



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE

INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

VYUŽITÍ SPEKTROSKOPICKÝCH METOD PŘI STUDIU INTERAKCE PŘÍRODNÍ ORGANICKÉ HMOTY S ORGANICKÝMI IONTY

UTILIZATION OF SPECTROSCOPICAL METHODS IN THE STUDY ON INTERACTION OF NATURAL ORGANIC MATTER WITH ORGANIC IONS

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Adam Prisažný

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. Petr Sedláček, Ph.D.

BRNO 2019

Zadání bakalářské práce

Číslo práce: FCH-BAK1402/2018 Akademický rok: 2018/19
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie
Student: **Adam Prisažný**
Studijní program: Chemie a chemické technologie
Studijní obor: Chemie pro medicínské aplikace
Vedoucí práce: **Ing. Petr Sedláček, Ph.D.**

Název bakalářské práce:

Využití spektroskopických metod při studiu interakce přírodní organické hmoty s organickými ionty

Zadání bakalářské práce:

1. Zpracovat literární rešerši na téma bakalářské práce.
2. Na základě literární rešerše vybrat vhodné spektroskopické techniky v dispozici pracoviště.
3. Realizovat sérii experimentů pro ověření využitelnosti vybraných technik při studiu interakcí modelových frakcí přírodní organické hmoty s organickými ionty.
4. Diskutovat výsledky, provést finální zhodnocení testovaných metod.

Termín odevzdání bakalářské práce: 31.5.2019:

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

Adam Prisažný
student(ka)

Ing. Petr Sedláček, Ph.D.
vedoucí práce

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2019

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

ABSTRAKT

Tato bakalárska práca sa zaoberá interakciou humínových kyselín s iónovými organickými zlúčeninami a vplyvom chemickej modifikácie humínových kyselín na túto interakciu. Modelovým organickým iónom bolo zvolené farbivo Rhodamín 6G. Interakcie boli skúmané pomocou spektroskopických metód. Výsledky ukázali, že väzba medzi reaktantmi nebola primárne závislá na karboxylových funkčných skupinách humínových kyselín. Fluorescenčné experimenty preukázali statický mechanizmus zhášania a diferenčná UV-VIS spektroskopia preukázala existenciu π - π interakcií.

ABSTRACT

This bachelor thesis deals with the interaction of humic acids with organic ions and effect of chemical modification of humic acids on this interaction. Rhodamine 6G was used as a model organic ion. The interaction were studied by spectroscopy methods. Results showed that the bond between the reactants was not primarily dependent on carboxylic functional groups of humic acids. Fluorescence experiments indicated static quenching mechanism and differential UV-VIS spectroscopy demonstrated the existence of π - π interactions.

KLÚČOVÉ SLOVÁ

Humínové kyseliny, Rhodamín 6G, metylovaná modifikácia, zhášanie fluorescencie, emisné spektrum, excitačné spektrum, UV-VIS spektrum, absorbanca, organické ióny

KEY WORDS

Humic acid, Rhodamine 6G, methylate modification, fluorescence quenching, emissional spectrum, excitational spectrum, UV-VIS spectrum, absorption, organic ions

PRISAŽNÝ, Adam. Využití spektroskopických metod při studiu interakce přírodní organické hmoty s organickými ionty. Brno, 2019. Dostupné také z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/113457>. Bakalářská práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav fyzikální a spotřební chemie. Vedoucí práce Petr Sedláček.

PREHLÁSENIE

Prehlasujem, že som bakalársku prácu vypracoval samostatne a že všetky použité literárne zdroje som správne a úplne citoval. Bakalárska práca je z hľadiska obsahu majetkom Fakulty chemické VUT v Brne a môže byť využitá ku komerčným účelom len so súhlasom vedúceho práce a dekana FCH VUT.

.....

Podpis študenta

POĎAKOVANIE

Na tomto mieste by som rád poďakoval vedúcemu mojej bakalárskej práce Ing. Petrovi Sedláčkovi, Ph.D. za vynikajúci prístup, vedenie a cenné rady poskytnuté pri riešení tejto diplomovej práce. Ďalej by som chcel poďakovať Ing. Eve Fryšovej, Bc. Janke Szabovej a Ing. Vojtěchovi Enevovi, Ph.D. za pomoc v experimentálnej časti tejto práce. Špeciálne poďakovanie patrí mojej rodine a priateľom za neustálou podporu počas celého môjho štúdia.

Obsah

| | | |
|----------|--|-----------|
| 1 | Úvod | 7 |
| 2 | Cieľ práce | 8 |
| 3 | Teoretická časť: | 9 |
| 3.1 | Humínové látky..... | 9 |
| 3.1.1 | Rozdelenie humínových látok..... | 9 |
| 3.1.2 | Štruktúra humínových látok..... | 9 |
| 3.1.3 | Modifikácie humínových látok..... | 10 |
| 3.1.4 | Využitie humínových kyselín..... | 10 |
| 3.2 | Princípy využitých experimentálnych techník..... | 10 |
| 3.2.1 | UV-VIS spektrofotometria..... | 10 |
| 3.2.2 | Fluorescencia..... | 11 |
| 4 | Súčasný stav riešenej problematiky | 15 |
| 4.1 | Vplyv funkčných skupín na reaktivitu humínových kyselín..... | 15 |
| 4.2 | Interakcia humínových kyselín s organickými iónmi..... | 16 |
| 4.2.1 | Interakcia s farbivami..... | 16 |
| 4.2.2 | Interakcia s inými organickými iónovými látkami..... | 16 |
| 4.2.3 | Rhodamín 6G..... | 17 |
| 5 | Experimentálna časť | 18 |
| 5.1 | Použité chemikálie..... | 18 |
| 5.2 | Použité prístroje..... | 18 |
| 5.3 | Selektívna metylácia humínových kyselín..... | 18 |
| 5.4 | UV-VIS spektroskopické experimenty..... | 18 |
| 5.4.1 | Príprava vzoriek..... | 18 |
| 5.4.2 | Meranie absorpčných spektier..... | 19 |
| 5.5 | Fluorescenčné metódy..... | 19 |
| 5.5.1 | Príprava vzoriek..... | 19 |
| 5.5.2 | Meranie emisných spektier..... | 20 |
| 5.5.3 | Korekcia emisných spektier..... | 20 |
| 5.5.4 | Meranie doby života fluorescencie..... | 20 |
| 5.5.5 | Ustálená fluorescenčná spektroskopia..... | 21 |
| 5.5.6 | Korekcia excitačných a emisných spektier..... | 21 |

| | | |
|-----------|---|-----------|
| 6 | Výsledky a diskusia | 22 |
| 6.1 | UV-VIS spektroskopia | 22 |
| 6.2 | Zhášanie fluorescencie | 24 |
| 6.3 | Ustálená fluorescenčná spektroskopia | 28 |
| 7 | Záver..... | 31 |
| 8 | Zdroje | 32 |
| 9 | Zoznam použitých skratiek a symbolov | 35 |
| 10 | Prílohy | 36 |

1 ÚVOD

Humínové látky sú predmetom rôznych štúdií a výskumov, s využitím v rôznych odvetviach priemyslu. Jedná sa o látky s jedinečnou chemickou štruktúrou a prirodzeným výskytom v pôde i v iných prírodných zdrojoch. Vďaka veľkému množstvu rôznorodých funkčných skupín vo svojej štruktúre sú humínové látky schopné interagovať s mnohými druhmi látok z radu anorganickej alebo organickej chémie. Pre ich všestranné využitie je potreba dôkladne porozumieť mechanizmu interakcií humínových látok s konkrétnymi druhmi látok. Mnoho autorov prispelo svojimi prácami na tému interakcií humínových látok so širokou škálou látok (napr. farbivá, tenzidy, biocidy, farmaceuticky zaujímavé látky, a pod.) do celkového stavu poznania. To svedčí, že každá vedecká spoločnosť má záujem o humínové látky a ich využitie vo svojich odvetviach.

Táto bakalárska práca sa venuje štúdiu interakcie humínových kyselín, jednej z frakcií humínových látok, s iónovými organickými zlúčeninami. V experimentálnej časti práce sa za týmto účelom budú používať spektroskopické metódy. Práca prináša náhľad na obecné zákonitosti interakcie medzi humínovými kyselinami a iónovými organickými látkami a na vplyv funkčných skupín v štruktúre humínových kyselín na interakciu s vybranými zástupcami iónových organických zlúčenín.

2 CIEĽ PRÁCE

Cieľom mojej bakalárskej práce bolo spracovať literárnu rešerš na tému bakalárskej práce. Na základe literárnej rešerše bolo potrebné vybrať vhodné spektroskopické techniky k dispozícii na pracovisku. Následne realizovať sériu experimentov pre overenie využiteľnosti vybraných techník pri štúdiu interakcií modelových frakcií organickej hmoty s organickými iónmi. Na záver diskutovať výsledky a previesť finálne zhodnotenie testovaných metód.

3 TEORETICKÁ ČASŤ:

3.1 Humínové látky

Humínové látky (HL) sú široko sa vyskytujúce látky na povrchu Zeme, ako hlavné zložky pôd a sedimentov sa nachádzajú v takmer všetkých suchozemských a vodných prostrediach. Vznikajú pri biologickej i chemickej degradácii rastlinných a živočíšnych zvyškov, ale aj ako výsledok syntetických aktivít mikroorganizmov. Produkty týchto reakcií sú spájané do zložitejších chemických štruktúr, ktoré sú stabilnejšie ako východiskové materiály. Dôležitou vlastnosťou humínových látok je schopnosť tvoriť hydrofilné i hydrofóbne komplexy s kovovými iónmi a vodnými oxidmi. Takisto sú schopné interagovať s ílovými minerálmi a organickými zlúčeninami, ako sú alkány, mastné kyseliny, dialkylftaláty a pesticídy [1].

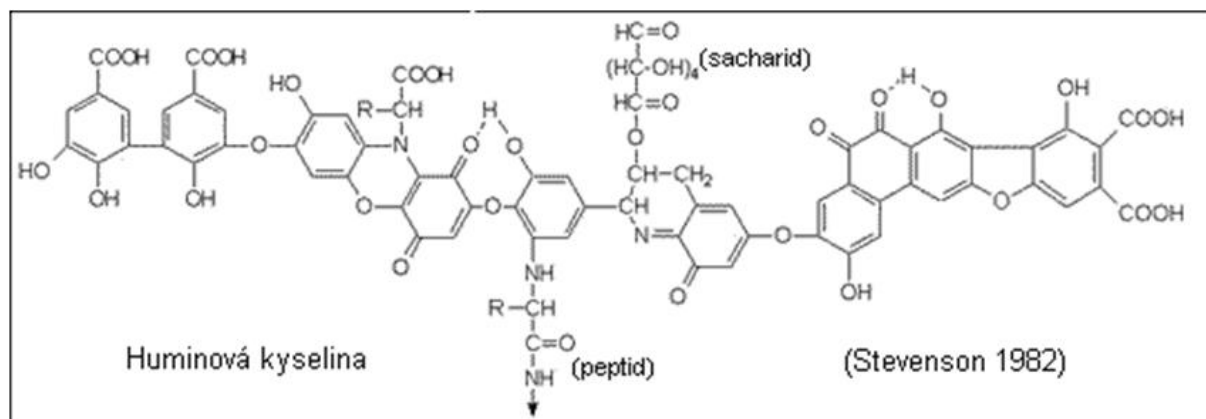
3.1.1 Rozdelenie humínových látok

V súčasnosti rozlišujeme tri hlavné frakcie humínových látok: fulvínové kyseliny, humínové kyseliny a humíny. Fulvínové kyseliny (FK) sú rozpustné vo vode, kyselinách i zásadách. Tato frakcia má najnižšiu molekulovú veľkosť a najvyššiu reaktivitu. Sú zafarbené žlto až hnedočierne. Humínové kyseliny (HK) sú rozpustné len v zásadách. Okyslením alkalického roztoku dôjde k ich precipitácii. Tato frakcia má väčšiu molekulovú veľkosť a nižšiu reaktivitu než FK. Sú zafarbené tmavohnedo. Humíny (HU) – nerozpustná frakcia humínových látok. Tato frakcia má najväčšiu molekulovú veľkosť a najnižšiu reaktivitu. Sú zafarbené do čierne [2], [3].

3.1.2 Štruktúra humínových látok

Humínové látky sú polydisperzné polyelektrolyty. Z prírodných zdrojov je nemožné nájsť dve rovnaké molekuly HL, čo je spôsobené ich vysokým stupňom molekulárnej irregularity a heterogenity. Taktiež neexistuje všeobecný štruktúrny vzorec. Veľa autorov publikovalo mnoho modelových štruktúrnych vzorcov molekulových fragmentov HL [2] (ukážka na Obr. 1).

Majoritnými prvkami štruktúry HL sú uhlík, kyslík, vodík, dusík a síra. Zastúpenie týchto prvkov je charakteristické pre každú frakciu HL, pre každý zdroj HL. Molekulová hmotnosť týchto látok sa pohybuje v rozmedzí 2–1300 kDa.



Obr. 1: Návrh štruktúry humínových látok podľa Stevesona [4]

3.1.3 Modifikácie humínových látok

Ako môžeme vidieť na *Obr. 1*, tak štruktúra HL je veľmi komplexná a obsahuje veľké množstvo rôznych typov funkčných skupín. Pre štúdie štruktúry sú preto vhodnejšie stabilné deriváty HL, pre ich jednoduchšie štúdium [4]. Deriváty majú selektívne blokované konkrétne funkčné skupiny, čo sa využíva pri štúdiu kyslosti HL alebo vplyvu funkčných skupín na reaktivitu HL v rôznych procesoch [6].

Významnou technikou pre vznik štruktúrnej modifikácie HL je esterifikácia karboxylových skupín pomocou metanolu a tionyl chloridu. Ďalšou technikou je acetylácia fenolových a alkoholových hydroxylov použitím anhydridu kyseliny octovej a kyseliny sírovej. Andelković a spol. vo svojej štúdiu [7] použili esterifikáciu karboxylových skupín, ktoré boli premenené na metylestery. Týmto sa prejavila vysoká selektivita, špecifickosť a účinnosť techniky, na rozdiel od acetylácie, kde nastala blokácia aj iných funkčných skupín, okrem hydroxylových.

Naša fakulta prispela svojim dielom k štúdiu derivátov HL. Klučáková a spol. použili TMS-DM, ktorý je komerčne dostupný a používa sa k účelu metylácie karboxylových skupín a fenolov, k metylácii HK. Skúmali vplyv metylovanej modifikácie na difúziu. Metylované HK zaznamenali pokles rýchlosti difúzie med'natých iónov v géloch, spôsobený zníženým obsahom karboxylových skupín od nemodifikovaných HK [8], [9].

3.1.4 Využitie humínových kyselín

Dôkazom aké výnimočné látky sú humínové látky je šírka ich použitia, ktorá zahŕňa na prvý pohľad nespojiteľné oblasti poľnohospodárstva a biomedicíny. Balneoterapia je jedna z medicínskych aplikácií HL, zahŕňa využitie rašeliny k uzdravujúcim účelom. Ďalej HL vykazujú antivírusovú aktivitu, znemožňuje vytvárať väzbu vírov na povrch bunky, má pozitívny vplyv na hemokoaguláciu a fibrinolýzu a majú protizápalové účinky [10]. V oblasti zápalových ochorení sú HL a produkty dlhodobo študované. Protizápalové účinky HL sa stávajú bezpečnou alternatívou v liečbe a prevencii zápalových nemocí, kde by nahradili rizikové nesteroidné protizápalové liečivá [11].

3.2 Princípy využitých experimentálnych techník

3.2.1 UV-VIS spektrofotometria

UV-VIS spektroskopia je jedna z najstarších a najrozšírejších metód molekulovej spektroskopie. V roku 1852, kedy bol Bougher-Lambert-Beerov zákon bol definitívne formulovaný, bol vytvorený základ kvantitatívneho hodnotenia absorpčných meraní v krátkom časovom intervale. To viedlo ku kolorimetrii, potom k fotometrii, a nakoniec k spektrofotometrii. Pravdaže tento vývoj bol závislý na vývoji detektorov na meranie intenzity svetla, od ľudského oka až k súčasnému detektoru silikónových diód, vďaka ktorým nám je umožnené súčasné meranie kompletneho UV-VIS spektra [12].

3.2.1.1 Princíp metódy

UV-VIS spektrofotometria je spektrálna metóda zameraná meraním elektrónových spektier molekúl látok absorbujúcich elektromagnetické žiarenie vo vlnových dĺžkach od 200-800 nm,

čiže v ultrafialovej a viditeľnej oblasti spektra. Pri tejto absorpcii dochádza k excitácii valenčných elektrónov nachádzajúcich sa v molekulových orbitáloch. Zmena stavu elektrónového obalu molekuly úzko súvisí so zmenou jej vibračných a rotačných stavov. Výsledkom merania absorpčného spektra sú preto absorpčné pásy, ktoré na rozdiel od čiarových spektier zachytia veľký počet energeticky blízkyh elektrónových prechodov u molekuly, lebo vznikajú zmenou vibračných a rotačných podhladin molekúl spôsobené prechodom elektrónov z nižších elektrónových hladín do vyšších [13].

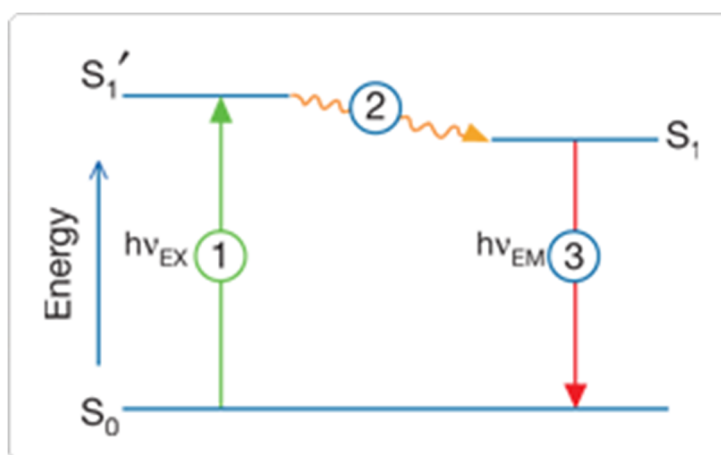
3.2.2 Fluorescencia

V oblasti štúdia molekulárnych interakcií v rozličných systémoch sú okrem absorpčných metód dosť často využívané fluorescenčné techniky. Z tohto dôvodu sa boli využité na štúdium interakcií, ktorou sa zabyva moja práca.

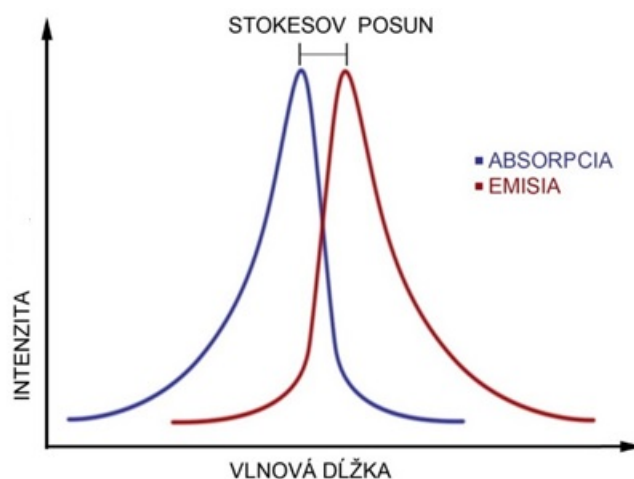
3.2.2.1 Princíp

Fluorescencia je fotoluminiscenčný jav, počas ktorého dochádza k excitácii hmoty svetelnou energiou a pri následnej deexcitácii je pozorovaná emisia žiarenia tejto hmoty. Funkčné skupiny schopné fluorescencie označujeme ako fluorofory. Vo fluoroforoch dochádza k absorpcii žiarenia v určitej vlnovej dĺžke a následne k emisii žiarenia v odlišnej vlnovej dĺžke. Pre každý fluorofor je charakteristické množstvo a vlnová dĺžka emitovanej energie, nemôžeme vylúčiť závislosť na prostredie okolo daného fluoroforu [14].

Na Obr.2 môžeme vidieť zjednodušený Jabloňskiho diagram, ktorý zobrazuje tri fázy prebiehajúce pri absorpcii a následne pri emisii svetelnej energie. V prvej fáze externý zdroj dodáva fotón s určitou energiou, excitačnou. Tento fotón je absorbovaný fluoroforom, ktorý sa dostáva do excitovaného stavu S_1' . Druhá fáza prebieha keď sa fluorofor nachádza v excitovanom stave a podlieha konformačným zmenám, v dôsledku rôznych interakcií s prostredím. Energia S_1' je tak rozptýlená a vzniká stav S_1 , z ktorého pochádza fluorescenčná emisia. Tretia fáza zobrazuje emisnú fluorescenciu. Fluorofor sa vracia do svojho základného stavu S_0 , čo je spôsobené emitáciou fotónu s emitačnou energiou. V dôsledku straty energie počas stavu excitácie je energia emitovaného fotónu nižšia a fotón má dlhšiu vlnovú dĺžku ako fotón emitovaný. Rozdiel v energii sa nazýva Stokesov posun (vid'. Obr. 3) [15].



Obr.2: Jabloňskiho diagram [15]



Obr. 3: Stokesov posun

3.2.2.2 Vnútorný filtračný efekt

Intenzita fluorescencie je priamoúmerná koncentrácii fluoroforu len v určitom rozsahu optických hustôt. V prípade vyššej koncentrácie fluoroforu dochádza k odchýlke od lineárnej závislosti, spôsobené vnútorným filtračným efektom. Tento jav môže znižovať intenzitu excitačného aj emisného žiarenia spätnou absorpciou emitovaného svetla. Kvôli pôsobeniu tohto efektu je nutné emisné dáta, ktoré sme získali experimentálne, korigovať. Ku korekcii je možné použiť vzťah podľa Lakowiczeho [16], ktorý je definovaný následne:

$$F_{corr} = F_{obs} \cdot 10^{\left(\frac{OD_{ex} + OD_{em}}{2}\right)}, \quad (1)$$

kde F_{corr} je korigovaná hodnota nameranej intenzity fluorescencie, F_{obs} je nameraná intenzita fluorescencie, OD_{ex} je optická hustota pri excitačnej vlnovej dĺžke a OD_{em} je optická hustota pri emisnej vlnovej dĺžke. Ak je optická dráha študovaného vzorku dlhá 1 cm, je možné nahradiť optické hustoty za absorbancie a korekčný vzťah znázornený v rovnici (1) je zmenený na tento tvar:

$$F_{corr} = F_{obs} \cdot 10^{\left(\frac{A_{ex} + A_{em}}{2}\right)}, \quad (2)$$

kde A_{ex} je absorbanca pri excitačnej vlnovej dĺžke a A_{em} je absorbanca pri emisnej vlnovej dĺžke.

3.2.2.3 Zhášanie fluorescencie

Pod pojmom zhášanie sa rozumie pokles intenzity fluorescencie dôsledkom rôznych molekulárnych interakcií fluoroforu. Látka spôsobujúca tento pokles je nazývaná zhášač. Ako zhášač fluorescencie funguje množstvo látok, vzdušný kyslík, halogény, ióny ťažkých kovov a pod. Fluorescenčná metóda založená na zhášaní fluorescencie pre štúdium reakcie medzi HK a rôznymi polutantami je využívaná vďaka svojej spoľahlivosti, nízkej časovej náročnosti a relatívnej jednoduchosti [16], [17].

Z hľadiska typu kontaktu medzi fluoroforom a zhášačom sa rozlišuje zhášanie dynamické alebo statické. Pri dynamickom zhášaní dochádza k difúznej interakcii fluoroforu so zhášačom. Po tejto interakcii sa excitovaný fluorofor vracia do základného energetického stavu bez emisie fotónu, čiže nedochádza k žiadnej chemickej zmene molekúl, fluorofor uvoľní absorbovanú energiu bez žiarenia. Pokles intenzity popisuje Stern-Volmerová rovnica, ktorá má rozdielny tvar v dynamickom a statickom zhášaní. V dynamickom má tento tvar:

$$\frac{F_0}{F} = 1 + k_q \cdot \tau_0 \cdot [Q] = 1 + K_D \cdot [Q], \quad (3)$$

kde F_0 a F sú intenzity fluorescencie bez, respektíve so zhášačom, k_q je bimolekulárna zhášacia konštanta, τ_0 je doba života fluorescencie za neprítomnosti zhášača, $[Q]$ predstavuje koncentráciu zhášača a K_D je Stern-Volmerova zhášacia konštanta, ktorá predstavuje citlivosť interakcie fluoroforu ku zhášaču. Čím väčšia je hodnota tejto konštanty, tým je väčšia pravdepodobnosť difúzneho kontaktu.

Pri statickom zhášaní dochádza k vzniku väzby medzi fluoroforom a zhášačom, čím sa tvorí nefluorescenčný komplex. Ak tento komplex absorbuje svetelnú energiu, vracia sa ihneď do základného energetického stavu bez emisie fotónov. Interakcia medzi komponentami a vznik väzby je to, čím sa tieto dva typy zhášania líšia od seba. Stern-Volmerová konštanta má rovnaký tvar ako v rovnici (3), len v tomto type zhášania je konštanta K_D nahradená konštantou K_S , t.j. asociačná konštanta vzniku komplexu [16]. Jej tvar je nasledovný:

$$\frac{F_0}{F} = 1 + k_q \cdot \tau_0 \cdot [Q] = 1 + K_S \cdot [Q]. \quad (4)$$

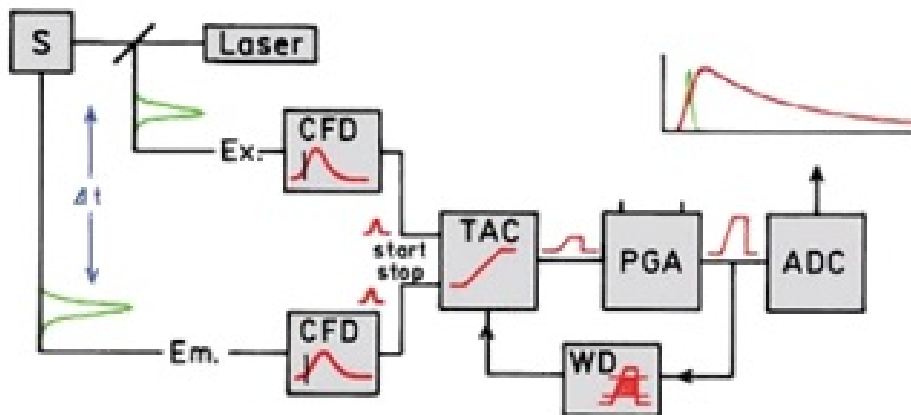
3.2.2.4 Fluorescenčná spektroskopia

Analytické techniky založené na štúdiu fluorescencie sú veľmi používateľné, kvôli ich vysokej citlivosti, selektivite a možnosti časového rozlíšenia. Priamou fluoreskujúcou metódou môžeme merať len fluoreskujúce látky. Prístroj pracuje v rozsahu príslušných vlnových dĺžok excitácie a emisie. V prípade nefluoreskujúceho analytu sa využívajú nepriame metódy, ako napríklad zhášanie [17].

Fluorescenčné meranie je rozdelená dva základné typy. Prvým a viac využívaným typom je ustálená (*steady-state*) fluorescencia. Je realizovaná pri konštantnom osvetľovaní a pozorovaní. Vzorka je ožiarená súvislým lúčom svetla a následne je zaznamenávané emisné spektrum. Druhým typom je časovo rozlíšená (*time-resolved*) fluorescencia. Je založená na štúdiu poklesu intenzity fluorescencie po časovo obmedzenej excitácii. V súčasnej dobe sa tento typ fluorescencie realizuje pomocou metódy TCSPC (*Time Correlated Single Photon Counting*), čiže časovo korelovaným sčítaním fotónov [16].

Princíp tejto metódy je znázornený na *Obr. 4*. Vzorka je excitovaná excitačným pulzom a signál následne pokračuje prvým kanálom k diskriminátoru konštantnej funkcie (CFD), ktorý zmeria čas príchodu pulzu. Následne pokračuje signál na prevodník (TAC), v ktorom sa začne vytvárať napätie, ktoré lineárne rastie s časom. V druhom kanáli je zmeraný čas príchodu pulzu

emitovaného fotónu druhým diskriminátorom konštantnej funkcie (CFD). Odtiaľ signál prechádza na prevodník (TAC), čím sa zastaví rast napätia. V tomto momente je napätie úmerné časovému oneskoreniu medzi excitačným a emisným signálom. Pomocou digitálneho prevodníku (ADC) je následne napätie prevedené do číselných hodnôt. Výsledné dáta sú zobrazené v podobe grafu, závislosť poklesu počtu fotónov za čas [18].



Obr. 4: Schéma metódy TCSPC [16]

4 SÚČASNÝ STAV RIEŠENEJ PROBLEMATIKY

4.1 Vplyv funkčných skupín na reaktivitu humínových kyselín

Problematike posúdení vplyvu konkrétnych funkčných skupín v štruktúre HK na ich reaktivitu bola venovaná veľká pozornosť po celom svete už dosť rokov, čoho výsledkom je vykonanie rôznych pokusov alebo prispôsobenie známych metód (viď. *Tabuľka 1*).

Tabuľka 1: Metódy využívané na štúdium reaktivity a vlastností HK ovplyvnenú funkčnými skupinami HK

| Metódy: | Využitie metódy na štúdium: | |
|---|--|----------------------|
| Selektívna metylácia | Štúdium vplyvu funkčných skupín HK na reaktivitu | [19] |
| Kalcium-acetátová metóda Jodometrická titrácia | Karboxylové skupiny vplývajúce na acidobázické vlastnosti | [20] [20] |
| Acetylácia s acetanhydridom v pyridinu | Všetky hydroxylové skupiny vplývajúce na acidobázické vlastnosti | [20] |
| Ubaldiniho postup | Fenolické skupiny vplývajúce na acidobázické vlastnosti | [20] |
| Postup podľa Fritza Schnitzer a Skinner Metóda podľa Browna | Karboxylové skupiny vplývajúce na acidobázické vlastnosti | [20] [20] [20] |
| Upravená Zeiselova metóda | Metoxylové skupiny vplývajúce na acidobázické vlastnosti | [20] |

V štruktúre HK je veľké množstvo funkčných skupín, karboxylové, fenolové, enolové, hydroxylové, éterové, atď. Ich obsah závisí na mnohých faktoroch, ako sú pôvod, doba uskladnenia, klíma alebo podmienky extrakcie [21]. Vzhľadom k veľkému počtu týchto skupín HK disponujú mnohými reaktívnymi miestami, čo je dôvodom, prečo sú schopné sa viazať na rôzne organické a anorganické látky. Stanovenie charakteru väzieb HK so zlúčeninami je neustále predmetom skúmania, keďže sa na tvorbe väzby podieľajú rôzne druhy väzieb, ako napríklad iónové, koordinačné, kovalentné, atď. [22]

Najčastejšie a hlavné funkčné skupiny v molekulách HK zodpovedné za interakcie s okolím sú skupiny fenolové a karboxylové. Pre porovnanie ich vplyvu na HK bolo vykonaných veľa štúdií a výskumov. Jeden z nich vykonal Schmeide a spol., ktorý skúmal interakciu prírodných a modifikovaných HK za kyslého pH s uranylovými iónmi. Modifikované HK mali zablokované fenolové skupiny. Výsledky výskumu preukázali minoritný vplyv fenolových skupín na interakciu, z čoho vyplýva že na reakcie s uranylovými iónmi sa podieľali hlavne karboxylové skupiny [23].

Vplyv karboxylových skupín HK bol študovaný Andelkovič a spol., kde predmetom štúdie bola interakcia modifikovaných a nemodifikovaných HK s iónmi kadmia. Modifikácia

zahrňovala v tomto prípade blokáciu karboxylových skupín, pomocou metanolu a tionyl chloridu. Z výsledkov vyplývalo, že sa ióny kadmia viazali preferenčne na nemodifikované HK, čo dokazuje majoritný vplyv karboxylových skupín na interakciu [24].

4.2 Interakcia humínových kyselín s organickými iónmi

Celá rada látok, zodpovedné za znečistenie životného prostredia, má povahu organických iónov. Väzba týchto látok na HK predstavuje jednu z možných ciest ako odstrániť tieto látky z prírodných zdrojov. Z tohto dôvodu sa veľa štúdií a výskumov zaujíma o väzbu medzi HK a iónovými organickými iónmi.

4.2.1 Interakcia s farbivami

Mnohé štúdie potvrdili, že humínové kyseliny významne ovplyvňujú adsorpciu farbív na adsorbenty rôzneho pôvodu. Zermane a spol. zistili, že pri zvýšení hodnoty pH zmesi adsorbentu a HK nastáva zlepšenie adsorpcie bazického farbiva (Basic Yellow 28) na adsorbenty rôzneho pôvodu. Dôvodom je, že pri zväčšení pH zmesi došlo k disociácii funkčných skupín HK, čím sa zvýšil negatívny náboj povrchov adsorbentov [25]. Podobný pozitívny vplyv dosiahol Zhang a spol., ktorý na výskum použil nanočastice Fe_3O_4 ovrstvené HK. Výsledky ukázali, že nanočastice s HK na povrchu adsorbovali väčšie množstvo metylovej modrej ako samotné HK alebo nanočastice bez HK na povrchu. Za hlavný väzbový mechanizmus sa považovali elektrostatické sily [26].

Sheng a spol. sledoval interakciu medzi HK a kationovou toluidínovou modrou. Výsledky ukázali vysoký vplyv pH a iónovej sily na pozorovanú reakciu. Rastúca hodnota pH má pozitívny vplyv na väzbovú schopnosť HK, na rozdiel od iónovej sily, ktorá má negatívny vplyv. Rastúce pH spôsobuje disociáciu funkčných skupín, čo spôsobuje zvýšenie negatívneho náboju HK. Vyššia hodnota iónovej sily naopak spôsobila redukciu elektrickej dvojvrstvy HK. Za hlavný väzbový mechanizmus sa v tomto prípade považovali elektrostatické sily [27].

4.2.2 Interakcia s inými organickými iónovými látkami

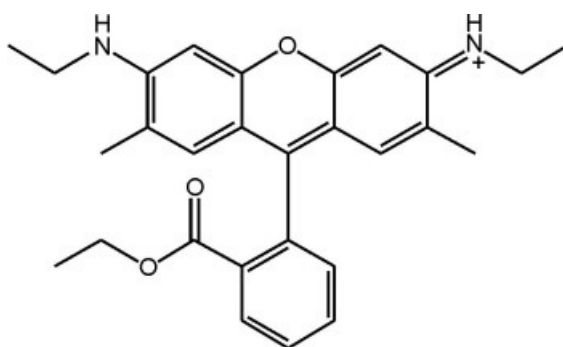
Iglesias a spol. vo svojej štúdií [28] sledoval interakciu biocidov paraquat a kyseliny (4-chlor-2-metylfenoxy)octovej (MCPA) s HK so zameraním na vplyv pH a iónovej sily. Výsledky preukázali to, čo publikoval i Sheng a spol. [27], interakcia kationovej organickej látky, v našom prípade paraquat, s HK bola silnejšia pri zvýšenej hodnote pH a zníženej iónovej sile. U MCPA bola pozorovaná menšia ochota interagovať s HK, pretože MCPA vykazovala aniónovú formu. Za hlavný väzbový mechanizmus sa i v tejto publikácii považovali elektrostatické sily, i keď pri nízkom HK, kedy boli HK málo ionizované, prevažovali v interakcii vodíkové väzby a Van der Waalsove sily.

Nakashima a spol. použili fluorescenčnú spektroskopiu na štúdium interakcie derivátov pyrénu s HK. Deriváty mali povahu neutrálnu, aniónovú a kationovú. Následne boli porovnávané väzbové konštanty, ktoré boli získané pomocou ustálených fluorescenčných zhášacích techník. Tak ako sa v predošlých štúdiách aj tu sa preukázal silný vplyv elektrostatických síl. Najväčšiu hodnotu väzbovej konštanty vykazovali kationové deriváty a najmenšiu vykazovali aniónové deriváty pyrénu. V tejto štúdií sa tiež ukázalo, že HK fungujú ako efektívny zhášač fluorescencie pyrénových derivátov [29].

4.2.3 Rhodamín 6G

Rhodamín 6G (R6G) patrí do skupiny xantenových farbív. Sú to látky s komplexnými molekulami, obsahujúce kruhové štruktúry a majúcu planárny a rigidný charakter [30]. Štruktúra Rhodamínu 6G je znázornená na *Obr. 5*.

Toto farbivo sa vyznačuje dobrou fotostabilitou a vysokým kvantovým výťažkom fluorescencie. Vlnová dĺžka absorpčného maxima sa nachádza v okolí hodnoty 530 nm, emisné v okolí 550 nm [31]. Využíva sa často ako fluorescenčná sonda v biochémií, k monitoringu membránovej fúzie, k mikroskopickým štúdiám bunkových procesov a štruktúr, k analýze proteínov a je to dôležité laserové farbivo [32]. Pre tieto vlastnosti bol preto vybraný Rhodamín 6G ako zástupca organických iónov v mojej práci.



Obr. 5: Štruktúra R6G [30]

5 EXPERIMENTÁLNA ČASŤ

5.1 Použité chemikálie

Rhodamín 6G

Humínové kyseliny (IHSS štandard izolovaný z Leonarditu)

Metylované humínové kyseliny (príprava vid'. kapitola 5.3)

Hydroxid sodný

Hydrogenfosforečnan disodný dodekahydrát

Dihydrogenfosforečnan sodný dihydrát

Deionizovaná voda (PureLab)

Septonex

5.2 Použité prístroje

Spektrofotometer UV-VIS HITACHI U-3900H

Fluorescenčný spektrometer Horiba FluoroLog®

Spektrofluorometer Fluorocube, Horiba Jobin Yvon Scientific, Inc.

Fluorescenčný spektrofotometer EDINBOURGH

5.3 Selektívna metylácia humínových kyselín

Časť IHSS HK bola podrobená selektívnej metylácii. Dôvodom bolo porovnanie a štúdium vplyvu tejto modifikácie na interakcii s modelovým organickým iónom. Do ôsmich kadičiek bolo navážené vždy po 2 g IHSS HK a ku každému množstvu bolo pipetovaných 8 ml chloroformu a 4 ml metanolu. Následne bolo do každej kadičky bolo po kvapkách pridávaných 8 ml TMS-DM v hexáne. Zmesi boli miešané 2 hodiny na magnetickej miešačke v digestory a následne bolo do každej kadičky pridaných 1,5 ml TMS-DM. Metylované HK sa najprv sušili v digestory pri laboratórnej teplote cez noc a následne boli premiestnené na Petriho misky a sušené v sušiarňi pri 40 °C. Sušenie prebiehalo dovtedy, kým sa z mHK neodparilo nezreagované metylačné činidlo. Touto modifikáciou došlo k esterifikácii karboxylových skupín v štruktúre HK.

5.4 UV-VIS spektroskopické experimenty

5.4.1 Príprava vzoriek

Hodnoty koncentrácií pripravovaných vzoriek boli prevzaté z práce mojej konzultantky [33], ktorá realizovala pilotní experimenty zamerané na štúdium vplyvu chemickej modifikácie HK na ich interakciu s organickými iónmi.

Pre experimenty bol pripravený zásobný roztok IHSS HK o koncentrácii 1 g/l rozpustením príslušného množstva v 0,01 M NaOH. Rovnako sa postupovalo v prípade mHK. Zásobný roztok Rhodamínu 6G s koncentraciou 0,1 g/l bol pripravený riedením zásobného roztoku s koncentraciou 1 g/l, ktorý bol pripravený rozpustením daného množstva v deionizovanej vode. Na doplnenie vzoriek na finálny objem bol pripravený fosfátový pufoer o pH 6,9-7, a to

rozpuštením množstva $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0,748 g) a $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ (1,862 g) v deionizovanej vode na finálny objem 1000 ml.

Na meranie UV-VIS spektier boli nachystané sady vzoriek HK, mHK, Rhodamínu 6G a ich zmesi. Najskôr boli pripravené vzorky obsahujúce len jeden reaktant. Rhodamín 6G bol pipetovaný do dvoch odmerných baniek, v jednej s výslednou koncentráciou $1 \mu\text{mol/l}$, v druhej s koncentráciou $10 \mu\text{mol/l}$. HK aj mHK boli rovnako ako Rhodamín 6G pipetované do dvoch odmerných baniek, v jednej s výslednou koncentráciou 2 mg/l , v druhej s koncentráciou 20 mg/l . Tieto zmesi boli pripravené následne. Do jednej odmernej banky bolo pipetovaných $120 \mu\text{l}$ zásobného roztoku Rhodamínu 6G a $50 \mu\text{l}$ HK. Do druhej odmernej banky bolo pipetovaných $1,2 \text{ ml}$ zásobného roztoku Rhodamínu 6G a $0,5 \text{ ml}$ HK. Rovnako boli pripravené i zmesi s mHK. Finálny objem, 25 ml , v každej banke bol doplnený fosfátovým pufrom.

5.4.2 Meranie absorpčných spektier

Vzorky obsahujúce Rhodamín 6G s HK a mHK (postup vid' **kapitola 5.4.1**) boli aplikované do kremennej kyvety a ich absorpčné spektrá boli merané pomocou spektrofotometru UV-VIS HITACHI U-3900H. Nastavenie spektrofotometru bolo nasledovné:

- Rozsah vlnových dĺžok: $200\text{-}900 \text{ nm}$
- Rýchlosť: 300 nm/min
- Zmena lámp: 340 nm
- Šírka štrbín: 4 nm
- Krok: 1 nm

Samotné meranie prebiehalo nasledovne: najskôr boli spektrá všetkých vzoriek merané oproti fosfátovému pufru (referenční vzorek). Neskôr boli merané diferenčné spektra zmesi Rhodamínu 6G s HK, a s mHK, a to vždy oproti jednému z reaktantov s príslušnou koncentráciou použitému ako referenčná vzorka. Všetky získané absorpčné spektrá boli exportované do Excel dokumentu. Zo získaných hodnôt absorbancií boli zostavené spojové bodové grafy.

5.5 Fluorescenčné metódy

5.5.1 Príprava vzoriek

Hodnoty koncentrácií pripravovaných vzoriek boli taktiež prevzaté z práce mojej konzultantky [33].

Pre experimenty bol pripravený zásobný roztok IHSS HK s koncentráciou $0,1 \text{ g/l}$ rozpuštením príslušného množstva v $0,01 \text{ M NaOH}$. Rovnako sa postupovalo v prípade mHK. Zásobný roztok Rhodamínu 6G s koncentráciou $330 \mu\text{M}$ bol pripravený rozpuštením zodpovedajúceho množstva farbiva v deionizovanej vode a riedením. Merané vzorky boli doplnené na finálny objem fosfátovým pufrom, ktorého príprava je spomínaná v **kapitole 5.4.1**.

Na meranie zhášania a dĺžky života fluorescencie bolo nachystaných sedem vzoriek Rhodamínu 6G s HK a sedem s mHK. Do odmerných baniek bolo pipetovaných vždy $75 \mu\text{l}$ zásobného roztoku Rhodamínu 6G a rôznych objemov zásobného roztoku HK, mHK (0 ml , $0,125 \text{ ml}$, $0,25 \text{ ml}$, $0,5 \text{ ml}$, $0,75 \text{ ml}$, $1,0 \text{ ml}$, $1,25 \text{ ml}$). Finálny objem, 25 ml , bol doplnený fosfátovým pufrom.

5.5.2 Meranie emisných spektier

Vzorky s farbivom a rastúcou koncentráciou HK, mHK (postup vid'. kapitola 5.5.1) boli aplikované do kremennej fluorescenčnej kyvety a ich emisné spektrá boli merané pomocou fluorescenčného spektrofotometra EDINBOURGH. Nastavenie spektrofotometra bolo nasledovné:

- § Vlnová dĺžka excitácie: 520 nm
- § Očakávané maximum emisie: 550 nm
- § Šírka štrbín: 1,05 nm
- § Rozsah emisného spektra: 530-650 nm
- § Krok: 1 nm

Samotné meranie vždy začínalo vzorkou, ktorá neobsahovala HK, mHK. Pri tejto vzorke sa očakávala najväčšia intenzita emisie. Šírka štrbín prístroja, ktorá bola nastavená podľa spomínanej vzorky, zostala nezmenená počas celého merania. Získané emisné spektrá boli exportované do Excel dokumentu. Maximá v emisných spektrách boli následne použité na stanovenie zhášacej konštanty z Stern-Volmerovej rovnice.

5.5.3 Korekcia emisných spektier

Z dôvodu možného vplyvu vnútorného filtračného efektu (vid'. kapitola 3.2.2.2) na emisné spektrá bola pri získaných intenzitách fluorescencie prevedená korekcia podľa rovnice (2). K zisteniu požadovaných absorpcií meraných vzoriek bol použitý UV-VIS spektrofotometer HITACHI U-3900H s nastaveným rozsahom vlnových dĺžok 650-520 nm, s krokom 1 nm a šírkou štrbín 4 nm. Získané absorpčné spektrá boli exportované v podobe dokumentu MS Excel.

5.5.4 Meranie doby života fluorescencie

Pre stanovenie mechanizmu zhášania fluorescencie Rhodamínu 6G humínovými kyselinami boli vzorky (príprava vid'. kapitola 5.5.1) podrobené analýze časovo rozlíšenej fluorescencie pomocou prístroja Fluorocube, ktorý pracuje na princípe metódy TCSPC. Nastavenie spektrofluorometra Fluorocube bolo nasledovné:

- Excitačná vlnová dĺžka nanoLED diódy: 455 nm
- Šírka pulzu diódy: 1,2 ns
- Emisný monochromátor: 550 nm
- Excitačný polarizátor: 0°
- Emisný polarizátor: 54,7°
- Coaxial delay: 65 ns
- TAC range: 50 ns
- RT preset: 0 s
- Peak preset: 10 000 counts
- Repetition rate: 1 MHz
- Sync delay: 0 ns

Signál diódy bol nastavený použitím koloidného kremíka (ludox) pri nastavení emisného monochromátora na excitačnú vlnovú dĺžku zvolenej nanoLED diódy, 455 nm. Poklesy intenzít

fluorescencie u meraných vzoriek boli zaznamenávané pomocou programu DataStation Version 2.4. K získaniu dôb života fluorescencie Rhodamiinu 6G z nameraných dát bol použitý program DAS6 Fluorescence Decay Analysis, ktorý pracuje na princípe nelineárnej regresie metódou najmenších štvorcov. V tomto programe boli namerané dáta prekladané 1-2 exponenciálnou matematickou funkciou. Výsledné dáta boli exportované v podobe textového dokumentu a následne prepísané do dokumentu MS Excel.

5.5.5 Ustálená fluorescenčná spektroskopia

Príprava vzoriek sa od predchádzajúcich fluorescenčných metód líši, keďže sledujeme fluorescenciu humínových kyselín a ich metylovanej modifikácie. Pre experiment bol pripravený zásobný roztok IHSS HK s koncentráciou 0,1 g/l rozpustením príslušného množstva v 0,01 M NaOH. Rovnako sa postupovalo v prípade mHK. Následne boli vytvorené dve sady vzoriek. V obidvoch sadách bolo zastúpené množstvo HK, a mHK, s výslednou koncentráciou 0,01 g/l. V druhej sade vzoriek bol k HK, a mHK, pridané množstvo látky Septonex s výslednou koncentráciou 0,001 g/l. Zásobný roztok látky Septonex s koncentráciou 0,1 g/l bol pripravený rozpustením príslušného množstva v deionizovanej vode.

Pripravené sady vzoriek boli následne aplikované do kremenej fluorescenčnej kyvety a ich excitačné a emisné spektrá boli merané pomocou fluorescenčného spektrometra Horiba FluoroLog®. Nastavenie spektrometra bolo nasledovné:

- § Excitačné maximum: 280 nm
- § Emisné maximum: 450 nm
- § Šírka štrbín: 5 nm
- § Optická dráha: 1 cm
- § Rozsah excitačného spektra: 240-550 nm
- § Rozsah emisného spektra: 300-600 nm
- § Krok: 5 nm
- § IHR 320 (detekcia): vypnuté
- § Nastavené formuly: R1, T1, T1/R1, T1_c/R1_c

Excitačné a emisné maximum bolo nastavené pri sledovaní prvého vzorku pomocou kontroly prístroja. Získané údaje boli exportované do dokumentu formátu Origin, ktoré pomocou OriginViewer boli skopírované a skorigované Stern-Volmerovou rovnicou (vid'. **kapitola 5.5.6**). Upravené hodnoty intenzít fluorescencie boli využité k vytvoreniu 3D grafov emisných a excitačných spektier.

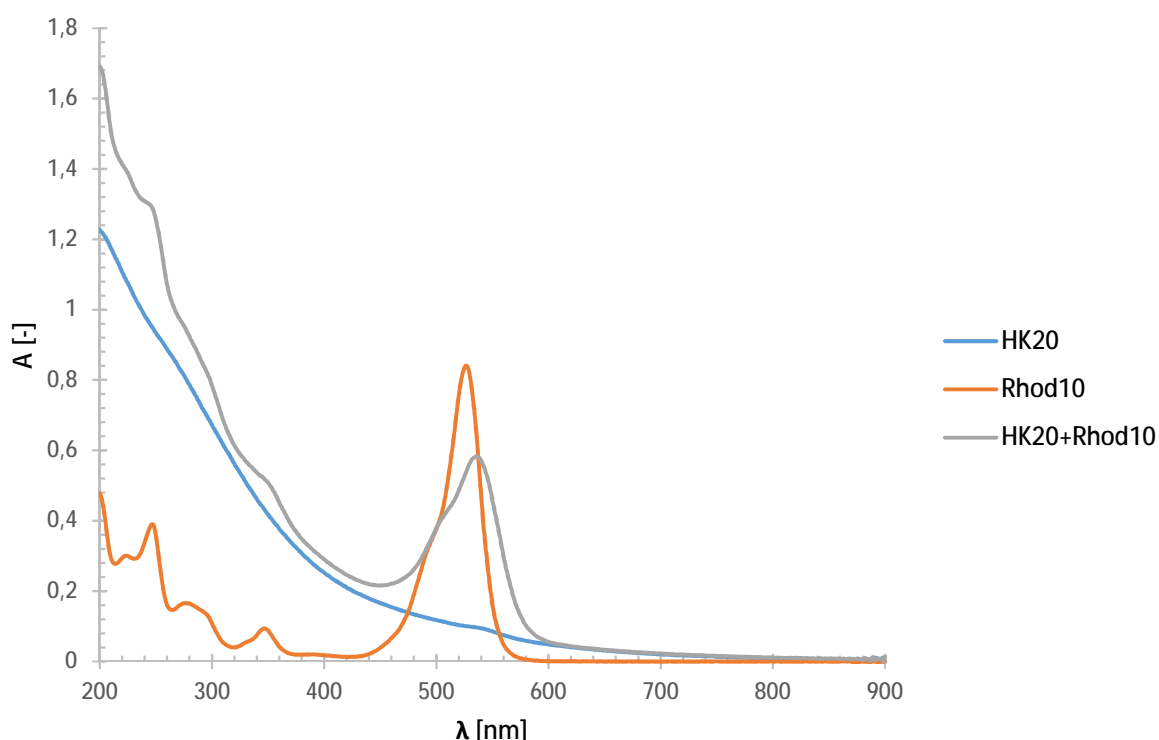
5.5.6 Korekcia excitačných a emisných spektier

Z dôvodu možného vplyvu vnútorného filtračného efektu (vid'. **kapitola 3.2.2.2**) na excitačné a emisné spektrá bola pri získaných intenzitách fluorescencie prevedená korekcia podľa rovnice (2). K zisteniu požadovaných absorpcií meraných vzoriek bol použitý UV-VIS spektrofotometer HITACHI U-3900H s nastaveným rozsahom vlnových dĺžok 600-240 nm, s krokom 1 nm a šírkou medzery 4 nm. Získané absorpčné spektrá boli exportované v podobe dokumentu MS Excel.

6 VÝSLEDKY A DISKUSIA

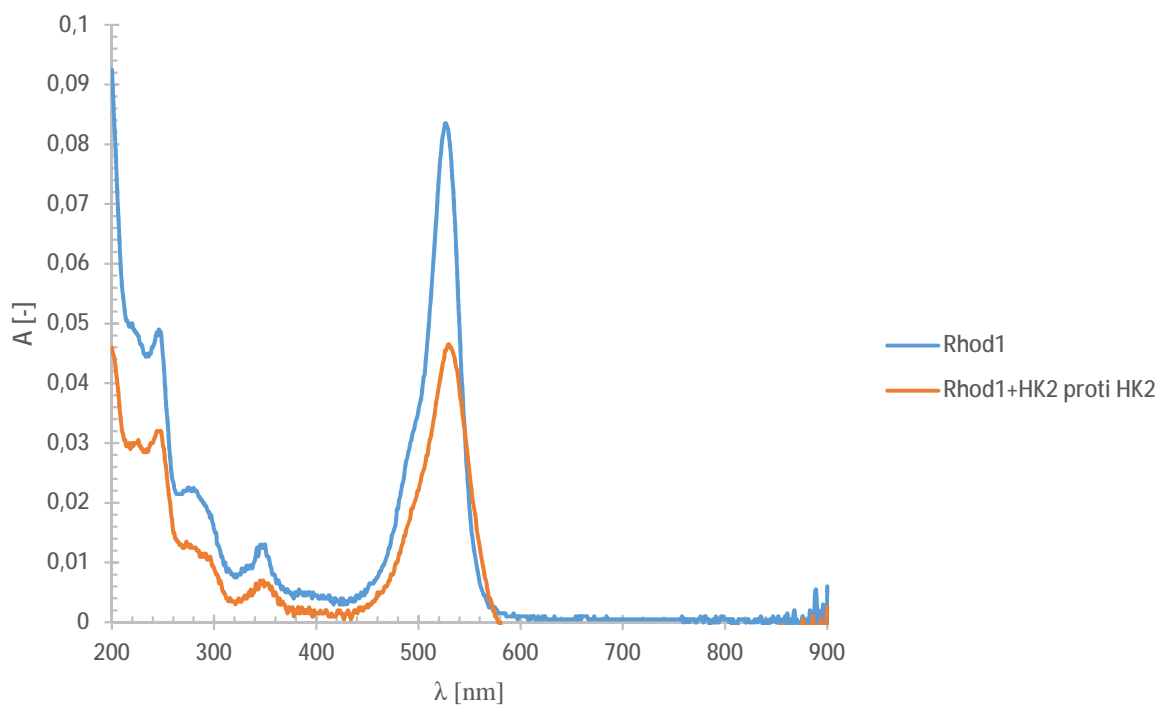
6.1 UV-VIS spektroskopia

Cieľom tohto merania bolo zistenie, respektíve ozrejenie interakcie humínových kyselín s Rhodamínom 6G. V grafe na *Obr.6* môžeme vidieť absorpčné spektrá Rhodamínu 6G, humínových kyselín s určitou koncentráciou a ich zmesi, merané oproti fosfátovému pufru. Ďalšie absorpčné spektrá s rôznymi koncentraciami, alebo rôznych modifikácii nájdete v *Príloha 1* až *Príloha 3*. Pre zistenie konkrétnych zmien v absorpčnom spektre bola použitá diferenčná UV-VIS, t.j. meranie zmesi oproti jednému z reaktantov, v našom prípade Rhodamín 6G alebo humínové kyseliny, respektíve ich metylované modifikácie.



Obr.6: UV-VIS spektrá humínových kyselín s koncentráciou 20 mg/l, R6G s koncentráciou 10 μmol/l a ich zmesi merané proti fosfátovému pufru

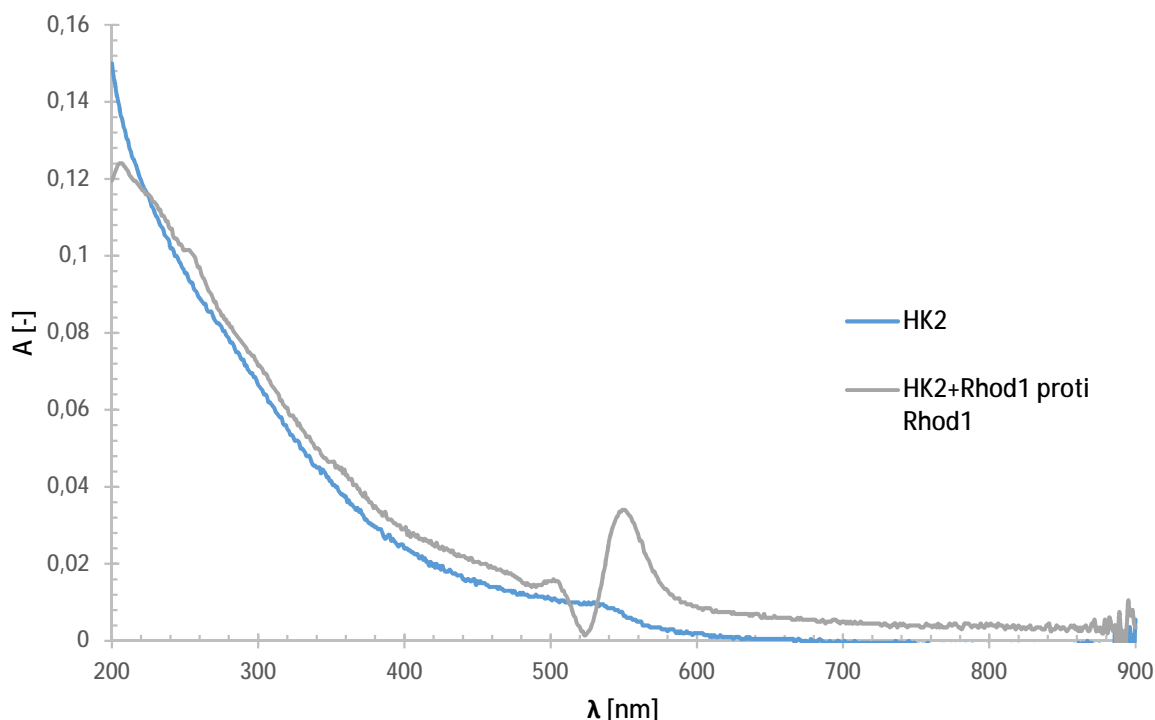
Ďalšie absorpčné spektrá Rhodamínu 6G a jeho zmesi boli merané proti roztoku humínových kyselín s koncentráciou zhodnou s jej koncentráciou v zmesi s Rhodamínom 6G. Výsledné UV-VIS spektrum zmesi ukazuje *Obr. 7*. V grafe je viditeľná interakcia Rhodamínu 6G s humínovými kyselinami, ktoré spôsobili, že v absorpčnom spektre zmesi nastal pokles absorpčného maxima a došlo k červenému posunu, čiže k posunutiu absorpčného maxima k vyšším vlnovým dĺžkam. Tento úkaz bol viditeľný aj pri vyšších koncentráciách, ale aj pri metylovaných modifikáciách humínových kyselín (viď. *Príloha 4* až *Príloha 6*). V metylovaných modifikáciách sme si mohli všimnúť miernejšie poklesy a posuny maxim absorbancie Rhodamínu 6G v porovnaní od nemetylovaných.



Obr. 7: UV-VIS spektrá R6Gs koncentráciou $1\mu\text{mol/l}$ sledované proti pufru a jeho zmesi s HK s koncentráciou 2 mg/l sledované proti HK s koncentráciou 2 mg/l

Tieto schopnosti humínových kyselín, ktoré s interakciou s farbivami zmenia ich absorpčné spektrum (dôjde k posunu k vyšším vlnovým dĺžkam), si všimol Hongmei Zhang s kolegami v interakcii humínových kyselín s malachitovou zelenou [34], i Zanini a spol. v interakcii s oxazínom [35]. Pri všetkých spomenutých meraniach, vrátane nášho, sa meralo s predpokladom, že medzi reaktantmi dochádza k vzniku π - π interakcií medzi aromatickými kruhmi humínových kyselín a Rhodamínu 6G. Práve vďaka týmto interakciám majú humínové kyseliny taký vplyv na Rhodamín 6G aj iné farbivá, aký sme mohli vidieť na predchádzajúcich grafoch.

Na Obr. 8 (vid'. Príloha 7 až Príloha 9) môžeme sledovať vplyv farbiva na humínové kyseliny. Môžeme vytvoriť z toho záver, že tak ako humínové kyseliny ovplyvňujú farbivá, tak farbivá neovplyvňujú humínové kyseliny. Zvláštnosťou je zakrivenie spektra v oblasti, kde by absorboval samotný Rhodamín 6G. Keďže sledujeme jeho zmes s humínovými kyselinami, tak vlastne porovnávame dva rôzne Rhodamíny 6G, „blank“ Rhodamín 6G je iný Rhodamín 6G v zmesi s humínovými kyselinami, respektíve s ich metylovanou modifikáciou. Z posledných grafov sa dá konštatovať, aký vplyv majú všetky skúmané modifikácie humínových kyselín na farbivá, kde sú menené ich vlastnosti pomocou π - π interakcií.



Obr. 8: UV-VIS spektrá HK s koncentráciou 2 mg/l sledované oproti puftru a jej zmesi s R6G s koncentráciou 1 $\mu\text{mol/l}$ sledované proti R6G s koncentráciou 1 $\mu\text{mol/l}$

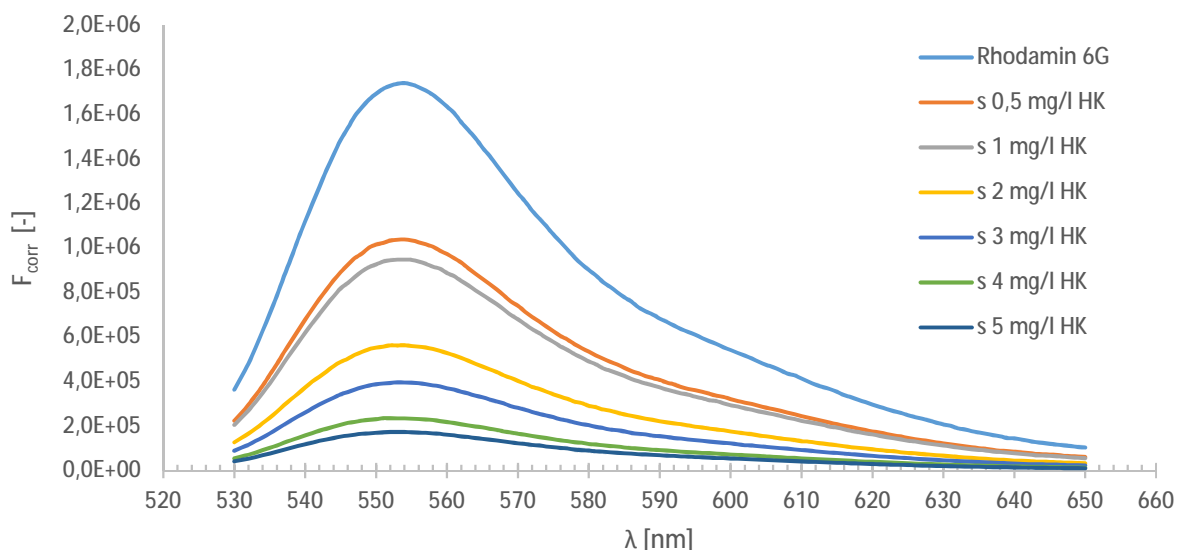
6.2 Zhášanie fluorescence

V tomto experimente sa využila schopnosť fluorescence Rhodamínu 6G. Experiment mal dve časti, cieľom prvého merania bolo meranie zhášania fluorescence Rhodamínu 6G humínovými kyselinami a porovnať vplyv modifikácie humínových kyselín na túto interakciu. Druhou cieľom merania bolo určenie mechanizmu zhášania fluoreskujúceho farbiva pomocou merania dôb života fluorescence Rhodamínu 6G v prítomnosti zhášača.

Vzorky obsahujúce konštantnú koncentráciu Rhodamínu 6G a rastúce koncentrácie humínových kyselín, respektíve metylovanej modifikácie (príprava vid' kapitola 5.5.1), boli merané vo fluorescenčnej kyvete pomocou fluorospektroskopu. Rovnako boli vzorky odmerané i na UV-VIS spektrometre, kde získané absorbancie boli využité na korekciu nameraných intenzít fluorescence podľa rovnice (2). Pri všetkých prezentovaných výsledkoch sa pracovalo s korigovanými hodnotami intenzity fluorescence.

Výsledné emisné spektrá, čiže závislosť intenzity fluorescence na vlnovej dĺžke, ukazuje Obr. 9, na ktorom môžeme vidieť intenzity fluorescence zhášané nemodifikovanými humínovými kyselinami. Na Obr. 9 na grafe je vidieť, že intenzita fluorescence Rhodamínu 6G klesá s koncentráciou humínových kyselín. Zhodný výsledok dosiahol aj Hafuka a spol., ktorí taktiež sledovali zhášanie Fluoresceínu a Rhodamínu 6G. Tí zistili slabý účinok humínových kyselín na Fluoresceín (FSC), ale silný na Rhodamín 6G (R6G), čo bolo aj dôvodom použitia tohto farbiva ako zástupcu organických iónov, keďže podľa Hafuku humínové kyseliny reagujú lepšie na kationové ióny (R6G) ako na aniónové (FSC) [36].

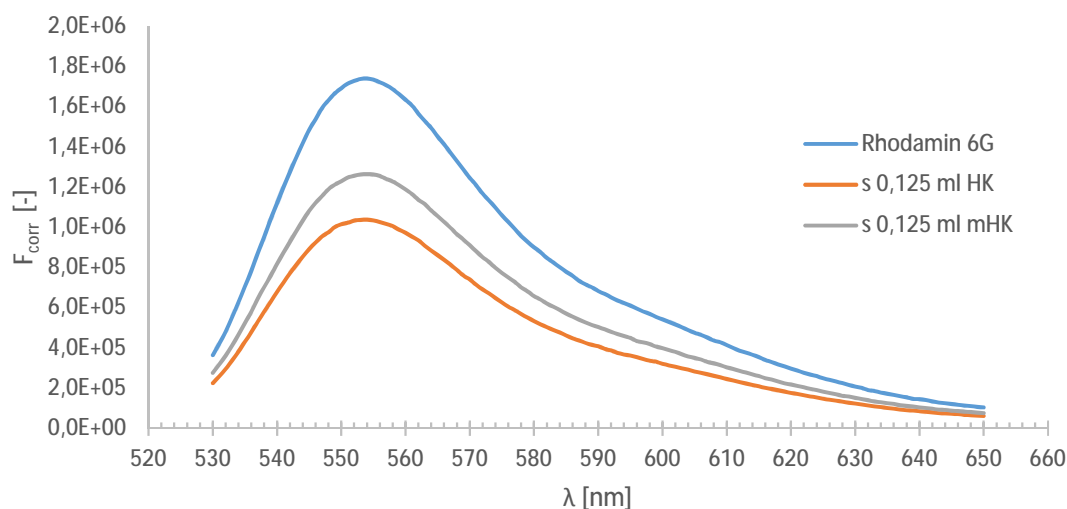
Rovnaký trend vykazujú vzorky s modifikovanými humínovými kyselinami (viď. Príloha 10), obidve modifikácie fungujú ako zhášač fluorescence Rhodamínu 6G.



Obr. 9: Zhášanie fluorescence R6G pomocou koncentračnej rady humínových kyselín s koncentráciou 0,1 g/l

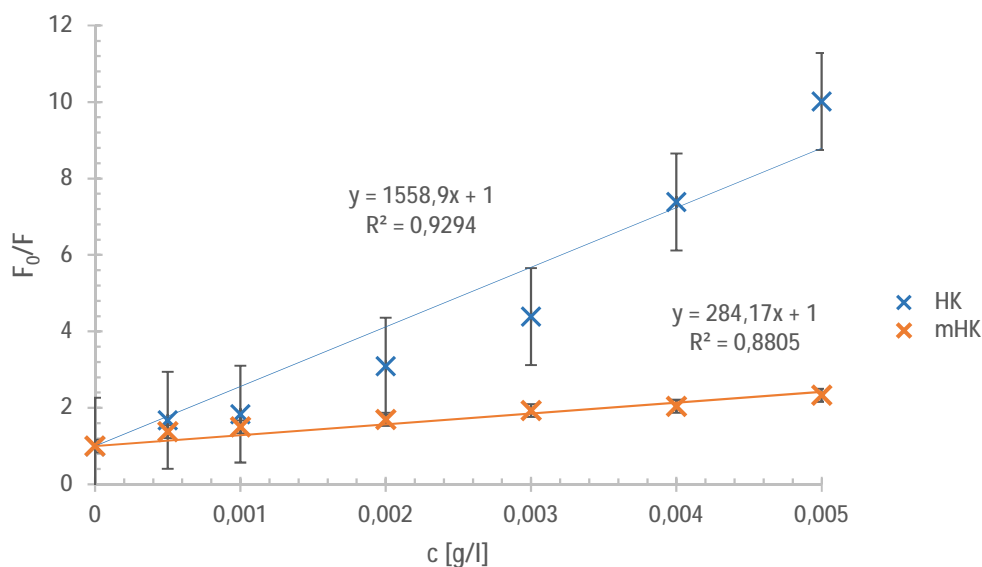
Aj keď metylovaná modifikácia vykazuje rovnaký trend zhášania ako nemodifikovaná, je vidieť mierny rozdiel v emisných spektrách Rhodamínu 6G. Príklad je znázornený na Obr. 10, na ktorom vidíme emisné spektrá „blank“ Rhodamínu 6G a zmes s humínovými kyselinami, aj jej modifikovanej modifikácii s rovnakou koncentráciou, presnejšie s koncentráciou 0,004 g/l. Rovnaký trend bol dosiahnutý vo všetkých meraných koncentráciách.

Nemodifikované humínové kyseliny zhášajú fluorescenciu Rhodamínu 6G viac ako ich metylovaná modifikácia, takže ak berieme mieru zhášania ako známku ako interagujú humínové kyseliny s Rhodamínom 6G, tak môžeme konštatovať, že pokles zhášania metylovaných humínových kyselín je obmedzenie interakcie, ktoré mohlo spôsobiť práve metylácia v štruktúre tejto modifikácie.



Obr. 10: Porovnanie zhášania fluorescence R6G humínových kyselín a ich metylovanej modifikácii s rovnakou koncentráciou

Maximá intenzít fluorescence všetkých nameraných vzoriek boli použité ku zostrojeniu závislostí popísané Stern-Volmerovou rovnicou, vid'. rovnica (2). Výsledky pre vzorky s humínovými kyselinami a metylovaných modifikácií sú znázornené v grafe na Obr. 11. Vďaka tejto závislosti si môžeme taktiež všimnúť rozdielu medzi humínovými kyselinami a ich metylovanou modifikáciou, kde hodnoty pomerov F_0/F boli nižšie pri modifikovaných humínových kyselinách, keďže zhášali menej ako nemodifikované.

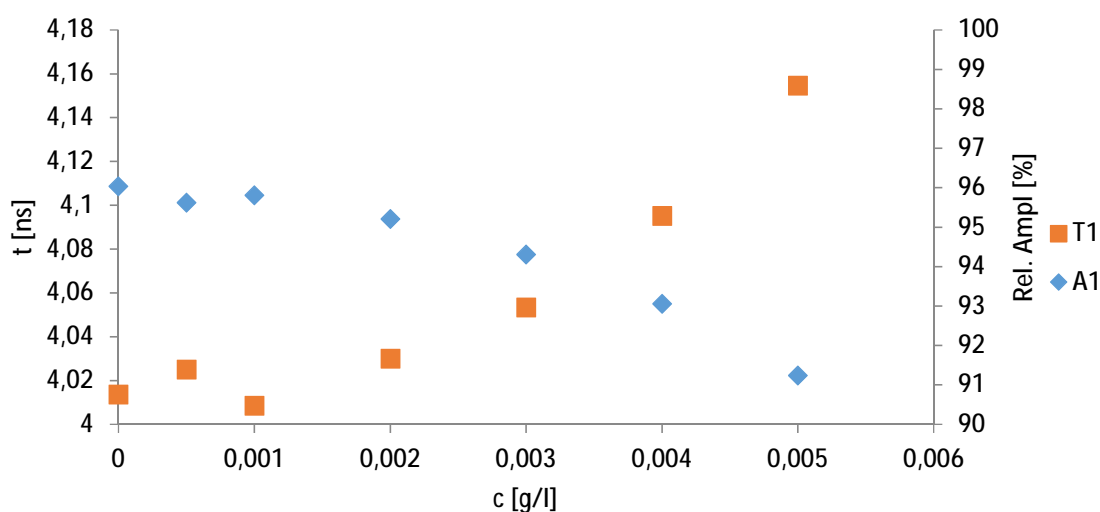


Obr. 11: Pomer korigovaných intenzít fluorescence R6G s a bez zhášača v závislosti na koncentrácii humínových kyselín/metylovaných humínových kyselín

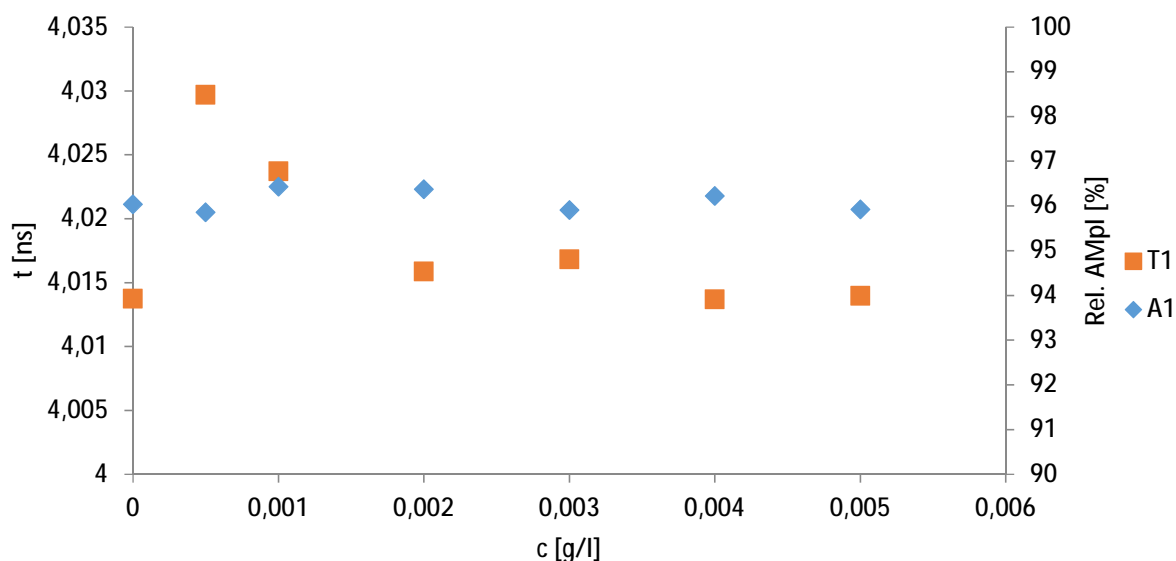
Z doterajších výsledkov sa nevie určiť, o aký typ mechanizmu zhášania sa jedná, preto sa muselo prejsť k druhej časti, a to k meraniu doby života fluorescence. Sada vzoriek bola

rovnako pripravená ako v predošlých meraniach emisných spektier. Následne bola podrobená analýze časovo rozlíšenej fluorescenčnej metóde TCSPC. Výsledky, ktoré môžeme vidieť v grafoch na *Obr. 12* a *Obr. 13* ukázali, že Rhodamín 6G vykazuje rast doby života s narastajúcou koncentráciou humínových kyselín, zatiaľ čo v zmesi Rhodamínu 6G s metylovanými humínovými kyselinami zostala doba života fluorescence približne rovnaká. Z toho plynie, že mechanizmus zhášania Rhodamínu 6G humínovými kyselinami je takmer statický, čiže nám vyšiel zhodný výsledok s publikáciou od Hafuka a spol. [36].

V grafoch sa nachádza okrem nameraného času aj jeho relatívne zastúpenie, t.j. ako veľmi statický bol mechanizmus zhášania. Môžeme spozorovať, že v prípade nemodifikovaných humínových kyselín klesá relatívne zastúpenie majoritnej doby života fluorescence. Naopak u metylovej modifikácie sa relatívne zastúpenie takmer nemení. Z tohto merania môžeme skonštatovať, že zmes Rhodamínu 6G a metylovaných humínových kyselín má väčší statický potenciál mechanizmu zhášania ako majú zmesi s nemodifikovanými. Naopak, s narastajúcou koncentráciou nemodifikovaných humínových kyselín nám rastie dynamický potenciál mechanizmu zhášania fluorescence. Pre prehľad vid'. *Príloha 11* a *Príloha 12* sú zaznamenané minoritné doby života fluorescence, ktoré sú nižšie ako je doba života fluorescence Rhodamínu 6G bez zhášača. Ukazujú mieru dynamického potenciálu mechanizmu zhášania u daných sad vzoriek (modifikované vs. nemodifikované)



Obr. 12: Meranie doby zhášania fluorescence R6G a humínových kyselín v závislosti na koncentrácii humínových kyselín spolu s ich relatívnym zastúpením



Obr. 13: Meranie doby zhášania fluorescence R6G a metylovaných humínových kyselín v závislosti na koncentrácii humínových kyselín spolu s ich relatívnym zastúpením

Statický mechanizmus zhášania znamená v našom prípade to, že vznikom väzieb medzi Rhodamínom 6G a humínovými kyselinami sa tvorí nefluoreskujúci komplex. Stern-Volmerová rovnica, ktorá nám popisala pokles intenzity fluorescence pri meraniach zhášania fluorescence, obsahuje asociačnú konštantu vzniku komplexu K_s . Hodnota konštanty v prípade nemodifikovaných humínových kyselín bola stanovená na 1558,9 l/g, v prípade modifikovaných 284,17 l/g.

Zo zistených hodnôt môžeme konštatovať, že i keď nemodifikované humínové kyseliny vykazujú väčší dynamický mechanizmus zhášania, tak ochotnejšie prebiehal vznik nefluoreskujúcich komplexov v zmesi. Pri modifikovaných humínových kyselinách môže byť pokles vzniku nefluoreskujúcich komplexov spôsobený zmenou v štruktúre, metyláciou. Napriek tomu interakcia nebola úplne podmienená prítomnosťou funkčných skupín v štruktúre zhášača, v našom prípade karboxylových kyselín v humínových kyselinách, čoho dôkazom je, že metylované humínové kyseliny pomerne dosť zhášali fluorescenciu Rhodamínu 6G.

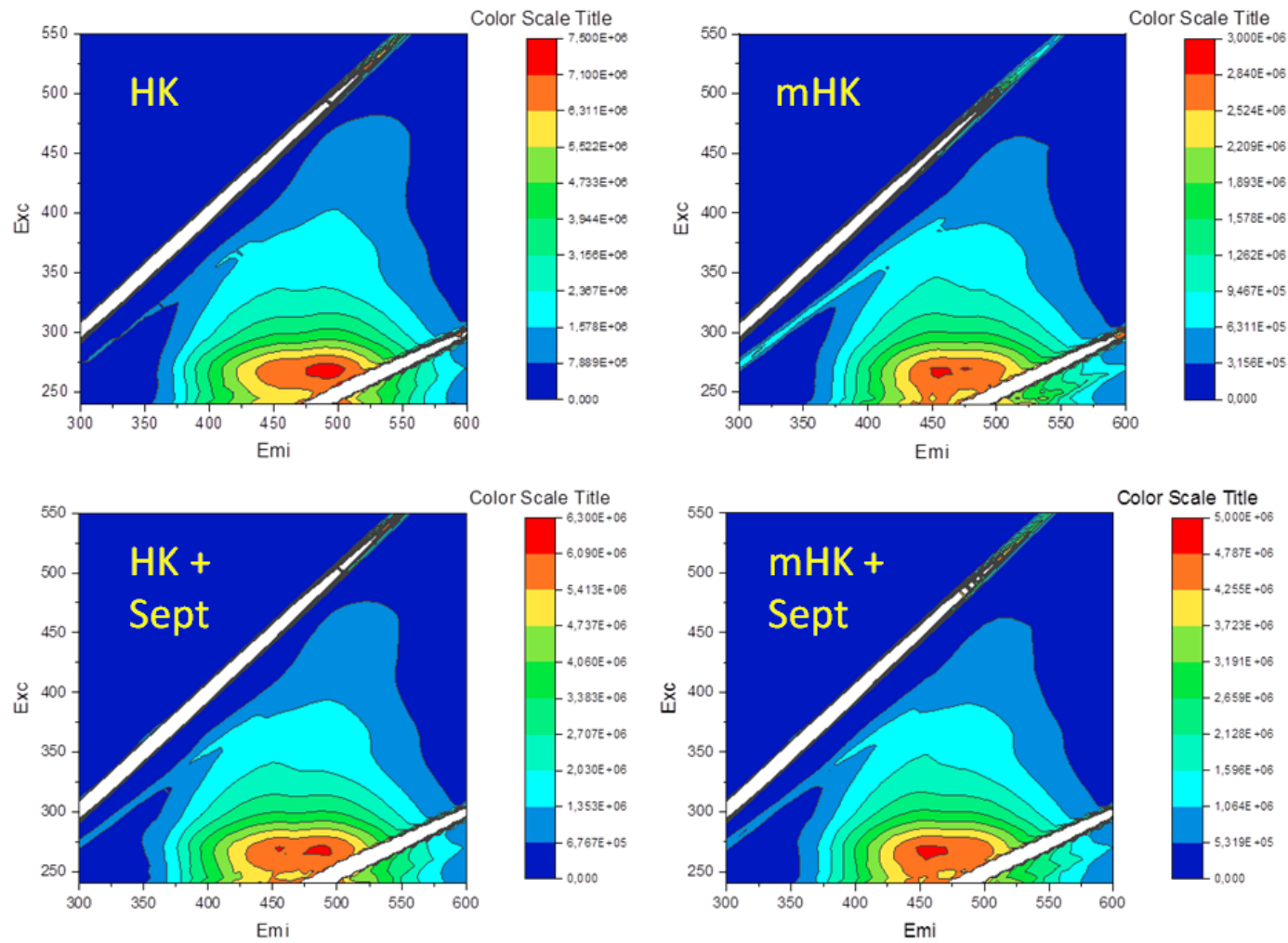
6.3 Ustálená fluorescenčná spektroskopia

Z predošlých experimentov sme sledovali interakciu HK a Rhodamínu 6G, z pohľadu ako HK ovplyvňujú Rhodamin 6G. V tomto experimente sme preto zvolili novú kombináciu reaktantov, dôvodom zmeny reaktantu bolo sledovanie vlastnej fluorescence humínových kyselín. Ako zástupcu iónových organických látok sme zvolili Septonex, ktorý je široko rozšírený a aplikačne zaujímavý model kationového tenzidu, a nedisponuje fluorescenčnými vlastnosťami.

Vzorky (príprava vid'. kapitola 5.5.5), boli merané vo fluorescenčnej kyvete pomocou fluorescenčného spektroskopu. Rovnako boli vzorky odmerané i na UV-VIS spektrometre, kde získané absorbancie boli využité na korekciu nameraných intenzít fluorescence podľa rovnice (2). Pri všetkých prezentovaných výsledkoch sa pracovalo s korigovanými hodnotami intenzity fluorescence.

Výsledné excitačné a emisné spektrá boli prevedené do excitačno-emisného spektier, ktoré sú zobrazené na *Obr. 14*. Na spektrách sú najväčšie hodnoty fluorescencie vyznačené červenou farbou. Keď porovnáme spektrá HK a mHK, môžeme spozorovať rast výskytu maxim fluorescencie v nižších vlnových dĺžkach. Tento jav sa nazýva modrý posun, je to jav, kedy emisia emitovanej energie prebieha v nižších vlnových dĺžkach. Tento jav si môžeme všimnúť i v porovnaní spektier HK a HK+Septonex, aj v porovnaní mHK a mHK+Septonex. Pre ich lepšie porovnanie boli zostavené excitačno-emisné spektrá vid'. *Príloha 13* a *Príloha 14*.

Rovnaké výsledky dosiahol i Yuan a spol. [37], ktorý študoval interakciu medzi HK a dvoma druhmi antibiotík pomocou UV-VIS spektroskopie. Výsledky ukázali červený posun absorpčných spektier s jedným druhom antibiotík (sulfadiazín) a modrý posun s druhým druhom antibiotík (oxytetracyklín). Pri zvýšení pH vzorkov vykazovali všetky UV-VIS spektrá modrý posun, čo mohlo byť spôsobené disociáciou funkčných skupín HK. Z tohto záveru môžeme skonštatovať, že metylácia funkčných skupín HK má rovnaký vplyv na ich vlastnosti ako zvýšenie pH.



Obr. 14: Excitačno-emisné spektrá HK, mHK, ich zmesi so Septonexom

7 ZÁVER

Táto bakalárska práca je zameraná na štúdium interakcie humínových kyselín s iónovými organickými látkami. Cieľom práce bolo stanoviť vplyv funkčných skupín na túto interakciu. K analýze interakcií boli vybrané vhodné spektroskopické metódy: UV-VIS spektroskopia, fluorescenčné metódy (zhášanie fluorescence a doba života fluorescence) a ustálená fluorescenčná spektroskopia.

V rámci UV-VIS experimentov pri meraní zmesi Rhodamínu 6G a humínových kyselín proti roztoku humínových kyselín alebo metylovaných humínových kyselín s rovnakou koncentráciou došlo v spektre Rhodamínu 6G k batochromnému posunu maxima absorpcie. Týmito výsledkami bol potvrdená hypotéza o prítomnosti π - π interakcií medzi Rhodamínom 6G a humínovými kyselinami.

Interakcia medzi Rhodamínom 6G a humínovými kyselinami, resp. ich metylovanými modifikáciami bola následne študovaná fluorescenčnými metódami. Potvrdili sme schopnosť humínových kyselín prejavovať sa ako výborný zhášač fluorescence, keď s rastúcou koncentráciou HK a mHK klesala intenzita fluorescence Rhodamínu 6G. Mechanizmus zhášania bol pomocou merania doby života fluorescence stanovený ako prevažne statický a doba života Rhodamínu 6G sa hýbala okolo hodnoty 4 ns. Zo Stern-Volmerovej závislosti boli určené asociačné konštanty vzniku komplexu (K_S). Konštanta bola u HK vyššia ako u mHK, čo naznačuje obmedzenie interakcie s farbivom vplyvom metylácie v štruktúre mHK. Metylované humínové kyseliny stále dostatočne zhášali Rhodamín 6G, z čoho vyplýva, že blokovanie karboxylových skupín nezpôsobuje kompletnú absenciu interakcií humínových kyselín s Rhodamínom 6G.

Posledná metóda na sledovanie interakcie humínových kyselín s iónovými organickými látkami bola zvolená ustálená fluorescenčná metóda. Zástupca iónových organických látok bola namiesto Rhodamínu 6G látka Septonex. Metóda bola nastavená tak, aby sme sledovali interakciu HK s organickými iónmi z pohľadu HK. V excitačno-emisných spektrách zmesí HK, mHK a Septonexu v rámci tohto experimentu došlo k hypsochromnému posunu emisných intenzít fluorescence oproti roztokom HK, mHK. Tento istý posun bol prítomný v porovnaní excitačno-emisných spektrách roztokov HK a mHK. Z tohto záveru sa dá konštatovať vplyv funkčných skupín HK na ich reaktivitu.

Všetky prevedené spektroskopické metódy sa ukázali ako použiteľné techniky pre štúdium interakcie medzi humínovými kyselinami a organickými iónmi a pre posúdenie vplyvu funkčných skupín HK na túto interakciu. Dosiiahnuté výsledky, hlavne z posledného experimentu, predstavujú veľkú motiváciu a inšpiráciu pre pokračujúci výskum v oblasti reaktivity humínových kyselín. V nasledujúcich experimentoch by mohlo byť zaujímavé sa zamerať na interakcie HK s farmaceuticky zaujímavými organickými látkami, alebo látkami s využitím v medicíne, biomedicíne. Taktiež by bolo zaujímavé sa zamerať na metódy, kde budeme priamo na humínových kyselinách pozorovať vplyv modifikácie na ich reaktivitu, ako to bolo u fluorescenčnej ustálenej spektroskopii.

8 ZDROJE

- [1] SCHNITZER, M. a S.U. KHAN. Soil Organic Matter. Developments in Soil Science. 1978, 8, 1-319. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0166-2481\(08\)70016-3](https://doi.org/10.1016/S0166-2481(08)70016-3).
- [2] STEINBERG, Ch. Ecology of humic substances in freshwaters: determinants from geochemistry to ecological niches. New York: Springer, 2003. ISBN 3-540-43922-6.
- [3] TAN, K. H. Humic matter in soil and the environment: principles and controversies. New York: Marcel Dekker, c2003. Books in soils, plants and the environment. ISBN 0-8247-4272-9.
- [4] STEVENSON, F. Humus chemistry: genesis, composition, reactions. 2nd ed. New York: John Wiley and Sons, c1994. ISBN 04-715-9474-1.
- [5] MORITA, H. Facile methylation of humic acids from organic soils. Canadian journal of chemistry. 1966, r. 44, s. 1593–1594.
- [6] ANDELKOVIĆ, T., J. PEROVIĆ, M. PURENOVIĆ, S. BLAGOJEVIĆ, R. NIKOLIĆ, D. ANDJELKOVIĆ a A. BOJIĆ. Spectroscopic and potentiometric studies on derivatized natural humic acid. Analytical Science. 2006, r. 22, č. 12, s. 1553–1558. ISSN 0910-6340.
- [7] ANDELKOVIĆ, T., J. PEROVIĆ, M. PURENOVIĆ, S. BLAGOJEVIĆ, R. NIKOLIĆ, D. ANDJELKOVIĆ a A. BOJIĆ. A direct potentiometric titration study of the dissociation of humic acid with selectively blocked functional groups. Eclética Química. 2006, r. 31, č. 3, s. 39–46. ISSN 0100-4670.
- [8] VAN'T ERVE, T. J., R. H. RAUTIAINEN, L. W. ROBERTSON a G. LUTHE. Trimethylsilyldiazomethan: A safe non-explosive, cost effective and less-toxic reagent for phenol derivatization in GC applications. Environment International. 2010, r. 36, č. 8, s. 835–842. ISSN 0160-4120.
- [9] KLUČÁKOVÁ, M., M. KALINA, P. SEDLÁČEK a L. GRASSET. Reactivity and transport mapping of Cu(II) ions in humic hydrogels. Journal of Soils and Sediments. 2014, r. 14, č. 2, s. 368–376. ISSN 1439-0108.
- [10] STEINBÜCHEL, A. a R. H. MARCHESSAULT. Biopolymers for medical and pharmaceutical applications. Weinheim: Wiley-VCH, 2005. ISBN 3-527-31154-8.
- [11] VAN RENSBURG, C. E. J. The antiinflammatory properties of humic substances: Amini review. Phytotherapy Research. 2015, r. 29, č. 6, s. 791–795. ISSN 0951418x.
- [12] PERKAMPUS, Heinz-Helmut. UV-VIS spectroscopy and its applications. Berlin: Springer, 1992. Springer laboratory.
- [13] ČÁSLAVSKÝ, Josef a Jiří Georg Kamil ŠEVČÍK. Analýza organických látek: učební text projektu "Příprava kurzů a učebních textů v oboru vzorkování a chemické analýzy": modul K02-2014. Český Těšín: 2 THETA, 2014. Analytical standards and equipment. ISBN 978-80-260-7085-6.
- [14] SAUER, M., J. HOFKENS a J. ENDERLEIN. Handbook of fluorescence spectroscopy and imaging: from single molecules to ensembles. Weinheim: Wiley-VCH, 2011. ISBN 978-3-527-31669-4.
- [15] The Molecular Probes® Handbook: Fluorescence Fundamentals [online]. Invitrogen. [cit. 2014-1-4]. Dostupné na URL: <http://www.lifetechnologies.com/cz/en/home/references/molecular-probes-the-handbook/introduction-to-fluorescence-techniques.htm>

- [16] LAKOWICZ, J. R. Principles of fluorescence spectroscopy. 3rd ed. New York: Springel, 2006. ISBN 978-0387-31278-1.
- [17] NAKASHIMA, K., M. MAKI, F. ISHIKAWA, T. YOSHIKAWA, Y. K. GONG a T.MIYAJIMA. Fluorescence studies on binding of pyrene and its derivatives to humic acid. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 2007, r.67, č. 3–4, s. 930–935. ISSN 1386-1425
- [18] VALEUR, B. Molecular fluorescence: principles and applications. 1st ed. Weinheim: Wiley-VCH, 2002. ISBN 3-527-60024-8. Khan, Tuhin. (2017). Chemical and Physical Strategies for Modulation of Excited State Dynamics and Consequent Emission Enhancement of Schiff Bases. 10.13140/RG.2.2.29866.11201.
- [19] GRASSET, Laurent, Cédric GUIGNARD, André AMBLÈS, Ismail M. ABID a Geoffrey DAVIES. Free and esterified aliphatic carboxylic acids in humin and humic acids from a peat sample as revealed by pyrolysis with tetramethylammonium hydroxide or tetraethylammonium acetate: Binding of Fe(III), Pb(II), and Cu(II). *Organic Geochemistry*. 2002, 33(3), 181-188. DOI: 10.1016/S0146-6380(01)00150-4. ISSN 01466380. Dostupné tiež z:
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0146638001001504>
- [20] SCHNITZER, M a KHAN S. U. Humic substances in the environment. New York: M. Dekker, 1972, 327 s. ISBN 08-247-1614-0.
- [21] DE MELO, B. A. G., F. L. MOTTA a M. H. A. SANTANA. Humic Acids: Structural properties and multiple functionalities for novel technological developments. *Materials Science and Engineering C*. 2016, r. 62, s. 962–974. ISSN 0928-4931.
- [22] SKOKANOVÁ, M. a K. DERCOVÁ. Humínové kyseliny. Interakcie humínových kyselín s kontaminantami. *Chemické listy*. 2008, č. 102, s. 338–345.
- [23] SCHMEIDE, K., S. SACHS, M. BUBNER, T. REICH, K. H. HEISE a G. BERNHARD. Interaction of uranium(VI) with various modified and unmodified natural 57 and synthetic humic substances studied by EXAFS and FTIR spectroscopy. *Inorganica Chimica Acta*. 2003, r. 351, s. 133–140. ISSN 0020-1693.
- [24] ANĐELKOVIĆ, T., R. NIKOLIĆ, A. BOJIĆ, D. ANĐELKOVIĆ a G. NIKOLIĆ. Binding of cadmium to soil humic acid as a function of carboxyl group content. *Macedonian Journal of Chemistry and Chemical Engineering*. 2010, r. 29, č. 2, s. 215–224. ISSN 1857-5552.
- [25] ZERMANE, F., B. CHEKNANE, J. P. BASLY, O. BOURAS a M. BAUDU. Influence of humic acids on the adsorption of Basic Yellow 28 dye onto an iron organo-inorgano pillared clay and two Hydrous Ferric Oxides. *Journal of Colloid and Interface Science*. 2013, r. 395, s. 212–216. ISSN 0021-9797.
- [26] ZHANG, X., P. ZHANG, Z. WU, L. ZHANG, G. ZENG a CH. ZHOU. Adsorption of methylene blue onto humic acid-coated Fe₃O₄ nanoparticles. *Colloids and Surface A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 2013, r. 435, s. 85–90. ISSN 0927-7757.
- [27] SHENG, G. P., M. L. ZHANG a H. Q. YU. Quantification of the interactions between acationic dye and humic substances in aqueous solutions. *Journal of Colloid and Interface Science*. 2009, r. 331, č. 1, s. 15–20. ISSN 0021-9797.

- [28] IGLESIAS, A., R. LÓPEZ, D. GONDAR, J. ANTELO, S. FIOL a F. ARCE. Effect of pH and ionic strength on the binding of paraquat and MCPA by soil fulvic and humic acids. *Chemosphere*. 2009, r. 76, č. 1, s. 107–113. ISSN 0045-6535.
- [29] NAKASHIMA, K., M. MAKI, F. ISHIKAWA, T. YOSHIKAWA, Y.-K. GONG a T. MIYAJIMA. Fluorescence studies on binding of pyrene and its derivatives to humic acid. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 2007, r. 67, č. 3-4, s. 930–935. ISSN 1386-1425.
- [30] ZEHENTBAUER, F. M., C. MORETTO, R. STEPHEN, T. THEVAR, J. R. GILCHRIST, D. POKRAJAC, K. L. RICHARD a J. KIEFER. Fluorescence spectroscopy of Rhodamine 6G: Concentration and solvent effects. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 2014, r. 121, s. 147–151. ISSN 1386-1425.
- [31] SHANKARLING, G. S. a K. J. JARAG. Laser Dyes. *Resonance: Journal of Science Education*. 2010, r. 15, č. 9, s. 804–818.
- [32] GHASEMI, J., A. NIAZI a M. KUBISTA. Thermodynamics study of the dimerization equilibria of rhodamine B and 6G in different ionic strengths by photometric titrations and chemometric methods. *Spectrochimica Acta Part A*. 2005, r. 62, s. 649–656. ISSN 1386-1425.
- [33] FRYŠOVÁ, E. Vliv chemické modifikace huminových kyselin na jejich interakces organickými ionty. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2017. 74 s. Vedoucí diplomové práce Ing. Petr Sedláček, Ph.D.
- [34] ZHANG, H., M. YIN, J. SHI a Y. WANG. Quest for binding mode of malachite green with humic acid. *Journal of Molecular Structure*. 2015, r. 1081, s. 268–273. ISSN 0022-2860.
- [35] ZANINI, G. P., M. J. AVENA, S. FIOL a F. ARCE. Effects of pH and electrolyte concentration on the binding between a humic acid and an oxazine dye. *Chemosphere*. 2006, r. 63, č. 3, s. 430–439. ISSN 0045-6535
- [36] HAFUKA, Akira, Qing DING, Hiroshi YAMAMURA, Koji YAMADA a Hisashi SATOH. Interactions of dissolved humic substances with oppositely charged fluorescent dyes for tracer techniques. *Water Research* [online]. 2015, 85, 193-198 [cit. 2019-05-13]. DOI: 10.1016/j.watres.2015.08.039. ISSN 00431354. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0043135415301901>
- [37] YUAN, Xiaoyu, Shengke YANG, Jie FANG, Xueli WANG, Haizhen MA, Zongzhou WANG, Runze WANG a Yaqian ZHAO. Interaction Mechanism between Antibiotics and Humic Acid by UV-Vis Spectrometry. *International Journal of Environmental Research and Public Health* [online]. 2018, 15(9) [cit. 2019-05-20]. DOI: 10.3390/ijerph15091911. ISSN 1660-4601. Dostupné z: <http://www.mdpi.com/1660-4601/15/9/1911>

9 ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK A SYMBOLOV

HL – humínové látky

HK – humínové kyseliny

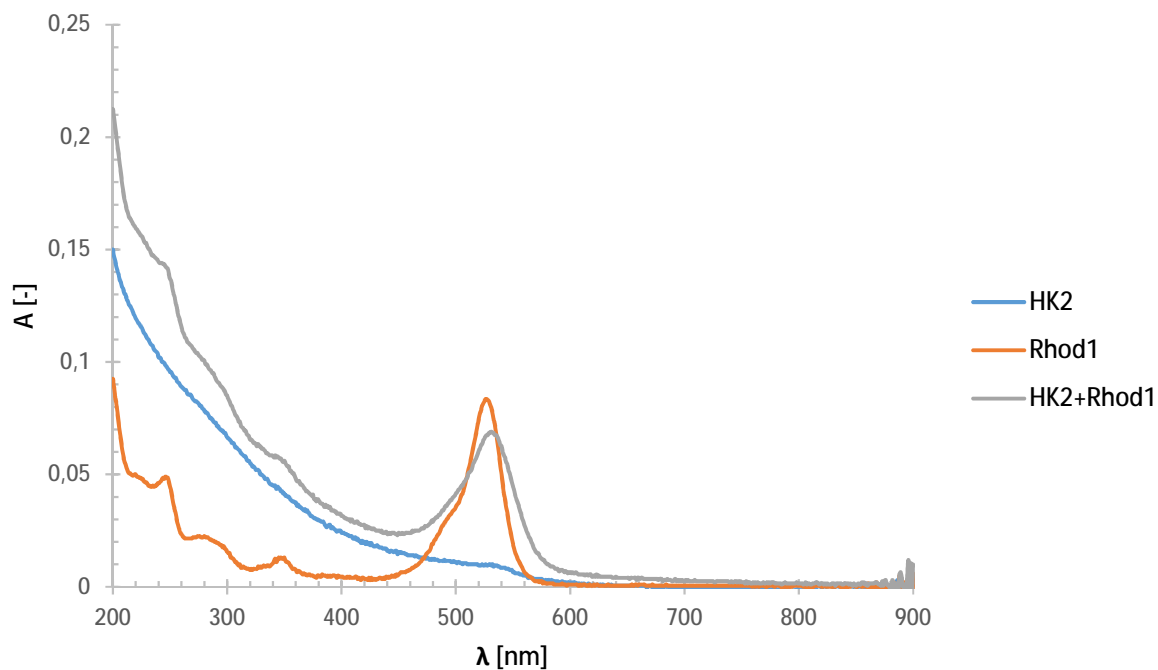
mHK – metylované humínové kyseliny

TMS-DM – (Diazometyl) trimetylsilán

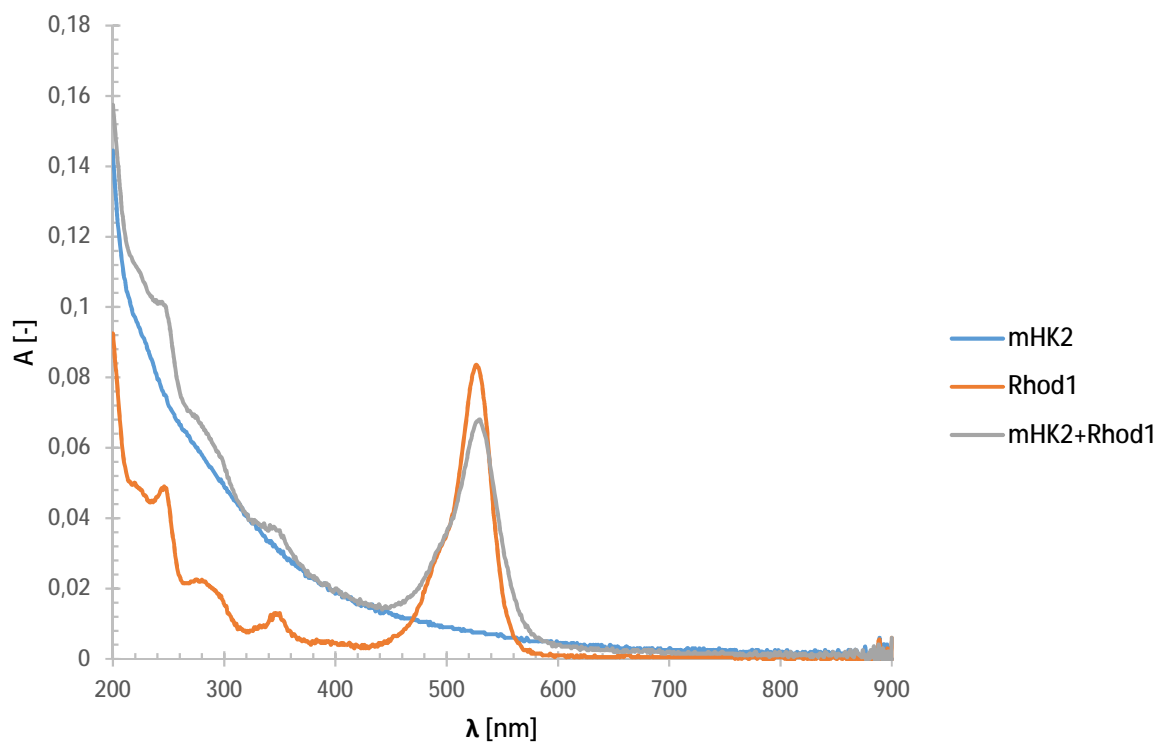
TCSPC – Time-correlated Single Photon Counting

R6G – Rhodamín 6G

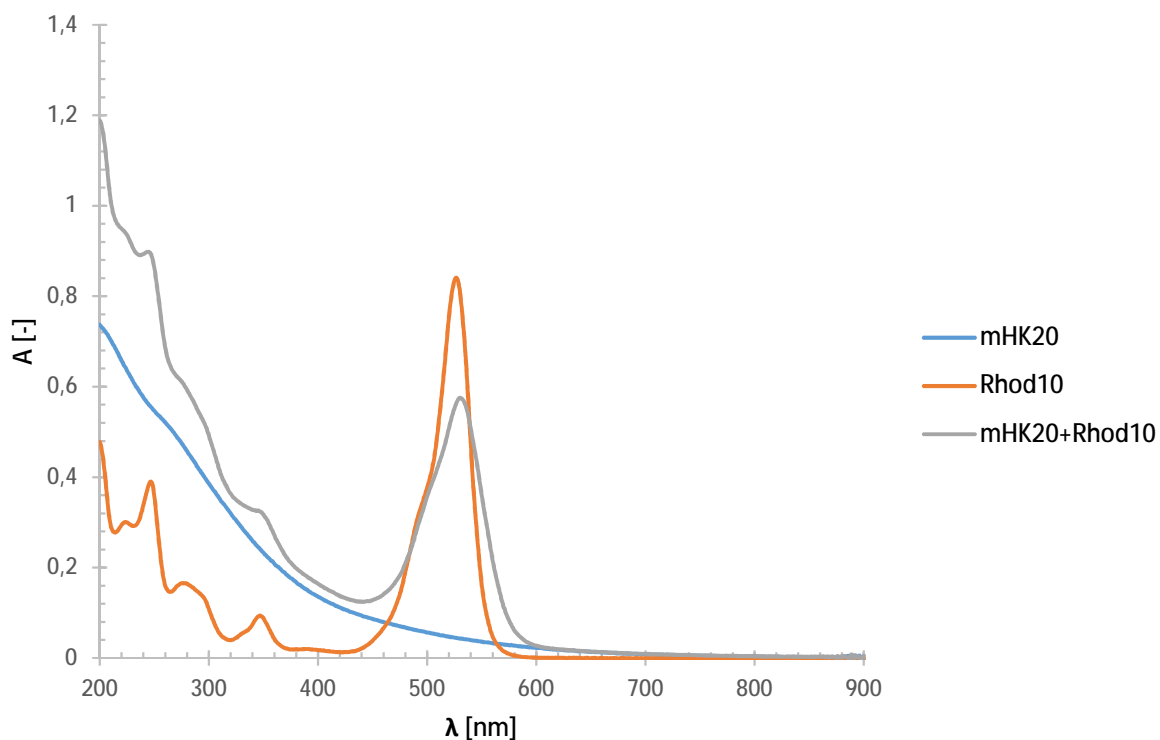
10 PRÍLOHY



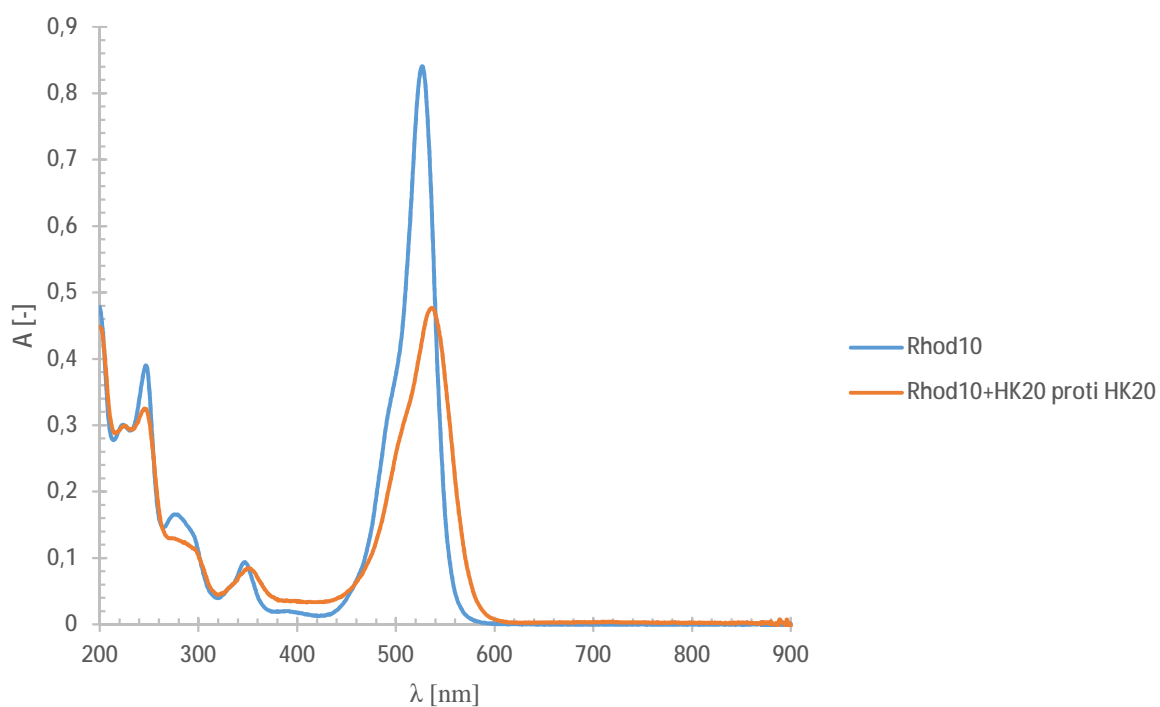
Príloha 1: UV-VIS spektrá HK s koncentráciou 2 mg/l, R6G s koncentráciou 1 $\mu\text{mol/l}$ a ich zmesi merané proti fosfátovému pufru



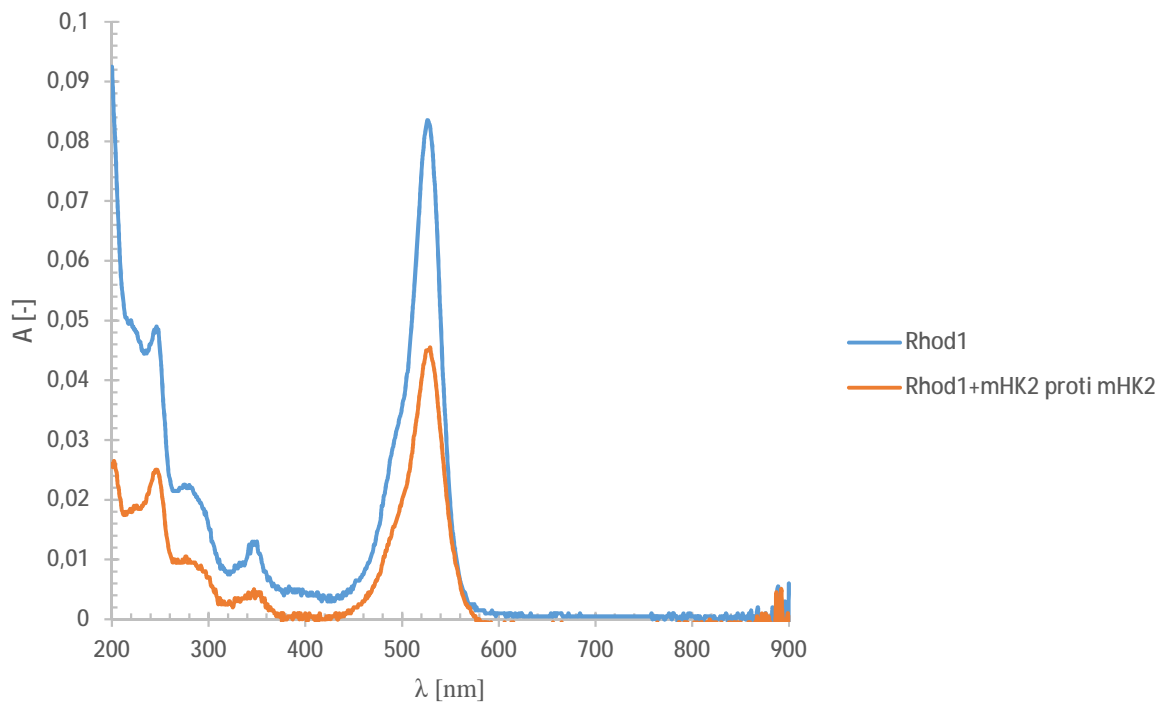
Príloha 2: UV-VIS spektrá mHK s koncentráciou 2 mg/l, R6G s koncentráciou 1 $\mu\text{mol/l}$ a ich zmesi merané proti fosfátovému pufru



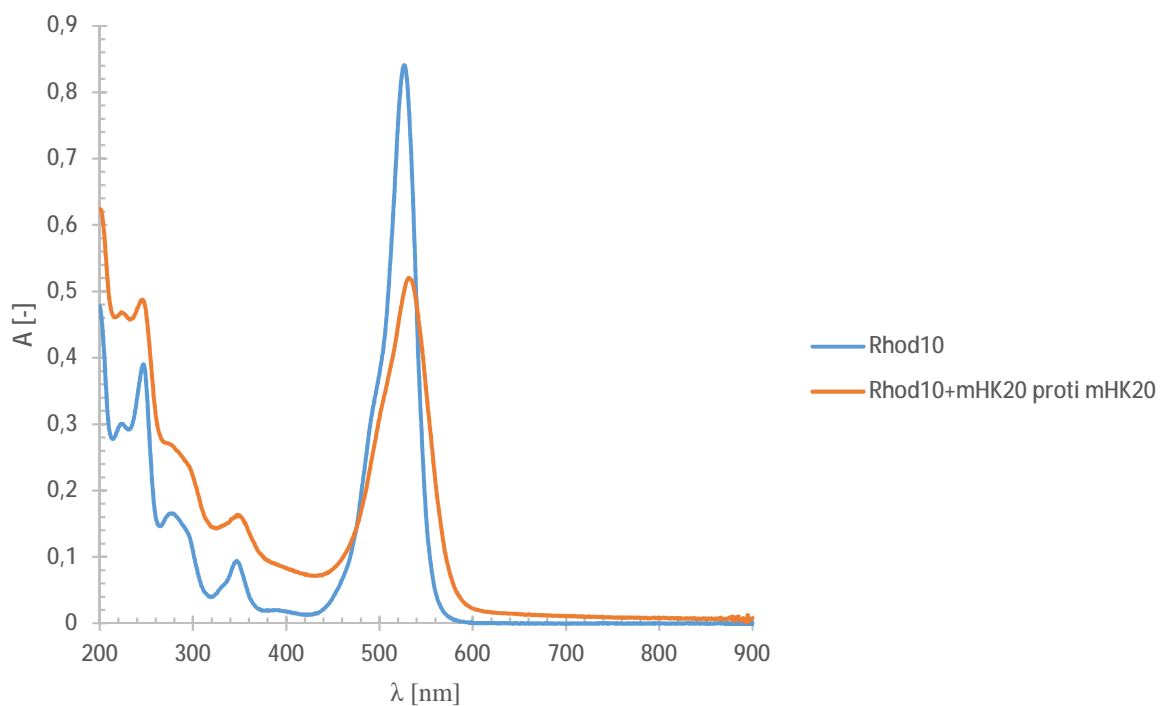
Príloha 3: UV-VIS spektrá mHK s koncentráciou 20 mg/l, R6G s koncentráciou 10 $\mu\text{mol/l}$ a ich zmesi merané proti fosfátovému pufru



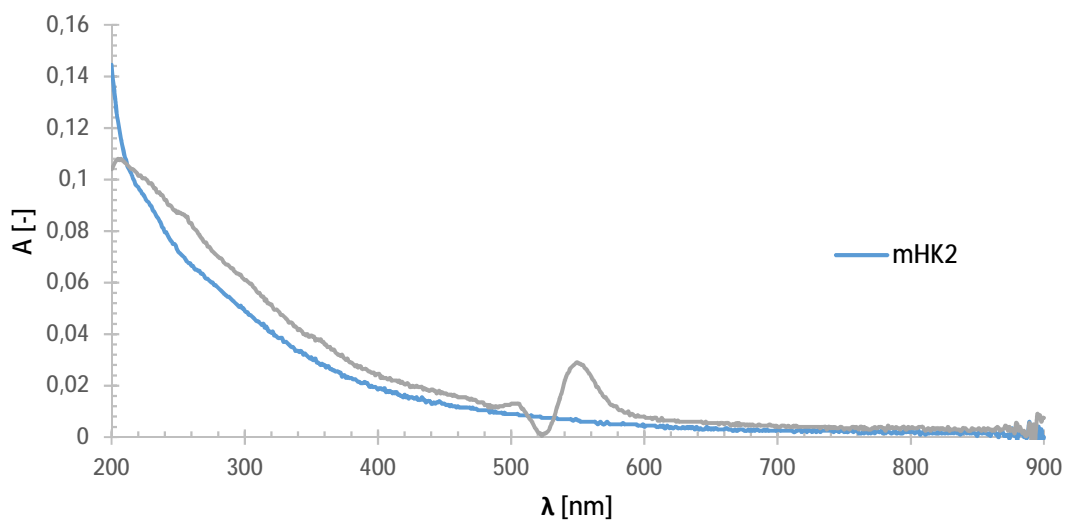
Príloha 4: UV-VIS spektrum R6Gs koncentráciou 10 $\mu\text{mol/l}$ sledované proti pufru a jeho zmesi s HK s koncentráciou 20 mg/l sledované proti HK s koncentráciou 20 mg/l



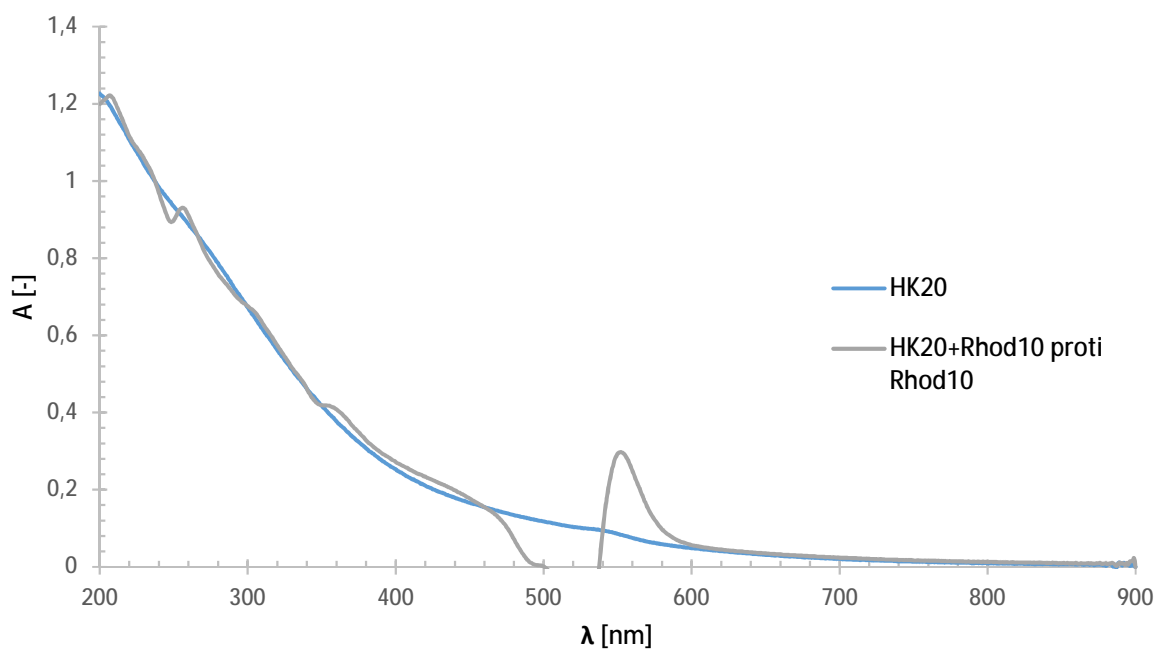
Príloha 5: UV-VIS spektrum R6G s koncentráciou $1\mu\text{mol/l}$ sledované proti pufru a jeho zmesi s mHK s koncentráciou 2 mg/l sledované proti mHK s koncentráciou 2 mg/l



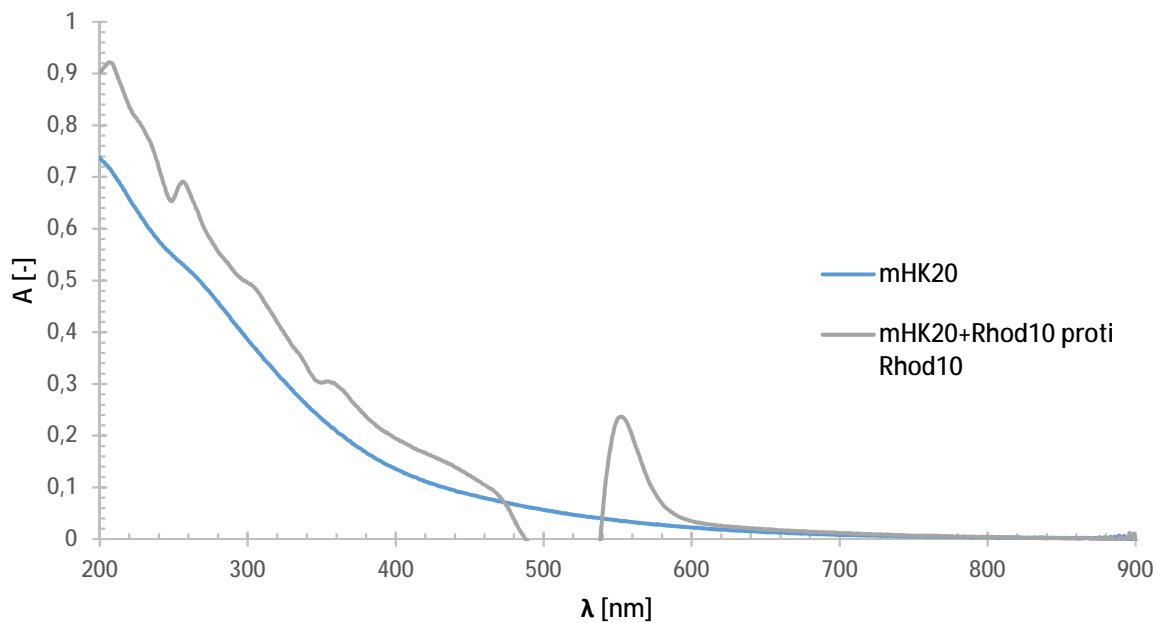
Príloha 6: UV-VIS spektrum R6Gs koncentráciou $10\mu\text{mol/l}$ sledované proti pufru a jeho zmesi s mHK s koncentráciou 20 mg/l sledované proti mHK s koncentráciou 20 mg/l



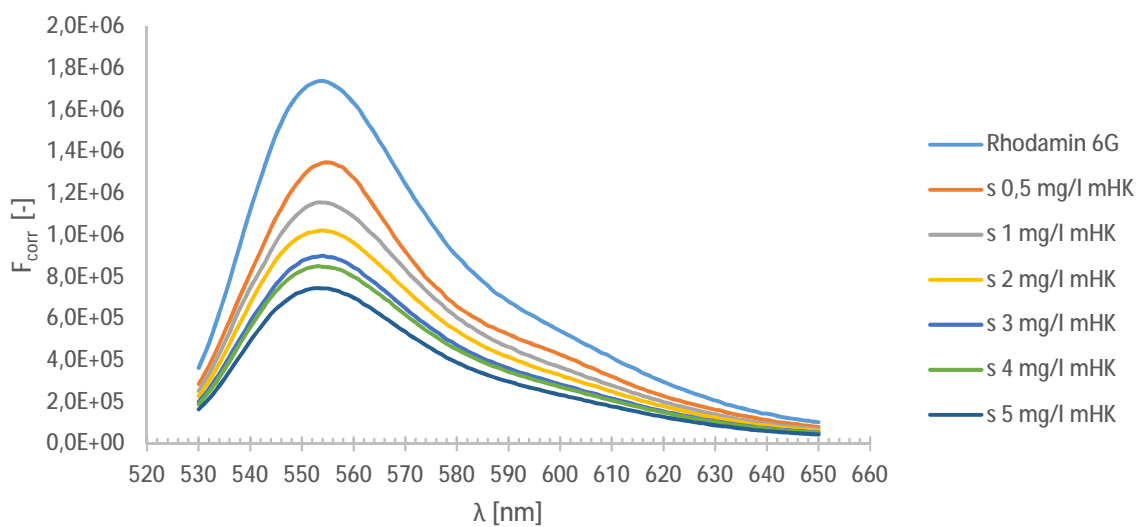
Príloha 7: UV-VIS spektra mHK s koncentráciou 2 mg/l sledované oproti pufru a jej zmesi s R6G s koncentráciou 1 $\mu\text{mol/l}$ sledované proti R6G s koncentráciou 1 $\mu\text{mol/l}$



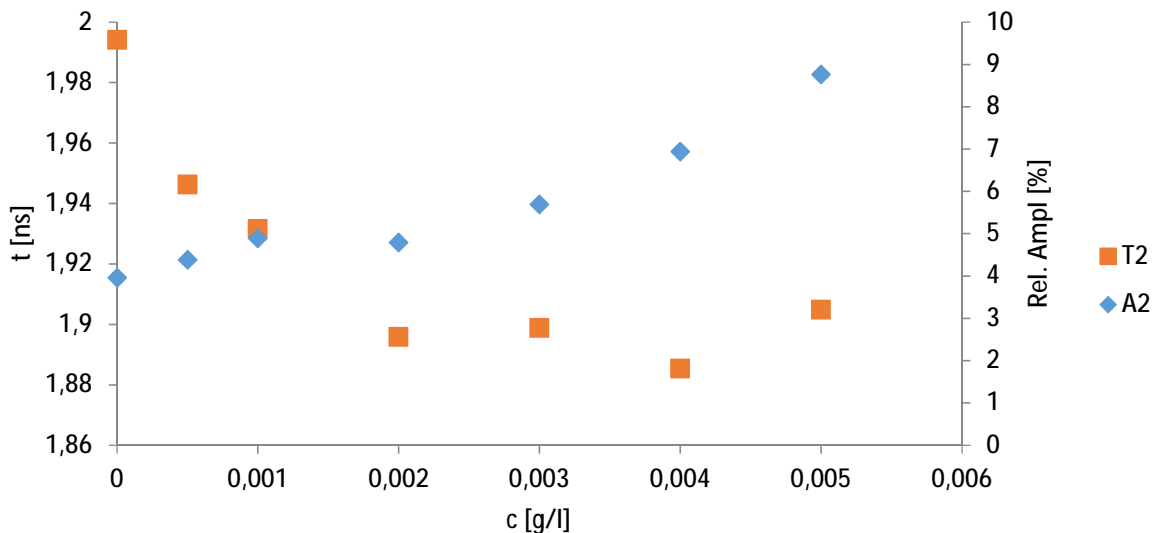
Príloha 8: UV-VIS spektra HK s koncentráciou 20 mg/l sledované oproti pufru a jej zmesi s R6G s koncentráciou 10 $\mu\text{mol/l}$ sledované proti R6G s koncentráciou 10 $\mu\text{mol/l}$



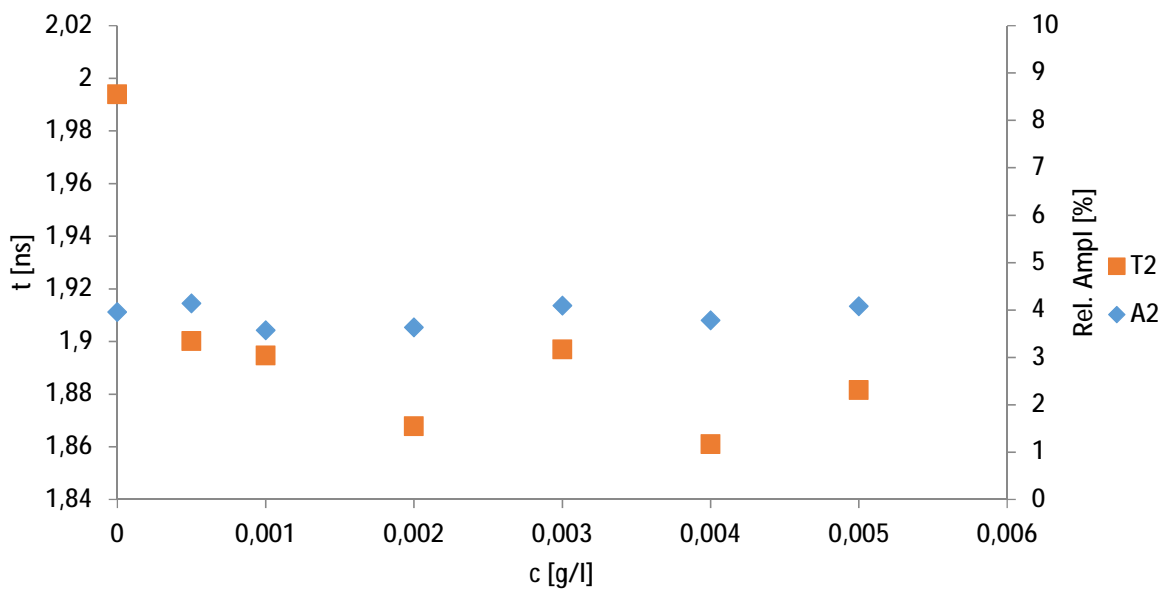
Príloha 9: UV-VIS spektra mHK s koncentráciou 20 mg/l sledované oproti pufru a jej zmesi s R6G s koncentráciou 10 $\mu\text{mol/l}$ sledované proti R6G s koncentráciou 10 $\mu\text{mol/l}$



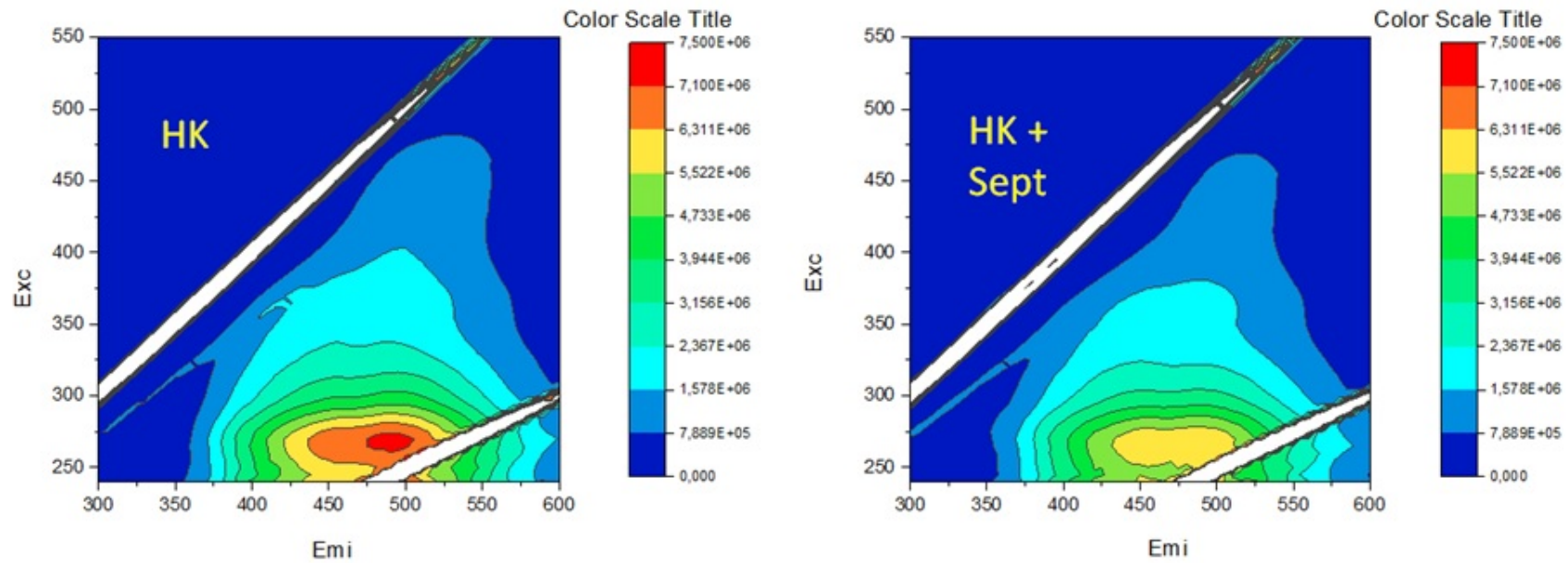
Príloha 10: Zhasenie fluorescencie R6G pomocou koncentračnej rady metylovaných humínových kyselín s koncentráciou 0,1 g/l



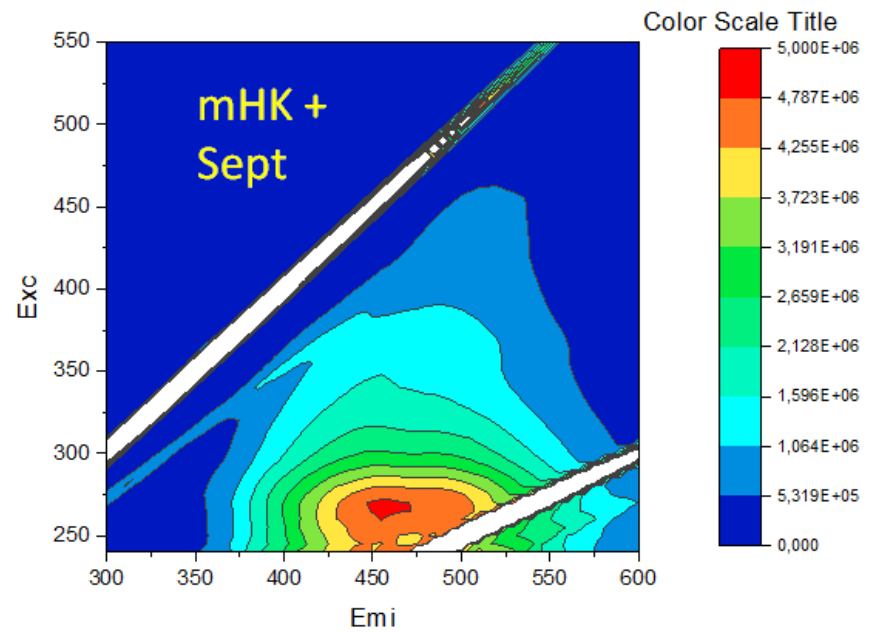
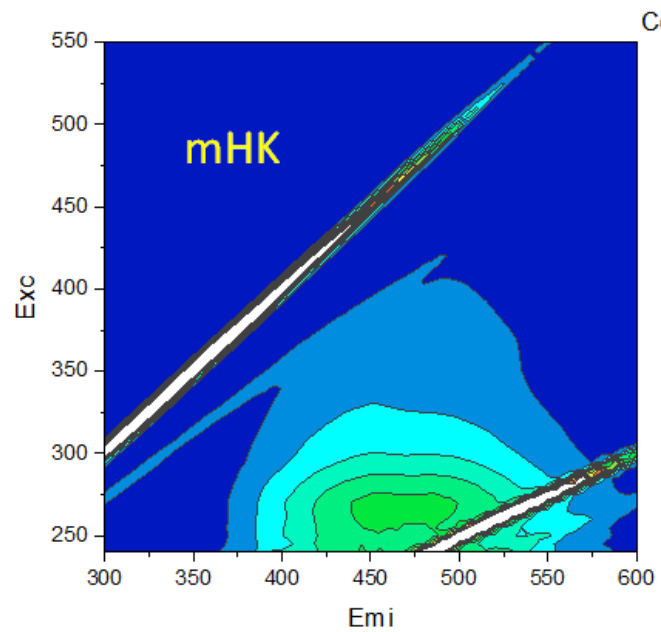
Príloha 11: Meranie doby zhášania fluorescence R6G a humínových kyselín v závislosti na koncentrácii humínových kyselín spolu s ich relatívnym zastúpením – minoritné doby života fluorescence



Príloha 12: Meranie doby zhášania fluorescence R6G a metylovaných humínových kyselín v závislosti na koncentrácii humínových kyselín spolu s ich relatívnym zastúpením – minoritné doby života fluorescence



Príloha 13: Porovnanie 3D emisno-excitačných spektier HK a HK+Septonex s rovnakou spektrálnu škálou



Príloha 14: Porovnanie 3D emisno-excitačných spektier mHK a mHK+Septonex s rovnakou spektrálnu škálou