



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

STRUKTURNÍ A TERMODYNAMICKÉ ASPEKTY INTERAKCÍ BIOPOLYMERŮ S ORGANICKÝMI IONTY

STRUCTURAL AND THERMODYNAMIC ASPECTS OF INTERACTIONS BETWEEN BIOPOLYMERS AND ORGANIC IONS

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Jan Rybárik

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. Petr Sedláček, Ph.D.

BRNO 2017

Zadání diplomové práce

Číslo práce: FCH-DIP0949/2015
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie
Student: **Bc. Jan Rybářík**
Studijní program: Spotřební chemie
Studijní obor: Spotřební chemie
Vedoucí práce: **Ing. Petr Sedláček, Ph.D.**
Akademický rok: 2016/17

Název diplomové práce:

Strukturní a termodynamické aspekty interakcí biopolymerů s organickými ionty

Zadání diplomové práce:

1. Zpracovat literární rešerši na téma metod studia polyelektrolytových biopolymerů s iontovými sloučeninami (zapojení jednotlivých strukturních motivů, metody studia).
2. Na základě literární rešerše zvolit vhodnou modelovou kombinaci biopolymeru a iontové sondy a vhodné metody studia jejich vzájemné interakce.
3. Navrhnout a realizovat sérii experimentů zaměřenou na interakce vybraného biopolymeru s modelovým iontem, stanovit vybrané termodynamické parametry těchto interakcí a prostudovat zapojení klíčových funkčních skupin při těchto interakcích.

Termín odevzdání diplomové práce: 5.5.2017

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

Bc. Jan Rybářík
student(ka)

Ing. Petr Sedláček, Ph.D.
vedoucí práce

prof. Ing. Miloš Pekař, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2017

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

ABSTRAKT

Diplomová práce se zabývá studiem termodynamických a strukturních aspektů při interakcích huminových kyselin s iontovými organickými sloučeninami. Jako modelový organický iont bylo použito barvivo methylenová modř. Interakce byly studovány pomocí izotermické titrační kalorimetrie, rozpouštěcí kalorimetrie a metodou difúze v difúzních celách.

ABSTRACT

This master thesis deals with the study of thermodynamic and structural aspects of the interactions of humic acids with organic ions. Methylene blue (dye) was used as a model organic ion. The interactions were studied by isothermal titration calorimetry, dissolution calorimetry and by diffusion in diffusion cells.

KLÍČOVÁ SLOVA

Huminové látky, difúzní cely, izotermická titrační kalorimetrie, rozpouštěcí kalorimetrie, methylenová modř, iontové sloučeniny, dialýza, difúze.

KEYWORDS

Humic substances, diffusion cells, isothermal titration calorimetry, dissolution calorimetry, methylene blue, ionic compounds, dialysis, diffusion.

RYBÁRIK, J. Strukturální a termodynamické aspekty interakcí biopolymerů s organickými ionty. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2017, 66 s. Vedoucí diplomové práce Ing. Petr Sedláček, Ph.D.

PROHLÁŠENÍ

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

.....
podpis studenta

PODĚKOVÁNÍ

Rád bych poděkoval vedoucímu své diplomové práce Ing. Petru Sedláčkovi, Ph.D. za jeho čas, ochotu a cenné rady, které daly vznik této práci. Dále bych rád poděkoval Ing. Jitce Krouské za velkou pomoc při měření experimentální části mé diplomové práce. Nesmím opomenout velký dík mé rodině, drahé polovičce a přátelům za velkou podporu při studiu.

OBSAH

1	Úvod	8
2	Cíl práce	9
3	Teoretická část	10
3.1	Huminové látky	10
3.2	Dělení huminových látek	10
3.2.1	Fulvinové kyseliny	11
3.2.2	Huminové kyseliny	11
3.2.3	Huminy	12
3.3	Složení a struktura huminových látek	13
3.4	Původ huminových látek	15
3.4.1	Degradační teorie (ligninová teorie)	15
3.4.2	Syntetická teorie	16
3.5	Historie a aplikace huminových látek	17
3.5.1	Zemědělská aplikace	17
3.5.2	Průmyslová aplikace	18
3.5.3	Environmentální aplikace	18
3.6	Reaktivita huminových kyselin	18
3.7	Interakce huminových kyselin s iontovými organickými sloučeninami	19
3.7.1	Interakce s barvivy	19
3.7.2	Reakce s pesticidy a herbicidy	20
3.8	Vybrané metody analýzy interakcí huminových látek s iontovými sloučeninami	21
3.8.1	Izotermická titrační kalorimetrie	21
3.8.2	Rozpouštěcí kalorimetrie	23
3.8.3	Membránové procesy	24
3.8.3.1	Molekulová difúze a dialýza	24
4	Současný stav řešené problematiky	27
4.1	Interakce huminových kyselin s iontovými organickými sloučeninami	27
4.1.1	Interakce s barvivy	27
4.1.2	Interakce s pesticidy a herbicidy	30
4.2	Vliv imobilizovaných huminových kyselin na adsorpci různých látek	32
5	Experimentální část	35
5.1	Použité chemikálie a spotřební materiál	35
5.2	Použité přístroje	35

5.3	Extrakce huminových kyselin z lignitu	35
5.4	Selektivní methylace huminových kyselin	36
5.5	Příprava roztoků pro měření	37
5.5.1	Fosfátový pufr	37
5.5.1.1	Příprava fosfátového pufru	37
5.5.2	Roztoky huminových kyselin	37
5.5.2.1	Příprava roztoků pro ITC experimenty	37
5.5.2.2	Příprava roztoků pro SolCal experimenty	38
5.5.2.3	Příprava roztoků pro difúzní experimenty	38
5.5.3	Roztoky methylenové modře	39
5.5.3.1	Příprava roztoků pro difúzní experimenty	39
5.5.3.2	Příprava roztoků pro kalibrační řadu methylenové modři	39
5.6	Charakterizace huminových kyselin	40
5.6.1	FT-IR	40
5.6.2	TGA analýza	40
5.7	Kalorimetrické experimenty	41
5.7.1	Postup měření izotermické titrační kalorimetrie (ITC)	41
5.7.2	Parametry měření	41
5.7.3	Postup měření rozpouštěcí kalorimetrie (SolCal)	42
5.8	Difúzní experimenty	43
5.8.1	Postup měření	43
4.8.2	Nastavení spektrofotometru (UV-VIS HITACHI U-3900H)	43
6	Výsledky a diskuse	44
6.1	Charakterizace huminových kyselin	44
6.1.1	FT-IR spektroskopie	44
6.1.2	Termogravimetrická analýza	46
6.2	Kalorimetrické experimenty	48
6.2.1	Izotermická titrační kalorimetrie	48
6.2.2	Izotermická titrační kalorimetrie HK/mHK	48
6.3	Rozpouštěcí kalorimetrie	50
6.4	Difúzní experimenty	51
6.4.1	Optimalizace měření	51
6.4.2	Kalibrační křivka	52
6.4.3	Stanovení zdánlivé rovnovážné konstanty	53
7	Závěr	58

8	Seznam použitých zdrojů	60
9	Seznam zkratek a symbolů	66

1 ÚVOD

Huminové látky představují velice širokou skupinu organických sloučenin, které vznikají postupným rozkladem rostlinných zbytků a živých organismů. Obsahují mnohonásobně více organického uhlíku, než nalézáme v živých organismech. Informace a znalosti o nich jsou stále omezené a nabízí tak příležitost pro další výzkum. Huminové látky jsou důležitou součástí ekosystému, podílí se na samočištění půd, zadržování vody v půdě, pufrací kapacitě půdy a vazbě CO₂ v půdě.

Průmyslová výroba a zemědělství sebou přináší řadu znečištění. Polutanty se dostávají nejen do povrchových a podzemních vod, ale i do půdy a vzduchu, kde si s nimi musí příroda poradit. Je proto důležité, abychom byli obezřetní a pochopili mechanismy, pomocí kterých dochází v přírodě k odbourávání polutantů, které se denně dostávají do životního prostředí.

Týmy z různých koutů světa se zabývají vázáním rozličných látek (sond) na huminové látky. Možnosti interakcí jsou různé: iontová výměna, tvorba vodíkových můstků, coulombické interakce, vodíkové můstky, van der Waalsovy interakce, hydrofobní interakce, aj. Tyto interakce huminových látek se sondou jsou silně ovlivněny fyzikálně-chemickými parametry jako je pH, iontová síla, koncentrace sondy/huminových látek, teplota či rychlost míchání.

Má práce je rozdělena do 3 hlavních oddílů: teoretické seznámení s huminovými látkami, současný stav problematiky a experimentální část.

Experimentální část je zaměřena na měření termodynamických veličin, jako je entalpie a zdánlivá rovnovážná konstanta, která nám pomůže k hlubšímu pochopení interakčního mechanismu huminových kyselin a methylovaných huminových kyselin s organickou sondou, v tomto případě s methylovanou modří. Byly použity kalorimetrické experimenty (rozpuštěcí kalorimetrie, izotermická titrační kalorimetrie a dialýza v difúzních celách).

2 CÍL PRÁCE

Cílem diplomové práce bylo zpracovat literární rešerši na téma interakce biopolymerů (huminových látek) s vhodnou iontovou organickou sloučeninou se zapojením jednotlivých strukturních motivů huminových látek a metod studia. Následně navrhnout a realizovat sérii experimentů analyzující interakce vzorku huminových kyselin s modelovým organickým iontem. Série experimentů byla zaměřena zejména na zapojení vybraných funkčních skupin huminových látek a na stanovení vybraných termodynamických parametrů při těchto interakcích.

3 TEORETICKÁ ČÁST

3.1 Huminové látky

Huminové látky (HL) jsou přírodní organické sloučeniny se supramolekulární strukturou. Patří mezi nejvíce rozšířené sloučeniny světa, které obsahují obrovské množství uhlíku ve své struktuře. Lze je nalézt téměř na jakémkoliv místě ekosystému, kde jsou zastoupeny v odlišných mírách, od stopových množství, až po desítky procent, viz Tabulka 1 - *Přehled zastoupení huminových a fulvinových kyselin v přírodních*. Největší obsah HL nacházíme v oxyhumolitu, rašelině a lignitu.

Obsah huminových látek v těchto materiálech kolísá také v závislosti na místě výskytu. Ve vodě tvoří rozpuštěné huminové látky největší frakci organických látek. Pro zajímavost, přítomnost huminových látek byla prokázána i na Antarktidě, kde jsou odlišné podmínky pro humifikaci ve srovnání s ostatními kontinenty.

Huminové látky se z přírodních látek izolují metodou extrakce a frakcionace za použití kyselých a zásaditých roztoků, jenž byl základ pro zkoumání těchto látek. Díky jejich přírodnímu původu je řadíme mezi obnovitelné zdroje. Jejich vznik je dán chemickým rozkladem organického materiálu či biologickou činností mikroorganismů. Huminové látky v půdě a vodách je třeba chránit, protože je hojně využíváme za účelem ochrany a péče o životní prostředí. [1–5]

Tabulka 1 - Přehled zastoupení huminových a fulvinových kyselin v přírodních zdrojích [4]

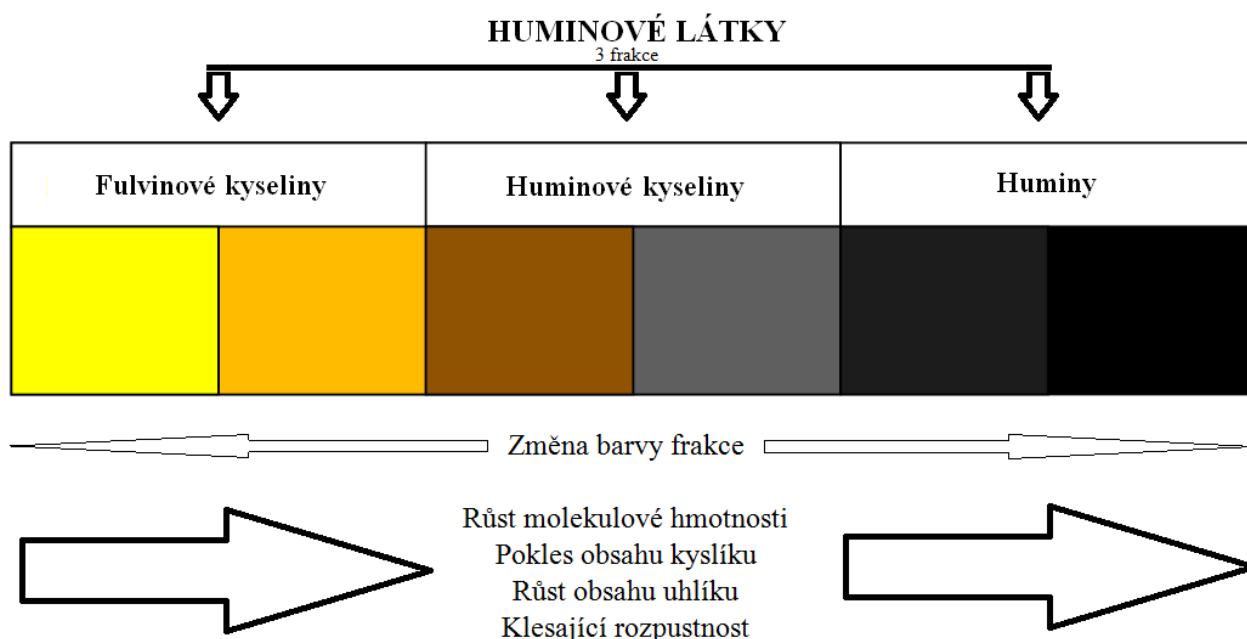
Přírodní materiál	Zastoupení huminových a fulvinových kyselin v hm %
Humát	40–85
Černá rašelina	10–40
Hnědé uhlí	10–30
Hnůj	5–15
Půda	1–5
Černé uhlí	0–1

3.2 Dělení huminových látek

Při klasifikaci huminových látek se nejčastěji vychází z různé rozpustnosti huminových látek ve vodném prostředí o různé hodnotě pH. Nejnámější je dělení do tří frakcí:

- fulvinové kyseliny (FK),
- huminové kyseliny (HK),
- huminy (HU).

Tyto frakce se liší na první pohled barvou, přesto však je jejich chemická struktura velmi podobná. Barevnou rozlišnost frakcí huminových látek je možné vidět na Obrázek 1. [2,4]



Obrázek 1 - Rozdělení frakcí huminových látek (Stevenson 1982) [7,10]

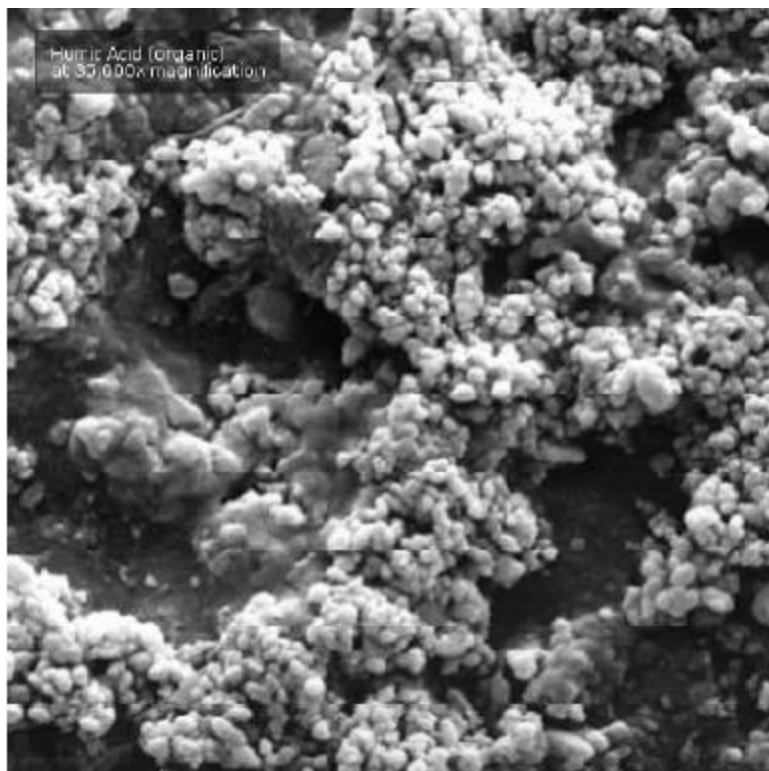
3.2.1 Fulvinové kyseliny

Fulvinové kyseliny jsou frakcí rozpustnou ve vodném prostředí při jakékoliv hodnotě pH. Zůstávají v roztoku po oddělení huminových kyselin okyselením. Fulvinové kyseliny mají odstíny světle žluté až žlutohnědé. Vyznačují se nejnižší molekulovou hmotností ve srovnání s dalšími dvěma frakcemi. [2, 5]

3.2.2 Huminové kyseliny

Huminové kyseliny jsou rozpustné ve zředěných alkalických roztocích, po okyselení roztoku se vysráží. Rozpouští se při vysokých hodnotách pH, ale nerozpouští se v kyselém prostředí (pH = 2). Tato nízká rozpustnost je způsobena protonací karboxylových skupin, což způsobuje vysrážení huminových kyselin z roztoku. Zbarvení HK je tmavě hnědé až černé.

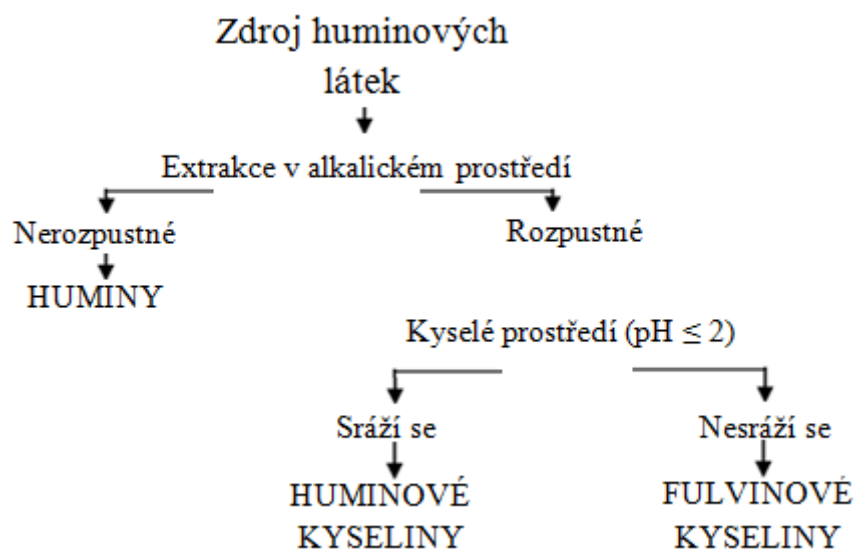
Z fyzikálně-chemického hlediska se huminové kyseliny při rozpouštění se chovají jako hydrofilní supramolekulární koloidní látky s různým stupněm disperzity. Tyto supramolekulární koloidní látky mají záporný náboj a izoelektrický bod leží v kyselé oblasti. Molekulová hmotnost HK je nižší než u huminů a vyšší než u fulvinových kyselin a pohybuje se v rozmezí asi od 2 do 200 kDa. Detail HK na elektronovém skenovacím mikroskopu se zvětšením 35 000x demonstruje Obrázek 2. [2, 3, 5]



Obrázek 2 - Huminová kyselina, zvětšení 35 000x (SEM) [11]

3.2.3 Huminy

Huminy jsou frakcí, která není rozpustná ve vodě za žádných podmínek. Jejich barva je obvykle černá. Přehledné schéma získávání jednotlivých frakcí huminových látek názorně prezentuje Obrázek 3. [2,5]



Obrázek 3 - Schéma chování huminových látek za různého pH [5]

3.3 Složení a struktura huminových látek

Existují dva základní pohledy na huminové látky. Z historického hlediska lze brát huminové látky jako polymer (makromolekulu, polyelektrolyt), což vede ke snadnému pochopení jejich složení a struktury. Dnes popisujeme huminové látky jako supramolekulární agregát. [6,10,12,13]

Molekulová velikost HL se pohybuje v rozmezí od několika stovek po tisíce Da. Mají charakter amorfních látek a při karbonizaci produkují CO₂. Obsahují velké množství vody a v roztoku se chovají jako lyofobní koloidy s velkou sorpční kapacitou. Existence huminových látek je známa již po několik století, ale struktura HL je rozmanitá, ne příliš probádaná a je předmětem zkoumání vědeckých týmů po celém světě. Znalost stavby HL je nutná k pochopení funkce a role těchto látek v půdě. [3,7]

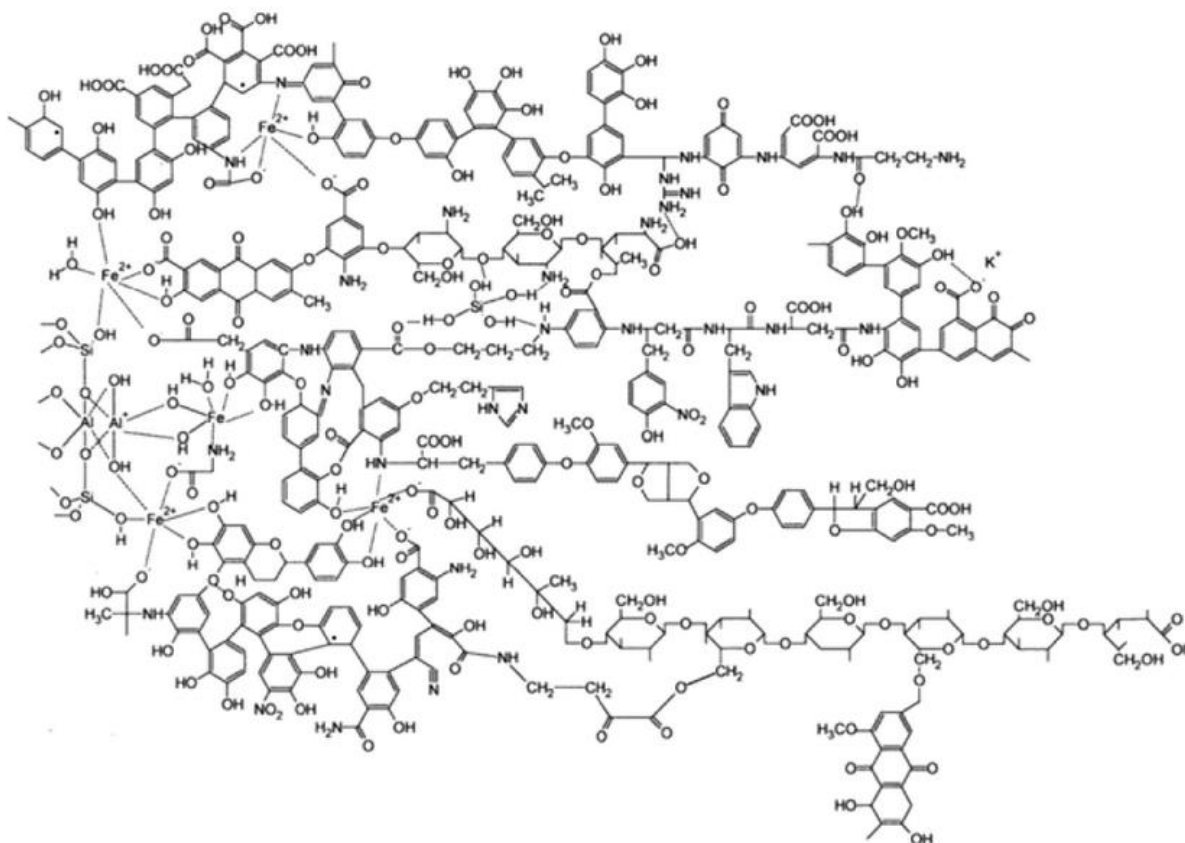
Uhlík a kyslík jsou hlavními prvky v HL. Dalšími prvky nacházející se jejich struktuře jsou vodík, dusík, síra a také fosfor. Jejich procentuální zastoupení se v jednotlivých skupinách HL liší. Souhrnně však lze tvrdit, že huminové kyseliny obsahují více C, H, N, ale méně kyslíku než fulvinové kyseliny. Tyto rozdíly v zastoupení jednotlivých prvků ve fulvinových a huminových kyselinách ukazuje přehledná Tabulka 2 - Prvkové složení v hm % [4]

Tabulka 2 - Prvkové složení v hm % [4]

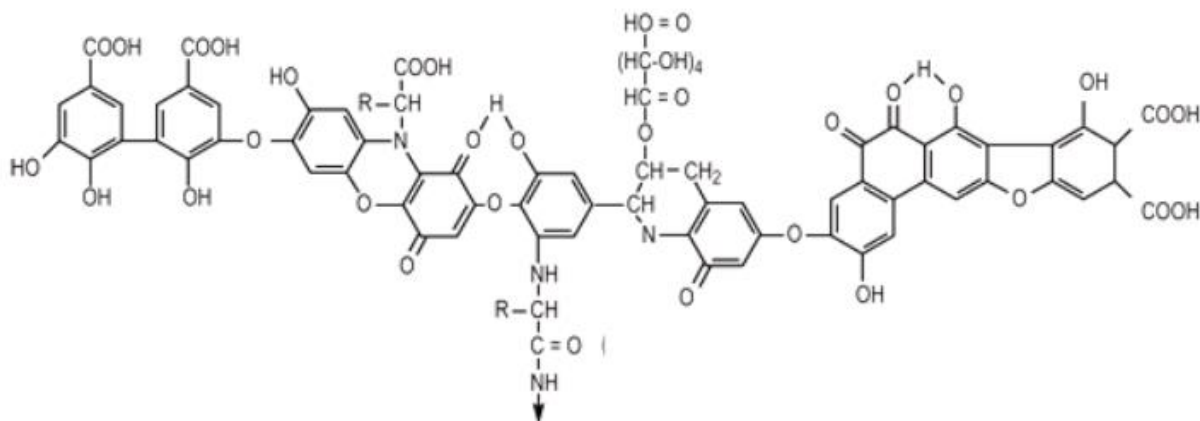
Prvek	Prvkové složení v hm %	
	FK	HK
C	40,7–50,6	53,8–58,7
O	39,7–49,8	32,8–38,3
H	3,8–7,0	3,2–6,2
N	0,9–3,3	0,8–4,3

Z výsledků prvkových analýz můžeme dostat poměry C/H a C/O, čímž můžeme odhadovat zastoupení funkčních skupin v HL.

Huminové látky, jakožto heterogenní směs látek, není možné popsat jednoduchým strukturním vzorcem, proto se používají obecné strukturní modely. Na světě najdeme spoustu různých struktur HL, z uvedeného vyplývá, že budeme jen těžko hledat dvě identické. Historicky první pokus popsat strukturu huminových látek vzorcem se uskutečnil v 80. letech 20. století, kdy téměř současně pánové Stevenson a Haworth představili své hypotetické vzorce HL. S postupem času vzniklo mnoho modelů struktur HL, dva z nich lze vidět na **Chyba! Nenalezen zdroj odkazů.** a Obrázek 5. [3,4]



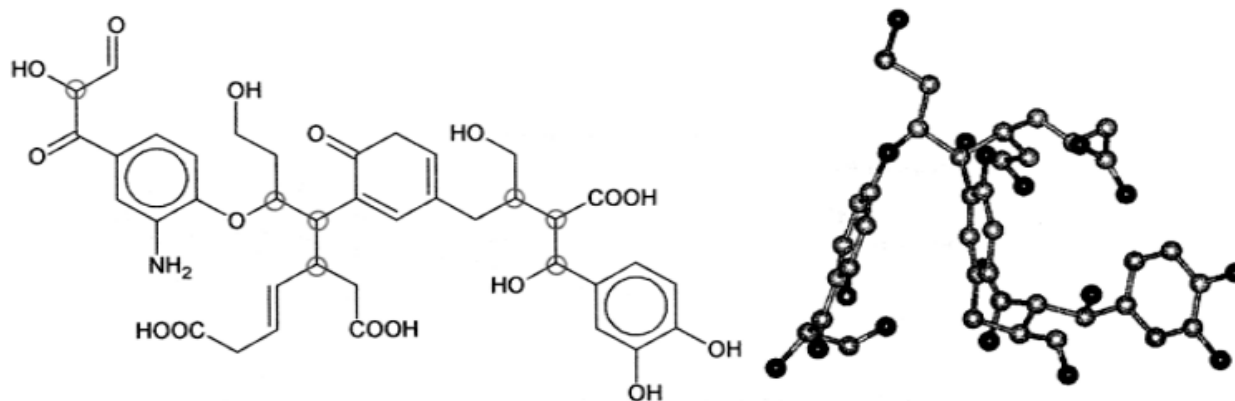
Obrázek 4 - Historicky navrhovaná struktura HL podle Kleinhepela [6]



Obrázek 5 - Předpokládaná struktura HK podle Stevensona. (R = alkyl, aryl) [9]

HK byly obecně považovány za komplexní aromatickou strukturu, kde spojení mezi aromatickými skupinami zajišťují aminokyseliny, aminocukry, peptidy a alifatické sloučeniny. Struktury obsahují hlavně velké množství různých funkčních skupin (karboxylových, fenolových, alkoholových, chinonových, éterových, dusíkatých, aj.). Huminové kyseliny tedy vykazují polyaniontový charakter a mohou vázat ionty různými mechanismy. Znalost funkčních skupin nám dává lepší představu o struktuře molekuly a jejích chemických, fyzikálních či biologických vlastnostech.

Jak již bylo uvedeno v úvodu této kapitoly, polymerní teorie je považována za tradičnější, starší a dnes již překonanou. Naopak huminové látky jako supramolekulární systém je novější teorie, která je podpořena moderními analytickými metodami. Modernější model HK, včetně předpokládané konformace, je možné vidět na Obrázek 6. Hlavními aspekty supramolekulární struktury je stabilizace převážně slabými disperzními silami namísto kovalentních vazeb. Dále je třeba zmínit hydrofobnost, van der Waalsovy síly, π - π interakce (patrové interakce, π - π stacking) a vodíkové vazby, které jsou zodpovědné za velkou molekulární hmotnost huminových látek. [6,10,12,13]



Obrázek 6 - Moderní model, který ukazuje pravděpodobnou konformaci HK [6,10]

3.4 Původ huminových látek

Proces vzniku HL, který nazýváme humifikace, není zcela objasněn. Mezi vědci nepanuje v této otázce shoda a existuje více teorií jejich vzniku. Jedná o soubor složitých biochemických reakcí. Jediné v čem se shodují, je prvotní zdroj materiálu tvořený převážně rostlinami a v menší míře všemi ostatními organismy. Přehledné schéma vzniku huminových látek se nachází na obrázku 7. [1,4,5,14–17]

Humifikační teorie dělíme do tří hlavních skupin:

- degradační (ligninová) teorie,
- syntetická (polyfenolová) teorie,
- melanoidinová teorie.

3.4.1 Degradáční teorie (ligninová teorie)

Degradáční teorie popisuje vznik HL rozkladem odumřelého rostlinného materiálu, kdy dochází k postupné přeměně rostlinných látek na humin, který je výchozím materiálem humifikace. Dalším procesem je oxidační degradace huminu, kdy vznikají HL se stejnou molekulovou hmotností jako humin, ale s výrazně vyšším obsahem funkčních skupin -COOH, -CHO a -OH. Snížením molekulové hmotnosti HL, které mají vyšší obsah kyslíku ve funkčních skupinách, se dostaneme přes huminové kyseliny až na fulvinové kyseliny. Proces přeměny není ukončený, ale pomalu pokračuje a vznikají ještě menší molekuly. Na konci této přeměny zůstávají pouze molekuly vody a oxidu uhličitého, ale tento proces

je velice pomalý. Proces probíhá mikrobiálním rozkladem ligninu, kutinu nebo melaninu, kdy nejprobadanější je tzv. ligninová teorie. [1,4,10,14–17]

Ligninová teorie předpokládá, že je lignin nejdříve rozkládán mikroorganismy, tím se stane součástí půdního humusu. V půdě dochází k postupné ztrátě methoxylových funkčních skupin ($-\text{OCH}_3$), následnou oxidací postranních řetězců vznikají karboxylové skupiny ($-\text{COOH}$). Předpokladem je, že lignin a produkty humifikace reagují s amoniakem, vznikají cyklické a kondenzované strukturní formy, které již známe z obecných strukturních vzorců. Tuto teorii podpořil Waksman několika argumenty:

- lignin i huminové kyseliny jsou těžko rozkládány většinou hub a bakterií,
- lignin i huminové kyseliny jsou rozpustné v alkalických roztocích, sráží se v kyselinách a obsahují methoxylové funkční skupiny,
- lignin i huminové kyseliny mají kyselý charakter,
- pokud je lignin zahříván v zásaditém roztoku, je přeměněn na huminové látky obsahující methoxylovou skupinu,
- obecně tedy mají huminové kyseliny spoustu společných vlastností se zoxidovaným ligninem.

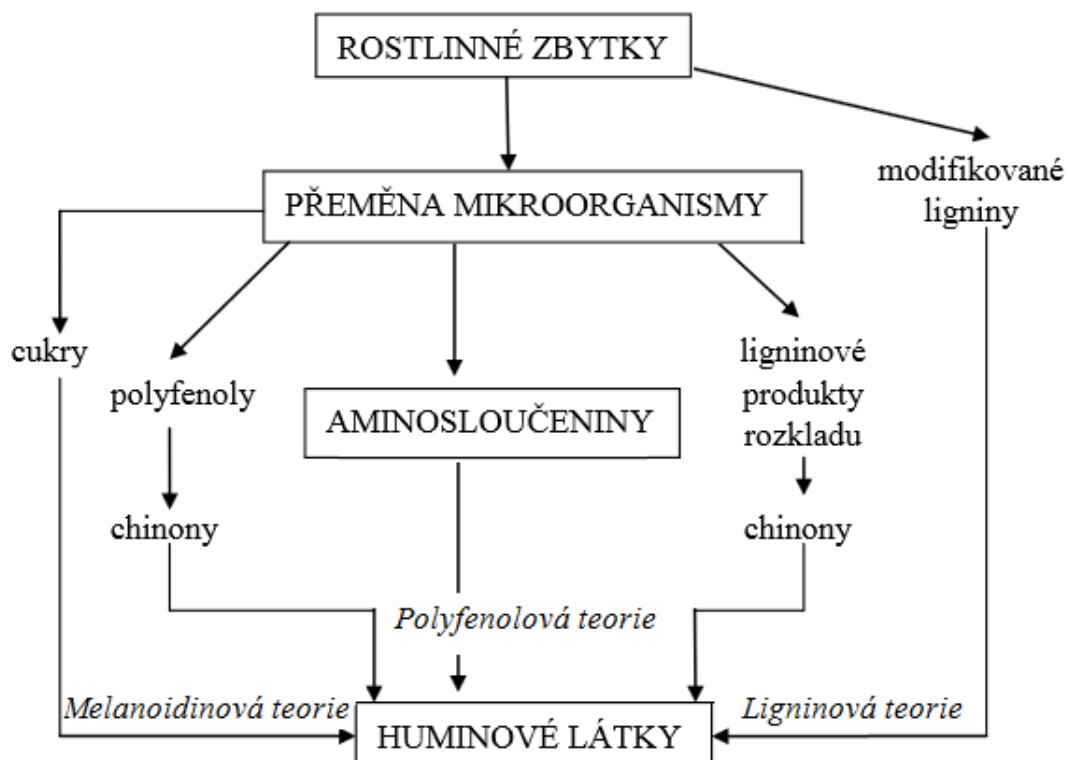
3.4.2 Syntetická teorie

Syntetická teorie vychází z teorie, kdy je rostlinná tkáň nejprve degradována na malé molekuly (karboxylové kyseliny, fenoly atd.) a z nich se následnou syntézou tvoří jednoduché prekurzory huminových látek. Podle této teorie tedy nejdříve dochází ke vzniku fulvinových kyselin, následně huminových kyselin a nakonec dochází ke vzniku největších a nerozpustných huminů.

Polyfenolová teorie v sobě zahrnuje důležitou roli ligninu v humifikaci. Je založena na reakci chinonů s dusíkatými látkami (aminokyselinami), ale může polymerovat i bez nich. Chinony zde vznikají enzymatickou přeměnou fenolu, který získáváme z ligninu (uvolnění fenolických aldehydů a kyselin). Polyfenolová teorie nám ukazuje cestu, jak začlenit dusík do struktury HL. Kromě ligninu do této kategorie začleňujeme i vznik HL z celulózy.

Další možností vzniku HL je melanoidinová teorie. Je založena na reakci aminokyselin s redukcujícími cukry (amino skupina s karbonylovou funkční skupinou cukru). Produkty reakce prochází dalšími změnami, jako je např. cyklizace či dekarboxylace. Produktem jsou hnědé dusíkaté produkty melanoidiny, které jsou velice obdobné jako huminové látky.

Pravděpodobné je, že degradační a syntetická teorie existují vedle sebe a různě se prolínají. Například degradační ligninu nejprve vzniknou malé molekuly, z nichž se syntetizují huminové kyseliny a ty jsou pak oxidací a fragmentací přeměněny na fulvinové kyseliny. Ve vodních ekosystémech zřejmě dominuje degradační mechanismus, zatímco v terestrických ekosystémech převažuje syntéza. [1,4,5,14–17]



Obrázek 7 - Schéma vzniku HL [5]

3.5 Historie a aplikace huminových látek

S huminovými látkami nevědomky zacházeli již naši předkové. Pojem „humus“ pochází již od Římanů, u kterých toto označení zdomácnělo. Později ve středověku si lidé uvědomovali, že je třeba nechat půdu „odpočinout“ tak, aby byla úrodnější. Zavedli tím trojpolní systém, kdy rozdělili půdu na tři části. Jedna část se osela na jaře, druhá na podzim a třetí z nich nechávali ladem, aby opět načerpala sílu. Příští rok se toto kolečko posunulo a na jaře byla oseta část, která byla nechána ladem. Od pradávna také lidé používali zahradní kompost, ale třeba i močůvku a kejdu, jako zdroj živin pro půdu. Větší zájem o huminové látky byl mezi vědci probuzen v 80. letech 20. století, kdy proběhlo velké pátrání za strukturálním vzorcem HL a Německý chemik Franz Carl Achard navrhl metody izolace huminových látek z hnědého uhlí. [18,19]

3.5.1 Zemědělská aplikace

Huminové látky představují důležitý agronomický faktor. Výrazným vlivem se jejich obsah v půdě projevuje na kvalitě a produktivitě půd. Se zvyšujícím se obsahem těchto látek dochází ke zlepšení fyzikálních vlastností a schopnosti půdy zadržovat vodu. Hrají důležitou roli při výměně živin a mají značnou pufrací kapacitu.

V současné době se huminové látky používají jako aditiva v hnojivech, např. humát vápenatý, který značně zvyšuje úrodnost půdy, nebo humát amonný s výrazným stimulujícím růstovým faktorem. HL interagují například s železem za tvorby chelátu, čímž jej zpřístupní

pro rostliny. Dalším významným použitím je jejich schopnost vázat herbicidy, fungicidy a další látky, u kterých je žádoucí lokální aplikace a nikoliv jejich šíření do okolí. [20–22]

3.5.2 Průmyslová aplikace

Huminové látky nacházejí uplatnění ve zpracování kůží jako součást impregnace, dále při barvení dřevěných dých a nábytku. V keramickém průmyslu jsou huminové látky používány jako aditiva zlepšující mechanickou pevnost keramiky, k barvení pálených střešních tašek, a u plastů jako barvivo pro nylon 6 nebo PVC plasty. Zajímavé je, že našly uplatnění u extrakce uranu z jeho rud. Huminové kyselina váže velmi dobře uranové ionty v oxidačním stupni +VI a +V. [20–23]

3.5.3 Environmentální aplikace

Huminové a fulvinové kyseliny jsou důležitými přírodními organickými supramolekulárními látkami, protože tvoří s mnoha těžkými kovy komplexy, které jsou takto vázány a nemohou dále prostupovat prostředím. Byly prozkoumány komplexy s kovy jako železo, nikl, rtuť, kadmium, měď a také s radioaktivními prvky. Použití našly u filtrů odpadních a průmyslových vod a u filtrů pro sorpci plynů (jatečné kafilérie, odstranění sirovodíku ze zemního plynu). Kromě kovů mohou huminové látky interagovat s pesticidy, herbicidy, insekticidy a některými farmaceutickými produkty. Interakcí dochází k imobilizaci těchto látek a snižuje se jejich negativní působení a prostup životním prostředím. [20–22]

3.6 Reaktivita huminových kyselin

Huminové kyseliny jsou strukturně složité látky, pro které je typický vysoký obsah funkčních skupin jako např. skupin karboxylových, fenolových, alkoholových, aminových a thiolových. Obsah těchto funkčních skupin úzce souvisí s jejich původem a stářím. Všechny přítomné funkční skupiny ovlivňují výslednou reaktivitu huminových kyselin, a proto je velice důležité určit jejich obsah a jejich rozložení v molekule.

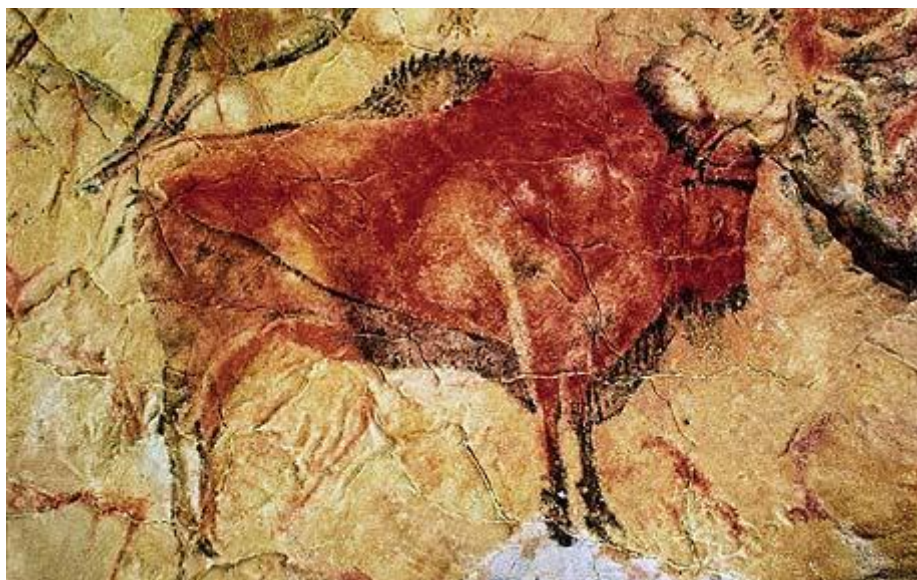
Karboxylová, fenolová a hydroxylová funkční skupina se podílí především na kyselých vlastnostech HK a silně ovlivňují celkovou polaritu molekuly. Vůbec nejreaktivnější funkční skupinou jsou karboxylové skupiny, dále fenolové skupiny, které obsahují HK méně. Tyto skupiny jsou zároveň místa možných interakcí jak se sloučeninami, tak s prvky. Důležitou vlastností huminových kyselin je jejich schopnost tvořit koordinační sloučeniny s různorodými látkami, které tvoří v přírodě polutanty, jedná se o pesticidy, barviva a těžké kovy. Reaktivita huminových kyselin je díky velkému množství funkčních skupin velice složitá. Metodou FT-IR můžeme detekovat přítomnost funkčních skupin a po interakci zjistit, jaké funkční skupiny se zapojily do reakce. [1,5,11,23]

3.7 Interakce huminových kyselin s iontovými organickými sloučeninami

3.7.1 Interakce s barvivy

Barviva jsou široká skupina sloučenin, kterých se primárně využívá v textilním průmyslu při vybarvování textilních vláken rostlinného i živočišného původu. Dále nachází uplatnění při barvení usní, papíru, kaučuku, plastických hmot, lojů, vosků, mýdla, tužek, polygrafických barev, laků a inkoustů, dále v potravinářském průmyslu, v medicíně i v biochemii.

První důkazy o použití barviva (pigmentu) můžeme najít ve španělské Altamíře, kde pravěcí lidé zanechali malbu fauny jejich doby, viz Obrázek 8. První zmínky o používání organického barviva indiga pochází ze starověké Číny, kam se dostalo z Indie. Dále následovaly vyspělé civilizace Egypta i Řecka. V Egyptských hieroglyfech nacházíme informace o extrakci a použití organických barviv. První syntetické barvivo bylo pravděpodobně vyrobeno W. H. Perkinem roku 1856, který náhodně při syntéze chininu připravil anilinový purpur mauvein. Za otce chemie barev je považován Peter Gries, který svým objevem diazoniových sloučenin roku 1862 umožnil výrobu azobarviv. [24–27]



Obrázek 8 - Detail stěny jeskyně Altamira (oblast Kantábrie, severní Španělsko) [27]

Azobarviva jsou nejpočetnější a nejdůležitější skupinou organických barviv zahrnující všechny odstíny od žluté do černé. Zbytek připadá na další skupiny barviv a opticky zjasňující látky. Azobarvivy je možno barvit téměř všechny druhy přírodních a syntetických vláken, plasty, usně, papír či výrobky z pryže. Molekula azobarviva obsahuje jednu nebo několik azoskupin. [24–27]

3.7.2 Reakce s pesticidy a herbicidy

Pesticidy jsou chemikálie organického nebo anorganického původu. Tyto přípravky jsou určeny k tlumení a hubení rostlinných a živočišných škůdců. Slouží primárně k zamezení ztrát na kulturních rostlinách, zásobách potravin i krmiv, na technických produktech (textil, kůže, dřevo), ale i na bytech a domech. Největší uplatnění našly v zemědělství, kde se podle statistik používá pesticidů v 95 % případů. [28–30]

Podle jejich účinnosti se dělí na:

- insekticidy (hubení hmyzu),
- herbicidy (hubení plevelů a rostlin),
- fungicidy (hubení hub a jejich spor),
- zoocidy (hubení živočichů).

Podle rozsahu jejich působnosti se dělí na:

- selektivní,
- neselektivní (totální).

S rozšířením aplikace pesticidů v zemědělství vzniklo i mnoho problémů. Do ekosystému se dostalo a neustále se dostává spousta tun pesticidů ročně, což v konečném důsledku zatěžuje organismy v přírodě, a pronikají i do potravního řetězce člověka. Svými toxickými vlastnostmi pesticidy způsobily řadu nežádoucích účinků pro organismy (např. jejich kumulování v těle, otrava, kožní a nervová onemocnění) a výrazně tak ovlivnily kvalitu životního prostředí. Je proto velice žádoucí kontrolovat či omezovat užívání pesticidů a najít možnosti, jakým způsobem je v půdě zachytávat a odstraňovat je z ekosystému. Z těchto důvodů se dlouhodobě zkoumají možnosti použití huminových látek skrze jejich vazebné vlastnosti. [28–30]

Stevenson (1971) obecně definoval možnosti interakce huminových látek s pesticidy různými způsoby, kdy vždy záleží na chemické struktuře pesticidu. Možností interakcí je spousta, např. iontová výměna (mezi karboxylovou skupinou a fenolovou skupinou HK s protonovaným dusíkem pesticidu), vodíková vazba (karboxylové, karbonylové, hydroxylové a fenolová a alkoholové skupiny s elektronegativním kyslíkem a dusíkem), výměna náboje a protonace (záporný náboj HK oproti kladnému náboji pesticidů), dále pak např. výměna ligandu, koordinační vazbou přes kov nebo hydrofobní vázání. [5]

3.8 Vybrané metody analýzy interakcí huminových látek s iontovými sloučeninami

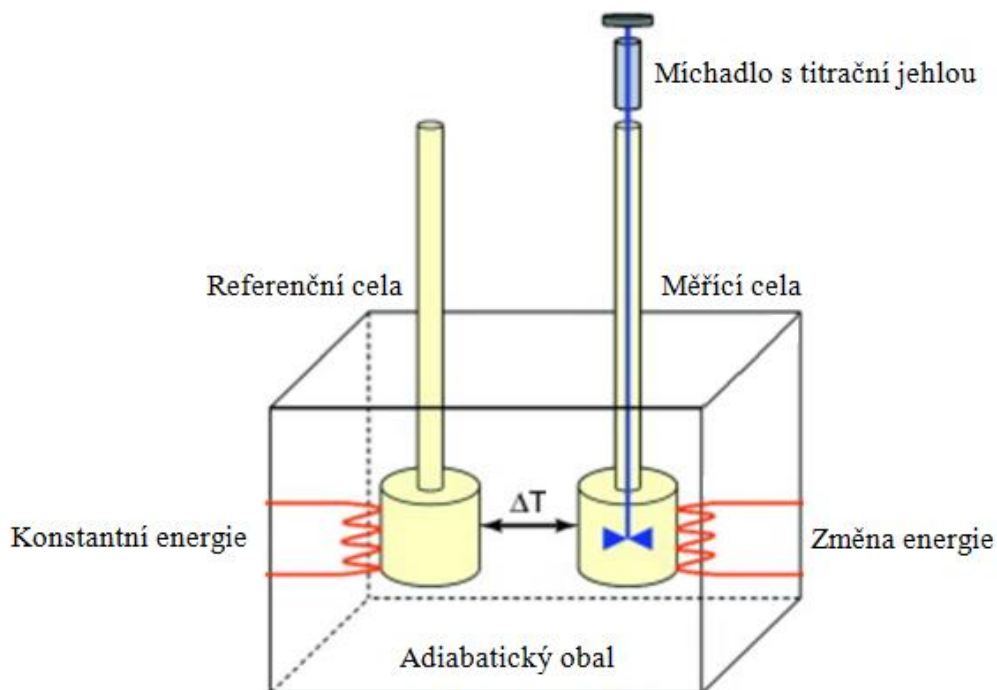
3.8.1 Izotermická titrační kalorimetrie

V současné době je izotermická titrační kalorimetrie (ITC) moderní technika užívaná ke studiu termodynamiky a charakterizaci mezimolekulárních interakcí. Díky její veliké citlivosti můžeme spolehlivě měřit termodynamické veličiny, které popisují charakter interakce mezi zkoumanými látkami, např. vazebnou entalpii ΔH , rovnovážnou konstantu K a také reakční stechiometrii.

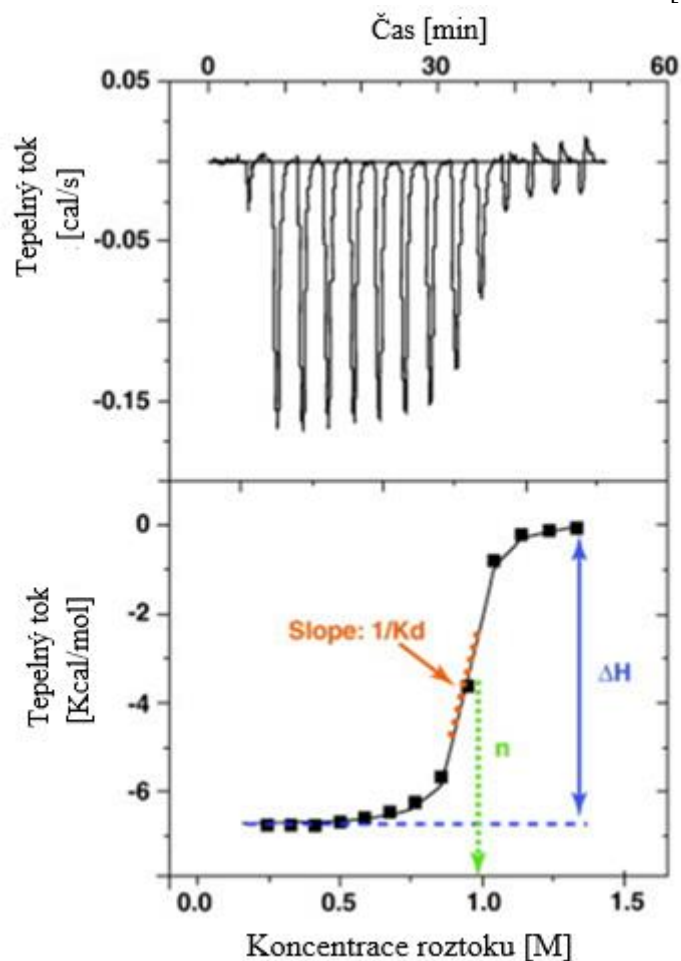
Touto metodou můžeme stanovovat kapalně, pevně i gelové vzorky, zákal ani zbarvení nemá na měření vliv. Velkou výhodou této instrumentální metody je, že termodynamické parametry interakcí mohou být měřeny bez imobilizace, úprav a bez omezení molekulovou hmotností. Výborně se tedy hodí do všech odvětví chemie (polymery, nanotechnologie, kompozity, pigmenty, emulze) a v biotechnologii. [31–33]

Na Obrázek 9 můžeme vidět základní konfiguraci izotermického titračního kalorimetru. Skládá se ze dvou identických cel, které jsou uzavřeny v adiabatickém obalu. Obě cely, referenční i měřicí cely, jsou během měření udržovány při konstantní teplotě. Do vzorkovací cely je pomocí stříkačky s kapilárou postupně titrováno požadované množství roztoku určeného k interakci, kde následně dochází k tepelným efektům, které jsou úměrné rozdílu mezi referenční a měrnou celou. Teplo, které se uvolňuje nebo absorbuje během reakce, se měří jako proměnná energie, která působí na celu se vzorkem za izotermických podmínek ($\Delta T = 0$). Rozdíl teplot je detekován velice citlivými termoelektrickými obvody, které jsou umístěné v prostoru mezi celami. Tyto termoelektrické obvody řídí změnu přísunu elektrické energie tak, aby byla teplota obou cel vyrovnaná. ITC tedy měří energii potřebnou k udržení izotermických podmínek mezi celami. Přesněji se měří změna přítoku elektrické energie v závislosti na čase, která je zaznamenána vzhledem k okamžité změně koncentrace složek. Tyto změny nastávají v měřicí cele titrací. V případě exotermické reakce v měřicí cele, kdy je energie uvolňována, je přísun energie redukován. U endotermické reakce, kdy je teplo spotřebováváno, je přítok elektrické energie navyšován. [31–35]

Příklad detekce můžeme vidět na Obrázek 10, graf závislosti tepelného toku na čase. Je zde vidět série píků, která odpovídá přidávku roztoku při titraci. Integrací naměřených píků potom dostáváme graf závislosti změny vazebné entalpie ΔH na mol přidavku. Tato křivka se nazývá vazebná izoterma a slouží k vyhodnocení dalších termodynamických veličin, např. vazebné konstanty K nebo k určení stechiometrie reakce. [31–35]



Obrázek 9 - Schéma izotermického titračního kalorimetru [35]



Obrázek 10 - Horní obrázek - výstup z kalorimetru, dolní obrázek - vyhodnocení naměřených dat [35]

3.8.2 Rozpouštěcí kalorimetrie

V současné době je rozpouštěcí kalorimetrie (SolCal) další moderní technikou užívanou ke studiu termodynamiky. Tato metoda slouží ke stanovení rozpouštěcího tepla vzorku v rozpouštědle. Lze ji použít pro pevné i kapalně vzorky. Jedinou podmínkou úspěšnosti experimentu je rozpustnost vzorku v daném rozpouštědle. Experimenty probíhají za izotermických podmínek. Fotografie cely SolCal můžete vidět na Obrázek 11.



Obrázek 11 - Cely SolCal [60]

Měření probíhá v měřící cele o objemu 100 ml, která je naplněna rozpouštědlem. Vzorek je před měřením hermeticky uzavřen v malé jednorázové skleněné ampuli, která je v průběhu experimentu rozbita o hrot uvnitř měřící cely. Tím dojde k řízenému rozpuštění vzorku. Po celou dobu měření je zaznamenávána teplota obsahu měřící cely. Ze změny teploty v průběhu měření je měřícím programem vypočteno rozpouštěcí teplo dané reakce. Výsledkem je hodnota tepla, které se uvolnilo nebo spotřebovalo při rozpuštění vzorku. Nejčastěji se tato technika používá ve farmaceutickém průmyslu při hodnocení obsahu krystalické nebo amorfni složky v aktivních substancích. [36]

3.8.3 Membránové procesy

Membránové procesy jsou různorodou problematikou nacházející široké uplatnění napříč technickou praxí (výroba pitné vody, dialyzační procesy, membránové sušení plynu, aj.). Tyto procesy se využívají k separaci složek tekutých homogenních nebo heterogenních směsí (kapalných roztoků a směsí, plynných směsí, suspenzí pevných částic v kapalině), k zahušťování roztoků nízkomolekulárních i vysokomolekulárních látek, a mohou také zadržovat v kapalinách dispergované mikročástice. [37]

Separální membránou je tenká polopropustná vrstva nebo fólie. Membrány separují na základě následujících mechanismů (či jejich kombinací):

- různé velikosti částic směsi, tzv. síťový mechanismus,
- různé afinity složek směsi k materiálu membrány a jejich různé rychlosti difúze membránou,
- elektrochemické interakcí mezi složkami směsi a materiálem membrány.

3.8.3.1 Molekulová difúze a dialýza

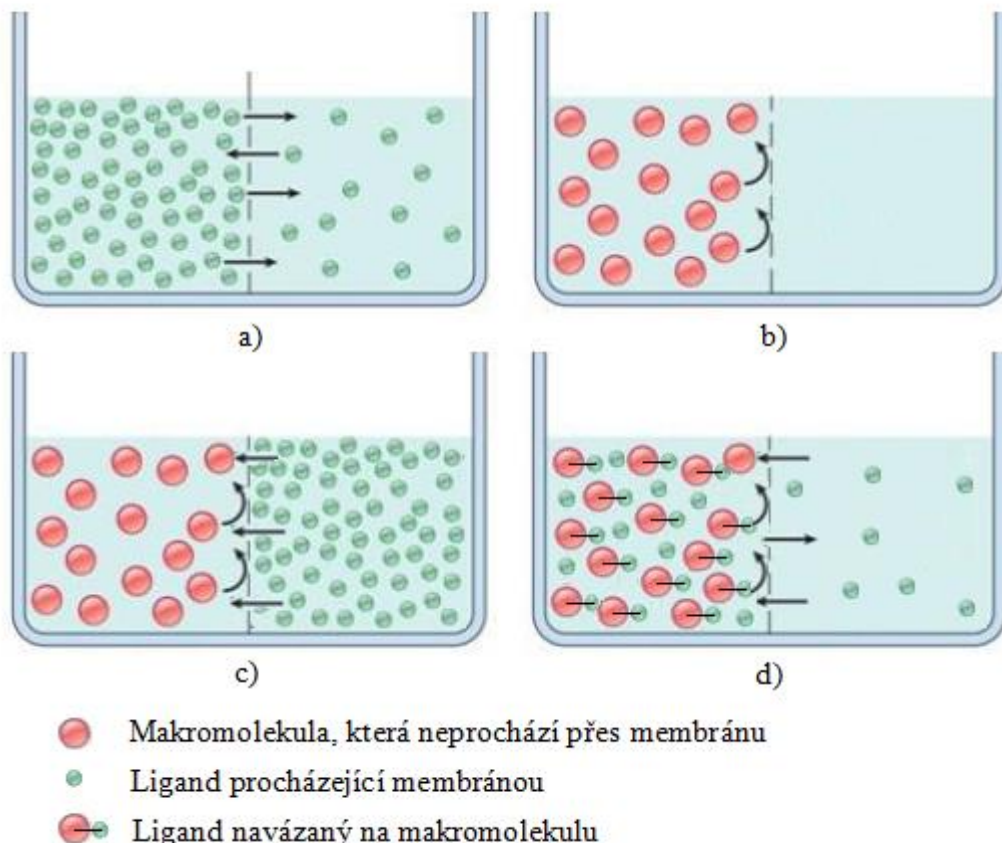
Difúze je přestup látky, který představuje molekulární transport hmoty složky “i”, kdy se některá složka roztoku (*i*) pohybuje určitým směrem v navenek nehybné fázi (tj. ve fázi, která se jako celek nepohybuje) a směřující k vyrovnání koncentrací této složky ve všech místech roztoku. Od míst s vyšší koncentrací proudí látka do míst s nižší koncentrací až do vyrovnání koncentrací. Dialýza je děj, při kterém jsou oddělovány látky s různou velikostí molekul na základě velikosti pórů dialyzační membrány, která je nejčastěji tvořena acetátem celulózy. Tato metoda nachází uplatnění v biochemii a lékařství. [38–41]

Proces vyrovnání koncentrací je velmi pomalý, protože je důsledkem tzv. tepelného pohybu, který je znám jako Brownův pohyb. Tento pohyb lze pozorovat pod mikroskopem v důsledku srážek disperzní částice s velkým počtem molekul disperzního prostředí, kdy se disperzní částice pohybuje různými směry po velmi složité dráze (počet nárazů z různých stran není rovnocenný). Hnací silou difúze je tedy koncentrační gradient, obecně pak gradient chemických potenciálů transportované látky v systému, který pozorujeme. Rychlost šíření částic je funkcí velikosti částic, teploty a vlastností prostředí. V případě dialýzy pak i velikosti pórů v membráně. [38–41]

V případě, že máme k dispozici dvě cely oddělené polopropustnou membránou, jednu s makromolekulami a druhou s membránovým permeantem, dochází k následujícím situacím, které můžeme vidět na Obrázek 12:

- část a) membránový permeant (ligand, v našem případě barvivo methylenová modř) prochází přes semipermeabilní membránu a není nijak omezen. Po čase by došlo k vyrovnání koncentrací tak, aby byla koncentrace ve všech místech stejná,
- část b) makromolekula (v našem případě HK) je na průchod polopropustnou membránou příliš velká, tudíž nedochází k průchodu makromolekuly přes tuto membránu a rovnováha se ustavuje pouze v jedné cele,

- část c) a d) makromolekula je schopná vázat ligand, dochází tedy k neustálému vyrovnávání koncentrací tak, aby byl volný ligand rozpuštěný v obou celách a všech místech spojených cel rovnoměrně. Množství ligandu na straně makromolekuly bude tedy vyšší a to jen díky jeho navázání na makromolekulu. Část d) ukazuje situaci po vyrovnání koncentrací permeantu.



Obrázek 12 – Průběh difúze ligandu při analýze vazebných interakcí [41]

Tato metoda je vhodná pro stanovení, kdy se měří množství ligandu na obou stranách membrány, rozdíl v koncentracích bude způsoben navázáním ligandu na makromolekuly. Tento rozdíl potom lze použít ke stanovení rovnovážných a vazebných konstant díky znalosti počtu molekul ligandu navázaných na makromolekuly. [39–42]

Z této metody lze vycházet i při výpočtu zdánlivé rovnovážné konstanty K_{app} (zdánlivá, protože její hodnota závisí pouze na molární koncentraci). Předpokládejme, že platí rovnice 1:

$$c_0V = c_{volná\ zdroj}V + c_{volná\ přijm}V + c_{vázaná}V \quad (1)$$

kde: C_0 výchozí koncentrace methylenové modři (MM) ve zdrojové cele
 V objem systému
 $C_{volná\ zdroj} / C_{volná\ přijm}$ koncentrace volné (nevázané) sondy ve zdrojové/přijímací cele
 $C_{vázaná}$ koncentrace barviva navázaného na HK

Vzhledem k tomu, že objem systému je neměnný a platí rovnovážná distribuce barviva v obou celách, pak platí rovnice 2. Úpravou rovnice dostaneme tvar rovnice 3:

$$c_0 = c_{volná} + c_{volná} + c_{vázaná} \quad (2)$$

$$c_{vázaná} = c_0 - 2c_{volná} \quad (3)$$

Pro rovnováhu systému mezi volnou a vázanou methylenovou modří platí rovnice 4 a 5:



$$K_{app} = \frac{[MM]_{vázaná}}{[MM]_{volná}} \quad (5)$$

Dosazením upravené rovnice 3 do rovnice 5 dostaneme tvar rovnice 6:

$$K_{app} = \frac{c_{vázaná}}{c_{volná}} = \frac{c_0 - 2c_{volná}}{c_{volná}} = \frac{c_0}{c_{volná}} - 2 \quad (6)$$

4 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

4.1 Interakce huminových kyselin s iontovými organickými sloučeninami

4.1.1 Interakce s barvivy

Předmětem této kapitoly je shrnutí poznatků o adsorpci různých organických barviv na huminové kyseliny. Při adsorpci byly zkoumány různé podmínky, vliv pH, elektrolytu, teploty, množství huminové kyseliny, vliv počáteční koncentrace barviva či vliv míchání. Důležité je i zmínit, že princip vázání organických barviv je stále otázkou mnohých diskuzí a není zcela objasněn. Tabulka 3 ukazuje přehled doposud studovaných vlivů a interakcí HK s barvivy. [43–51]

Vinod a Anirufhan zkoumali adsorpci tří základních barviv, jmenovitě u methylenové modři, krystalové violeti a rhodaminu B na huminové kyseliny, které byly imobilizované na jílové koloně. Ukázalo se, že díky navázání huminových kyselin na jíl byla kolona 2–2,5krát účinnější než při použití kolony bez huminových kyselin. Byl zkoumán vliv pH na účinnost kolony. Maximální účinnost byla zjištěna v rozsahu pH 5,0–7,0. Výsledky dokazují, že huminové kyseliny jsou slabě disociovány a v hlavní míře zapojují do interakcí karboxylové funkční skupiny, které nesou záporný náboj. Tento náboj je zdrojem elektrostatických interakcí (coulumbických interakcí) s kladně nabitými barvivy. [43]

Technická univerzita, Liaoning v Číně pod vedením Xu D. používala huminové kyseliny k izolaci barviva košenilová červeň z vodného roztoku ve vsádkovém reaktoru. Byl zde zkoumán především vliv množství HK na rychlost adsorpce a také ovlivnění interakce iontovou silou. Bylo pozorováno zvýšení adsorpce barviva se zvyšující se koncentrací HK, jež souvisí s větší adsorbční plochou, která je úměrná vyššímu počtu aktivních míst pro sorpci. Vliv iontové síly byl zřejmý, se zvyšující se iontovou silou klesala rychlost sorpce. Interakce mezi HK a barvivem byly elektrostatické povahy a mohou zahrnovat valenční síly prostřednictvím výměny a sdílení elektronů. [44]

Zaninani a spol. z Argentiny zkoumali vázání huminových kyselin s oxazinem ve vodném prostředí v rozsahu pH 4,0–10,0 a při různé koncentrací elektrolytu KCl. Množství navázaného barviva bylo silně závislé na iontové síle. Vazba byla poměrně silná díky elektrostatickým silám. Se vzrůstajícím pH a klesající koncentrací elektrolytu docházelo ke zvýšení počtu vazných míst na huminových kyselinách (záporně nabitě funkční skupiny). Tyto výsledky ukazují, že jsou huminové kyseliny schopné flexibilně reagovat na různé pH a koncentraci elektrolytu. [45]

Fernandes a spol. z brazilské univerzity studovali interakci roztoku methylenové modři pomocí rašeliny. Byly zde sledovány různé vstupní koncentrace methylenové modři a teploty při promíchávání. Absolutní množství sorbované methylenové modři se zvyšovalo s vyšší počáteční koncentrací barviva a rostoucí teplotou. Jedná se o endotermní reakci. Po nasycení vnějších vazebných míst difundovala methylenová modř do pórů HK. Dále dochází k výměně protonů (H^+) mezi $-COOH$ skupinami rašeliny a kationtovými skupinami methylenové modři. [46]

Ho a spol. studovali interakci dvou barviv *basic blue 69* a *acid blue 25* s rašelinou, která obsahuje velké množství huminových kyselin. Ve vsádkovém reaktoru zkoumali vliv počáteční koncentrace barviva, účinek míchání a teploty. Rychlost míchání v reaktoru ukázala, že množství adsorbovaného barviva bylo se zvyšující se rychlostí míchání vyšší, což bylo vysvětleno efektem mezní vrstvy, kterou musí barvivo překonat při difúzi k povrchu adsorbentu a k prostupu do vnitřních prostor huminových látek. Projevuje se i vliv vyšší vstupní koncentrace, kdy bylo množství adsorbovaného barviva za jednotku času úměrně vyšší. *Basic blue 69* se sorbuje lépe při vyšších teplotách, naopak *acid blue 25* při nižších teplotách. Adsorpci přičítají elektrostatickým silám, iontové výměně a chemické reakci. Jedná se o exotermicky aktivované procesy, opět na principu difúze nejdříve k povrchu a poté do pórů. [47]

Allen a spol. zkoumali adsorpci barviv (*basic blue 3*, *basic yellow 21* a *basic red 22*) na rašelinu. Principem navázání zde mohly být coulombické interakce a iontová výměna. Huminové kyseliny nesou záporný náboj, který způsobuje interakci s kationtovými barvivami. Tyto vlastnosti autoři přisuzují karboxylovým a nitrilovým skupinám. Naopak skrz záporně nabitý povrch molekul HL může docházet k odpudivým silám vůči kyselým barvivům, která jsou jako celek záporně nabitá. [48]

Jesus a spol. také prováděli adsorpční experimenty, adsorpci *reactive orange 16* a *reactive red 120* na huminovou kyselinu imobilizovanou na oxidu křemičitém. Tento proces byl exotermní. Experimenty ukázaly, že nejúčinnější byla adsorpce při pH 1. Za chemickou interakci jsou zodpovědné karboxylové a fenolové skupiny, které jsou při nízkém pH protonovány. Přebytek H^+ zde zvyšuje kladný náboj na povrchu částic adsorbentu a podporuje elektrostatickou přitažlivost. [49]

Duanping zkoumal adsorpční schopnosti huminových kyselin s barvivem *red 3R* ve vsádkovém reaktoru. Byly zde zkoumány dva parametry, doba kontaktu a iontová síla. Adsorpce barviva na vločkovou huminovou kyselinu byla rychlá. Množství sorbovaného barviva se zvyšovalo s množstvím přidané huminové kyseliny, ale snižovalo se s množstvím přidaného chloridu sodného, který zvyšoval iontovou sílu roztoku. Zkoumání předpokládá, že adsorpční mechanismus je tvořen elektrostatickými silami, vodíkovou vazbou a van der Waalsovými silami. [50]

Ve studii byla zkoumána interakce mezi opačně nabitými barvivami rhodaminem 6G a fluoresceinem se směsí huminových látek (huminové a fulvinové kyseliny) metodou zhášení fluorescence. Intenzita fluorescence se snižovala v závislosti na přídavku HL. Zhášení probíhalo díky interakci s kladně nabitým rhodaminem 6G a záporně nabitou huminovou kyselinou. Interakce je přisuzována elektrostatickým repulsím. [51]

Tabulka 3 – Přehled studovaných vlivů a interakcí HL s barvivy

Látka	Vliv	Interakce	Odkaz
methylenová modř, krystalová violet, rhodamin B	pH	elektrostatické interakce	[43]
košenilová červeň A	pH, iontová síla	elektrostatické interakce	[44]
oxazin	pH, iontová síla,	elektrostatické interakce	[45]
methylenová modř	teplota, různé počáteční koncentrace MM	výměna iontů	[46]
<i>basic blue 69, acid blue 25</i>	počáteční koncentrace barviva, rychlost míchání, teplota	elektrostatické interakce, iontová výměna, chemická reakce	[47]
<i>basic blue 3, basic yellow 21, basic red 22</i>	-	coulombické interakce, iontová výměna	[48]
<i>reactive orange 16, reactive red 120</i>	pH	elektrostatické interakce	[49]
<i>red 3R</i>	iontová síla, doba kontaktu	elektrostatické interakce, vodíková vazba, van der Waalsovy síly	[50]
rhodamin 6G, fluorescein	-	elektrostatické repulse	[51]

4.1.2 Interakce s pesticidy a herbicidy

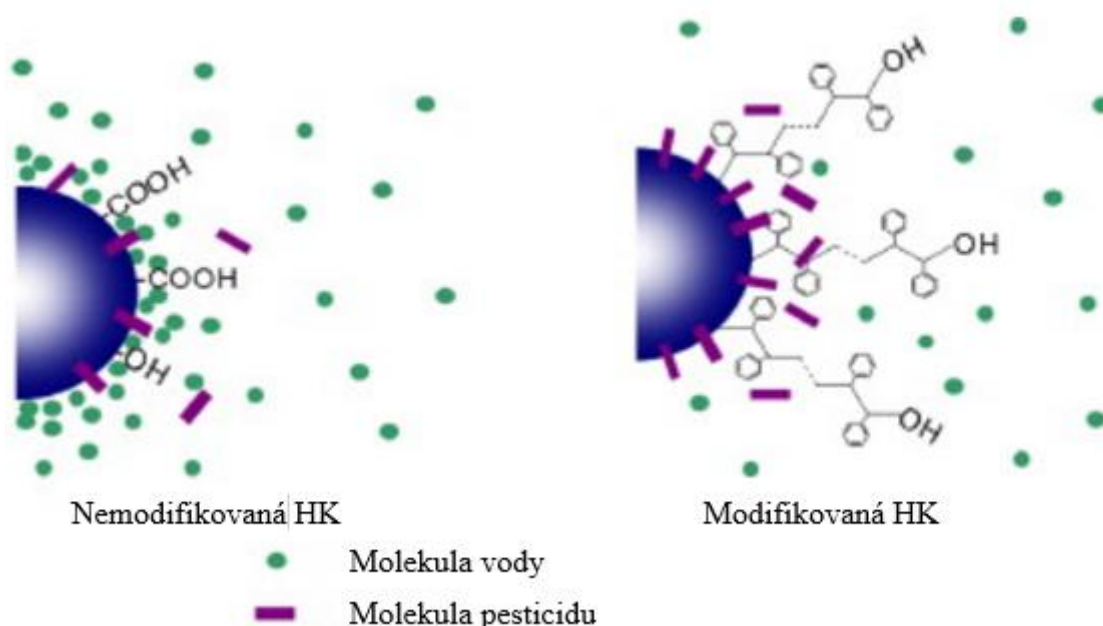
Pesticidy v přírodě mohou degradovat samy, ale jejich sorpce na HL je silně ovlivněna jejich rozpustností, pH půdy a také vlhkostí a množstvím srážek. Přehled doposud studovaných vlivů a interakcí HK s pesticidy a herbicidy je v Tým španělské fakulty chemické, Santiago de Compostela, zkoumal vliv pH a iontové síly na interakci herbicidu paraquatu s huminovými látkami (HK a FK). Bylo zjištěno, že množství navázaného herbicidu se zvyšuje s rostoucím pH, kdy se zvyšuje záporný náboj na karboxylových skupinách. Herbicid paraquat je naopak kladně nabitý, takže se zde uplatňují elektrostatické interakce. Rostoucí iontová síla zde způsobuje stínění náboje a tím dochází ke snížení sorpce na HL. [55]

Tabulka 4.

Tým María, L. Sebastiao, C. a spol. zkoumal adsorpci herbicidu metribuzinu, který má vysokou rozpustnost ve vodě a slabou adsorpci. Interakce je silně závislá na pH. V rozmezí pH 6,8–7,12 byla adsorpce nejvyšší. Interakce nebylo možné popsat jen pomocí vodíkových můstků, ale také pomocí interakce karboxylových a alkoholových skupin s dusíkem za tvorby amidů a aminů. [52]

Kinetické studie adsorpce kyseliny 2,4-dichlorfenoxyoctové a pikloramu (kyselina 4-amino-3,5,6-trichloro-2-pyridinokarboxylová) ukázaly, že rychlost vázání pikloramu na huminové kyseliny byla zpočátku rychlá, ale klesala s časem a s nutností pronikat do vnitřních prostor struktury huminových kyselin. Relativně vysoká rychlost adsorpce při nízkých hodnotách aktivační energie a aktivačního tepla ukázaly, že se jedná zejména o van der Waalsovy síly a hydrofobní interakce. [53]

Yang a spol. zkoumali sorpci třech organických pesticidů (parathion, karbaryl a karbofuran) s huminovými kyselinami a dále také s huminovými kyselinami modifikovanými styrenem (kopolymerem polyesteru), viz Obrázek 13. Jejich upravený vzorek HK obsahoval menší množství karboxylových a fenolových skupin, což způsobilo lepší adsorpci pesticidů. Tento efekt byl přičítán snížení počtu polárních skupin a zvětšením objemu molekuly polystyrenem. Horší sorpci u nemodifikovaných HK tým vysvětloval tvorbou vodního filmu, který ztížil přístup hydrofobních pesticidů. [54]



Obrázek 13 - Schéma sorpce pesticidu na nemodifikovanou a modifikovanou HK [54]

Tým španělské fakulty chemické, Santiago de Compostela, zkoumal vliv pH a iontové síly na interakci herbicidu paraquatu s huminovými látkami (HK a FK). Bylo zjištěno, že množství navázaného herbicidu se zvyšuje s rostoucím pH, kdy se zvyšuje záporný náboj na karboxylových skupinách. Herbicid paraquat je naopak kladně nabitý, takže se zde uplatňují elektrostatické interakce. Rostoucí iontová síla zde způsobuje stínění náboje a tím dochází ke snížení sorpce na HL. [55]

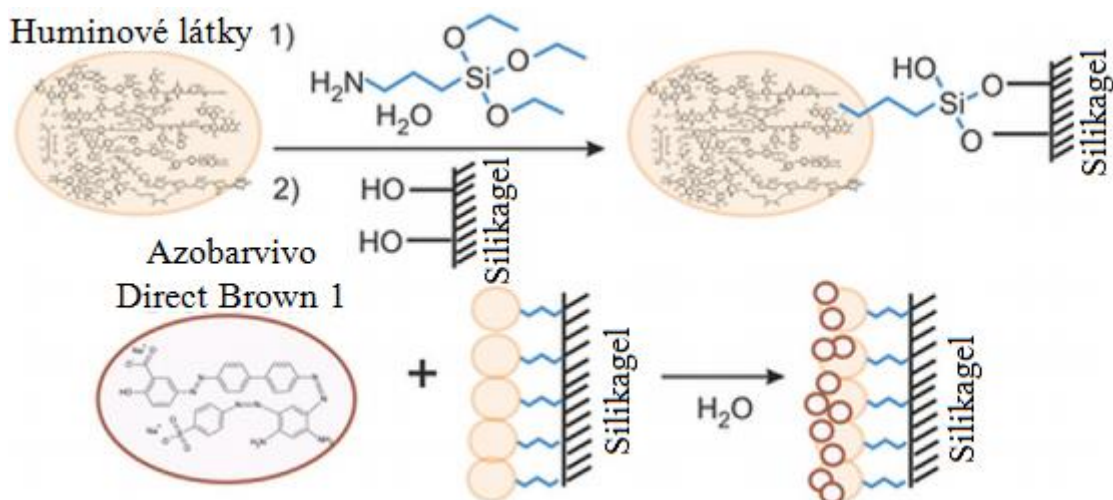
Tabulka 4 - Přehled studovaných vlivů a interakcí HL s pesticidy a herbicidy

Látka	Vliv	Interakce	Odkaz
metribuzin	pH	vodíkové můstky, karboxylové a alkoholové skupiny reagovaly s dusíkem za tvorby amidů a aminů	[52]
pikloram	struktura částic HK	van der Waalsovy síly a hydrofobní interakce	[53]
parathion, karbaryl, karbofuran	objem molekuly	hydrofobních efekt	[54]
paraquat	pH a iontová síla	elektrostatické interakce	[55]

4.2 Vliv imobilizovaných huminových kyselin na adsorpci různých látek

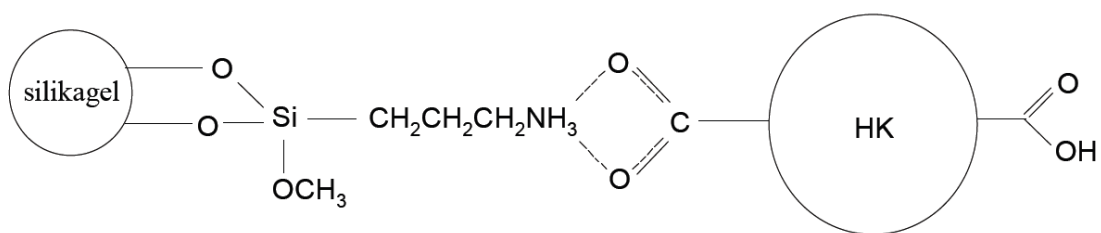
Huminové látky se ukazují být důležitým faktorem, který může výrazně ovlivňovat adsorpci látek na povrchy, které jinak vykazují mnohem nižší adsorpci. Kombinací vlastností huminových kyselin a nosiče vznikají materiály, které dovolují opětovné využití. Recyklace těchto materiálů mohou do budoucna být důležitým ekonomickým faktorem pro případné převedení do praxe. [56–59]

Volikov a spol. zkoumali možnosti odstranění azobarviva (*brown 1 azo dye*) z vody pomocí silikagelu modifikovaného huminovými látkami (viz Obrázek 14). Tento materiál vykazoval iontové, hydrofobní a donor-akceptorové interakce. Za tyto interakce je odpovědné velké množství funkčních skupin. Výsledkem je, že tyto vrstvy stabilizované na vrstvě silikagelu mohou účinně adsorbovat nejen problematická azobarviva, která tvoří 50 % všech vyráběných barviv, ale i další kontaminující látky, což může mít velký přínos v sanačních procesech. [56]



Obrázek 14 - Schéma navázání HL na silikagel a způsob a schéma navázání azobarviva na HL [55]

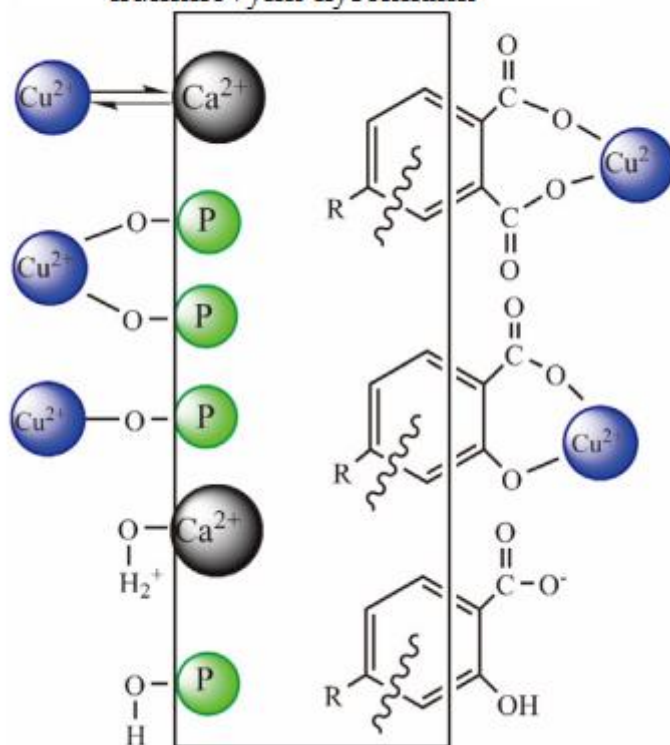
Podobným tématem se zabýval tým Prado z brazilské univerzity. Ti imobilizovali huminové kyseliny na silikagel za vzniku materiálu, který vykazoval dvojí vlastnosti, tepelnou a chemickou stabilitu silikagelu v kombinaci s chelatačními vlastnostmi huminových látek. Velkou výhodou tohoto materiálu byla především možnost opakovaného použití, jedná se o bezodpadovou techniku. Jejich model můžete vidět na Obrázek 15, kdy k navázání na silikagel dochází pomocí vodíkových vazeb mezi aminoskupinami modifikovaného oxidu křemičitého a karboxylovými kyselinami. Proces navázání indigokarmínu na huminové kyseliny může být oproti spontánní adsorpci ještě entropicky podpořen pomocí deprotonace huminových kyselin. [57]



Obrázek 15 - Způsob navázání huminových kyselin na silikagel [57]

Yang a spol. zkoumali adsorpční možnosti nízkonákladového biokompatibilního sorbentu hydroxyapatitu (HAP). Nanočástice hydroxyapatitu s navázanými huminovými kyselinami byly studovány pomocí infračervené spektroskopie FT-IR a pomocí SEM. Bylo zjištěno, že adsorpce Cu^{2+} iontů probíhá principem iontové výměny. Uplatňují se zde chelatační vlastností huminových kyselin (karboxylové a fenolické skupiny huminových kyselin). Adsorpce na povrch hydroxyapatitu s navázanými huminovými kyselinami (HAP/HK) je spontánní, endotermicky a entropicky výhodná. Obrázek 16 ukazuje interakční možnosti tohoto povrchu. [58]

Povrch hydroxyapatitu s navázanými huminovými kyselinami



Obrázek 16 - Ukázka interakcí s povrchem hydroxyapatitu s navázanými huminovými kyselinami [58]

Zhang a jeho tým zkoumali adsorpci methylenové modři na nanočástice oxidu železnato-železitého potaženého huminovými kyselinami, které byly připraveny metodou srážení. Průměrná velikost kulových částic byla 15 nm. Metoda TGA ukázala poměr s HK 2:1 (nano-částice $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{HK}$), kdy byly tyto částice stabilní v rozmezí pH 3,0–11,0. Výsledky ukázaly, že nanočástice $\text{HK}/\text{Fe}_3\text{O}_4$ vykazují mnohem vyšší adsorpci methylenové modři než holá Fe_3O_4 částice nebo samotný prášek huminové kyseliny. Adsorpce methylenové modři na $\text{HK}/\text{Fe}_3\text{O}_4$ je nejspíše elektrostatického původu v kombinaci s komplexními vlastnostmi HK. Záporně nabitě částice HK reagují s kationtovou methylenovou modří, kdy se elektrostatická přitažlivost zvyšuje s rostoucím pH. [59]

5 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

5.1 Použité chemikálie a spotřební materiál

K experimentům byly použity následující chemikálie:

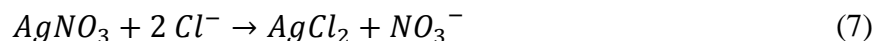
- Kyselina chlorovodíková 35% (Lach-Ner s.r.o)
- Hydroxid sodný (Penta)
- Kyselina fluorovodíková 38–40% (Lach-Ner s.r.o)
- Dusičnan stříbrný (Merci)
- Methylenová modř (Lachema)
- Čistá voda čištěná přístrojem PURELAB-flex
- Methanol p.a. (Lach-Ner s.r.o)
- Chloroform p.a. (Lach-Ner s.r.o)
- Hydrogenfosforečnan sodný, dihydrát (Penta)
- Dihydrogenfosforečnan sodný, dihydrát (Penta)
- Trimethylsilyl-diazomethan v hexanu, 2M (Acros)
- Silikonová pasta Lukosan (Lučební závody a.s., Kolín)
- Dialyzační membrána Spectra/Por® (Spectrum laboratories, Inc.)
 - Plošná šířka: 54 mm
 - Průměr: 34 mm
 - Objem/délka: 9,3 ml/cm
 - Délka: 15 m
 - MWCO: 3,500

5.2 Použité přístroje

- Centrifuga Rotina 46R Hettich
- Lyofilizátor Virtis benchtop K (Bio Trade s.r.o)
- Spektrofotometr UV-VIS HITACHI U-3900H
- Spektrofotometr FT-IR, Nicolet iS50
- Difúzní cely PrermeGear
- Multimetr Mettler-Toledo SevenMulti (pH metr)
- Modulární kalorimetr TAM III, TA Instruments, USA
- Termogravimetr TGA Q5000, TA Instruments

5.3 Extrakce huminových kyselin z lignitu

Zdrojem lignitu byl jemně granulovaný jihomoravský lignit. 60 g namletého lignitu bylo smícháno s 1 dm³ 0,1M roztoku HCl, vniklá suspenze byla ponechána 1 hodinu na třepačce. Dekalcinovaný lignit byl promyt dostatečným množstvím destilované vody tak, aby došlo k vymytí chloridových iontů (aplikováno 10krát), přítomnost chloridových iontů byla zjišťována pomocí důkazové reakce s AgNO₃ (viz rovnice (7)).



Takto připravený lignit byl převeden do plastové nádoby s extrakčním činidlem (0,1 M hydroxid sodný a 0,1 M bezvodý pyrofosfát). Láhev s extrakčním činidlem byla ponechána na třepačce 12 hodin.

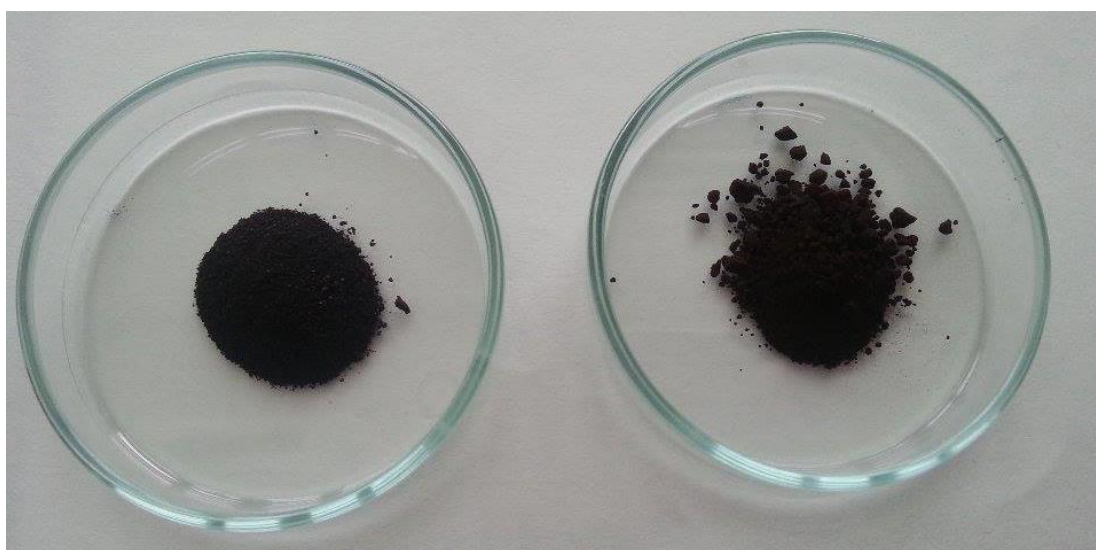
Získaná suspenze byla odstředěna a supernatant (roztok HK a FK) byl přefiltrován přes filtr. Získaný filtrát byl okyselen pomocí kyseliny chlorovodíkové na $\text{pH} = 2$. Po dvou hodinách došlo k vysrážení veškeré HK, která byla odstředěna od zbytku roztoku. Pevný podíl (HK) byl převeden do dialyzační membrány. Membrána byla hermeticky uzavřena a následně ponořena do kádinky s destilovanou vodou, která byla denně vyměňována vždy s důkazovou reakcí na přítomnost chloridových iontů (pomocí AgNO_3 , viz). Jakmile destilovaná voda nevykazovala přítomnost Cl^- iontů, byl vzorek HK lyofilizován. Extrakce huminových kyselin byla provedena třikrát. Byl připraven vlastní vzorek HK pro další práci. Takto bylo získáno 20,1 g huminových kyselin.

5.4 Selektivní methylace huminových kyselin

Pro porovnání reaktivity a vlivu karboxylových kyselin při vázání barviva, byla provedena methylace části izolovaných HK. Pomocí této metody byla provedena esterifikace karboxylových funkčních skupin.

K 1 g huminových kyselin byly přidány 4 cm^3 chloroformu a 2 cm^3 metanolu. Následně bylo přidáno 4 cm^3 2M roztoku trimethylsilyl-diazometanu v hexanu (TMS-DM). Směs byla míchána 2 hodiny na míchačce v digestoři. Po vybouření bylo přidáno dalších $0,75 \text{ cm}^3$ TMS-DM. Ze získaných modifikovaných kyselin bylo potřeba odpařit nereagované činidlo, vzorek byl sušen v digestoři při laboratorní teplotě.

Úspěch selektivní methylace bylo možné vizuálně posoudit na změně barvy, kdy vzorek HK má barvu černou a methylovaný vzorek HK hnědé zbarvení, a metodami FT-IT a TGA. Obrázek změny barvy a struktury je vidět na obrázku Obrázek 17).



Obrázek 17 - Porovnání barevnosti připravených vzorků. Vlevo HK, vpravo mHK

5.5 Příprava roztoků pro měření

5.5.1 Fosfátový pufr

Methylenová modř je planární molekula, která může nosit pozitivní náboj. Pokud je methylenová modř rozpuštěná v roztoku, má tendenci agregovat, což značně ovlivňuje její difúzní schopnosti. Agregace methylenové modři byla potvrzena spektrofotometricky při difúzním testu. Dimery methylenové modři silně adsorbují při 605 nm, zatímco monomery při 665 nm. Experimentálně bylo potvrzeno, že roztok methylenové modři při pH = 7 a při vysoké iontové síle vykazuje vyšší difuzivitu.

Pro následující experimenty byl na základě zjištěných vlastností methylenové modři zvolen fosfátový pufr, který pomohl udržet u připravených roztoků v okolí pH = 7.

5.5.1.1 Příprava fosfátového pufru

Fosfátový pufr se připravil smícháním 0,01M roztoku Na₂HPO₄ a 0,01M roztoku NaH₂PO₄ v poměru 61:39. Bylo naváženo 2,6699 g NaH₂PO₄ a následně rozpuštěno v 1,5 litru čisté vody. Dále bylo naváženo 1,5601 g Na₂HPO₄ a rozpuštěno také v čisté vodě. Bylo odměřeno 1,22 l roztoku NaH₂PO₄, 0,78 l roztoku Na₂HPO₄. Roztoky byly smíchány a promíchány v 2 litrové odměrné baňce. Bylo změřeno pH. U všech připravených roztoků se pH pohybovalo v rozmezí 6,5–7,3.

5.5.2 Roztoky huminových kyselin

Roztoky huminových kyselin byly připravovány jako zásobní v koncentracích 0,1 g/l a 0,05 g/l huminových kyselin/methylovaných huminových kyselin (HK/mHK) do odměrných baněk o různých objemech tak, aby nebylo připraveno zbytečně velké množství roztoku. Na každý experiment bylo vždy potřeba připravit čerstvý roztok.

Pro dialyzační experimenty byla navážka rozpuštěna v zásaditém roztoku. Následně byl roztok zředěn do požadovaného objemu fosfátovým pufrem. Pro ITC experimenty byl použit vzorek HK a mHK, který byl zředěn do požadované koncentrace buď pufrem, nebo čistou vodou, v závislosti na typu experimentu. Přesný postup při práci ukazují následující podkapitoly:

5.5.2.1 Příprava roztoků pro ITC experimenty

- 0,1 g/l HK v 0,01M NaOH (v čisté vodě/fosfátovém pufre) – bylo rozpuštěno 0,02 g NaOH v 50 ml čisté vody/fosfátovém pufre. Do tohoto roztoku byla převedena navážka 0,01 g HK. Vzorek byl umístěn na magnetickou míchačku po dobu 24 hodin a poté byl naředěn čistou vodou/fosfátovým pufrem v odměrné baňce o objemu 100 ml. Bylo změřeno pH.
- 0,05 g/l HK v 0,01M NaOH (ve vodě/fosfátovém pufre) – byl připraven pomocí ředění roztoku 0,1 g/l HK v 0,01M NaOH. Bylo odebráno 50 ml toho roztoku do odměrné baňky o objemu 100 ml. Roztok byl naředěn pomocí čisté vody/fosfátového pufru. Bylo změřeno pH.

- 0,1 g/l mHK v 0,05M NaOH (ve vodě/fosfátovém pufru) – bylo rozpuštěno 0,1 g NaOH v 50 ml čisté vody/fosfátového pufru. Do tohoto roztoku byla převedena navážka 0,01 g mHK. Vzorek byl umístěn na magnetickou míchačku po dobu 48 hodin a poté byl naředěn čistou vodou na objem 100 ml do odměrné baňky. Bylo změřeno pH.
- 0,05 g/l mHK v 0,01M NaOH (ve vodě/ fosfátovém pufru) – byl připraven pomocí ředění roztoku 0,1 g/l mHK v 0,01M NaOH (ve vodě a fosfátovém pufru). Bylo odebráno 50 ml tohoto roztoku do odměrné baňky o objemu 100 ml. Roztok byl naředěn pomocí čisté vody/fosfátového pufru. Bylo změřeno pH.

5.5.2.2 Příprava roztoků pro SolCal experimenty

- byl rozpuštěn 1 g methylenové modři v 50 ml čisté vody,
- bylo rozpuštěno 0,04 g NaOH ve 100 ml čisté vody a do tohoto roztoku byla převedena navážka 0,05 g HK,
- bylo rozpuštěno 0,08 g NaOH ve 100 ml čisté vody a do tohoto roztoku byla převedena navážka 0,05 g mHK.

5.5.2.3 Příprava roztoků pro difúzní experimenty

- 0,1 g/l HK v 0,01M NaOH (ve fosfátovém pufru) – bylo rozpuštěno 0,04 g NaOH ve 100 ml čisté vody. Do tohoto roztoku byla převedena navážka 0,05 g HK. Vzorek byl umístěn na magnetickou míchačku po dobu 24 hodin a poté byl naředěn fosfátovým pufrům na 500 ml do odměrné baňky. Bylo změřeno pH.
- 0,05 g/l HK v 0,01M NaOH (ve fosfátovém pufru) – byl připraven pomocí ředění roztoku 0,1 g/l HK v 0,01M NaOH. Bylo odebráno 250 ml tohoto roztoku do odměrné baňky o objemu 500 ml. Roztok byl naředěn pomocí fosfátového pufru. Bylo změřeno pH.
- 0,1 g/l mHK v 0,05M NaOH (ve fosfátovém pufru) – bylo rozpuštěno 0,2 g NaOH ve 100 ml čisté vody. Do tohoto roztoku byla převedena navážka 0,05 g mHK. Vzorek byl umístěn na magnetickou míchačku po dobu 48 hodin a poté byl naředěn fosfátovým pufrům na 500 ml do odměrné baňky. Bylo změřeno pH.
- 0,05 g/l HK v 0,01M NaOH (ve fosfátovém pufru) – byl připraven pomocí ředění roztoku 0,1 g/l mHK v 0,05M NaOH. Bylo odebráno 250 ml tohoto roztoku do odměrné baňky o objemu 500 ml. Roztok byl naředěn pomocí fosfátového pufru. Bylo změřeno pH.

5.5.3 Roztoky methylenové modře

Na všechny experimenty byly používány různé počáteční koncentrace methylenové modře. Pro každý z experimentů byly vždy připravovány nové roztoky MM. Na dialyzační experimenty byla methylenová modř rozpuštěna ve fosfátovém pufru, v případě kalorimetrických experimentů byla methylenová modř rozpuštěna dle experimentu buď v čisté vodě, nebo ve fosfátovém pufru.

5.5.3.1 Příprava roztoků pro difúzní experimenty

Pro difúzní experimenty byly zvoleny 4 výchozí koncentrace MM. Jmenovitě 0,1 g/l, 0,05 g/l, 0,025 g/l a 0,01 g/l MM. Tento výběr byl uskutečněn na základě zkušeností z práce Ing. Petra Sedláčka, Ph.D., vedoucího mé práce a Bc. Evy Fryšové, na jejichž experimenty navazuji.

- Pro koncentraci 0,1 g/l MM bylo naváženo 0,05 g/l methylenové modře. Tato navážka byla kvantitativně převedena do odměrné baňky o objemu 500 ml a doplněna po rysku fosfátovým pufrům.
- Pro koncentraci 0,05 g/l MM bylo naváženo 0,025 g methylenové modře. Tato navážka byla kvantitativně převedena do odměrné baňky o objemu 500 ml a doplněna po rysku fosfátovým pufrům.
- Pro koncentraci 0,025 g/l MM bylo naváženo 0,0125 g methylenové modře. Tato navážka byla kvantitativně převedena do odměrné baňky o objemu 500 ml a doplněna po rysku fosfátovým pufrům.
- Pro koncentraci 0,01 g/l MM bylo naváženo 0,005 g methylenové modře. Tato navážka byla kvantitativně převedena do odměrné baňky o objemu 500 ml a doplněna po rysku fosfátovým pufrům.

5.5.3.2 Příprava roztoků pro kalibrační řadu methylenové modři

Pro difúzní experimenty byla připravena kalibrační řada roztoků s různou koncentrací MM (0,1 g/l; 0,05 g/l; 0,01 g/l; 0,005 g/l; 0,0025 g/l; 0,001 g/l; 0,0005 g/l; 0,00025 g/l). Ze zásobního roztoku o koncentraci 0,1 g/l MM bylo odpipetováno 5 ml MM a zředěno na objem 50 ml pomocí fosfátového pufru (0,01 g/l MM), další roztoky pak byly připraveny ředěním. Naměřená kalibrační křivka byla použita k výpočtu poklesu koncentrace barviva ve zdrojové cele při difúzních experimentech.

5.6 Charakterizace huminových kyselin

Nedílnou součástí práce byla také charakterizace používaných vzorků HK a mHK. K jejich charakterizaci a k ověření úspěšné methylace byla použita FT-IR a TGA analýza

5.6.1 FT-IR

Měření bylo prováděno na FT-IR spektrofotometru Nicolet iS50 pro vzorek HK, i pro mHK. Byla vybrána metoda DRIFT (technika difúzní reflektance). DRIFT byla vyvinuta speciálně za účelem studia měření práškových vzorků. Při této technice se infračervené záření přivádí na práškový vzorek, část je absorbována, část je odražena a rozptýlena. Rozptýlené záření je převedeno vhodným optickým zařízením na detektor spektroskopu. Difúzně reflektanční spektra jsou vyjádřena v lineárních jednotkách funkce Kubelka-Munk, které odpovídají absorpanci.

Malé množství vzorku HK a následně mHK bylo umístěno na vzorkovací jamku, která byla zavedena do přístroje. Spektra byla stanovena s rozlišením 8 cm^{-1} jako průměr skenů 65.

5.6.2 TGA analýza

Měření probíhalo na přístroji TGA Q5000 (TA Instruments). Na analytických vahách bylo do hliníkové pánvičky naváženo 3–5 mg HK/mHK. Odtud byla pánvička pinzetou přesunuta do přístroje na čidlo. Na druhé, referenční čidlo, byla umístěna prázdná pánvička ze stejného materiálu. Byl spuštěn teplotní program s tímto nastavením:

- Stoupání teploty o 10 °C/min
- Lineární nárůst teploty
- Teplota do 800 °C
- Oxidační atmosféra (čištěný vzduch)

5.7 Kalorimetrické experimenty

5.7.1 Postup měření izotermické titrační kalorimetrie (ITC)

Do měrné ocelové cely bylo napipetováno 750 μl vybraného vzorku rozpuštěných huminových kyselin tak, aby nevznikly bubliny. Cella byla následně postupně pomalu zasouvána do přístroje. Bylo nastaveno míchání 100 otáček za minutu. Fotografii cely je k vidění na Obrázek 18.



Obrázek 18 - cely ITC [60]

Stříkačka s ocelovou kapilárou o celkovém objemu 250 μl (Hamilton) byla opatrně pomocí kapátka naplněna vybraným roztokem methylenové modře. Při plnění nesměly vzniknout vzduchové bubliny, které by ovlivnily měření. Kapilára byla zasunuta do ampule měrné cely a stříkačka byla umístěna do dávkovací pumpy.

5.7.2 Parametry měření

- Počet přídavků: 50
- Objem každého přídavku: 5 μl
- Doba přídavku: 5 s
- Interval mezi jednotlivými přídavky: 15 min
- Konstantní teplota titrace: 25 $^{\circ}\text{C}$
- Celkový dávkovaný objem titračního roztoku: 250 μl
- Celkový čas měření: 12,5 hodiny
- Na začátku titrace bylo v cele 750 μl vzorku HK, mHK
- 100 otáček za minutu

5.7.3 Postup měření rozpouštěcí kalorimetrie (SolCal)

Do 100 ml měřicí cely bylo napipetováno 100 ml 0,1 g/l HK. Do jednorázové ampule byl vpraven cca 1 ml připraveného roztoku koncentrované methylové modři. Obsah ampule byl zvážen. Následně byla ampule zazátkována, hermeticky uzavřena včelím voskem a umístěna do míchadla a do měřicí cely, která byla následně zasunuta do kalorimetru. Obrázek 19 prezentuje měřicí celu.

Byl spuštěn automatický program s nastavenou teplotou 25 °C. Po 40 minutách, kdy proběhla první elektricky řízená kalibrace, došlo k rozbití ampule s barvivem. Zaznamenala se velmi nevýrazná změna teploty odpovídající interakci barviva se vzorkem huminové kyseliny. Následovalo ustálení signálu, druhá kalibrace a ukončení měření.



Obrázek 19 - cela SolCal [60]

5.8 Difúzní experimenty

5.8.1 Postup měření

Pro experiment byly připraveny difúzní cely PermeGear. Okraje difúzních cel byly potřeny silikonem (Lukasan) a následně byla mezi cely vložena jednoduchá dialyzační membrána (Spectra/Por®). Do každé dialyzační cely bylo vloženo malé magnetické míchadlo, které bylo potřeba umístit do malého prostoru na dně cely. Spojení cel bylo provedeno pomocí bočních svorek, aby byly cely dokonale fixovány a nedošlo k jejich posunutí vůči sobě a tím k uvolnění membrány, smíchání roztoku zdrojové a přijímací cely či vytečení obsahu cel.

Pomocí nálevky bylo současně nalito 50 ml methylenové modři do zdrojové cely a 50 ml roztoku huminových kyselin (nebo mHK) do přijímací cely. Cely byly umístěny na magnetickou míchačku s rychlostí 250 otáček za minutu. Prázdné cely připravené pro experiment můžete vidět na Obrázek 20.



Obrázek 20 – Používané difúzní cely

4.8.2 Nastavení spektrofotometru (UV-VIS HITACHI U-3900H)

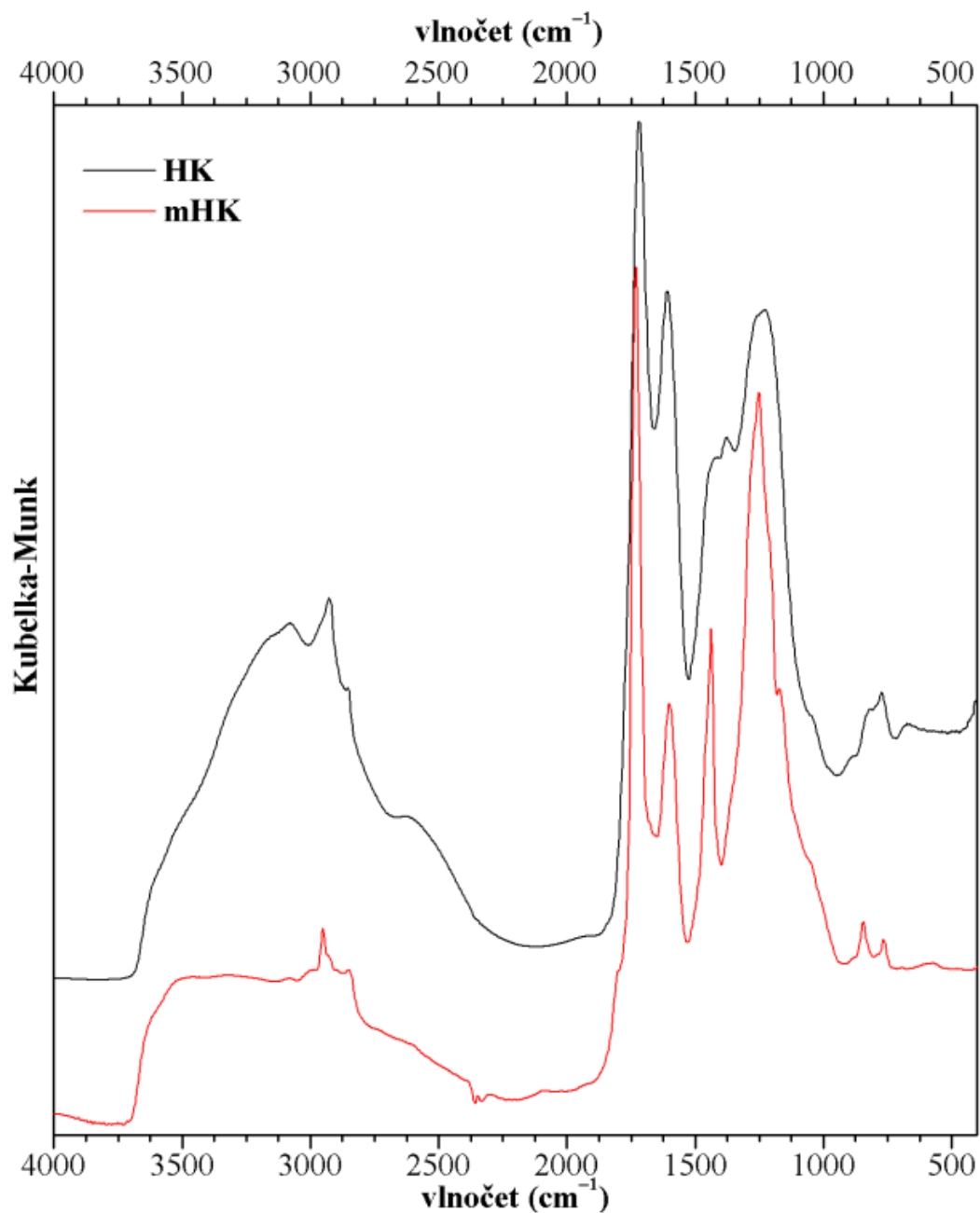
- Rozsah vlnových délek: 900–200 nm
- Rychlost: 300 nm/min
- Měřená veličina: absorbance
- Změna lamp při: 340 nm
- Šířka štěrby: 4 nm
- Výstupní zpráva: MS Excel

6 VÝSLEDKY A DISKUSE

6.1 Charakterizace huminových kyselin

6.1.1 FT-IR spektroskopie

Pro charakterizaci vzorků HK a mHK byla použita metoda FT-IR. Pro měření byla vybrána absorbance v rozsahu vlnočtů 4000–500 cm^{-1} . Naměřená spektra HK a mHK můžeme vidět v grafu na Obrázek 21. Rozdíly mezi HK a mHK můžete sledovat v Tabulka 5.



Obrázek 21 - Graf závislosti absorbance na vlnové délce.
Černá křivka HK, červená křivka mHK.

Černá křivka představuje odezvu HK a červená křivka odezvu mHK. Tato metoda nám nejen potvrdila přítomnost funkčních skupin, které jsou pro huminové látky charakteristické, tedy karboxylové, hydroxylové, fenolové, karbonylové a amidové funkční skupiny, ale i aromatické struktury, kterými jsou HL obecně tvořeny. Posuny ve vlnočtech a esterová vazba odpovídá skutečnosti, že došlo k methylaci HK.

V absorpční oblasti $3600\text{--}3000\text{ cm}^{-1}$ můžeme vidět u HK slaběji u mHK široký pík, který je připisován valenčním vibracím --OH skupin (jak z karboxylových skupin, tak z fenolických skupin, ale také v malé míře příspěvkem aminů a amidů), které jsou zapojeny do tvorby vodíkových vazeb, díky kterým vzniká supramolekulární struktura HK. Tento pík je natolik výrazný, že překrývá některé významné části spektra, které by mohly sloužit k další podrobnější analytické diagnostice.

Pík v oblasti 2927 cm^{-1} odpovídá asymetrickým valenčním vibracím --C--H v --CH_2 (u HK). Pík oblasti 2952 cm^{-1} odpovídá asymetrické valenční vibraci vazby --C--H v --CH_3 skupině (u mHK).

Symetrické valenční vibrace vazby --C--H u --CH_3 nacházíme u HK v oblasti 2855 cm^{-1} a u mHK v oblasti 2852 cm^{-1} .

Pík v oblasti kolem 1718 cm^{-1} je obecně přičítán symetrické valenční vibraci --C=O (u HK). Jedná se zejména o vibrace karboxylové skupiny, v menší míře potom vibrační pás ketonových a aldehydových skupin, amidových a chinonových skupin.

Okolí píku 1609 cm^{-1} také odpovídá skeletálním vibracím vazeb --C=C-- aromatického kruhu (u HK). Pík těchto struktur nacházíme v okolí píku 1600 cm^{-1} (u mHK). Struktury aromátů jsou jak kruhové, tak polokruhové.

Pík v oblasti 1415 cm^{-1} odpovídá valenčním vibracím skupiny --COOH (u HK). Pík 1438 cm^{-1} odpovídá deformačním asymetrickým vibracím --C--H vazeb v --CH_3 .

Píky v oblasti 1380 cm^{-1} a $2970\text{--}2930\text{ cm}^{-1}$ jsou přičítány vibraci --C--H alifatických řetězců a vibracím methoxylových skupin.

U mHK pík 1252 cm^{-1} odpovídá valenčním vibracím --C--O--C-- v aryl esterech a pík 1252 cm^{-1} odpovídá této skupině v aryl esterech.

Pík v okolí 1228 cm^{-1} (HK) odpovídá valenční vibraci --C--O-- vazby a deformačním vibracím --OH vazby v karboxylové skupině.

Vibrační píky v oblasti 766 cm^{-1} (mHK) a 773 cm^{-1} jsou přičítány mimorovinným deformačním vibracím --C--H vazeb v aromatickém kruhu.

Naměřené spektra byly porovnány s odbornými články zabývající se problematikou HK a mHK. [61–64]

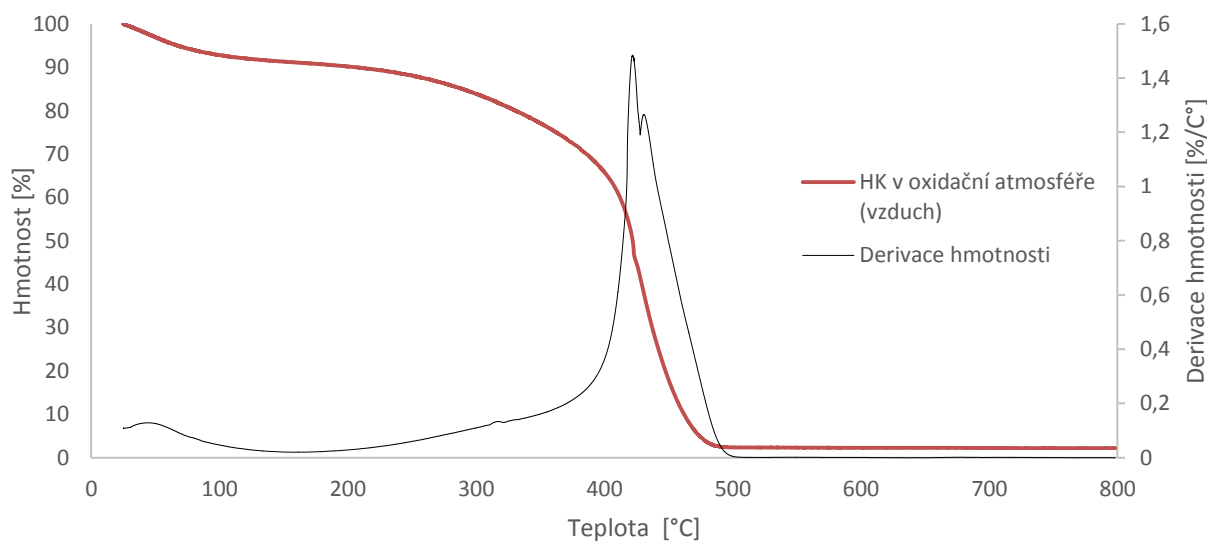
Tabulka 5 - Vyhodnocení FT-IR pro HK a mHK

HK		mHK	
Vlnočet v cm^{-1}	Popis vibrace	Vlnočet v cm^{-1}	Popis vibrace
2927	Asymetrické valenční vibrace C-H v -CH_2	2952	Asymetrické valenční vibrace C-H v -CH_3
2855	Symetrické valenční vibrace C-H v -CH_2	2852	Symetrické valenční vibrace C-H v -CH_2
1718	symetrické valenční vibrace C=O v karboxylových skupinách	1732	Symetrické valenční vibrace C=O v aryl esterech
1609	Skeletální vibrace C=C- aromátů	1600	Skeletální vibrace C=C- aromátů
1415	Valenční symetrická vibrace -COOH	1438	Deformační asymetrická vibrace C-H vazeb v -CH_3
1228	Valenční vibrace C-O a deformační vibrace -OH v -COOH	1252	Valenční vibrace C-O-C- v aryl esterech
773	Mimorovinná deformační vibrace C-H vazeb v aromátech	1172	Valenční vibrace C-O-C- v alkyl esterech
–	–	766	Mimorovinná deformační vibrace C-H vazeb v aromátech

6.1.2 Termogravimetrická analýza

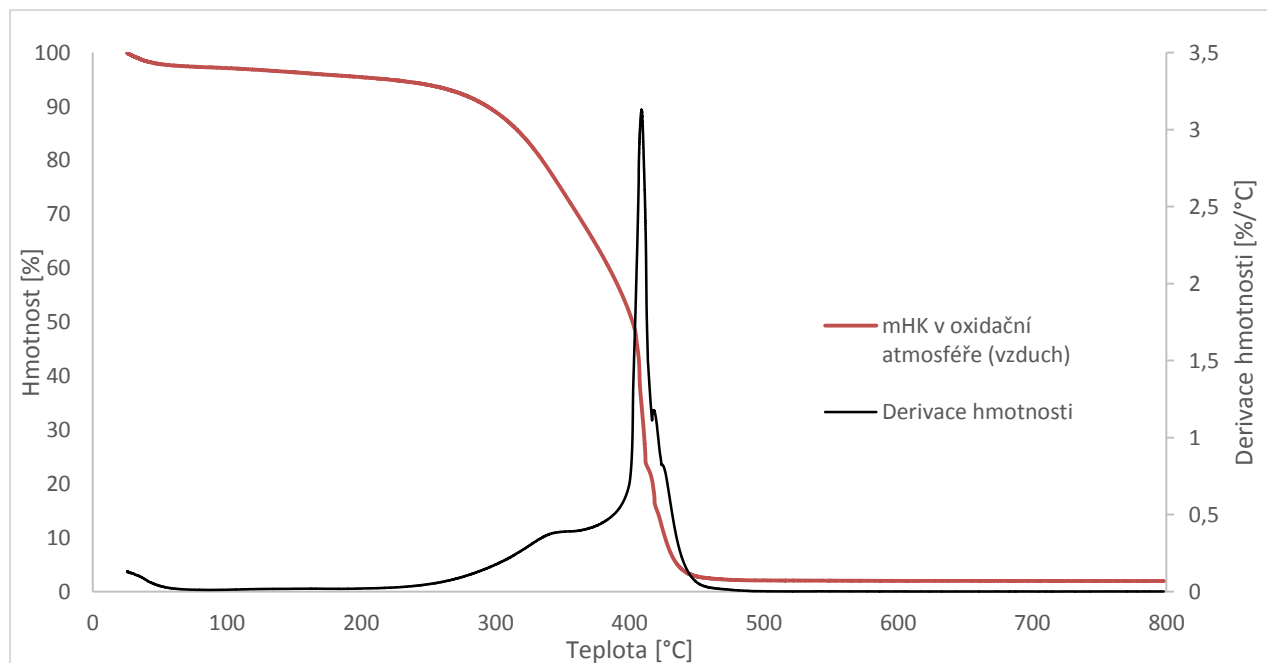
Termogravimetrická měření byla prováděna pomocí přístroje TA Instruments TGA Q5000. Pomocí této metody byly proměřeny dva vzorky a to HK a mHK v oxidační atmosféře (vzduch). Byl stanoven celkový obsah vody a popele u těchto vzorků.

Celkový hmotnostní úbytek vody ve vzorku HK do hraniční teploty cca 150 °C byl 8,67 hm%. Poté v rozmezí 150–800 °C došlo ke spálení organické hmoty, při teplotě 800 °C byl změřen popel, představující anorganickou hmotu. Obsah popele 2,35 hm% byl určen ze zbylé hmotnosti vzorku HK. Organická hmota odpovídala 88,98 hm%. Záznam měření je znázorněn v grafu na Obrázek 22.



Obrázek 22 - Záznam z měření TGA pro HK

Celkový hmotnostní úbytek vody ve vzorku mHK do hraniční teploty cca 150 °C byl 2,53 hm%. Poté v rozmezí 150–800 °C došlo ke spálení organické hmoty, při teplotě 800 °C byl změřen popel, představující anorganickou hmotu. Obsah popele 2,14 hm% byl určen ze zbylé hmotnosti vzorku mHK po jeho vystavení teplotě 800 °C. Organická hmota odpovídala 95,33 hm%. Záznam měření je znázorněn v grafu na Obrázek 23Obrázek 22.



Obrázek 23 - Záznam z měření TGA pro mHK

Černá křivka znázorňuje teplotní derivaci úbytku hmotnosti a vyjadřuje rychlost, s jakou vzorek při daném teplotním programu v daném okamžiku ztrácí svoji hmotnost. Na této křivce se ukázaly rozdíly mezi vzorek HK a mHK. U mHK začal úbytek hmotnosti dříve a z odečtu hmotnostního úbytku a vody a popele byl o 6,35 hm% vyšší. Tento rozdíl odpovídá termické labilitě způsobenou methylovaného vzorku mHK. Naměřená data jsou shrnuta v Tabulka 6.

Tabulka 6 - Výsledky termogravimetrické analýzy HK a mHK

	HK	mHK
Obsah vlhkosti [hm%]	8,67	2,53
Obsah anorganické hmoty (popel) [hm%]	2,35	2,14
Obsah organické hmoty [hm%]	88,98	95,33

6.2 Kalorimetrické experimenty

6.2.1 Izotermická titrační kalorimetrie

Jak již bylo zmíněno v kapitole 3.8.1, díky veliké citlivosti můžeme spolehlivě měřit termodynamické veličiny, které popisují charakter interakce mezi zkoumanými látkami, např. vazebnou entalpii ΔH , rovnovážnou konstantu K a také k určení reakční stechiometrie. Získáme charakteristickou křivku závislosti tepelného toku na čase. Píky pod touto křivkou můžeme integrovat a získat tak závislost změny vazebné entalpie ΔH .

6.2.2 Izotermická titrační kalorimetrie HK/mHK

Pro kalorimetrické experimenty byly zvoleny identické počáteční koncentrace MM a HK/mHK, které byly použity na experimenty v difúzních celách. Zkoumána byla i počáteční koncentrace 1 g/l MM proti koncentraci 0,1 a 0,05 g/l HK/mHK. Všechny tyto kombinace jsou uvedeny v *Tabulka 7 - Přehled kombinací použitých na ITC*.

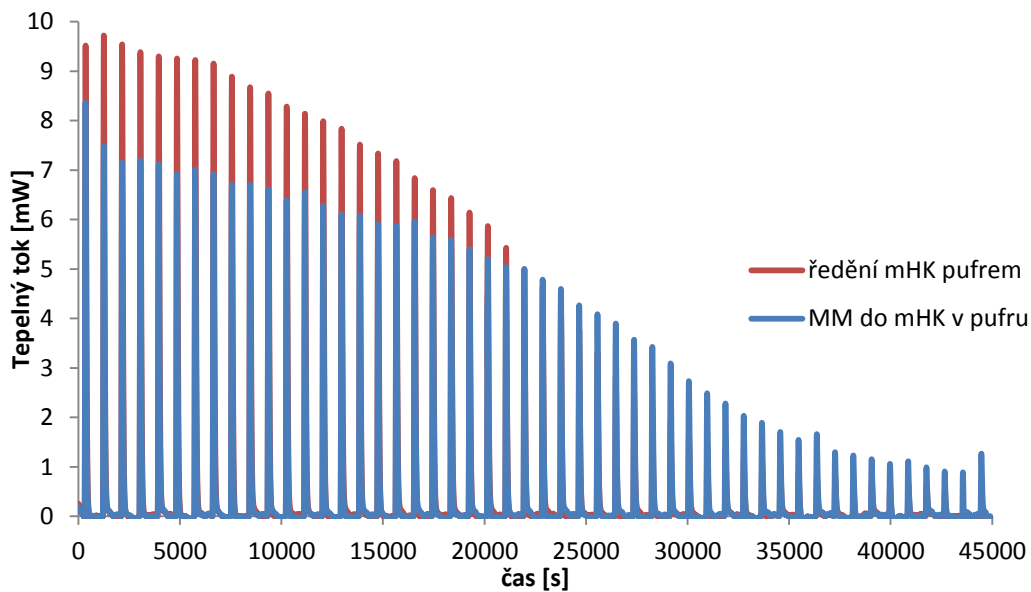
Tabulka 7 - Přehled kombinací použitých na ITC

Roztok, kterým bylo titrováno	Titrovaný roztok v pufru			
MM 0,1 g/l nebo 0,05 g/l	HK 0,05	HK 0,1	mHK 0,1	mHK 0,05
MM 1 g/l	HK 0,05	HK 0,1	mHK 0,1	mHK 0,05
Pufr	HK 0,05	HK 0,1	mHK 0,1	mHK 0,05
MM 1 g/l	Pufr			
Roztok, kterým bylo titrováno	Titrovaný roztok v čisté vodě			
MM 0,1 g/l nebo 0,05 g/l	HK 0,05	HK 0,1	mHK 0,1	mHK 0,05
MM 1 g/l	HK 0,05	HK 0,1	mHK 0,1	mHK 0,05
Voda	HK 0,05	HK 0,1	mHK 0,1	mHK 0,05
MM 1 g/l	Voda			

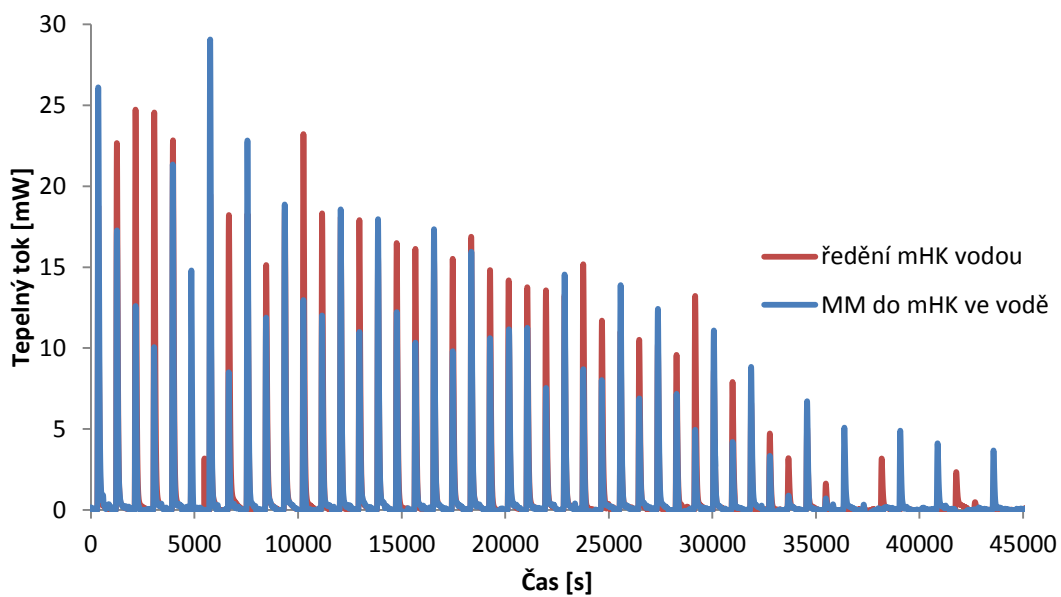
V grafu na Obrázek 24 můžete vidět záznam měření blanku (titrace mHK fosfátovým pufrům) a titraci 1 g/l MM do 0,1 mHK ve fosfátovém pufru. Signál obou měření je takřka identický vzhledem k jednotkám, ve kterých se pohybujeme, proto jsme usoudili, že signál odpovídá pouze ředění roztoku mHK. Z tohoto důvodu bylo přistoupeno k měření v čisté vodě.

V grafu na obrázku Obrázek 25 můžete vidět záznam z druhého měření blanku (titrace mHK čistou vodou) a titraci 1 g/l MM do 0,1 mHK ve vodě. Obdrželi jsme silnější signál, ale obě měření byla opět identická. I zde signál odpovídal pouze ředění roztoku mHK. Je zřejmé, že signál může ovlivňovat i molární koncentrace NaOH, který byl použit na ředění HK (0,01 M NaOH) a mHK (0,05 M NaOH).

Při žádné kombinaci roztoků uvedených v tabulce 7 se neprojevuje výrazný entalpický efekt. Na vyhodnocení je vidět odezva systému, ale v obou případech se jedná nejspíše o ředění roztoků, než-li o interakci HK/mHK s MM.



Obrázek 24 - Graf závislosti tepelného toku na čase
 (červený signál titrace fosfátového pufru do 0,1 g/l mHK,
 modrý signál titrace 1 g/l MM do 0,1 mHK ve fosfátovém pufru)

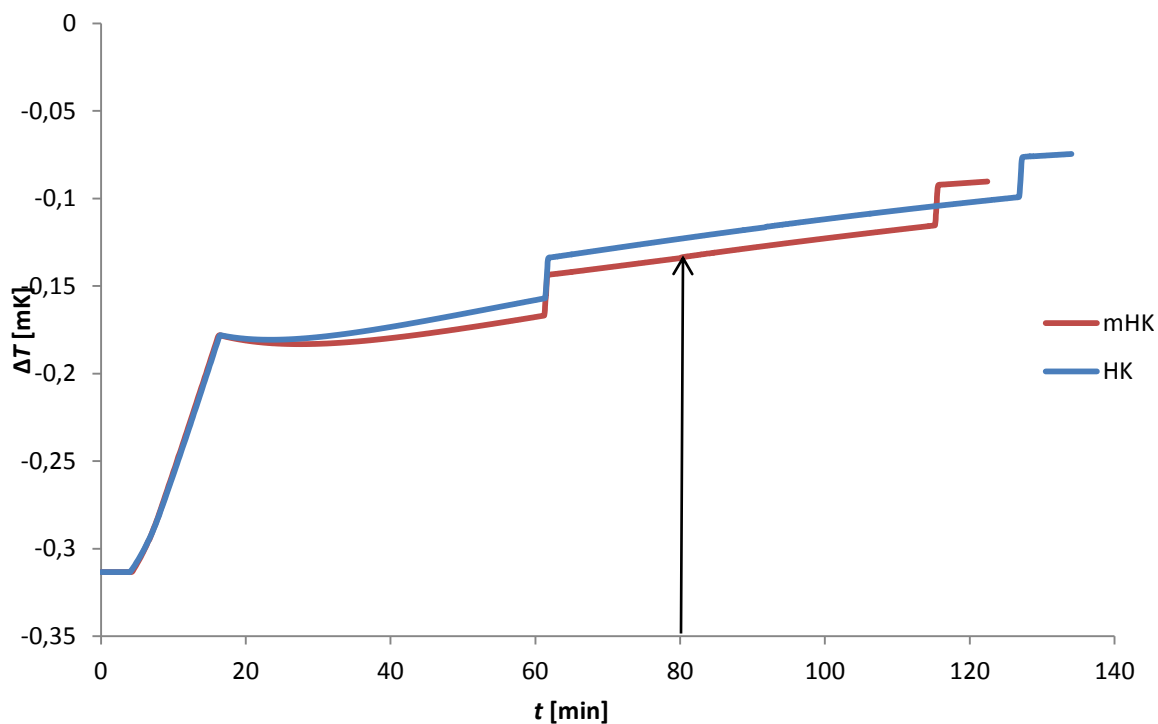


Obrázek 25 - Graf závislosti tepelného toku na čase
 (červený signál titrace čisté vody do 0,1 g/l mHK,
 modrý signál titrace 1 g/l MM do 0,1 mHK ve vodě)

6.3 Rozpouštěcí kalorimetrie

Jak již bylo napsáno v kapitole 3.8.2, tato metoda slouží ke stanovení rozpouštěcího tepla. Tuto metodu jsme využili při měření tepelného zabarvení míšení roztoku huminové kyseliny/methylované huminové kyseliny s methylenovou modří. Roztok byl vysoce koncentrovaný tak, aby po rozbití ampulky došlo k naředění na požadovanou počáteční koncentraci MM, tedy 0,1g/l.

V grafu na Obrázek 26 můžeme vidět graf závislosti rozdílu teploty na čase. První zlom na křivkách v čase 63 minut odpovídá 1. kalibraci, zlom v čase cca 115 minut odpovídá 2. kalibraci. Pro HK, která je v grafu zobrazena jako modrá křivka, došlo k rozbití ampule v čase 81 min a pro mHK, která je v grafu zobrazena jako červená křivka, v čase 80 min. Výsledky ukazují, že proces je exotermně zabarven a výsledky potvrdily, že entalpie je malá a hnací silou bude entropický efekt. Při míšení MM o koncentraci 0,05 g/l s HK o koncentraci 0,1 g/l se uvolní 389 mJ/g tepla, při míšení MM o koncentraci 0,05 g/l s mHK o koncentraci 0,1 g/l se uvolní 340 mJ/g tepla.



Obrázek 26 - Graf závislosti teploty na čase, metoda rozpouštěcí kalorimetrie

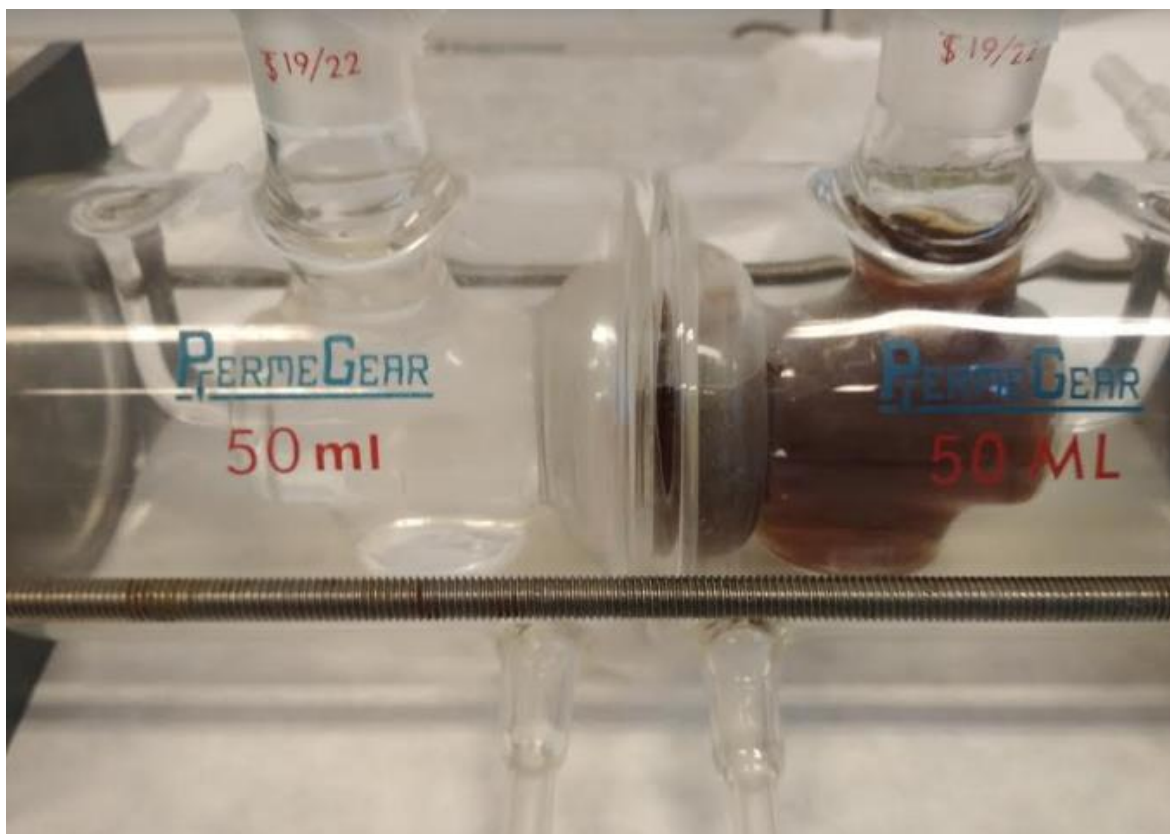
6.4 Difúzní experimenty

Během experimentů byla sledována snižující se počáteční koncentrace MM ve zdrojové cele. Při předpokladu, že se část barviva naváže na HK/mHK a po čase se dosáhne rovnováhy mezi celami rozdělenými dialyzační membránou, poskytuje koncentrace volného (nenavázaného) barviva kvantitativní vyjádření míry interakce mezi barvivem a HK/mHK v přijímací cele aparatury. Z této rovnováhy můžeme zjistit poměr mezi koncentrací navázaného a volného barviva, tzv. zdánlivá rovnovážná konstanta K_{app} (zdánlivá, protože uvažuje zjednodušené reakční schéma, viz rovnice ((1))).

6.4.1 Optimalizace měření

Pro měření bylo třeba ověřit dvě podmínky. První podmínkou je nepropustnost dialyzační membrány pro HK a mHK a druhou podmínkou je propustnost dialyzační membrány pro methylenovou modř.

Kontrola prostupnosti HK a mHK přes dialyzační membránu byla realizována sérií dvou experimentů. Nejdříve s použitím dvojité dialyzační membrány a následně s jednoduchou dialyzační membránou. V obou případech byl do zdrojové cely umístěn roztok HK/mHK a do přijímací cely čistá voda. Po dobu dvou týdnů bylo zkoumáno vizuálně (Obrázek 27) a analytickou metodou (UV-VIS spektrofotometrie), zdali nedochází k průchodu HK/mHK přes dialyzační membránu. Po dvou týdnech byly experimenty ukončeny s nulovým prostupem. Na základě toho byla z ekonomických důvodů zvolena jednoduchá dialyzační membrána, která se ukázala jako dostatečně nepropustná pro naše potřeby.



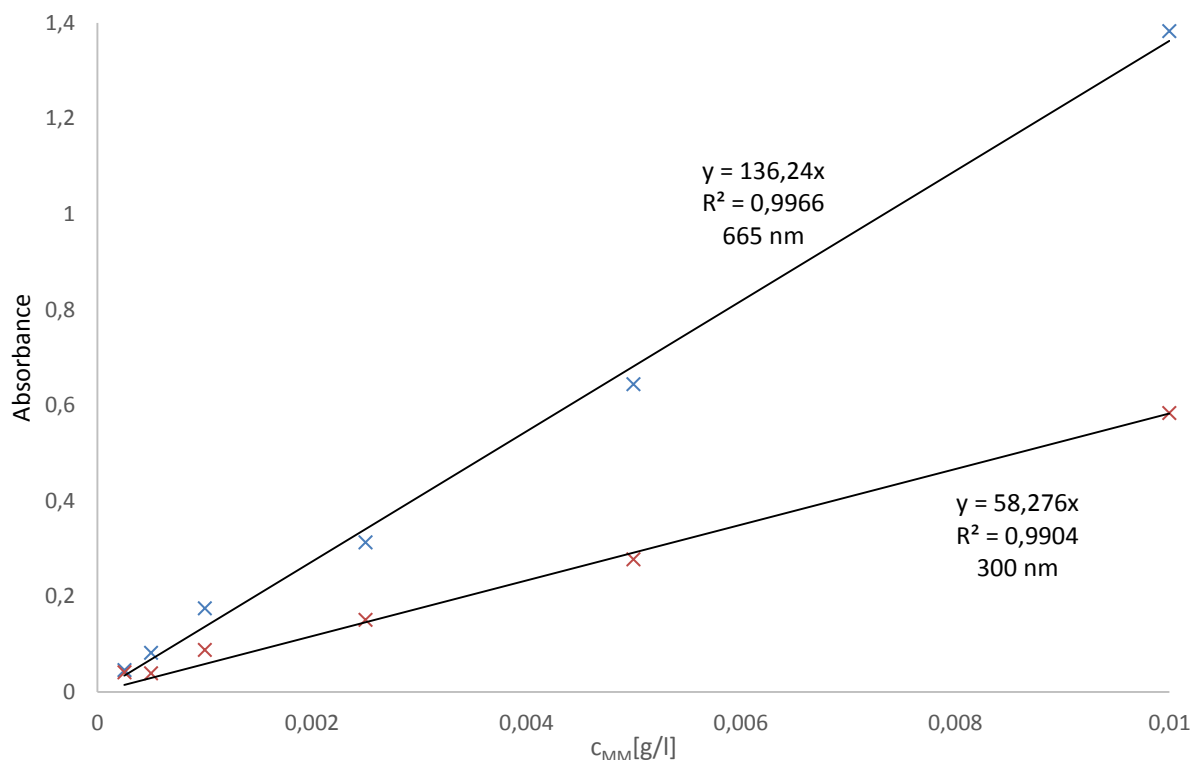
Obrázek 27 - Měření propustnosti dialyzační membrány.
Vpravo roztok huminových kyselin (zdrojová cela), vlevo rozpouštědlo (přijímací cela)

Propustnost methylenové modře byla zkoumána podobným způsobem. Na základě literární rešerše a zkušeností vedoucího mé práce a Bc. Evy Fryšové byla zvolena výchozí koncentrace 0,1 g/l MM. Do zdrojové cely byl umístěn roztok MM o počáteční koncentraci 0,1 g/l, do přijímací cely čisté rozpouštědlo. Následně byl zkoumán prostup barviva tentokrát již přes jednoduchou dialyzační membránu. Pomocí UV-VIS spektrofotometrie bylo dokázáno, že dialyzační membrána je prostupná pro methylenovou modř, jelikož byla změřená absorbance ve zdrojové i přijímací cele téměř totožná po 72 hodinách. Při měření jsme brali v úvahu, že se část barviva absorbuje na membránu. Při počáteční koncentraci 0,1 g/l MM prostupuje MM skrz dialyzační membránu a malá část se absorbuje na dialyzační membránu. Během 10 dnů došlo k téměř úplnému odbarvení dialyzační membrány. Lze tedy vliv absorpce MM na dialyzační membránu téměř zanedbat. Se snižující se vstupní koncentrací MM byla absorpce na membránu menší, při koncentraci 0,01 g/l nevykazovala dialyzační membrána téměř žádnou absorpci, ale v případě nízkých koncentrací MM ji již nelze úplně zanedbat, je třeba brát také v úvahu sorpci na stěny difúzních cel.

Pro další měření byly zvoleny 4 následující počáteční koncentrace MM - 0,1 g/l, 0,05 g/l, 0,025 g/l a 0,01 g/l. Tyto koncentrace byly vybrány, abychom mohli sledovat a porovnat množství MM, které je schopné se na HK/mHK navázat v závislosti na různé počáteční koncentraci MM ve zdrojové cele.

6.4.2 Kalibrační křivka

Příprava roztoků k nachystání roztoků kalibrační řady methylenové modři byla popsána v kapitole 5.5.3.2. Z absorpčního spektra byly vybrány vlnové délky 665 a 300 nm, kde má methylenová modř svá dvě absorpční maxima. Z důvodu vyšší citlivosti bylo následně vybráno maximum při vlnové délce 665 nm. Získaná kalibrační křivka z maxima 665 nm byla použita k výpočtu poklesu koncentrace barviva ve zdrojové cele při difúzních experimentech a následných výpočtech K_{app} . Kalibrační křivky jsou znázorněny v grafu na Obrázek 28.



Obrázek 28 - Graf závislosti absorpance na koncentraci MM

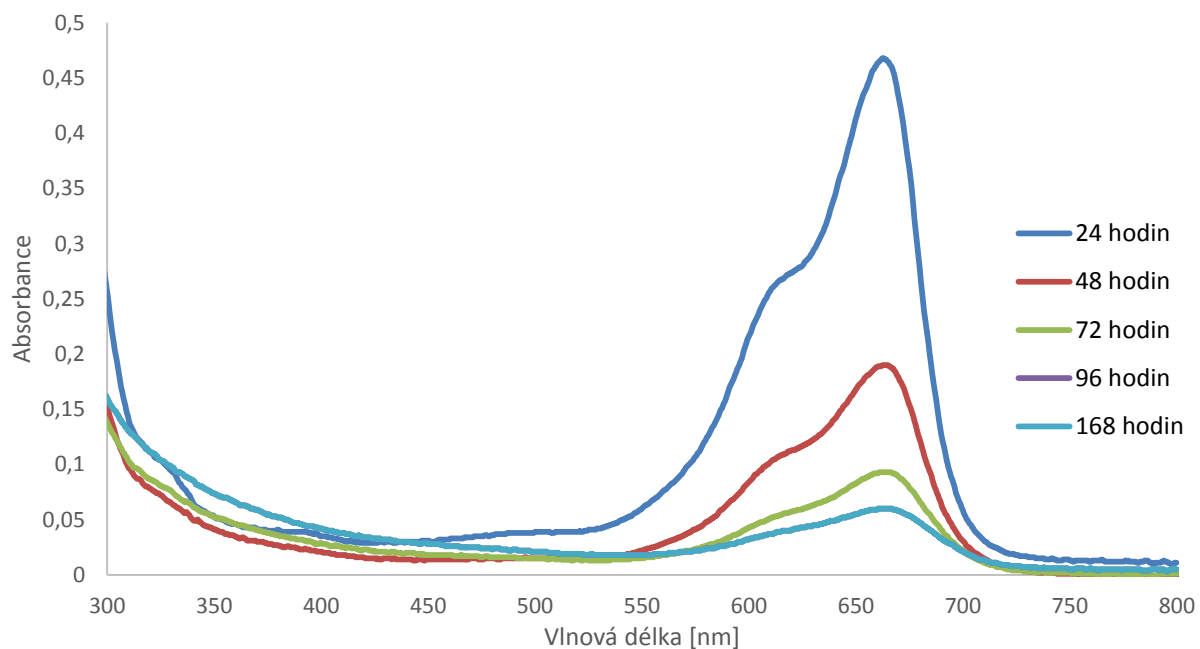
6.4.3 Stanovení zdánlivé rovnovážné konstanty

Roztoky byly měřeny vždy v různých kombinacích. Souhrn těchto kombinací ukazuje *Tabulka 8*. Každá ze zvolených koncentrací methylenové modři byla proměřena s roztokem HK/mHK o koncentraci 0,1 g/l nebo 0,05 g/l. Každé měření bylo opakováno dvakrát. Dohromady bylo provedeno 32 měření, které byly použity pro stanovení a porovnání zdánlivých rovnovážných konstant K_{app} . Byl sledován vliv selektivní methylace na K_{app} a tyto hodnoty byly porovnány.

Tabulka 8 - Přehled kombinací počátečních koncentrací, použitých při difúzních experimentech

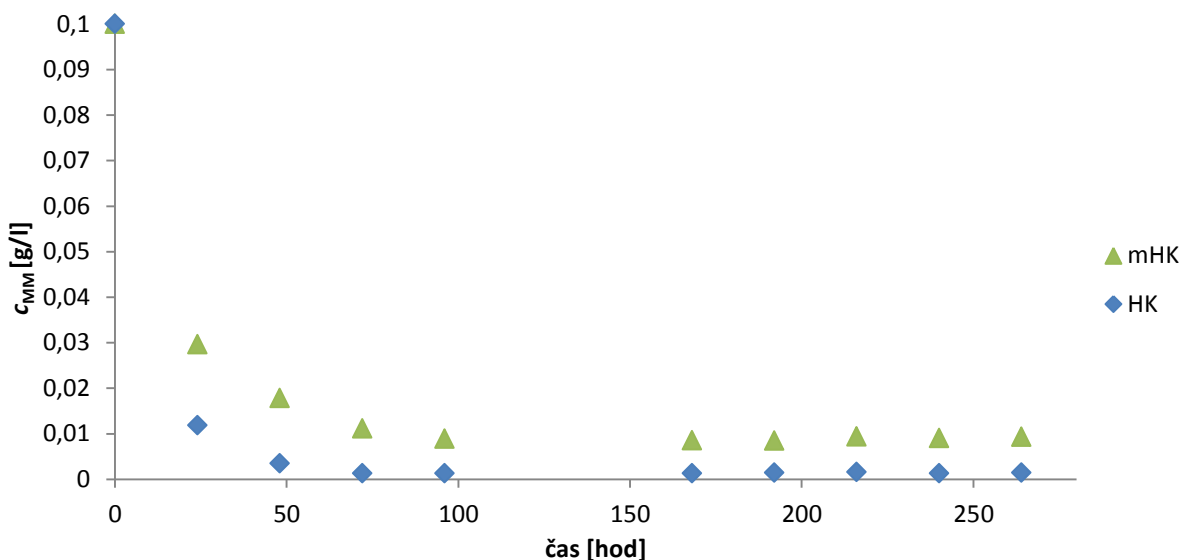
Zdrojová cela	Přijímací cela			
	Koncentrace HK [g/l]		Koncentrace mHK [g/l]	
Počáteční koncentrace methylenové modři [g/l]	0,1	0,05	0,1	0,05
0,1	0,1	0,05	0,1	0,05
0,05	0,1	0,05	0,1	0,05
0,025	0,1	0,05	0,1	0,05
0,01	0,1	0,05	0,1	0,05

V grafu na Obrázek 29 je znázorněna časová změna UV-VIS spektra zdrojové cely s methylenovou modří s počáteční koncentrací 0,1 g/l proti přijímací cele s 0,1 g/l HK. Můžeme sledovat, že v prvních 72 hodinách došlo k nejvýznamnějšímu snížení hodnoty absorpance. Další snižování absorpance bylo již pozvolné. Do ustanovení rovnováhy mezi zdrojovou a přijímací celou bylo potřeba vyčkat v průměru 3 týdny, poté byl každý z experimentů ukončen. Každá z kombinací roztoku HK/mHK s roztokem MM byla proměřena dvakrát a měla obdobný průběh snižování absorpance MM ve zdrojové cele.



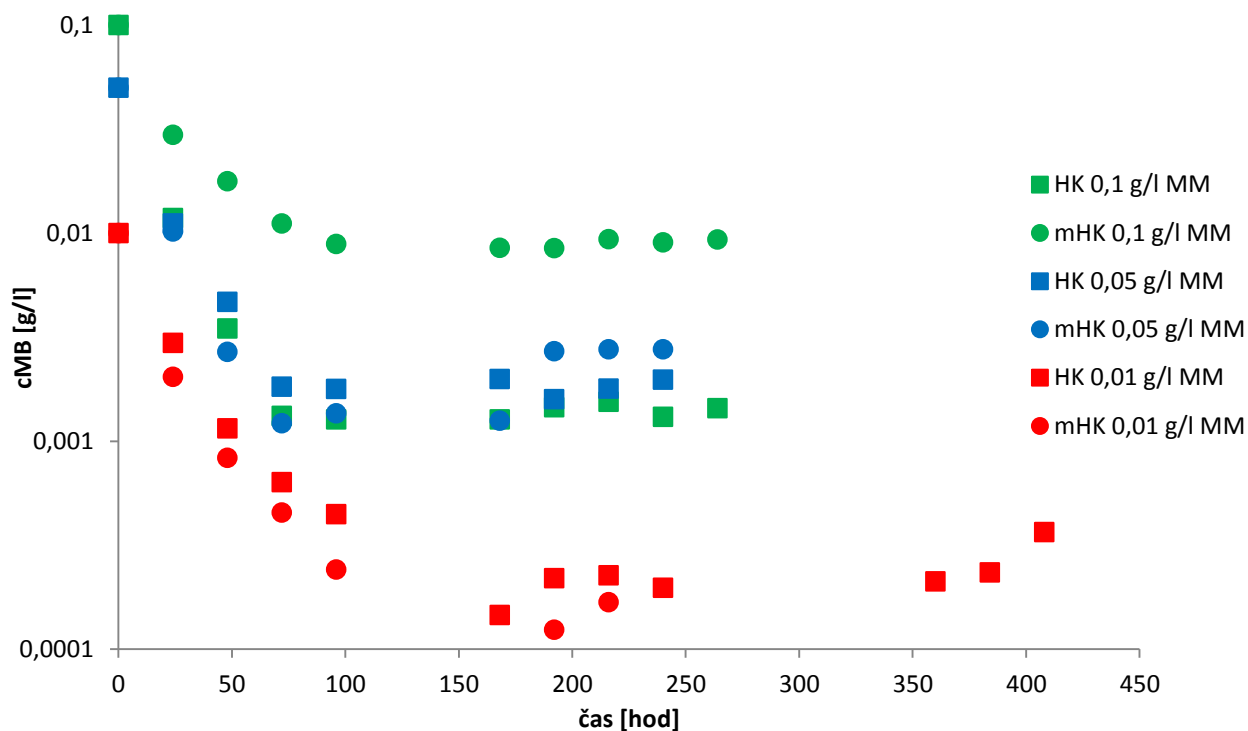
Obrázek 29 - Graf časové změny UV-VIS spektra v přijímací cele při 665 nm (počáteční koncentrace 0,01 g/l MM proti 0,1 g/l HK)

V grafu na Obrázek 30 je znázorněn úbytek počáteční koncentrace MM v čase pro koncentraci 0,1 g/l methylenové modři s HK a mHK o koncentraci 0,1 g/l. Jak je názorně vidět, byl splněn původní předpoklad, MM bude více interagovat s HK než mHK. Tento předpoklad byl splněn pouze u počáteční koncentrace 0,1 g/l methylenové modři. Pro nižší počáteční koncentrace MM 0,01 g/l, 0,025 g/l a 0,05 g/l je již trend jiný.



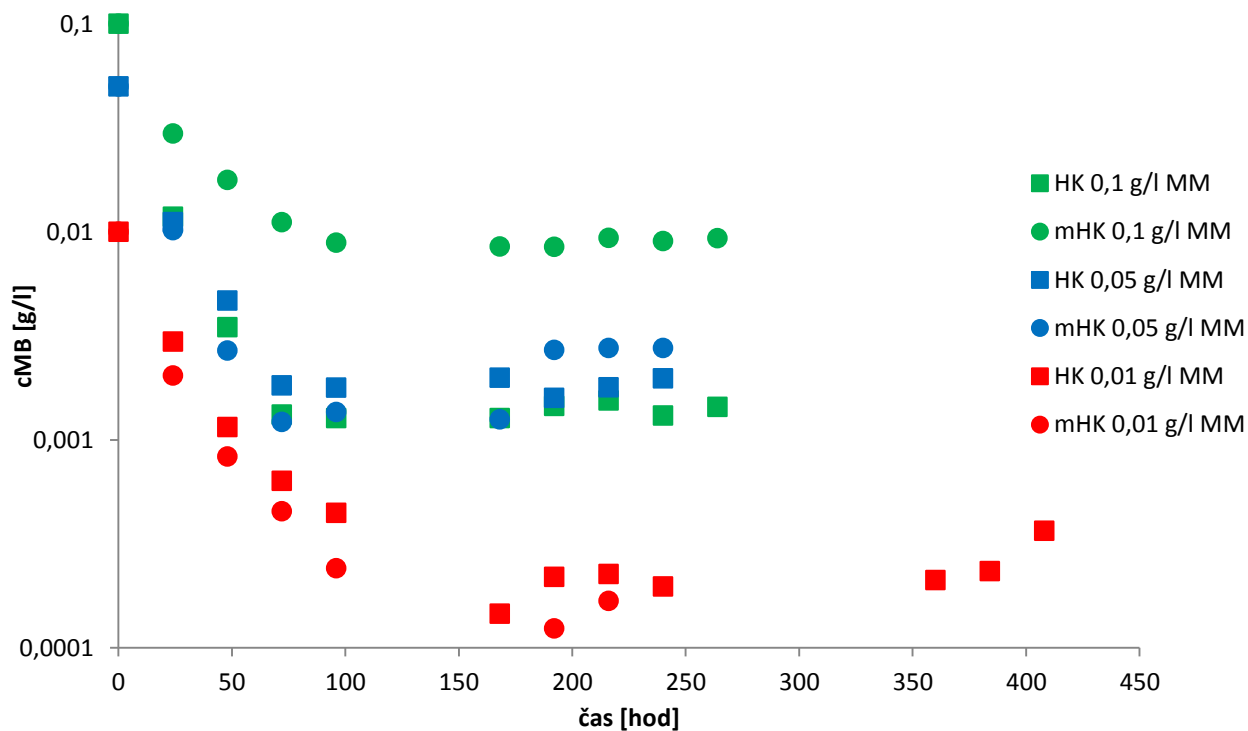
Obrázek 30 - Graf úbytku počáteční koncentrace MM v čase, 0,1 g/l MM proti 0,1 g/l HK/mHK

U počáteční koncentrace 0,05 g/l MM bylo naměřeno stejné množství absorbované methylenové modři na huminovou kyselinu, než na její methylenovou formu. U počáteční koncentrace 0,025 g/l a 0,01 g/l MM již mHK vykazovala vyšší absorbanci MM než HK. Grafické znázornění těchto změn je možné sledovat na



Obrázek 31 - Graf závislosti úbytku počáteční koncentrace MM proti 0,1 g/l HK/mHK (barevně jsou odlišeny počáteční koncentrace MM, HK je označena čtverečkem, mHK kolečkem) .

Tento rozdíl v množství adsorbované MM lze vysvětlit například zpětnou deesterifikací methylenových skupin, při nízkých počátečních koncentracích MM je možné, že byly naměřené hodnoty ovlivněny sorpcí na stěny difúzních cel a na dialyzační membránu. Malý rozdíl v absorbanci v tomto případě může výrazně ovlivnit naše data. V opačném případě se může jednat o chování mHK při nízkých koncentracích sondy (barviva MM). Je možné, že se do interakcí s methylenovou modří zapojují další funkční skupiny, které HK obsahují, pokud jsou -COOH skupiny „blokovány“ methylací. Na základě současného stavu řešené problematiky rozebraného v kapitole 4 by se mohlo jednat především o hydrofobní interakce, π - π interakce, vodíkovou vazbu, van de Waalsovy či další interakce. Tyto interakce by měly být podrobeny dalšímu zkoumání a opakovanému měření, aby byly tyto výsledky potvrzeny.



Obrázek 31 - Graf závislosti úbytku počáteční koncentrace MM proti 0,1 g/l HK/mHK (barevně jsou odlišeny počáteční koncentrace MM, HK je označena čtverečkem, mHK kolečkem)

Podle (6 uvedené v kapitole 3.8.3.1, byly na základě naměřených dat vypočítány hodnoty zdánlivých rovnovážných konstant, které jsou pro všechny experimenty uvedeny v *Tabulka 9*. Na základě vypočítaných hodnot v *Tabulka 9* byla data uspořádána v grafech na *Obrázek 32* *Obrázek 33*.

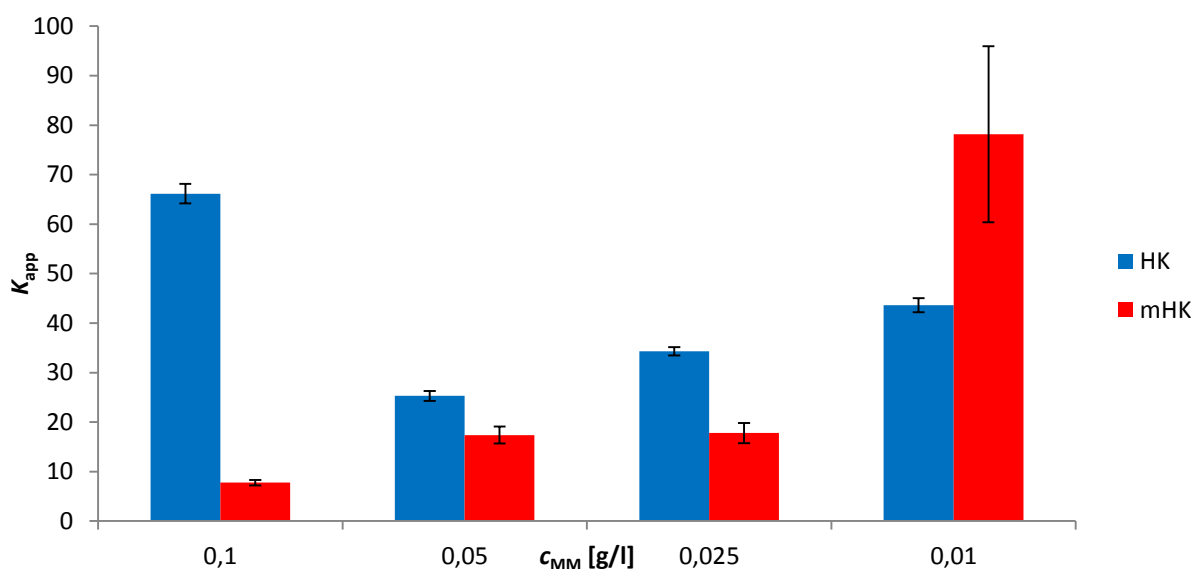
Tabulka 9 - Vypočítané hodnoty zdánlivých rovnovážných konstant

Koncentrace MM [g/l]	Zdánlivá rovnovážná konstanta K_{app}			
	0,1 g/l HK	0,05 g/l HK	0,1 g/l mHK	0,05 g/l mHK
0,1	66,15	22,76	7,77	3,38
0,05	25,30	9,67	17,38	7,72
0,025	34,32	14,51	17,79	6,15
0,01	43,63	39,11	78,17	48,83

Sloupcový graf na *Obrázek 32* znázorňuje závislost zdánlivé rovnovážné konstanty (K_{app}) na počáteční koncentraci methylenové modři ve zdrojové cele pro koncentraci 0,1 g/l HK/mHK. Graf jasně ukazuje, že je hodnota K_{app} silně závislá na počáteční koncentraci barviva. U HK můžeme sledovat prudký pokles hodnoty K_{app} při experimentu s poloviční počáteční koncentrací MM, tedy z 0,1 g/l na 0,05 g/l MM. Poté hodnoty K_{app} pozvolna stoupaly, ale již nedosáhly hodnoty K_{app} nejvyšší počáteční koncentrace MM 0,1 g/l.

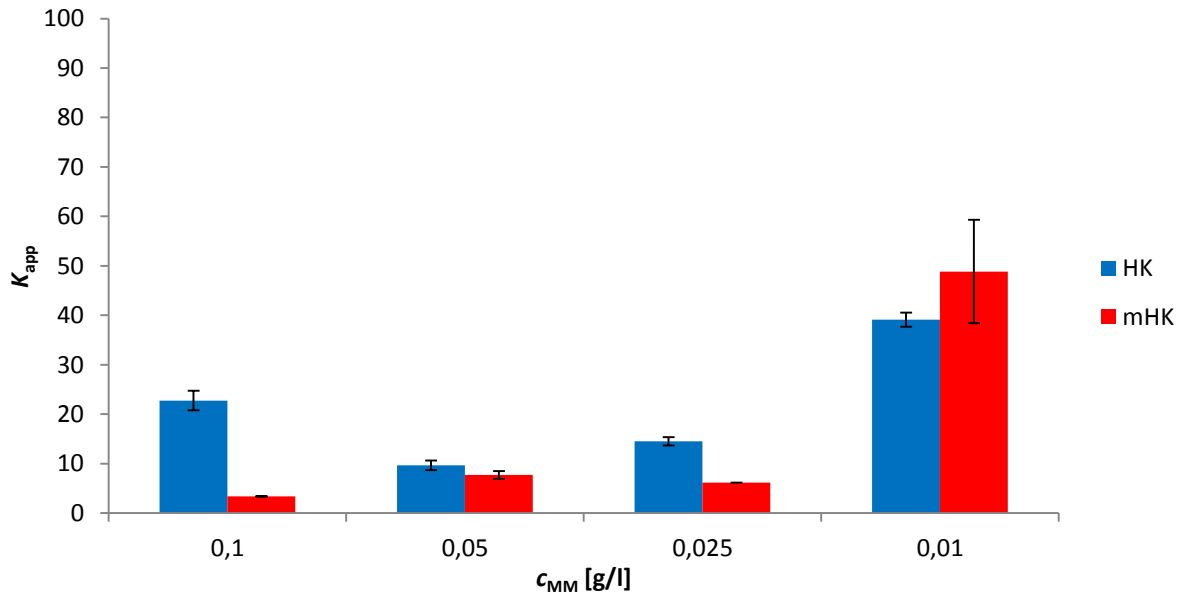
Při vyhodnocení hodnot K_{app} pro mHK je tendence naprosto opačná. Při vstupní koncentraci 0,1 g/l MM dosahuje K_{app} nejnižší číselné hodnoty a postupně stoupá, až dosahuje svého maxima pro vstupní koncentraci MM 0,01 g/l. Hodnota K_{app} pro mHK pro 0,01 g/l MM dokonce překonala hodnotu K_{app} pro HK při vstupní koncentraci MM 0,1 g/l.

Z těchto výsledků lze usuzovat, že elektrostatické interakce u vzorků HK jsou nahrazeny u mHK jiným typem interakcí, které bude potřeba v budoucích experimentech prokázat. Může se jednat např. o π - π interakce či hydrofobní interakci.



Obrázek 32 - Graf závislosti zdánlivé rovnovážné konstanty na koncentraci MM pro 0,1 g/l HK (modrá) a 0,1 g/l mHK (červená)

Obdobné výsledky nám přinesly experimenty s koncentrací 0,05 g/l HK/mHK, které můžete vidět ve sloupcovém grafu na Obrázek 33. Hodnoty K_{app} u vstupní koncentrace 0,1 g/l MM vykazují mírně vyšší hodnotu u HK, poté následuje prudký pokles a stoupání až ke vstupní koncentraci MM 0,01 g/l. Hodnoty K_{app} u mHK vykazovaly od počáteční koncentrace 0,1 g/l MM zvyšující tendenci. Hodnota K_{app} mHK při vstupní koncentraci 0,01 g/l dokonce překonala veškeré hodnoty MM pro sérii měření s koncentrací 0,05 g/l HK/mHK.



Obrázek 33 - Graf závislosti zdánlivé rovnovážné konstanty na koncentraci MM

Z naměřených hodnot K_{app} jsme zjistili následující trendy. Hodnota K_{app} u HK vykazuje vždy vysokou hodnotu při vstupní koncentraci 0,1 g/l a poté hodnota klesá na polovinu a postupně roste až k počáteční koncentraci 0,01 g/l MM. Hodnoty K_{app} pro mHK stoupají od vstupní koncentrace 0,1 g/l MM až po 0,01 g/l MM. Maximální hodnoty K_{app} jsme vypočítali vždy při experimentu s mHK se vstupní koncentrací 0,01 g/l MM.

7 ZÁVĚR

Cílem této diplomové práce bylo zpracovat literární rešerši na téma interakce biopolymerů (humínových látek) s vhodnou iontovou organickou sloučeninou se zapojením jednotlivých strukturních motivů humínových látek a metod studia. Na základě této rešerše pak následně navrhnout a realizovat sérii experimentů analyzující interakce vzorku humínových kyselin (HK)/ methylované humínové kyseliny (mHK) s modelovým organickým iontem methylenovou modří (MM). Hlavním cílem bylo zjistit entalpický efekt a hodnotu zdánlivé rovnovážné konstanty vybraných koncentrací HK/mHK s vybranými počátečními koncentracemi MM.

HK a mHK byly nejdříve podrobeny charakterizaci pomocí FT-IR a termogravimetrické analýzy, aby byla potvrzena selektivní methylace mHK. Termogravimetrická analýza nám přinesla údaje o vlhkosti, obsahu popela a organické hmoty ve vzorcích. Díky vyššímu obsahu organické složky u mHK byla potvrzena methylace. Obdobné výsledky nám přinesla metoda FT-IR, byl potvrzen vznik esterové vazby nárůstem absorbance v oblastech odpovídajících esterům.

Izotermickou titrační kalorimetrií jsme proměřili velké množství vzorků v různých prostředích (ve fosfátovém pufru a v čisté vodě). Titrace fosfátovým pufrům do roztoku HK/mHK vykazovala téměř stejný signál jako titrace různých vstupních koncentrací MM do HK/mHK. Experimenty proto byly zopakovány v čisté vodě se silnějším signálem, ale stejnými výsledky. Na základě těchto měření jsme potvrdili, že naměřený signál odpovídá pouze ředěním roztoků HK/mHK. Značnou mírou se na uvolněném teple podílí i NaOH, který byl použit na ředění HK (0,01 M NaOH) a mHK (0,05 M NaOH). Izotermická titrační kalorimetrie vzorků se ukázala pro stanovení termodynamických veličin jako užitečné, ale nepřinesly nám očekávané hodnoty entalpie.

Rozpouštěcí kalorimetrií jsme stanovovali rozpouštěcí teplo. Jednalo se o slabý signál, ale potvrdilo se exotermické zabarvení reakce. Bylo stanoveno, že při míšení MM o vstupní koncentraci 0,05 g/l s roztokem 0,1 g/l HK se uvolní 389 mJ/g tepla. Při míšení MM o vstupní koncentraci 0,05 g/l s roztokem 0,1 g/l mHK bylo naměřeno 340 mJ/g uvolněného tepla.

Další použitou metodou byla dialýza v difúzních celách. Počáteční hodnoty koncentrace MM byly zvoleny 0,1 g/l, 0,05 g/l, 0,025 g/l a 0,01 g/l. Tyto experimenty jsme použili k výpočtu zdánlivé rovnovážné konstanty, kterou jsme vypočítali jako poměr molární koncentrace barviva navázaného na HK/mHK k molární koncentraci barviva volného za rovnovážného stavu. K dosažení rovnovážného stavu došlo vždy do 3 týdnů od počátku experimentu.

Hodnota zdánlivé rovnovážné konstanty dosahuje u HK nejvyšších hodnot pro počáteční koncentraci 0,1 g/l MM, poté klesá na polovinu u počáteční koncentrace 0,05 g/l MM a má stoupající tendenci k počáteční koncentraci 0,01 g/l MM. Hodnota zdánlivé rovnovážné konstanty u mHK má obrácenou tendenci. U počáteční koncentrace 0,1 g/l MM má nejnižší hodnotu a postupně stoupá až k počáteční koncentraci 0,01 g/l MM, kde dosáhla svého maxima v obou případech, a byly nejvyšší z celého měření.

Tyto výsledky dokazují, že pokud jsou karboxylové skupiny blokovány, mHK mají jiný mechanismus interakce. Elektrostatické interakce jsou v tomto případě nahrazeny jiným druhem interakce, například hydrofobní interakce, π - π interakce.

Z aplikovaných analytických metod se kalorimetrické experimenty se pro analýzu interakcí HK/mHK s methylovanou modří ukázaly jako užitečné, i když neprokázaly entalpický efekt, je tedy jisté, že hnací silou bude primárně entropický efekt, který byl dokázán difúzními experimenty. Difúzními experimenty v dialyzačních celách jsme získali informace o zdánlivých rovnovážných konstant, které nám dávají jasnější představu o interakčních schopnostech HK i mHK, pokud jsou blokovány karboxylové skupiny. Věřím, že další optimalizací a experimenty, bychom mohli dospět k dalším zajímavým výsledkům.

8 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- [1] SKOKANOVÁ, M., K. DERCOVÁ: Humínové kyseliny. Pôvod a štruktúra. *Chemické listy*. 2008, č. 102, s. 262–268
- [2] GUALTIERI, WEBER, J.: *Properties of humic substances* [online], 2009 [cit. 2016-01-20]. Dostupné z <http://www.ar.wroc.pl/~weber/kwasy2.htm>>
- [3] VESELÁ, L., KUBAL, M., KOZLER, J., INNEMANOVÁ, P.: Struktura a vlastnosti přírodních huminových látek typu oxihumolitu. In *Chemické listy* 99, 2005, p. 711–717.
- [4] WEBER, J.: *Definition of soil organic matter, Humintech*. [online]. [cit. 2016-01-20]. Dostupné z: <http://www.humintech.com/001/>
- [5] STEVENSON, F. J.: *Humus chemistry: Genesis, composition, reactions*, 2nd edition. New York, 1994, p.496. ISBN 0-471-59474-1. (10)
- [6] STEELINK, Cornelius: Peer Reviewed: Investigating Humic Acids in Soils. *Analytical Chemistry*. 2002, vol. 74, issue 11, 326 A-333 A. DOI: 10.1021/ac022040m.
- [7] STEINBERG, Christian E: *Ecology of humic substances in freshwaters: determinants from geochemistry to ecological niches*. Berlin: Springer, 2003, 440 s. ISBN 35-404-3922-6
- [8] Prof. Blaskó Lajos. Soil organic matter. In: *Tankonyvtar* [online]. Maďarsko, 2008 [cit. 2016-01-24].
- [9] Stevenson, F.J.: *Humus Chemistry: Genesis, composition, reactions*, 2nd ed. New York, Brisbane, Toronto, Singapore, 1994. ISBN 0-471-59474-1.
- [10] Sein LT, Varnum JM, Jansen SA.: (1999) Conformational modeling of a new building block of humic acid approaches to the lowest energy conformer. *Environ Sci Technol* 33(4):546–552.
- [11] HUMINOVÉ KYSELINY. INTERAKCIE HUMINOVÝCH KYSELIN S KONTAMINANTAMI. *Chemické listy* [online]. 2008, (102), 338-345 [cit. 2016-02-15].
- [12] PÉDROT, M.; DIA, A.; DAVRANCHE, M.: Dynamic structure of humic substances: Rare earth elements as a fingerprint. *Journal of Colloid and Interface Science* [online]. 2010, 345, [cit. 2016-02-22]. Dostupné z

- [13] PICCOLO, A. The supramolecular structure of humic substances. *SoilScience*. 2001, 166, 11, s. 810–832. Dostupné z: <http://www.suprahumic.unina.it/home/images/pdf/Soil%20Science%202002-supramolecular.pdf>
- [14] PVOKONSKÝ, M, PVOKONSKÁ L.: ÚPRAVA VODY S OBSAHEM HUMINOVÝCH LÁTEK. *Chemické listy* [online]. 2010, 2010(104), 1015-1022 [cit. 2016-02-15]. Dostupné z: http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2010_11_1015-1022.pdf
- [15] VANLOON, G. W., DUFFY, S. J.: *Environmental chemistry: a global perspective*. United States by Oxford University Press Inc., New York, 2000. 492 p. ISBN 0-19-856440 6.
- [16] SKOKANOVÁ, M, DERCOV L.: Huminové kyseliny - původ a struktura. *Chemické listy* [online]. 2008, (102), 262-268 [cit. 2016-02-15]. Dostupné z: http://chemicke-listy.cz/docs/full/2008_04_262-268.pdf
- [17] CHYTILOVÁ, A.: *Molekulární organizace huminových kyselin v roztocích*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2014. 62 s. Vedoucí bakalářské práce doc. Ing. Martina Klučáková, Ph.D.
- [18] BREMNER, J. M. a H. LEES: Studies on soil organic matter: Part II. The extraction of organic matter from soil by neutral reagents. *The Journal of Agricultural Science* [online]. CaMMridge University Press, 1949, **39**(03), 274-279 [cit. 2016-04-21]. DOI: 10.1017/S0021859600004214. ISBN 10.1017/S0021859600004214. Dostupné z: http://www.journals.caMMridge.org/abstract_S0021859600004214
- [19] Latinské slovo - humus. *Latinský slovník, latinsky.cz* [online]. 2009 [cit. 2016-04-21]. Dostupné z: <http://latinsky-slovník.latinsky.cz/cesko-latinsky/humus.html>
- [20] SEDLÁČEK P.: *Hydrogely huminových kyselin - experimentální model i aplikační forma*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2009. 39 s. (přílohy 51 s.). Vedoucí dizertační práce doc. Ing. Martina Klučáková, Ph.D.
- [21] APENA-MÉNDEZ, E., M.: *Humic substances ñ compounds of still unknown structure: applications in agriculture, industry, environment, and biomedicine* [online]. 2005: *Journal of Applied Biomedicine*, 2005 [cit. 2016-02-15]. ISSN 1214-0287. Dostupné z: https://assets.motherearthlabs.com/resources/4.humic_.substances.compnds.of_.unkwn_.structure2005.pdf
- [22] STEINBERG, Christian: *Ecology of humic substances in freshwaters: determinants from geochemistry to ecological niches*. 1. New York: Springer, 2003. ISBN 35-404-3922-6.
- [23] GONZÁLEZ-PÉREZ, M, GOMES F.: ¹³C NMR and FTIR spectroscopy characterization of humic acids in spodosols under tropical rain forest in southeastern Brazil. *Geoderma*. 2008, vol. 146, 3-4, s. 425-433. DOI: 10.1016/j.geoderma.2008.06.018

- [24] *Barviva a pigmenty* [online]. 2009. Pardubice, 2009, s. 25 [cit. 2016-02-15]. Dostupné z: <http://www.upce.cz/fcht/uocht/spektrum/ktol-vlastnostib.pdf>
- [25] Chemické složení tiskových barev. In: *Elektronická učebnice* [online]. Olomouc: Online, 2009 [cit. 2016-02-15]. Dostupné z: <https://eluc.kr-olomoucky.cz/verejne/lekce/2548>
- [26] Historie používání barviv. In: *An Durspek's Website* [online]. 2005 [cit. 2016-02-15]. Dostupné z: http://jandur.cz/chem/absorpce/historie_barviv.htm
- [27] Alamira. In: *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2001- [cit. 2016-02-15]. Dostupné z: <https://cs.wikipedia.org/wiki/Altamira>
- [28] Pesticidy. In: *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2001- [cit. 2016-02-15]. Dostupné z: <https://cs.wikipedia.org/wiki/Pesticidy>
- [29] ARNIKA. Pesticidy. In: *Arnika* [online]. 2014: Arnika, 2014 [cit. 2016-02-15]. Dostupné z: <http://arnika.org/pesticidy>
- [30] Ovoce, zelenina a pesticidy. In: *Biospotřebitel* [online]. Praha, 2009 [cit. 2016-02-15]. Dostupné z: <http://biospotrebitel.cz/bio-poradna/jak-na-eko-domacnost/ovoce-zelenina-a-pesticidy>
- [31] DIFERENČNÍ KOMPENZAČNÍ KALORIMETRIE. In: *Centrum materiálového výzkumu* [online]. Brno: Fakulta chemická, Vysoké učení technické v Brně, 2016 [cit. 2016-04-15]. Dostupné z: <http://www.materials-research.cz/cz/laboratore/laborator-biokoloidu/termicka-analyza-a-kalorimetrie/metody-termicke-analyzy/>
- [32] BOUCHEMAL, K.. New challenges for pharmaceutical formulations and drug delivery systems characterization using isothermal titration calorimetry. *DrugDiscovery Today*. 2008, vol. 13, no. 21–22, p. 960–972. ISSN 13596446.
- [33] PEROZZO, R.; FOLKERS, G.; SCAPOZZA, L. Thermodynamics of protein–ligand interactions: History, presence, and future aspects. *J. Recept. Sig. Transd.* 2004, vol. 24, p. 1–52.
- [34] HOLDGATE, G. A.; WARD, W. H. J. *Measurement of binding thermodynamics in drug discovery*. *Drug Discov. Today* 2005, vol. 22, p. 1543–1550.
- [35] NÚÑEZ, Sara, Jennifer VENHORST a Chris G. KRUSE. Target–drug interactions: first principles and their application to drug discovery. *Drug Discovery Today*. 2012, vol. 17, 1-2, s. 10-22. DOI: 10.1016/j.drudis.2011.06.013
- [36] *Precision Solution Calorimetry* [online]. 2018: New Castle, 2017 [cit. 2017-04-20]. Dostupné z: Precision Solution Calorimetry

- [37] PALATÝ, Zdeněk a Bohumil BERNAUER. *Membránové procesy*. Vyd. 1. V Praze: Vysoká škola chemicko-technologická, 2012, 282 s. ISBN 978-80-7080-808-5.
- [38] MIKULÁŠEK, Petr. *Tlakové membránové procesy*. Vyd. 1. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 2013. ISBN 978-80-7080-862-7.
- [39] BARTOVSKÁ, Lidmila. *Fyzikální chemie povrchů a koloidních soustav*. Vyd. 4. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 2002, 192s. ISBN 80-708-0475-0
- [40] NOVÁK, Josef P. *Fyzikální chemie II.1*. vyd. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 2001, 321 s. ISBN 80-7080-436-X
- [41] POUCHLÝ, Julius. *Fyzikální chemie makromolekulárních a koloidních soustav*. 2. Vyd. Praha: VŠCHT, 2001, 201 s. ISBN 80-7080-422-X.
- [42] HAYNIE, Donald T. *Biological thermodynamics*. 2nd ed. CaMmridge: CaMmridge University Press, 2008, xvi, 422 s. ISBN 978-0-521-71134-0.
- [43] VINOD, V. P. a T. S. ANIRUDHAN. *Adsorption Behaviour of Basic Dyes on the Humic Acid Immobilized Pillared Clay*. SpringerLink [online]. 2003, 2003(150), 193-217 [cit. 2016-02-15]. DOI: 10.1023/A:1026145631713. ISBN 10.1023/A:1026145631713.
- [44] XU, Duanping, Changjian GU a Xiao CHEN. Adsorption and Removal of Acid Red 3R from Aqueous Solution Using Flocculent Humic Acid Isolated from Lignite. *Procedia Environmental Sciences* [online]. 2013, 2013(vol. 18), 127-134 [cit. 2016-04-15]. DOI: 10.1016/j.proenv.2013.04.017. ISSN 18780296.
- [45] ZANINI, Graciela P., Marcelo J. AVENA, Sarah FIOL a Florencio ARCE. Effects of pH and electrolyte concentration on the binding between a humic acid and an oxazine dye. *Chemosphere* [online]. 2006, 63(3), 430-439 [cit. 2016-04-15]. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2005.08.053. ISSN 00456535. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0045653505011288>
- [46] FERNANDES, A.N., C.A.P. ALMEIDA, C.T.B. MENEZES, N.A. DEBACHER a M.M.D. SIERRA. Removal of methylene blue from aqueous solution by peat. *Journal of Hazardous Materials* [online]. 2007, 144(1-2), 412-419 [cit. 2016-02-15]. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2006.10.053. ISSN 03043894.
- [47] HO, Y.S. a G. MCKAY. Sorption of dye from aqueous solution by peat. *Chemical Engineering Journal* [online]. 1998, 70(2), 115-124 [cit. 2016-02-15]. DOI: 10.1016/S0923-0467(98)00076-1. ISSN 13858947.
- [48] ALLEN, S.J., G. MCKAY a J.F. PORTER. Adsorption isotherm models for basic dye adsorption by peat in single and binary component systems. *Journal of Colloid and Interface Science* [online]. 2004, 280(2), 322-333 [cit. 2016-04-19]. DOI: 10.1016/j.jcis.2004.08.078. ISBN 10.1016/j.jcis.2004.08.078.

- [49] JESUS, A.M.D., L.P.C. ROMÃO, B.R. ARAÚJO, A.S. COSTA a J.J. MARQUES. *Use of humin as an alternative material for adsorption/desorption of reactive dyes*. Doi:10.1016/j.desal.2011.01.063 [online]. 0111n. 1., 274(Issues 1-3), 13-21 [cit. 2016-04-19]. DOI: 10.1016/j.desal.2011.01.063. ISBN 10.1016/j.desal.2011.01.063.
- [50] XU, Duanping, Changjian GU a Xiao CHEN. *Adsorption and Removal of Acid Red 3R from Aqueous Solution Using Flocculent Humic Acid Isolated from Lignite*. *Procedia Environmental Sciences* [online]. 2013 International Symposium on Environmental Science and Technology (2013 ISEST), 2013, 18(2), 127–134 [cit. 2016-04-19]. DOI: 10.1016/j.proenv.2013.04.017. ISBN 10.1016/j.proenv.2013.04.017.
- [51] 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(1), 193–198 [cit. 2016-04-19]. DOI: 10.1016/j.watres.2015.08.039. ISBN 10.1016/j.watres.2015.08.039.
- [52] LANDGRAF, Maria Diva, Sebastião Claudino DA SILVA a Maria Olímpia DE O. REZENDE. Mechanism of metribuzin herbicide sorption by humic acid samples from peat and vermicompost. *Science direct* [online]. 1998, [cit. 2016-02-15]. DOI: 10.1016/S0003-2670(98)00049-X. ISBN 10.1016/S0003-2670(98)00049-X.
- [53] KNEN., S. U. EQUILIBRIUM AND KINETIC STUDIES OF THE ADSORPTION OF 2,4-D AND PICLORAM ON HUMIC ACID. *Can. J. Soil. Sci* [online]. 1973, 53, 429-434 [cit. 2016-02-15].
- [54] YANG, Chengjian, Qingru ZENG, Yang YANG, Ruiyang XIAO, Yunzhong WANG a Hui SHI. The synthesis of humic acids graft copolymer and its adsorption for organic pesticides: the origin, evolution, and impact of doi moi. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry* [online]. 2014, 20(3), 1133-1139 [cit. 2016-04-17]. DOI: 10.1016/j.jiec.2013.07.001. ISSN 1226086x.
- [55] 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* [online]. 2009, 76(1), 107-113 [cit. 2016-04-17]. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2009.02.012. ISSN 00456535.
- [56] VOLIKOV, Alexander B., Sergey A. PONOMARENKO, Andrey I. KONSTANTINOV, Kirk HATFIELD a Irina V. PERMINOVA. *Nature-like solution for removal of direct brown 1 azo dye from aqueous phase using humics-modified silica gel* [online]. [cit. 2016-04-15]. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2015.11.070. ISBN 10.1016/j.chemosphere.2015.11.070.
- [57] PRADO, Alexandre G.S, Bárbara S MIRANDA a Guilherme V.M JACINTHO. *Interaction of indigo carmine dye with silica modified with humic acids at solid/liquid interface* [online]. [cit. 2016-04-15]. DOI: 10.1016/S0039-6028(03)00990-7. ISBN 10.1016/S0039-6028(03)00990-7.

- [58] YANG, Lei, Zhenggui WEI, Wenhui ZHONG, Jing CUI a Wei WEI. *Modifying hydroxyapatite nanoparticles with humic acid for highly efficient removal of Cu(II) from aqueous solution* [online]. [cit. 2016-04-15]. DOI: 10.1016/j.colsurfa.2015.11.039. ISBN 10.1016/j.colsurfa.2015.11.039.
- [59] ZHANG, Xian, Panyue ZHANG, Zhen WU, Ling ZHANG, Guangming ZENG a Chunjiao ZHOU. *Adsorption of methylene blue onto humic acid-coated Fe₃O₄ nanoparticles* [online]. [cit. 2016-04-15]. DOI: 10.1016/j.colsurfa.2012.12.056. ISBN 10.1016/j.colsurfa.2012.12.056.
- [60] *Precision Solution Calorimetry* [online]. 2018: New Castle, 2017 [cit. 2017-04-20]. Dostupné z: Precision Solution Calorimetry
- [61] *Introduction to Interpretation of Infrared Spectra*. UNIVERSITY OF PUGET SOUND [online]. 2017: John Hanson., 2017 [cit. 2017-04-20]. Dostupné z: <http://www2.ups.edu/faculty/hanson/Spectroscopy/IR/IRInterpretation.htm>
- [62] TATZBER, Michael, Michael STEMMER, Heide SPIEGEL, Christian KATZLBERGER, Georg HABERHAUER, Axel MENTLER a Martin H. GERZABEK: FTIR-spectroscopic characterization of humic acids and humin fractions obtained by advanced NaOH, Na₄P₂O₇, and Na₂CO₃ extraction procedures. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* [online]. 2007, 170(4), 522-529 [cit. 2017-04-20]. DOI: 10.1002/jpln.200622082. ISSN 14368730.
- [63] Soumia Amir, Mohamed Hafidi, George Merlina, Hassan Hamdi, Jean-Claude Revel. *Elemental analysis, FTIR and 13C-NMR of humic acids from sewage sludge composting*. HAL [online]. 2004, 2004(1), 7 [cit. 2017-04-20].
- [64] HELAL, Aly A., G. A. MURAD a A.A. HELAL. Characterization of different humic materials by various analytical techniques. *Arabian Journal of Chemistry* [online]. 2010, 2010(4), 51-54 [cit. 2017-04-20]. DOI: 10.1016/j.arabjc.2010.06.018. ISBN 10.1016/j.arabjc.2010.06.018.

9 SEZNAM ZKRATEK A SYMBOLŮ

Zkratka	Význam
HL	Huminové látky
HK	Huminové kyseliny
FK	Fulvinové kyseliny
HU	Huminy
mHK	Methylová huminová kyselina
MM	Methylenová modř
SEM	Elektronový skenovací mikroskop
FT-IR	Infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací
ITC	Izotermická titrační kalorimetrie
SolCal	Rozpouštěcí kalorimetrie
TMS-DM	Trimethylsilyldiazomethan v hexanu
UV-VIS	UV-VIS spektrofotometrie
TGA	Termogravimetrie
HAP/HK	Hydroxyapatit s navázanými huminovými kyselinami
C_0	Výchozí koncentrace MM ve zdrojové cele
V	Objem systému
$C_{\text{volná zdroj}}/ C_{\text{volná příjm}}$	Koncentrace volné (nevázané) sondy ve zdrojové/přijímací cele
$C_{\text{vázaná}}$	Koncentrace navázaného barviva na HK
ΔH	Vazebná entalpie
K_{app}	Zdánlivá rovnovážná konstanta