



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ
BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA CHEMICKÁ
CENTRUM MATERIÁLOVÉHO VÝZKUMU

FACULTY OF CHEMISTRY
MATERIALS RESEARCH CENTRE

VYUŽITÍ METOD TERMICKÉ A STRUKTURNÍ
ANALÝZY PŘI STUDIU VZNIKU
POLYELEKTROLYTOVÝCH KOMPLEXŮ

UTILIZATION OF THERMAL AND STRUCTURAL ANALYSES IN STUDY ON THE
FORMATION OF POLYELECTROLYTE COMPLEXES

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE
BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE
AUTHOR

BARBORA ŘIHÁČKOVÁ

VEDOUCÍ PRÁCE
SUPERVISOR

Ing. JITKA KROUSKÁ, Ph.D.

BRNO 2014



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

Zadání bakalářské práce

Číslo bakalářské práce: **FCH-BAK0808/2013** Akademický rok: **2013/2014**
Ústav: Centrum materiálového výzkumu
Student(ka): **Barbora Řiháčková**
Studijní program: Chemie a chemické technologie (B2801)
Studijní obor: Chemie pro medicínské aplikace (2808R031)
Vedoucí práce **Ing. Jitka Krouská, Ph.D.**
Konzultanti:

Název bakalářské práce:

Využití metod termické a strukturní analýzy při studiu vzniku polyelektrolytových komplexů

Zadání bakalářské práce:

- 1) Vypracovat literární rešerši na téma metod studia vzniku polyelektrolytových komplexů.
- 2) Otestovat vhodné metody termické a strukturní analýzy, vybrané na základě vypracované literární rešerše, na modelových polyelektrolytových komplexech připravených kombinací chitosanu a huminových kyselin.

Termín odevzdání bakalářské práce: 23.5.2014

Bakalářská práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu a v elektronické formě vedoucímu bakalářské práce. Toto zadání je přílohou bakalářské práce.

Barbora Řiháčková
Student(ka)

Ing. Jitka Krouská, Ph.D.
Vedoucí práce

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
Ředitel ústavu

V Brně, dne 31.1.2014

prof. Ing. Jaromír Havlica, DrSc.
Děkan fakulty

ABSTRAKT

Tato bakalářská práce se zabývá studiem polyelektrolytových komplexů na bázi chitosanu a huminových kyselin. Tato práce je motivována prozkoumáním nových materiálů, které mohou mít v budoucnu potenciál například v zemědělských a medicínských aplikacích.

Pomocí metod izotermické titrační kalorimetrie a dynamického rozptylu světla byla studována míra a charakter interakcí. Kalorimetrická měření prokázala, že se snižující se koncentrací vzorků klesají i výsledné hodnoty entalpie reakce. Dále bylo ověřeno, že získané teplotní změny při titraci nejsou ovlivněny přítomností vody jako prostředí, ale především interakcemi mezi reaktivními skupinami chitosanu a huminových kyselin. Měřením intenzity rozptýleného světla a Z-průměru velikosti částic u všech vzorků byl ověřen výrazný nárůst velikosti částic při titraci způsobený vznikem polyelektrolytových komplexů.

ABSTRACT

This bachelor thesis deals with a study of the polyelectrolyte complexes made by chitosan and humic acids. The work was motivated by the research in the field of new materials which can be potentially useful for agricultural and medical applications.

A degree and a character of the interactions were studied by isothermal titration calorimetry and dynamic light scattering method. The calorimetric experiments proved that decreasing concentration of samples causes decreasing of reaction enthalpy. Moreover, the temperature changes during the titration are not influenced by water molecules as environment but mostly by the interactions between the functional groups of chitosan and humic acids. The formation of polyelectrolyte complexes was proved also by measurements of intensity of scattered light and Z-average of particle size.

Klíčová slova:

izotermická titrační kalorimetrie, dynamický rozptyl světla, huminové kyseliny, chitosan, polyelektrolytové komplexy

Key words:

isothermal titration calorimetry, dynamic light scattering, humic acids, chitosan, polyelectrolyte complexes

ŘIHÁČKOVÁ, B. *Využití metod termické a strukturní analýzy při studiu vzniku polyelektrolytových komplexů*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2014. 51 s. Vedoucí bakalářské práce Ing. Jitka Krouská, Ph.D.

PROHLÁŠENÍ

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

.....
podpis studenta

Poděkování:

Na tomto místě bych velice ráda poděkovala své vedoucí Ing. Jitce Krouské, Ph.D. za vynikající vedení, cenné rady a čas, který mi věnovala při vypracování mé bakalářské práce. Dále bych chtěla poděkovat Ing. Michalu Kalinovi a Ing. Ireně Tůrkeové za rady a pomoc při osvojování experimentálních technik.

Také bych zde chtěla poděkovat své rodině za podporu při studiu na vysoké škole.

OBSAH

1	ÚVOD	7
2	CÍL PRÁCE	8
3	TEORETICKÁ ČÁST	9
3.1	Huminové látky	9
3.1.1	Vznik huminových látek	9
3.1.2	Rozdělení huminových látek	10
3.1.3	Struktura a složení huminových látek	11
3.1.4	Vlastnosti a využití huminových látek	13
3.2	Chitosan	14
3.2.1	Struktura chitosanu	14
3.2.2	Výskyt chitinu/chitosanu	15
3.2.3	Výroba chitosanu	15
3.2.4	Vlastnosti a reaktivita chitosanu	16
3.2.5	Využití chitosanu v různých odvětvích	17
3.3	Polyelektrolytové komplexy	18
3.3.1	Huminové látky jako polyelektrolytové komplexy	18
3.3.2	Chitosan jako polyelektrolytový komplex	19
3.4	Metody analýzy polyelektrolytových komplexů	19
3.4.1	Termická analýza – kalorimetrie	19
3.4.2	Strukturní analýza – dynamický rozptyl světla	21
4	SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	23
5	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	25
5.1	Použité chemikálie	25
5.2	Použité přístroje	25
5.3	Příprava zásobních roztoků a vzorků	25
5.3.1	Příprava zásobního roztoku 0,1 M HCl	25
5.3.2	Příprava vzorků lignohumátu	25
5.3.3	Příprava vzorků chitosanu	25
5.4	Měření na kalorimetru TAM III	25
5.4.1	Postup a nastavení měření	25
5.4.2	Realizace kalorimetrických měření	26
5.5	Měření na analyzátoru Zetasizer Nano ZS	27
5.5.1	Postup a nastavení měření	27
5.5.2	Realizovaná měření	27
6	VÝSLEDKY A DISKUZE	28
6.1	Kalorimetrická měření	28
6.1.1	Titrace chitosanu lignohumátem o koncentracích 5 %, 4 % a 2 %	28

6.1.2	Optimalizované titrace v rozmezí koncentrací 1 % – 0,01 %	30
6.1.3	Srovnání titrací chitosanu lignohumátem s titracemi vodou pro roztoky o vybraných koncentracích.....	31
6.2	Měření intenzity rozptýleného světla a velikosti částic	35
7	ZÁVĚR.....	41
8	SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ	43
9	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....	47
10	PŘÍLOHY	48

1 ÚVOD

Huminové kyseliny jsou jednou ze tří frakcí huminových látek. Jedná se o skupinu látek přírodního původu, které jsou jedním z nejvýznamnějších zdrojů organického uhlíku na planetě. Jedná se o dostupnou a poměrně levnou surovinu. Nevýhodou je rozdílné složení huminových látek z různých zdrojů. Výzkum v oblasti využití huminových látek je rozšířen po celém světě. Největší potenciál mají aplikace v zemědělství a problematice ochrany životního prostředí. Neméně důležité jsou i poznatky v medicínských a veterinárních oborech.

Chitosan je po celulóze druhým nejrozšířenějším biopolymerem na Zemi. Jeho získávání je ekonomicky výhodné a jeho zdroje jsou v podstatě nevyčerpatelné. Zároveň jsou někdy chitosanu připisovány až zázračné vlastnosti. Výjimečnost chitosanu spočívá především v tom, že se jedná o kationový biopolymer a je tedy nasnadě studovat tvorbu polyelektrolytových komplexů s anionovými partnery. Těchto síťovacích činidel již bylo popsáno mnoho a většina z nich je přírodního původu. U mnohých z nich se spekuluje o potenciálu v biomedicínských aplikacích.

Huminové kyseliny a chitosan se tedy jeví jako vhodné „partneři“ pro tvorbu polyelektrolytového komplexu gelovité struktury. Vizually již bylo několikrát potvrzeno, že se smísením složek gely tvoří, je však důležité popsat jejich vznik a optimalizovat jejich přípravu.

Pro studium interakcí mezi huminovými kyselinami a chitosanem byly zvoleny dvě metody. První z nich je izotermická titrační kalorimetrie, která umožňuje sledovat změny ve vzorku z termodynamického hlediska. Druhá metoda je optická, založená na měření intenzity rozptýleného světla. Touto metodou byly charakterizovány vzniklé agregáty z hlediska jejich velikosti. Přesto, že se jedná o standardní metody, bylo nutné experimentální podmínky optimalizovat pro daný systém, který má svá specifika.

2 CÍL PRÁCE

Cílem této bakalářské práce je otestovat vhodné metody termické a strukturní analýzy pro studium polyelektrolytových komplexů připravených kombinací chitosanu a huminových kyselin. Optimalizovat postupy měření a posoudit míru interakcí mezi modelovými komplexy na základě získaných dat.

3 TEORETICKÁ ČÁST

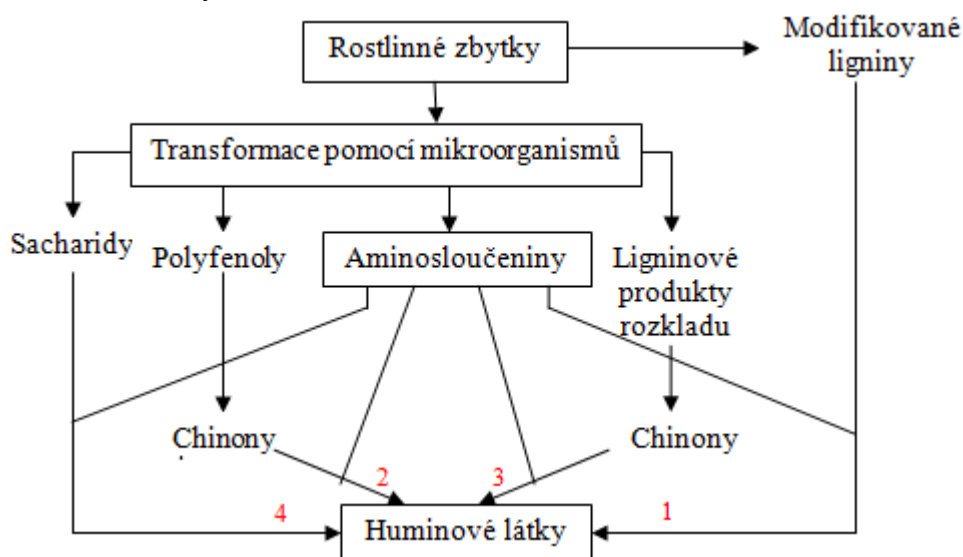
3.1 Huminové látky

Huminové látky (HL) jsou zcela běžné látky přírodního původu. Jedná se o směs organických, cyklických a aromatických struktur. Huminové látky jsou nedílnou součástí půd a vod, ve strukturách HL je vázáno významné množství organického uhlíku. HL jsou společně s proteiny, polysacharidy, aminokyselinami, sacharidy součástí humusu. Huminové látky vznikají v přírodě procesem chemického a biologického rozkladu organických zbytků v půdách, často také za přítomnosti mikroorganismů.[1] Huminové látky se přirozeně vyskytují v menší míře (stopová množství, jednotky procent) v píscích, jílech i v běžných půdách. Poměrně velký obsah je přítomen v hnědém uhlí. Nejvíce HL (až 85 %) je však obsaženo v kaustobiolitech – rašelina, lignit a oxyhumolit.[2]

3.1.1 Vznik huminových látek

Proces vzniku huminových látek se nazývá humifikace a existuje několik teorií, jak probíhá.

Teorie nejsou jednotné a zatím nedokázaly jasně vysvětlit proces vzniku huminových látek v různých typech prostředí. Následující schéma názorně ukazuje různé předpokládané dráhy vzniku huminových látek.



Obr. 1 Mechanismus vzniku huminových látek podle Stevenson [1]

Ligninová teorie (dráha 1) předpokládá, že huminové látky jsou odvozeny z ligninu. Pro tuto teorii existuje mnoho podporujících argumentů. Jedním z nich je, že značné množství ligninu je zpracováváno mikroorganismy a zbytek se stává složkou humusu. Dále tuto teorii podporují podobné vlastnosti a složení HL a ligninu. Proti této teorii však hovoří studie, která vyvrátila výskyt hub rozkládajících lignin ve vlhkých sedimentech. Ligninová teorie vysvětluje podíl modifikovaných ligninů v humusu rašeliny, jezerních sedimentů a vlhkých půdách.

Polyfenolová teorie (dráha 2 a 3) stále zahrnuje lignin. Funkční skupiny (fenolické aldehydy a kyseliny) jsou však enzymaticky pomocí mikroorganismů přeměněny na chinony. Dráha 2 a 3 se liší ve zdroji chinonů. Polyfenoly mohou být syntetizovány i z jiných zdrojů,

než je lignin (např. celulóza). Dále jsou enzymaticky oxidovány na chinony. Z obou zdrojů pak tyto tvoří základní kameny huminových látek.

Kondenzace sacharid-amin (dráha 4) je podstatou nejstarší myšlenky vzniku humusu. Podle této teorie kondenzují, jako vedlejší produkty metabolismu mikrobů, redukující cukry s aminokyselinami za vzniku N-glykosylaminů. Poté tyto jednotky pomalu polymerizují v půdě a vznikají hnědé produkty. Výkyvy teplot a vlhkosti celému procesu zřejmě napomáhají. [1]

Existuje celá řada dalších teorií objasňující vznik huminových látek. Jednou z abiotických teorií vzniku HL je melanoidinová teorie, kde je melanoidin produktem Maillardovy reakce (vznik Schiffovy báze mezi karbonylem sacharidu a dusíkem aminoskupiny v aminokyselině či amoniaku). Melanoidiny jsou pak hnědé látky podobné huminovým.

Vzniku huminových látek (či podobných) pomáhají také živé organismy (bakterie, houby, kyanobakterie, řasy, mechorosty, lišejníky, cévnaté rostliny). Za prekurzory HL jsou považovány kromě ligninu a polyfenolů také melanoidiny, mikrobiální melaniny, fenoly mikrobů a nižších rostlin, algaenan, sporopolenin, kutan a různé polutanty.[3]

3.1.2 Rozdělení huminových látek

Huminové látky se konvenčně dělí na frakce podle rozpustnosti v kyselém/bazickém prostředí.

- **Humin** je černou frakcí, která je nerozpustná ve vodě, kyselinách i zásadách.
- **Fulvinové kyseliny (FK)** jsou rozpustné ve vodě při všech hodnotách pH. Zůstávají v roztoku po odstranění huminových kyselin. Jedná se o světle žlutou až žluto hnědou frakci.
- **Huminové kyseliny (HK)** jsou látky nerozpustné v kyselinách ($\text{pH} < 2$), a rozpustné v zásadách. Jedná se o nejvíce extrahovanou frakci, která je zbarvena tmavě hnědě až do černa. Rozdíl mezi FK a HK je především v molekulové hmotnosti, počtu funkčních skupin a velikosti molekul.[4]

Huminové látky a jejich preparáty pro komerční účely můžeme dále dělit podle zdroje, z kterého jsou získávány/vyráběny.

- **HL 1. generace** jsou látky získávané do preparátů těžbou leonarditu, oxyhumolitu nebo kapucínu. Měnit vlastnosti a složení těchto látek je velmi těžké, protože vznikaly ve velkých hloubkách miliony let. Za tak dlouhou dobu na sebe může surovina navázat mnoho znečišťujících látek, které ji znehodnocují a komplikují výrobu čistého produktu.
- **HL 2. generace** jsou humáty vyráběné z rašeliny a jezerních sapropelů. Dodávají se jako roztoky s až 8 % HK a stopovým množstvím FK. Stejně jako u předchozí kategorie je složité kontrolovat stejnou kvalitu výsledného produktu.
- **3. generace HL – lignohumáty** jsou směsí vysokomolekulárních i nízkomolekulárních HL. Jsou plně rozpustné. Fakulta chemická se dlouhodobě zabývá výzkumem huminových látek spolu s komerčními partnery. Jedním z nich je firma Amagro, která vyrábí lignohumát metodou umělé humifikace lignosulfonátu (odpad z dřevní hmoty při výrobě celulózy). Přirozený proces je urychlován a vzniká produkt obsahující až 90 % solí HK.[5]

3.1.3 Struktura a složení huminových látek

Znalosti o složení a struktuře HL jsou i přes několik desetiletí výzkumů omezené. Makromolekuly huminových látek jsou velké a komplexní. Obsahují nejvíce organický uhlík, dále také heteroatomy – především kyslík, dusík, vodík a síru. Výskyt jednotlivých prvků a jejich poměry v HL (ve vodě) ukazuje následující tabulka.

Tabulka 1 Složení HL ve vodách [7]

Prvek	FK (hm. %)	HK (hm. %)
C	46,0	57,0
O	48,6	37,1
N	4,0	4,4
H	1,2	2,0
O:C	1,056	0,651
H:C	0,087	0,077
N:C	0,026	0,035

Obsah a poměr funkčních skupin, ve kterých je obsažen rozpuštěný organický uhlík (DOC), se liší v huminových látkách získaných z různých zdrojů a prostředí. Přehled funkčních skupin uvádí Tabulka 1. Také struktura molekul HL (a především HK) je předmětem zájmu již dlouhou dobu. Je zde snaha vytvořit model průměrné molekuly, což ovšem není jednoduchý úkol také z již zmíněného důvodu, a to že HL se liší podle původu.[2] Vytvořený model pak samozřejmě nevyhovuje všem existujícím huminovým látkám.

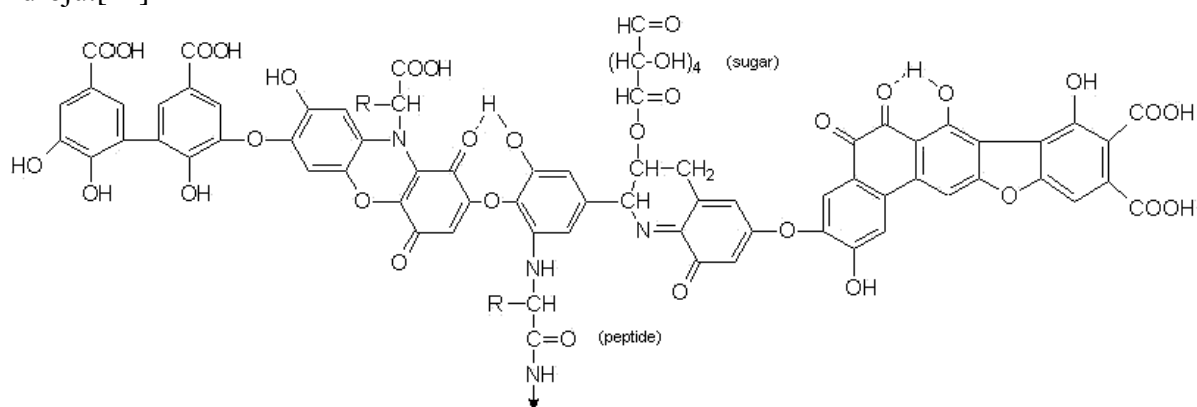
Huminové látky můžeme popsat jako heterogenní směs organických molekul. Vytvořené modely molekul huminových látek vychází ze znalostí elementárního složení, obsažení funkčních skupin, z degradačních produktů a v neposlední řadě také z výsledků různých strukturních analýz. Mezi nejmodernější metody používané v pochopení složité struktury HL patří například nukleární magnetická rezonance. [9]

Tabulka 2 Funkční skupiny v různých formách DOC podle [8]

Funkční skupina	struktura	výskyt
<i>kyselé skupiny</i>		
karboxylová fenolická s enolickým vodíkem chinonová	$(Ar-)R-COOH$ $Ar-OH$ $(Ar-)R-CH=CH-OH$ $Ar=O$	90 % veškerého DOC vodní huminové látky, fenoly vodní huminové látky vodní huminové látky, chinony
<i>bazické skupiny</i>		
aminová amidová iminová	$(Ar-)R-CH_2-NH_2$ $(Ar-)R-C=O(-NH-R)$ $CH_2=NH$	aminokyseliny peptidy (nestabilní) huminové látky
<i>neutrální skupiny</i>		
alkoholová etherová ketonická	$(Ar-)R-CH_2-OH$ $(Ar-)R-CH_2-O-CH_2-R$ $(Ar-)R-CH_2=O(-R)$	vodní huminové látky, cukry vodní huminové látky vodní HL, těkavé látky, ketokyseliny
aldehydická esterová (laktonová)	$(Ar-)R-CH_2=O(-H)$ $(Ar-)R-CH_2=O(-OR)$	cukry vodní HL, hydroxykyseliny, taniny
cyklická imidová	$(R-)O=C-NH-C=O(-R)$	vodní huminové látky

Nejtypičtějším příkladem je struktura podle Stevensonova (z roku 1982), která ukazuje molekulu HK jako velkou molekulu obsahující skelet z aromatických struktur, volné a vázané fenolické OH skupiny, chinonové struktury, dusík a síru jako můstkové atomy a karboxylové skupiny vázané na aromatických kruzích. Dále vystihuje i sacharidovou a aminokyselinovou jednotku a výskyt peptidických vazeb.[10]

S vývojem metod strukturní analýzy vznikly i novější modely molekul HL. Pokročilými metodami, jako je analytická pyrolýza, hmotnostní spektrometrie, plynová chromatografie a počítačové modelování, byly vytvořeny trojrozměrné modely molekul HL z různých zdrojů.[11]



Obr. 2 Model huminové kyseliny podle [10]

3.1.4 Vlastnosti a využití huminových látek

Jak již bylo popsáno, huminové kyseliny jsou nerozpustné v kyselinách a rozpustné v zásadách. Velké množství karboxylových a fenolických skupin ve struktuře HK umožňuje nahrazení vodíku jiným kationtem nebo radikálem. HK jsou tedy schopné vázat kovové prvky z kapalných i pevných směsí. Chinolinové struktury v HK vysvětlují schopnost vázat aminokyseliny. Všechny tyto sorpční a transportní schopnosti dávají potenciál k širokému využití HK v praxi. Nesmíme také opomenout zmínit velice důležitou roli huminových kyselin ovlivňovat příznivě fyziologii rostlin.[12]

Huminové (i fulvinové) kyseliny se chovají jako slabě kyselé polyelektrolyty, mohou tedy být aplikovány metody založené na ionizaci kyselých funkčních skupin. Negativní náboje mohou vzniknout z karboxylových, fenolických, enolických a imidových funkčních skupin. HK mají významnou pufrací schopnost, která dovoluje růst rostlin v široké škále pH. Síť negativních nábojů v HL vykazuje mobilitu v elektrickém poli. Elektronegativní skupiny se také participují v oxidačně-redukčních reakcích.[13]

HK mají využití v nejrůznějších oborech. V zemědělství hrají důležitý vliv na kvalitu půdy, zlepšují její fyzikální vlastnosti a udržení vlhkosti. HK zlepšují strukturu půdy, její schopnost udržet optimální prostředí a také zabraňují erozi. Huminové kyseliny jsou dnes běžnou součástí hnojiv v podobě humátů (solí HK) vápenatých, sodných či amonných. Další vlastností HK je schopnost chelatovat ionty železa, které se stanou přístupnějšími pro rostliny. HK prospívají rostlinám v několika úrovních. Zvyšují produkci rostlinných enzymů a hrají roli jako katalyzátory v biologických procesech. HK také pomáhají růstu rostlin, zlepšují tvorbu kořenových systémů a přijímání živin. [12], [14]

Až překvapivě široké je využití huminových látek v průmyslu. Ve stavebnictví jsou HL používány jako přídavek do betonů. V kožedělném průmyslu se HL používají jako barvivo, činidlo k vydělávání kůží a nakonec jako přísada při finální úpravě produktů. V dřevozpracujícím a papírenském průmyslu se HL vyskytují jako barviva pro lepenku, papír i nábytek. V keramickém průmyslu našly HL uplatnění jako aditiva, která zlepšují mechanickou pevnost. Huminové látky se dokonce využívají i při produkci plastů jako barviva Nylonu 6 nebo PVC. Také zpevňují polyurethanové pěny.[15]

Životnímu prostředí HL pomáhají svými aplikacemi v zemědělství. HL mají schopnost odstraňovat toxické kovy z odpadních vod. Při čištění odpadních vod flotací rozpuštěným vzduchem mohou HK pomáhat odstraňovat stopová množství mastnoty, ropy, tekutých organických a nerozpuštěných látek. Přídavek HK zlepšuje proces precipitace kovů prostřednictvím hydroxidů vápenatého a sodného. Huminové kyseliny dokážou ve stopových množstvích odstranit z vod těžké kovy jako olovo, rtuť, kadmium, měď, zinek, nikl a chrom. HK pomáhají také odstraňování hliníku.[16]

Huminové látky obsažené v bahně a rašelině se ve formě zábalů a koupelí se používají již od starověku. Indikací byly především gynekologické poruchy (chronické záněty, neplodnost, hormonální nerovnováha, klimakterické potíže), revmatická onemocnění (artróza, dna, rehabilitace po úrazech) a kožní problémy (chronické ekzémy, psoriáza). Jako kontraindikační se považovala akutní zánětlivá, infekční onemocnění a také maligní tumory. Při balneoterapii dochází k příznivé hypertermii, která podporuje krevní oběh a nastartuje hojivé procesy postižených tkání.

I přes všechny známé pozitivní účinky na pacienty, naše znalosti o fyziologických a farmaceutických principech HL jsou značně omezené. V posledních desetiletích se

výzkumy zabývají především interakcemi HL s izolovanými enzymy, efekty na krevní srážlivost, estrogenovou aktivitu a také na interakce s látkami, které jsou pro tělo škodlivé.

Byly prokázány antivirové účinky například proti slintavce a kulhavce, viru chřipky A a viru herpes simplex typu 1. Zajímavý je také zkoumaný vliv proti viru HIV. HK byly také studovány v oblasti prevence gynekologických pooperačních srůstů. Byl prokázán vliv na aktivaci fibrinu. Dále bylo studováno perorální podávání HK jako prevence proti intoxikaci organismu. Významnou roli hrají také studie zaměřené na použití HK jako ochrany proti ionizujícímu záření. Ve veterinárním lékařství se HL úspěšně používají jako léky proti gastrointestinálním chorobám a jsou využívány také jako antidotum zabraňující intoxikaci.[17]

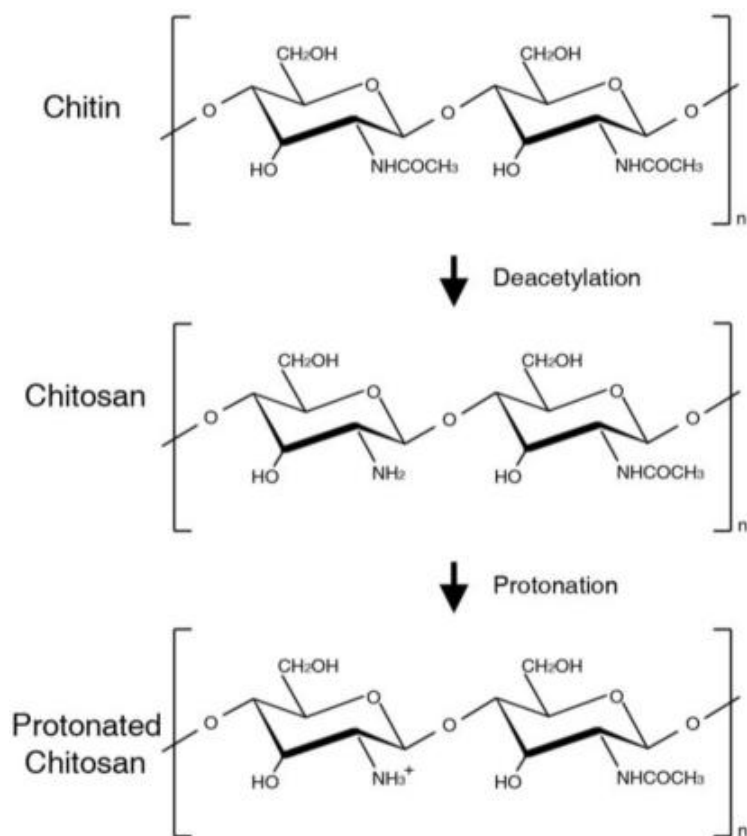
3.2 Chitosan

Chitosan je přírodní polysacharid odvozený od chitinu, který je po celulóze nejrozšířenějším polysacharidem na světě. Chitin byl poprvé izolován z hub na začátku 19. století. Později byl izolován i z kutikul hmyzu. V roce 1859 Charles Rouget zkoumal převedení chitinu do roztoku. Po alkalizaci získal substanci rozpustnou v kyselinách, a tím poprvé popsal chitosan. Chitin je strukturně podobný celulóze, oba polysacharidy mají β -(1,4) glykosidové vazby. Chitin se, kromě hub a kutikul hmyzu, dále nachází například ve schránkách měkkýšů a rozsivek a v buněčných stěnách plísní a kvasinek. [18]

3.2.1 Struktura chitosanu

Chitin je složen z monosacharidových jednotek 2-acetylamin-2-deoxy- β -D-glukopyranózy (nebo *N*-acetylglukosaminu). Pokud dojde k deacetylaci acetamidové skupiny, vznikne 2-amino-2-deoxy- β -D-glukopyranóza (také D-glukosamin). Jednotlivé monosacharidové jednotky jsou vázány β -(1,4) glykosidovými vazbami.[19] Strukturu chitinu, chitosanu a jeho protonované formy ukazuje Obr. 3.

Chitosan je ve skutečnosti kopolymerem složeným z jednotek acetylovaných i deacetylovaných. Jejich poměr ovlivňuje vlastnosti výsledných polymerů. Tento poměr vyjadřuje stupeň deacetylce (DD) nebo acetylce (DA). Firma Sigma-Aldrich dodává několik typů chitosanu. Jednou možností rozdělení je podle molekulových hmotností. Chitosan LMW (low molecular weight) je charakteristický stupněm deacetylce $\geq 75\%$ a molekulovou hmotností 20 – 190 kDa. U chitosanu HMW (high molecular weight) je udávána molekulová hmotnost v rozmezí 190 – 375 kDa a DD $> 45\%$. Firma dodává i MMW (medium molecular weight) chitosan, u kterého udává stupeň deacetylce 75 – 85 %. [20], [21]



Obr. 3 Struktura chitinu, chitosanu a protonovaného chitosanu [22]

Chitin existuje ve třech variantách podle uspořádání řetězců jako α , β , γ -chitin. Nejrozšířenějším je α -chitin, který je tvořen anti-paralelními řetězci. Nejvíce se vyskytuje v buněčných stěnách hub a v kutikulách členovců. β -chitin, který je v přírodě méně rozšířen, se vyskytuje především u olihní a rozsivek. Sacharidové řetězce jsou v paralelním postavení a nejsou zpevněny vodíkovými můstky tolik jako α forma. Třetí forma γ -chitin je tvořena dvěma vlákny paralelními a jedním anti-paralelním.[18]

3.2.2 Výskyt chitinu/chitosanu

Chitin byl poprvé objeven izolací z hub roku 1811 profesorem Henri Braconnotem. Později byl chitin objeven v kutikulách hmyzu. Výskyt chitinu je kromě těchto dvou zdrojů velký a zahrnuje nejrůznější organismy. Chitin se nachází v různých protistech či houbovcích. Dále také ve schránkách vajíček vířníků a hlístic. Chitin je obsažen v oocyttech, kokonech a peritrofické matrix hmyzu, ostnu olihní, kostí sépií a schránek ramenonožců a měkkýšů (také v radule). Chitin u strunatců byl nalezen například u pláštěnců. Chitin obsahují také hrudní ploutve současných ryb. Bakterie rodu *Rhizobium* a *Agrobacterium* jsou schopné produkovat chito-oligosacharidy. Chitin se vyskytuje v nepřeberném množství organismů, nejdůležitějším zdrojem chitinu jsou však schránky koryšů jako jsou krabi, krevety či humři. [18]

3.2.3 Výroba chitosanu

Chitin se tradičně vyrábí z odpadu vzniklého po zpracování mořských koryšů. Jejich schránky ovšem obsahují také uhličitan vápenatý a proteiny, které je nutno odstranit. Získaný chitin je poté deproteinován zředěným roztokem HCl a deacetylován 40% roztokem

hydroxidu sodného při 120 °C po dobu 1 – 3 h. Po dokončení tohoto procesu získáme chitosan deacetylovaný ze 70 %. Ve schránkách korýšů se vyskytuje také karotenoid astaxanthin, který zatím nebyl syntetizován, a je tedy dalším ekonomickým přínosem při zpracování odpadu. Dalším zdrojem pro výrobu chitosanu je chitin z mycelií hub.[19] Je snahou průmyslově získávat chitosan z jiných zdrojů. Bylo prokázáno, že chitin a chitosan jsou součástí buněčných stěn některých kvasinek a vláknitých hub, například *Candida albicans*, *Saccharomyces cerevisiae*, či *Mucor rouxii*, aj. [23] Mnoho studií se zabývá produkcí chitinu a chitosanu přímo z těchto zdrojů. Studie [24] se zabývá produkcí chitosanu bakterií *Citrobacter*. Ve studii [25] byl chitosan úspěšně izolován z různých plísní (*Rhizopus sp*, *Mucor sp* a *Aspergillus niger*).

Neméně zajímavá je příprava LMW chitosanu depolymerací. V práci [26] byla diskutována optimalizace přípravy LMW chitosanu pomocí kyseliny fosforečné. Studována byla i depolymerace chitosanu pomocí kyseliny chlorovodíkové. [27] Obecně se však u chemických fragmentací chitosanu vyskytují komplikace v podobě nízkých výtěžků či vzniku nežádoucích modifikací. Jako řešení se jeví použití enzymů, které fungují při mírných podmínkách a také jsou specifické. Často se používají enzymy chitinasa a chitosanasa. Zkoumají se ovšem i jiné enzymy, například neutrální proteasa z *Bacillus subtilis* nebo papain.[28],[29]

3.2.4 Vlastnosti a reaktivita chitosanu

Na rozdíl od většiny přírodních polysacharidů (celulóza, pektin, agar, aj.), které jsou kyselé povahy, jsou chitin a chitosan příkladem bazického polysacharidu. Chitin je velmi hydrofobní a nerozpustný ve vodě a většině organických rozpouštědel. Chitin je rozpustný například v hexafluoroisopropanolu, hexafluoroacetonu a chloroalkoholech ve spojení s vodnými roztoky minerálních kyselin a dimethylacetamidu s přídavkem chloridu lithného. Chitosan je také nerozpustný ve vodě, je však rozpustný ve zředěných kyselinách (octová, mravenčí, minerální kyseliny).

Chitosan je z chemického hlediska lineární polyamin s reaktivními amino a hydroxylovými skupinami. Obecně lze říci, že chitosan je všestrannější než chitin díky amino skupině v C-2 poloze. Typické jsou pro chitosan reakce aminů, tedy *N*-acylace a Schiffovy reakce. *N*-acylací acetanhydridem lze získat plně acetylovaný chitin. Chitosan s aldehydy a ketony tvoří aldminy a ketiminy. *N*-alkylované chitosany obsahují objemné substituenty, které oslabují vodíkové můstky, a tím umožňují rozpustnost ve vodě i přes vysokou hydrofobicitu původní molekuly chitosanu. [30] Esterifikacím a etherifikacím podléhají –OH skupiny.

Reaktivita chitosanu umožňuje přípravu mnoha derivátů. K nejvíce prozkoumaným patří *O*- a *N*-karboxymethylchitosany (CM-chitosan). Podle podmínek při reakci s kyselinou chloroctovou v přítomnosti NaOH získáme příslušný *O*- nebo *N*-derivát. Dalšími deriváty jsou například: chitosan-6-*O*-sulfát, trimethylchitosan amonium, alkylované chitosany, chitosany s navázanými disacharidy či různé roubované kopolymery.[31]

Chitosan má významnou schopnost chelatace. Při téměř neutrálním pH dokáže vázat ionty měďnaté, rtuťnaté, nikelnaté či zinečnaté. Tato schopnost je významná především pro poznatky v oblasti úpravy odpadních vod.[19] Dále se zkoumají možnosti použití chitosanu jako prostředku pro imobilizaci enzymů. [30]

3.2.5 Využití chitosanu v různých odvětvích

Biologické vlastnosti jako biokompatibilita, biodegradabilita a netoxičita předurčují hlavní směr využití chitosanu v biomedicíně, kosmetice a potravinářství. K dalším patří ošetření odpadních vod nebo papírenský průmysl.

▪ Potravinářský průmysl

Byly prokázány významné baktericidní a fungicidní vlastnosti chitosanu. Účinkuje proti různým bakteriím (*E. Coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, aj.) Bylo prokázáno zastavení růstu *Botrytis cinerea* a *Rhizopus stolonifer* v jahodách po sklizni při použití chitosanu. Nabízí se tedy možnost jeho použití jako antimikrobiálního činidla ve spojitosti s trendem opouštět chemické konzervanty.

Filmotvorné vlastnosti chitosanu jsou užitečné pro zlepšení kvality a délky trvanlivosti čerstvých, mražených i vyrobených potravin. Filmy vytvořené na bázi chitosanu pomáhají kontrolovat vlhkost proudící mezi potravinou a okolním prostředím, dále uvolňování antimikrobiálních látek, živin a chutí. Brání také hnědnutí ovoce. Filmy z chitosanu mají dobré mechanické vlastnosti a zkoumají se jejich použití jako membrán pro reverzní osmózu.

Při výrobě ovocných džusů vzniká nežádoucí zakalení, které bývá odstraňováno pomocí želatiny, bentonitu, silica gelu či tanninů. Soli chitosanů vnáší silný pozitivní náboj a úspěšně čistí tekutinu a také upravuje její kyselost. Jako aditivum se používá chitosan ve stabilizátorech barvy, emulgátorech či zlepšovadlech chuti.

Chitosan se přidává do krmiv pro zvířata, která prokazatelně lépe prospívají. Byl prokázán vliv chitosanu na snižování hladiny cholesterolu v krvi. Chitosan vytváří v žaludku s tuky emulzi. V tenkém střevě se olejové kapičky zachytávají v řetězcích polysacharidu a jsou vyloučeny s těla. V Japonsku jsou běžně k dostání potraviny s chitosanem. V dnešní době jsou potravinové doplňky na bázi chitosanu běžně prodejné. Měly by být užitečné pro lidi trpící nadváhou.

▪ Kosmetika

V kosmetickém průmyslu se chitosan ujal v péči o vlasy, pleť a ústní dutinu. Je běžnou součástí šampónů, činidel pro trvalou, barev na vlasy, různých sprejů a tvarujících přípravků. Chitosan vlas obalí a dodává mu jemnost, hladkost a mechanickou pevnost. Výborně působí jako antistatický přípravek. Molekulová hmotnost chitosanu nedovoluje vniknutí do kůže, proto je bezpečný v kosmetických přípravcích jako jsou laky na nehty, líčidla, čistící emulze či koupele. Chitosan i chitin se používají v zubních pastách, ústních vodách a žvýkačkách. Osvěžují dech a potlačují tvorbu plaku a zubního kazu. Soli chitosanu maskují nepříjemnou chuť oxidů křemíku a pomáhají zachovat granulovou podstatu čistících prášků v pastách.[30]

▪ Biomedicína a farmacie

Asi nejširší uplatnění chitosanu i chitinu nalzáme v biomedicíně a farmacii. V oblasti cíleného transportu léčiv se molekule chitosanu uplatňuje sekundární hydroxyskupina, který bývá substituovaná spojovacím článkem „spacerem“, kterým je navázána aktivní složka. Cílení léčiv se hodně zaměřuje na léčbu rakoviny. Kombinace chitosan-spacer-polypeptid (inhibitor metastáz) již byla testována na zvířatech. Kombinace chitosanu a alginátu v tabletách pomáhá prodloužit uvolňování léčivých látek. V těchto tabletách by mohly být do těla pacienta dopravovány látky, které jinak musí přijímat injekčně. [19],[34]

Kromě tablet je chitosan jako pomocná látka využíván ve formě gelů, filmů, emulzí, zvlhčovacích a krycích prostředků a jako mikrokapsle. Již poměrně dlouho je známá schopnost filmů obsahujících chitosan podporovat hojení ran. V tomto odvětví medicíny má uplatnění i chitin, jehož jednotka *N*-acetylglukosamin se vyskytuje i v kyselině hyaluronové, která je při procesu hojení ran velice důležitá. Na trhu existují krycí materiály, které pomáhají regenerovat poškozenou kůži, ránu udržují vlhkou a čistou. Používají se i chitinové chirurgické nitě, které mají také podpůrný účinek a samy se vstřebají. [31],[32]

Tkáňové inženýrství, které je experimentálním a poměrně novým odvětvím medicíny, nabízí další uplatnění chitinu a chitosanu a to v porézních maticích (scaffold), které se připravují buď lyofilizací hydrogelů či přímou přípravou různých kompozitních matic (s želatinou, hydroxyapatitem, aj.) Sulfátový či karboxymethylovaný chitosan vykazuje aktivitu antikoagulantu. Dále je chitosan v kombinaci s jinými materiály používán pro kontaktní čočky či různé náhrady. [30],[33],[34]

▪ Ostatní odvětví

Jak již bylo uvedeno výše u vlastností chitosanu, má schopnost chelátovat ionty těžkých kovů. Směs chitosanu s chitinem však dokáže z vody odstraňovat arsen, ropu a ropné produkty. Zkoumají se možnosti čištění pitné vody. V papírenském průmyslu se biodegradabilní chitin i chitosan používá jako zpevňovač recyklovaného papíru. Deriváty chitinu dodávají textiliím antistatické a repelentní vlastnosti. V textilním průmyslu se také využívá vlastnosti chitosanu odstraňovat barviva z odpadní barvicí lázně. V zemědělství se chitinem ošetřují semena, která pak lépe a rychleji rostou a navíc jsou odolnější. V chemické oblasti je zajímavé využití chitinu a chitosanu v tenkovrstevné nebo vysoce účinné kapalinové chromatografii. V této práci samozřejmě nelze, a ani to není jejím cílem, postihnout všechny aplikace a možnosti využití. Obrovský zájem odborné i laické veřejnosti o chitosan jen pobízí k dalšímu bádání o možnostech reaktivity a následných aplikacích. [30],[36]

3.3 Polyelektrolytové komplexy

Polyelektrolyty jsou vysokomolekulární látky obsahující postranní funkční skupiny schopné elektrolytické disociace. Disociací vznikají makromolekula s velkým počtem elementárních nábojů a příslušné ionty opačného náboje. V roztocích nesou polyelektrolyty elektrický náboj. Podle typu disociujících skupiny dělíme polyelektrolyty na:

- kyselé, obsahují skupiny například karboxylátové či sulfátové,
- bazické, které jsou typické zásaditými skupinami (amoniová),
- amfoterní, které v řetězcích obsahují kyselé i bazické skupiny.

Silně kyselé skupiny disociují téměř úplně, zatímco slabě kyselé a slabě bazické skupiny disociují jen do určitého stupně. Ve zředěných roztocích se polyelektrolyty vyskytují spíše ve formě nataženého řetězce z důvodu výskytu velkých odpudivých sil mezi souhlasně nabitými skupinami. [37] Polyelektrolytové komplexy (PEC) vznikají, pokud reagují ve vodném roztoku dva opačně nabitě polyelektrolyty.

3.3.1 Huminové látky jako polyelektrolytové komplexy

Pojem huminové látky je souhrnný název pro skupinu látek nejednotné struktury, která závisí na vzniku, původu a umístění naleziště. Dříve byla struktura HL považována za polymerní, nebyly však nalezeny opakující se monomery. Odborná veřejnost se tedy více

přiklání k polyelektrolytové a makromolekulární povaze HL.[38] Bylo zjištěno, že agregace HL je dynamická a velmi závisí na pH prostředí.[39] HL obsahují velké množství skupin, které mohou být ionizovány. Především se jedná o fenolické, hydroxylové a karboxylové skupiny. Dokážou vázat kovové ionty a organické molekuly.[8],[40]

3.3.2 Chitosan jako polyelektrolytový komplex

Aminové skupiny a dlouhé heteropolysacharidové řetězce tvoří z chitosanu výjimečný kationický polyelektrolyt. Elektrostatické interakce chitosanu s polyelektrolytem jsou jiné povahy než iontové, jsou silnější než jiné typy slabých interakcí (např. vodíkové můstky). Takové typy komplexů nepotřebují žádné organické prekurzory, katalyzátory nebo reakční činidla, nabízí se tedy možnost zkoumání různých PEC hydrogelů pro medicínu. Byly připraveny PEC na bázi chitosanu s anionickými polysacharidy jako alginát, glukosaminyglykany, chondroitin sulfát, hyaluronová kyselina, heparin, karboxymethyl celulóza, pektin, dextran sulfát, xanthan. Dále také s proteiny (želatina, albumin, fibroin, keratin a kolagen) a syntetickými aniontovými polymery (polyakrylová kyselina). PEC chitosanu a jiného polyaniontu se většinou tvoří ochotně při fyziologických podmínkách, příprava nových komplexů může tedy být užitečná v medicíně. [41]

3.4 Metody analýzy polyelektrolytových komplexů

3.4.1 Termická analýza – kalorimetrie

Jednoduše řečeno metody termické analýzy studují změny vlastností vzorku, ke kterým dochází při jeho zahřívání nebo ochlazování. Kalorimetrie je disciplína, která se zaměřuje na sledování tepelných změn v průběhu měření. Kalorimetrické experimenty probíhají za řízených podmínek (konstantní objem či teplota). Kalorimetrické studie mohou být různě uspořádány jako titrace, průtok, reakce či sorpce. Všechny tyto metody můžeme dělit podle principu měření (tepelná kompenzace, akumulace), metod operace (statické, průtokové, skenovací) nebo podle konstrukce (počet cel). [41] Tato bakalářská práce je zaměřena na využití konkrétní kalorimetrické metody izotermická titrační kalorimetrie (ITC).

3.4.1.1 Princip izotermické titrační kalorimetrie

Izotermická titrační kalorimetrie je kvantitativní metoda studující termodynamické parametry interakcí v roztoku. Od 70. let minulého století, kdy začal rozvoj této techniky, došlo k mnoha pokrokům. Metoda ITC pomáhá porozumět především biologickým strukturám a procesům na molekulární úrovni. Zjišťuje energetické poměry při (především) biologických reakcích (vázaní ligandů, interakce mezi enzymem a substrátem a interakce mezi složkami multimolekulárních komplexů).

Obecně ITC měří teplo, které je buď pohlcováno, nebo uvolňováno. Pomocí kalorimetrických měření mohou být studovány konstanty stability, stechiometrie, interakce entalpií a entropií, Gibbsovy volné energie či změna tepelné kapacity. Velkou výhodou je měřítko experimentů, stačí množství vzorků v řádu stovek mikrolitrů.

Technika ITC vychází z předpokladu, že spolu reaguje makromolekula M s ligandy X souhrnně takto:



Pomocí izotermické titrační kalorimetrie lze stanovit rovnovážnou konstantu K (binding constant), změnu enthalpie systému ΔH° (heat of binding) a parametr n , který vyjadřuje stechiometrii sledovaného procesu. Poté je možno vyhodnotit standardní reakční Gibbsovu energii ΔG° a standardní reakční změnu entropie ΔS° :

$$\Delta G^\circ = -RT \ln K, \quad (2)$$

$$\Delta S^\circ = \frac{\Delta H^\circ - \Delta G^\circ}{T}, \quad (3)$$

Hodnota standardní reakční Gibbsovy energie ΔG° poskytuje informaci o „ochotě“ probíhající reakce. Pokud je tato hodnota ΔG° záporná, reakce probíhá samovolně zleva doprava a zvyšuje se i hodnota K . Pokud jsou hodnoty ΔG° kladné, pak reakce samovolně neprobíhá, probíhala by zprava doleva.

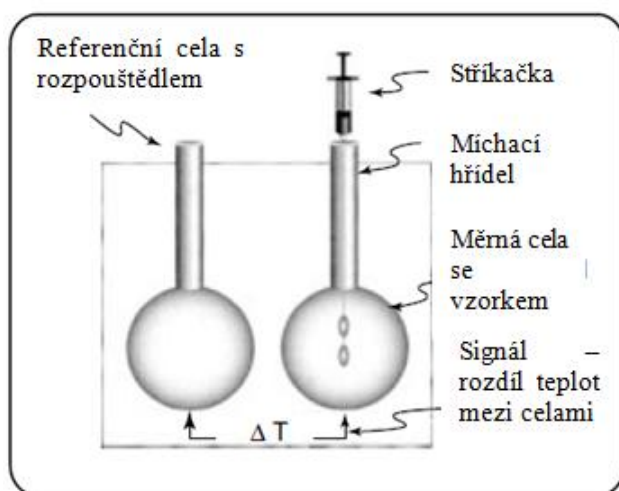
Pro konstantní teplotu můžeme rovnici Gibbsovy energie zapsat ve tvaru:

$$\Delta G^\circ = \Delta H^\circ - T\Delta S^\circ, \quad (4)$$

z kterého plyne, že se hodnota ΔG° skládá ze členu entalpického ΔH° a entropického $T\Delta S^\circ$. Pokud se teplo uvolňuje, je hodnota reakční energie záporná. To ukazuje na uvolnění energie z vazeb v produktu. Kladná hodnota entalpického členu (spotřeba tepla) ukazuje na energii spotřebovanou na štěpení vazeb. Entropický člen souvisí s neuspořádaností děje. Aby vznikaly stabilní sloučeniny MX_n , musí být kladná hodnota entropického členu převážena dostatečnou hodnotou entalpie ΔH° . [43]

3.4.1.2 Instrumentace

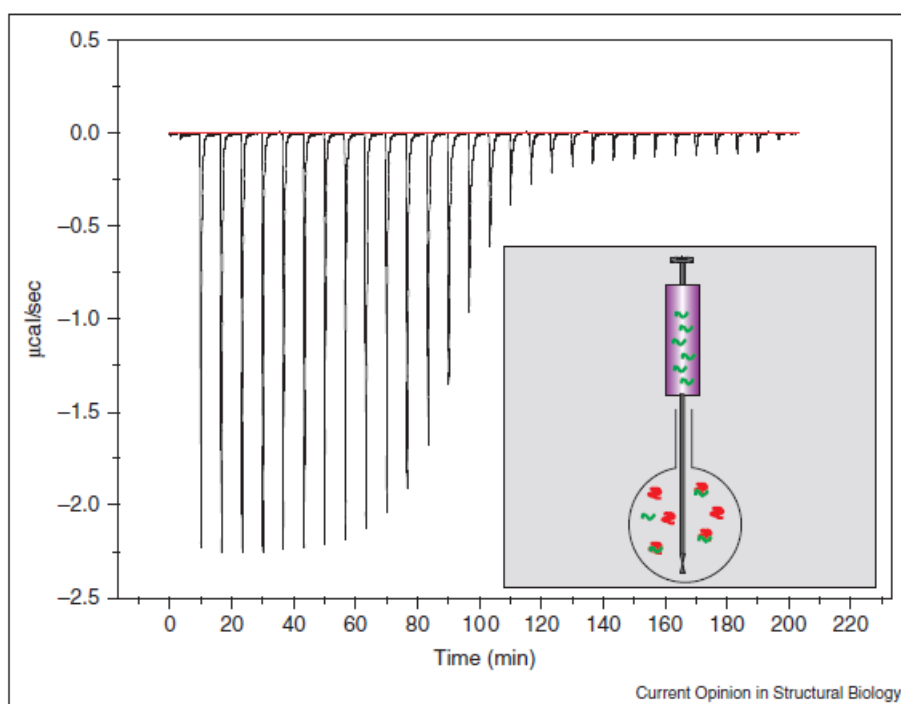
Základem ITC jsou dvě cely umístěné v obalu (kalorimetru), který je schopen udržet stálou teplotu. Jedna cela je referenční, obsahuje vodu nebo rozpouštědlo. Druhá cela je měrná, v ní je umístěn roztok vzorku. Obě cely by měly být chemicky inertní a měly by dobře vést teplo. Do měrné cely je přivedena kapilára se stříkačkou, ze které je dávkován roztok do titrovaného vzorku. Citlivé termoelektrické obvody zajišťují detekci teplotních rozdílů mezi celami. Musí být zachovány přísně izotermické podmínky. Základní uspořádání kalorimetru je vidět na Obr. 4. [44]



Obr. 4 – základní schéma izotermického kalorimetru podle [44]

3.4.1.3 Průběh měření a získaná data

Během experimentu je v měřicí cele zaznamenáván signál, který se samozřejmě mění a různě vychyluje podle konkrétně probíhající reakce. Kalorimetr měří energii potřebnou k udržení izotermických podmínek mezi celami. Výstupem z měření jsou data teplotního toku v průběhu času. Podle směrování pulzů můžeme okamžitě posoudit, zda se jedná o reakci exotermní nebo endotermní. Směr pulzů je dán nastavením a konvencí jednotlivých pracovišť. Plochy píků udávají změnu entalpie ΔH° . Možný výstup ITC je ukázán na Obr. 5.



Obr. 5 – ukázka výstupu z měření metodou izotermické titrační kalorimetrie z [45]

3.4.2 Strukturní analýza – dynamický rozptyl světla

Dynamický rozptyl světla (DLS), také znám jako kvazi-elastický rozptyl světla nebo fotonová korelační spektroskopie, je technika pro měření především velikosti částic koloidní povahy. Dovoluje provádět měření s poměrně malými objemy a koncentracemi vzorku.

Výsledky měření jsou srovnatelná s výsledky elektronového mikroskopu. Určité odchylky mohou být způsobeny rozdílem hydrodynamických poloměrů (můžou zahrnovat solvatační obaly či naadsorbované vrstvy na povrchu částic), skutečných poloměrů, nebo změnami velikostí částic při přípravě vzorků pro elektronovou mikroskopii. Získaná průměrná velikost koloidních částic je vážená podle páté mocniny (tzv. Z-average). Velké částice jsou nadhodnoceny, a tak se mohou frakce malých částic ztratit ve velké intenzitě záření rozptýleného na větších částicích.[46]

3.4.2.1 Principy DLS

Hlavním principem DLS je měření světla, které rozptylují molekuly ve vzorku, v průběhu času. Pokud by se molekuly ve vzorku vůbec nepohybovaly, rozptyl světla by byl konstantní a pro nás tedy neúčinný. K rozptylu světla dochází v důsledku Brownova pohybu. To je pohyb částic způsobený nárazy molekul disperzního prostředí do koloidních částic díky tepelnému pohybu. Brownův pohyb se projevuje v difúzi, sedimentaci a ovlivňuje stabilitu

koloidních soustav. Pohyb částic je ovlivněn několika faktory. Čím vyšší je teplota, tím rychleji se molekuly pohybují. Se zvyšující se viskozitou rozpouštědla klesá rychlost pohybu. A nakonec čím větší molekuly vzorku jsou, tím pomaleji se pohybují.

Pokud známe viskozitu prostředí a zajistíme konstantní teplotu, stává se intenzita rozptýleného světla přímo úměrnou hydrodynamickému poloměru částice d_H . Rychlost Brownova pohybu je definována pomocí difúzního koeficientu D . Tento koeficient potom můžeme převést na velikost částic pomocí Stokes – Einsteinovy rovnice:

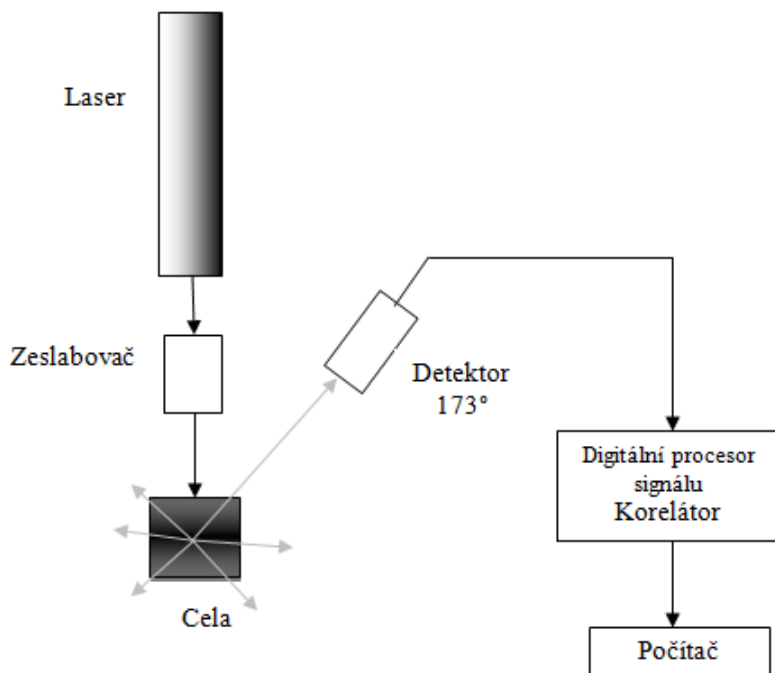
$$d_H = \frac{kT}{6\pi\eta D}, \quad (5)$$

kde k je Boltzmannova konstanta, T je teplota a η je viskozita.

Náhodný vzor intenzity světla se převede na měření hydrodynamického poloměru pozorováním změn v průběhu času. Ze stejných dat jsou získávány dva grafy s malou časovou prodlevou. Zaznamenává se korelace mezi těmito grafy. Korelace se vypočítává tak dlouho, až je dosaženo nulové korelace (změny intenzity jsou zcela náhodné). Čím rychleji se molekuly pohybují, tím rychleji se korelace přiblíží k nule. Změřená korelační funkce se poté může použít pro výpočet distribuce velikosti.[47],[48]

3.4.2.2 Instrumentace

Typický systém DLS se skládá z několika komponent, které jsou znázorněny na Obr. 6. Základem je laser, který osvětluje částice vzorku v cele. Laserový paprsek prochází buď přímo skrz vzorek, nebo je rozptýlen částicemi ve vzorku. Detektor zajišťuje měření intenzity rozptýleného světla. Přístroj Zetasizer Nano ZS má detektor umístěný v úhlu 173° . Pro ochranu detektoru před přetížením je instalován zeslabovač (attenuator), který snižuje intenzitu rozptylu.[49]



Obr. 6 Schéma přístroje Zetasizer Nano ZS

Podobně jako u měření ITC je možno využít měření velikosti částic v titračním módu. Základní přístroj Zetasizer je možno doplnit titrátorem, který umožňuje sledovat různé změny

intenzity rozptýleného světla při mísení dvou látek. Do nádoby s titrovaným roztokem je ze zásobní nádoby pomocí malého čerpadla přidáván titrační roztok. Po promísení obou složek je roztok nasáván do průtočné kyvety a probíhá samotné měření.[50]

4 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

Luo a Wang [51] se ve své studii zabývají nedávnými objevy a pokroky v oblasti přípravy polyelektrolytů na bázi chitosanu s především přírodními polysacharidy. Tyto směsné materiály jsou připravovány jako nanočástice, mikročástice, tablety, gely, membrány a filmy. Jako polyanionty byly zkoumány: alginát, hyaluronová kyselina, pektin, karagenan, xanthan, gellan, arabská guma, guma ze stromu ledvinovníku západního (zdroj kešu ořechů), karboxymethylcelulóza a exudáty z rostlin *Amorphophallus konjac* a *Cochlospermum gossypium*. Studie závěrem shrnuje možnosti využití polyelektrolytů na bázi chitosanu především v medicíně při cíleném transportu léčiv.

Fredheim a Christensen v článku [52] studovali interakce mezi lignosulfonátem a chitosanem. Oba reaktanty smíchali při pH 4,5 (0,1M NaCl) a následně zkoumali stabilitu vzniklých komplexů.

Většina následujících prací se zabývá studiem adsorpce huminových látek, i s navázanými polutanty, na chitosan či jeho soli nebo deriváty. Tyto studie si většinou kladou za cíl využití ekonomicky dostupných surovin pro čištění vody či dokonce pro přípravu vody pitné.

Zhang a Bai publikovali v roce 2003 studii [53], ve které zkoumali mechanismus a kinetiku adsorpce huminových kyselin na chitosanem obalené granule z polyethylentereftalátu. Proběhla studie zeta potenciálu. Dále prokázali, že se vzrůstem pH prostředí klesá adsorpční kapacita. Za použití rentgenové fotoelektronové spektroskopie (XPS) byla prokázána protonace aminoskupin chitosanové vrstvy a vznik organického komplexu s HK.

Yan a Bai v práci [54] zkoumali adsorpci olova a HK na hydrogelové perly chitosanu. Experimenty prováděli za laboratorní teploty při pH 5 – 7,5. Zkoumali adsorpci každého modelového materiálu zvlášť, poté postupnou adsorpci a adsorpci obou materiálů současně. Bylo prokázáno, že dochází ke komplexaci mezi adsorbátem a funkčními skupinami na povrchu perel. Adsorpce více látek najednou může být ovlivněna interakcemi mezi adsorbenty.

Bratskaya a spol. se zabývali srovnáním flokulace HK s chitosan hydrochloridem a chitosan glutamátem.[55] Studovali elektrický náboj vzniklých polyelektrolytových komplexů a efektivitu odstraňování barviva při flokulaci. Obě soli chitosanu se ukázaly jako velmi účinné, ve srovnání se však jako účinnější ukázal chitosan hydrochlorid.

Zhao a spol. v práci [56] studovali adsorpci HK z vodného roztoku na síťovaný karboxymethylchitosan. Systém maximálně adsorboval HK při pH 3,5. Pomocí metody XPS bylo zjištěno, že aminoskupiny karboxymethylovaného chitosanu jsou protonované a vzniká organický komplex mezi chitosanem a HK.

Liu a spol. se ve článku [57] zabývali vznikem superabsorbentu chitosan-g-poly(akrylové kyseliny)/ humát sodný. Tento komplex připravili roubovanou polymerací z chitosanu, akrylové kyseliny a humátu sodného ve vodném roztoku. Jako síťovací činidlo byl použit *N,N'*-metylenbisakrylamid a jako iniciátor ammonium persulfát. Dále zkoumali adsorpci vody a botnání při různých hodnotách pH. Příkladově humátu sodného oboje vlastnosti prokazatelně zlepšuje.

Wan Ngah a spol. v roce 2011 publikovali izotermickou a kinetickou studii zabývající se adsorpcí HK na chitosan- H_2SO_4 perly. [58] Proběhly studie vlivu iniciačního pH, míchání, teploty a výchozí koncentrace HK. Bylo prokázáno, že se jedná o endotermický proces. Chemisorpci nejlépe vyhovoval model pseudo kinetiky druhého řádu. Dále byly prokázány elektrostatické interakce mezi protonovanou amino skupinou a karboxylátovými a alkoholátovými skupinami v huminových kyselinách. Dále však uvádí, že nezanedbatelný vliv mají i van der Waalovy interakce a povrchová adsorpce.

Havelcová a spol. zkoumali sorbenty na bázi huminových látek a chitosanu.[59] Rovnovážnými sorpčními experimenty byla studována sorpční účinnost připravených sorbentů s kovy Cu, Co a Cd v závislosti na pH roztoku a koncentraci kovu. Došlo také k srovnání různých huminových látek (lignit a oxihumolit.) Potvrdil se synergický efekt použití dvou dobrých sorbentů v jednom kombinovaném.

Dong, Chen a Liu ve své nejnovější studii [60] publikovali přípravu nových magnetických nanočástic chitosanu a jejich aplikaci při odstraňování HK z vodných roztoků. Magnetické nanočástice byly připraveny *in situ* koprecipitací následovanou síťováním epichlorhydrinem. Vzniklý materiál je výhodný pro svou možnost recyklace. Při studiu adsorpce bylo zjištěno, že vyhovuje Langmuirův adsorpční model.

Přípravou směsných hydrogelů se na Fakultě chemické ve své dizertační práci zabýval **Sedláček**. Přípravoval také hydrogely na bázi chitosanu a HK. Zkoumal vliv různých činidel na gelaci, vliv pH, vliv iontové síly.[61]

Kalorimetrickými studiemi huminových látek se ve své diplomové práci věnovala **Türkeová**. [62] Studovala interakce huminových látek s měďnatými ionty. Časově náročnou byla část optimalizace postupu měření metodou izotermické titrační kalorimetrie. Získaným optimalizovaným postupem poté proběhla měření jednoduchých organických sloučenin, která posloužila jako modely funkčních skupin HL. Byly porovnány získané hodnoty ΔH z kalorimetrických měření a ze semiempirické INDO metody.

Měření velikosti částic různých systémů s huminovými kyselinami či s chitosanem se zabývalo již několik výzkumných skupin na různých vědeckých pracovištích. **Kjoniksen a spol.** zkoumali pomocí DLS modifikované a nemodifikované chitosany.[63] **Pa a Yu** zase studovali vliv koncentrace kyseliny octové, v které je chitosan rozpustný, na koncentraci amoniových skupin chitosanu.[64] V roce 2001 **Palmer a Wandruszka** publikovali studii, kde měření DLS pozorovali změnu agregačních velikostí částic ve vodných roztocích huminových a fulvinových kyselin v závislosti na změnách teploty, pH či přidavku elektrolytu.[65]

Studiemi dynamického rozptylu světla byly zkoumány komplexy DNA-chitosan. Byly použity chitosany o různých molekulových hmotnostech. Zkoumané komplexy byly shledány stabilními a byl prokázán vliv molekulové hmotnosti na hydrodynamický poloměr komplexů.[66] **Tan, Koopal a Norde** v roce 2008 publikovali článek, ve kterém popisují zkoumání interakcí mezi huminovými kyselinami a proteinem lysozymem pomocí DLS a ITC. Vznik komplexů probíhá do dosažení izoelektrického bodu. Zkoumali interakce v různých poměrech složek. Výsledkem byly kvalitní a reprodukovatelné výsledky z obou metod.[67]

5 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

5.1 Použité chemikálie

Lignohumát draselný, Amagro Humic Substances s.r.o., ČR
Chitosan (low molecular weight), Sigma-Aldrich®, USA
Voda čištěná přístrojem PURELAB-flex, ELGA-LabWater, USA
Kyselina chlorovodíková (Normanal ®), Lach-Ner, s.r.o., ČR

5.2 Použité přístroje

Magnetická míchačka Heidolph MR 300, Heidolph Instruments GmbH & Co.KG, SRN
Centrifuga MiniSpin, Eppendorf AG, SRN
Kalorimetr TAM III, TA Instruments, USA
Koloidní analyzátor Zetasizer Nano ZS, Malvern Instruments Ltd, Velká Británie
Autotitrátor MPT-2, Malvern Instruments Ltd, Velká Británie

5.3 Příprava zásobních roztoků a vzorků

5.3.1 Příprava zásobního roztoku 0,1 M HCl

Množství kyseliny odpovídající zvolené koncentraci bylo převedeno do odměrné baňky o objemu 1 dm³. Následně byla přečištěnou vodou doplněna po rysku. Tento roztok byl používán pro přípravu roztoku chitosanu.

5.3.2 Příprava vzorků lignohumátu

Navážka lignohumátu byla kvantitativně převedena do odměrné baňky a doplněna přečištěnou vodou po rysku. 2% roztok lignohumátu odpovídá hmotnostní koncentraci 20 g·dm⁻³.

5.3.3 Příprava vzorků chitosanu

Navážka chitosanu (low molecular weight) byla kvantitativně převedena do odměrné baňky a rozpuštěna připraveným 0,1M roztokem HCl. Roztok se přes noc míchal a následující den byl stejným roztokem HCl doplněn po rysku. Koncentrace se připravovaly vždy stejné jako pro lignohumát.

Pro měření kalorimetrie i dynamického rozptylu světla byly roztoky vzorků připravovány stejným způsobem.

5.4 Měření na kalorimetru TAM III

5.4.1 Postup a nastavení měření

- Do ampule referentní ocelové cely byla převedena přečištěná voda, ampule byla uzavřena a postupně zasouvána do přístroje.

- Vzorky lignohumátu a chitosanu byly zbaveny bublinek vzduchu centrifugací v odstředivce MiniSpin. Centrifugace vždy probíhala 5 minut při $3000 \text{ ot} \cdot \text{min}^{-1}$.
 - Do ampule měrné cely bylo napipetováno požadované množství chitosanu. Bylo upevněno zlaté míchadlo. Ampule byla uzavřena, cela byla zvenčí očištěna od otisků prstů a případných jiných nečistot a postupně zasouvána do přístroje.
 - Bylo nastaveno míchání vzorku chitosanu na $90 \text{ ot} \cdot \text{min}^{-1}$.
 - Stříkačka (Hamilton) s ocelovou kapilárou byla pečlivě naplněna roztokem lignohumátu tak, aby neobsahoval bubliny.
 - Stříkačka byla umístěna do dávkovací pumpy a kapilára byla zasunuta celou až do ampule s roztokem chitosanu.
- Nastavení:
- počet přidavků: 50
 - přidavek $5 \mu\text{l}$, doba přidavku 5 s
 - interval mezi přidavky: 30 min.; celková doba měření: 25 hodin
 - celkový objem titračního roztoku: $250 \mu\text{l}$
 - teplota $25 \text{ }^\circ\text{C}$

5.4.2 Realizace kalorimetrických měření

Vzhledem k tomu, že v literatuře dosud nebyla popsána kalorimetrická měření interakcí huminových kyselin a chitosanu, bylo nutné velkou část experimentů věnovat časově náročné optimalizaci podmínek titrací vzhledem k možnostem kalorimetru (maximální objem stříkačky, maximální objem měrné cely, objem jednotlivých přidavků, interval mezi přidavky.)

Postup titrace byl tedy zvolen s ohledem na instrumentaci kalorimetru. Jako titrovaný roztok byl použit chitosan, který je, především ve vyšších koncentracích, viskózní. Při titraci chitosanem by mohlo docházet k nepřesnostem a navíc by se kapilára mohla ucpat. Cílem těchto měření bylo provést kalorimetrické experimenty v co největším koncentračním rozpětí. Celý experimentální postup by mohl být rozdělen do následujících čtyř částí:

- titrace roztoků o koncentracích 5 %, 4 %, 2 % – titrace $500 \mu\text{l}$ roztoku chitosanu $250 \mu\text{l}$ lignohumátu, tedy titrace v poměru 2:1
- titrace roztoků o koncentracích 1,5 %, 1 %, 0,5 %, 0,25 % a 0,1 % – titrace $250 \mu\text{l}$ roztoku chitosanu $250 \mu\text{l}$ lignohumátu, tedy titrace v poměru 1:1
- titrace roztoků o koncentracích 0,05 % a 0,01 % – titrace v poměru 1:1, roztoky byly připravovány ředěním z roztoků o koncentraci 0,1 %
- titrace roztoků chitosanu a lignohumátu vodou v koncentracích 4 %, 2 %, 1 %, 0,5 % a 0,1 % – titrace v poměru 1:1.

Všechna měření byla provedena dvakrát.

5.5 Měření na analyzátoru Zetasizer Nano ZS

5.5.1 Postup a nastavení měření

- Do systému autotitrátoru MPT-2 byl nasát roztok chitosanu.
- 10 ml roztoku lignohumátu bylo převedeno do zkumavky se závitem a magnetickým míchadélkem. Přes systém autotitrátoru byl roztok lignohumátu nasáván do průtočné cely, která byla zasunuta do přístroje Zetasizer.
- Přes software přístroje byl nastaven průběh měření včetně počtu přídavek. Po každém přídávku byla třikrát měřena intenzita rozptýleného světla.

5.5.2 Realizovaná měření

Postup měření byl aplikován opět s ohledem na zařízení přístroje. Po prvním pilotním měření, kdy byl do vzorku chitosanu přidáván roztok lignohumátu, bylo zjištěno, že tento postup není ideální, protože nedocházelo k dostatečnému promísení vzorků. Všechna měření tedy byla poté realizována jako přídávky roztoku chitosanu do roztoku lignohumátu od nižších koncentrací. Byly proměřeny roztoky o hmotnostních koncentracích: 0,01 %, 0,05 %, 0,1 %, 0,25 %, 0,5 %, 1 % a 2 %. Během měření byla v roztoku ponořena elektroda, která v průběhu měření zaznamenávala změny hodnot pH. Koncentrace použitých roztoků byly použity shodně se vzorky pro kalorimetrická měření, abychom mohli alespoň částečně porovnat míru zaznamenaných interakcí.

6 VÝSLEDKY A DISKUZE

6.1 Kalorimetrická měření

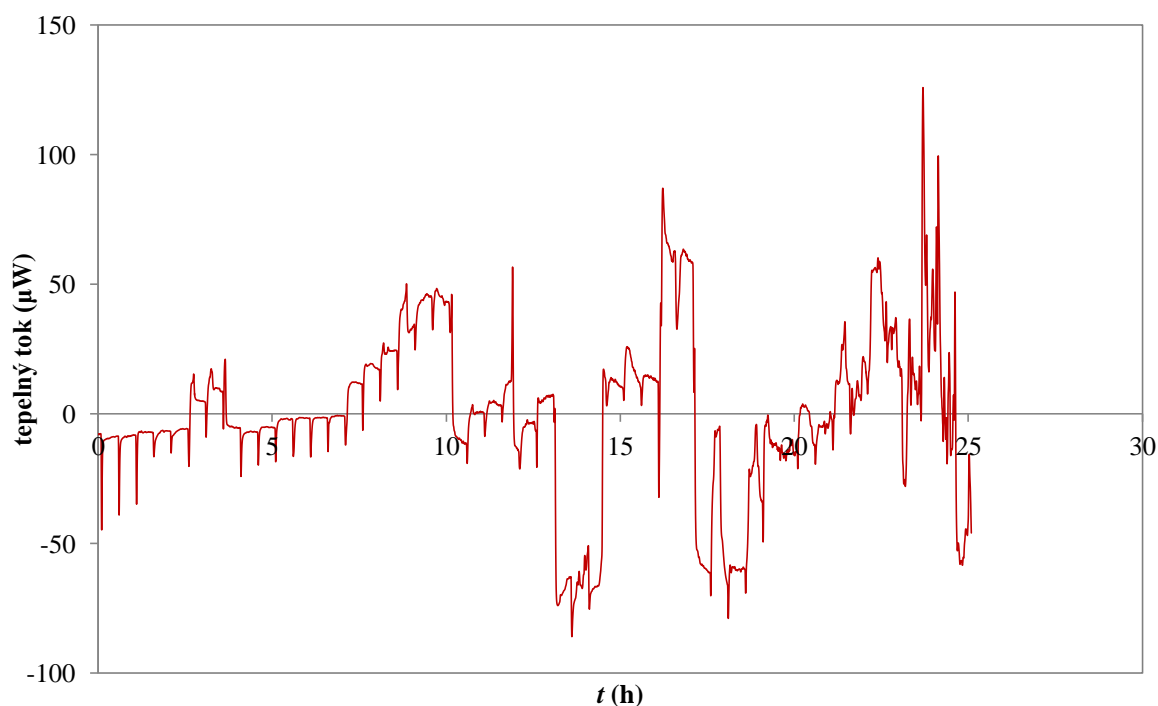
Výstupem z měření na kalorimetru TAM III je záznam závislosti tepelného toku (W) na čase (s). Již tento záznam může mnohé napovědět o průběhu měření. Pokud pík přidavku směřuje od osy x nahoru, jedná se o exotermní pochod. Pokud pík směřuje naopak dolů, jedná se o endotermní proces. Kalorimetrické studie interakcí chitosanu s lignohumátem ještě nebyly prováděny. Nejpodobnějším systémem se zabývali v práci [62], kde ovšem byly zkoumány interakce mezi huminovými kyselinami a měďnatými ionty.

Z nepublikovaných výsledků provedených měření byl určen experimentální model nastavení titrace. Bylo však třeba prozkoumat limity metody obzvláště z hlediska nejvyšší možné koncentrace chitosanu, který tvoří viskózní a velmi husté roztoky.

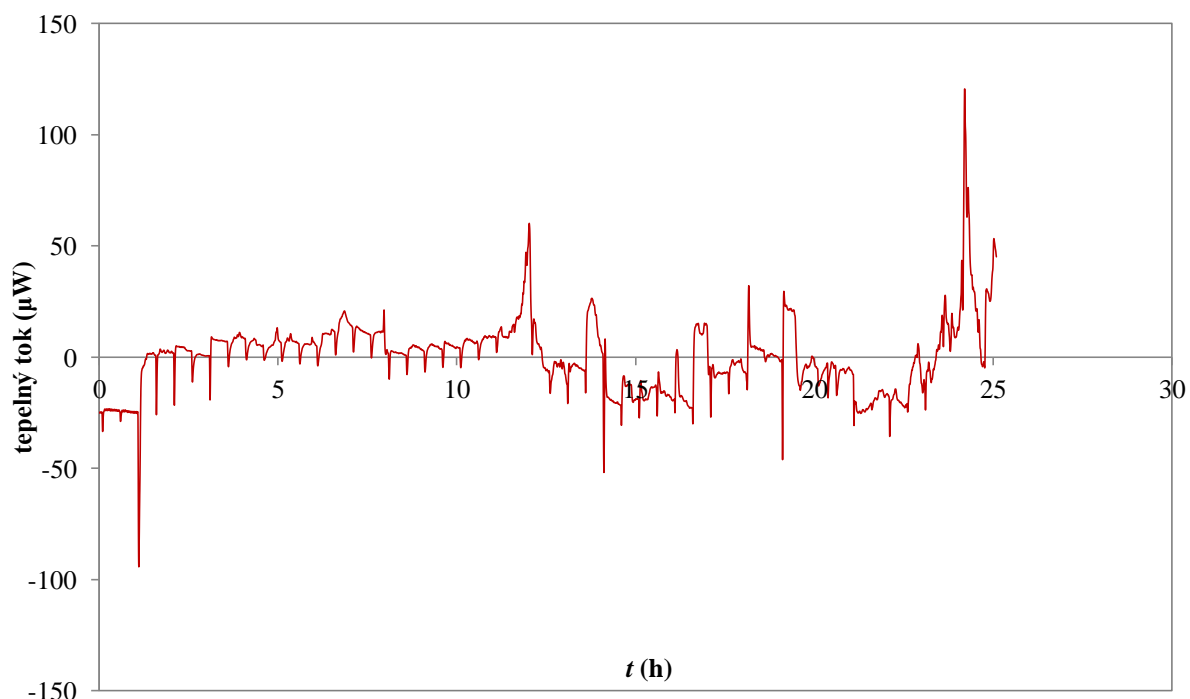
Další vyhodnocení titrace spočívá v integraci píků softwarem a je možno vynést závislost změny enthalpie ΔH na koncentraci nebo objemu titračního roztoku.

6.1.1 Titrace chitosanu lignohumátem o koncentracích 5 %, 4 % a 2 %

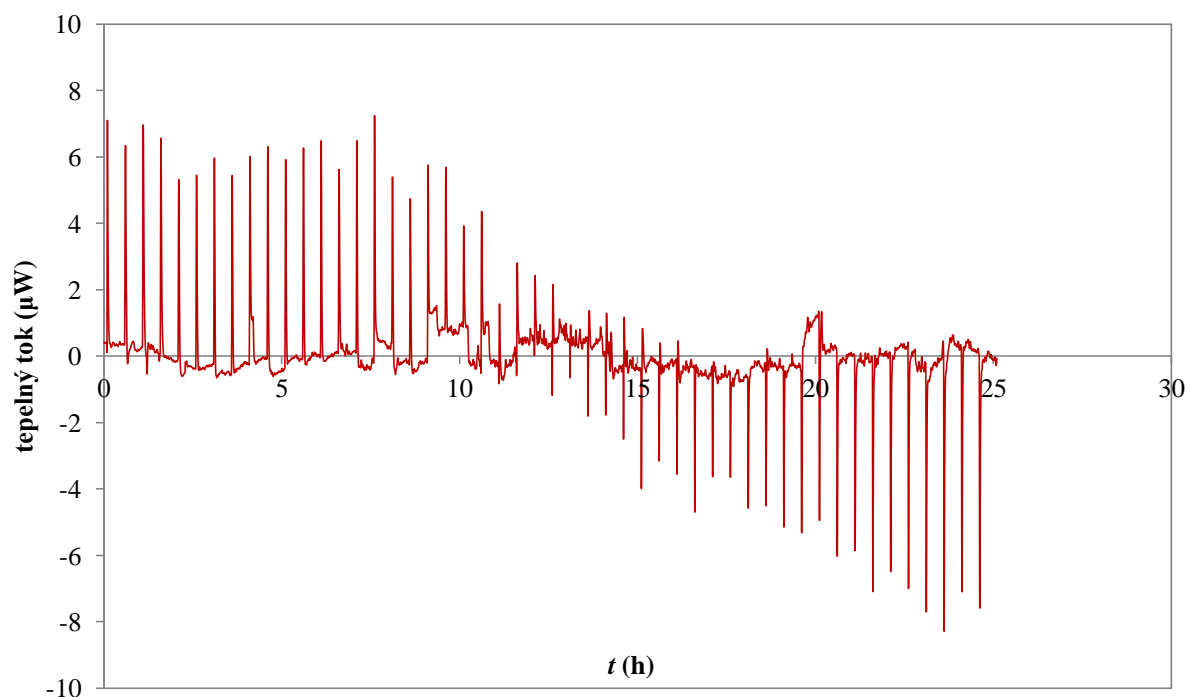
Jako horní koncentrační hranice byla vybrána hmotnostní koncentrace 5 % (odpovídá $50 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$). Roztoky lignohumátu byly připravovány bez problémů s rozpustností. Výrazné problémy se objevovaly s roztoky chitosanu, kdy i po několika dnech intenzivního míchání zůstávaly v odměrné baňce nerozpuštěné části navážky. A poté se již roztoky chitosanu nemohly považovat za čerstvě připravené. Titrace probíhala v poměru 2:1 pro chitosan. Průběh titrací ukazují následující tři grafy.



Obr. 7 Průběh titrace 5% chitosanu 5% lignohumátem



Obr. 8 Průběh titrace 4% chitosanu 4% lignohumátem

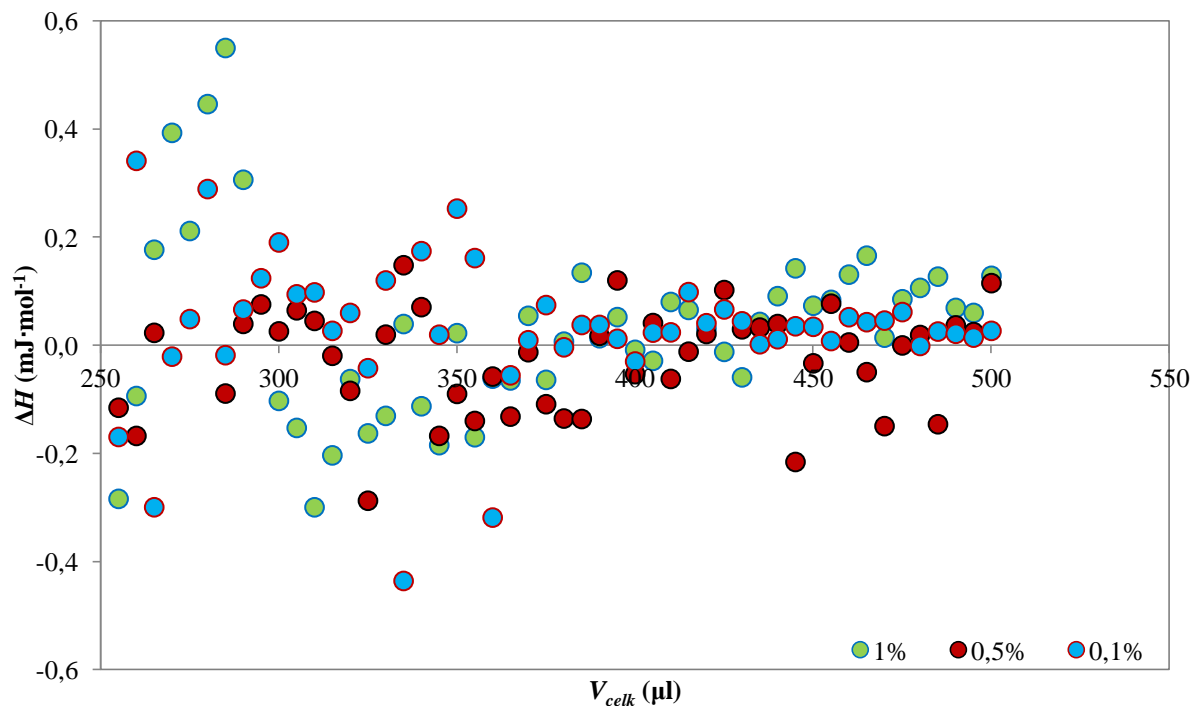


Obr. 9 Průběh titrace 2% chitosanu 2% lignohumátem

Především na prvních dvou grafech je zřetelné, že není stálá baseline a píky jsou spíše chaotické. Tento efekt zřejmě souvisí s viskozitou chitosanu, díky které byl vzorek v cele špatně promícháván. U 2% vzorku pozorujeme stálejší baseline. Došlo také k zajímavému jevu, kdy zhruba v polovině měření došlo ke změně směřování píků z exotermního děje na endotermní. Tento jev je přisuzován vzniku gelovitých komplexů (viz fotografie v příloze). Signál se pohyboval v oblasti jednotek μW .

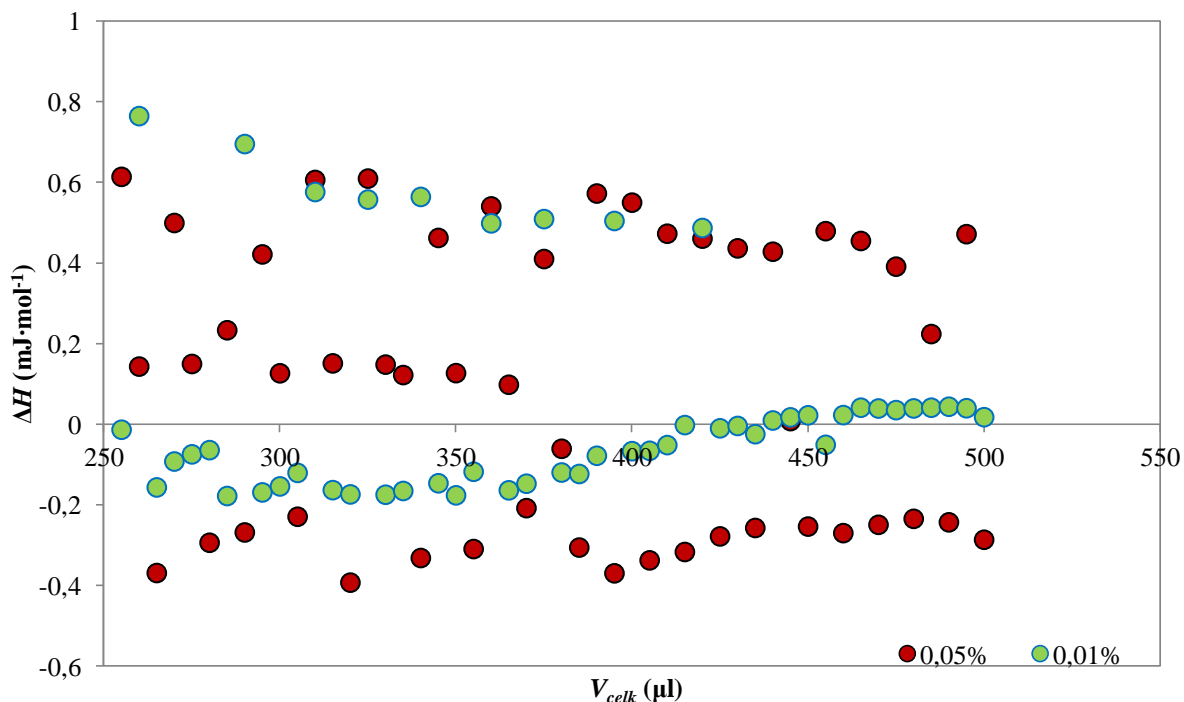
6.1.2 Optimalizované titrace v rozmezí koncentrací 1 % – 0,01 %

Pro titrace od koncentrace 1,5 % níže byl optimalizován titrační poměr na 1:1 (tedy 250 μl :250 μl). Původní poměr 2:1 již nižším zkoumaným koncentracím nevyhovoval. A předtím prováděné vizuální titrace potvrdily vznik komplexů v právě zvoleném poměru 1:1.



Obr. 10 Srovnání titrací chitosanu lignohumátem o koncentracích 1 %, 0,5 % a 0,1 %

Na Obr. 10 jsou srovnány změny entalpií při titraci 1%, 0,5 a 0,1% roztoků. Pozorujeme největší změnu enthalpie ze začátku měření. Je také patrné, že největší signál (a tedy změnu enthalpie) poskytl 1% vzorek. Intenzita signálu tedy klesala s koncentrací použitých vzorků.

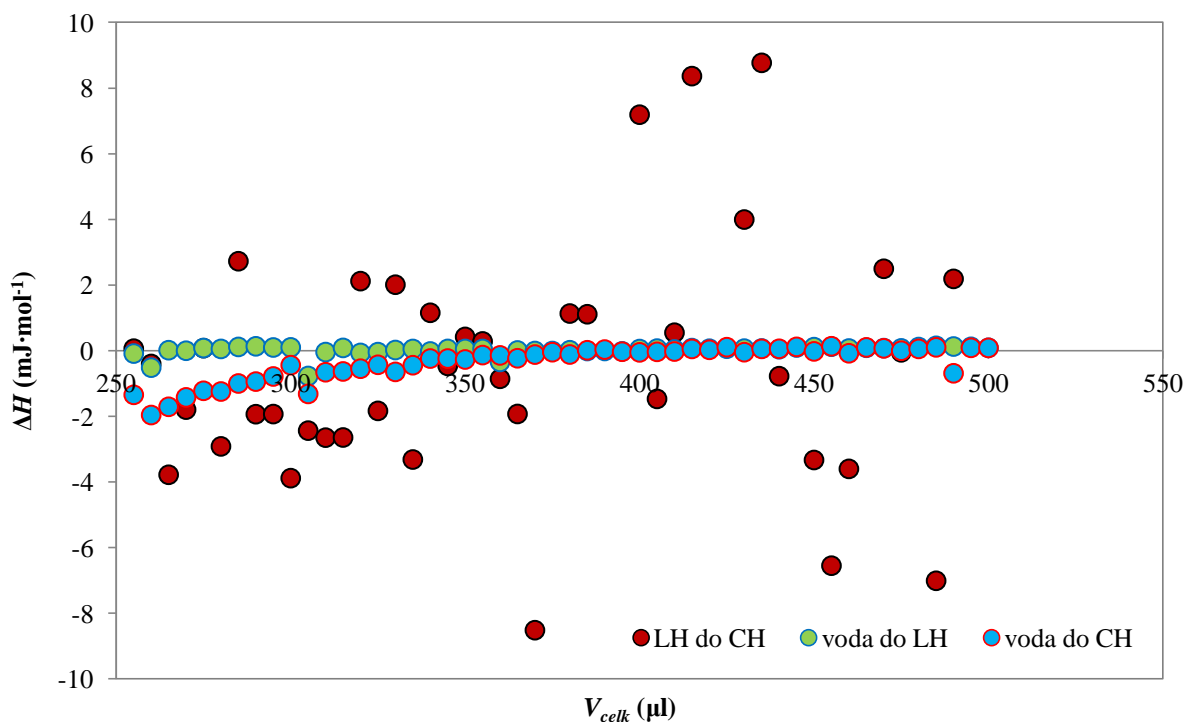


Obr. 11 Srovnání titrací chitosanu lignohumátem o koncentracích 0,05 % a 0,01 %

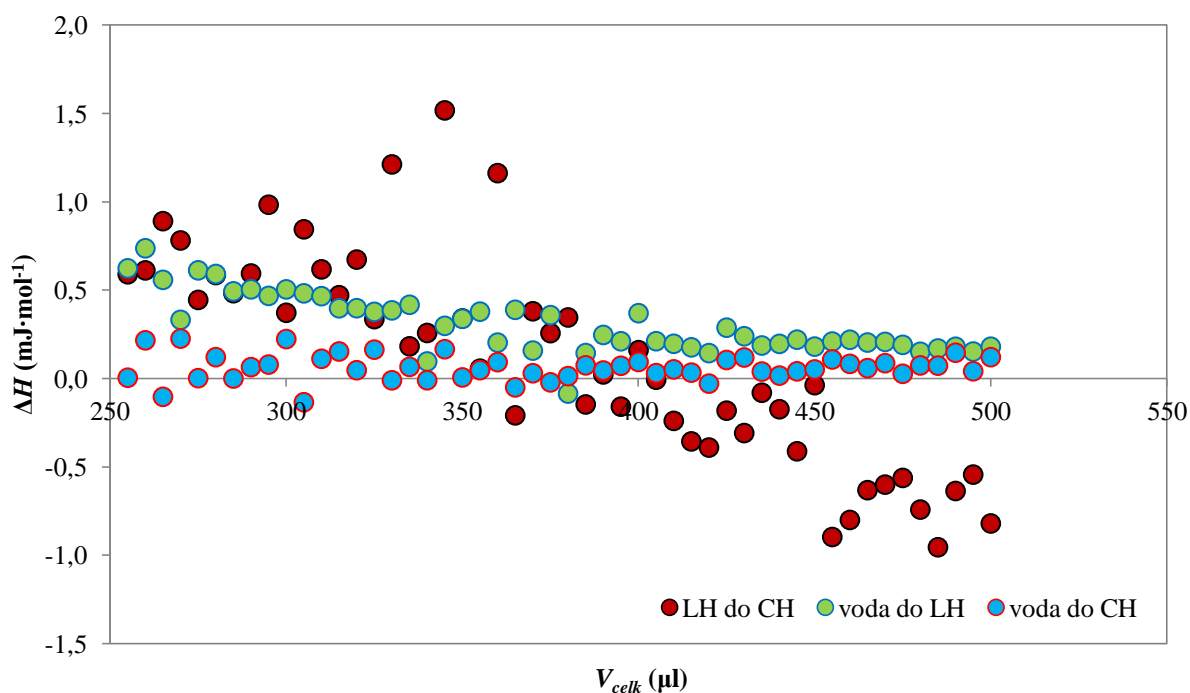
Obr. 11 zobrazuje srovnání titrací roztoků o koncentracích 0,05 % a 0,01 %, tedy roztoky ze spektra nejnižších zkoumaných koncentrací. Opět se zde opakuje trend klesající změny entalpie s klesající koncentrací. Také můžeme říci, že tato měření nebyla zřejmě provedena naprosto správně, protože odezva v podobě změn entalpie je poměrně chaotická (střídání směru píků nahoru a dolů.) Můžeme však usuzovat tvorbu komplexů u všech vzorků. Průběhy měření všech koncentrací jsou pro přehlednost uvedeny v příloze.

6.1.3 Srovnání titrací chitosanu lignohumátem s titracemi vodou pro roztoky o vybraných koncentracích

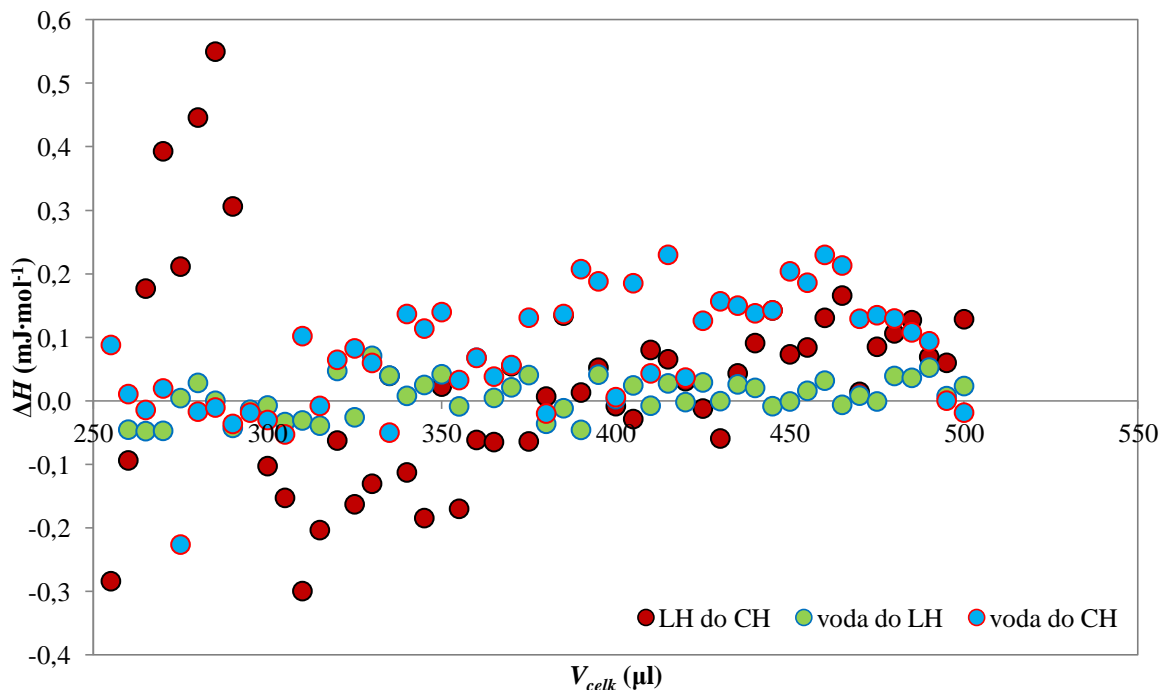
V další fázi provádění experimentů byly zkoumány interakce jednotlivých složek titrací s vodou. Cílem bylo vyvrátit vliv vody jako prostředí na vznik signálu při kalorimetrických měřeních a tedy potvrdit, že hlavním důvodem vzniku charakteristických píků při titracích jsou interakce mezi funkčními skupinami lignohumátu a chitosanu. Byly vybrány vzorky reprezentující zkoumanou koncentrační řadu počínaje 4% roztoky a konče 0,1% roztoky. Nižší koncentrace pro nás v tomto směru nejsou užitečné, protože již samotné titrace roztoků (0,05 % a 0,01 %) vykazují tak nízkou odezvu, že by nebylo možné prokázat původ interakcí.



Obr. 12 Koncentrace 4 %, srovnání interakcí při titracích chitosanu lignohumátem a chitosanu (lignohumátu) vodou. Pro lepší měřítko grafu byly u titrace LH do CH zanedbány hodnoty ΔH vyšší než $10 \text{ mJ}\cdot\text{mol}^{-1}$.

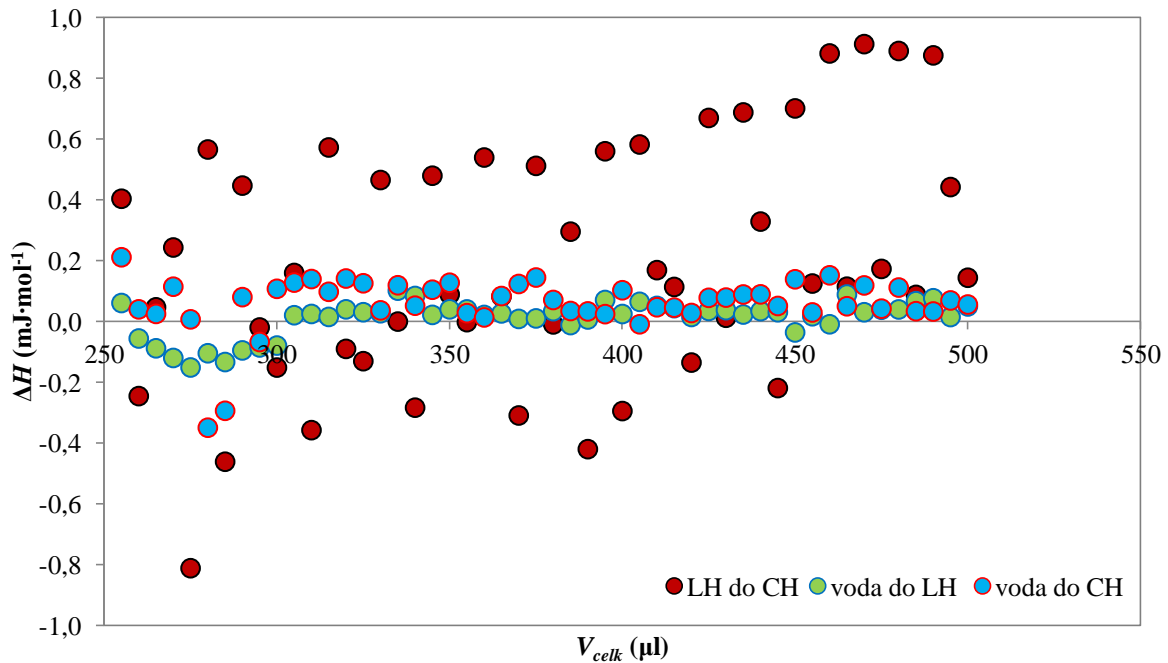


Obr. 13 Koncentrace 2 %, srovnání interakcí při titracích chitosanu lignohumátem a chitosanu (lignohumátu) vodou.

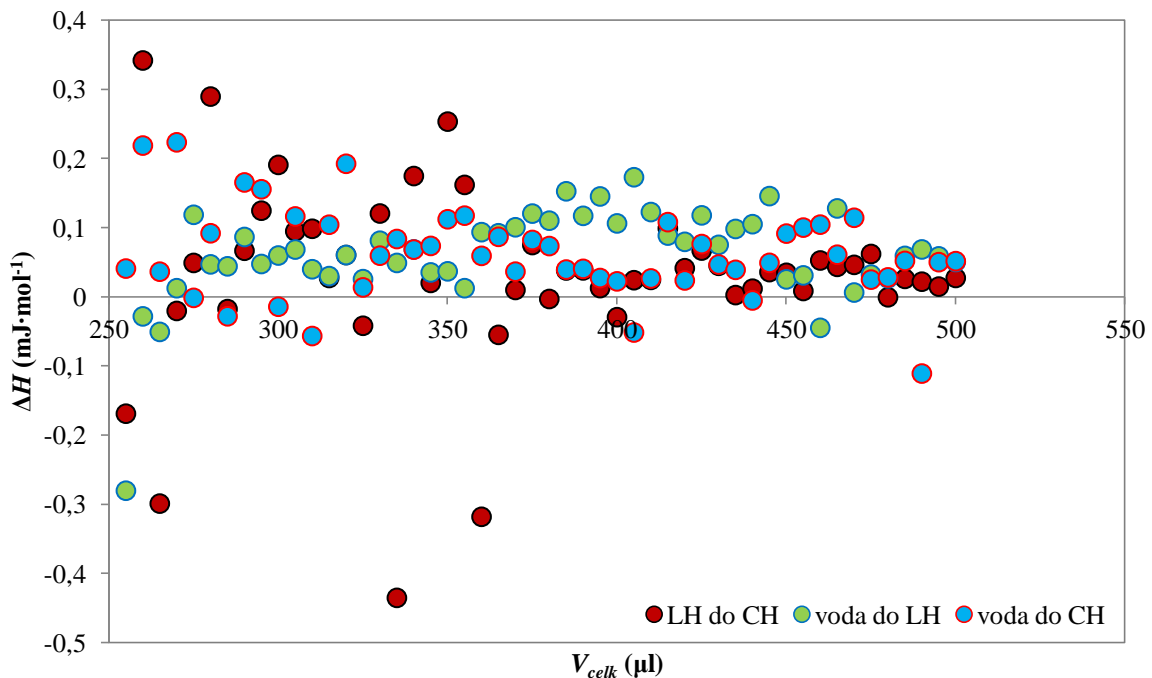


Obr. 14 Koncentrace 1 %, srovnání interakcí při titracích chitosanu lignohumátem a chitosanu (lignohumátu) vodou.

U porovnání interakcí pro 4 %, 2 % a 1 % vidíme, že jasně převažují interakce při titraci LH do CH. Interakce složek s vodou jsou naprosto zanedbatelné především u 4% vzorků. U 2% roztoku je zajímavé, že titrace lignohumátu vodou vykazuje větší změnu entalpie než titrace chitosanu vodou. Toto připisujeme tvorbě slabých vazebných interakcí fenolátových a karboxylátových skupin s vodou. U 1% roztoků je situace na první pohled již chaotičtější než u vyšších koncentrací. Ovšem stále větší změnu entalpie vykazuje chitosan titrovaný lignohumátem, i když ke konci titrace již převládá spíše změna entalpie připisovaná titraci lignohumátu vodou.



Obr. 15 Koncentrace 0,5 %, srovnání interakcí při titracích chitosanu lignohumátem a chitosanu (lignohumátu) vodou.



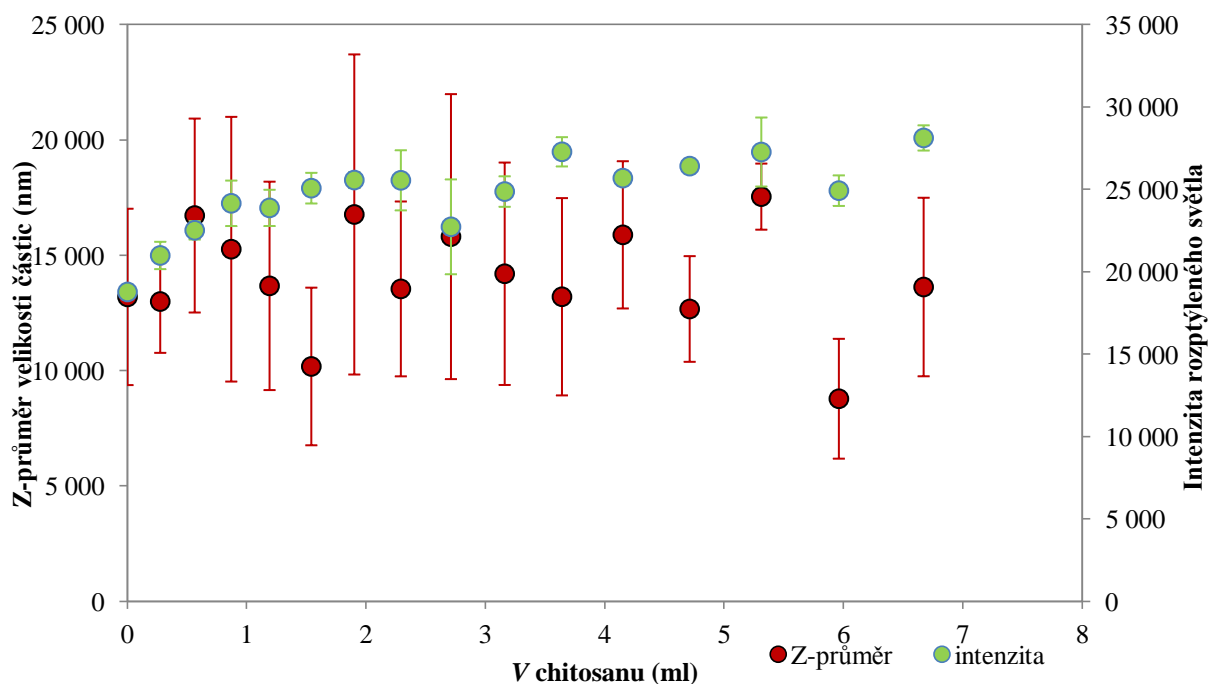
Obr. 16 Koncentrace 0,1 %, srovnání interakcí při titracích chitosanu lignohumátem a chitosanu (lignohumátu) vodou.

Dva grafy výše ukazují na srovnání interakcí pro koncentrace 0,5 % a 0,1 %. Jak již bylo diskutováno výše, výstup titrace roztoku o koncentraci 0,5 % je poměrně chaotický. Také došlo k zajímavému jevu, změna entalpie pro 0,5% vzorek dosahuje vyšších hodnot než 1% vzorek. U 0,5% vzorků pozorujeme výrazně nižší změny entalpie u interakcí složek s vodou

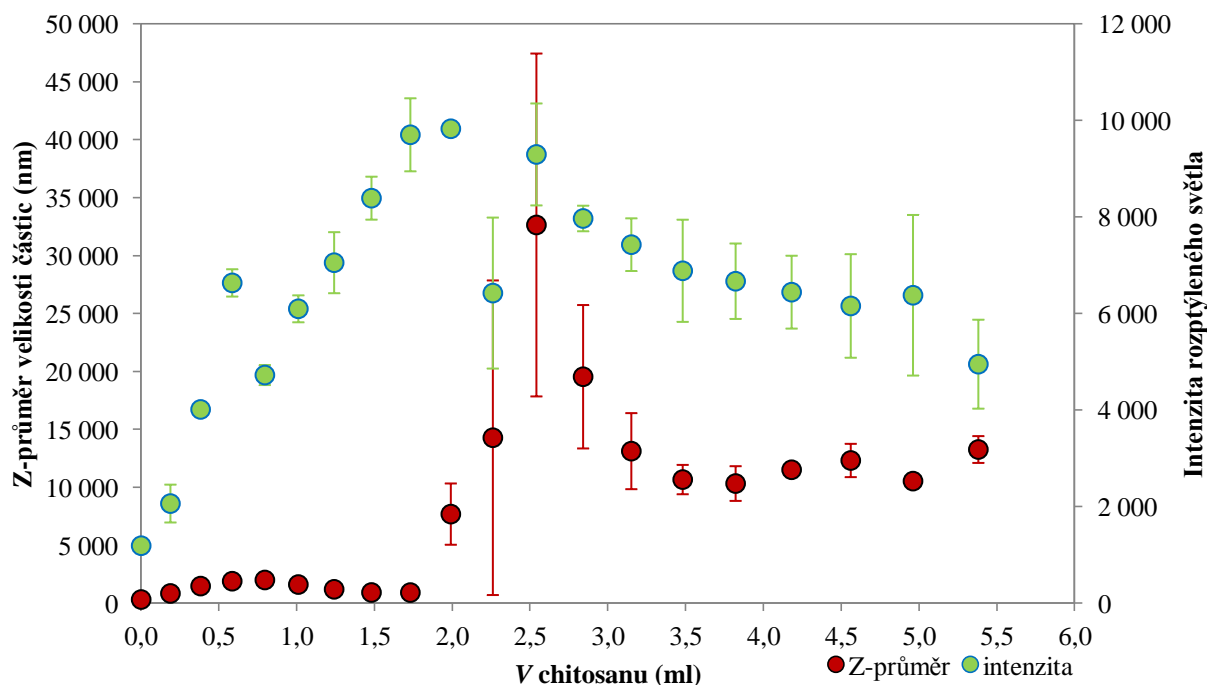
než u samotné titrace. U vzorku o koncentraci 0,1 % vypadá výstup opět poněkud chaoticky, nicméně největší změny entalpie opět vykazuje titrace chitosanu lignohumátem. Ke konci měření ovšem dominance těchto interakcí mizí, zřejmě již nedocházelo k tvorbě žádných komplexů, proto jsou vyšší entalpie u titrací lignohumátu (chitosanu) vodou. Obecně můžeme usoudit, že voda má zanedbatelný vliv na kalorimetrická měření a výstupy z měření skutečně odpovídají interakcím mezi lignohumátem a chitosanem.

6.2 Měření intenzity rozptýleného světla a velikosti částic

Bylo provedeno měření intenzity rozptýleného světla a velikosti částic pomocí dynamického rozptylu světla. Měření 2% vzorků neukazuje na výrazný vzestup velikosti částic či poklesu intenzity rozptýleného světla. Zřejmě u takto koncentrovaného vzorku došlo k agregaci ihned ze začátku titrace a vzniklé komplexy „stínily“ další vznikající při prosvícení vzorku a detekci.

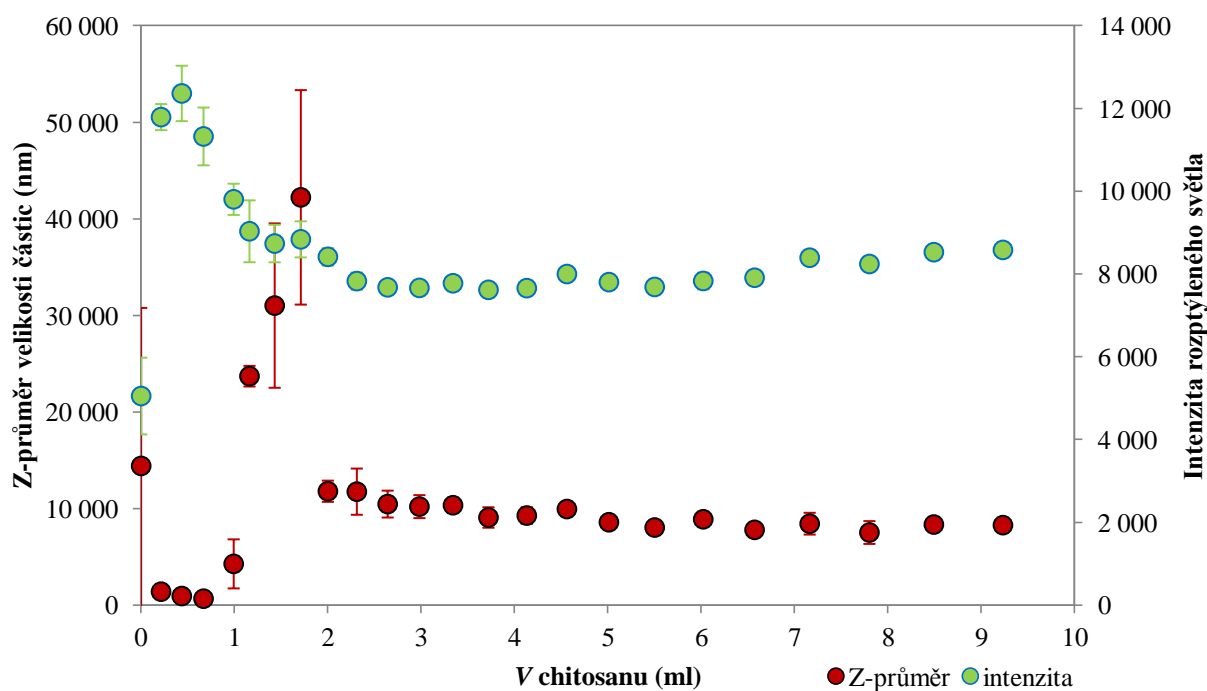


Obr. 17 Koncentrace 2 %, závislost velikosti částic a intenzity rozptýleného světla na přidavku chitosanu



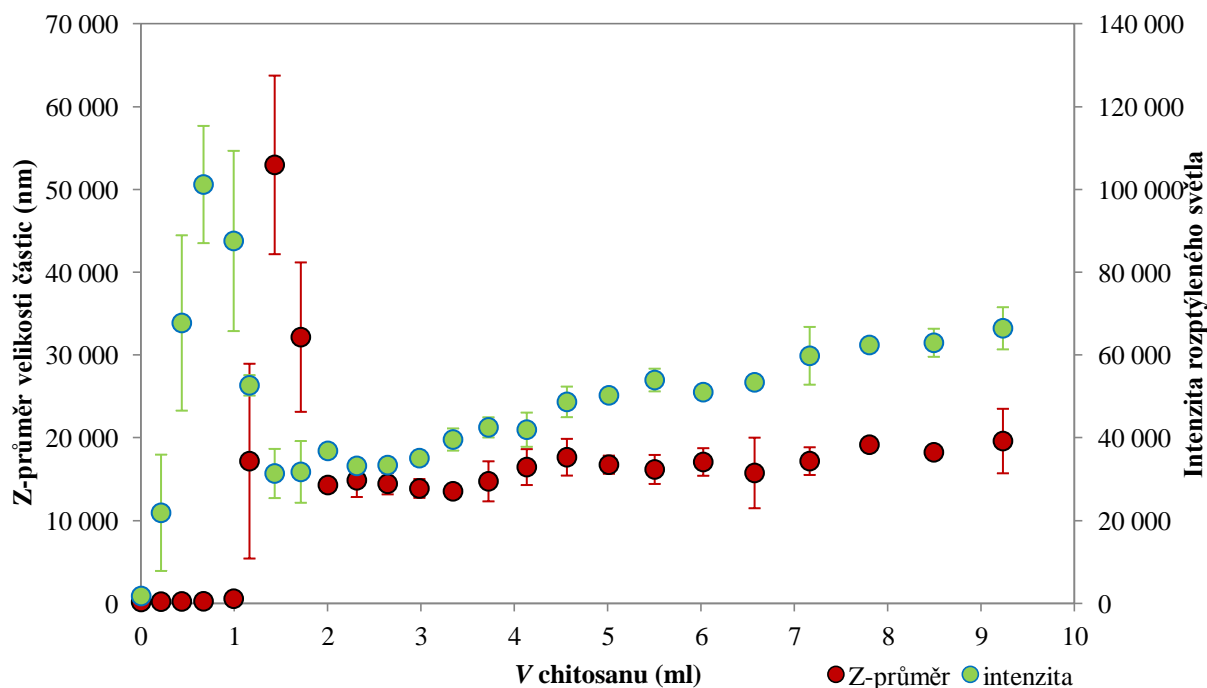
Obr. 18 Koncentrace 1 %, závislost velikosti částic a intenzity rozptýleného světla na přidavku chitosanu

U vzorku o koncentraci 1 % již vidíme výrazný vzestup Z-průměru velikosti částic při objemu přidaného chitosanu 2,5 ml (na 10 ml lignohumátu). S hodnotami Z-průměru zhruba koreluje i intenzita rozptýleného světla. Můžeme usoudit, že při 2 ml objemu přidaného chitosanu začalo docházet k výraznější komplexaci a vzniku agregátů.



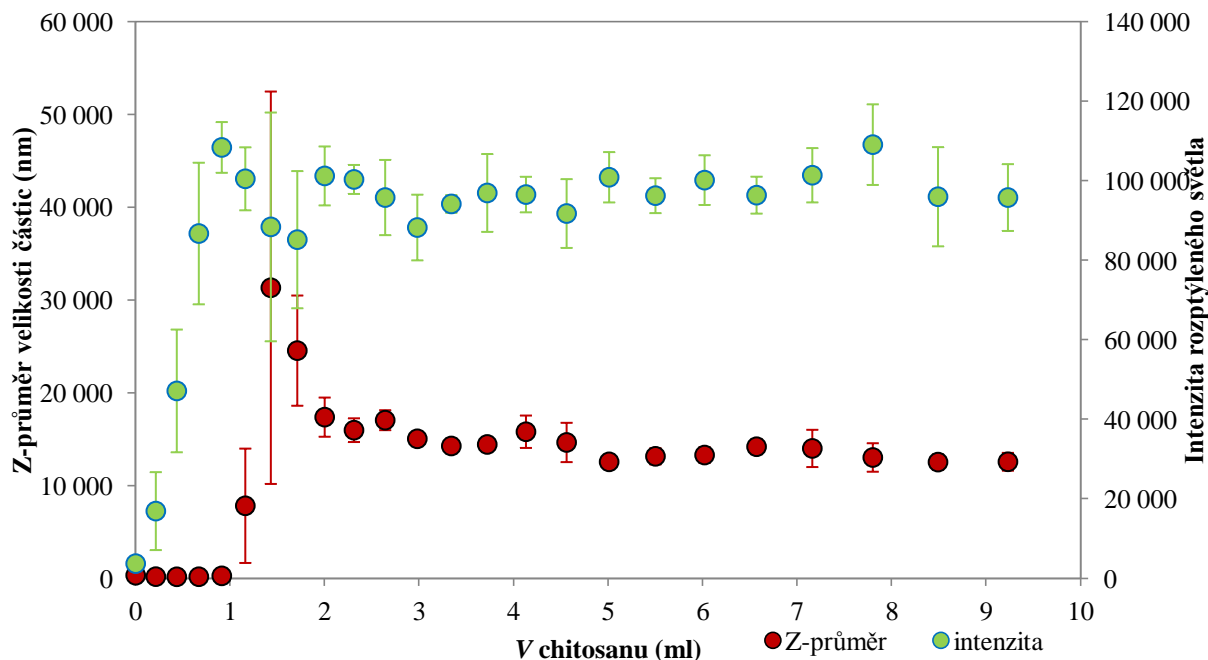
Obr. 19 Koncentrace 0,5 %, závislost velikosti částic a intenzity rozptýleného světla na přidavku chitosanu

Na Obr. 19 je graf Z-průměru velikosti částic a intenzity rozptýleného světla v závislosti na objemu přidaného chitosanu pro koncentraci 0,5 %. Zhruba u 1 ml přidaného chitosanu začíná prudký vzrůst Z-průměru velikosti částic až na hodnotu okolo 40 000 nm. Při tomto nárůstu velikosti částic logicky klesá intenzita rozptýleného světla.



Obr. 20 Koncentrace 0,25 %, závislost velikosti částic a intenzity rozptýleného světla na přídavku chitosanu

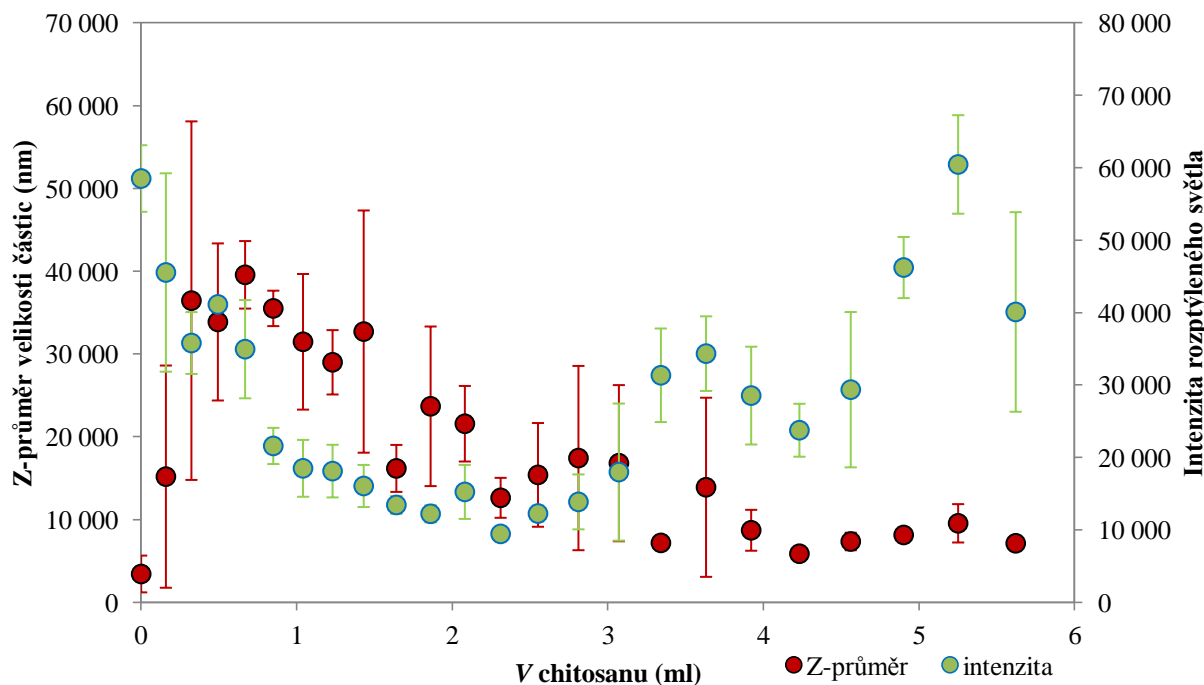
Při titraci roztoku lignohumátu chitosanem o koncentraci 0,25 % vidíme vznik agregátů při objemu přidaného chitosanu zhruba 1 ml. Předpokládáme, že je prudký pokles Z-průměru částic způsoben sedimentací ve zkumavce. Také vidíme, že při vzrůstu intenzity rozptýleného světla a Z-průměru velikosti částic dochází i ke zvětšování směrodatné odchylky.



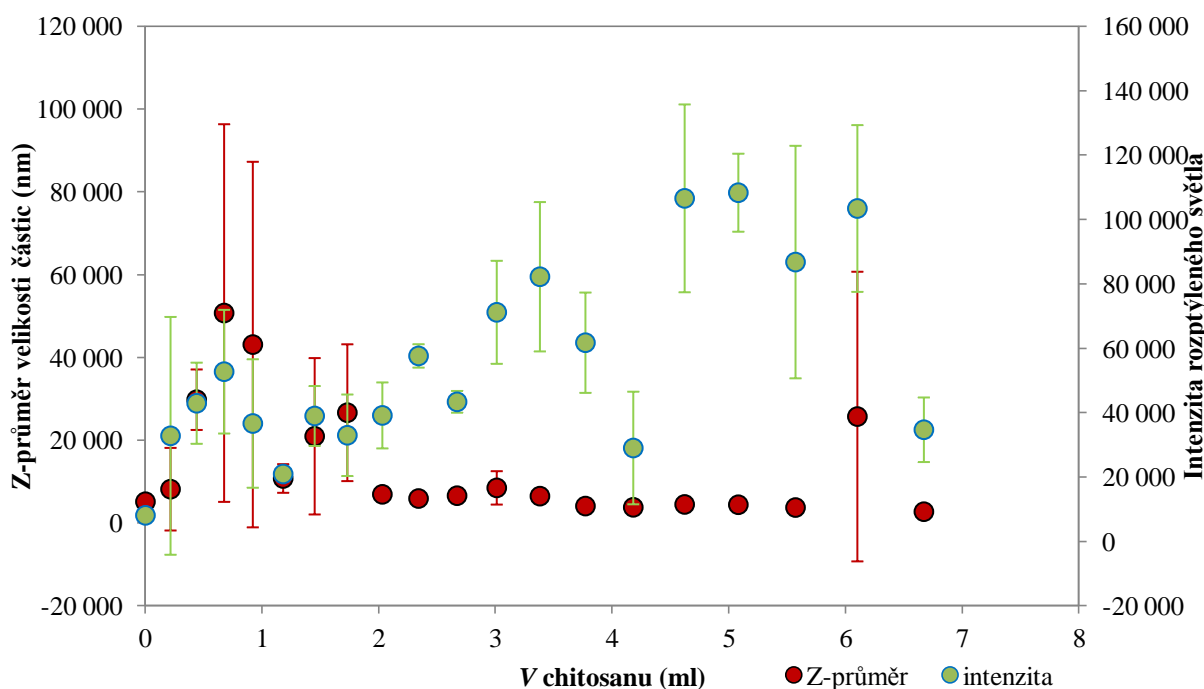
Obr. 21 Koncentrace 0,1 %, závislost velikosti částic a intenzity rozptýleného světla na přidavku chitosanu

Měření 0,1% vzorků ukázalo na obdobný trend jako u předchozích měření. V první třetině měření opět došlo k prudkému vzrůstu Z-průměru velikosti částic a mírnému poklesu intenzity rozptýleného světla. Toto měření vykazuje nejvyšší hodnoty intenzity rozptýleného světla. U nejvyšší hodnoty Z-průměru velikosti částic vidíme největší směrodatnou odchylku. Toto by mohlo být způsobeno postupným zvětšováním komplexů mezi jednotlivými měřeními (vzorek byl mezi měřeními promíchán a znovu nasán do průtočné kyvety.)

Grafy posledních dvou měření (0,05 % a 0,01 %) naznačují, že měření již probíhalo chaotičtěji a s většími směrodatnými odchylkami, ale přesto lze z grafů vyčíst, ve kterém bodě titrace dochází k největšímu nárůstu velikosti částic. U titrace 0,05 % roztoku zřejmě začala agregace hned druhým přidavkem chitosanu. Poté docházelo k mírnému poklesu Z-průměru velikosti a mírnému nárůstu intenzity rozptýleného světla. Titrace 0,01 % vzorku lignohumátu chitosanem také ukazuje nárůst velikosti částic u prvních přidavků. Toto měření je zajímavé tím, že hodnoty intenzity rozptýleného světla silně kolísají. To by mohlo být způsobeno velkou polydisperzitou systému.



Obr. 22 Koncentrace 0,05 %, závislost velikosti částic a intenzity rozptýleného světla na přidavku chitosanu



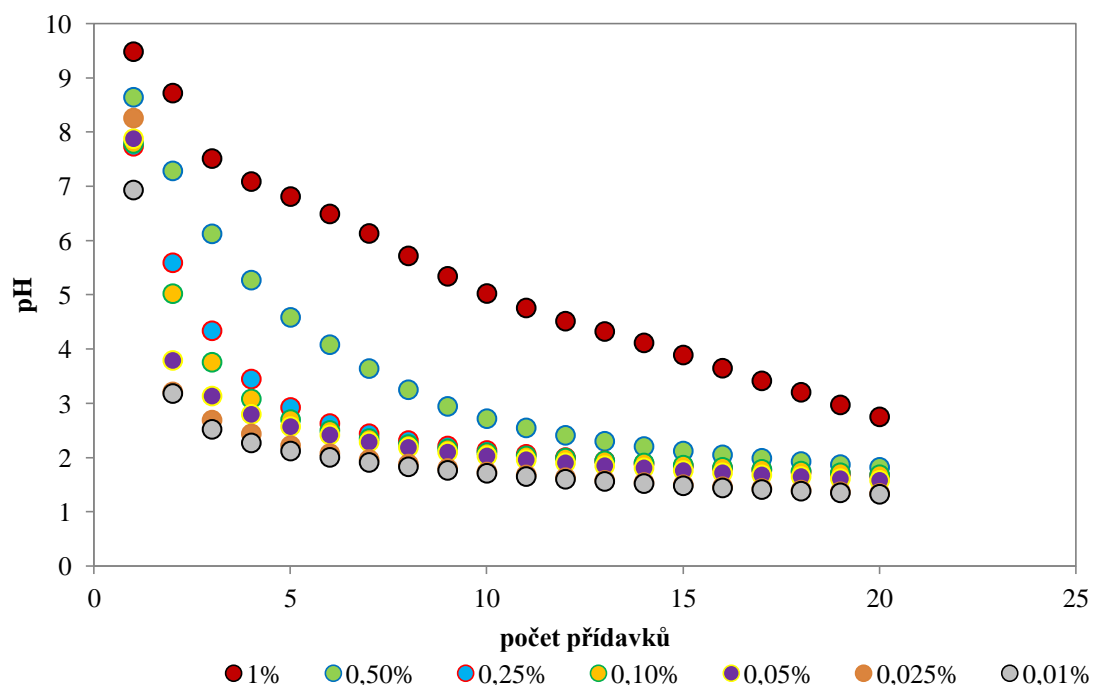
Obr. 23 Koncentrace 0,01 %, závislost velikosti částic a intenzity rozptýleného světla na přidavku chitosanu

Výsledky měření Z-průměru vizuálně vykazují trend tvorby komplexů při prvních přidavcích chitosanu do lignohumátu. Pro názorné porovnání byly vypočítány poměry objemu přidavku chitosanu při tvorbě největších částic k celkovému objemu. Byly získány podobné

poměry v rozmezí 0,8 – 0,9. Výsledky shrnuje Tabulka 3 . Obdobný trend u měření ITC nebyl zjištěn. Bylo prokázáno, že vznik komplexů se liší vlivem směru přidavku (viz fotografie v příloze) a měření oběma metodami probíhala přesně opačným směrem přidavku.

Tabulka 3

koncentrace	2 %	1 %	0,5 %	0,25 %	0,1 %	0,05 %	0,01 %
$\frac{V_{CH}}{V_{CH} + V_{LH}}$	0,84	0,80	0,85	0,87	0,87	0,94	0,94



Obr. 24 Průběh změny pH při titracích lignohumátu chitosanem o různých koncentracích

Během měření Z-průměru velikosti částic a intenzity rozptýleného světla byly zaznamenávány také hodnoty pH. Vzorky chitosanu byly připravovány v kyselém prostředí, takže je logické, že během měření docházelo k poklesu pH. To shrnuje graf na Obr. 24. Z grafu také můžeme vyčíst, že roztoky lignohumátu byly zásadité. Roztok o nejvyšší koncentraci měl na začátku měření nejvyšší pH, a to se mění po celou dobu experimentu. Ostatní vzorky vykazují daleko rychlejší pokles pH v první polovině experimentu a pak jsou hodnoty pH téměř konstantní.

7 ZÁVĚR

Cílem této bakalářské práce bylo otestovat vhodné metody termické a strukturní analýzy pro studium polyelektrolytových komplexů připravených kombinací chitosanu a huminových kyselin. Jako metoda termické analýzy byla zvolena izotermická titrační kalorimetrie a jako metoda strukturní analýzy byla zvolena metoda dynamického rozptylu světla. Základ práce tvoří teoretická část, která shrnuje vlastnosti a využití huminových kyselin a chitosanu a tím poukazuje na výjimečné schopnosti obou látek. Dále shrnuje principy zvolených metod a především se zabývá rešeršní částí, která ukazuje na poznatky z oblasti čím dál více rozšířených polyelektrolytových komplexů na bázi huminových kyselin a chitosanu.

Roztoky lignohumátu byly připraveny rozpuštěním navážky v přečištěné vodě. Roztoky chitosanu byly připraveny rozpuštěním navážky v 0,1M roztoku kyseliny chlorovodíkové.

Měření změn entalpie pomocí izotermické titrační kalorimetrie ukázalo, že míra interakcí klesá spolu s koncentrací použitých vzorků. Pro vzorky vyšších koncentrací (5 %, 4 % a 2 %) byl zvolen titrační poměr chitosanu k lignohumátu 2:1. Od koncentrace 1,5 % níže byl titrační poměr upraven na 1:1.

Pomocí titrací lignohumátu nebo chitosanu vodou byl docela spolehlivě vyloučen vliv vody jako rozpouštědla na tvorbu signálu při kalorimetrickém měření. Signál těchto „blank“ titrací byl vždy významně menší než u titrací chitosanu lignohumátem.

Měření intenzity rozptýleného světla a Z-průměru velikosti částic proběhlo při titraci lignohumátu chitosanem. Měření po každém přidavku proběhlo třikrát. U všech titrací jednoznačně došlo ke komplexaci a tvorbě agregátů polyelektrolytových komplexů, většinou se tak dělo v první polovině měření. Čím menší koncentrace byla zkoumána, tím dříve k prudkému nárůstu Z-průměru velikosti částic došlo.

Z výsledků obou metod bylo usouzeno, že k tvorbě komplexů opravdu dochází a interakce se dějí mezi chitosanem a lignohumátem. Optimálními koncentracemi pro ITC měření se jeví koncentrace kolem 1 %. Vyšší koncentrace jsou z důvodu vysoké viskozity problémové z hlediska míchání vzorku, u nižších koncentrací zase zřejmě dochází k interakcím nepravidelně a signál je silně rozkolísaný. Důvodem je především velké množství reaktivních skupin lignohumátu, což vytváří velmi složitý systém nejen z termodynamického hlediska. Při práci s takovými látkami je třeba mít na paměti, že v měřicí cele dochází při experimentu k velkému množství interakcí, které neustále mění výsledné chování vzorku – vznik a zánik nových vazeb, hydratace, elektrostatické interakce, difúze, agregace, rozpouštění, atd. U metody DLS jsou také pro zkoumání vhodné roztoky o koncentraci okolo 1 %. Tato metoda pozbývá na přesnosti, pokud vznikají příliš velké agregáty, které brání zaznamenání menších na detektoru. Tento problém by mohl být do budoucna vyřešen vhodným přefiltrováním vzorku chitosanu.

Zkoumání interakcí mezi lignohumátem a chitosanem bylo v této práci prováděno vůbec poprvé a je tedy nutné metody dále optimalizovat. Je nutné vypracovat vhodný postup pro přípravu roztoků chitosanu (např. zahřátí, aby se roztok nemusel míchat přes noc a mohlo být provedeno měření s naprosto čerstvým vzorkem).

Aby bylo možné dále rozvíjet výzkum vzniku polyelektrolytového komplexu na bázi lignohumátu a chitosanu, bude nutné dalšími experimentálními metodami zjistit molekulovou hmotnost obou složek (např. pomocí chromatografických metod.) Znalost molekulových hmotností a případně viskozity vzorků hodně usnadní další bádání.

Dále by bylo vhodné zkoumat míru interakcí, pokud se změní některé parametry – např. molekulová hmotnost chitosanu, pH, iontová síla či přidavek dalších síťovacích činidel. Tato práce splnila své cíle a položila základ dalšímu dlouhodobému výzkumu nových směsných materiálů založených na lignohumátu a chitosanu.

8 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- [1] WEBER, J. Definition of soil organic matter. In: *Humintech* [online]. 1999 [cit. 2014-02-28].
Dostupné z: http://humintech.com/001/articles/article_definition_of_soil_organic_matter.html
- [2] SKOKANOVÁ, M. a K. DERCOVÁ. Humínové kyseliny. Pôvod a štruktúra. *Chemické listy*. Praha: Česká společnost chemická, 2008, č. 102, s. 262-268.
- [3] SAIZ-JIMENEZ, C. The Chemical Structure of Humic Substances: Recent Advances. PICCOLO, Alessandro. *Humic substances in terrestrial ecosystems*. New York: Elsevier, 1996, s. 1-44. ISBN 0444815163.
- [4] MACCARTHY, P. The principles of humic substances. *Soil Science*. 2001, Vol. 166, s. 738-751.
- [5] *Oficiální stránky společnosti Amagro s.r.o.* [online]. 2008 [cit. 2014-03-07].
Dostupné z: <http://www.amagro.com/reach.html>
- [6] ANDREUX, F. Humus in world soils. PICCOLO, A. *Humic substances in terrestrial ecosystems*. New York: Elsevier, 1996, s. 45-100. ISBN 0444815163.
- [7] PITTER, P. *Hydrochemie*. 3. přepr. vyd. Praha: VŠCHT, 1999, 568 s. ISBN 80-708-0340-1.
- [8] MCDONALD, S. et al. Analytical chemistry of freshwater humic substances. *Analytica Chimica Acta*. 2004, Vol. 527, s. 105-124.
- [9] NOVÁK, F. a R. HRABAL. Kvantitativní ¹³C NMR spektroskopie huminových látek. *Chemické listy*. Praha: Česká společnost chemická, 2011, č. 105, s. 752-760.
- [10] Degradation products and chemical structures. STEVENSON, F. *Humus chemistry: genesis, composition, reactions*. 2nd Ed. New York: John Wiley and Sons, 1994. ISBN 0-471-59474-1.
- [11] SCHULTEN, H. a P. LEINWEBER. Characterization of humic and soil particles by analytical pyrolysis and computer modeling. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*. 1996, Vol. 38, s. 1-53.
- [12] TYL, P. et al. ICS AS ČR, Technical report. *Tvorba ontologie huminových látek*. 2010. Dostupné z: <http://www.ihss-cz.cz>
- [13] Electrochemical and ion-exchange properties. STEVENSON, F. *Humus chemistry: genesis, composition, reactions*. 2nd Ed. New York: John Wiley and Sons, 1994. ISBN 0-471-59474-1.
- [14] *Oficiální stránky společnosti Humintech* [online]. [cit. 2014-03-27]. Dostupné z: <http://humintech.com/001/agriculture/information/general.html>
- [15] PENA-MÉNDEZ, E. M., J. HAVEL a J. PATOČKA. Humic substances - compounds of still unknown structure: applications in agriculture, industry, environment, and biomedicine. *Journal of applied biomedicine*. České Budějovice: University of South Bohemia in České Budějovice, 2005, č. 3, s. 13-24.
- [16] Wastewater treatment. *Humintech* [online]. [cit. 2014-03-27]. Dostupné z: http://humintech.com/001/environment/applications/wastewater_treatment.html
- [17] KLÖCKING, R., B. HELBIG, A. STEINBÜCHEL a M. HOFRICHTER. Humic Substances, Medical Aspects and Applications of. *Biopolymers Online*. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH, 2005-01-15.
- [18] MERZENDORFER, H. Chitin. GABIUS, H. *The sugar code: fundamentals of glycosciences*. Weinheim: Wiley-VCH, 2008. ISBN: 9783527320899.

- [19] RAVI, K. A review of chitin and chitosan applications. *Reactive and Functional Polymers*. 2000, Vol. 46, issue 1, s. 1-27. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com>
- [20] DASH, M., F. CHIellini, R.M. OTTENBRITE a E. CHIellini. Chitosan—A versatile semi-synthetic polymer in biomedical applications. *Progress in Polymer Science*. 2011, Vol. 36, issue 8, s. 981-1014.
- [21] Oficiální stránky společnosti Sigma-Aldrich ®. [online]. [cit. 2014-04-01]. Dostupné z: <http://www.sigmaaldrich.com/materials-science/material-science-products.html?TablePage=108668634>
- [22] YANG, T. Chitin-based Materials in Tissue Engineering: Applications in Soft Tissue and Epithelial Organ. *International Journal of Molecular Sciences*. 2011, Vol. 12, issue 12, s. 235-242.
- [23] SUNTORNSUK, W, P POCHANAVANICH a L SUNTORNSUK. Fungal chitosan production on food processing by-products. *Process Biochemistry*. 2002, Vol. 37, issue 7, s. 727-729.
- [24] UJITA, M., M. IKE, S. TACHIBANA, G. KITADA, S.M. KIM a Z. INOUE. Characterization of a biofloculant produced by *Citrobacter* sp. TKF04 from acetic and propionic acids. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 2000, Vol. 89, issue 1, s. 40-46.
- [25] NADARAJAH, K., J. KADER, M. MAZMIRA a D.C.PAUL . Production of Chitosan by Fungi. *Pakistan Journal of Biological Sciences*. 2001, Vol. 4, issue 3, s. 263-265.
- [26] JIA, Z. a D. SHEN. Effect of reaction temperature and reaction time on the preparation of low-molecular-weight chitosan using phosphoric acid. *Carbohydrate Polymers*. 2002, Vol. 49, issue 4, s. 393-396.
- [27] KASAAI, M.R., J. ARUL a G. CHARLET. Fragmentation of Chitosan by Acids. *The Scientific World Journal*. 2013, Vol. 2013, s. 109-110.
- [28] LI, J., Y. DU, J. YANG, T. FENG, A. LI a P. CHEN. Preparation and characterisation of low molecular weight chitosan and chito-oligomers by a commercial enzyme. *Polymer Degradation and Stability*. 2005, Vol. 87, issue 3, s. 441-448.
- [29] MUZZARELLI, R.A.A., M. TOMASETTI a P. ILARI. Depolymerization of chitosan with the aid of papain. *Enzyme and Microbial Technology*. 1994, Vol. 16, issue 2, s. 110-114.
- [30] DUTTA, P. K., J. DUTTA a V. S. TRIPATHI. Chitin and chitosan: Chemistry, properties and applications. *Journal of Scientific & Industrial Research*. 2004, Vol. 63, s. 20-31.
- [31] RINAUDO, M., W. KIM a D. TENG. Chitin and chitosan: Properties and applications. *Progress in Polymer Science*. 2006, Vol. 31, issue 7, s. 603-632.
- [32] ILLUM, L. Chitosan and its use as a pharmaceutical excipient. *Pharmaceutical Research*. 1998, Vol. 15, No. 9.
- [33] KHOR, E., L. Y. LIM. Implantable applications of chitin and chitosan. *Biomaterials*. 2003, Vol. 24, issue 13, s. 549-555.
- [34] SHAHIDI, F., J. K.V. ARACHCHI, Y.JEON. Food applications of chitin and chitosans: Chemistry, Production, Applications, and Health Effects. *Trends in Food Science*. 1999, Vol. 10, issue 2, s. 115-128.

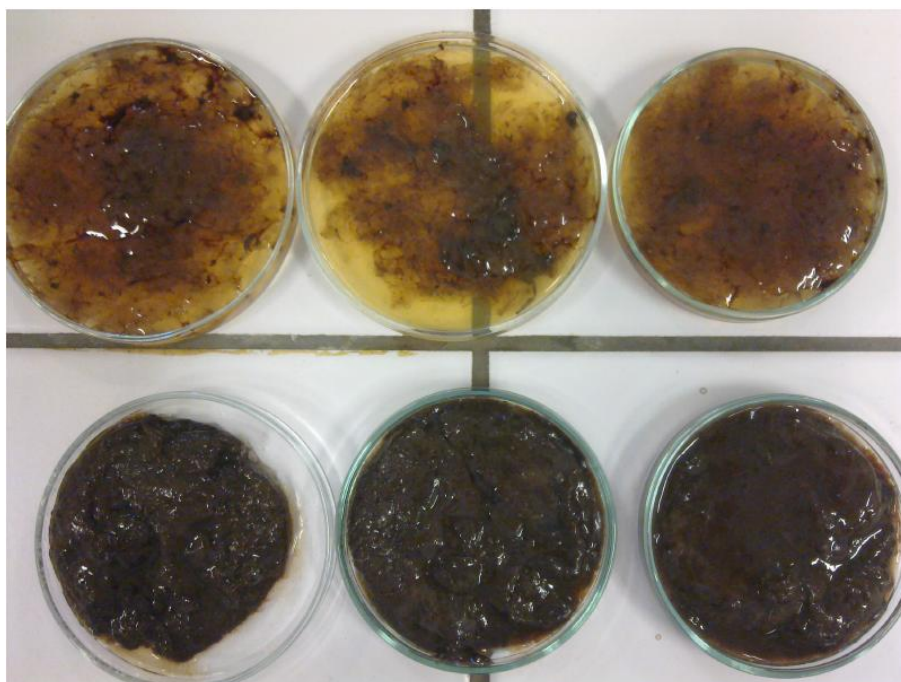
- [35] VAVŘÍKOVÁ, E. a J. VINŠOVÁ. Chitosan a jeho farmaceutické aplikace. *Chemické listy*. 2009, č. 103, s. 56-65.
- [36] MATHUR, N.K. a C.K. NARANG. Chitin and chitosan, versatile polysaccharides from marine animals. *Journal of Chemical Education*. 1990, Vol. 67, issue 11, s. 526-532.
- [37] BARTOVSKÁ, L. a M. ŠIŠKOVÁ. *Co je co v povrchové a koloidní chemii* [online]. 2005 [cit. 2014-04-03]. Dostupné z: http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid_es-001/ebook.copyright.htm
- [38] MACCARTHY, P. THE PRINCIPLES OF HUMIC SUBSTANCES. *Soil Science*. 2001, Vol. 166, issue 11, s. 738-751.
- [39] PÉDROT, M., A.e DIA a M. DAVRANCHE. Dynamic structure of humic substances: Rare earth elements as a fingerprint. *Journal of Colloid and Interface Science*. 2010, Vol. 345, issue 2, s. 206-213.
- [40] PICCOLO, A. THE SUPRAMOLECULAR STRUCTURE OF HUMIC SUBSTANCES. *Soil Science*. 2001, Vol. 166, issue 11, s. 810-832.
- [41] DASH, M., F. CHIPELLINI, R.M. OTTENBRITE a E. CHIPELLINI. Chitosan—A versatile semi-synthetic polymer in biomedical applications. *Progress in Polymer Science*. 2011, Vol. 8.
- [42] HAINES, P. *Principles of thermal analysis and calorimetry*. The Royal Society of Chemistry, 2002, 220 s. ISBN 08-540-4610-0.
- [43] Stanovení termodynamických dat pomocí titrační kalorimetrie. In: ŘEHÁK, Karel. *Ústav fyzikální chemie VŠCHT Praha* [online]. 2007 [cit. 2014-04-03]. Dostupné z: <http://www.vscht.cz/fch/cz/vyuka/ITC.pdf>
- [44] SCHMIDTCHEN, F. P. Isothermal Titration Calorimetry in Supramolecular Chemistry. *Analytical methods in supramolecular chemistry*. 2nd completely rev. and enlarged ed. Weinheim: Wiley-VCH, 2012. ISBN 978-3-527-32982-3.
- [45] LEAVITT, S. a E. FREIRE.. Direct measurement of protein binding energetics by isothermal titration calorimetry. *Current Opinion in Structural Biology*. 2001, Vol. 11, issue 5, s. 123-149.
- [46] KVÍTEK, L. *Metody studia koloidních soustav*. Katedra fyzikální chemie PřF UP Olomouc, 2006.
- [47] JACKSON, K. Dynamický rozptyl světla – co, jak, proč?. *CHEMagazín*. 2007, XVII., Číslo 1.
- [48] MALVERN INSTRUMENTS LTD. *Dynamic Light Scattering: An Introduction in 30 Minutes*. Worcestershire, United Kingdom, 2014. Technical note.
- [49] MALVERN INSTRUMENTS LTD. *Zetasizer Nano: Příručka pro uživatele*. Worcestershire, United Kingdom, 2007.
- [50] MALVERN INSTRUMENTS LTD. *MPT-2 Autotitrator: User manual*. Worcestershire, United Kingdom, 2007.
- [51] LUO, Y. a Q. WANG. Recent development of chitosan-based polyelectrolyte complexes with natural polysaccharides for drug delivery. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2014, Vol. 64.
- [52] FREDHEIM, G. E. a B. E. CHRISTENSEN. Polyelectrolyte complexes: Interactions between Lignosulfonate and Chitosan. *Biomacromolecules*. 2003, Vol. 4, s. 232-239.
- [53] ZHANG, X. a R. BAI. Mechanism and kinetics of humic acid adsorption onto chitosan-coated granules. *Journal of Colloid and Interface Science*. 2003, Vol. 264, s. 30-38.
- [54] YAN, W.L. a R. BAI. Adsorption of lead and humic acid on chitosan hydrogel beads. *Water Research*. 2005, Vol. 39, s. 688-698.

- [55] BRATSKAYA, S., S. SCHWARZ a D. CHERVONETSKY. Comparative study of humic acids flocculation with chitosan hydrochloride and chitosan glutamate. *Water Research*. 2004, Vol. 38.
- [56] ZHAO, L. et al Adsorption of humic acid from aqueous solution onto irradiation-crosslinked carboxymethylchitosan. *Bioresource Technology*. 2008, Vol. 99, s. 1911-1917.
- [57] LIU, J., Q. WANG a A. WANG. Synthesis and characterization of chitosan-g-poly(acrylic acid)/sodium humate superabsorbent. *Carbohydrate Polymers*. 2007, Vol. 70.
- [58] WAN NGAH, W.S., S. FATINATHAN a N.A. YOSOP. Isotherm and kinetic studies on the adsorption of humic acid onto chitosan-H₂SO₄ beads. *Desalination*. 2011, Vol. 272, s. 293-300.
- [59] HAVELCOVÁ, M., J. MIZERA, V. MACHOVIČ, O. PŘIBYL, L. BORECKÁ a I. KRAUSOVÁ. Sorbenty na bázi huminových látek a chitosanu. *Chemické Listy*. 2011, Vol. 105, s. 913-917.
- [60] DONG, Ch., W. CHEN a Ch. LIU. Preparation of novel magnetic chitosan nanoparticle and its application for removal of humic acid from aqueous solution. *Applied Surface Science*. 2014, Vol. 292, s. 1067-1076.
- [61] SEDLÁČEK, P. *Hydrogely huminových kyselin - experimentální model i aplikační forma*. 2009. Dizertační práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická.
- [62] TÜRKEOVÁ, I. *Kalorimetrická studie interakcí huminových látek s kovovými ionty*. 2013. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická.
- [63] KJONIKSEN, A., Ch. IVERSEN, B. NYSTRÖM, T. NAKKEN a O. PALMGREN. Light Scattering Study of Semidilute Aqueous Systems of Chitosan and Hydrophobically Modified Chitosans. *Macromolecules*. 1998, Vol. 31, s. 8142-8148.
- [64] PA, J. a T. LEON YU. Light Scattering Study of Chitosan in Acetic Acid Aqueous Solutions. *Macromolecular Chemistry and Physics*. 2001, Vol. 202, s. 985-991.
- [65] PALMER, N. E. a R. VON WANDRUSZKA. Dynamic light scattering measurements of particle size development in aqueous humic materials. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*. 2001, Vol. 371, s. 951-954.
- [66] ALATORRE-MEDA, M., P. TABOADA, J. SABÍN, B. KRAJEWSKA, L.M. VARELA a J.R. RODRÍGUEZ. DNA-chitosan complexation: A dynamic light scattering study. *Colloids and Surfaces: Physicochemical and Engineering Aspects*. 2009, Vol. 339, s. 145-152.
- [67] TAN, W. F., L. K. KOOPAL a W. NORDE. Interaction between Humic Acid and Lysozyme, Studied by Dynamic Light Scattering and Isothermal Titration Calorimetry. *Environmental Science & Technology*. 2009, Vol. 43, s. 591-596.

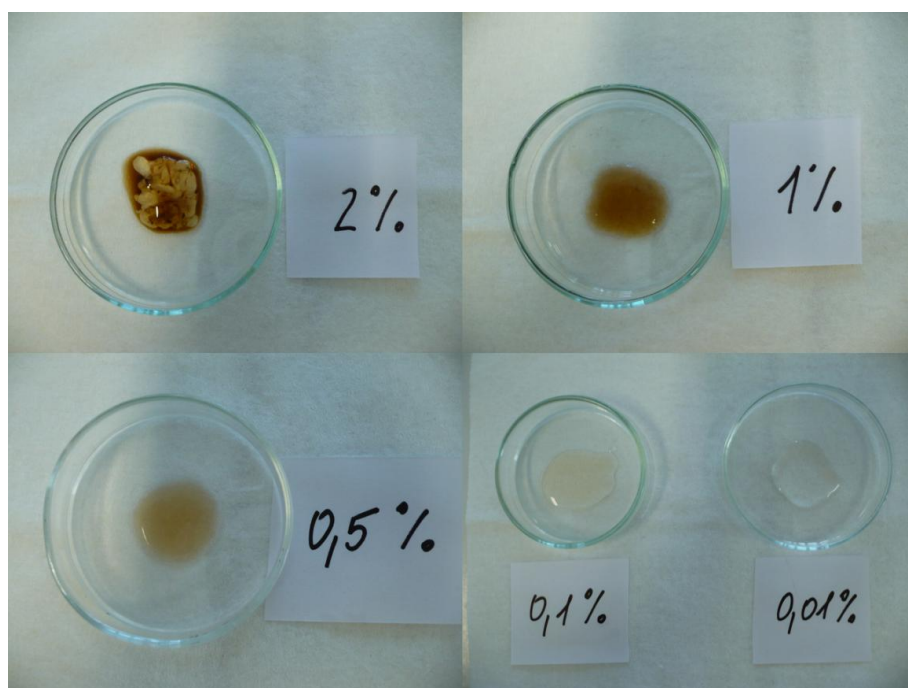
9 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

HL	humínové látky
FK	fulvíkové kyseliny
HK	humínové kyseliny
DOC	rozpuštěný organický uhlík
LMW	nízká molekulová hmotnost
MMW	střední molekulová hmotnost
HMW	vysoká molekulová hmotnost
PEC	polyelektrolytový komplex
ITC	izotermická titrační kalorimetrie
DLS	dynamický rozptyl světla
XPS	rentgenová fotoelektronová spektroskopie

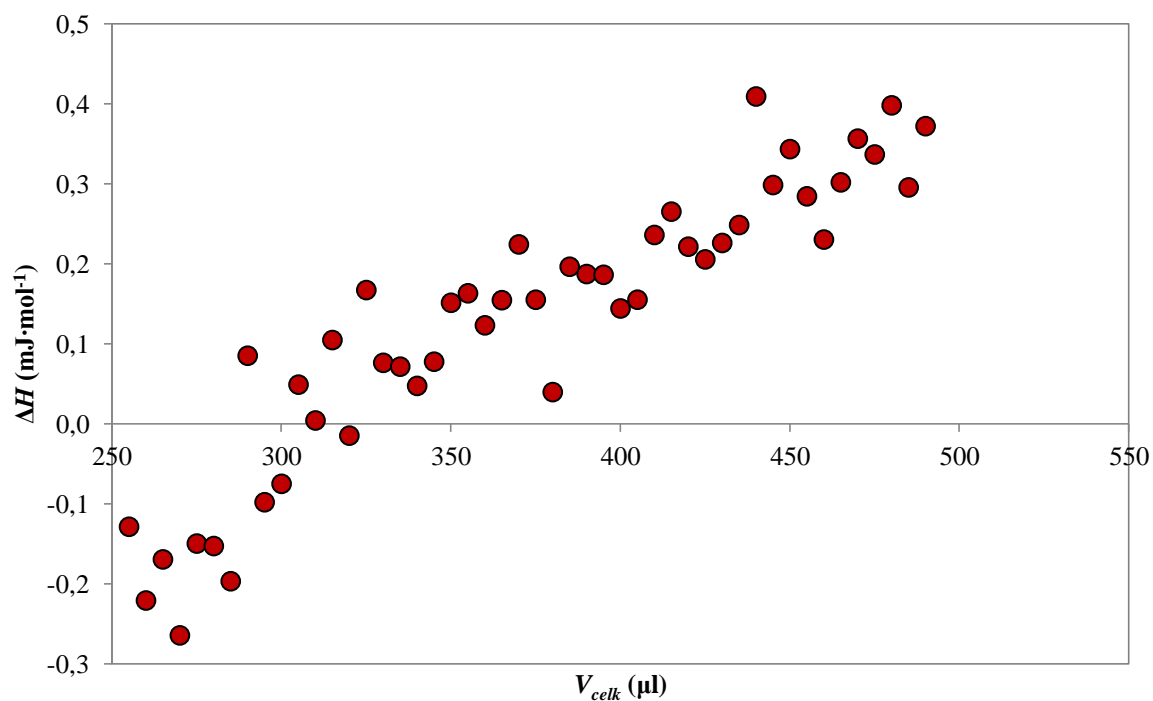
10 PŘÍLOHY



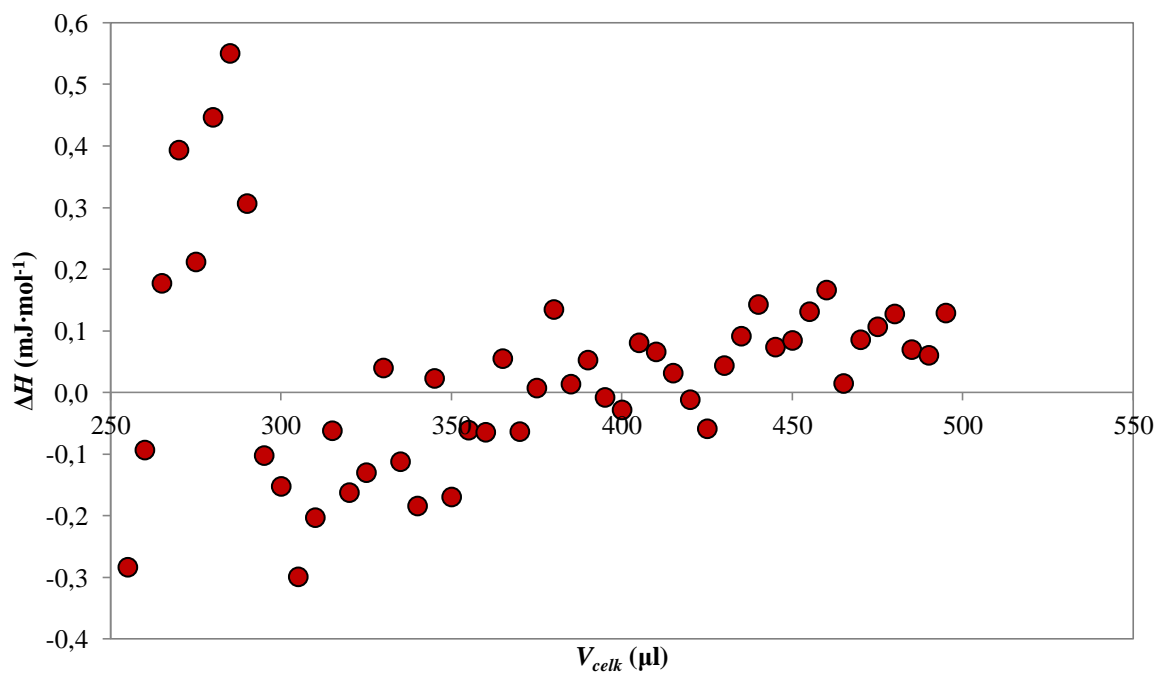
Obr. 25 Gely vzniklé z lignohumátu a chitosanu, koncentrace 2 %. LH do CH (horní řada), CH do LH (spodní řada)



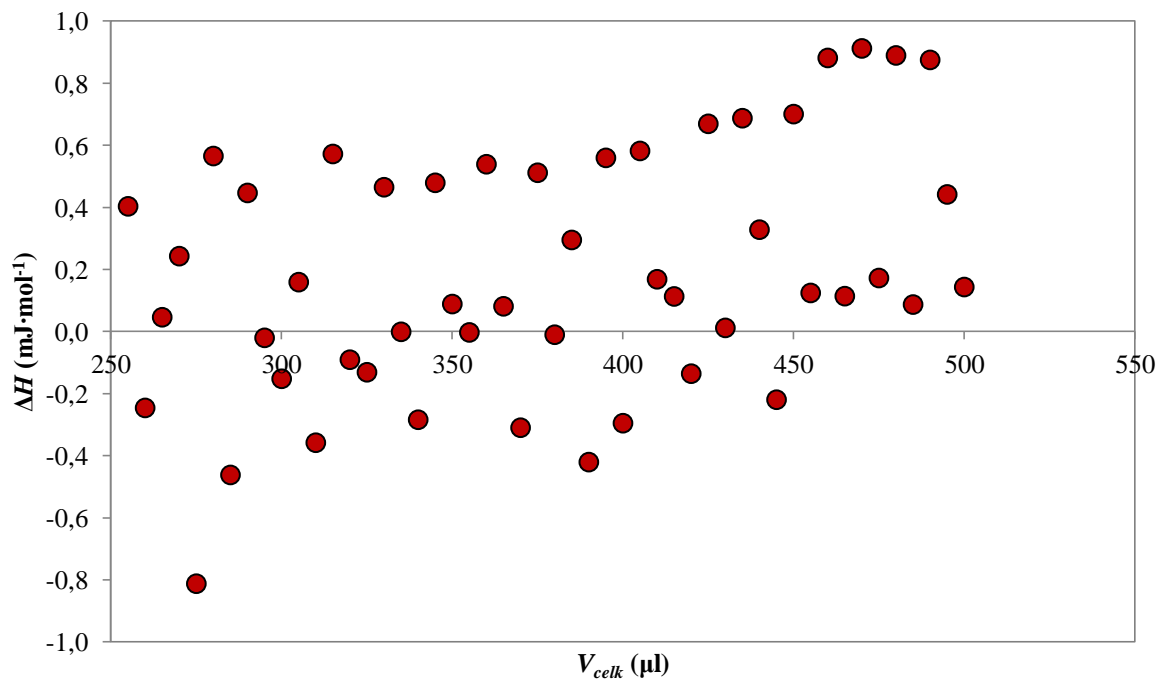
Obr. 26 Ukázka vzniklých komplexů LH a CH o různých koncentracích



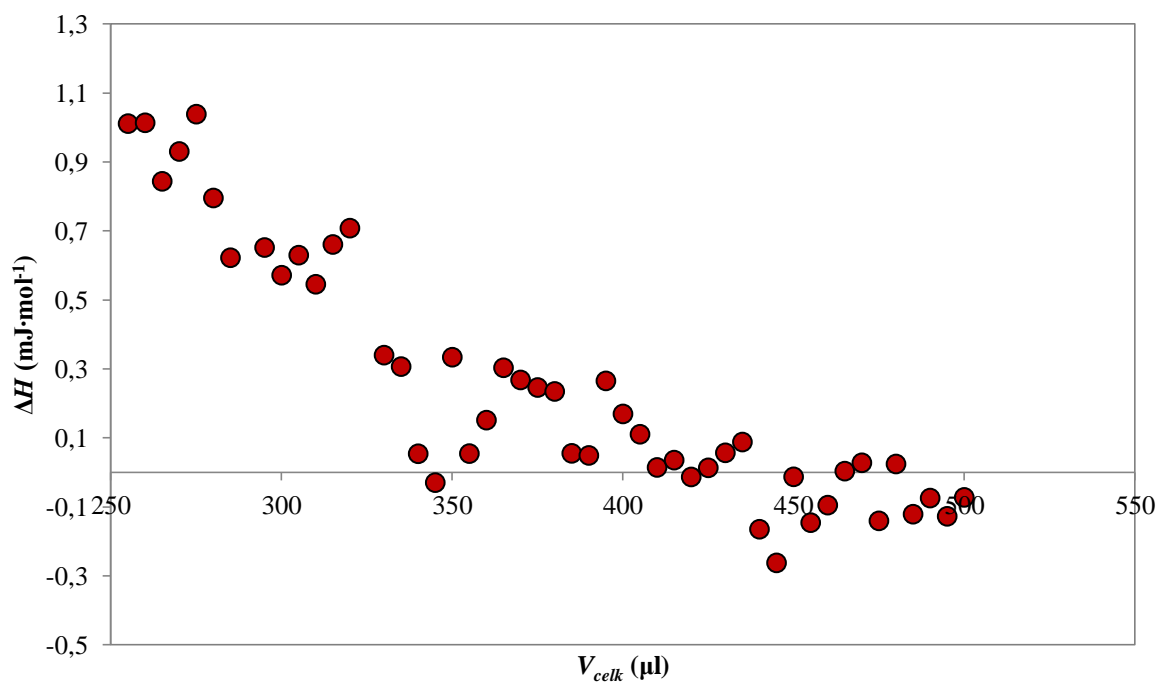
Obr. 27 Průběh titrace chitosanu lignohumátem o koncentraci 1,5 % (poměr 1:1)



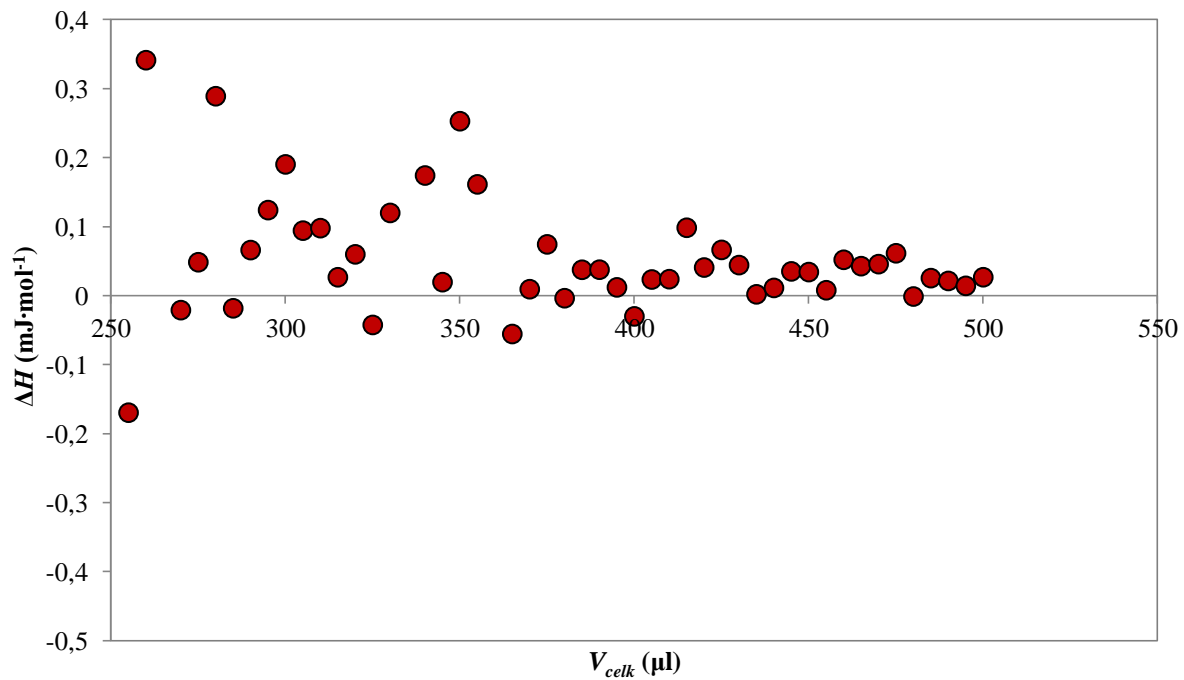
Obr. 28 Průběh titrace chitosanu lignohumátem o koncentraci 1 %



Obr. 29 Průběh titrace chitosanu lignohumátem o koncentraci 0,5 %



Obr. 30 Průběh titrace chitosanu lignohumátem o koncentraci 0,25 %



Obr. 31 Průběh titrace chitosanu lignohumátem o koncentraci 0,1 %