x) \cdot A}$
$t = 0$	$-\infty < x < \infty$	$c_1 = c_{10}$

Symbol n_{tot} představuje celkové látkové množství difundující látky ve zdroji na počátku experimentu, nejedná se tedy v tomto případě o difúzní tok. Po určité době t bude koncentrační profil dán při difúzi pouze v jednom směru následujícím vztahem (viz rovnice 27):

$$c_1 = \frac{n_{\text{tot}}}{A \cdot \sqrt{\pi \cdot D \cdot t}} \exp\left(-\frac{x^2}{4 \cdot D \cdot t}\right) \quad (27)$$

Při experimentálně stanoveném rozdělení koncentrace v čase t je možné vyhodnotit difúzní koeficient zlogaritmováním vztahu (27)

$$\ln c_1 = \ln \frac{n_{\text{tot}}}{A \cdot \sqrt{\pi \cdot D \cdot t}} - \frac{x^2}{4 \cdot D \cdot t} \quad (28)$$

Vynesáním $\ln c_1$ v závislosti na x^2 lze získat lineární závislost se směrnici $\text{tg } \alpha = \frac{D \cdot t}{4}$. Aby

bylo možné použít řešení pro nekonečný systém, musí být délka vzorku dostatečná na to, aby bylo množství difundující látky, které by se dostalo za konečný rozměr systému zanedbatelné vůči celkovému množství. Pokud jako zanedbatelné množství uvažujeme 0,1 % celkového množství, poté je nutné volit délku vzorku dle následující závislosti (viz rovnice 29)

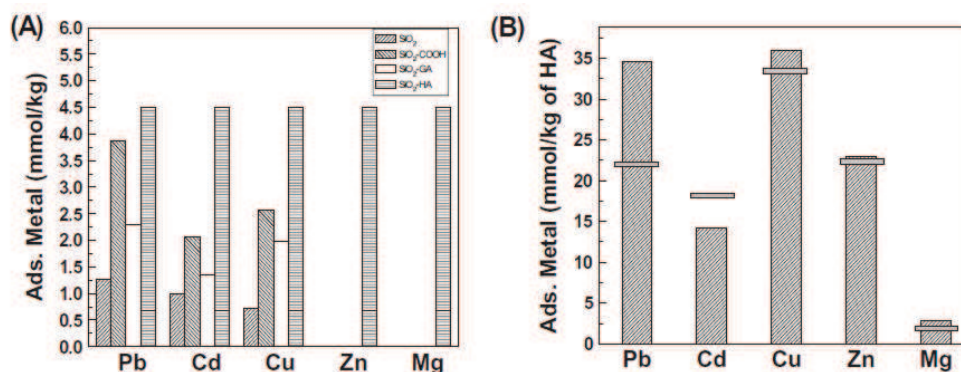
$$x' \approx 4 \cdot \sqrt{D \cdot t} \quad (29)$$

4 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

4.1 Interakce biopolymerů s polutanty

Rostoucí koncentrace polutantů – především iontů těžkých kovů – ve vodě a v půdě představuje zásadní riziko pro životní prostředí. Právě přípravky na bázi HL mohou v blízké budoucnosti představovat řešení, jak zmírnit následky znečišťování životního prostředí těmito polutanty. HL, konkrétně pak HK jako jedna z jejich frakcí, disponují vysokou afinitou vůči iontům těžkých kovů a celé řadě dalších toxických látek, čímž umožňují interakci s těmito polutanty a omezování jejich biologické aktivity.

Autoři práce [10] se ve své práci zabývali testováním sorpčních charakteristik tří materiálů na bázi oxidu křemičitého připravených imobilizací karboxylových respektive hydroxylových skupin. Sorpční charakteristiky těchto materiálů byly srovnávány taktéž s materiálem na bázi oxidu křemičitého s imobilizovanými HK. Sorpční schopnosti takto připravených materiálů byly zkoumány na základě sorpční kapacity vůči běžným vícemocným iontům kovů, konkrétně se jednalo o následující ionty: Pb^{2+} , Cd^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} a Mg^{2+} . Kovalentní imobilizace HK na skupiny oxidu křemičitého probíhala formováním amidových vazeb mezi aminovými skupinami (aminopropyl oxidu křemičitého) a karboxylovými skupinami přítomnými v HK.



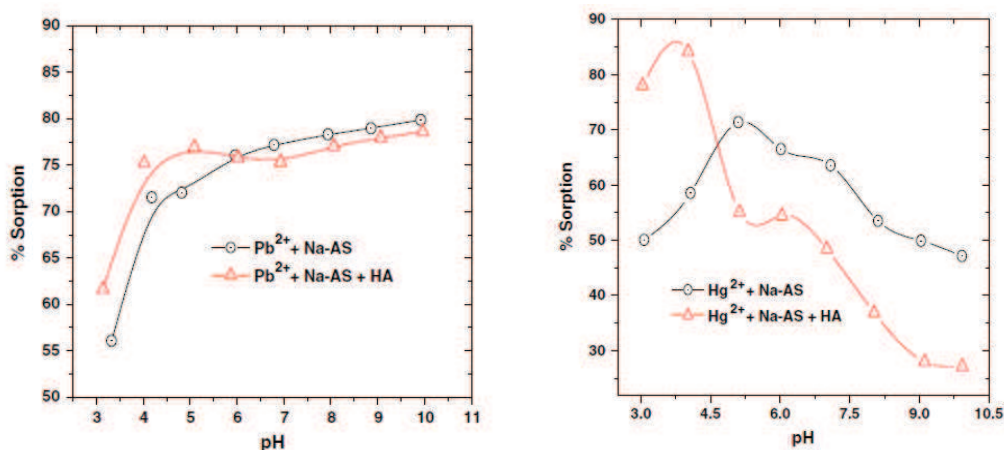
Obrázek 12: (A) Nasorbované množství iontů těžkých kovů (mmol/kg) na různě modifikované materiály na bázi oxidu křemičitého při $\text{pH}=7$. (B) Maximální množství iontů těžkých kovů (mmol/kg HK) sorbovaných na oxid křemičitý s imobilizovanými HK při $\text{pH}=7$. Horizontální sloupce představují srovnání v podobě výsledků experimentů uvedených v citované literatuře. [11].

Data prezentovaná v tomto článku potvrzují významný vliv HK na sorpční charakteristiky zkoumaných materiálů vůči iontům těžkých kovů. Sorpční charakteristiky materiálu na bázi oxidu křemičitého s imobilizovanými huminovými kyselinami vykazovaly několikanásobně vyšší sorpční kapacitu než v případě jiných materiálů.

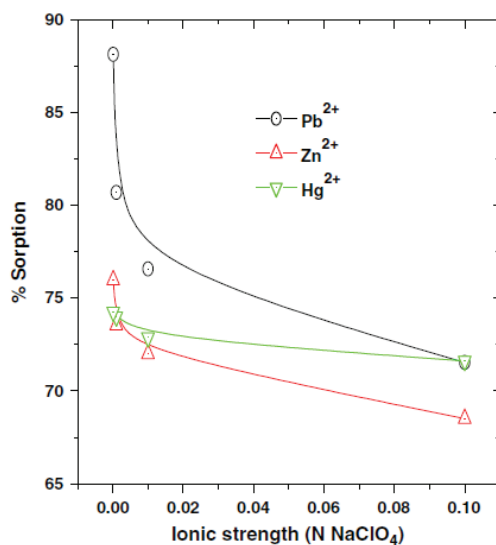
Jiná práce kolektivu autorů v čele se Singhem [14] se zabývala studiem sorpčních schopností aluminosilikátů v různém prostředí vůči kovovým iontům. Sorpční experimenty byly provedeny při absenci a v přítomnosti HK (Aldrich) při různých hodnotách pH . Sérií experimentů byl zjišťován vliv iontové síly, vliv iontů vápníku, jeho koncentrace a v neposlední řadě také vliv teploty na sorpční charakteristiku aluminosilikátů. Experimentálně bylo ověřeno, že obsah HK i charakter prostředí (experimenty prováděny při různém pH) hrají významnou roli při sorpci kovových iontů (Pb^{2+} , Zn^{2+} a Hg^{2+}) na modifikované aluminosilikáty. Při nižším pH ($\text{pH} < 6$) byl pozorován nárůst sorpční kapacity zkoumaného

materiálu v přítomnosti huminových kyselin. Sorpční charakteristiky zkoumaných materiálů byly stanovovány a porovnávány UV-VIS spektrometrií.

Uvedená studie deklaruje významný vliv HK na sorpci toxických kovů (například olovnaté nebo rtuťnaté ionty), což je patrné z níže uvedených grafických závislostí. Obrázek 13 zobrazující procento nasorbovaného množství rtuťnatých iontů v závislosti na hodnotě pH roztoku, ze kterých byly tyto ionty sorbovány, nejlépe vystihuje vliv HK. Při nízkém pH disponuje vzorek s přidavkem HK vysokou sorpční kapacitou na rozdíl od vzorku bez HK. V případě tohoto vzorku poté dochází k nárůstu sorpční kapacity s rostoucím pH (do určité hodnoty pH), na rozdíl od vzorku s přidavkem HK, u kterého se stoupající hodnotou pH dochází k poměrně výraznému poklesu nasorbovaného množství rtuťnatých iontů. Poslední grafická závislost zobrazuje vliv sorpční kapacity zkoumaného materiálu na iontové síle roztoku, ze kterého byly ionty sorbovány. Jak je patrné z tohoto grafu (viz obrázek 14), se stoupající hodnotou iontové síly, která byla regulována chloristanem sodným, dochází k výraznému poklesu nasorbovaného množství olovnatých iontů. Naopak v případě rtuťnatých iontů prakticky nedochází k ovlivnění sorpční kapacity zkoumaného materiálu vlivem iontové síly [14].

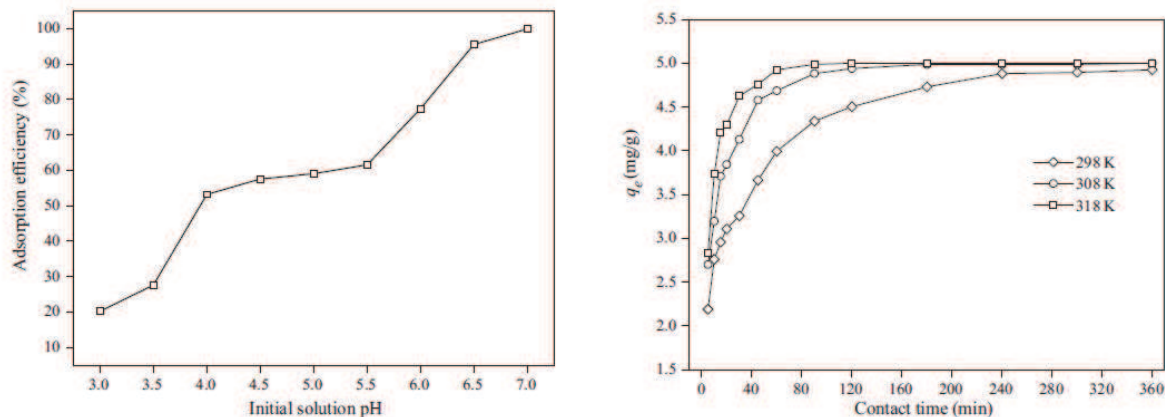


Obrázek 13: Sorpce olovnatých iontů (vlevo) a rtuťnatých iontů (vpravo) na vzorky aluminosilikátu při absenci a v přítomnosti huminových kyselin [14].



Obrázek 14: Vliv iontové síly na sorpční charakteristiku aluminosilikátů [14].

Autoři Lin, Zhan a Zhu se ve své práci [15] věnovali studiu sorpce měďnatých iontů z vodných roztoků na HK imobilizované na zeolity. Dospěli k závěru, že HK imobilizované na zeolity disponují vyšší sorpční kapacitou vůči měďnatým iontům než samotné zeolity (viz obrázek 15). Efektivita adsorpce Cu^{2+} iontů se zvyšuje s rostoucím pH v rozmezí od 3 do 7. Množství nasorbovaných iontů na zkoumané materiály bylo stanovováno AAS.



Obrázek 15: Vliv pH roztoku na efektivitu adsorpce měďnatých iontů na zeolity s imobilizovanými huminovými kyselinami (vlevo), vliv teploty na sorpci měďnatých iontů na zeolity s imobilizovanými huminovými kyselinami (vpravo) [15].

Další publikace kolektivu autorů v čele s Kwok [16] se zabývala sorpcí arsenitých sloučenin na chitosan. Chitosan se jeví jako vhodný nízkonákladový sorbent pro tyto sloučeniny. Hlavním cílem této publikace bylo zjištění vlivu přípravy roztoku chitosanu na sorpční charakteristiky tohoto materiálu. Studován byl především vliv pH roztoku chitosanu a v neposlední řadě také vliv teploty sorpce.

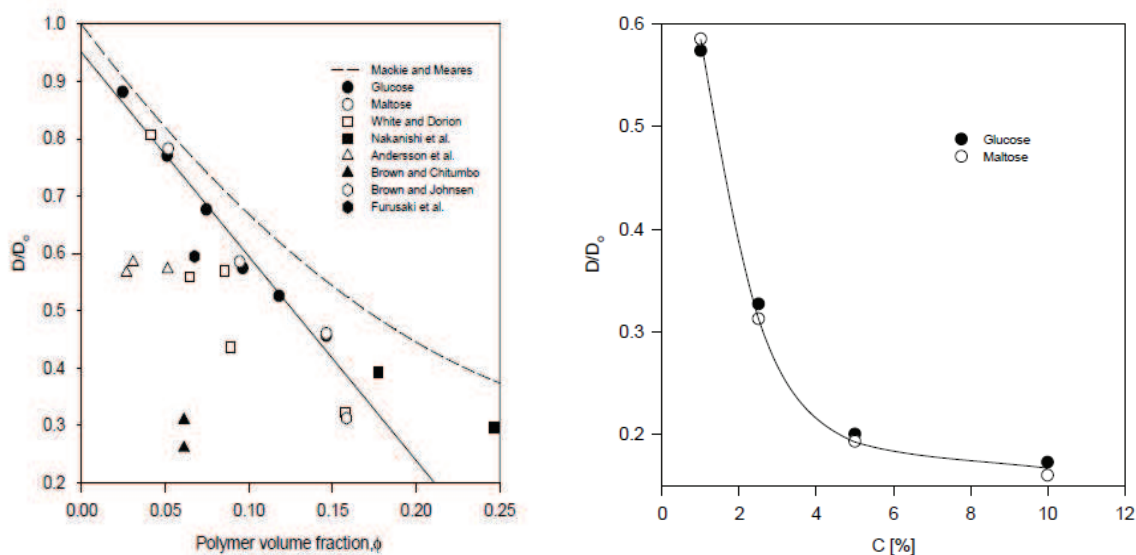
4.2 Difúze v gelových fázích

Gel představuje vhodné médium pro studium reaktivity různých látek, ať už přírodního či syntetického charakteru pomocí difúzních procesů. Velkou výhodou gelových disperzních soustav je fakt, že modifikací přípravy lze dosáhnout materiálu s přesně definovaným tvarem a velikostí, což je nezbytné pro matematický popis difúze a výběr vhodného modelu pro vyhodnocení difúzních experimentů.

Podrobnější popis difúzních experimentů v gelových fázích lze najít v celé řadě referencí [56] – [60]. V referenci [56] se autor zabývá studiem difúzních procesů, kde jako difundující médium bylo použito glukózy či maltózy v různě koncentrovaných polyakrylamidových gelech (PAAG). Pro studium těchto difúzních procesů byla použita metoda nestacionární difúze z konečného zdroje. Experimentálně bylo dokázáno, že hodnoty difúzních koeficientů v polyakrylamidových gelech poklesly oproti čisté vodě v rozmezí 15 – 85 hm. %. Autor tohoto článku také ověřoval vliv měnících se parametrů měření, jednalo se především o koncentraci monomeru, teplotu, iontovou sílu, koncentraci difundující substance, aj. Dosažené výsledky jsou shrnuty v následujících grafických závislostech.

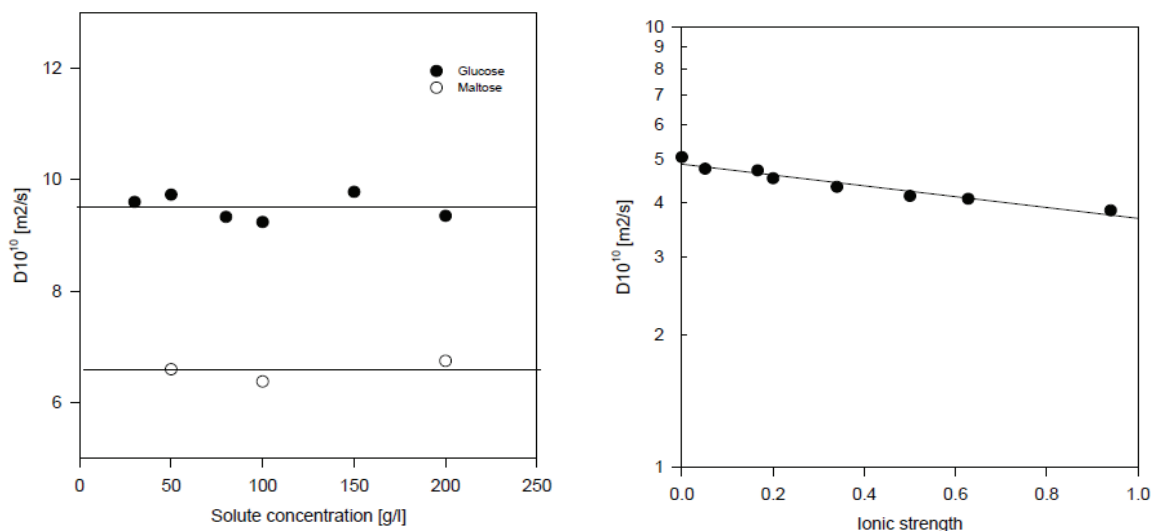
Z níže uvedených grafů (viz obrázek 16) je patrné, že hodnota difúzního koeficientu klesá s rostoucím obsahem monomeru v gelové fázi. Tento fakt může být vysvětlován tím, že s rostoucí koncentrací monomeru v gelové fázi dochází ke snižování velikosti pórů ve finálním gelu, stejně tak jako poklesem volného objemu v gelové fázi. Vliv síťovacího

oměru na hodnotu difúzního koeficientu byl studován v gelech o koncentraci 20 hm. % akrylamidu a síťovací poměry byly v rozmezí 1,0 – 10 %. Vliv na poměr difúzních koeficientů je patrný z výše uvedené grafické závislosti (vpravo), kde hodnota D_0 reprezentuje difúzní koeficient naměřený ve vodě při teplotě 60 °C. Jak je zřejmé z tohoto grafu (viz obrázek 16), difúzní koeficient poměrně prudce klesá s rostoucí hustotou síťování. Zajímavých výsledků bylo dosaženo při porovnání difúzních koeficientů v závislosti na síťovacím poměru pro maltózu a glukózu, pokles poměru D/D_0 byl pro obě zkoumané látky prakticky totožný.



Obrázek 16: Vliv procentuálního obsahu polymerní frakce (ϕ) (vlevo) resp. síťovacího poměru (vpravo) na difúzní koeficient [56].

Dalším aspektem, kteří autoři tohoto článku zkoumali byl vliv koncentrace glukózy či maltózy na hodnoty difúzního koeficientu. Z níže uvedeného grafu (obrázek 17) je patrné, že hodnota difúzního koeficientu je nezávislá na koncentraci glukózy či maltózy. Samozřejmě je nutné podotknout, že difúzní koeficient je nezávislý na koncentraci uvedených sacharidů pouze v měřeném rozsahu. Ověřování vlivu iontové síly na hodnotu difúzního koeficientu bylo prováděno při teplotě 25 °C. Další parametry měření byly následující; koncentrace monomeru byla ustanovena na hodnotě 20 hm. % a poměr síťování měl hodnotu 1 %. Změna iontové síly jednotlivých roztoků byla stanovována změnou pH roztoků použitím různých pufrů v rozmezí 3,0 – 7,0. Experimentálně dosažené výsledky jsou patrné z grafické závislosti na obrázku níže (viz obrázek 17). Se vzrůstající iontovou silou dochází k poklesu hodnot difúzního koeficientu. Tento pokles má lineární tendenci. Autor tohoto článku dosáhl následujících závěrů; hodnoty difúzního koeficientu jsou značně proměnné s měnícími se vlastnostmi připraveného vzorku.



Obrázek 17: Vliv koncentrace glukózy a maltózy v gelové fázi na difúzní koeficient (vlevo) a vliv změny iontové síly na hodnotu difúzního koeficientu (vpravo) [56].

V další zmiňované publikaci [57] se autoři zaměřili na studium efektivní hodnoty difúzního koeficientu proteinů. Studium efektivní hodnoty difúzního koeficientu bylo realizováno metodou difúzní cely pro vzorky lysozomu a BSA při různém pH a iontové síle. Jako nosné medium pro studium difuzivity proteinů byla zvolena agaróza.

Tabulka 7: Efektivní hodnota difúzního koeficientu ($m^2 \cdot s^{-1}$) pro lysozom a BSA při různém pH a různé iontové síle

protein	difúzní koeficient (10^{11}) ($m^2 \cdot s^{-1}$)		
	pH = 4	pH = 5,6	pH = 11
lysozom (nízká iontová síla)			
experiment 1	22,3	22,4	9,1
experiment 2	20,6	20,9	8,6
lysozom s 0,1 M chloridem sodným			
experiment 1	10,4	10,4	9,6
experiment 2	10,4	12,8	10,4
BSA (nízká iontová síla)			
experiment 1	4,8	6,5	4,7
experiment 2	5,0	6,1	6,4
BSA s 0,1 M chloridem sodným			
experiment 1	2,5	3,3	2,6
experiment 2	2,4	3,4	2,3

Jak je patrné z výše uvedené tabulky (viz tabulka 7), hodnoty difúzních koeficientů se značně liší s měnícími se parametry měření. Difúzní procesy skrz agarózové gely s přidavkem bílkovin (lysozom a BSA) jsou ovlivněny jak iontovou silou, tak také pH prostředí, ve kterém

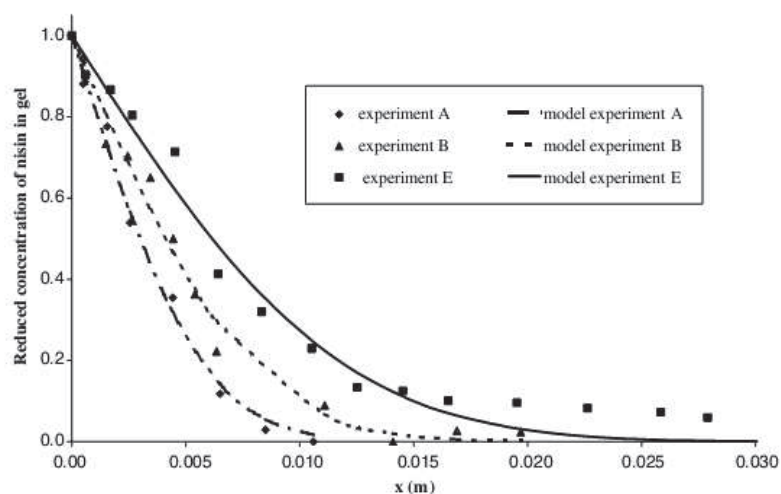
difúze probíhá. Autor publikace [57] také poukazuje na některé nevýhody stanovení difúzního koeficientu pomocí metody difúzní cely, především se pozastavuje nad tím, že experimenty s proteiny v difúzních celách jsou poměrně časově náročné, jako řešení navrhuje zautomatizování procesu.

Dalším kolektivem autorů, který se zabývá studiem difúzních procesů v agarózových gelech je kolektiv autorů v čele s I. Sebtí [58]. V této publikaci se autoři zaměřují na studium difúzního koeficientu pro nisin, což je polypeptid skládající se z 34 aminokyselin. Tato látka je produkována bakteriemi mléčného kvašení. Dalšími parametry, které byly studovány jsou především vliv teploty (v rozsahu 5,4 – 22,3 °C) a vliv koncentrace nisinu na probíhající difúzní procesy. Dosažené výsledky jsou sumarizovány v tabulce 8, z níž je především patrné, že s rostoucí teplotou dochází k výraznému nárůstu difúzního koeficientu.

Tabulka 8: Vypočtené hodnoty difúzního koeficientu pro nisin při různých teplotách ve 3 hm. % agarózovém gelu.

experimentální podmínky			difúzní koeficient ($\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$)	S	R^2
teplota (°C)	čas (dny)	koncentrace ($\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$)			
5,4	5,92	256	$1,92 \cdot 10^{-11}$	0,998	0,994
9,9	6,11	252	$3,52 \cdot 10^{-11}$	0,994	0,987
9,8	6,91	372	$3,27 \cdot 10^{-11}$	0,987	0,960
10,2	11,60	336	$3,74 \cdot 10^{-11}$	1,000	0,970
22,3	5,93	376	$8,14 \cdot 10^{-11}$	0,990	0,980

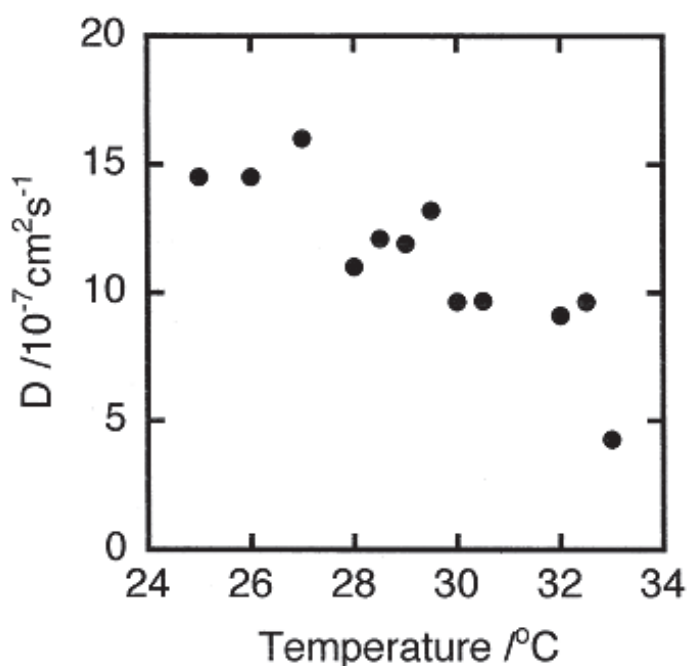
Symbol S představuje sklon experimentálně získané koncentrace oproti teoretické koncentrací, symbol R^2 symbolizuje koeficient spolehlivosti. Odlišnosti v hodnotách difúzních koeficientů mohou být jednoduše vysvětleny různou velikostí difundujících molekul a také odlišnostmi ve struktuře gelové matrix. Jak již bylo zmíněno výše, autoři tohoto článku se zaměřili také na studium teplotní závislosti difúzních procesů, což naznačuje níže uvedená grafická závislost (viz obrázek 18).



Obrázek 18: Teplotní závislost difúze nisinu v 3 hm. % agarózovém gelu (doba difúze 6 dnů)

Japonští autoři F. Tsunomori a H. Ushiki se ve své publikaci [60] zaměřili na studium difúzních procesů v závislosti na velikosti pórů difúzního media. Autoři v této publikaci uvádějí, že snižováním velikosti pórů dochází k poklesu difúzního koeficientu. V této práci byl také studován vliv teploty na difúzní procesy. Difúzní koeficienty byly vypočítávány z časové závislosti koncentračních profilů pro různé teploty. Experimentálně bylo dokázáno, že hodnota difúzního koeficientu klesala s určitou tendencí v závislosti na smršťovacím poměru, který je funkcí teploty. Jako difundující barvivo v těchto experimentech byl použit Rhodamin B, který je poměrně lehce rozpustný ve vodném prostředí, ale tvoří hydrofobní chromofor. Grafická závislost (viz obrázek 19) zobrazuje teplotní závislost difúzního koeficientu zkoumaného materiálu, kde jako barvivo byl použit Rhodamin B. Jak je patrné z tohoto grafu (viz obrázek 19), difúzní koeficienty lineárně klesají s rostoucí teplotou, což je způsobeno jediným měnícím se parametrem experimentů (viskozita).

Pokles difúzního koeficientu se stoupající teplotou je tedy v tomto případě způsoben právě změnou viskozity zkoumaného materiálu, ovšem dle Einstein-Stokova zákona by ovšem mělo docházet k lineárnímu nárůstu difúzního koeficientu s rostoucí teplotou, což ale u tohoto experimentu splněno není.



Obrázek 19: Teplotní závislost difúzního koeficientu pro Rhodamin B [60].

5 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

5.1 Použité chemikálie

hydroxid sodný, p.a., Penta Chrudim
kyselina chlorovodíková, 35 %, p.a., Lach–Ner s.r.o.
kyselina chlorovodíková PENTA 1 N c = 1 M
humínové kyseliny – popel 28,92 %, 2008
chitosan, Sigma Aldrich Inc.
agarosa, Sigma Aldrich Co., for routine use
methyloranž, Lachema
methylenová modř, Lachema
bromid draselný, Sigma Aldrich
silikonový olej
destilovaná voda

Humínové kyseliny byly izolovány metodou alkalické extrakce z jihomoravského lignitu (důl Mírov, lokalita Mikulčice). Jedná se o mírně upravenou proceduru, publikovanou Piccolem a Contem [71]; tato metoda extrakce byla použita v celé řadě předcházejících experimentů v rámci studia fyzikálně-chemických vlastností HK [8], [21], [46] a [72].

5.2 Použité přístroje a zařízení

Reometr AR-G2 Ta Instruments
FT-IR spektrometr Nicolet Impact 400
UV-VIS spektrometr Hitachi U-3300
UV-VIS spektrometr Varian Cary50
vpichová elektroda
difúzní cela PermeGear Inc.
sušárna Venticell
analyzátor vlhkosti Denver Instrument IR 35
analytické váhy Sealtec SBC 31
spektrofotometrické sondy, detektory, zdroje světla, software od společnosti Ocean Optics
magnetické míchačky Variomag Poly a Heidolph MR HEI-Standard
přenosný teploměr GMM 175 Greisinger
pH metr WTW pH 330
regulátor teploty Julabo a Haake DC5
ultrazvuk UCC 1 Ultrasonic Compaq Cleaner powersonic
automatický titrátor Titroline Alpha plus Schott
kombinovaný altimetr Metler Toledo SevenMulti s pH elektrodou a vodivostní sondou

5.3 Charakterizace používaných materiálů

5.3.1 Charakterizace biopolymerů

Následující kapitola je věnována základní charakterizaci hlavních materiálů, se kterými bylo pracováno, jednalo se především o biopolymerní sloučeniny (humínové kyseliny, chitosan a agaróza). Tyto biopolymery byly charakterizovány následujícími metodami: elementární analýzou, následně bylo provedeno několik typů titrací, v neposlední řadě byly

také biopolymery podrobeny měření infračervených spekter. Poslední metodou, která byla aplikovaná pouze na huminové kyseliny byla UV-VIS spektrometrie.

Elementární analýza biopolymerů

Všechny zmíněné biopolymerní sloučeniny, se kterými bylo pracováno byly analyzovány základními analytickými metodami, mezi než patří také elementární analýza. Elementární analýza huminových kyselin, chitosanu a agarózy byla provedena na CHNSO Mikroanalýzátoru Flash 1112, což je přístroj vyrobený firmou Carlo Erba. Měření bylo realizováno na Ústavu struktury a mechaniky hornin Akademie věd České republiky v Praze (ÚSMH AVČR).

Stanovení kyselosti biopolymerů

Titrace huminových kyselin byla jednou z dalších základních charakterizací vzorků, se kterými bylo pracováno, jelikož hlavním cílem tohoto experimentu bylo stanovení nejen celkové kyselosti vzorků huminových kyselin, ale také zdánlivé disociační konstanty a obsahu karboxylátových skupin. Každá z titrací HK byla realizovaná pomocí automatického titrátoru. Automatrikový titrátor byl propojen společně s kombinovaným multimetrem s počítačem, kde pomocí softwaru Hyperterminal a SevenMulti byly zaznamenávány naměřené hodnoty *pH* a vodivosti v určitých časových intervalech.

První titrací, které byl vzorek huminových kyselin podroben, byla titrace zpětná za použití 0,05 M kyseliny chlorovodíkové [70]. Vzorky HK byly připraveny následujícím způsobem: požadovaná navážka (100 mg) HK izolovaných z jihomoravského lignitu byla rozpuštěna v předem připraveném 0,01 M hydroxidu sodném o objemu 100 ml. Kvůli dokonalému rozpuštění HK v hydroxidu sodném byla daná směs ponechána na vícemístné míchačce po dobu minimálně 24 hodin. Následně byl roztok HK rozpuštěný v hydroxidu sodném titrován 0,05 M kyselinou chlorovodíkovou s konstantním přídatkem 0,05 ml v intervalu 30 s do finálního objemu kyseliny chlorovodíkové, který činil 30 ml. Každých 5 sekund byla zaznamenávána změna *pH* a vodivosti. Celkovou kyselost HK lze určit ze spotřeby titračního činidla pro titraci přebytku hydroxidu sodného a celkové spotřeby při vytitrování kyselých skupin HK.

Druhou titrací, kterou HK podstoupily, byla titrace přímá, kde jako titrační činidlo byl použit 0,05 M hydroxid sodný. Požadovaná navážka huminových kyselin (100 mg) byla suspendována ve 100 ml čisté destilované vody a následně umístěna na míchačku, kde byla míchána po dobu minimálně 24 hodin. Následující den byl roztok HK titrován 0,05 M hydroxidem sodným s konstantním přídatkem 0,05 ml, s intervalem přikapávání 2,5 minut. Celkový objem titračního činidla činil 30 ml. Opět byla pomocí kombinovaného multimetru, v časovém intervalu 30 vteřin zaznamenávána změna *pH* a vodivosti.

Poslední titrací, která byla provedena na vzorcích huminových kyselin, byla titrace karboxylátová [16] za použití 0,5 M octanu vápenatého. Navážka HK, která činila jako při každé titraci 100 mg byla převedena do Erlenmayerovy baňky a následně bylo přidáno 10 ml 0,5 M octanu vápenatého a 40 ml čisté destilované vody. Zároveň se vzorkem HK byl připraven slepý vzorek, což představovala směs 10 ml 0,5 M octanu vápenatého a 40 ml destilované vody. Oba připravené vzorky byly stejně jako v předešlých případech umístěny na vícemístnou míchačku, kde byly míchány po dobu 24 hodin. Následně byly oba roztoky přefiltrovány přes filtrační nálevku a promyty destilovanou vodou. Uvolněná kyselina octová

byla poté stanovována 0,1 M hydroxidem sodným s konstantním přídatkem hydroxidu 0,05 ml v časovém intervalu 30 vteřin. Změna vodivosti a pH byla snímána každých 30 vteřin. Karboxylátová kyselost je poměrně lehce zjištělná z rozdílu uvolněného množství kyseliny octové ve vzorku huminových kyselin a ve slepém vzorku (množství kyseliny v obou vzorcích odpovídá inflexnímu bodu na křivce pH nebo je jednoduše zjištělné ze spotřeby odpovídající hodnotě $pH = 9,8$).

Obdobným způsobem byl ztitrován také chitosan. Chitosan byl podroben titraci přímé, navážka chitosanu (100 mg) byla míchána po dobu 24 hodin na vícemístné míchačce Variomag Poly ve 100 ml destilované vody a po 24 hodinovém míchání byla tato suspenze titrována roztokem kyseliny chlorovodíkové o koncentraci 0,05 M. Experimentální nastavení bylo stejné jako v případě přímé titrace huminových kyselin. Následně byl prášek chitosanu podroben také titraci zpětné, kde jako titrační činidlo přebytku chlorovodíkové kyseliny byl použit 0,05 M roztok hydroxidu sodného. Vzorek pro titraci byl připraven následujícím způsobem, navážka chitosanu (100 mg) byla rozpuštěna v 0,01 M kyselině chlorovodíkové. Vzorek chitosanu v kyselině chlorovodíkové byl míchán po dobu 24 hodin na vícemístné míchačce.

Zpracované výsledky titrací jsou uvedeny a diskutovány v kapitole 6.1.2.

Spektrální charakterizace

Vibrační spektra práškových zbytků gelů, získaných vysušením v horkovzdušné sušárně při 50 °C po dobu tří dnů, byla měřena na FT-IR spektrometru Nicolet Impact 400 v tabletě, lisované ze směsi s čistým vyžíhaným bromidem draselným. V předchozích měřeních bylo ověřeno, že tento způsob úpravy vzorků nezpůsobuje takové nevratné chemické modifikace HK (dekarboxylace apod.), které by se mohly projevit změnou absorpce IČ záření.

Výše uvedeným způsobem byly připraveny vzorky agarózových gelů s přídatkem biopolymeru, následně byly tyto vzorky umístěny do sušárny při výše uvedených podmínkách. Po třídenním sušení byla sušina nadrcena následně smíchána s vyžíhaným bromidem draselným a poté měřena na přístroji Nicolet Impact 400, kde bylo nejprve vytvořeno pozadí pomocí zcela vyžíhaného bromidu draselného. Následně byla vytvořena směs bromidu draselného společně se zbytky sušiny vzorků huminových kyselin v poměru 3:1 a pomocí lisu byla vylišována transparentní tableta, která byla umístěna do přístroje, a následně bylo změřeno infračervené spektrum požadovaného vzorku. Obdobným způsobem byly připraveny i tablety pro ostatní vzorky, jednalo se o následující: 1 hm. % agarózový gel s různým přídatkem biopolymeru (HK a chitosan). Následně byly také připraveny koncentrovanější agarózové gely bez přídatku biopolymeru, konkrétně se jednalo o koncentrace 2 hm. % a 4 hm. %. Proměřeny byly také práškové vzorky biopolymerů (huminové kyseliny, chitosan a agaróza). Naměřená infračervená spektra, odlišnosti pro různé vzorky jsou sumarizovány a diskutovány v kapitole 6.1.3.

Jednou z dalších charakterizací HK je měření jejich UV-VIS spekter. Příprava vzorků pro měření UV-VIS spekter probíhala dle následujícího postupu: navážka 5 mg HK izolovaných z jihomoravského lignitu byla rozpuštěna v 50 ml hydroxidu sodného o koncentraci 0,1 M. Nutností při přípravě tohoto vzorku bylo, aby HK byly dokonale rozpuštěny v hydroxidu sodném, proto byl daný vzorek míchán po dobu 24 hodin na vícemístné míchačce Variomag Poly. Po dokonalém rozpuštění bylo změřeno UV-VIS spektrum v rozsahu 900 – 200 nm na UV-VIS spektrometru Hitachi U-3300, kde jako pozadí byl použit roztok, ve kterém byly

humínové kyseliny rozpuštěny, čili 0,1 M hydroxid sodný. Naměřená spektra jsou zobrazena a výsledky jsou diskutovány v kapitole 6.1.7. Charakterizace HK pomocí UV-VIS spektroskopie je jednou z mnoha metod, pomocí níž mohou být HK analyzovány. Jako další vhodné metody charakterizace se jeví například FT-IR, elementární analýza ...), více o základní charakterizaci huminových kyselin nabízejí následující dvě reference [68] a [69].

5.3.2 Charakterizace biopolymerních hydrogelů

Následující kapitola věnována charakterizaci samotných hydrogelů na bázi agarózy. Tyto hydrogely, stejně tak jako jejich sušiny byly charakterizovány běžně dostupnými analytickými metodami, jako jsou například infračervená spektroskopie viz kapitola 6.1.3 či stanovení sušících křivek jednotlivých hydrogelů s různou koncentrací biopolymeru (HK či chitosan) viz kapitola 6.1.6. Následně byla zjišťována velikost pórů v různě koncentrovaných agarózových gelech viz kapitola 6.1.5. Porovnávány byly také mechanické vlastnosti jednotlivých hydrogelů pomocí oscilačních testů, což jsou testy spadající do oboru reometrie viz kapitola 6.1.4.

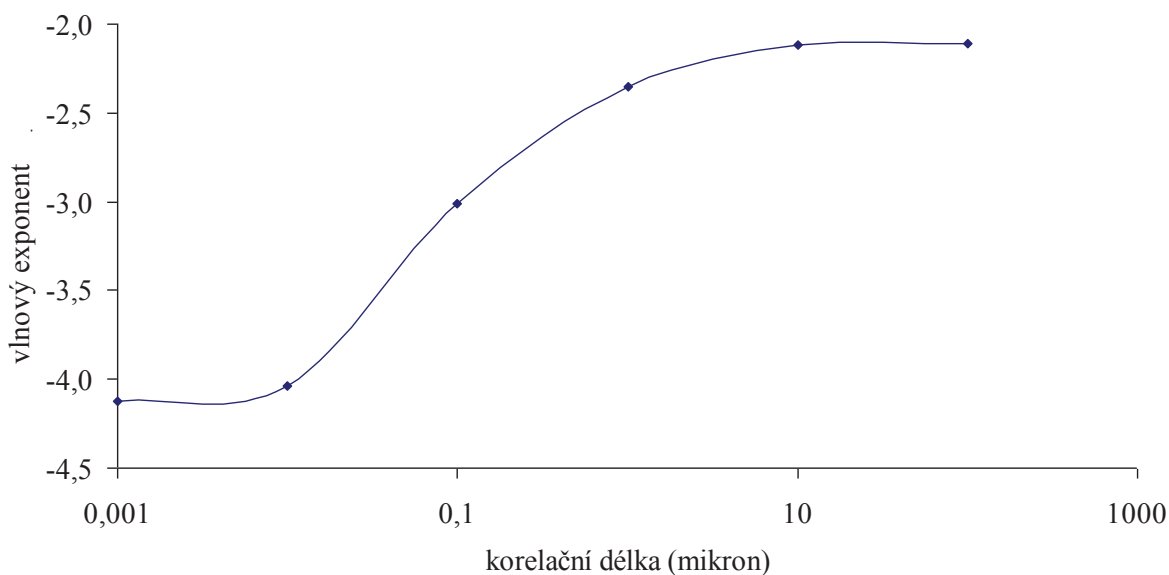
Infračervená spektrometrie hydrogelů na bázi agarózy

Příprava vzorků použitých pro měření infračervených spekter na infračerveném spektrometru s Fourierovou transformací je diskutována v kapitole 5.3.1. Infračervená spektra byla proměřena také u práškových biopolymerů, se kterými bylo pracováno, konkrétně se jedná o HK, chitosan a agarózu.

Stanovení velikosti pórů v agarózových gelech

Dalším typem charakterizace materiálu, s kterým bylo pracováno bylo stanovení velikosti pórů v agarózových gelech. Motivací k tomuto experimentu byl článek kolektivu singapurských autorů v čele s J. Narayanan [65], kteří se zabývali taktéž studiem velikosti pórů v různě koncentrovaných agarózových gelech. Celý experiment probíhal následovně: klasickým způsobem byly připraveny agarózové gely o různých koncentracích, konkrétně se jednalo o 1 hm.%, 2 hm.% a 4 hm.%. Tyto vzorky byly připraveny v plastových kyvetách. Následně byla změřena jejich absorpční spektra na přístroji UV-VIS spektrofotometru typu Hitachi v rozmezí 800 – 700 nm. Z naměřených absorbancí byla pomocí následujícího vzorce $\tau(\lambda) = 2,3A(\lambda)/L$ *turbidita*, jejíž logaritmus byl vynesena v závislosti na dekadickém logaritmu vlnové délky. Ze směrnice této přímky byl určen vlnový exponent, který je dle [66] závislý na korelační délce podle následující grafické závislosti (viz obrázek 20).

Korelační délka je poté přímo úměrná velikosti pórů. Naměřené a porovnané hodnoty jsou uvedeny diskutovány v kapitole 6.1.7.



Obrázek 20: Závislost vlnového exponentu na dekadickém logaritmu korelační délky [66].

Studium viskoelastických vlastností agarózových gelů

Nezbytnou charakterizací polotuhých hydrogelových forem, agarózových gelů nevyjímaje, jsou reometrická měření. Všechny zkoumané vzorky, koncentrační řada čistého agarózového gelu, tak také 1 hm. % agarózový gel s přidavkem různého množství daného biopolymeru byly charakterizovány na reometru typu AR-G2 TA Instrument pomocí jednoduchých oscilačních testů. Pro studium mechanických vlastností agarózových gelů byly použity dva typy oscilačních testů, konkrétně se jednalo o oscilační test s konstantní frekvencí a měnící se amplitudou napětí, tento test sloužil především pro určení oblasti lineární viskoelastivity (LVO). Druhým použitým testem byl test s konstantní amplitudou napětí (tato amplituda napětí musela být volena velmi obezřetně, vzhledem k tomu, aby nedošlo k úplné deformaci vzorku, musela amplituda napětí ležet v LVO) a měnící se frekvencí oscilací. Použitou geometrií pro studium viskoelastických vlastností agarózových gelů byl senzor typu deska/deska o průměru 40 mm.

Parametry pro první z řady jednoduchých oscilačních testů, pro test s konstantní frekvencí a měnící se amplitudou napětí byly následující: prvním krokem před měřením byla teplota a ekvilibrace vzorku po dobu 5 minut, následně byl spuštěn samotný test, jehož nastavení bylo: frekvence oscilací $f = 1$ Hz, rozsah amplitudy deformace $\gamma = 0,1 \% \dots 100 \%$. Normálová síla stlačování byla udržována pod hodnotou 2 N. Všechny experimenty byly prováděny při konstantní teplotě $T = 25$ °C. Celá aparatura byla chlazená průtokovým termostatem typu Haake DC5.

Oscilační testy s konstantní amplitudou napětí a měnící se frekvencí oscilací byly prováděny při amplitudě napětí 0,1 %, vzhledem k tomu, že tato amplituda napětí leží v oblasti lineární viskoelastivity, jak je patrné z níže uvedené grafické závislosti. Frekvenční oscilační test pro vzorky s různou koncentrací biopolymeru měl následující parametry, amplituda napětí $\gamma = 0,1 \%$, rozsah frekvencí $f = 0,1$ Hz ... 20 Hz (měřeno se sestupnou tendencí). Maximální hodnota normálové síly při stlačování vzorku $F = 2$ N a teplota měření, při které byly experimenty prováděny opět $T = 25$ °C (teplota zajištěna průtokovým termostatem typu Haake DC5).

Všechny zkoumané vzorky agarózových gelů byly charakterizovány paměťovým (elastickým) modulem $G'(\omega)$, ztrátovým (viskozním) modulem $G''(\omega)$, komplexní viskozitou $\eta^*(\omega)$ a v neposlední řadě také ztrátovým úhlem δ , který lze spočítat dle následující matematické rovnice (30):

$$\text{tg}(\delta) = G'' / G' \quad (30)$$

Sušení agarózových hydrogelů

Následující experiment se týkal především sušících charakteristik agarózových hydrogelů, se kterými bylo pracováno. Hlavním studovaným aspektem bylo, zda přidavek HK respektive chitosanu k 1 hm. % agarózovému gelu vyvolána markantní změnu v sušících charakteristikách (v síle hydratace gelu). Experiment byl prováděn následovně: do Petriho misky bylo dle klasického způsobu přípravy agarózových gelů připraveno po 10 ml od každého vzorku s lišící se koncentrací biopolymeru. Petriho miska byla přikryta hodinovým sklíčkem a gel tuhl po dobu 45 minut. Po dokonalém ztuhnutí byl gel opatrně vyjmut z Petriho misky a umístěn na hliníkovou formu do analyzátoru vlhkosti. Analyzátor vlhkosti byl propojen s počítačem a aktuální úbytek hmotnosti vzorku byl automaticky ukládán ve vhodně zvolených časových intervalech pomocí softwaru Hyperterminal. Sušící parametry byly následující: teplota sušení 105 °C, automatický konec sušení při dosažení konstantní hmotnosti po dobu 2 minut, interval ukládání: 30 vteřin. Experiment byl pro každý vzorek prováděn třikrát a výsledná data jsou průměrnou hodnotou z naměřených experimentálních dat. Získaná data byla poté následně vyhodnocována pomocí MS Excel, sumarizované výsledky jsou diskutovány v kapitole 6.1.6.

5.4 Příprava hydrogelových vzorků pro difúzní experimenty

5.4.1 Příprava agarózových gelů s přidavkem biopolymeru

Cílem přípravy agarózových gelů s přidavkem huminových kyselin bylo získat vhodné medium pro studium reaktivity biopolymerů, v tomto případě huminových kyselin. Vzhledem k tomu, že agaróza disponuje termoreverzibilní schopností gelace a současně má charakter neionogenního, chemicky téměř inertního materiálu (z hlediska afinity k iontovým sloučeninám), byla zvolena jako nosná polotuhá matrice pro inkorporaci huminových kyselin, které by dle teoretických studií měly výrazným způsobem ovlivňovat rychlost difúzních procesů.

Důležitou etapou experimentální části práce byla optimalizace přípravy agarózových gelů. Samotná příprava agarózových gelů použitých pro difúzní experimenty v difúzních celách byla realizována dle následujícího postupu: Difúzní experimenty s různým přidavkem huminových kyselin byly realizovány v 1 hm. % agarózovém gelu. Potřebné množství práškové agarózy (0,1 g) bylo kvantitativně převedeno do kádinky s 10 ml destilované vody. Následně byl celý systém zahříván na teplotu 85 °C až do úplného rozpuštění agarózy. Následně byl horký roztok vložen do ultrazvukové lázně na dobu jedné minuty. Tato procedura byla prováděna z toho důvodu, aby výsledná gelová fáze obsahovala co nejméně vzduchových bublin. Poté byl ještě horký roztok nalit do předem předehřáté plastové formy, která byla opatřena sklíčky, aby nedošlo ke zbytečnému odpařování roztoku a tím pádem zakoncentrovávání agarózového gelu a také z toho důvodu, aby se vytvořil hladký povrch

gelu, což je nezbytné pro experimentu. Následně byl gel ponechán k tunutí na vzduchu po minimální dobu 45 minut.

V případě přípravy agarózových gelů s různou koncentrací HK pro difúzi v kyvetách byla příprava gelů obdobná jen s nepatrnými modifikace. Stejně jako v případě vzorků pro difúzní celu, potřebné množství agarózy bylo rozpuštěno v přesně definovaném množství vody, následně byla agaróza rozpuštěna při teplotě 85 °C a kádinka se vzorkem umístěna do ultrazvuku. Poté byl horký roztok převeden do plastových kyvet a tunutí probíhalo opět volně na vzduchu bez přikrytí sklíčky. Po tunutí gelu, které trvalo minimálně 45 minut bylo skalpelem vytvořeno hladké, ostré rozhraní gelu, zarovnané s hranou kyvety.

Pro přípravu agarózových gelů s přídavkem HK musel být taktéž připraven zásobní roztok HK (humát sodný). Roztok humátu sodného byl připraven dle následujícího postupu. Potřebné množství HK bylo rozpuštěno v 0,5 M hydroxidu sodném. Požadovaná koncentrace humátu sodného byla 1 g·l⁻¹. 1 g HK byl rozpuštěn v 0,5 M hydroxidu sodném a po kompletním rozpuštění huminových kyselin bylo *pH* humátu sodného upraveno 0,5 M kyselinou chlorovodíkovou na konečnou hodnotu *pH* = 7. Roztok s upraveným *pH* byl následně doplněn destilovanou vodou na finální objem 1 litru. Tento roztok humátu sodného byl poté používán na přípravu agarózových gelů s různou koncentrací HK.

Obdobným způsobem byly připraveny také hydrogely s přídavkem druhého zkoumaného biopolymeru (chitosan).

5.4.2 Příprava difúzních experimentů v diafragmové difúzní cele

Tato kapitola přípravy difúzních experimentů v diafragmové difúzní cele plynule navazuje na kapitolu 5.4.1. Po dokonalém zgelovatění roztoku agarózy (přibližně 45 minut), byl gel ve formě umístěn mezi dvě komory difúzní cely. Styčné plochy hydrogelu a formy byly pečlivě namazány speciálním vakuovým tukem na zábrusy, který sloužil k tomu, aby difúze probíhala pouze skrz difúzní prostředí (hydrogel) a dané barvivo neprotékalo některou z neutěsněných děr. Následně byly obě difúzní komory opatrně spojeny tak, aby nedošlo k vypadnutí agarózového gelu z formy a spoj mezi těmito komorami byl omotán dvěma vrstvami parafilmu, opět z důvodu utěsnění celé soustavy. Do každé z komor difúzní cely byly umístěny magnetické míchadla a poté tato cela byla umístěna na vícemístnou míchačku typu, rychlost míchání byla nastavena na hodnotu 400 RPM. K vnějšímu plášti difúzní cely byl pomocí gumových hadic připojen zdroj proudící vody z chladiče, který byl nastaven na požadovanou teplotu (30, 40 či 50 °C). Teplota musela být striktně dodržována, vzhledem k tomu, že difúzní procesy jsou poměrně značně závislé na teplotě, při které daná difúze probíhá.

Ještě před započítím celého experimentu byly připraveny zásobní roztoky používaných barviv. V případě studia reaktivity a difuzivity skrz agarózové hydrogely s přídavkem HK bylo jako difundující medium použito barvivo methylenová modř a to z toho důvodu, že HK coby anionaktivní biopolymer a methylenová modř coby kationaktivní barvivo jsou schopny spolu interagovat, což tím pádem ovlivňovat i rychlost difúzních procesů a z naměřených rozdílů v hodnotách difúzních koeficientů lze usuzovat o reaktivitě HK. Zásobní roztok MB byl připraven následujícím způsobem: navážka 1 g methylenové modři (váženo přesností na 4 desetinná místa) byla kvantitativně převedena do odměrné baňky o objemu 1 litru, která byla naplněna 500 ml destilované vody. Následně byla odměrná baňka společně s navážkou MB umístěna na magnetickou míchačku, kde byl roztok míchán až do úplného rozpuštění

methylenové modři. Následně byl roztok MB doplněn destilovanou vodou na finální objem 1 litru, čímž byl získán požadovaný zásobní roztok methylenové modři o koncentraci $1 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$. V experimentech probíhajících v difúzní cele byla však koncentrace barviva MB pouze $0,01 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$. Proto všechny roztoky o požadovaných koncentracích byly připravovány ředěním ze zásobního roztoku MB o koncentraci $1 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$.

Pro difúzní experimenty s druhým zkoumaným biopolymerem, s chitosanem, což je kationaktivní biopolymer, bylo zvoleno jako vhodná difundující látka skrz difúzní medium methylenová oranž. Opět nejprve musel být připraven zásobní roztok MO, koncentrace byla totožná jako v případě MB a to $c = 1 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$. Příprava zásobního roztoku methyloranži se nepatrně lišila od přípravy methylenové modři, vzhledem k tomu, že MO se poměrně neochotně rozpouští ve studené vodě, musela být nejprve navážka (1 g) rozpuštěna ve vodě zahřáté na $60 \text{ }^\circ\text{C}$. Po absolutním rozpuštění MO v horké vodě byl objem roztoku doplněn na požadovaný finální objem v odměrné baňce. Roztok methylenové oranži musel být zfiltrován přes skládaný papírový filtr, vzhledem k tomu, že prášková methyloranž neobsahuje pouze čisté barvivo, ale obsahuje také některé nečistoty nerozpustné ve vodě, z tohoto důvodu byl tedy roztok MO zfiltrován a poté následně doplněn objem destilovanou vodou na hodnotu 1 l.

Po přípravě zásobního roztoků obou barviv mohl být započat experiment v difúzní cele. Do jedné z komor difúzní cely bylo nalito přesně definované množství roztoku barviva (60 ml) a současně s roztokem barviva byl do druhé komory nalit ekvivalentní objem destilované vody. Oba roztoky musí být do obou komor difúzní cely lity současně vzhledem k hydrostatickému tlaku kapaliny, který by mohl způsobit vypadnutí agarózového gelu ze své formy. Následně byla do komory s destilovanou vodou umístěna spektrometrická sonda napojená optickými vlákny na zdroj světla a detektor (vše od firmy Ocean Optics) a detektor byl spojen USB kabelem s počítačem. Komunikace s detektorem a převod dat do měřitelné podoby byla zajištěna programem Spectra Suite opět od firmy Ocean Optics. Před započátkem experimentu musel být zdroj světla zapnut přibližně hodinu před samotným experimentem, aby intenzita paprsku dosáhla maximální hodnoty. Po ponoření spektrometrické sondy do komory s destilovanou vodou byl pomocí zmíněného softwaru vybrán vhodný integrační čas (většinou se integrační čas pohyboval v rozmezí 3000 – 6000 ms) z toho důvodu, aby v měřeném spektru byly ideálně vidět všechny píky. Následně bylo změřeno spektrum čisté destilované vody (baselina) a poté spektrum s odpojeným detektorem, což by v ideálním případě mělo regulovat a celkově odstranit šum. Tímto způsobem bylo dokončeno prvotní nastavení experimentu. Pomocí zmíněného softwaru byly jednotlivé spektra ukládány v půlhodinových časových intervalech automaticky v textových souborech.

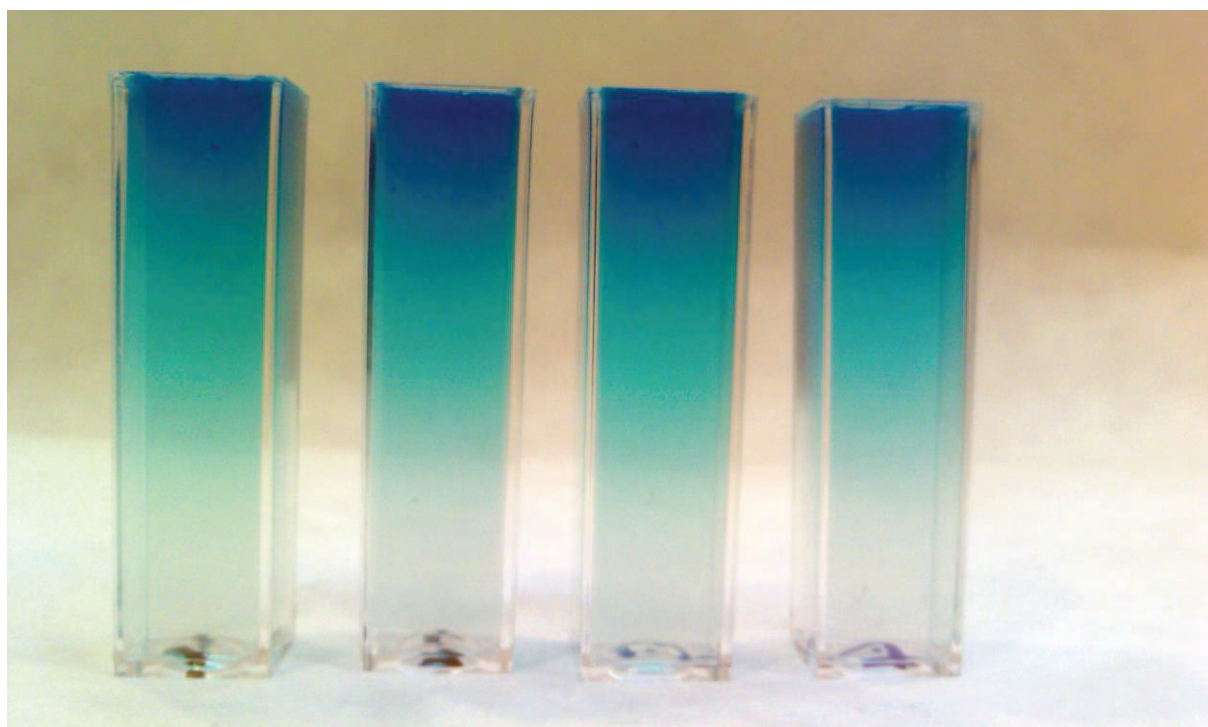
V nastavených časových intervalech (30 minut) byla ukládána spektra v rozsahu vlnových délek 200 – 1000 nm. Z nárůstu absorbance při maximu byl poté vypočítán difúzní koeficient, na stanovení a porovnání difúzních koeficientů pro jednotlivé zkoumané agarózové vzorky s různou koncentrací HK či chitosanu ve struktuře se zaměřuje kapitola 6.2. Textové soubory, ve kterých byla jednotlivá spektra v časovém intervalu ukládána byly převedeny do jednoho Excelu pomocí vytvořeného makra. Pro zpracování naměřených dat byly použity programy MS Excel a Origin.

5.4.3 Příprava difúzních experimentů v kyvetách

Agarózové gely s přísadkou biopolymeru byly připraveny totožným způsobem jako výše uvedené hydrogely. Po ukončení procesu tuhnutí bylo pomocí skalpelu vytvořeno rovné, ostré

rozhraní na hranách všech kyvet. Toto rozhraní bylo vytvořeno z toho důvodu, aby všechny difúzní procesy probíhaly do každé z kyvet stejným způsobem. Po vytvoření rozhraní byly kyvety s různou koncentrací chitosanu respektive HK ponořeny do roztoku MO respektive MM. Koncentrace barviva byla volena tak, aby finální absorbance dosahovala hodnoty $A = 1$, čili v případě MO byla jako vhodná koncentrace zvolena $0,0264 \text{ g}\cdot\text{l}$ a v případě MB byla koncentrace tohoto barviva ustanovena na hodnotě $0,01 \text{ g}\cdot\text{l}$. 500 ml barviva o výše uvedené koncentraci bylo nalito do skleněné nádoby, následně byly do roztoku barviva umístěny kyvety s agarózovými gely a skleněná nádoba byla opatřena víkem z toho důvodu, aby nedocházelo k odpařování barviva a tím i změně koncentraci daného barviva. Skleněné víko nádoby bylo omotáno parafínem z důvodu utěsnění celé soustavy. Takto připravený difúzní systém byl umístěn do předem předehřáté sušárny na danou teplotu. Difúzní experimenty v kyvetách byly prováděny při třech různých teplotách, konkrétně 30 , 40 a $50 \text{ }^\circ\text{C}$. Rychlost difúzních procesů byla stanovována UV-VIS spektrometricky na přístroji Varian. V různé výšce kyvety byla proměřena spektra v rozsahu vlnových délek $300 - 900 \text{ nm}$.

Kyvety s různým obsahem biopolymeru byly proměřeny v různých polohách pomocí polohovatelného nástavce (viz příloha). Následně byla absorbance pomocí kalibračních přímků převedena na koncentraci a byl vynesena graf závislosti koncentrace na vzdálenosti od rozhraní, ve kterém docházelo k difúzi.



Obrázek 21: Kyvety s agarózovým gelem po difúzi methylenové modři v čase 48 hodin.

6 DISKUZE A VÝSLEDKY

6.1 Charakterizace biopolymerních materiálů a agarózových hydrogelů

6.1.1 Elementární analýza

Jak je patrné již ze strukturních vzorců všech sloučenin, největší pozornost v elementární analýze musí být věnována především biogenním prvkům: kyslík, uhlík, vodík, vzhledem k tomu, že tyto prvky jsou nejvíce zastoupeny ve všech zkoumaných biopolymerních látkách.

Prvním vzorkem, který byl podroben elementární analýze, byl vzorek práškové agarózy, také od společnosti Sigma Aldrich. Vlhkost měřeného vzorku agarózy dosahovala hodnoty 2,58 hm. % a množství popela bylo 1,78 hm. %. Naměřené hodnoty zastoupení v atomových procentech pro jednotlivé prvky jsou uvedeny v tabulce 9.

Tabulka 9: Procentuální prvkové zastoupení ve vzorku agarózy v suchém bezpopelovém stavu.

prvek	kyslík	uhlík	vodík	síra	dusík
zastoupení [atom. %]	23,4	27,7	48,7	0,1	0,0

Měřený vzorek HK vykazuje typické prvkové složení pro HK izolované z jihomoravského lignitu [8], jak je patrné z přiložené tabulky 10. Vyšší zastoupení vodíku na úkor uhlíku ve struktuře huminových kyselin ve srovnání s jinými HK lignitického původu [16] indikuje menší aromaticitu huminových kyselin z jihomoravského lignitu. Huminové kyseliny byly také charakterizovány množstvím popela, který byl poměrně hojně zastoupen, vzhledem k tomu, že používané huminové kyseliny nebyly pročišťovány vodou. Konkrétní hodnota zastoupení popela činila 28,92 hm. % a vlhkost huminových kyselin dosahovala hodnoty 6,98 hm. %. Naměřené prvkové zastoupení pro huminové kyseliny izolované z jihomoravského lignitu je uvedeno v přiložené tabulce (viz tabulka 10).

Tabulka 10: Procentuální prvkové zastoupení ve vzorku HK v suchém bezpopelovém stavu.

prvek	kyslík	uhlík	vodík	síra	dusík
zastoupení [atom. %]	24,0	27,6	48,0	0,2	0,2

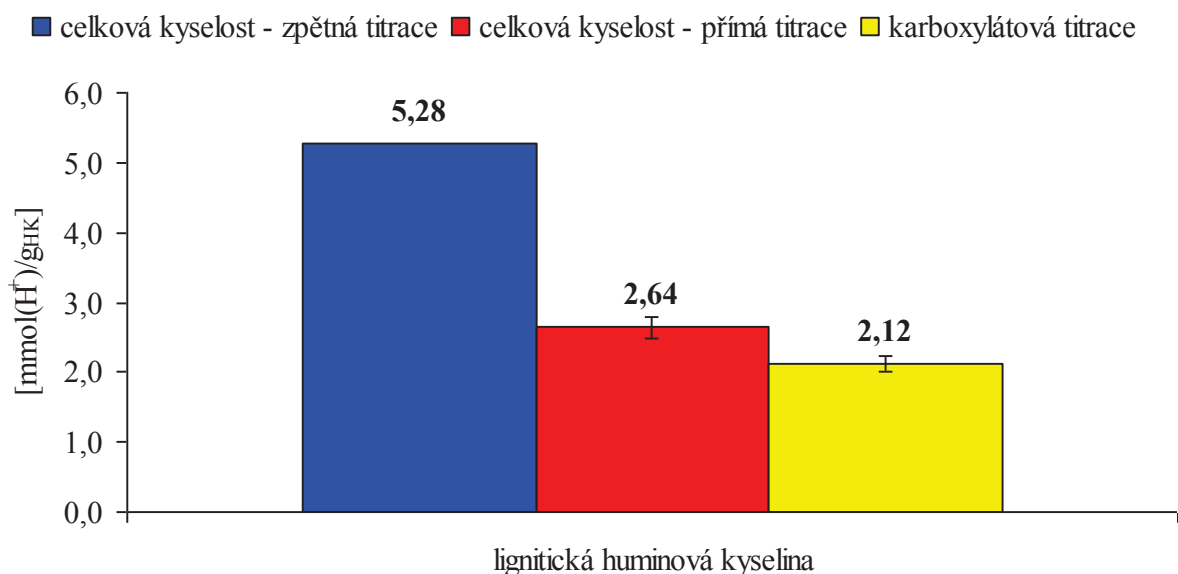
Následně byl elementární analýze podroben také vzorek chitosanu, experimentální provedení bylo prakticky totožné, jako v případě HK. Vlhkost používaného chitosanu od společnosti Sigma Aldrich dosahovala hodnoty 5,89 hm. % a množství popela přepočtené na hmotnostní procenta bylo 3,04 hm. %. Největší prvkové zastoupení v chitosanu má vodík, což je celkem logické, vzhledem k tomu, že chitosan ve své struktuře obsahuje velké množství amidových skupin. Konkrétní naměřené hodnoty atomových procent jsou uvedeny v tabulce 11.

Tabulka 11: Procentuální prvkové zastoupení ve vzorku chitosanu v suchém bezpopelovém stavu.

prvek	kyslík	uhlík	vodík	síra	dusík
zastoupení [atom. %]	16,8	26,9	52,1	0,00	4,2

6.1.2 Stanovení kyselosti biopolymerů

Na níže uvedených grafech je zobrazena vypočtená hodnota kyselosti používaných HK stanovovaná různými titracemi dle výše uvedených postupů. Pokud lze srovnat hodnotu celkové kyselosti s kyselostí karboxylátovou, lze tvrdit, že karboxylové skupiny ve struktuře HK jsou hlavními strůjci celkové kyselosti HK. Jelikož kyselost vypočtená z karboxylátové titrace dosahovala hodnoty 2,12 mmol H⁺ na gram HK, zatímco celková kyselost stanovená přímou titrací disponovala hodnotou 2,64 mmol H⁺ na gram HK. Lze tedy tvrdit, že přibližně 80 % celkové kyselosti HK je způsobeno přítomností COOH skupin v huminových kyselinách.

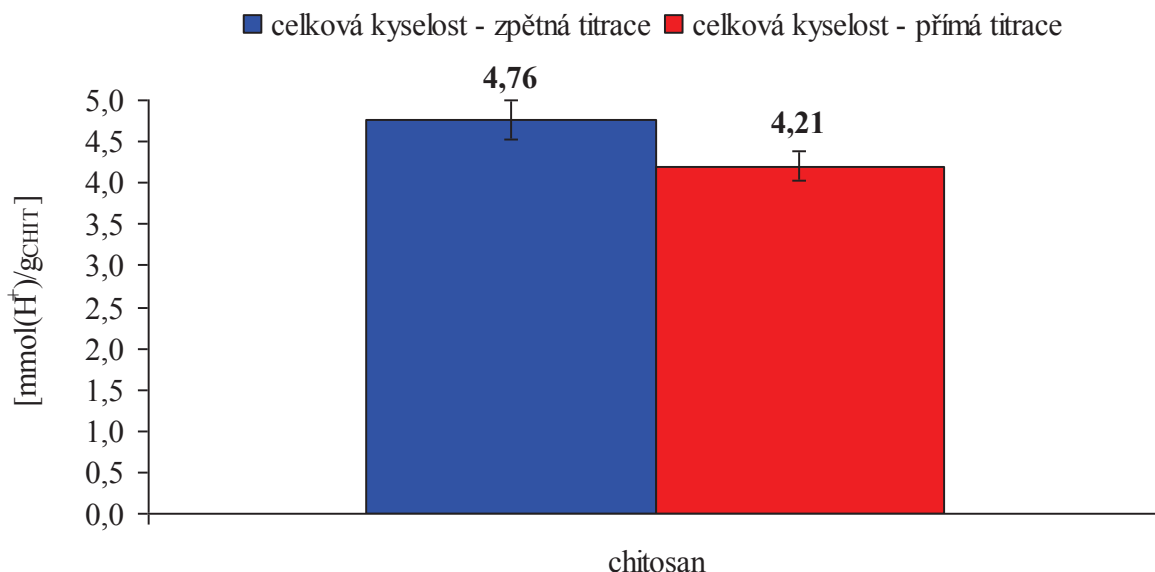


Obrázek 22: Vypočtená kyselost lignitických huminových kyselin.

Srovnání celkové kyselosti vypočtené ze zpětné titrace a celkové kyselosti získané přímou titrací je následující: celková kyselost získaná zpětnou titrací dosahuje hodnoty 5,28 mmol H⁺ na gram HK, zatímco jak již bylo zmíněno výše, celková kyselost získaná přímou titrací dosahuje pouze hodnoty 2,64 mmol H⁺ na gram HK. Jak je patrné z uvedených hodnot, celková kyselost získaná zpětnou titrací je přibližně dvakrát větší, než v případě celkové kyselosti získané přímou titrací, což lze vysvětlit tím, že při zpětné titraci dochází vlivem hydroxidu sodného k disociaci veškerých funkčních skupin (řetězce HK v alkalickém roztoku jsou natažené), zatímco v případě přímé titrace, kdy huminové kyseliny byly dispergovány pouze ve vodě v podobě sbalených klubek, jsou některé funkční skupiny nepřístupné titračnímu činidlu (skryté v polymerním klubku) a nelze je tedy stanovit přímou titrací.

V případě přímé titrace má klíčový vliv na výslednou kyselost rychlost přidavku činidla. Při pomalé titraci dochází v důsledku postupné disociace kyselých skupin k napřimování řetězců HK. Při dostatečně pomalé titraci by se takto stanovená výsledná kyselost měla přiblížit hodnotě celkové kyselosti stanovené nepřímou metodou. Naopak při rychlejší přidavku titračního činidla jsou u přímé titrace přednostně disociovány kyselé skupiny na povrchu polymerního klubka. Rozdíl mezi výsledky přímé a nepřímé titrace poté poskytuje zajímavou informaci o tvaru polymerního klubka HK ve vodné suspenzi. Pro podrobnější charakterizaci distribuce kyselých funkčních skupin mezi povrchem a vnitřním objemem klubka použitého

vzorku by proto bylo vhodné přímou titrací zopakovat pro více různých rychlostí přidavků titračního činidla.



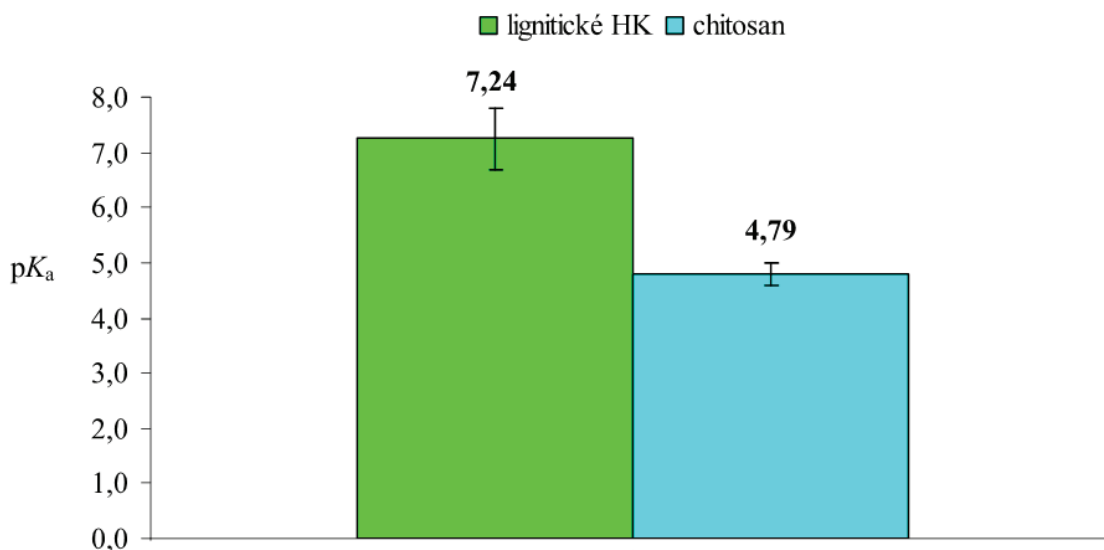
Obrázek 23: Vypočtená celková kyselost chitosanu získaná zpětnou a přímou titrací.

Na výše uvedeném grafu (obrázek 23) jsou zobrazeny vypočtené hodnoty kyselosti pro další používaný biopolymer – chitosan. Celková kyselost chitosanu byla opět stanovována pomocí zpětné respektive přímé titrace. Rozdíly ve vypočtených hodnotách celkové kyselosti nejsou tak markantní jako v případě HK, v obou případech se celkové kyselosti lišily přibližně o 10 %. Tento rozdíl je pravděpodobně způsoben tím, že u chitosanu není tak složitá konformace jako v případě HK, lze tedy tvrdit, že všechny amidové skupiny jsou přístupné i při přímé titraci. Nabízí se také další vysvětlení, tento rozdíl může být způsoben značnými odlišnostmi v hodnotách izoelektrických bodů chitosanu a huminových kyselin. Pokud bychom měli srovnat celkovou kyselost HK a chitosanu pomocí zpětné titrace, tak je patrné, že HK disponují vyšší kyselostí, než v případě chitosanu.

Dále byla pomocí titračních metod zjištěna také hodnota zdánlivé disociační konstanty (rovnice 31 a 32) pro jednotlivé biopolymery, což zobrazuje níže uvedený graf (viz obrázek 24). Jak je patrné z tohoto grafu, HK disponují vyšší hodnotou pK_a konstanty, což je očekávaný výsledek. V případě HK dosahovalo pK_a hodnoty 7,2, zatímco u chitosanu měla hodnotu pouze 4,8. Použité HK se chovají jako slabá kyseliny, disociace nastává při pH v neutrální a zásadité oblasti. Naproti tomu bazické skupiny chitosanu disociují při pH nižším než cca 4. Tabelovaná hodnota pK_a pro chitosan je 6,5.

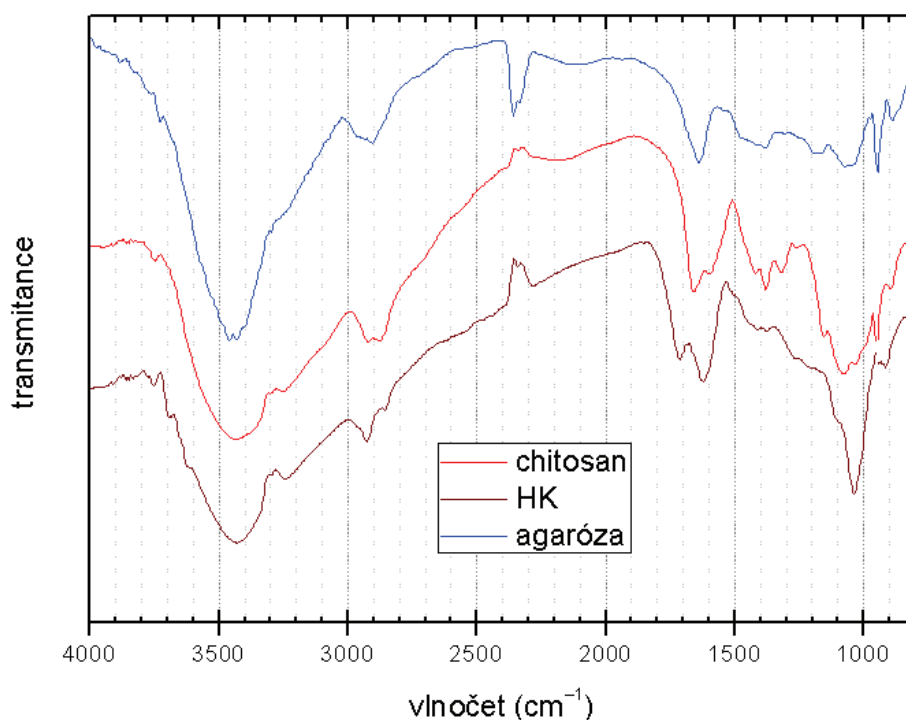
$$pH = pK_{app} - n \log \frac{\alpha}{1 - \alpha} \quad (31)$$

$$\alpha = \frac{c_{NaOH} \cdot V_{NaOH} + [H^+]}{b_c \cdot g_{HA}} \cdot (V_{susp} + V_{NaOH}) \quad (32)$$



Obrázek 24: Vypočtené hodnoty zdánlivé disociační konstanty pro lignitické HK a chitosan.

6.1.3 Infračervená spektroskopie biopolymerů a sušín agarózových gelů



Obrázek 25: Infračervená spektra pro používané biopolymerní sloučeniny.

Výše uvedený graf (viz obrázek 25) zobrazuje infračervená spektra pro všechny zkoumané biopolymery (agaróza, huminové kyseliny, chitosanu). Zobrazené infračervené spektrum pro chitosan lze popsat následovně. Široký pít v rozmezí $3\ 600$ až $3\ 100\ \text{cm}^{-1}$ je indikuje přítomnost $-\text{OH}$ skupin, následně pík v rozmezí vlnových délek $3\ 000$ až $2\ 850\ \text{cm}^{-1}$

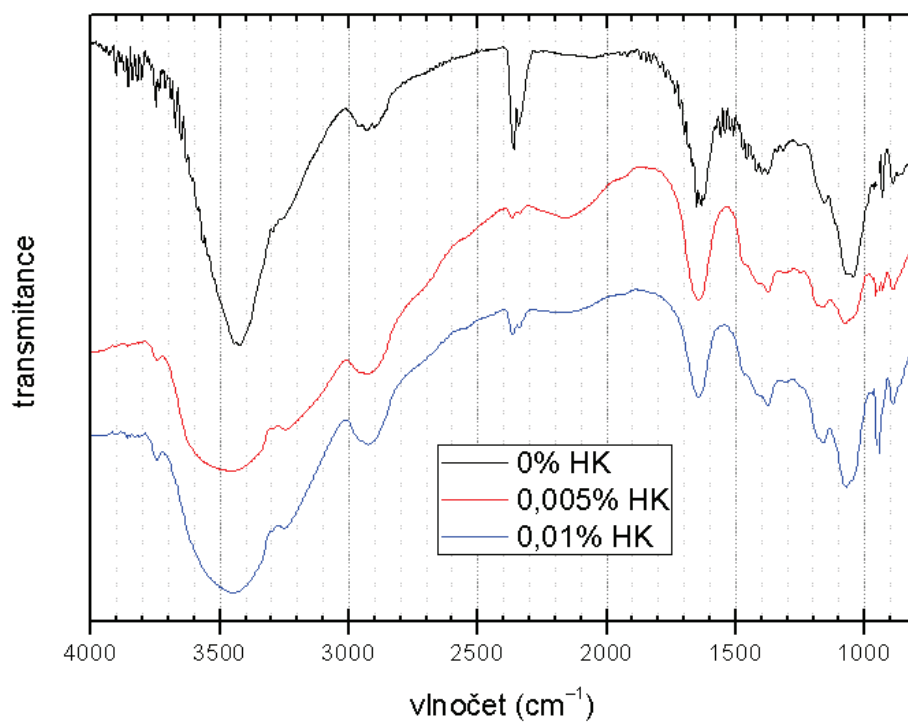
charakterizuje přítomnost alifatických skupin C–H. Pík při vlnočtu $1\,650\text{ cm}^{-1}$ reprezentuje acetylované amino skupin pocházející z chitinu, z čehož lze usuzovat, že zkoumaný vzorek chitosanu není zcela deacetylován. Jeden z posledních reprodukovatelných píků je v rozsahu vlnočtů $1\,200$ až $1\,000\text{ cm}^{-1}$, který je charakteristický pro primární aminové skupiny.

Další infračervené spektrum HK (viz obrázek 25) vykazuje typický průběh pro lignitické HK. Ostré úzké pásy nad $3\,500\text{ cm}^{-1}$ odpovídají absorpci anorganických –OH skupin, vázaných v jílové složce popela. Široký oblý pás v oblasti $3\,500$ až $3\,000\text{ cm}^{-1}$ je charakteristický pro materiály s vysokým obsahem –OH skupin. Ve spektrální oblasti kolem $2\,900\text{ cm}^{-1}$ se nachází typický dublet, který odpovídá valenčním vibracím alifatických skupin –CH₂– a –CH₃, které v HK charakterizují především obsah lipidických struktur. Široký slabý pás kolem $2\,530\text{ cm}^{-1}$ charakterizuje absorpci vodíku v karboxylových skupinách silně poutaných H– můstky a je jedním z důležitých vodítek při posuzování disociace těchto skupin. Ve spektru HK je v této oblasti patrný dublet pásů při $1\,710$ a $1\,600\text{ cm}^{-1}$; pás při $1\,710\text{ cm}^{-1}$ odpovídá absorpci –C=O nedisociovaných karboxylových skupin, absorpce kolem $1\,600\text{ cm}^{-1}$ náleží konjugovaným ketonům, fenolovým –OH skupinám a disociovaným karboxylátům. V oblasti pod $1\,500\text{ cm}^{-1}$ se nachází slabší pásy absorpce alifatických a ligninových struktur. Další pás okolo $1\,280\text{ cm}^{-1}$ opět odpovídá nedisociovaným –COOH skupinám a ostrý pík okolo $1\,050\text{ cm}^{-1}$ náleží –C–O–C– etherovým a esterovým můstkům a sacharidovým –OH skupinám. V této oblasti absorbují také hydroxidové skupiny minerálních nečistot (popela). Posledními dvěma interpretovatelnými pásy jsou úzký pík okolo 910 cm^{-1} (zde absorbují jednak dimery nedisociovaných karboxylových skupin, ale také –OH skupiny minerálních složek – jílu) a pík okolo 670 cm^{-1} , který odpovídá absorpci aromatických benzenových jader.

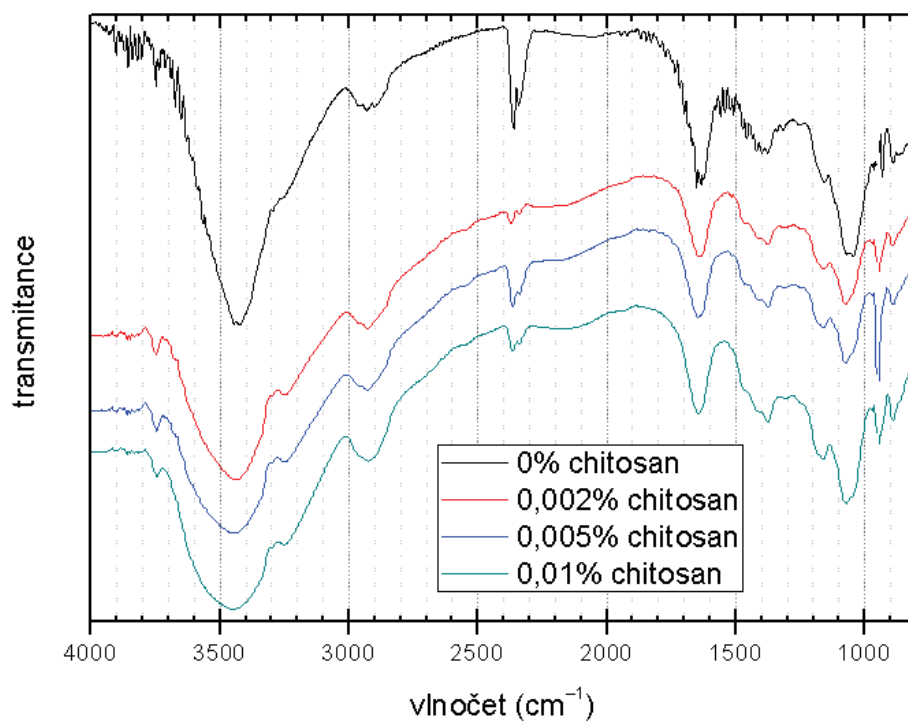
Posledním zobrazeným spektrem je infračervené spektrum práškové agarózy (viz obrázek 25). Široký oblý pás kolem $3\,500\text{ cm}^{-1}$ je opět typický pro –OH skupiny. Pík při $2\,900\text{ cm}^{-1}$ představuje vibrace alifatických skupin –CH₂– a –CH₃. Pík při $2\,400\text{ cm}^{-1}$ nepředstavuje žádné relevantní skupiny, jelikož se jedná o pík charakterizující plynný oxid uhličitý. Dalším reprodukovatelným píkem je spektrální oblast při vlnočtu $1\,100\text{ cm}^{-1}$, která představuje vibrace skupiny C–O. Posledním reprodukovatelným píkem je pík pod $1\,000\text{ cm}^{-1}$, který charakterizuje přítomnost 3,6-anhydrogalaktózy.

Další naměřená infračervená spektra agarózových gelů s přidavkem biopolymeru jsou shrnuta na grafických závislostech uvedených níže (viz obrázek 26 a 27). Ze srovnání těchto spekter je patrné, že s rostoucí koncentrací biopolymeru (HK) dochází k rozšiřování pásu ve spektrální oblasti okolo $3\,500\text{ cm}^{-1}$, který je charakteristický pro –OH. Žádné jiné zřetelné odlišnosti v jednotlivých spektrech nejsou pozorovány, což je pravděpodobně způsobeno tím, že přidavek huminových kyselin k 1 hm. % agarózovému gelu byl velmi malý, vzhledem k tomu, že maximální koncentrace HK v agarózovém gelu byla pouze 0,01 hm. %.

Ani v případě přidavku dalšího biopolymeru (chitosan) nebyl pozorován žádný markantní rozdíl v naměřených infračervených spektrech. Jediný rozdíl je stejně jako v případě huminových kyselin pozorovatelný ve spektrální oblasti kolem $3\,500\text{ cm}^{-1}$, kde dochází k rozšíření tohoto spektrálního pásu charakteristického pro –OH.



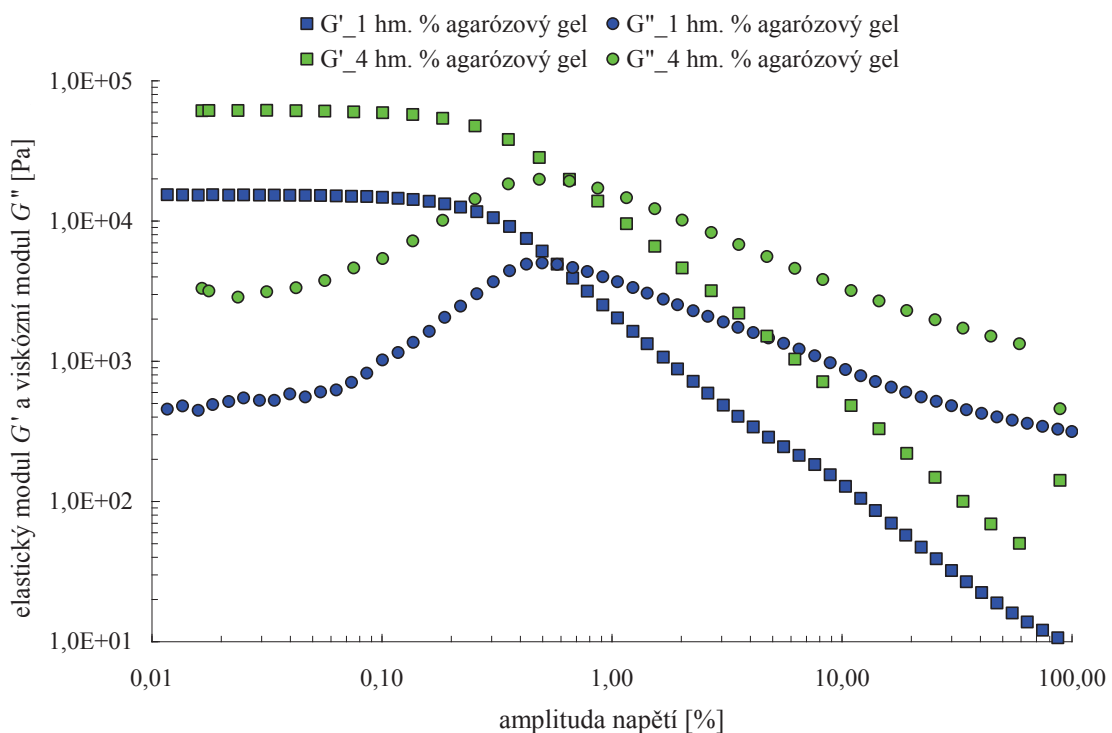
Obrázek 26: Infračervená spektra pro 1 hm. % agarózový gel s přidavkem HK.



Obrázek 27: Infračervená spektra pro 1 hm. % agarózový gel s přidavkem chitosanu.

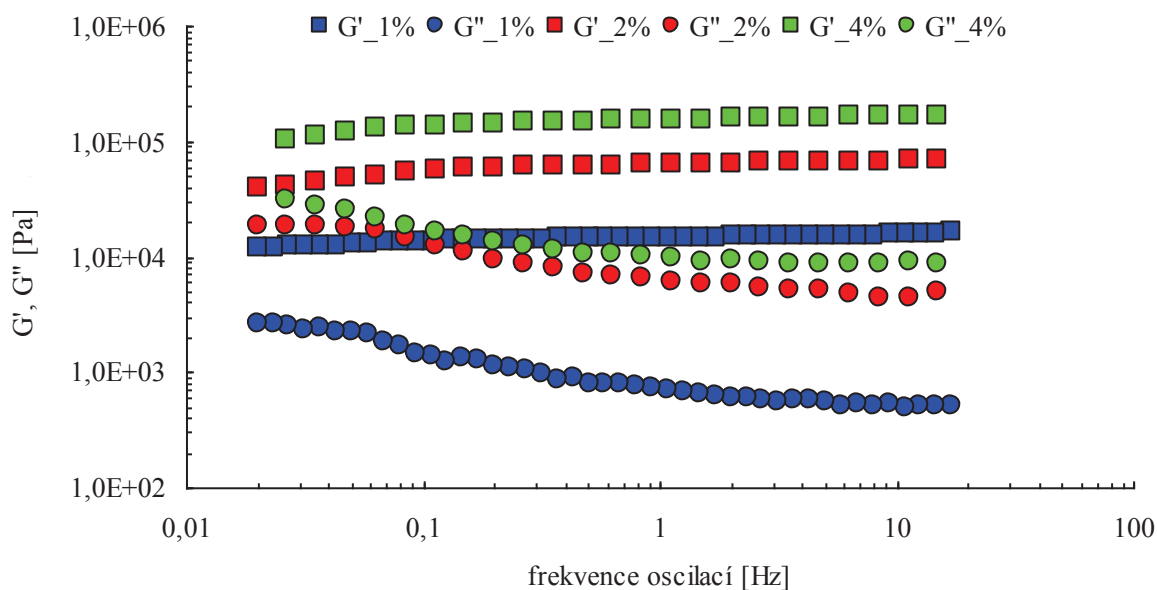
6.1.4 Studium viskoelastických vlastností agarózových hydrogelů

Hlavním cílem tohoto experimentu bylo zjistit a porovnat viskoelastické vlastnosti agarózových hydrogelů pomocí jednoduchých oscilačních testů, konkrétně se jednalo o testy s konstantní frekvencí oscilací a měněnou amplitudou napětí, kdy tento test sloužil především k určení lineární oblasti viskoelastivity (LVO), kterou je nezbytné znát pro další oscilační test s konstantní amplitudou napětí a proměnnou frekvencí oscilací. Níže uvedený graf (viz obrázek 28) zobrazuje jednoduchý oscilační test pro 1 hm. % a 4 hm. % agarózové hydrogely. Z tohoto grafu je patrné, že oba zkoumané systémy se chovají obdobně s tím rozdílem, že hydrogel s vyšší koncentrací agarózy v gelu disponoval vyššími hodnotami viskoelastických modulů v obou případech, ať již modulu ztrátového či modulu elastického. Z toho lze usuzovat, že gel s vyšší koncentrací agarózy v gelu disponoval rigidnější strukturou, než v případě 1 hm. % agarózového gelu. Pro přehlednost grafické závislosti byly vynechány viskoelastické charakteristiky 2 hm. % agarózového gelu, jehož moduly ležely přibližně uprostřed mezi charakteristikami 1 hm. % a 4 hm. % agarózového gelu. Jak již bylo zmíněno výše, tento jednoduchý oscilační test s konstantní frekvencí oscilací sloužil především pro určení LVO, nutné pro další experimenty. Ve všech případech byla jako vhodná amplituda napětí zvolena hodnota 0,1 %, vzhledem k tomu, že při vyšších amplitudách napětí docházelo k nevratné deformaci zkoumaného vzorku, což je potvrzeno rapidním poklesem obou viskoelastických modulů. V obou zobrazených případech, tedy jak v případě 1 hm. % gelu, tak také v případě 4 hm. % gelu docházelo k nevratné porušení struktury prakticky při stejné amplitudě napětí, konkrétní hodnota byla přibližně 0,25 % deformace. Obdobná hodnota amplitudy napětí nutná pro deformaci vzorku svědčí o stejném mechanismu vzniku gelu, lze tedy říci, že koncentrace agarózy v gelu nemá výraznější vliv na způsob vzniku těchto materiálů.



Obrázek 28: Jednoduchý oscilační test s konstantní frekvencí oscilací a měněnou amplitudou napětí pro 1 hm. % a 4 hm. % agarózový gel.

Dalším testem, kterému byly agarózové gely bez přídavku biopolymeru podrobeny, byl oscilační test s různou frekvencí oscilací a vhodnou konstantní amplitudou napětí. Výstupy z těchto experimentů jsou zobrazeny v následujících grafických závislostech. Z níže uvedených grafů je patrné, že i přes vysoké procento vody v hydrogelu disponují všechny zkoumané materiály (hydrogely s různou koncentrací agarózy v gelu) plně síťovanou strukturou, což lze usuzovat z toho, že elastický modul převyšuje poměrně výrazně modul viskózní. Odlišnosti ve struktuře hydrogelu lze popsat grafickou závislostí na grafu (viz obrázek 29), který vyjadřuje závislost komplexního modulu na frekvenci oscilací. Komplexní modul pružnosti se skládá z reálné a imaginární složky. Reálná složka charakterizuje elastické vlastnosti zkoumaných materiálů, imaginární složka charakterizuje viskózní vlastnosti materiálů. Odlišnosti jednotlivých agarózových vzorků o různé koncentraci jsou ještě více zřetelné z příložené tabulky 12, ve které jsou zobrazeny hodnoty komplexního modulu v závislosti na koncentraci agarózy v hydrogelu. Z této tabulky (viz tabulka 12) a z příloženého grafu (viz obrázek 29) lze usuzovat, že hodnota komplexního modulu roste přímo úměrně se stoupající koncentrací agarózy v hydrogelu. Lze tedy tvrdit, že se stoupající koncentrací dochází ke vzniku pevnější vzorků s rigidnější strukturou, což bylo patrné již při samotné manipulaci se vzorkem. Experimentálně bylo tedy ověřeno, že koncentrace agarózy v gelu má výrazný vliv na finální mechanické vlastnosti připravených hydrogelů. Co se týče rozdílů v hodnotách elastického a viskózního modulu, pro jednotlivé vzorky, tak lze říci, že zde nejsou pozorovány markantnější odchylky, jelikož ani v jednom případě nedosahoval rozdíl mezi G' a G'' větší než dva řády.

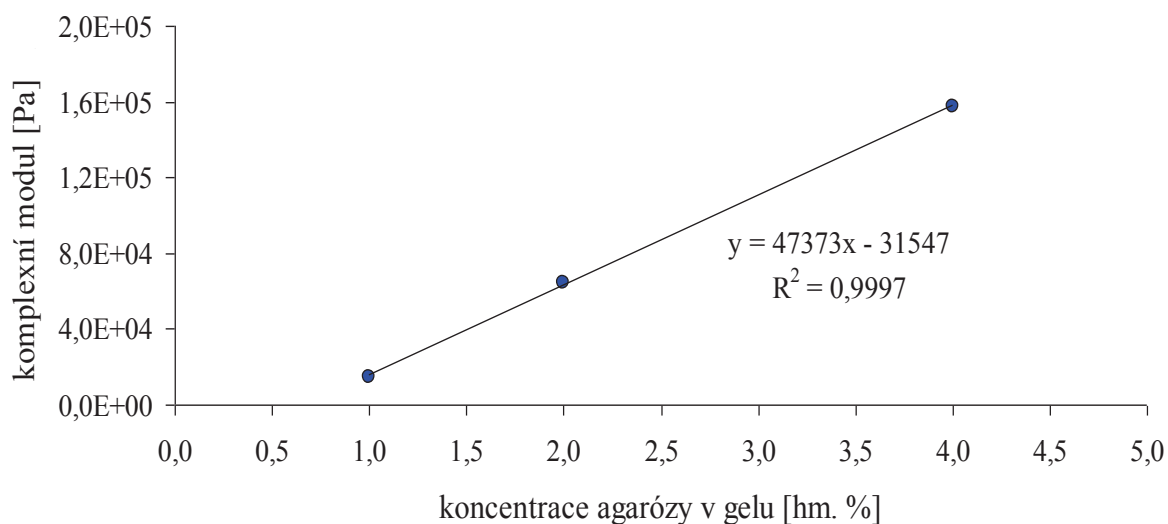


Obrázek 29: Oscilační test s proměnnou frekvencí oscilací a konstantní amplitudou napětí pro agarózové gely různých koncentrací.

Jak je patrné z níže uvedené grafické závislosti (viz obrázek 30), a tabulky 12, změna mechanických vlastností (nárůst komplexního modulu) koreluje s nárůstem koncentrace agarózy v gelu. Z tohoto grafu lze usuzovat, jakých mechanických vlastností by dosahovaly agarózové gely o vyšších, respektive nižších koncentracích.

Tabulka 12: Vypočtené hodnoty komplexního modulu pro různě koncentrované hydrogely

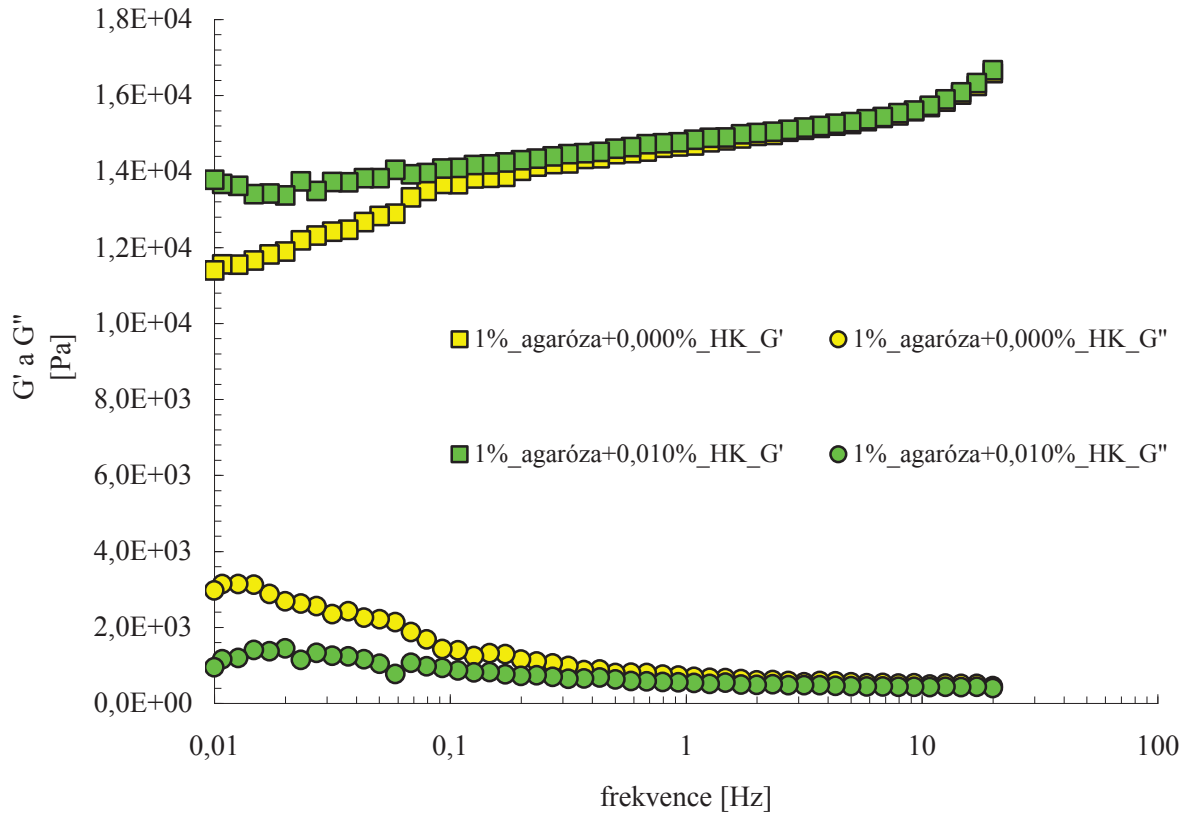
koncentrace agarózy [hm. %]	komplexní modul [Pa]
1	14 894
2	64 597
4	157 479



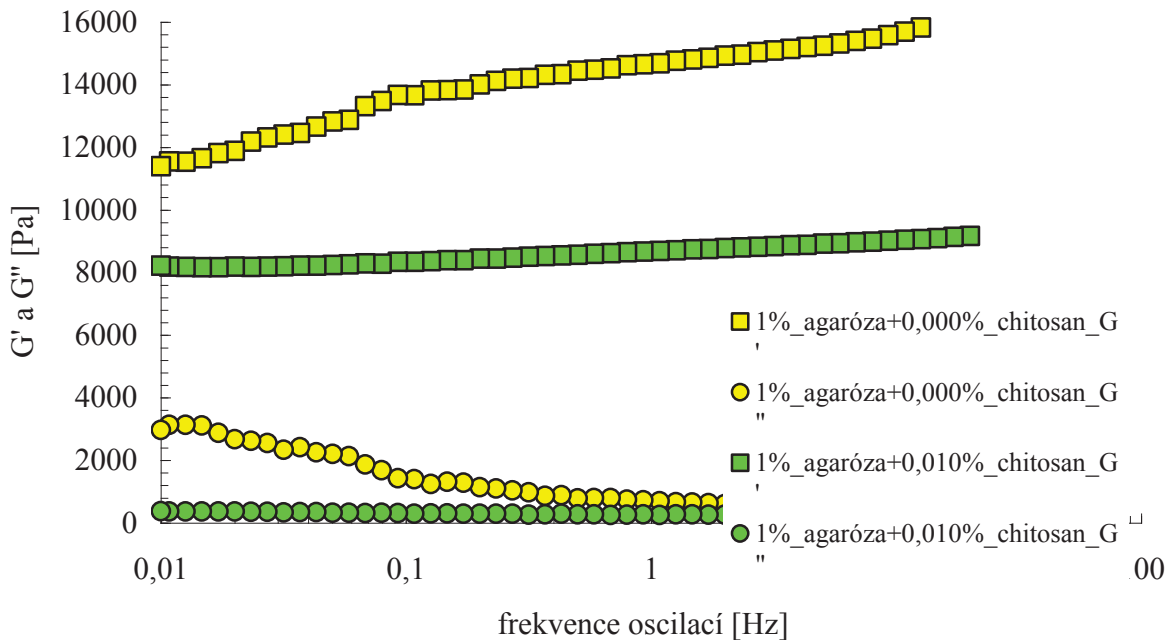
Obrázek 30: Závislost komplexního modulu na hmotnostní koncentraci agarózy v gelu.

Viskoelastické charakteristiky byly studovány také u agarózových gelů s různým přidavkem biopolymeru. Výstupy z těchto polymerů jsou znázorněny na níže uvedených grafech.

Obrázek 31 charakterizuje mechanické vlastnosti 1 hm. % agarózového gelu s přidavkem HK. Pro přehlednost jsou v grafu (viz obrázek 31) uvedeny pouze vzorky s největší diferencí obsahu HK. Jak je patrné z této grafické závislosti, přidavek HK nemá výraznější vliv na výsledné viskoelastické charakteristiky zkoumaných materiálů, což je pravděpodobně způsobeno tím, že maximální přidavek huminových kyselin se pohyboval v setinách procenta. Zcela odlišný trend byl pozorován v případě agarózových gelů s přidavkem chitosanu, změřené viskoelastické charakteristiky pomocí frekvenčních testů jsou uvedeny na grafu níže (viz obrázek 32).



Obrázek 31: Frekvenční závislost viskoelastických modulů pro gely s různou koncentrací HK



Obrázek 32: Frekvenční závislost viskoelastických modulů pro gely s různou koncentrací chitosanu

Jak je patrné z frekvenční závislosti pro agarózové gely s chitosanem (viz obrázek 32), přidavek chitosanu ovlivňuje poměrně markantně finální mechanické vlastnosti připravených vzorků, jelikož pokles v modulech, především pak v elastickém modulu byl poměrně zřetelný. Lze tedy tvrdit, že přidavek chitosanu do struktury agarózového gelu vede k tomu, že rigidita

a pevnost uzlů termoreverzibilních agarózových gelů klesá, což je poměrně zajímavý fakt. Jedním z vysvětlení může být vliv aminových skupin ve struktuře chitosanu. Chitosan pravděpodobně interaguje s agarózou mnohem silněji, než v případě HK a z tohoto důvodu poté dochází ke zhoršení mechanických vlastností připravených vzorků.

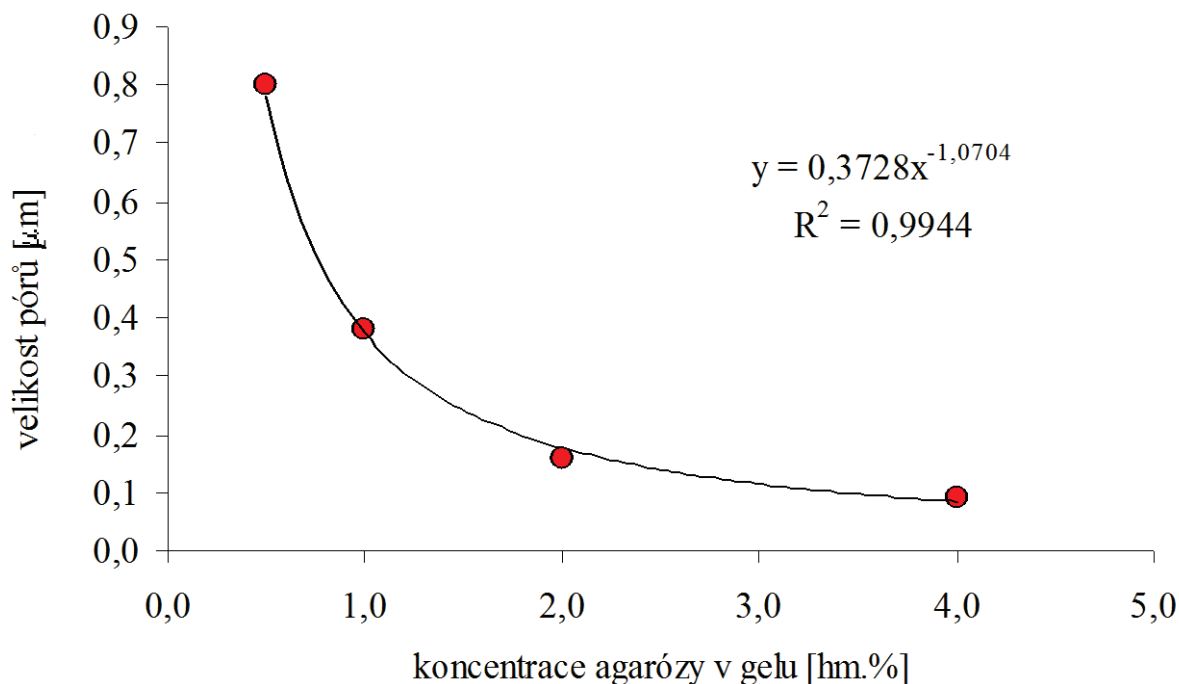
Pro shrnutí lze tedy říci, že vyšší obsah agarózy v gelovém systému vede k tomu, že tyto vzorky disponují rigidnější strukturou, než v případě vzorků s nižší koncentrací agarózy. Dále lze tvrdit, že HK alespoň v měřeném rozsahu nemají významnější vliv na výsledné viskoelastické vlastnosti hydrogelů na bázi agarózy. Pevnost uzlů ve struktuře gelu je tedy dána pouze termoreverzibilní agarózou. Opačný trend je nastolen v agarózových gelech s přidavkem chitosanu, v tomto případě docházelo ke snižování rigidity připravených vzorků s rostoucí koncentrací chitosanu v hydrogelech. Jednoduché viskoelastické testy sloužily především k volbě vhodné koncentrace agarózy v gelu pro difúzní experimenty, jako vhodná koncentrace se jevila 1 hm. %, jelikož rigidita a pevnost vzorku dosahovala požadovaných vlastností a difúze nebyla tak časově náročná jako v případě, kdyby byl zvolen gel s vyšším obsahem agarózy.

6.1.5 Stanovení velikosti pórů hydrogelů na bázi agarózy

Předpokladem pro následující experiment zabývající se stanovením velikosti pórů v agarózových hydrogelech byla domněnka, že velikost pórů připravených materiálů je značně závislá na zvolené koncentraci agarózy v gelu. Výsledky jsou sumarizovány v tabulce 13. Vypočtené hodnoty vlnového koeficientu byly zprůměrovány ze tří měření a tyto zprůměrované hodnoty byly vyneseny do grafu dle Aymarda [66] a z tohoto grafu byla následně odečtena velikost pórů, která je přímo úměrná korelační délce udávané v mikrometrech. Z níže uvede tabulky a grafické závislosti je patrné, že se stoupající koncentrací dochází k výraznému poklesu velikosti pórů. Zajímavým faktem je také exponenciální pokles velikosti pórů, což je zřejmé z grafu. Lze tedy tvrdit, že největší rozdíl ve velikosti pórů je pozorovatelný při nízkých koncentracích, konkrétně rozdíl mezi 0,5 hm. % a 1 hm. % agarózovým gelem. Z grafické závislosti (viz obrázek 33) a přiložené rovnice regrese lze tedy usuzovat o velikosti pórů i pro různé jiné koncentrace agarózy v hydrogelu. Velikost pórů agarózových gelů klesá s rostoucí koncentrací agarózy v gelu a to exponenciálně, vzhledem k tomu, že při vyšších koncentracích dochází k přiblížení agarózových řetězců a vzájemné interakci. Z tohoto důvodu lze vysvětlit i fakt, že difúze v gelech s vyšší koncentrací je mnohem pomalejší, než v případě hydrogelů s nižší koncentrací.

Tabulka 13: Hodnoty vlnového exponentu a velikosti pórů pro agarózové gely s různou koncentrací.

koncentrace agarózy [hm. %]	vlnový exponent (VE)		průměr VE	velikost pórů [μm]
0,5	-2,47	-2,34	-2,40	0,80
1,0	-2,59	-2,59	-2,59	0,38
2,0	-3,06	-3,06	-3,06	0,16
4,0	-2,81	-2,84	-2,82	0,09

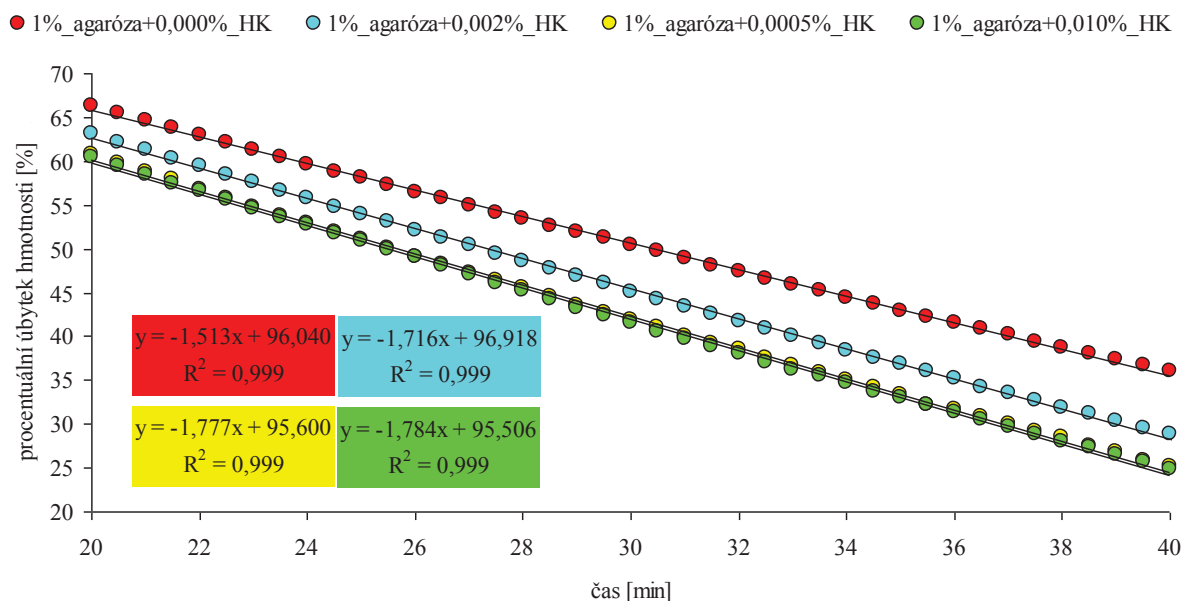


Obr. 33: Závislost velikosti pórů na koncentraci agarózy v daném hydrogelu.

6.1.6 Sušící charakteristiky agarózových hydrogelů

Následující experiment byl zaměřen na stanovení sušících charakteristik a sestrojení sušících křivek pro agarózové gely s různou koncentrací biopolymeru. Změna hmotnosti při sušení hydrogelů byla zaznamenávána pomocí analyzátoru vlhkosti s obslužným PC. Všechny vzorky byly sušeny při 105 °C až do ustálení konstantní hmotnosti. Do grafických závislostí byla pro přehlednost vynesena pouze lineární část a to v časovém intervalu 20 až 40 minut. Hlavní motivací k realizování tohoto experimentu byla hypotéza, že přidávkem biopolymeru může dojít k markantnímu ovlivnění způsobu vazby vody ve finálním hydrogelu. Naměřená data jsou sumarizována v následujících grafických závislostech (viz obrázek 34), které zobrazují úbytek hmotnosti jednotlivých hydrogelů v časovém intervalu 20 až 40 minut. Ze směrnic uvedených lineárních závislostí (které charakterizují rychlost sušení) lze usuzovat o charakteru připravených hydrogelů a odlišnostech v sušení pro jednotlivé vzorky. První graf zobrazuje sušící křivky pro agarózové gely s přidávkem huminových kyselin. Z těchto sušících křivek (viz obrázek 34) lze usuzovat, že přidávek HK k 1 hm. % agarózovému gelu vyvolává pomalejší sušení daného vzorku. Nejmarkantnější rozdíl je pozorován mezi čistým 1 hm. % agarózovým gelem bez přidavku biopolymeru a 1 hm. % agarózovým gelem s největším přidávkem huminových kyselin, čili 0,010 hm. %. Rozdíl ve směrnici pro tyto dva vzorky představuje hodnota 0,271, lze tedy tvrdit, že sušení agarózových gelů s přidávkem huminových kyselin probíhá přibližně o 15 % rychleji.

Zajímavým faktem a motivací k dalšímu výzkumu této problematiky je také teplotní závislost na velikost pórů agarózových hydrogelů, vzhledem k tomu, že v případě vyšších teplot bude docházet k porušování slabých agarózových řetězců uvnitř struktury těchto materiálů a velikost pórů by teoreticky měla růst s rostoucí teplotou gelu. Jiné aplikovatelné metody na stanovení velikosti pórů v agarózových gelech jeví se jako vhodné jsou dynamický rozptyl světla (DLS) či mikroskopické metody (SEM, AFM, aj.).

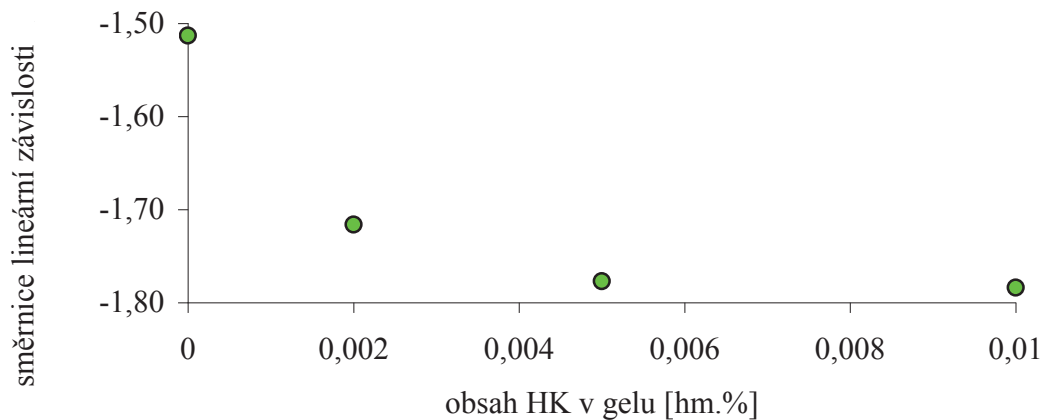


Obrazek 34: Sušící křivky pro agaróзовé gely s přidavkem HK v intervalu sušení 20 až 40 minut.

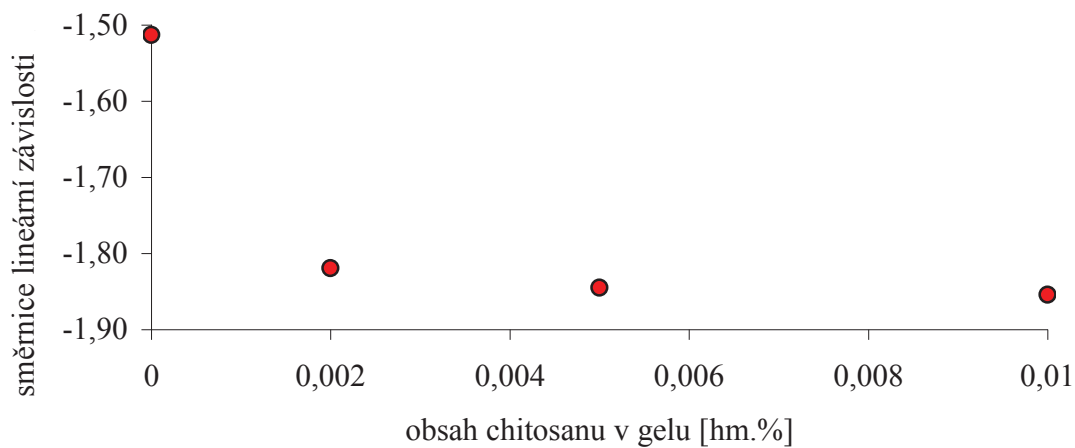
V případě, porovnání vlivu koncentrace biopolymeru (humínové kyseliny) na rychlost sušení, lze tvrdit, že přidavek vyšší koncentrace humínových kyselin neovlivňuje sušící charakteristiky tak výrazně. Lze tedy tvrdit, že sebemenší přidavek HK ovlivňuje sušící charakteristiky připravených vzorků, ovšem přidavek vyšší koncentrace HK nemá tak markantní vliv. Směrnice, které charakterizují sušící charakteristiky jednotlivých vzorků, jsou uvedeny v tabulce 14.

Tabulka 14: Experimentálně získané směrnice sušících křivek pro agaróзовé gely s přidavkem biopolymerů

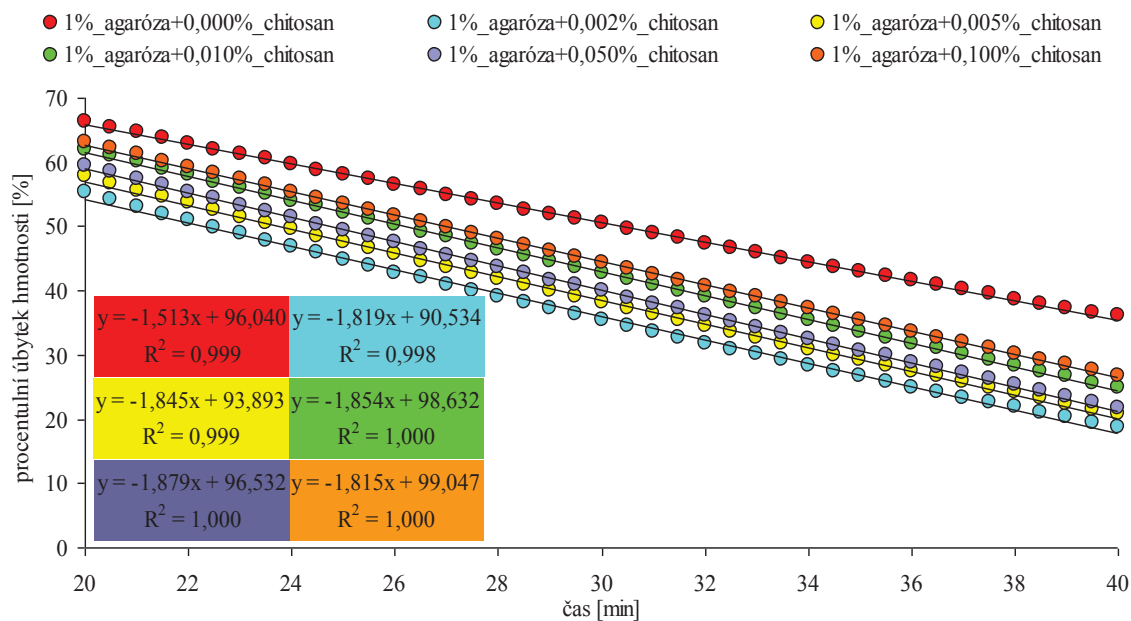
koncentrace HK v gelu [hm. %]	směrnice přímky (HK)	směrnice přímky (chitosan)
0,000	-1,513	-1,513
0,002	-1,716	-1,819
0,005	-1,777	-1,845
0,010	-1,784	-1,854



Obrázek 35: Závislost směrnice sušících křivek na koncentraci huminových kyselin v gelu.



Obrázek 36: Závislost směrnice sušících křivek na koncentraci chitosanu v gelu.



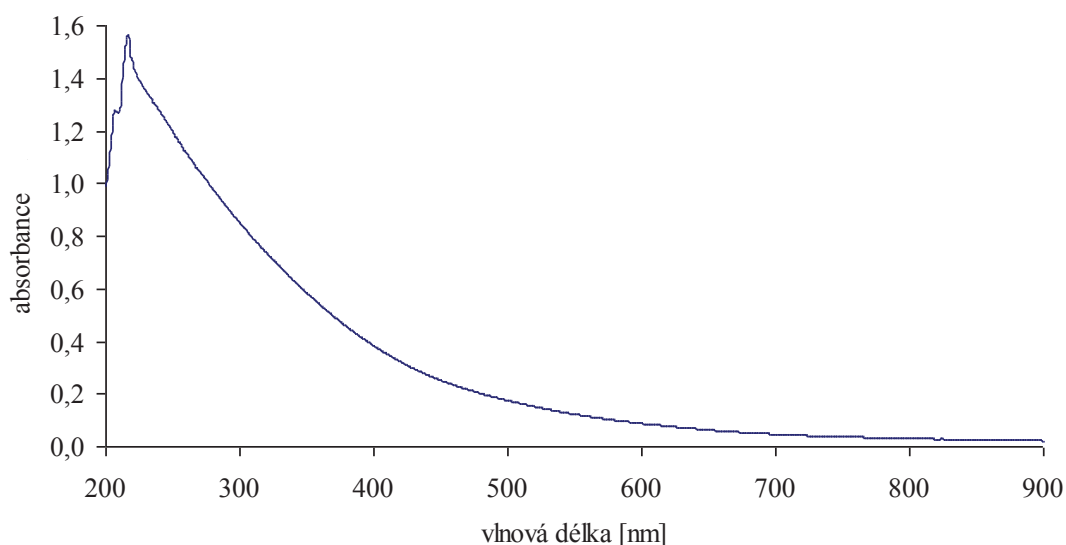
Obrázek 37: Sušící křivky pro gely s přidavkem chitosanu v časovém intervalu 20 – 40 minut.

Na obrázku 37 jsou zobrazeny sušící charakteristiky agarózových gelů s přidavkem chitosanu, opět v časovém intervalu 20 až 40 minut. Opět bylo prokázáno, že přidavek biopolymeru do struktury agarózového gelu výrazně zvyšuje rychlost sušení, což potvrzují výše uvedené grafické závislosti. Dle směrnic lineárních závislostí lze usuzovat, že s vyšším přidavkem chitosanu do struktury agarózových gelů dochází k postupnému rychlejšímu sušení. Tento fakt je splněn prakticky pro každou koncentraci chitosanu v gelu, s výjimkou nejvyšší koncentrace 0,1 hm. %. Pravděpodobně se jedná o chybu měření, i když byl tento vzorek stejně jako ostatní měřen třikrát. Dalším vysvětlením může být to, že rozdíly v koncentraci chitosanu jsou natolik malé, že nejsou schopny ovlivnit rychlost sušení, popřípadě chitosan nemusí mít prakticky žádný vliv na sušící charakteristiky agarózových gelů. Dle původních předpokladů nebyl pozorován žádný markantní rozdíl ve finálních hmotnostech sušin jednotlivých vzorků.

6.1.7 UV-VIS spektrometrie roztoku huminových kyselin

UV-VIS spektrometrie slouží jako univerzální nástroj pro charakterizaci HL. Z naměřeného UV-VIS spektra lze vypočítat standardní optické charakteristiky. Ty jsou velmi užitečné pro určení disperzity vzorku, slouží také k jakémusi náhledu na chemickou strukturu HK, lze jimi také zjistit molární hmotnost měřených vzorků. Absorpční poměr A_{280} / A_{465} odpovídá poměru mezi odolnými ligninovými strukturami a mladými frakcemi s nízkým stupněm humifikace. Tento poměr dosahuje hodnoty 4,3. Další poměr představuje tzv. *humifikační index*, jedná se o poměr absorbcí při vlnových délkách 465 nm ku absorbcanci při vlnové délce 665 nm. HK jsou charakteristické tím, že s rostoucí molekulovou hmotností nebo stupněm disperzity tento humifikační index klesá. Humifikační index dosahuje hodnoty 3,9, což je poměrně nízká hodnota, což svědčí o tom, že použité HK disponují poměrně vysokou molekulovou hmotností.

Neméně důležitou spektrální charakteristikou v souvislosti s chemií HK představuje koeficient $\Delta \log K = \log A(400\text{nm}) - \log A(600\text{nm})$. Skupina japonských autorů v čele s Kumada [67] definovala souvislost mezi $\Delta \log K$ a stupněm humifikace, vyšší hodnota $\Delta \log K$ reprezentuje vyšší humifikace materiálu. Použité huminové kyseliny mají $\Delta \log K = 0,6382$, tím pádem spadají do kategorie typu B (viz. [67]), což naznačuje vysoký stupeň *humifikace*.



Obrázek 38: Absorpční spektrum v oblasti UV-VIS pro lignitické HK.

6.2 Difúzní experimenty

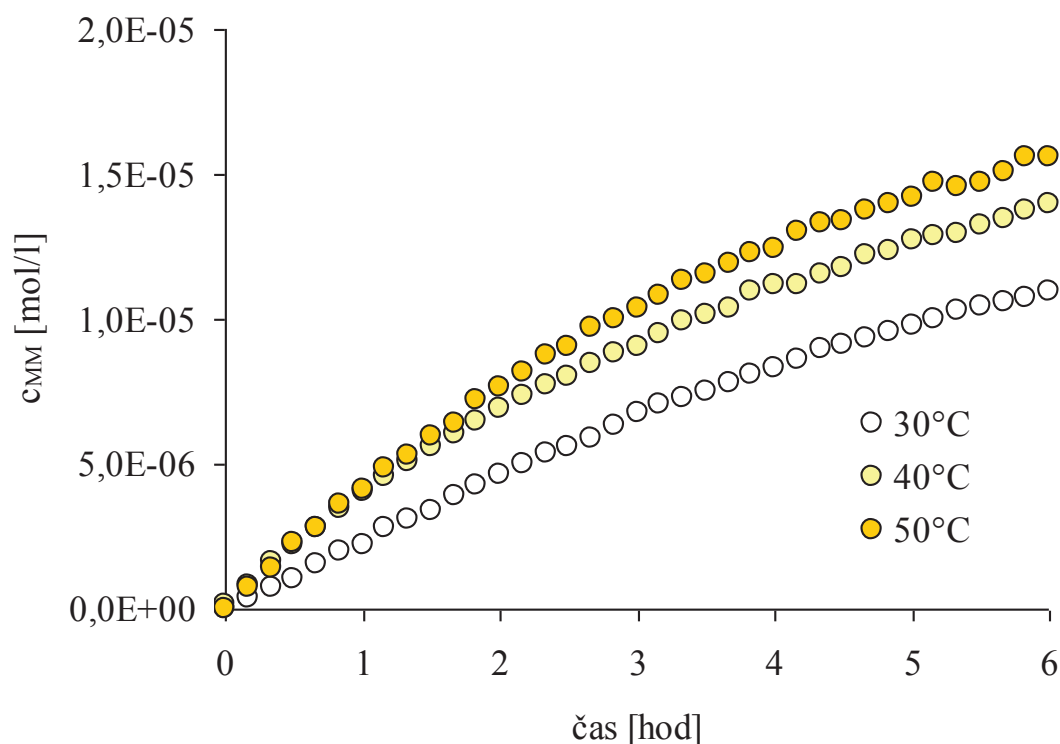
Následující experimenty byly hlavní náplní této diplomové práce. Jednalo se především o studium reaktivity vybraných biopolymerů formou difúzních procesů. Konkrétně byla reaktivita huminových kyselin a chitosanu studována ustálenou difúzí v difúzní cele a neustálenou difúzí v kvetách. Zahrnut byl také vliv teploty na difúzní procesy skrz polotuhé agaróзовé gely s přidavkem biopolymeru.

6.2.1 Stanovení difúzního koeficientu použitých barviv ve vodném roztoku

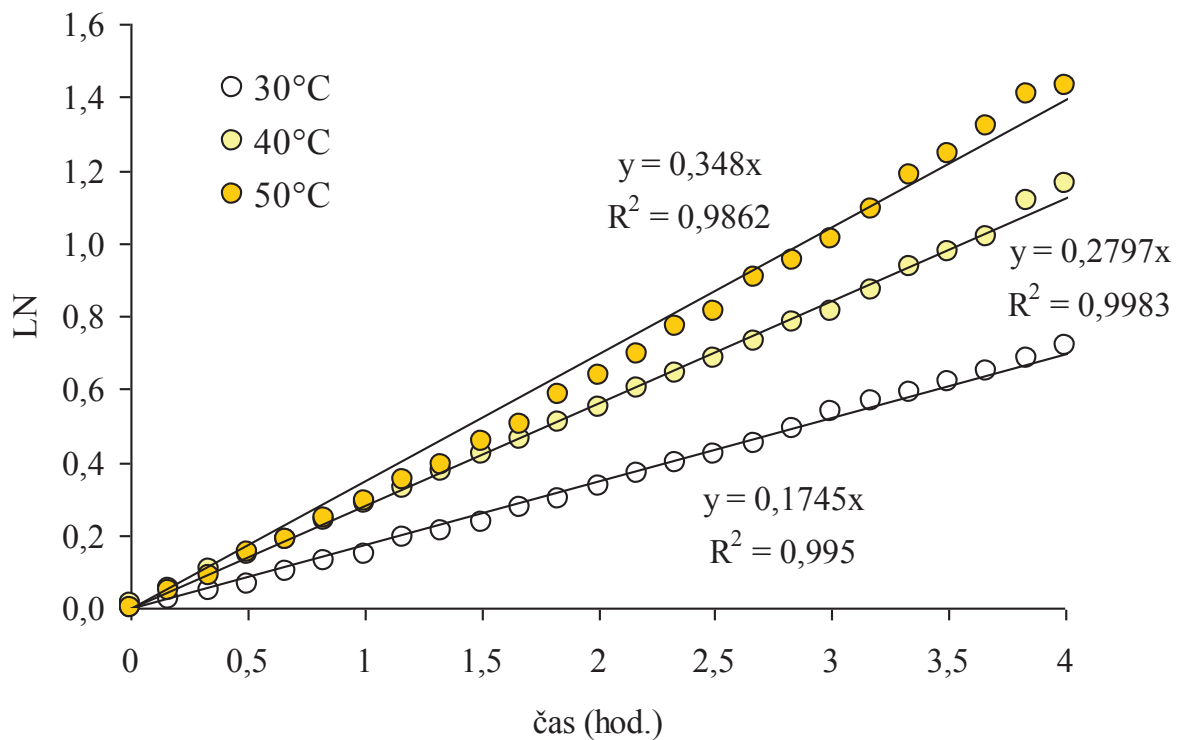
Jako první byly provedeny difúzní experimenty vybraných organických barviv (MM a MO) skrz membrány SPI PORE vyrobené z polykarbonátu s velikostí pórů 0,2 μm. Na prvním grafu (viz obrázek 39) je patrná časová závislost změny koncentrace methylenové modři v přijímací komoře difúzní cely. Na druhém grafu je zobrazena závislost funkce LN na čase. Funkce LN je definována podle níže uvedené rovnice (33). Ze směrnice této závislosti lze poté vypočítat difúzní koeficient vybraných barviv ve vodných roztocích.

$$\beta \cdot D \cdot t = -\ln\left(1 - 2 \frac{c_p}{c_{z0}}\right) = LN \quad (33)$$

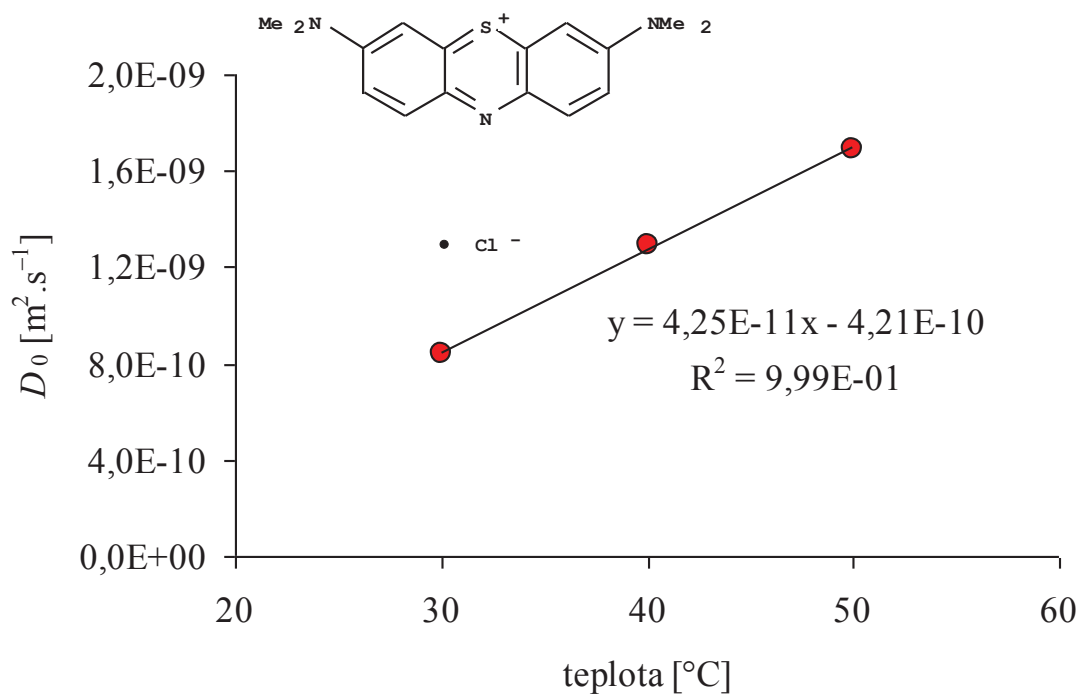
Konstanta β , která charakterizuje použitou membránu, byla stanovena kalibrací cely za použití materiálu o známé hodnotě difúzního koeficientu (KCl, viz [74]). Z uvedených grafů (viz obrázek 41) je patrné, že s rostoucí teplotou dochází k lineárnímu nárůstu difúzního koeficientu organického barviva (MM) ve vodných roztocích. Bylo tedy experimentálně ověřeno, že teplota má výrazný vliv na rychlost difúzních procesů ve vodných roztocích.



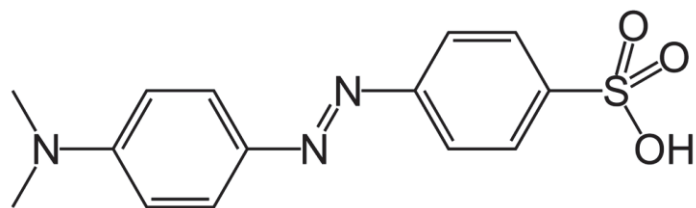
Obrázek 39: Časová závislost změny koncentrace MM pro difúzi barviva skrz membránu při různých teplotách.



Obrázek 40: Časová závislost funkce LN vypočítané dle rovnice (33) pro difúzi skrz membránu při různých teplotách.



Obrázek 41: Difúzní koeficient pro barviva ve vodných roztocích v závislosti na teplotě experimentu.



Obrázek 42: Strukturální vzorec organického barviva – methylenová oranž.

Stejným způsobem byl vyhodnocen také difúzní koeficient ve vodném roztoku v případě použití methylenové oranži coby difúzního média. Difúzní koeficient pro methylenovou oranž byl stanoven pouze při jedné teplotě, konkrétně 30 °C. Vypočtené hodnoty difúzního koeficientu pro methylenovou modř a methylenovou oranž jsou sumarizovány v následující tabulce 15.

Výsledné hodnoty difúzního koeficientu budou ovlivněny nejen teplotou, při které difúze probíhala. Hodnoty difúzního koeficientu budou také značně závislé na molární hmotnosti daného barviva.

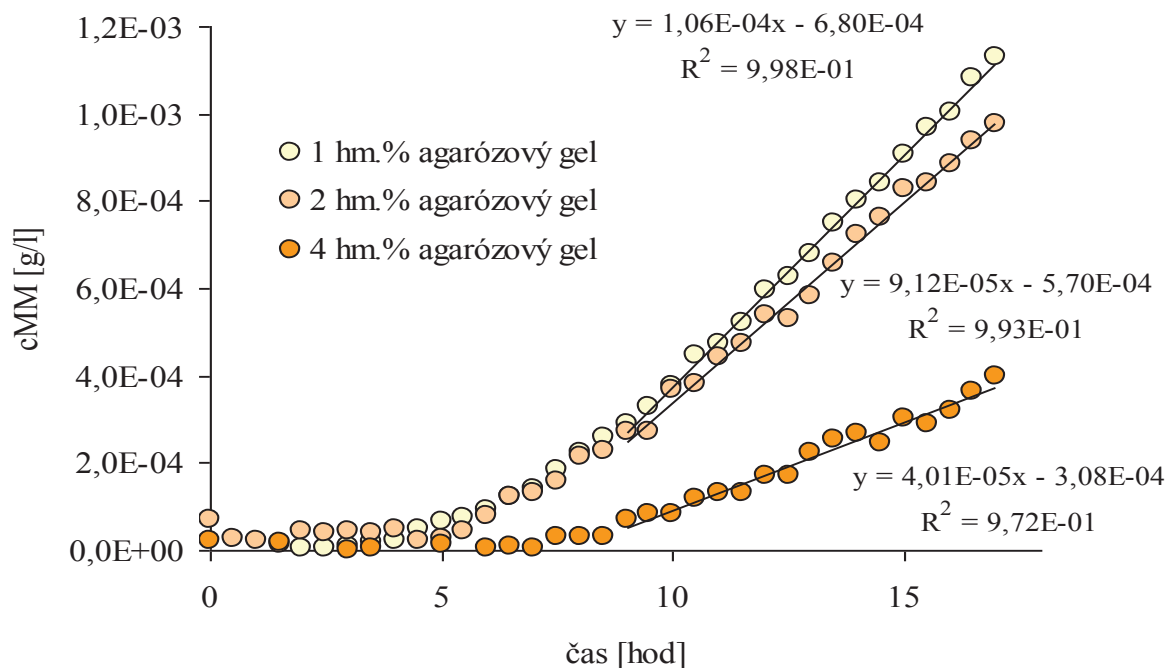
Tabulka 15: Vypočtené difúzní koeficienty pro difúzi barviva ve vodě při různých teplotách.

teplota [°C]	difúzní koeficient D_0 [m ² ·s ⁻¹]	
	MM	MO
30	$8,44 \cdot 10^{-10}$	$9,66 \cdot 10^{-10}$
40	$1,29 \cdot 10^{-9}$	
50	$1,69 \cdot 10^{-9}$	

6.2.2 Stanovení difúzního koeficientu v agarózových gelech metodou difúzní cely

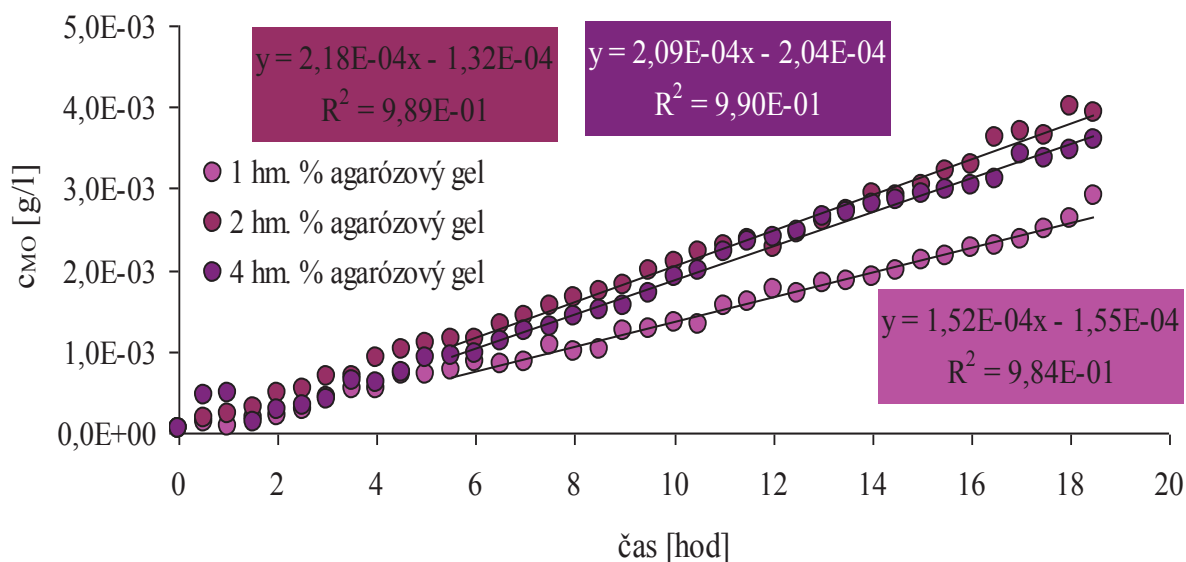
Hlavním cílem tohoto experimentu bylo ověření vlivu koncentrace agarózy v agarózovém gelu na rychlost difúze a hodnotu difúzního koeficientu studovaných barviv. Naměřená data jsou sumarizována v následujících grafických závislostech a tabulkách. V případě methylenové oranži byly experimenty prováděny při teplotě 30 °C, v případě methylenové modři při teplotách 30, 40 a 50 °C. Teplota byla regulována průtokovým termostatem.

Na první grafické závislosti (viz obrázek 43) je zobrazena závislost změny koncentrace methylenové modři (MM) v přijímací komoře difúzní cely při teplotě 30 °C. Jak je patrné z tohoto grafu, s rostoucí koncentrací agarózy v připravených hydrogelech dochází k výraznému zpomalování difúze. Nejmarkantnější rozdíl je pozorován mezi koncentracemi 2 hm. % a 4 hm. % agarózy v gelu. Z tohoto grafu lze také usuzovat, po jaké době barvivo penetrovalo skrz gelovou bariéru, lze tvrdit, že methylenová modř je poprvé detekována v přijímací cele v časovém horizontu 6 – 8 hodin, dle posuzovaného vzorku. Lineární části časové změny koncentrace methylenové modři v přijímací komoře difúzní cely byly proloženy přímkou, ze směrnice těchto lineárních částí lze poté vypočítat konečnou hodnotu difúzního koeficientu (viz rovnice 22) a tím pádem charakterizovat difúzní procesy.



Obrázek 43: Časová závislost změny koncentrace MM v přijímací komoře difúzní cely pro různě koncentrované agaróznové gely při teplotě 30 °C.

Níže uvedený graf (viz obrázek 44) zobrazuje závislost změny koncentrace methylenové oranži v čase. Lineární části změny koncentrace methylenové oranži byly proloženy přímkami, ze směrnic těchto lineárních závislostí byly vypočteny difúzní koeficienty.



Obrázek 44: Časová závislost změny koncentrace MO v přijímací komoře difúzní cely pro různě koncentrované agaróznové gely při teplotě 30 °C.

Tabulka 16: Vypočtené hodnoty difúzního koeficientu, času průchodu a absorbovaného množství methylenové modři a methylenové oranži pro různě koncertované agarózové gely.

teplota [°C]	agaróza v gelu [hm. %]	methylenová modř			methylenová oranž		
		D_{eff} [$\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$]	$t_{\text{průchod}}$ [hod]	n_{MM} v gelu [mol]	D_{eff} [$\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$]	$t_{\text{průchod}}$ [hod]	n_{MO} v gelu [mol]
30	1	$7,13 \cdot 10^{-10}$	6,4	$4,87 \cdot 10^{-7}$	$3,44 \cdot 10^{-10}$	0,30	$1,76 \cdot 10^{-7}$
	2	$5,88 \cdot 10^{-10}$	6,5	$9,47 \cdot 10^{-7}$	$3,83 \cdot 10^{-10}$	0,81	$1,54 \cdot 10^{-7}$
	4	$2,66 \cdot 10^{-10}$	7,8	$1,33 \cdot 10^{-6}$	$5,61 \cdot 10^{-10}$	1,36	$2,64 \cdot 10^{-6}$
40	1	$1,11 \cdot 10^{-9}$	1,6	$2,89 \cdot 10^{-7}$			
	2	$1,03 \cdot 10^{-9}$	3,1	$6,06 \cdot 10^{-7}$			
	4	$8,76 \cdot 10^{-10}$	2,6	$1,07 \cdot 10^{-6}$			
50	1	$1,23 \cdot 10^{-9}$	1,7	$3,25 \cdot 10^{-7}$			
	2	$1,12 \cdot 10^{-9}$	1,9	$5,85 \cdot 10^{-7}$			
	4	$9,34 \cdot 10^{-10}$	1,5	$8,68 \cdot 10^{-7}$			

Předpokládáme-li, že koncentrace na fázovém rozhraní není stejná ze strany gelu i roztoku, ale že poměr koncentrací v gelu a roztoku v blízkosti rozhraní popisuje rozdělovací koeficient ε , je možné vztah (11) pro teoretický koncentrační profil upravit do jednoduché formy (34)

$$J_1 = -D \cdot \varepsilon \cdot \frac{\partial c_1}{\partial x} = \frac{D \cdot \varepsilon}{l} \cdot (c_{10} - c_{1l}) \quad (34)$$

ε je poté známkou afinity gelu k difundující látce (představuje poměr koncentrací v gelu a v roztoku při ustálení rovnováhy, a tedy sílu, jakou gel „vyčerpává“ difundující ionty z roztoku). Za předpokladu, že po ustálení difúze je až do konce experimentu koncentrační profil neměnný, je možné při znalosti konečných koncentrací difundující látky v obou roztocích hodnotu ε z tohoto vztahu jednoduše vypočíst.

Tabulka 17: Vypočtené hodnoty rozdělovacího koeficientu ε pro různě koncentrované agarózové gely.

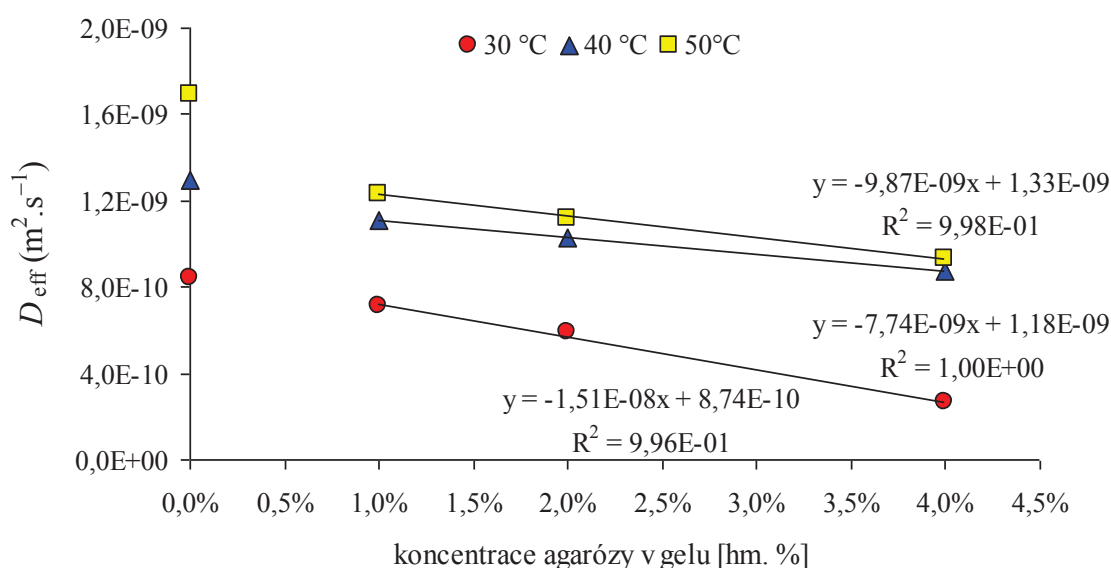
teplota [°C]	agaróza v gelu [hm. %]	ε_{MM}	ε_{MO}
30	1	6,8	0,63
	2	18,0	0,73
	4	40,6	1,11
40	1	3,3	
	2	8,6	
	4	23,3	
50	1	2,8	
	2	3,2	
	4	15,3	

Výše uvedená tabulka 17 sumarizuje rozdělovací koeficient ε pro různě koncentrované agarózové gely při různých teplotách. Jak je patrné z uvedené tabulky, s rostoucí koncentrací agarózy v gelu dochází k nárůstu rozdělovacího koeficientu, což je jeden z důvodů, proč difúze probíhá pomaleji v koncentrovanějších agarózových gelech. Tento nárůst je téměř dokonale lineární. S rostoucí teplotou naopak dochází ke snižování hodnot rozdělovacího koeficientu, což má za následek urychlení difúzních procesů. Afinita gelu k barvivu tedy s rostoucí teplotou lineárně klesá.

Níže uvedené grafické závislosti zobrazují efektivní hodnoty difúzního koeficientu (viz obrázek 45), čas průchodu (viz obrázek 47) a rozdělovací koeficient ε (viz obrázek 49) v případě použití mehtlyenové modři coby difúzního media. Jak je patrné z těchto grafů, efektivní hodnota difúzního koeficientu klesá s rostoucí koncentrací agarózy v gelu lineárně. Čas průchodu dle očekávání lineárně rostl s rostoucí koncentrací agarózy v gelu, což je zřejmé dle předpokladů, vzhledem k tomu, jak již bylo ověřeno dříve, s rostoucí koncentrací agarózy v gelu dochází ke zmenšování velikosti pórů a z tohoto důvodu je rychlost difúze v gelech s vyšším obsahem agarózy pomalejší. Poměrně zajímavým faktem je skutečnost, že čas průchodu se měnil jen ve velmi malém rozmezí, konkrétně v časovém horizontu 6,4 – 7,8 hodiny, zatímco efektivní hodnoty difúzního koeficientu se lišily řádově.

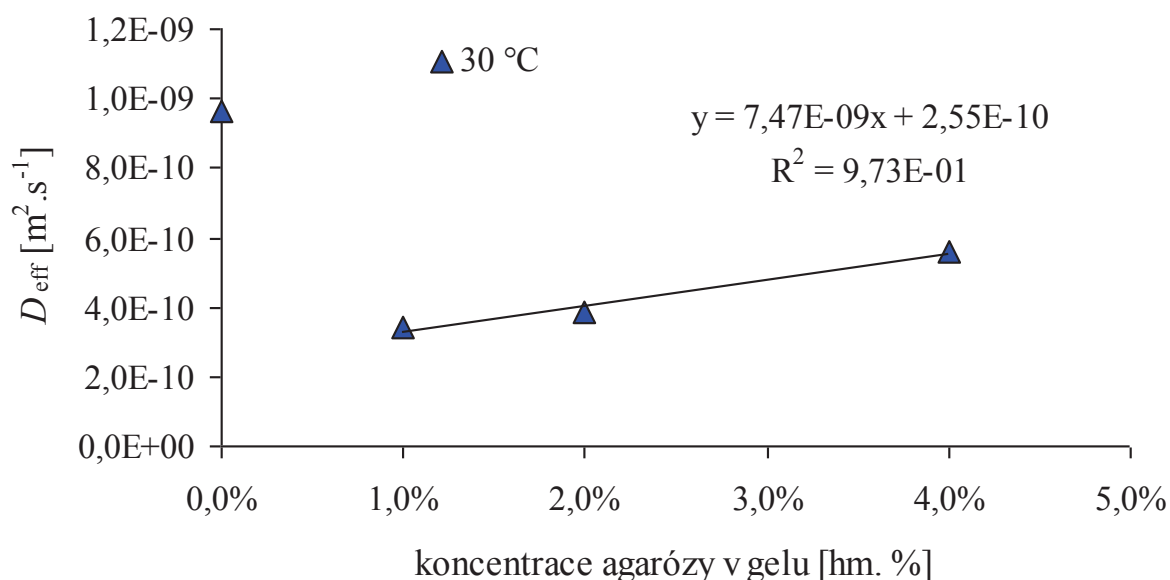
S rostoucí koncentrací agarózy gelu dochází k lineárnímu poklesu efektivního difúzního koeficientu. Se zvyšující se teplotou experimentu dochází k pozvolnému nárůstu efektivních difúzních koeficientů, nejmarkantnější rozdíl je pozorovatelný při difúzi přes membránu. Naopak při nejvyšší koncentraci agarózy v gelu je vliv teploty prakticky zanedbatelný. Jako difúzní médium byl použit roztok MO. Za nulovou koncentrací agarózy v gelu byla považována difúze vybraného organického barviva skrz membránu a to v obou případech, jak v případě použití MM, tak také v případě použití MO, coby difúzního média.

Difúzní experimenty spojené s difúzní celou přes porézní přepážku v podobě různě koncentrovaných agarózových gelů byly prováděny také při vyšších teplotách. Hlavním cílem tohoto experimentu bylo objasnění vlivu teploty na rychlost difúze přes agarózové gely.



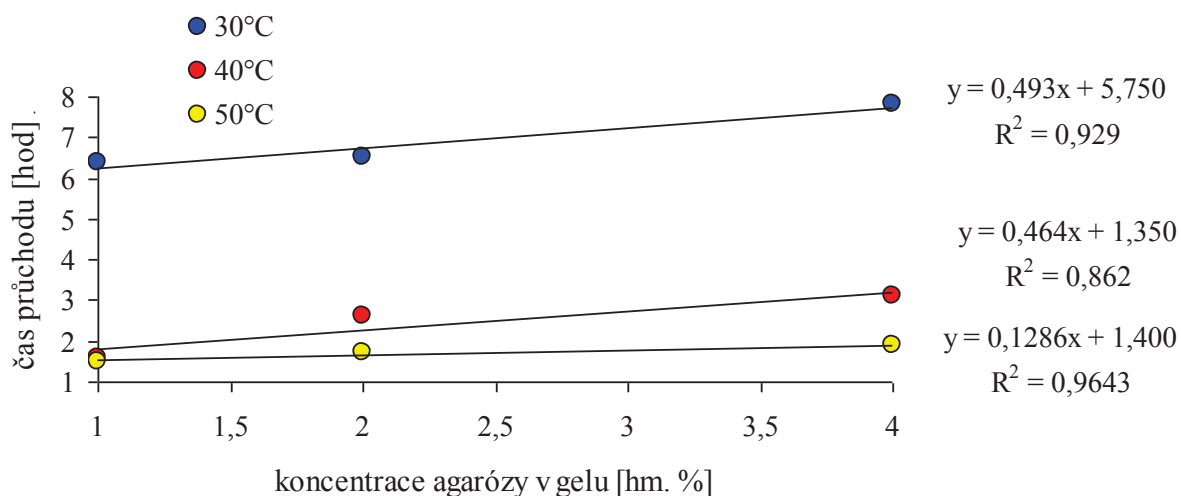
Obrázek 45: Závislost D_{eff} na w agarózy v gelech, v případě použití MM coby difúzního média.

Níže uvedená grafická závislost (viz obrázek 46) zobrazuje stejně jako v předešlém případě efektivní difúzní koeficient v závislosti na koncentraci agarózy v gelu v případě použití MO coby difúzního média při teplotě 30 °C. Jak je patrné z tohoto grafu, s rostoucí koncentrací agarózy v gelu dochází pouze k malému ovlivnění efektivních hodnot difúzních koeficientů, z čehož lze usuzovat, že vybrané organické barvivo (MO) neinteraguje s agarózovými gely a lze také tvrdit, že póry i v agarózovém gelu s nejvyšší koncentrací jsou natolik velké, že MO může procházet skrz tyto porézní překážky pouze bez sebemenších problémů.



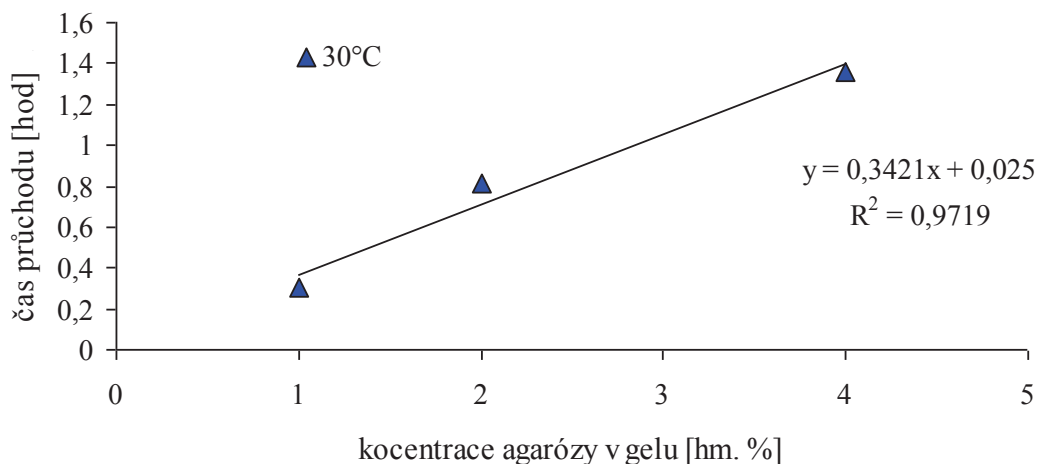
Obrázek 46: Závislost efektivního difúzního koeficientu na koncentraci agarózy v hydrogelech v případě použití MO coby difúzního média..

1 hm. % agarózový gel vykazoval nejvyšší hodnotu difúzního koeficientu a nejnižší dobu průchodu barviva skrz tento gel, navíc jeho konzistence a mechanické vlastnosti byly dostačující pro manipulaci s tímto vzorkem a proto bylo rozhodnuto, že další experimenty v podobě studia reaktivity biopolymerů budou prováděny formou tohoto hydrogelu.



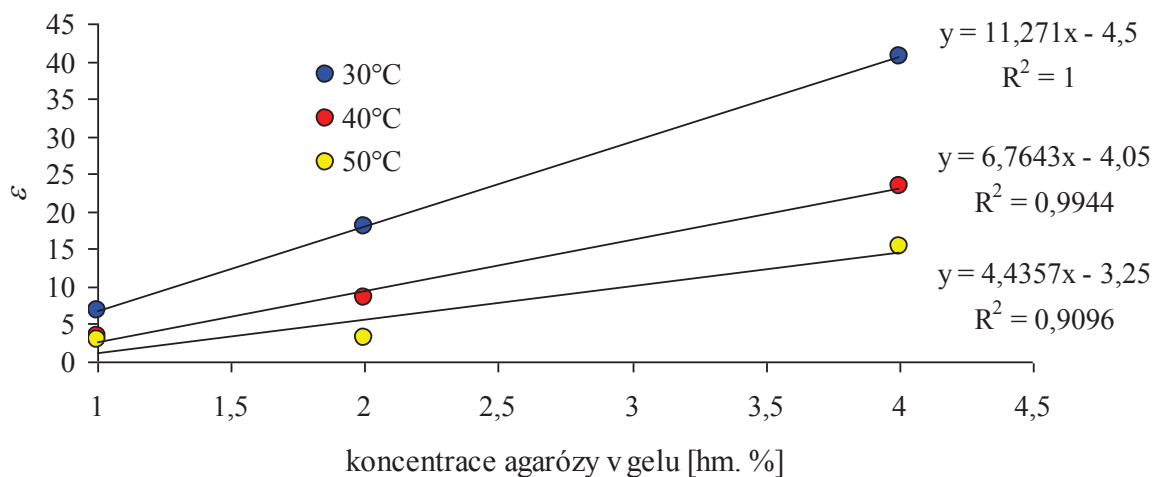
Obrázek 47: Čas průchodu MM pro jednotlivé agarózové gely lišící se koncentrací agarózy v gelu.

Na dalším grafu (viz obrázek 48) je uveden čas průchodu barviva (methylenová oranž) skrz různě koncentrované agaróзовé gely. Jak je vidno z tohoto grafu, s rostoucí koncentrací agarózy v gelu docházelo pouze k nepatrnému ovlivňování času průchodu methylenové oranží. Časy průchodu byly pro methylenovou oranž ve srovnání s methylenovou modří mnohem nižší.

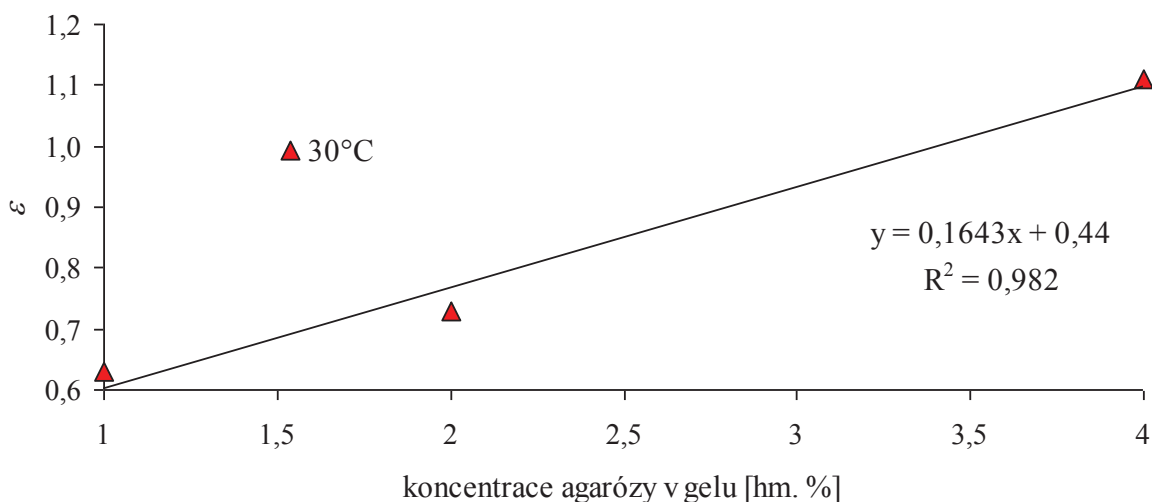


Obrázek 48: Vypočtené hodnoty času průchodu MO pro různě koncentrované agaróзовé gely.

Na následujícím grafu (viz obrázek 49 a 50) je uvedena závislost rozdělovacího koeficientu ε na koncentraci agarózy v gelu. Jak je patrné z těchto závislostí, s rostoucí koncentrací agarózy v gelu dochází k lineárnímu nárůstu rozdělovacího koeficientu. Při nižších teplotách je směrnice tohoto nárůstu větší, než v případě vyšších teplot, z čehož lze usuzovat, při nižších teplotách má změna koncentrace agarózy v gelu větší význam, než v případě vyšších teplot.



Obrázek 49: Závislost rozdělovacího koeficientu ε na hmotnostní koncentraci agarózy v gelu při různých teplotách v případě použití MM coby difúzního média.



Obrázek 50: Závislost rozdělovacího koeficientu ε na hmotnostní koncentraci agarózy v gelu při teplotě 30 °C v případě použití MO coby difúzního média.

Experimentálně bylo tedy ověřeno, že teplota má výrazný vliv na rychlost difúze v agarózovém gelu, což bylo teoreticky předpokládáno. Naměřená data jsou sumarizována v uvedených grafech. Jak je patrné z uvedených grafů a tabulek, se stoupající koncentrací agarózy v připravených gelech klesá efektivní hodnota difúzní koeficientu lineárně. Rychlost difúze v koncentrovanějších agarózových gelech je tedy nižší a to z toho důvodu, že koncentrovanější gely disponují menšími póry, což bylo experimentálně dokázáno v kapitole Stanovení velikosti pórů.

Zajímavý je také vliv teploty na rychlost difúze, což bylo hlavní náplní tohoto experimentu. Srovnání vypočtených efektivních hodnot difúzních koeficientů nabízí výše uvedené grafické závislosti. S rostoucí teplotou dochází ke zrychlování celého difúzního procesu, teplota má tedy pozitivní vliv na rychlost difúzních experimentů, což bylo teoreticky předpokládáno.

Experimentálně bylo tedy ověřeno, že v případě použití methylenové modři coby difúzního média, koncentrace agarózy v gelu i teplota mají poměrně výrazný vliv na rychlost difúzních procesů. Další experiment, který byl proveden pouze s tím rozdílem, že jako difúzní médium bylo použito jiné barvivo, konkrétně methylovaná oranž, se kterou bylo dále pracováno v souvislosti a agarózovými gely a chitosanem. Tento experiment byl prováděn pouze při jedné teplotě, konkrétně 30 °C a to z toho důvodu, že rozdíly v difúzních koeficientech s rostoucím koncentrací agarózy v gelu byly v případě použití methylovaná oranž coby difúzního média pouze minimální, jak je diskutováno níže.

Především z grafu závislosti doby průchodu prvního barviva skrz různě koncentrované agarózové gely na koncentraci agarózy v gelu (viz obrázek 50) je patrné, že změna koncentrace agarózy v gelu nemá výraznější vliv na změnu difúzního koeficientu, v případě použití methylenové oranži coby difúzního média, což je poměrně zajímavé, jelikož jak bylo výše ověřeno, změnou koncentrace agarózy v gelu dochází ke změně velikost pórů a dle tohoto faktu bylo předpokládáno, že změnou koncentrace agarózy lze docílit difúzních procesů různých rychlostí. Což je zajímavý fakt, vzhledem k tomu, že methylenová oranž i methylenová modř disponují podobnými molárními hmotnostmi, z čehož lze předpokládat, že rychlost difúze methylenové oranži skrz agarózové gely bude také výrazně ovlivněna stejně jako v případě methylenové modři. Tento fakt lze vysvětlovat pravděpodobně tím, že

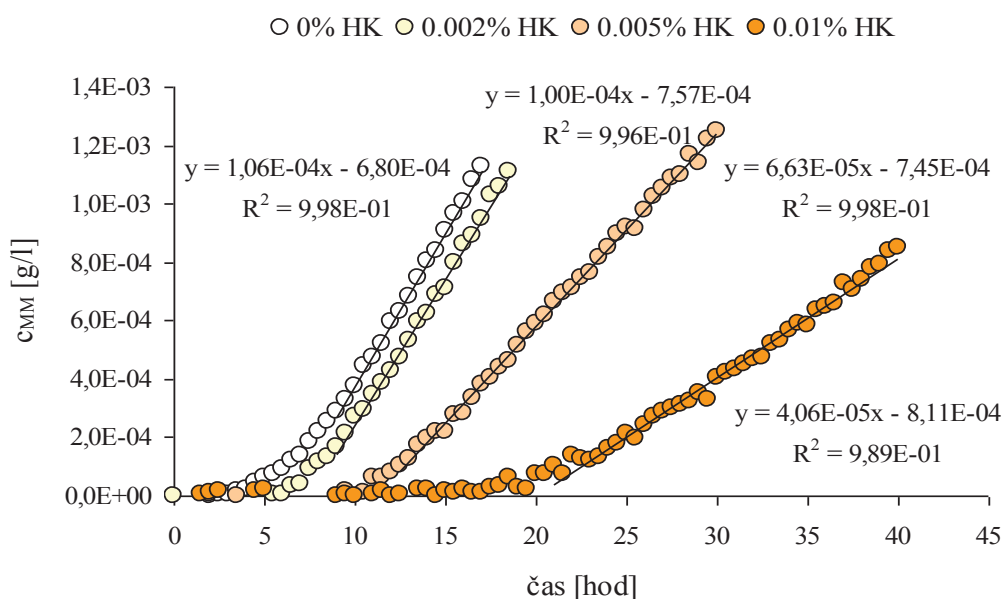
methylenová oranž při měřeném pH tvoří natažené řetězce, které mohou procházet skrz póry agarózového gelu, zatímco methylenová modř může tvořit globulární řetězce ve formě klubka a z tohoto důvodu může být rychlost difúze zpomalována. Z tohoto důvodu jsou poté ovlivněny všechny zkoumané parametry v čele s efektivním difúzním koeficientem.

Nepatrné rozdíly v difúzních koeficientech pro různě koncentrované gely mohou být vysvětleny např. rozdíly v turtuozitě (křivolakosti pohybu) v případě jednotlivých gelů. Difúzní koeficient je nepřímo úměrný turtuozitě a je možné uvažovat, že v případě koncentrovanějších gelů nabývá turtuozita nižších hodnot, pokud se mění charakter (tvar) pórů gelu – můžeme např. uvažovat uspořádání menších pórů gelu v určité kanálky, kterými může transport látky probíhat rychleji. Tuto hypotézu by ovšem samozřejmě bylo třeba experimentálně ověřit, což se jeví jako zajímavá inspirace pro navazující výzkum.

6.2.3 Stanovení difúzního koeficientu gelů s biopolymerem metodou difúzní cely

Následující experimenty plynule navazují na předešlou kapitulu 6.2.2. Hlavním cílem tohoto experimentu bylo porovnat reaktivitu jednotlivých biopolymerů, konkrétně se jednalo o HK a chitosan a objasnit tak, jakým způsobem a do jaké míry ovlivňují rychlost difúze vybraného organického barviva skrz porézní přepážku v podobě 1 hm. % agarózového gelu.

Na níže uvedeném grafu (viz obrázek 51) je zobrazena změna koncentrace použitého organického barviva (methylenová modř) v závislosti na čase pro agarózové gely s různou koncentrací biopolymeru při teplotě 30 °C. Z tohoto grafu lze usuzovat, že přidavek huminových kyselin k agarózovým gelům výrazně ovlivňuje difúzní charakteristiky těchto materiálů. Konkrétní výsledky a závěry jsou diskutovány níže. Stejný graf byl sestrojen také pro druhé organické barvivo (MO) respektive pro druhý zkoumaný biopolymer (chitosan). Vzhledem k tomu, že se jednalo o stejnou závislost, tak tento graf není uveden. Ze směrnic jednotlivých lineárních částí změny koncentrace vybraného barviva v čase lze vypočítat následující parametry charakterizující difúzní procesy. Parametry jsou sumarizovány v níže uvedené tabulce 18, konkrétně se jedná o efektivní difúzní koeficient, čas průchodu barviva skrz agarózové gely a množství difúzního média absorbovaného v gelech.



Obrázek 51: Časová závislost změny koncentrace MM pro gely s přidavkem HK při $T = 30\text{ °C}$.

Tabulka 18: Parametry charakterizující difúzi pro huminové kyseliny a chitosan.

teplota [°C]	huminové kyseliny				chitosan			
	w biopolymer [hm. %]	D_{eff} [m ² ·s ⁻¹]	t_p [hod]	n_{MM} v gelu [mol]	w biopolymer [hm. %]	D_{eff} [m ² ·s ⁻¹]	t_p [hod]	n_{MO} v gelu [mol]
30	0	$7,13 \cdot 10^{-10}$	6,4	$4,76 \cdot 10^{-7}$	0	$3,54 \cdot 10^{-10}$	0,6	$1,81 \cdot 10^{-7}$
	0,002	$6,32 \cdot 10^{-10}$	7,5	$6,41 \cdot 10^{-7}$	0,01	$3,80 \cdot 10^{-10}$	1,4	$1,58 \cdot 10^{-7}$
	0,005	$4,46 \cdot 10^{-10}$	11,2	$7,45 \cdot 10^{-7}$	0,05	$4,05 \cdot 10^{-10}$	2,1	$8,50 \cdot 10^{-8}$
	0,010	$2,53 \cdot 10^{-10}$	20,2	$1,03 \cdot 10^{-6}$	0,10	$4,23 \cdot 10^{-10}$	4,6	$3,45 \cdot 10^{-8}$
40	0	$1,08 \cdot 10^{-9}$	1,5	$2,89 \cdot 10^{-7}$				
	0,002	$8,67 \cdot 10^{-10}$	3,6	$5,66 \cdot 10^{-7}$				
	0,005	$8,31 \cdot 10^{-10}$	4,8	$7,93 \cdot 10^{-7}$				
	0,010	$4,42 \cdot 10^{-10}$	8,3	$9,57 \cdot 10^{-7}$				
50	0	$1,29 \cdot 10^{-9}$	2,0	$2,89 \cdot 10^{-7}$				
	0,002	$9,99 \cdot 10^{-10}$	2,2	$5,74 \cdot 10^{-7}$				
	0,005	$1,06 \cdot 10^{-9}$	3,7	$8,59 \cdot 10^{-7}$				
	0,010	$1,07 \cdot 10^{-9}$	4,8	$1,05 \cdot 10^{-6}$				

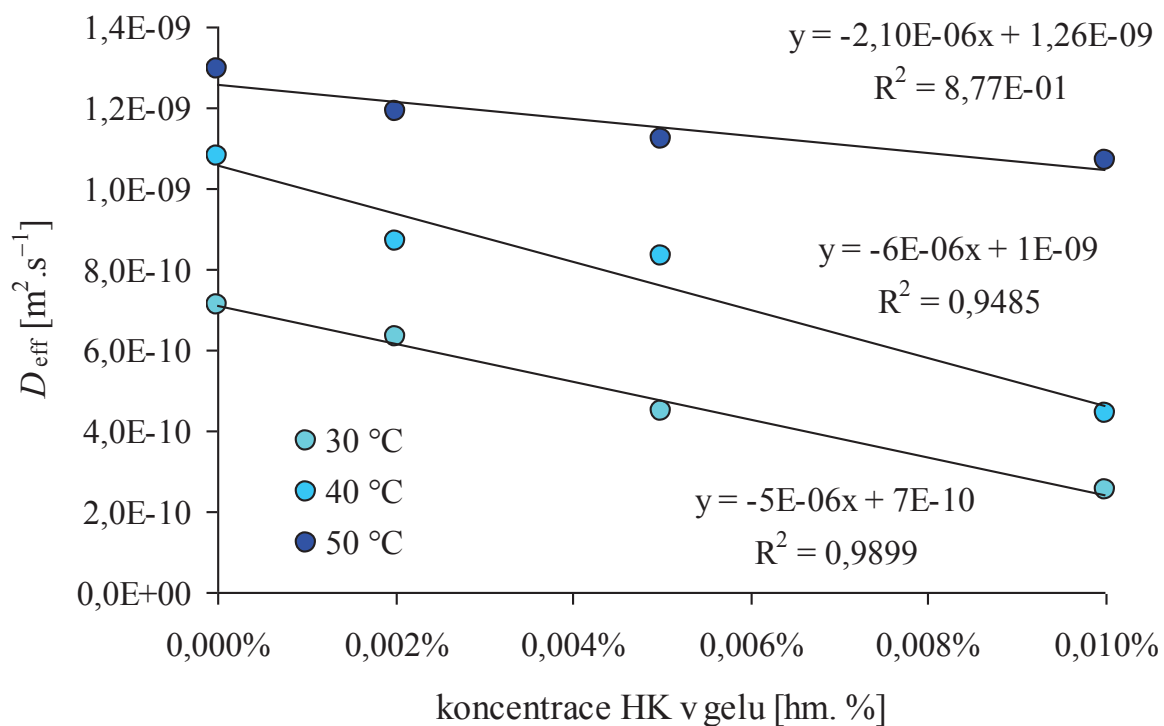
V případě huminových kyselin byly experimenty prováděny i při vyšších teplotách, jelikož při nejnižší teplotě experimentu (30 °C) byl potvrzen vliv koncentrace huminových kyselin na difúzní charakteristiky systému.

Zatímco v případě huminových kyselin docházelo s rostoucí koncentrací tohoto biopolymeru k poklesu efektivních hodnot difúzních koeficientů (viz. obrázek 50), v případě druhého zkoumaného biopolymeru (chitosan) naopak docházelo k nárůstu efektivních difúzních koeficientů (viz. obrázek 51). Výše uvedená tabulka 18 zobrazuje také čas průchodu organického barviva skrz porézní překážku, jak je patrné z uvedené tabulky, s rostoucí koncentrací biopolymeru (HK i chitosan) dochází k nárůstu času průchodu, čili zpomalování difúzního procesu. Z tohoto faktu lze usuzovat, že v systému s přidavkem biopolymeru dochází k nějaké interakci mezi difúzním médiem (organické barvivo) a difúzním systémem (agarózový gel s přidavkem biopolymeru). Konkrétní závěry jsou součástí této kapitoly.

Součástí této tabulky je taktéž absorbované množství zvoleného barviva do struktury agarózového gelu. Opět lze tvrdit, že s rostoucí koncentrací biopolymeru dochází k lineárnímu nárůstu naabsorbovaného množství barviva. Cože bylo také předpokládáno, jelikož anionaktivní biopolymer (HK) je schopen interagovat s kationaktivním barvivem (MM) a vytvářet tak agregáty. Stejný princip je pozorován také v případě druhého biopolymeru (chitosan) společně s MO, ovšem v opačném gardu.

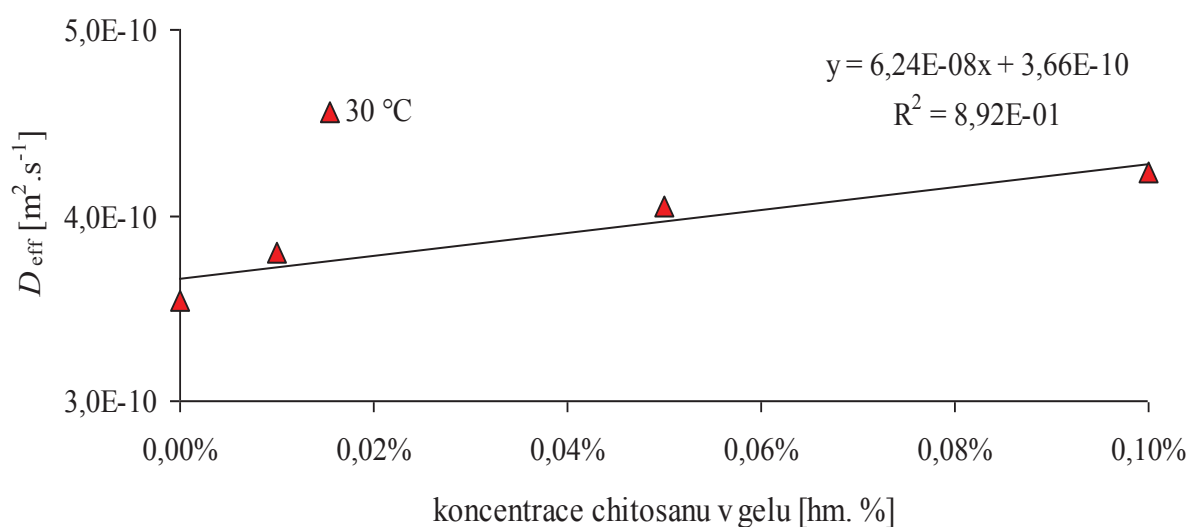
Tabulka 19: Vypočtené hodnoty rozdělovacího koeficientu ε pro agarózové gely s přidavkem biopolymeru při různých teplotách.

teplota [°C]	koncentrace HK [hm. %]	ε_{HK}	koncentrace chitosanu [hm. %]	$\varepsilon_{chitosan}$
30	0	6,8	0	0,7
	0,002	9,6	0,01	0,6
	0,005	13,3	0,05	0,3
	0,010	20,0	0,10	0,1
40	0	3,3		
	0,002	7,8		
	0,005	13,1		
	0,010	18,4		
50	0	3,5		
	0,002	8,0		
	0,005	15,0		
	0,010	22,1		



Obrázek 52: Závislost efektivního difúzního koeficientu na koncentraci HK v agarózovém gelu při různých teplotách.

Na výše uvedeném grafu (viz obrázek 52) je zobrazena závislost efektivní hodnoty difúzního koeficientu na obsahu HK v agarózovém gelu. Jak již bylo zmíněno výše, teplota výrazným způsobem ovlivňuje rychlost difúzních procesů. Vliv teploty byl studován také v případě agarózových gelů s přídavkem biopolymeru, a to v případě HK. Jak je patrné z následujících grafických závislostí, se zvyšující se koncentrací HK v agarózovém gelu dochází k drastickému poklesu efektivní hodnoty difúzního koeficientu, který probíhá lineárně. Z toho lze tedy usuzovat, že přídavek HK výrazným způsobem ovlivňuje rychlost difúze. Lze předpokládat, že HK jsou schopny interagovat s difúzním médiem (MM), což bylo také předpokládáno, jelikož HK ve své struktuře obsahují spoustu kyselých funkčních skupin, které jsou schopny disociovat a elektrostaticky interagovat s bazickou molekulou MM. Z tohoto důvodu je celý difúzní proces zpomalován a na to tím více, čím vyšší koncentrace HK je zvolena.



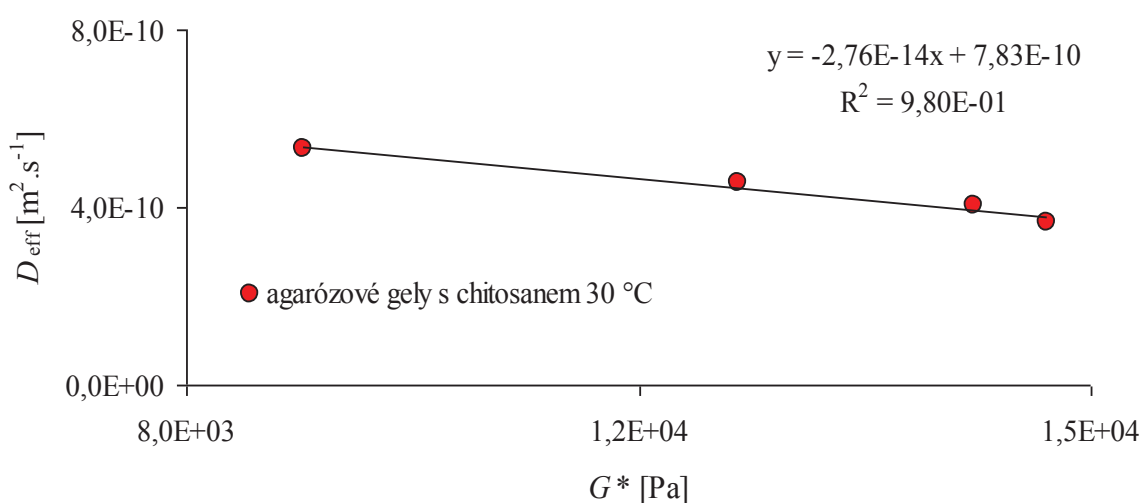
Obrázek 53: Závislost efektivního difúzního koeficientu na koncentraci chitosanu v agarózovém gelu při různých teplotách.

Stanovení difúzního koeficientu metodou difúzních cel bylo provedeno i u 1 hm. % agarózového gelu s přídavkem různého množství chitosanu. Hlavní zřetel byl brán především na stanovení reaktivity chitosanu, jak již bylo ověřeno dříve, koncentrace agarózy v gelu nemá výraznější vliv na hodnoty difúzních koeficientů v případě, že je použita MO coby difúzní médium. V tomto byl studován vliv koncentrace chitosanu na difúzní koeficienty, zda tento vliv bude výraznějším způsobem ovlivňovat rychlost difúze, navzdory výše uvedeným faktům. Naměřené a vypočtené hodnoty difúzních koeficientů a času průchodu pro jednotlivé vzorky jsou sumarizovány a diskutovány v následujících grafech a tabulkách.

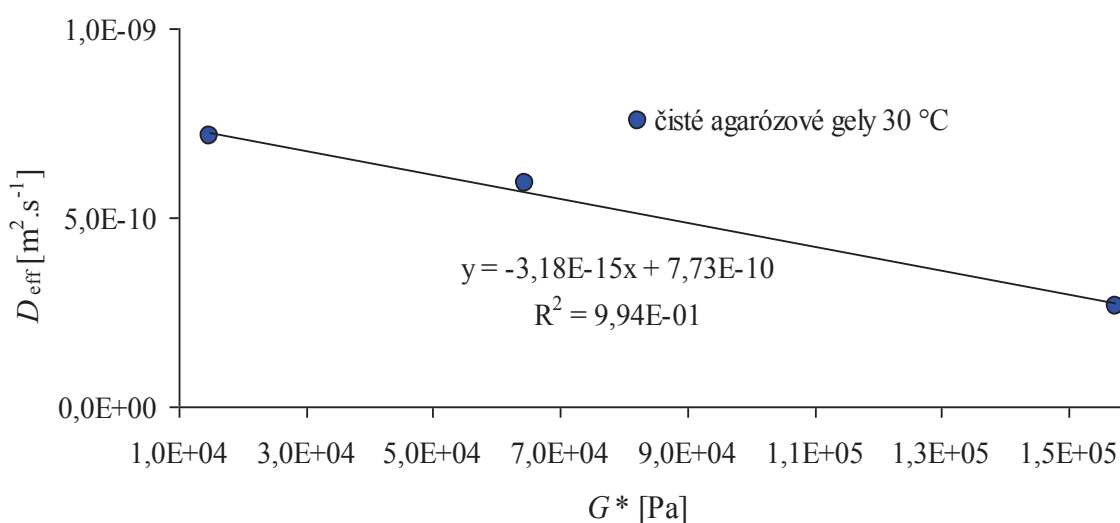
Z uvedeného grafu (viz obrázek 53) je patrné, že s rostoucí koncentrací chitosanu v agarózovém gelu dochází k pozvolnému nárůstu efektivního difúzního koeficientu, což je zajímavým faktem, jelikož z toho vyplývá, že přídavek chitosanu do difúzní matrix v podobě agarózového gelu urychluje celou difúzi. Protože se nedá předpokládat, že by nedocházelo k žádné interakci mezi chitosanem a MO (afinita chitosanu k MO je dobře známa a popsána viz například [73]), nabízí se hypotéza, že mechanismus vlivu interakce mezi přidaným biopolymerem a difundující látkou na její transport je v tomto případě naprosto odlišný. V případě, že je interakce reverzibilní, mohla by vazebná místa fungovat jako tzv.

„přenašeče“ MO, které si molekuly MO vzájemně předávají a urychlují tak jejich transport skrz gel – tento mechanismus by v případě rovnovážných sorpčních experimentů, které jsou pro systém chitosan/MO tradičně aplikovány, nebylo možné zaznamenat. Jednodušší vysvětlení uvedeného jevu by ovšem mohlo být založeno na změně mechanických vlastností gelu přidávkou chitosanu, jak bylo diskutováno v kapitole 6.1.4. Ověření obou hypotéz vyžaduje podrobnější experimentální studium.

Na následujících grafech (viz obrázek 54) je vynesena závislost efektivního difúzního koeficientu na komplexním modulu. Hlavním účelem těchto grafů mělo být zjištění, zda mírný vzestup efektivní hodnoty difúzního koeficientu souvisí se změnou mechanických vlastností připravených agarózových gelů. Jak je patrné z těchto grafů, efektivní difúzní koeficient klesá s rostoucí hodnotou komplexního modulu (se stoupající koncentrací chitosanu v agarózovém gelu) lineárně se směrnici $-2,76 \cdot 10^{-14}$.



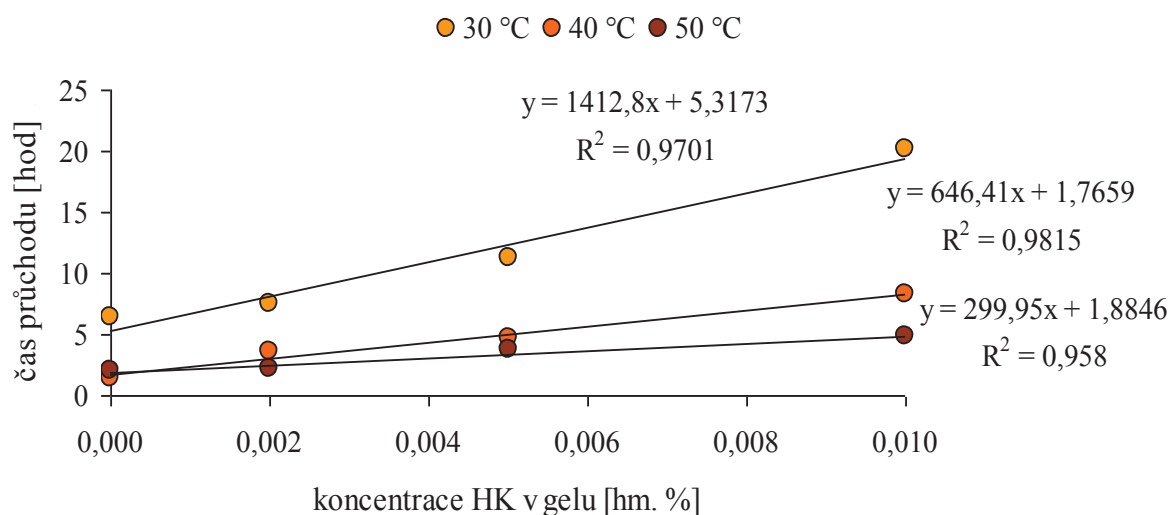
Obrázek 54: Závislost komplexního modulu agarózových gelů s přidávkou chitosanu na efektivní hodnotě difúzního koeficientu.



Obrázek 55: Závislost komplexního modulu různě koncentrovaných agarózových gelů na efektivní hodnotě difúzního koeficientu.

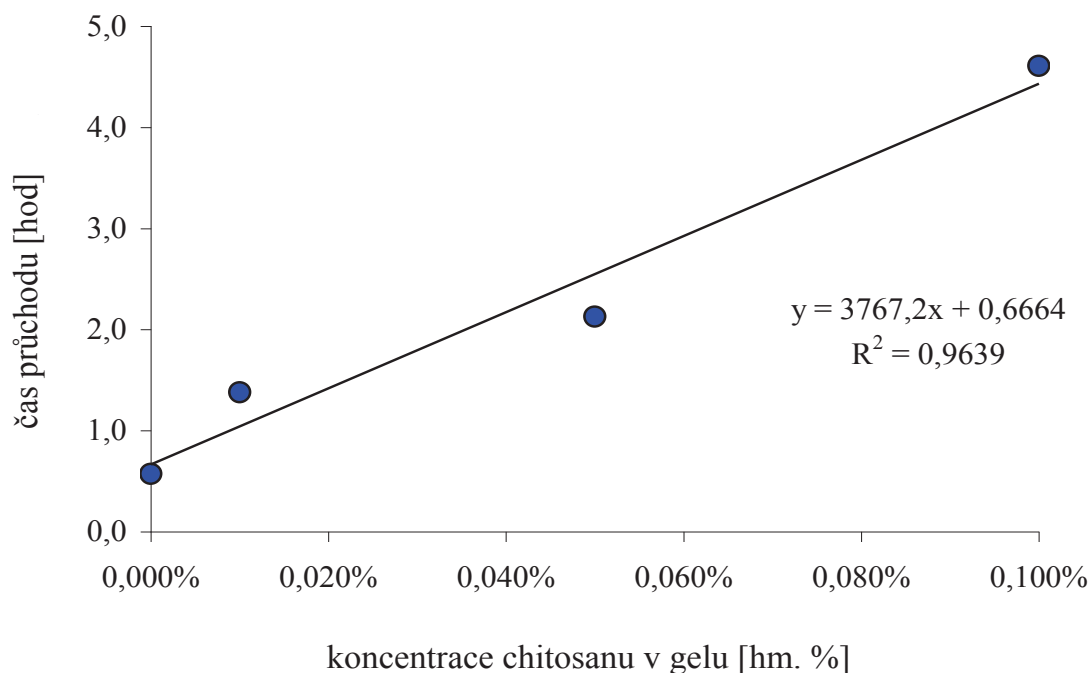
Pokud srovnáme tento pokles (viz obrázek 54) s druhou grafickou závislostí (viz obrázek 55), která taktéž zobrazuje závislost efektivního difúzního koeficientu na komplexním modulu, ovšem tentokrát pro různě koncentrované agarózové gely. Zde je patrný také lineární pokles efektivního difúzního koeficientu s klesající koncentrací agarózy v gelu (s rostoucím komplexním modulem) se směrnici $-3,18 \cdot 10^{-15}$. Srovnání směrnici těchto lineárních závislostí tedy vede k tomu, že pravděpodobnější je první zmiňovaná hypotéza, že chitosan v agarózových gelech funguje coby „přenašeč“ MO.

Volbou koncentrace HK se nemění pouze základní veličina charakterizující difúzní procesy – efektivní difúzní koeficient, ale také například čas průchodu difúzního média (viz obrázek 56). Závislost času průchodu na koncentraci HK jsou zobrazeny na níže uvedeném grafu. Jak je patrné z tohoto grafu, s rostoucí koncentrací HK ve vzorku roste také čas průchodu prvního barviva skrz porézní překážku v podobě agarózového gelu. Růst času průchodu je téměř dokonale lineární, alespoň v rozsahu měřených koncentrací HK. To jen potvrzuje fakt, že HK jsou schopny interagovat s MM, vytvářet s ní agregáty a tím pádem zpomalovat celý difúzní proces.



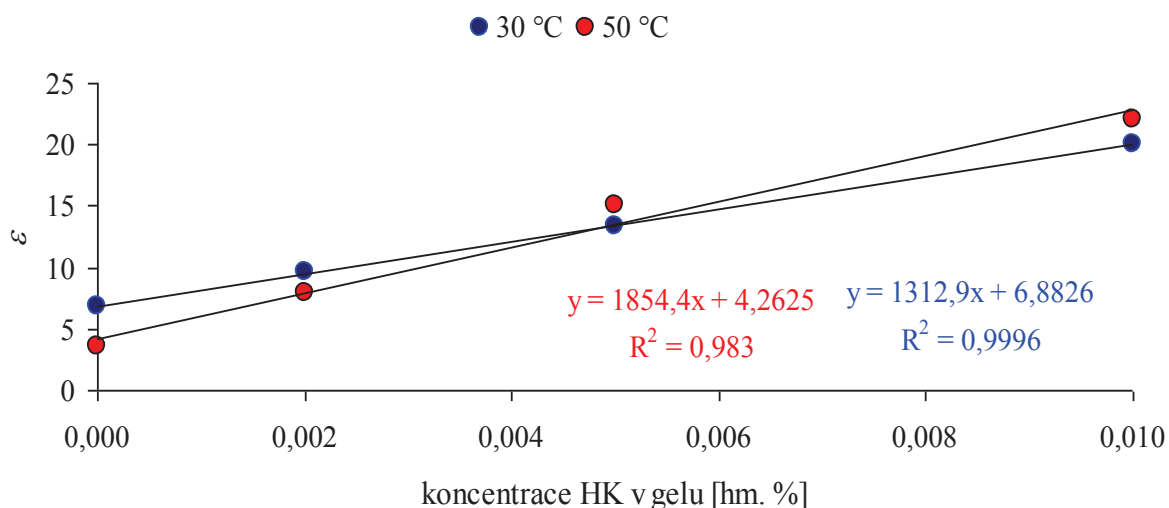
Obrázek 56: Závislost času průchodu použitého barviva pro agarózové gely s přidavkem HK na koncentraci HK při různých teplotách.

S rostoucí teplotou naopak dochází k poklesu času průchodu prvního barviva skrz porézní překážku. Hodnoty směrníc pro lineární regresní přímky s rostoucí teplotou poměrně výrazně klesají, z čehož lze usuzovat, že s rostoucí teplotou dochází k tomu, že vliv koncentrace HK je poměrně výrazně eliminován (rozdíly v času průchodu pro agarózové gely s různou koncentrací HK jsou menší, než v případě nižších teplot při které byl experiment prováděn), z čehož lze usuzovat, že teplota má mnohem větší vliv na rychlost difúze, než na interakci HK a MM. Vliv interakce na difúzní procesy se tedy při vyšší teplotě snižuje. Následující tabulka shrnuje naměřené a vypočtené hodnoty difúzního koeficientu pro různé koncentrace HK při různých teplotách.



Obrázek 57: Závislost času průchodu použitého barviva pro agarózové gely s přidavkem chitosanu na koncentraci HK při teplotě 30 °C.

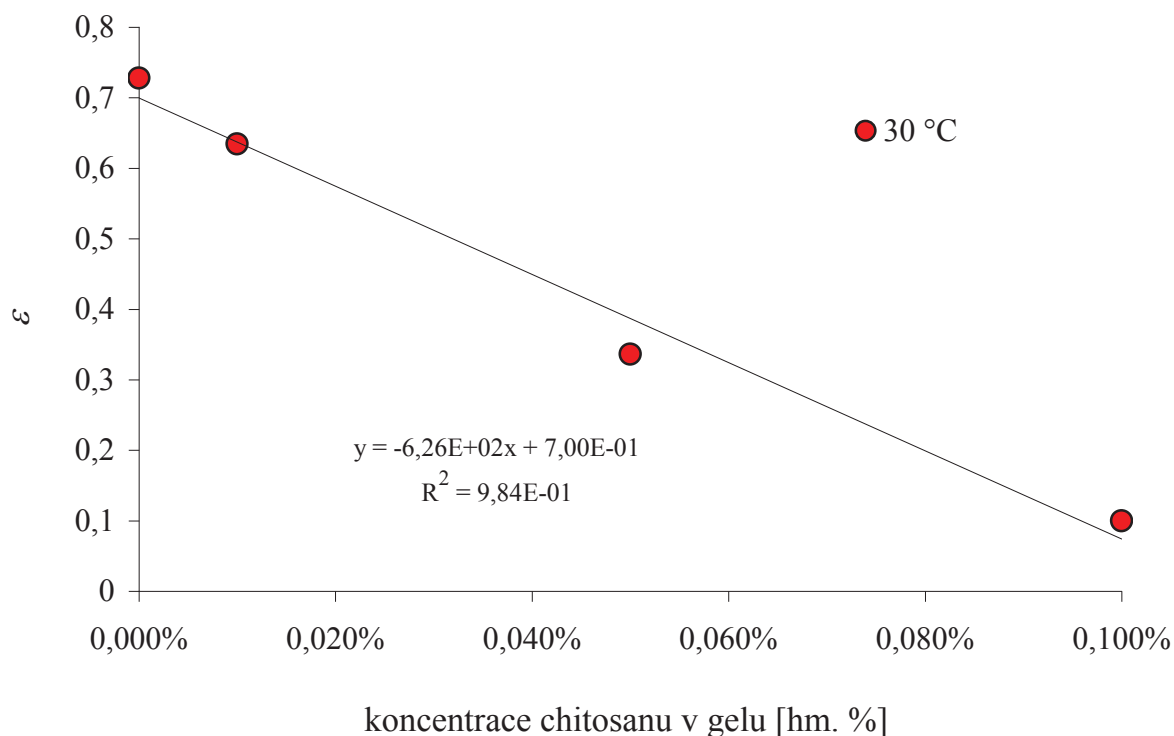
Ze závislosti času průchodu na koncentraci chitosanu v agarózovém gelu, lze usuzovat, že s rostoucí koncentrací chitosanu v agarózovém gelu dochází ke zpomalování rychlosti difúze, což je v kontrastu s výše uvedeným grafem závislosti efektivní hodnoty difúzního koeficientu na koncentraci chitosanu v agarózovém gelu. Rozdíl mezi jednotlivými časy průchodu je natolik malý, že se může pohybovat na hranici citlivosti měření.



Obrázek 58: Závislost rozdělovacího koeficient ϵ na koncentraci HK v gelu při teplotě 30 °C a 50 °C.

Z výše uvedeného grafu (obrázek 58) závislosti rozdělovacího koeficientu na koncentraci huminových kyselin v agarózovém gelu je patrné, že s rostoucí koncentrací HK dochází ke zvyšování rozdělovacího koeficientu. Při nižší teplotě experimentu (30 °C) je tento nárůst méně strmý (směrnice lineární závislosti dosahuje výrazně nižších hodnot), než v případě

experimentu při nejvyšší teplotě (50 °C), kde směrnice lineární závislosti dosahuje výrazně vyšších hodnot.



Obrázek 59: Závislost rozdělovacího koeficientu ε na koncentraci chitosanu v gelu při teplotě 30 °C.

Agarózové gely s přidavkem chitosanu tedy vykazují diametrálně odlišný trend ve srovnání s agarózovými gely s HK, zatímco HK rychlost difúze snižují a tím pádem snižují i difúzní koeficient vzhledem k výše zmíněným skutečnostem, rostoucí koncentrace chitosanu ve struktuře agarózového gelu naopak rychlost difúze zvyšuje, čímž roste také efektivní hodnota difúzních koeficientů.

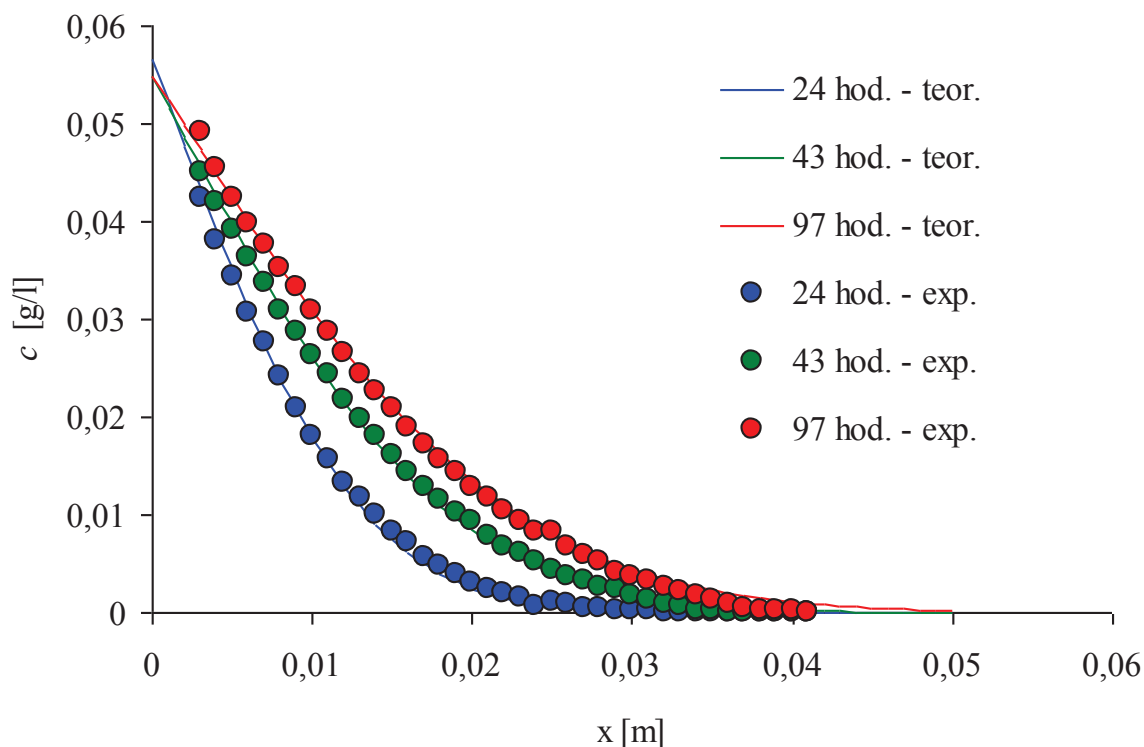
6.2.4 Stanovení difúzního koeficientu gelů s biopolymerem pro „difúzi v květech“

Dalším experimentem, kterému byly agarózové gely s přidavkem biopolymeru vystaveny byla neustálená difúze barviva v gelu. Na rozdíl od difúze realizované formou difúzní cely je v tomto případě předpokládáno, že objem zdrojového roztoku je natolik velký, že v něm vlivem difúze nedochází ke zdatelné změně koncentrace difundující látky. Difúzní koeficient je poté stanoven z koncentračních profilů difundující látky v gelu. Následující grafické závislosti a tabulky shrnují difúzní charakteristiky připravených vzorků, jejichž srovnáním lze usuzovat o reaktivitě biopolymerů.

Na níže uvedeném grafu (viz obrázek 60) je zobrazena vypočtená koncentrace methylenové modři v různých polohách květy s agarózovými gely s různou koncentrací biopolymeru (huminných kyselin). Z těchto koncentračních profilů lze poté vypočítat základní parametry charakterizující difúzní procesy (efektivní difúzní koeficient).

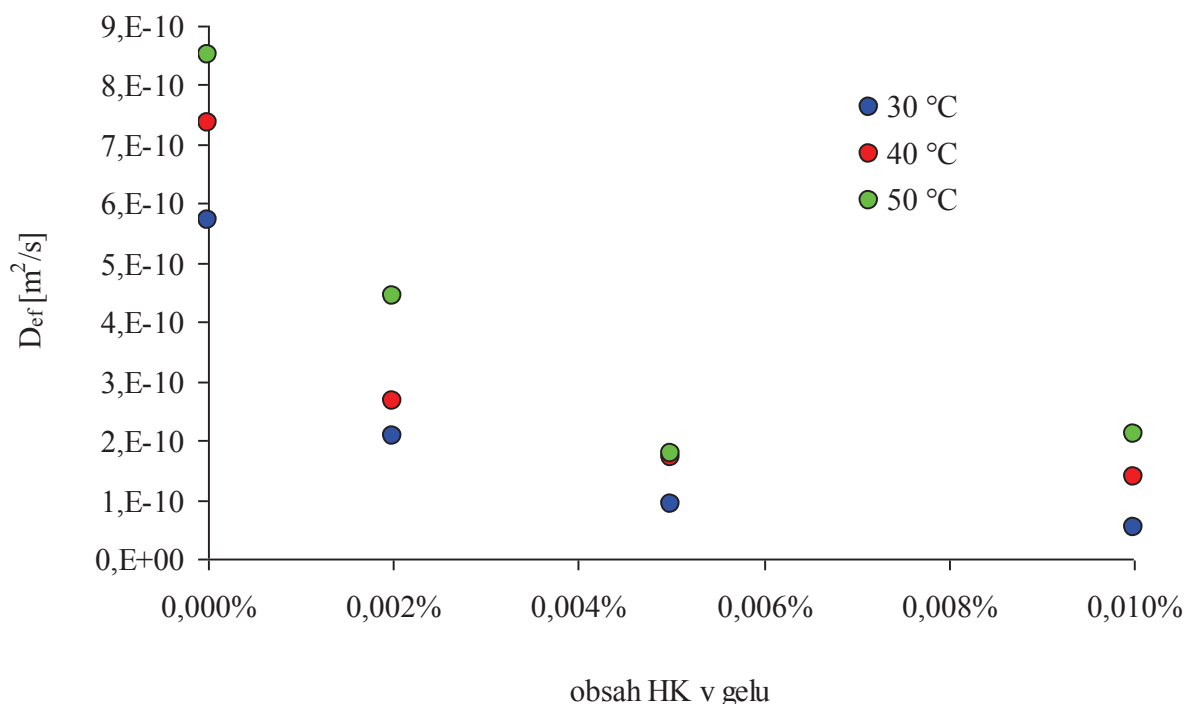
Experimentální koncentrační data byla proložena nelineární regresí (rovnice 12) a parametry D_{eff} a koncentrace na rozhraní byly stanoveny iteračně metodou nejmenších čtverců pomocí nástroje Řešitel programu Microsoft Excel. Pomocí MS Excel funkce Řešitel

byla vypočtena také teoretická koncentrace v různých časech a pro různé teploty, která by měla korelovat s naměřenými daty, což ve většině případů bylo splněno.



Obrázek 60: Vypočtené hodnoty koncentrace MO v 1 hm. % agarózovém gelu v různých polohách kyvety.

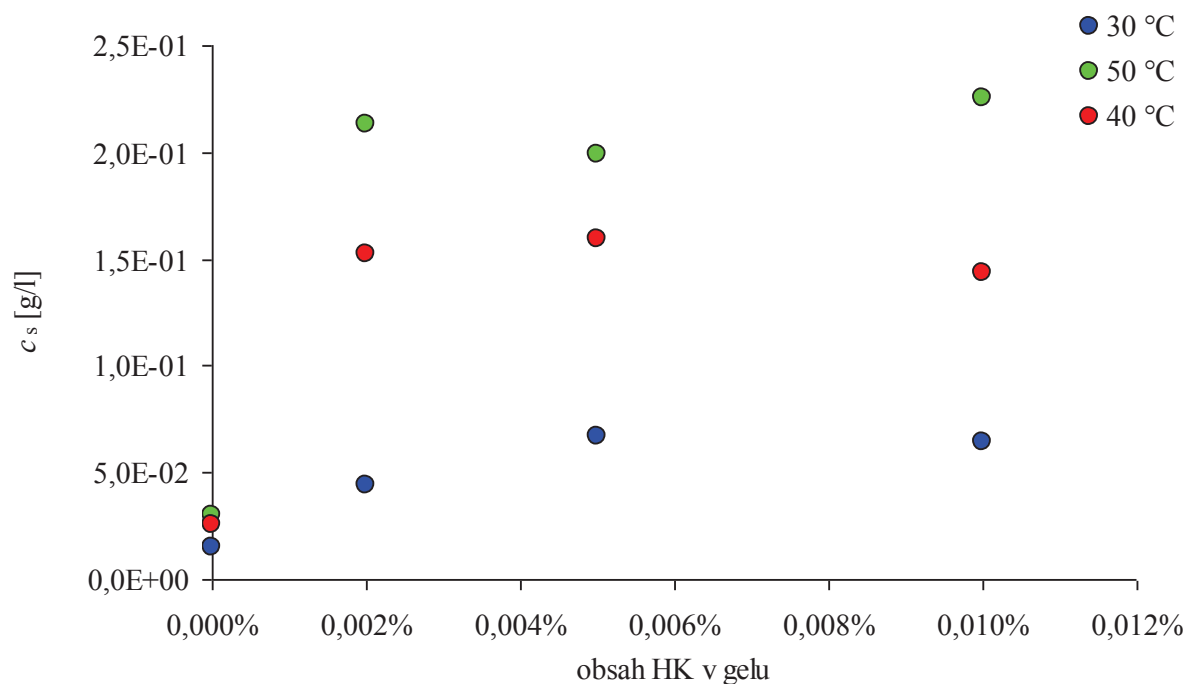
Na následujícím grafu (viz obrázek 61) je zobrazena závislost efektivní hodnoty difúzního koeficientu na obsahu HK v agarózovém gelu. Zároveň byla studována také závislost difúzních koeficientů na teplotě, stejně jako v případě difúzních cel (opět pouze pro HK). Na rozdíl od difúzních cel, efektivní hodnota difúzního koeficientu klesá s rostoucí koncentrací HK v gelu exponenciálně. Tento fakt je způsoben tím, že princip difúze je diametrálně odlišný, než v případě difúze v difúzních celách. Stejně jako pomocí difúzních cel, tak také pomocí difúze v kyvetách byl ověřován vliv biopolymeru (HK) na rychlost difúze. Ze zobrazeného grafu lze usuzovat, že HK coby anionkativní biopolymer jsou schopny interagovat s MM a tím pádem zpomalovat celý difúzní proces. Z tohoto grafu lze usuzovat o difúzi barviva skrz agarózový gel s přidavkem HK, vliv HK je zřejmý. Na druhou stranu koncentrace barviva na rozhraní roste společně s rostoucí koncentrací HK, což potvrzuje druhá grafická závislost. Nejmarkantnější nárůst je pozorován při nejvyšší zkoumané teplotě experimentu, při 50 °C. Lze tedy tvrdit, že huminové kyseliny mají poměrně velkou afinitu vzhledem k použitému barvivu, mnohem větší, než v případě dalšího studovaného biopolymeru (chitosan). Výsledky pro kationativní chitosan jsou také součástí této kapitoly a jsou uvedeny níže.



Obrázek 61: Závislost efektivního difúzního koeficientu na hmotnostní koncentraci HK v gelu.

Následující graf (viz obrázek 62) zobrazuje závislost koncentrace methylenové modři na rozhraní gel - roztok na obsahu HK ve vzorku. Jak je patrné z tohoto grafu, s rostoucí koncentrací HK v agarózovém gelu dochází ke zvyšování koncentrace na rozhraní. Takto byla experimentálně ověřena afinita HK k MM, zmiňovaná v předchozí kapitole v souvislosti s rozdělovacím koeficientem na rozhraní ε . Zvyšování koncentrace na rozhraní vede k vyššímu koncentračnímu gradientu MM, což by mělo přispívat ke zrychlování difúze barviva do struktury agarózových gelů. Tento proces je ovšem kompenzován HK, které jsou schopny interagovat s methylenovou modří a tím pádem celou difúzi zpomalovat. Zmíněné dva procesy tedy působí protichůdně, s tím rozdílem, že interakce mezi huminovými kyselinami a MM má mnohem větší vliv, než v případě zvyšování koncentrace na rozhraní.

Na níže uvedeném grafu (viz obrázek 62) je zobrazena závislost nasorbovaného množství methylenové modři na obsahu huminových kyselin v hydrogelu. Jak je patrné z této grafické závislosti, s rostoucí koncentrací huminových kyselin v agarózovém hydrogelu dochází při nízkých koncentracích huminových kyselin k poměrně razantnímu nárůstu nasorbovaného množství methylenové modři, tento nárůst je ovšem neměnný v případě vyšších koncentrací huminových kyselin v gelu. Tento fakt je pravděpodobně způsoben tím, že při nízkých koncentracích huminových kyselin se vyčerpá veškerá sorpční kapacita agarózového gelu vůči methylenové modři a vyšší koncentrace HK tedy již nemají šanci zvýšit tuto kapacitu. Pravděpodobně z tohoto důvodu je poté nasorbované množství MM neměnné.



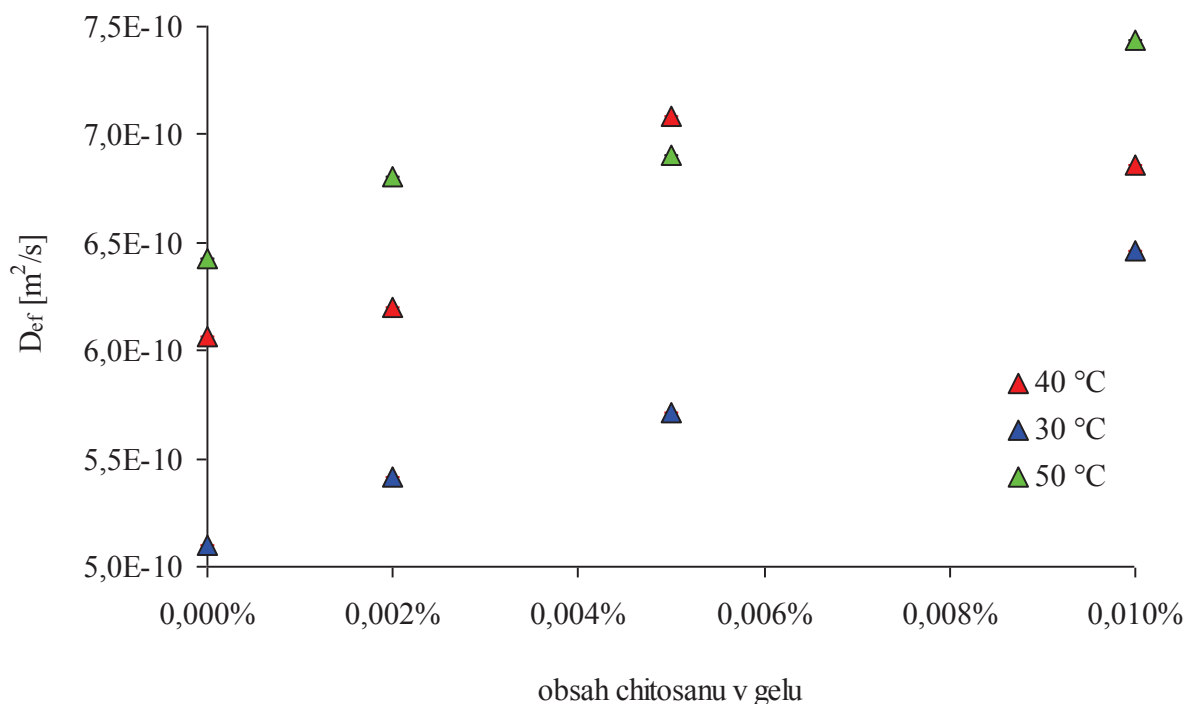
Obrázek 62: Závislost koncentrace MM na rozhraní roztok - gel na obsahu HK v agarózovém gelu.

Experimentálně byl také ověřen vliv teploty na difúzi vybraného organického barviva (MM) skrz agarózové gely s přidavkem HK. Jak je patrné z tohoto grafu, se zvyšující se teplotou dochází k poměrně rapidnímu nárůstu difúzního koeficientu při všech koncentracích huminových kyselin, stejně tak také dochází k nárůstu nasorbovaného množství methylenové modři do struktury agarózových gelů s rostoucí teplotou. Lze tedy tvrdit, že teplota má pozitivní vliv na sorpční kapacitu zkoumaných materiálů.

Obdobný experiment, čili difúze barviva do agarózových gelů s přidavkem biopolymeru byl proveden také u gelů s přidavkem chitosanu. Jako difúzní médium bylo použito barvivo methylenová oranž (MO). Vypočtené hodnoty difúzních koeficientů jsou zobrazeny na následujících grafických závislostech. Difúzní experiment z nekonečného zdroje byl prováděn stejně jako v případě huminových kyselin při různých teplotách. Velká pozornost byla věnována především vlivu teploty na rychlost difúzních procesů a samozřejmě také vlivu přidavku biopolymeru k 1 hm. % agarózovému gelu.

Metodou difúze z nekonečného zdroje byla zkoumána také reaktivita chitosanu. Naměřené výsledky jsou sumarizovány v tabulkách a grafech uvedených níže.

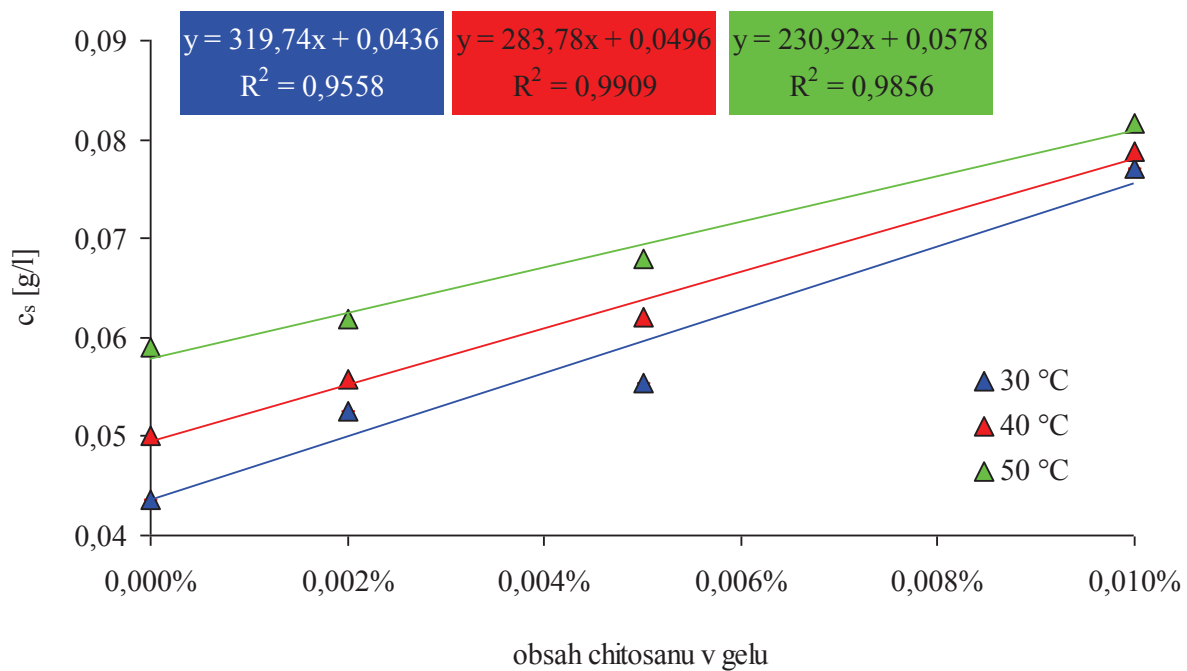
První graf (viz obrázek 63) zobrazuje závislost efektivní hodnoty difúzního koeficientu pro agarózové gely s různým přidavkem chitosanu v závislosti na teplotě. Jak je patrné z tohoto grafu, s rostoucí teplotou roste také difúzní koeficient, nejmarkantnější rozdíl je pozorován v rozmezí teplot 30 °C až 40 °C, především u čistého agarózového gelu bez přidavku chitosanu. Dalším aspektem, který byl bedlivě sledován, je změna hodnoty difúzních koeficientů v závislosti na rostoucí koncentraci chitosanu v gelu. S rostoucí koncentrací chitosanu dochází k nárůstu difúzního koeficientu prakticky lineárně, jediná odchylka je pozorována pouze u koncentrace 0,005 hm. % chitosanu v gelu u teploty 40 °C. V tomto případě se jedná pravděpodobně o chybu měření.



Obrázek 63: Závislost efektivního difúzního koeficientu na hmotnostní koncentraci chitosanu v agarózovém gelu pro různé teploty experimentu.

Zajímavým faktem je srovnání nastoleného trendu v růstu respektive poklesu hodnot difúzního koeficientu pro chitosan a huminové kyseliny. Zatímco v případě huminových kyselin klesá efektivní hodnota difúzního koeficientu exponenciálně, jelikož dochází k interakci huminových kyselin s difúzním médiem – methylenovou modří. V případě chitosanu dochází k pozvolnému lineárnímu nárůstu efektivních hodnot difúzních koeficientů. To potvrzuje výsledky stanovené metodou difúzních cel. Pro vysvětlení tohoto jevu by bylo zapotřební experimentálně ověřit hypotézy, předložené v předchozí kapitole.

Další graf (viz obrázek 64) zobrazuje závislost koncentrace použitého difúzního média na rozhraní kyvety. Jak je patrné z tohoto grafu, s rostoucí koncentrací chitosanu v agarózovém gelu dochází k lineárnímu nárůstu koncentrace na rozhraní. V případě nejnižší zkoumané teploty (30 °C) se tato koncentrace zvyšuje s rostoucí koncentrací chitosanu v gelu s nejstrmější směrnicí, zatímco v případě nejvyšší teploty 50 °C se směrnicí s nejmenším sklonem. Z toho lze usuzovat, že teplota má nejvyšší vliv na difúzní procesy v čistých agarózových gelech, zatímco v gelech s přídavkem chitosanu je vliv teploty mnohem menší. Rostoucí trend koncentrace na rozhraní odporuje naměřeným hodnotám v případě studia reaktivity chitosanu formou difúzní cely, jelikož v případě difúzních cel byla ověřena záporná afinita vůči methylenové oranži, takže dle teoretických předpokladů by s narůstající koncentrací chitosanu v agarózovém gelu mělo docházet k poklesu koncentrace methylenové oranž na rozhraní kyvety. Zobrazená grafická závislost má však stoupající tendenci. Tento fakt je pravděpodobně způsoben tím, že „difúze v kyvetách“ probíhá jiným mechanismem, než v případě difúzních procesů probíhajících v difúzní cele.



Obrázek 64: Závislost vypočtené koncentrace difúzního média na rozhraní roztok - gel na hmotnostní koncentraci chitosanu v agarózovém gelu pro různé teploty experimentu.

7 ZÁVĚR

Tato diplomová práce je zaměřena na studium a porovnání reaktivity přírodních biopolymerů formou difúzních procesů. Klíčovou náplní přiložené práce je laboratorní optimalizaci difúzních technik a objasnění metodiky v čele s difúzními procesy probíhajícími v difúzní cele a difúze z nekonečného zdroje probíhající v kvetách.

Difúzní procesy byly charakterizovány určováním difúzních koeficientů jako univerzálního hodnotícího parametru reaktivity biopolymerů, včetně ověření platnosti matematického aparátu použitého pro relevantní vyhodnocení naměřených dat. Hlavní pozornost je věnována interakci vybraných biopolymerních látek s difúzním médiem v podobě organického barviva. Klíčovými parametry, jejichž vliv na difúzní procesy byl studován, byly především teplota, při které dané difúzní procesy probíhaly a také koncentrace daného biopolymeru.

Obecně lze říci, že jeden z vybraných biopolymerů, konkrétně HK, vykazoval vysokou afinitu vzhledem k organickému barvivu (MM), vzhledem k tomu, že huminové kyseliny coby anionaktivní biopolymer jsou schopny interagovat s MM coby katioaktivním barvivem. Předpoklad interakce HK s MM byl dosvědčen oběma použitými metodami, jak studiem difúzních procesů v difúzní cele, tak také studiem difúzních procesů z nekonečného zdroje v kvetách. V případě chitosanu je mechanismus transportu v připravených gelech složitější, jelikož nárůst efektivního difúzního koeficientu s rostoucí koncentrací CHIT v agarózovém gelu nebyl tak rapidní, jako v případě poklesu difúzního koeficientu u HK. Nepatrný stoupající trend u chitosanu sice pozorovatelný je, ovšem je nutno ověřit ještě jinými metodami studia reaktivity biopolymerů, zda se skutečně jedná o důsledek interakce CHIT s vybraným organickým barvivem. Vzhledem k tomu, že existuje velké množství publikací prokazujících interakci chitosanu s MO, tak lze předpokládat, že k interakci dochází. Malé rozdíly v efektivních hodnotách difúzního koeficientu mohou být způsobeny buď velmi nízkou koncentrací chitosanu, popřípadě nevhodně zvoleným pH roztoku chitosanu (řetězce methylenové oranži mohou při nevhodně zvoleném pH vytvářet natáhnuté řetězce a z tohoto důvodu by mohly agarózovými gely procházet velmi hladce bez jakékoliv interakce s CHIT).

Difúzní procesy se jeví jako vhodná metoda pro studium reaktivity vybraných biopolymerů, vzhledem k tomu, že stanovení difúzního koeficientu metodou difúzní cely je elegantní a nenáročná metoda charakterizace gelových systémů s přidavkem biopolymeru. Jak již naznačují naměřená experimentální data, difúzní experimenty s vhodně zvolenou a připravenou gelovou formou s přidavkem biopolymeru nabízí zcela nové možnosti studia, modelování transportu a interakce nízkomolekulárních látek s gelovými maticemi obsahujícími zkoumané biopolymery. Tuto metodiku je také možno použít jako inovativní nástroj pro studium a porovnání reaktivity jednotlivých biopolymerů.

Hlavním přínosem této diplomové práce je především optimalizace difúzní technik a objasnění metodiky, vzhledem k tomu, že difúzní technicky by měly sloužit jako univerzální nástroj pro studium a charakterizaci jednotlivých biopolymerů. Další parametry, které by měly být studovány a plynule by měly navazovat na přiloženou práci, jsou především vliv pH iontové síly na difúzní procesy. Dále by měla být studována a porovnávána reaktivita jiných biopolymerů, nejen zde zmíněnými metodami, ale také jinými inovativními metodami jako například DLS. Experimentálně získaná data by měla být korelována také s paralelně probíhajícími počítačovými simulacemi za použití vhodného softwaru (např. program COMSOL Multiphysics).

8 POUŽITÁ LITERATURA

- [1] ČOUPEK, P. *Online – Geologická encyklopedie* [online]. 25.1.2008 [cit. 2010-04-07]. Geologická encyklopedie. Dostupné z WWW: <<http://www.geology.cz>>.
- [2] PITTER P. *Hydrochemie*. 4th ed. Praha: VŠCHT Praha, 2009, ISBN 978-80-7080-701-9.
- [3] WEBER, J.: *Definition of soil organic matter*, Humintech. [online]. poslední úprava: 2004-10-24, [citováno: 2011-10-28]. Dostupné z: <<http://www.humintech.com>>.
- [4] SKOKANOVÁ, M, DERCOVÁ, K. Humínové kyseliny. Pôvod a štruktúra. *Chemické listy*. 2008, č. 102, s. 262-265.
- [5] Piccolo, A., Humus and Soil Conservation. In *Humic substances in terrestrial ecosystems*. Ed. A. Piccolo, Elsevier, Amsterdam, 1996. pp. 225-264
- [6] DeBANO, F. L. Water repellency in soils: a historical overview. *Journal of Hydrology*. 2000, 231, 232, s. 4-32. Dostupný také z WWW: <www.elsevier.com/locate/jhydrol>.
- [7] SCHNITZER, M, KHAN, S., U.: *Humic substances in the environment*. MARCEL DEKKER, INC., New York, 1972.
- [8] SEDLÁČEK, P. *Hydrogely huminových kyselin - experimentální model i aplikační forma*. Ph.D. thesis. Brno: VUT v Brně, Fakulta chemická, 2009. 139 s.
- [9] VRBA, V, HULEŠ, L. Humus – půda – rostlina (2) Humus a půda. *Biom.cz* [online]. 2006-11-14 [cit. 2011-10-28]. Dostupné z WWW: <<http://biom.cz/cz/odborne-clanky/humus-puda-rostlina-2-humus-a-puda>>. ISSN: 1801-2655.
- [10] STATHI, Panagiota; DELIGIANNAKIS, Yiannis. Humic acid-inspired hybrid materials as heavy metal absorbents. *Journal of Colloid and Interface Science* [online]. 30.6.2010, 351, [cit. 2011-07-07]. Dostupný z WWW: <www.sciencedirect.com>.
- [11] CRISTL, I.; MILNE, C.J.; KINNIBURGH, D.G.; KRETZSCHMAR, R., *Environ. Sci. Technol.* 35 (2001) 2512.
- [12] DE LA ROSA, J.M.; SANTOS, M.; ARAÚJO, M.F. Metal binding by humic acids in recent sediments from the SW Iberian coastal area. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* [online]. 4.7.2011, 234, [cit. 2011-07-07]. Dostupný z WWW: <www.sciencedirect.com>.
- [13] FENG, Hua-Jun, et al. Study on biosorption of humic acid by activated sludge. *Biochemical Engineering Journal* [online]. 11.11.2007, 39, [cit. 2011-07-07]. Dostupný z WWW: <www.pubs.acs.org>.
- [14] SINGH, B.K.; BHADAURIA, Jyoti; TOMAR, Radha. Effect of humic acid on sorption of trace metal ions by sodium aluminosilicate. *Desalination* [online]. 6.11.2010, 268, [cit. 2011-07-07]. Dostupný z WWW: <www.sciencedirect.com>.
- [15] LIN, Jianwei; ZHAN, Yanhui; ZHU, Zhiliang. Adsorption characteristics of copper (II) ions from aqueous solution onto humic acid-immobilized surfactant-modified zeolite. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* [online]. 29.3.2011, 384, [cit. 2011-07-07]. Dostupný z WWW: <www.sciencedirect.com>.
- [16] STEVENSON, F.J. *Humus Chemistry: Genesis, Composition, Reactions*. New York, USA : Wiley-Interscience Publ., 1982. 496 s.

- [17] KALINA, M. *Využití průtokové coulometrie ve studiu transportu kovových iontů v huminových gelech*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2010. 69 s. Vedoucí diplomové práce doc. Ing. Martina Klučáková, Ph.D.
- [18] PERDUE, E. Michael. *International humic substances society* [online]. 2003 [cit. 2011-07-30]. IHSS Welcome Page. Dostupné z <http://www.ihss.gatech.edu/>.
- [19] KICKUTH, R., SCHEFFER, F.: Constitutive and nutritive properties of the so-called pseudo-amide nitrogen from humic acids. *Agrochimica*, 1976, vol. 20, no. 4 – 5, pp. 373 – 386.
- [20] SUTTON, R., SPOSITO, G., Molecular structure in soil substances: The new view. *Environmental science and Technology* [online]. 2005, 39, 23 [cit. 2011-07-30]. Dostupný z WWW: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16382919>.
- [21] SEDLÁČEK, P.: *Difúze kovových iontů v huminových gelech*. Brno, 2006, 70 s., Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická. Vedoucí diplomové práce doc. Ing. Martina Klučáková, Ph.D.
- [22] SEIN, L. T. Jr., VARNUM, J. M., JANSEN, S.A.: Conformation Modeling of a New Building Block of Humic acid: Approaches to the Lowest Energy Conformer, *Environmental Science and Technology*, 1999, vol. 33, pp. 546 – 552 [cit. 2011-07-30]. Dostupný z WWW: <http://www.sciencedirect.com>.
- [23] Schmeide, K. a kol.: Uranium(IV) sorption onto phyllite and selected minerals in the presence of humic acid. *Radiochim. Acta*, 2000, vol. 88, pp. 723 – 728.
- [24] Peña- Mendéz, E. M., Havel, J. a Patočka, J.: Humic substances – compounds of still unknown structure: applications in agriculture, industry, environment and biomedicine. *J. Appl. Biomed.* 3 (2005), 13 – 24.
- [25] KHOR, E. Chitin: a biomaterial in waiting (review). *Current Opinion in Solid State and Material Science* [online]. 2002, 6, [cit. 2011-08-11]. Dostupný z WWW: www.sciencedirect.com.
- [26] KHOR, E.; YOUNG, L. Lim. Implantable applications of chitin and chitosan. *Biomaterials* [online]. 2003, 24, [cit. 2011-08-11]. Dostupný z WWW: www.pubs.acs.org.
- [27] KURITA, K. Chitin and Chitosan: Functional Biopolymers from Marine Crustaceans (mini-review). *Marine Biotechnology* [online]. 2006, 8, [cit. 2011-08-11]. Dostupný z WWW: www.pubs.acs.org.
- [28] SYNOWIECKI, J.; AL-KHATEEB, N. Production, Properties and some New Applications of Chitin and Its Derivatives. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* [online]. 2003, 43(2), [cit. 2011-08-11]. Dostupný z WWW: www.pubs.acs.org.
- [29] RAVI KUMAR, M.N.V. A review of chitin and chitosan applications (review). *Reactive and Functional Polymers* [online]. 2008, 46, [cit. 2011-08-11]. Dostupný z WWW: www.sciencedirect.com.
- [30] DODANE, V.; VILIVALAM, V.D. Pharmaceutical applications of chitosan. *PSIT* [online]. 1998, 1(6), [cit. 2011-08-11]. Dostupný z WWW: www.pubs.acs.org.
- [31] SYNTHESIS AND CHARACTERIZATION OF CHITOSAN ALKYL PHOSPHATE: [online]. 2006 [cit. 2011-08-11]. *Journal of Chilean Chemical Society*. Dostupné z WWW: http://www.scielo.cl/scielo.php?pid=S0717-97072006000100011&script=sci_arttext.
- [32] HIROSHI, Ueno; TAKASHI, Mori; TORU, Fujinaga. Topical formulations and wound healing applications of chitosan. *Advanced Drug Delivery Reviews* [online]. 5.11.2001, 52, [cit. 2011-08-12]. Dostupný z WWW: www.sciencedirect.com.

- [33] TEIXEIRA, M. A., et al. Assessment of chitosan gels for the controlled release of agrochemicals. *Ind. Eng. Carbohydr. Polym.* [online]. 2007, 67, [cit. 2011-08-12]. Dostupný z WWW: <www.sciencedirect.com>.
- [34] FAN, J., et al. Preparation of galactosylated hyaluronic acid/chitosan scaffold for liver tissue engineering. US National Library of Medicine National Institutes of Health [online]. 1.12.2009, 26(6), [cit. 2011-08-12]. Dostupný z WWW: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>>.
- [35] UNIVERSITY OF HAMBURG. Botany online: Cell walls of Algae [online]. 1. vyd. [cit. 2012-02-17]. Dostupné z: <http://www.biologie.uni-hamburg.de/b-online/e26/26d.htm>.
- [36] RENN, Donald W. Agar and agarose: Indispensable partners in biotechnology. *Ind. Eng. Chem. Prod. Res. Dev.* 1984, č. 23, s. 5.7. Dostupné z: www.sciencedirect.com.
- [37] RINAUDO, Marguerite. Main properties and current applications of some polysaccharides as biomaterials. *Polym Int.* 2008, roč. 2008, č. 57, 397 - 430. Dostupné z: www.sciencedirect.com.
- [38] FUJII, T., T. YANO, H. KUMAGAI a O. MIYAWAKI. Scaling analysis on elasticity of agarose gel near the sol-gel transition temperature. *Food hydrocolloids.* 2000, č. 14. Dostupné z: www.sciencedirect.com.
- [39] <http://vydavatelstvi.vscht.cz>. *Vydavatelství VŠCHT* [online]. [cit. 2012-03-04]. Dostupné z: http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid_es-001/hesla/disperzni_system.html.
- [40] Selby HH and Wynne WH, Agar, in *Industrial Gums. Polysaccharides and Their Derivatives*, ed. by Whistler RL. Academic Press, New York/San Francisco/London, pp. 29–48 (1973).
- [41] Sand RE and Glickmans M, Seaweed extracts of potential economic importance, in *Industrial Gums. Polysaccharides and Their Derivatives*, ed. by Whistler RL. Academic Press, New York/San Francisco/London, pp. 147–194 (1973).
- [42] NOVÁK, J.: Fyzikální chemie – bakalářský a magisterský kurz. 1st ed. Praha : VŠCHT Praha, 2008. ISBN 978-80-7080-675-3.
- [43] POUCHLÝ, J.: Fyzikální chemie makromolekulárních a koloidních soustav. VŠCHT v Praze, 2001. ISBN 80-7080-422-x.
- [44] SEDLÁČEK, P. *Reologie gelů – stručný přehled*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2007. 34 s.
- [45] BARTOVSKÁ L., ŠIŠKOVÁ M.: Fyzikální chemie povrchů a koloidních soustav. VŠCHT v Praze, 2002, p. 163–168. ISBN 80–7080–475–0.
- [46] SMILEK, J. *Reologie huminového gelu*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2010. 52 s. Vedoucí bakalářské práce doc. Ing. Martina Klučáková, Ph.D.
- [47] Fears, M. A. a kol.: Syneresis and rheology of weak colloidal particle gels. *Colloids Surf., A*, 2006, vol. 288, no. 1 – 3, pp. 170-179.
- [48] MASARO, L., ZHU, X., X.: Physical models of diffusion for polymer solutions, gels and solids. *Progress in polymer science*, číslo 24, 1999. s. 731 – 775.
- [49] ABART, R. a PETRISHCHEVA E.. Mathematics of Diffusion Problems. In: [online]. Free University Berlin, 2006 [cit. 2012-03-11]. Dostupné z: http://www.geo.fu-berlin.de/geo/fachrichtungen/geochemhydromin/mineralogie/pdf/Math_of_diffus.pdf

- [50] ATKINS, P., DE PAULA, J.: *Atkins' physical chemistry*, 7th ed., Oxford University Press, 2002. ISBN 0-19-879285-9.
- [51] DOJČANSKÝ, J., LONGAUER, J.: *Chemické inžinierstvo II*, 1. vydání. Bratislava 2000, PPA Bratislava. ISBN 80-967064-8-9.
- [52] NOVÁK, J. P.: *Fyzikální chemie II*. Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 2001. ISBN 80-7080-436-x.
- [53] CRANK, J.: *The Mathematics of Diffusion*, 2nd ed. Oxford: Clarendon Press 1975.
- [54] CARSLAW, H.S., Jaeger, J.C. *The Conduction of Heat in Solids*, 2nd Ed., Oxford 1986.
- [55] CUSSLER, E.L. *Diffusion: Mass Transfer in Fluid Systems*, Cambridge University Press, Cambridge, 1984.
- [56] YANKOV, D. Diffusion of glucose and maltose in polyacrylamide gel. *Enzyme and Microbial Technology* [online]. 2004, roč. 4, č. 6 [cit. 2012-03-22]. Dostupné z: www.sciencedirect.com
- [57] GUTENWIK, J, B NILSSON a A AXELSSON. Determination of protein diffusion coefficients in agarose gel with a diffusion cell. *Biochemical Engineering Journal* [online]. 2004, roč. 1, č. 19 [cit. 2012-03-22]. Dostupné z: www.sciencedirect.com
- [58] SEBTI, I, D BLANC, A CARNET-RIPOCHE, R SAUREL a V COMA. Experimental study and modeling of nisin diffusion in agarose gels. *Journal of Food Engineering* [online]. 2004, č. 63 [cit. 2012-03-22]. Dostupné z: www.sciencedirect.com
- [59] SAVARY, G, C MOREAU a N CAYOT. Impact of the composition of polysaccharide composite gels on small molecules diffusion: A rheological and NMR study. *Food Research International* [online]. 2010, č. 43 [cit. 2012-03-22]. Dostupné z: www.sciencedirect.com
- [60] TSUNOMORI, F a H USHIKI. Pore size effect on diffusion coefficient of rhodamine B in PNIPA gel. *Physics Letters A* [online]. 1999, č. 258 [cit. 2012-03-22]. Dostupné z: www.sciencedirect.com
- [61] García-Gutiérrez, M. a kol.: Overview of laboratory methods employed for obtaining diffusion coefficients in FEBEX compacted bentonite. *J. Iberian Geol.*, 2006, vol. 32, no. 1, pp. 37 – 53.
- [62] Hlaváč, J. *Základy technologie silikátů*. Druhé upravené vydání. Praha 1988. SNTL – Nakladatelství technické literatury, n. p.
- [63] Lakatos, I., Lakatos-Szabó, J.: Diffusion of chromium ions in polymer/silicate gels. *Colloids Surf., A*, 1998, vol. 141, pp. 425 – 434.
- [64] Lakatos, I., Lakatos-Szabó, J.: Diffusion of H⁺, H₂O and D₂O in polymer/silicate gels. *Colloids Surf., A*, 2004, vol. 246, pp. 9 – 19.
- [65] NARAYANAN, Janaky, Xiong JUN-YING a Liu XIANG-YANG. Determination of agarose gel pore size: Absorbance measurements vis a vis other techniques. *Journal of Physics* [online]. 2006, č. 28, 83 - 86 [cit. 2012-04-13]. Dostupné z: http://iopscience.iop.org/1742-6596/28/1/017/pdf/jpconf6_28_017.pdf.
- [66] Aymard P, Martin D R, Plucknett K, Foster T J, Clark A H and Norton I T 2001 *Biopolymer* 59 131
- [67] Kumada, K.: *The chemistry of soil organic matter*. Food Fertilization Technology Centre, 1975, vol. 22, pp. 10-36.

- [68] Peuravuori, J., Zbankova, P., Pihlaja, K.: Aspects of structural features in lignite and lignite humic acids. *Fuel Process. Technol.*, 2006, vol. 87, no. 9, pp. 829-839.
- [69] Peuravuori, J., Simpson, A. J., Lam, B, Zbankova, P., Pihlaja, K.,. Structural features of lignite humic acid in light of NMR and thermal degradation experiments. *J. Mol. Struct.*, 2007, vol. 826, no. 2 – 3, pp. 131 – 142.
- [70] RIGGLE, Jeremy a Ray VON WANDRUSZKA. Dynamic conductivity measurements in humic and fulvic acid solutions. [online]. 2004, č. 64, 103 - 108 [cit. 2012-05-03]. Dostupné z: www.sciencedirect.com
- [71] Piccolo, A., Conte, P., a kol.: Effects of mineral and monocarboxylic acids on the molecular association of dissolved humic substances. *Eur. J. Soil Sci.*, 1999, vol. 50, no. 4, pp. 687-694.
- [72] Klučáková, M., Pekař, M.: Study of Structure and Properties of Humic and Fulvic Acids. IV. Study of Interactions of Cu^{2+} Ions with Humic Gels and Final Comparison, *J. Polym. Mater.*, 2003, vol. 20, no. 2, pp. 155-162.
- [73] MORAIS, W.A., A.L.P. DE ALMEIDA, M.R. PEREIRRA a J.L.C. FONSECA. Equilibrium and kinetic analysis of methyl orange sorption on chitosan spheres. [online]. 2008, č. 343 [cit. 2012-05-05]. Dostupné z: www.sciencedirect.com.
- [74] Stokes, R. Integral Diffusion of Potassium Chloride Solutions for Calibration of Diagraph Cells. *Journal of American Chemical Society*. 1951, 73, s. 2327-3528

9 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

9.1 Použité zkratky

<i>zkratka</i>	<i>význam zkratky</i>
DOM	rozpuštěná organická hmota
HL	humínové látky
HK	humínové kyseliny
FK	fulvínové kyseliny
HU	huminy
AAS	atomová absorpční spektroskopie
FT-IR	infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací
IHSS	mezinárodní společnost pro humínové sloučeniny (international humic substances society)
UV-VIS	ultrafialová a viditelná oblast spektra
GPC	gelová permeační chromatografie
DNA	deoxyribonukleonová kyselina
FZ	Fickův zákon
PAAG	polyakrylamidový gel
BSA	bis-trimethylsilyl acetamid
RPM	počet otáček za minutu
MO	methylovaný (methylenová oranž)
MM	methylenová modř
LVO	oblast lineární viskoelastivity
IB	izoelektrický bod
DLS	dynamický rozptyl světla
AFM	mikroskopie atomárních sil
SEM	skenovací elektronová mikroskopie
VE	vlnový exponent
CHIT	chitosan

9.2 Použité symboly

<i>symbol</i>	<i>význam</i>	<i>jednotka</i>
W	práce vykonaná systémem	joule [J]
μ	chemický potenciál	[J·mol ⁻¹]
x	prostorová souřadnice, vzdálenost	metr [m]
p	tlak	pascal [Pa]
T	teplota	kelvin [K]
F	síla	newton [N]
j_1	jednosměrný difúzní tok	[kg·m ⁻² ·s ⁻¹]
A	plocha	[m ²]
c	molární koncentrace	[mol·m ⁻³]
D	difúzní koeficient	[m ² ·s ⁻¹]
D_{eff}	efektivní difúzní koeficient	[m ² ·s ⁻¹]
D_0	difúzní koeficient ve vodě	[m ² ·s ⁻¹]
f	frekvence	hertz [Hz]
γ	amplituda napětí	[%]
F_N	normálová síla	newton [N]
$G'(\omega)$	elastický modul	pascal [Pa]
$G''(\omega)$	viskózní modul	pascal [Pa]
δ	ztrátový úhel	stupeň [°]
$\eta(\omega)$	komplexní viskozita	[Pa·s]
k	rychlostní konstanta	[s ⁻¹]
K	rovnovážná konstanta	[-]
φ	objemový zlomek	[-]
s	směrnice přímky	[-]
R^2	koeficient spolehlivosti	[-]
w	hmotnostní koncentrace	[hm. %]
β	konstanta aparatury	[m ⁻²]
ε	rozdělovací koeficient na rozhraní	[-]
V	objem	[m ³]
$c_{1\infty}$	původní koncentrace v difúzní cele	[mol·m ⁻³]
c_r	konečná koncentrace na rozhraní	[mol·m ⁻³]
n_{tot}	látkové množství difundující látky	[mol]

10 SEZNAM PUBLIKACÍ

Publikace, které tématicky pokrývají klíčovou část diskutovaných experimentů. Vždy se jedná o příspěvky na různých konferencích, ať již českých či zahraničních.

SEDLÁČEK, P.; SMILEK, J.; KLUČÁKOVÁ, M. *Diffusion Of Organic Dyes In Aqueous Solutions and Agarose Gels Studied By Method Of Horizontal Diffusion Cells*. Chemické listy. Chemické listy. Brno: Czech Chemical Society, 2011. s. s889 (s890 s.) ISSN: 0009-2770.

SEDLÁČEK, P.; SMILEK, J.; KLUČÁKOVÁ, M. *Humic Acids In Hydrogel Forms*. In 15th Conference on Environment and Mineral Processes, Part II. Ostrava: Publishing services department, VŠB – Technical University of Ostrava, 2011. s. 133-138. ISBN: 978-80-248-2388-1.

SEDLÁČEK, P.; SMILEK, J.; KLUČÁKOVÁ, M. *Novel reactivity mapping technique for characterization of polyelectrolyte biopolymers*. In Sborník příspěvků – XI. Pracovní setkání fyzikálních chemiků a elektrochemiků. Brno: Mendelova univerzita v Brně, 2011. s. 246-249. ISBN: 978-80-210-4234-6.

SEDLÁČEK, P.; SMILEK, J.; KLUČÁKOVÁ, M. *Diffusion techniques for characterization of dynamic humic systems*. In Book of Abstracts and Field Session Guide. Ul. Grunwaldzka 53, 50-357 Wroclaw, Poland: Polskie Towarzystwo Substancji Humusowych, 2011. s. 20-21.

SEDLÁČEK, P.; SMILEK, J.; KLUČÁKOVÁ, M. *Reactivity of biopolymers as observed by simple diffusion experiments*. Elektronický sborník. Berlín: TU Berlín, 2011.

11 SEZNAM PŘÍLOH

- | | |
|------------|---|
| PŘÍLOHA 1 | Navážky agarózy, objem vody a humátu k přípravě difúzních vzorků. |
| PŘÍLOHA 2 | Navážky agarózy, objem vody a chitosanu k přípravě difúzních vzorků. |
| PŘÍLOHA 3 | Počítačová simulace difúzní formy v programu Autocad. |
| PŘÍLOHA 4 | Práce se softwarem SpectraSuite. |
| PŘÍLOHA 5 | Sestavená difúzní cela. Probíhající difúze MM v agarózovém gelu. |
| PŘÍLOHA 6 | Nastavení softwaru CaryWin pro měření difúzních procesů v kyvetách. |
| PŘÍLOHA 7 | Kalibrační přímky organických barviv (MO a MM). |
| PŘÍLOHA 8 | Analyzátor vlhkosti Denver Instrument IR 35. |
| PŘÍLOHA 9 | Automatický titrátor Titroline Alpha plus a kombinovaný multimetrem Metler Toledo SevenMulti s <i>pH</i> a vodivostní elektrodou. |
| PŘÍLOHA 10 | Schéma difúzní cely. |
| PŘÍLOHA 11 | Nástavec pro měření na spektrometru Varian pro difúzi v kyvetách. |

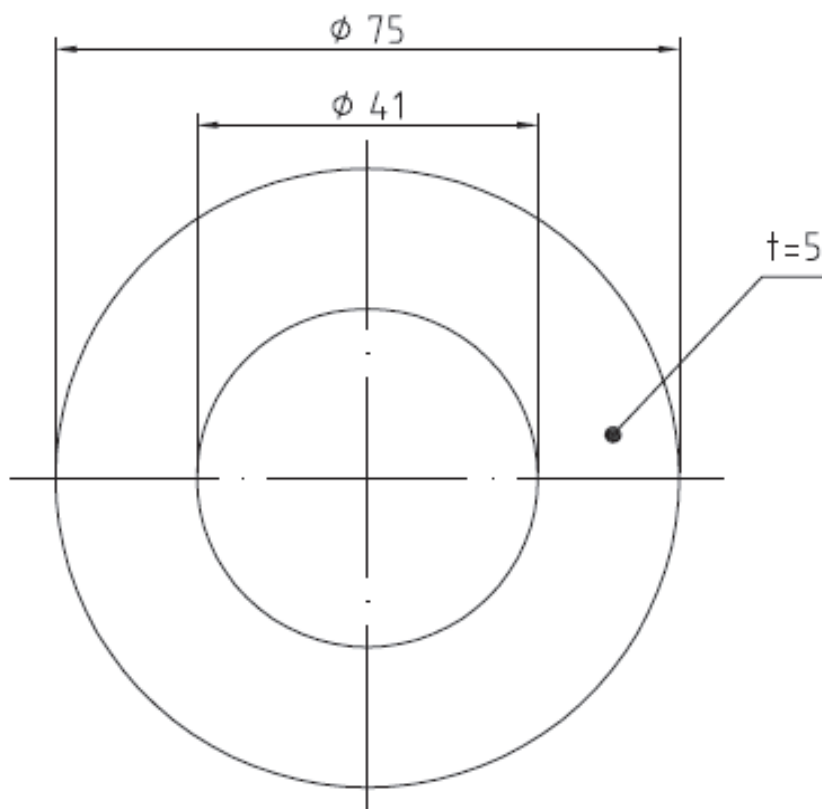
PŘÍLOHA 1

navážka agarózy [g]	objem vody [ml]	obsah HK v gelu [%]	objem humátu sodného ($0,1 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$) [ml]
0,1	10,0	0 %	0,0
0,1	9,8	0,002 %	0,2
0,1	9,5	0,005 %	0,5
0,1	9,0	0,010 %	1,0

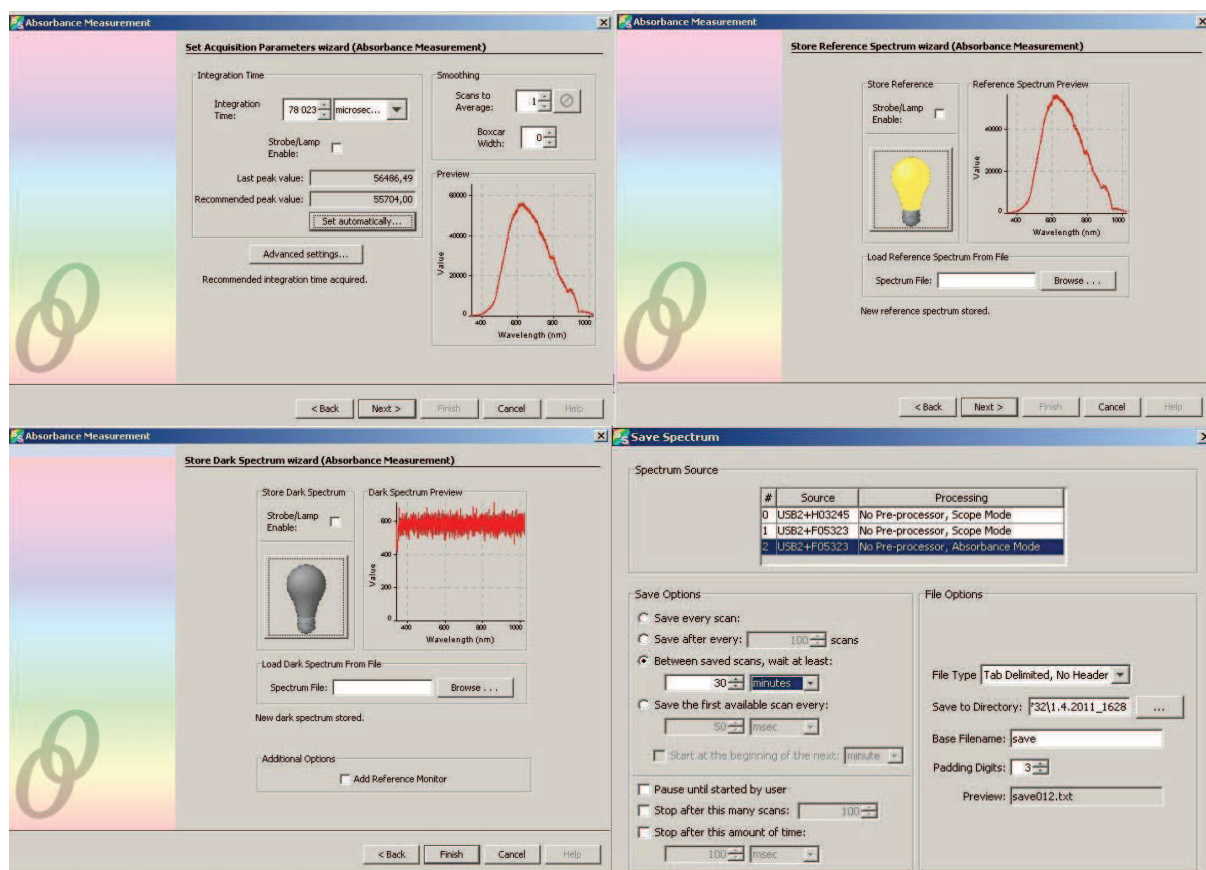
PŘÍLOHA 2

navážka agarózy [g]	objem vody [ml]	obsah chitosanu v gelu [%]	objem roztoku chitosanu ($1 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$) [ml]
0,1	10,0	0 %	0,0
0,1	9,8	0,01 %	0,2
0,1	9,5	0,05 %	0,5
0,1	9,0	0,10 %	1,0

PŘÍLOHA 3



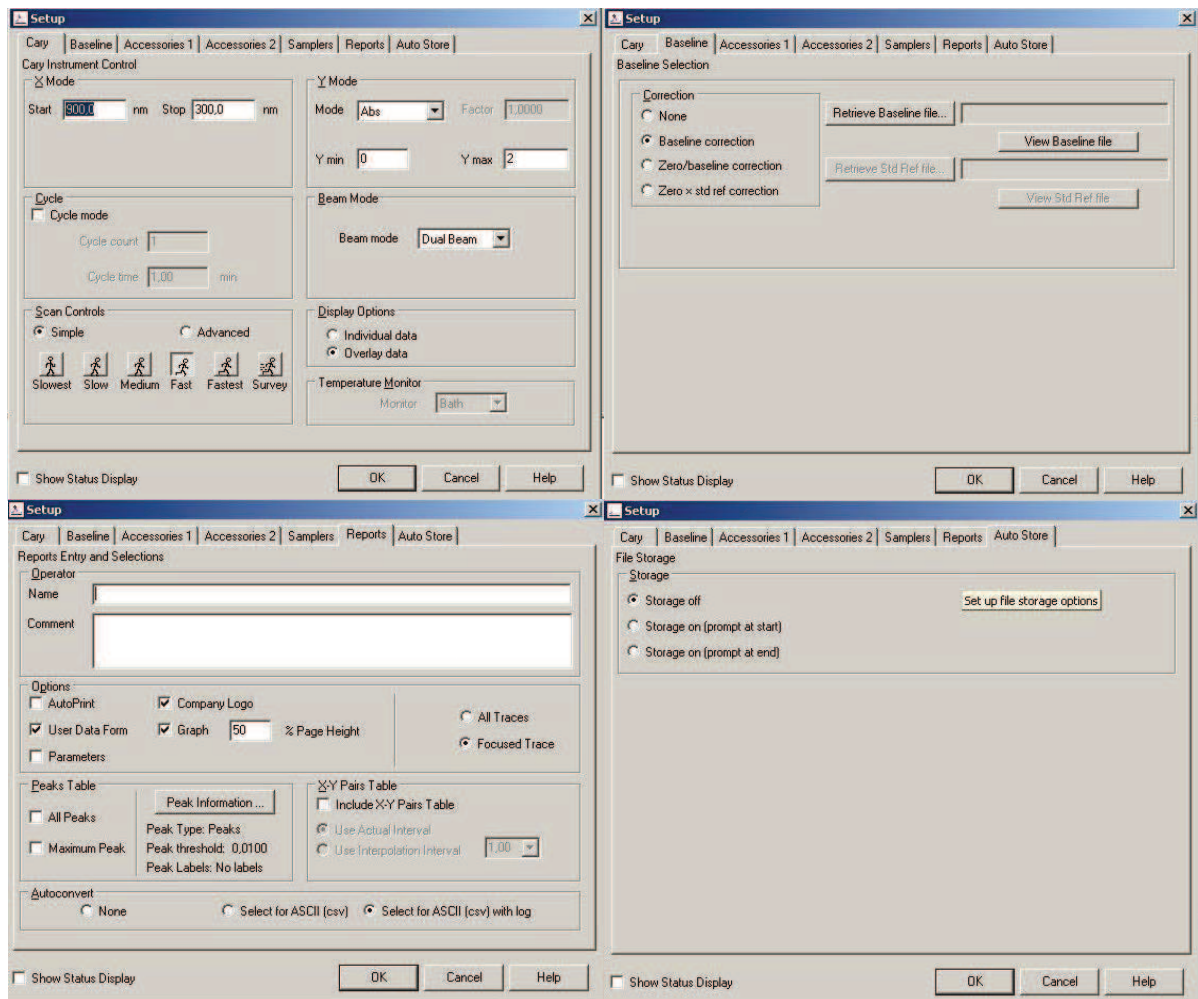
PŘÍLOHA 4



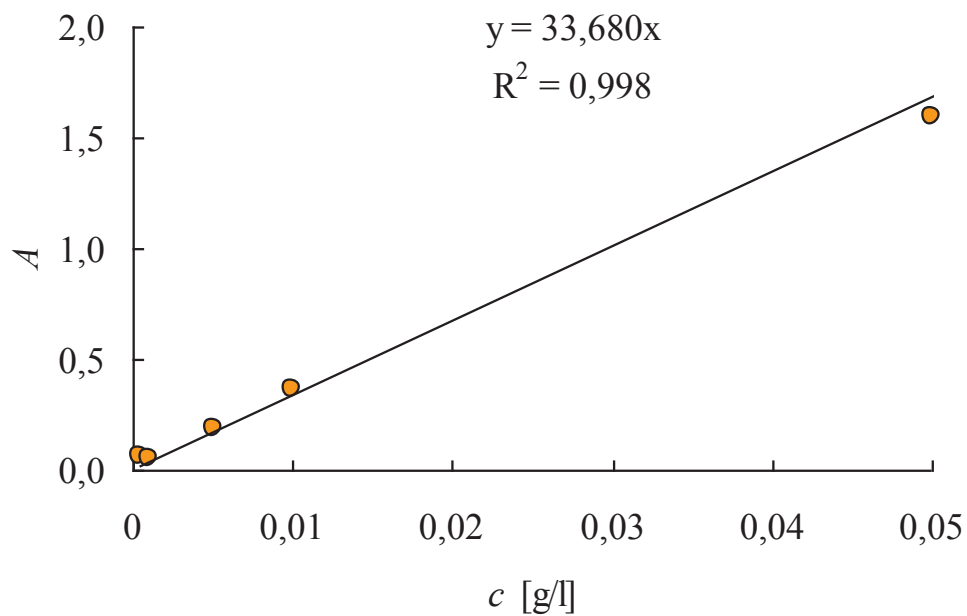
PŘÍLOHA 5

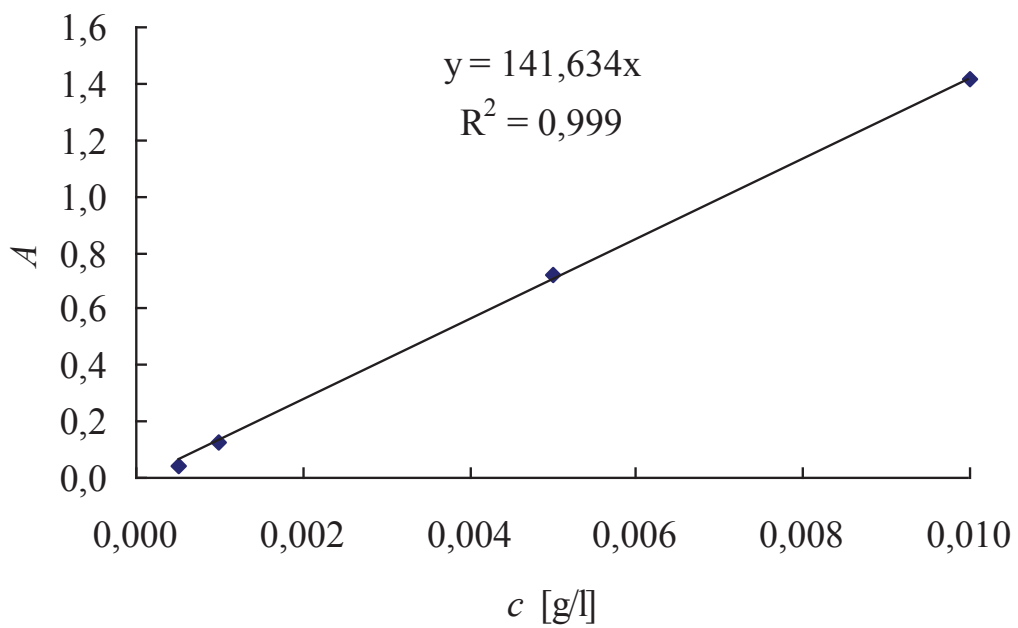


PŘÍLOHA 6



PŘÍLOHA 7





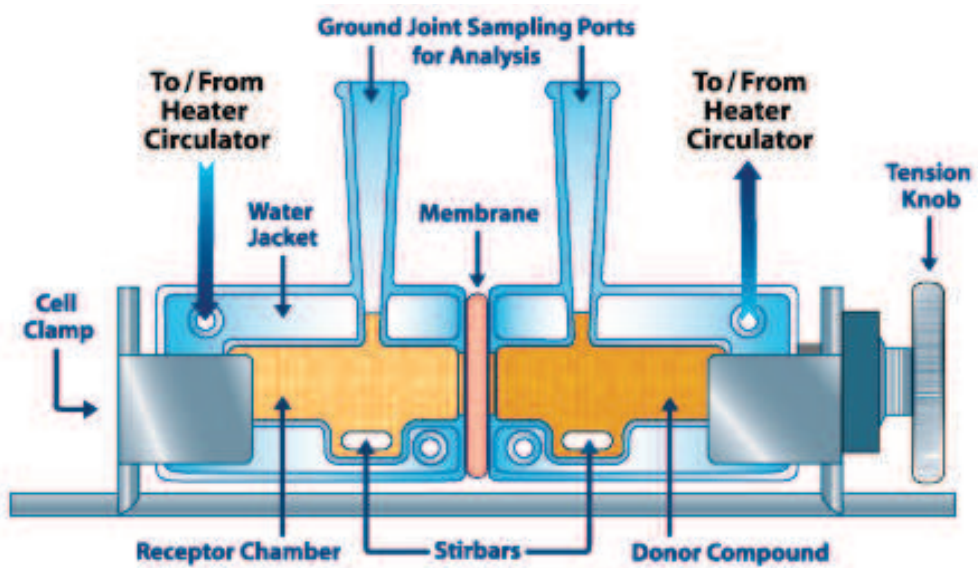
PŘÍLOHA 8



PŘÍLOHA 9



PŘÍLOHA 10



PŘÍLOHA 11

