

KVANTITATIVNÍ ^{13}C NMR SPEKTROSKOPIE HUMINOVÝCH LÁTEKFRANTIŠEK NOVÁK^a a RICHARD HRABAL^b

^a Biologické centrum AV ČR, v.v.i., Na Sádkách 7, 370 05 České Budějovice, ^b NMR laboratoř, VŠCHT Praha, Technická 1905, 166 28 Praha 6
 novakf@upb.cas.cz, Richard.Hrabal@vscht.cz

Došlo 12.1.10, přepracováno 25.3.11, přijato 25.5.11.

Klíčová slova: biologická aktivita, globální cyklus uhlíku, huminové kyseliny, ^{13}C NMR spektroskopie, struktura

Obsah

1. Úvod
2. Měření ^{13}C NMR spekter huminových kyselin
3. Interpretace ^{13}C NMR spekter
 - 3.1. Přiřazení pásů v ^{13}C NMR spektrech
 - 3.2. Strukturní parametry z ^{13}C NMR spekter
4. Kvantitativní analýza huminových látek ^{13}C NMR spektroskopii
5. LS ^{13}C NMR spektra vybraných huminových kyselin a fulvokyselin
6. Závěr

1. Úvod

Huminové látky (HL) představují největší a z hlediska globální stability na Zemi nejvýznamnější zásobu organického uhlíku. Jsou výsledkem biochemických a chemických reakcí doprovázejících rozklad a přeměny zbytků rostlinné a mikrobiální biomasy (souhrnně nazývaných humifikace). Nejdůležitějšími látkami, účastnicími se tohoto procesu, jsou lignin a produkty jeho přeměny, dále polysacharidy, melanin, kutin, lipidy, nukleové kyseliny aj. Jen v půdních uhlíkatých sloučeninách je vázáno přibližně 3,3krát více uhlíku než v atmosféře a 4,5krát více než v živých organismech¹. Na organické sloučeniny připadají téměř dvě třetiny půdních zásob uhlíku, z toho nejméně polovinu tvoří chemicky relativně odolné huminové látky. Další zásoby huminových látek jsou rozpuštěny ve vodách nebo uloženy v sedimentech moří, jezer, vodních toků a v ložiscích rašeliny, lignitu a uhlí. Nepřekvapí proto, že huminové látky zásadním způsobem ovlivňují život na Zemi – určují kvalitu půd, vod a vázáním uhlíku v relativně stabilních sloučeninách také složení atmosféry. Prvořadou otázkou pro pochopení úlohy HL v globálních procesech přeměn uhlíku je určení jejich komplikované

struktury. Nejvýznamnějším nástrojem pro její studium je ^{13}C nukleární magnetická rezonance (NMR).

NMR je spektrometrická metoda, umožňující studovat strukturu sloučenin měřením interakce elektromagnetických vln s jádry některých atomů v silném magnetickém poli. Měření vzorku získáme jeho NMR spektrum, znázorňující závislost intenzity této interakce na frekvenci elektromagnetických vln, která je vyjádřena jako tzv. chemický posun δ (I),

$$\delta = (\nu_{\text{vz}} - \nu_{\text{std}}) \cdot 10^6 / \nu_{\text{std}} \quad (I)$$

kde ν_{vz} a ν_{std} jsou frekvence signálů vzorku a standardu (například tetramethylsilanu, TMS), bezrozměrný parametr δ se vyjadřuje v jednotkách ppm. Protože vlastnosti jader ^{13}C jsou ovlivněny jejich nejbližším okolím, lze z NMR spektra získat podrobné informace o struktuře molekul. Bližší informace o principech metody lze nalézt v monografiích^{2,3} nebo skriptech⁴. Struktura huminových kyselin se studuje především ^{13}C NMR spektroskopii, pro speciální účely se měří také jádra ^1H , ^{31}P (cit.⁵), ^{27}Al (cit.⁶), ^{113}Cd a vzácně i ^{15}N NMR spektra⁷, která jsou extrémně náročná na přístrojový čas.

První pokus použít NMR k charakterizaci huminových kyselin (HK) byl sice proveden již počátkem šedesátých let minulého století⁸, využití ^{13}C NMR spektroskopie ke studiu struktury HK však umožnila až dostupnost NMR spektrometrů s Fourierovou transformací⁹ (FT) od druhé poloviny 70. let. Dnes je ^{13}C NMR spektroskopie považována za základní metodu studia struktury huminových kyselin, půdní organické hmoty i sedimentů a uhlí. ^{13}C NMR spektra HK lze měřit v roztoku i v pevné fázi. Obě techniky mají své přednosti i nevýhody. Při rutinním měření ^{13}C NMR huminových látek v pevném stavu bývá preferována technika CP/MAS NMR (Cross Polarization, Magic Angle Spinning, zkřížená polarizace při rotaci vzorku pod magickým úhlem), která umožňuje měřit též nerozpuštěné frakce huminových látek a vyhnout se případným změnám struktury HK při rozpouštění. Na přístrojový čas náročnější NMR spektroskopie v roztoku má naproti tomu vyšší rozlišení a také problémy spojené se stanovením jednotlivých typů atomu uhlíku jsou lépe prostudovány, takže získané hodnoty představují určitý standard, používaný při vyhodnocení výsledků jiných technik.

V tomto příspěvku si klademe za cíl (i) přehledně shrnout soudobé poznatky o využití ^{13}C NMR spektroskopie v roztoku (LS, liquid state) při studiu struktury, chemických a biologických vlastností huminových látek a (ii) prezentovat výsledky studia huminových kyselin a fulvokyselin charakteristických pro půdy a fosilní ložiska huminových hornin (rašelina, lignit, oxyhumolit) v České republice a poskytnout tak srovnávací materiál pro hlubší studium struktury huminových látek nejen v aplikovaných oborech.

2. Měření ^{13}C NMR spekter huminových kyselin

Podíl isotopu ^{13}C v přírodním uhlíku je pouze 1,1 %, avšak díky vysokému obsahu uhlíku v huminových kyselinách (40–65 %) lze ^{13}C NMR spektra huminových kyselin měřit i přes nepříliš velkou citlivost tohoto jádra se spinem $\frac{1}{2}$ (gyromagnetický poměr $\gamma_{\text{C}} = 67,283 \cdot 10^6 \text{ rad} \cdot \text{T}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, relativní citlivost vůči ^1H je $1,59 \cdot 10^{-2}$). Určitý problém pro měření představuje přirozená složitost huminových kyselin, která ovlivňuje spin-mřížkovou relaxační dobu T_1 atomového jádra ^{13}C (spin-mřížková relaxační doba T_1 je čas, který potřebuje excitované jádro k přenosu energie na okolní jádra tak, aby se vrátilo do původního stavu). Na rozdíl od elektronových, vibračních nebo rotačních excitovaných stavů je spin-mřížková relaxace systému jader, obzvlášť u jader se spinem $\frac{1}{2}$, velmi pomalá, což je způsobeno komplikovanými inter- a intramolekulárními interakcemi, které jsou ovlivněny strukturou molekul. Tato složitost se vysvětluje pseudomicelárním uspořádáním huminových látek v roztoku¹⁰. Naproti tomu spin-spinová relaxace T_2 , což je doba ztráty koherence magnetizace excitovaného stavu, se zkracuje se zvětšující se molekulovou hmotností. Jinými slovy, čím je molekulární pohyblivost nižší, tím delší je relaxační čas T_1 určitého jádra, ale kratší čas T_2 . To významným způsobem zvětšuje šířku signálů a tím snižuje rozlišení ^{13}C NMR spekter.

^{13}C NMR spektra HK v roztoku se obvykle měří na spektrometrech s pracovní frekvencí 400–600 MHz (^1H) v roztoku 0,1–0,5M-NaOD v D_2O . Jiná rozpouštědla, například dimethylsulfoxid (DMSO), se používají méně, jejich použití je opodstatněno například u dvourozměrných NMR spekter¹¹. Navážka HK se pohybuje okolo 200 mg, koncentrace je 50–100 mg ml^{-1} . Při vyšší koncentraci HK i NaOD se kvůli vyšší viskozitě a iontové síle zhoršuje kvalita spektra vlivem ztráty rozlišení. Pulsní sekvenci používanou pro měření ^{13}C NMR spekter huminových kyselin v roztoku lze zapsat $\pi/2 - t_{\text{acq}}$, kde $\pi/2$ představuje 90° úhel sklopení magnetizace a t_{acq} dobu snímání (akvizice) dat. Pro potlačení nežádoucí interakce s jádry ^1H , která se projevuje vznikem multipletů v ^{13}C spektru, se používá širokopásmový decoupling jader ^1H , založený na využití poměrně silného přídavného oscilujícího magnetického pole B_2 , které vyvolá rychlé přechody mezi energetickými hladinami jádra ^1H , čímž se zkracuje doba života spinových stavů těchto jader. Důsledkem je potlačení jejich interakce se spiny měřených jader ^{13}C . K získání kvantitativního ^{13}C NMR spektra s decouplingem protonů je ovšem nezbytná dostatečně dlouhá relaxační doba, aby stačila relaxovat i jádra ^{13}C s dlouhým spin-mřížkovým relaxačním časem T_1 (zejména kvartérní uhlíkové atomy). Pro kvantitativní měření se obvykle používá metoda tzv. inverzního klíčovaného decouplingu (Inverse Gated Decoupling)¹², při němž je protonový decoupler zapnut pouze při snímání dat; při následující relaxaci systému mezi dvěma akumulacemi (skeny) je vypnut. Dosáhne se tím jednak zrušení nepřímých spin-spinových interakcí ($^1\text{H} - ^{13}\text{C}$) ve

spektu během snímání dat, ale také přímých dipól-dipólových interakcí prostorem, jinými slovy zabrání se vzniku NOE (nukleárního Overhauserova efektu) během relaxační periody¹³. Různá schopnost relaxace C-atomů a různý vliv NOE na intenzitu jejich signálů jsou totiž hlavními příčinami toho, proč nelze běžná ^{13}C NMR spektra (na rozdíl od ^1H spekter) využít pro kvantitativní analýzu. Při inverzním klíčovaném decouplingu se běžně používá pulsní opakovací doba (recycle time) 5 s, někteří autoři¹⁴ však volí pouze 2 s, jiní¹⁵ naopak až 8 s. Relaxační periodu lze při této technice zkrátit použitím menšího sklápěcího úhlu (obvykle 45°). Relaxační činidla (např. acetylacetonát chromitý), přidávaná ke vzorku pro zkrácení relaxačního času, se při měření ^{13}C NMR spekter huminových kyselin nepoužívají (mj. kvůli možnému srážení hydroxidů/oxidů při $\text{pH} > 13$).

K získání dostatečně kvalitního spektra HK s vysokým odstupem signálů od šumu je nezbytná poměrně dlouhá doba akumulace dat. Typická doba měření ^{13}C NMR spektra HK je 12 hodin. Výsledný záznam FID (Free Induction Decay, volně doznívající indukce) se před Fourierovou transformací matematicky upravuje s použitím vázící funkce. Tato vhodně zvolená klesající exponenciální funkce rozšířením základní linie spektra (line broadening, LB) zvyšuje poměr signálu k šumu bez výrazného snížení rozlišení. Při zpracování ^{13}C NMR spekter HK jsou nejvhodnější hodnoty¹² LB v rozmezí 20–50 Hz.

^{13}C NMR spektra huminových kyselin a fulvokyselin prezentovaná v tomto článku byla měřena v 0,1M-NaOD v D_2O spektrometrem Bruker Avance DRX 500 s pracovní frekvencí 125,758 MHz (^{13}C) s těmito parametry: teplota 298,15 K, průměr kyvety 5 mm, počet akumulací na jedno spektrum 12 000, délka excitačního pulsu 5,7 μs (90°), akviziční čas 0,43 s, šířka spektra 37 538 Hz, pulsní opakovací doba 5 s a ^1H inverzní klíčovaný decoupling. Signál FID byl zpracován s rozšířením linie 25 Hz, chemické posuny byly vztaženy k signálu TMS jako externímu standardu.

Časově náročnými technikami DEPT a QUAT¹⁶ lze ve spektru HK rozlišit signály CH_3 , CH_2 , CH a kvartérních atomů C. Při technice DEPT (Distortionless Enhancement by Polarization Transfer, zvýšení citlivosti přenosem polarizace) se měří tři NMR spektra při různé šířce posledního (editačního) ^1H pulsu (θ_{45° , θ_{90° a θ_{135°). Kombinace těchto spekter¹⁷ poskytne tři subspektra, v nichž se projevuje signál pouze určitých typů uhlíkových atomů (methylových, methylenových, resp. methinových), zatímco signály ostatních typů atomů C jsou potlačeny. K získání DEPT spektra HK s dobrým poměrem signálu k šumu je zapotřebí přes 12 000–15 000 akumulací, což při opakovací době 5 s odpovídá celkové době měření cca 20 hodin, pro měření kvartérních atomů uhlíku technikou QUAT (QUATernary carbon observation) je při opakovací době 10 s zapotřebí dvoudenního měření.

Získání kvalitního ^{13}C NMR spektra HK klade vysoké nároky také na čistotu a rozpustnost vzorku. Přítomnost paramagnetických iontů ve vzorku způsobuje nežádoucí

rozšíření signálů, proto bývají ionty Fe^{3+} a Mn^{2+} při preparaci HK odstraňovány např. kyselinou fluorovodíkovou. Rozšíření signálů v ^{13}C NMR spektru způsobuje také nehomogenita rozpuštěného vzorku. Případný nerozpustný podíl ve vzorku HK je nezbytné před měřením odstranit odstředěním; vyloučení části vzorku však může komplikovat interpretaci spektra i srovnání s výsledky jiných analýz. Také asociace molekul HK do „komplexů“ s nízkou pohyblivostí, způsobená vyšší koncentrací HK nebo předchozím nešetrným sušením vzorku při vyšší teplotě, se na kvalitě spektra projevuje negativně.

Donedávna byla NMR spektrometrie huminových látek v roztoku omezena na studium huminových kyselin a fulvokyselin. Huminy, nejodolnější frakce huminových látek, byly považovány za neextrahovatelný zbytek. Simpson a spol.¹⁸ však ukázali, že více než 70 % huminů lze převést do roztoku postupným extrahováním roztokem 6M močoviny v 0,1M-NaOH a poté směsí DMSO–6% H_2SO_4 .

3.1. Přiřazení pásů v ^{13}C NMR spektrech

V ^{13}C NMR spektrech huminových kyselin se rozlišují čtyři základní oblasti: oblast alifatických atomů C (0 až 45 ppm), oblast *O*-alkylových a peptidových C atomů (45–110 ppm), aromatických a fenolických uhlíků (110 až 160 ppm) a karboxylových a karbonylových atomů C (160–200/230 ppm). Hranice mezi těmito oblastmi nevolí všichni autoři stejně – například pro rozlišení alifatického a *O*-alkylového atomu uhlíku bývá někdy používán chemický posun 50 ppm, hranice aromatického C bývá vedle uvedené hodnoty 110 ppm, obvyklé především při měření v pevné fázi, kladena též k hodnotám posunů 103, 105 nebo 106 ppm. U NMR spektroskopie v roztoku je vhodné volit jako spodní hranici aromatických C atomů lokální minimum mezi 105–108 ppm, jehož přesná poloha je ovlivněna podmínkami měření (koncentrací měřené látky, pH, iontovou silou roztoku). Podobně je posunuta horní hranice aromatické oblasti na 165 ppm (cit.¹⁹), zatímco při měření v pevné fázi se užívá 160 ppm. V hraničních oblastech se sice zpravidla nevyskytují intenzivní pásy a rozdíly tedy nejsou velké, sjednocení intervalů a podmínek měření by však bylo žádoucí.

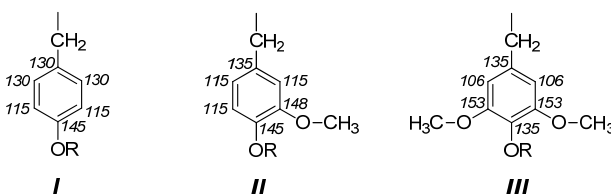
V oblasti 0–45 ppm nalézáme signály alkanových uhlíků mastných kyselin a vosků, výrazný signál při 22 ppm patří uhlíkům CH_3 skupin. Uhlíkové atomy proteinů přispívají signály v oblasti 20–60 ppm a signály karbonylové skupiny při 175 ppm. Signály methylenových skupin při 27, 31 a 40 ppm příslušejí uhlíkům methylenových řetězců v alkanech a mastných kyselinách²⁰, signály při 31 a 40 ppm patří pravděpodobně methylenové skupině vázané na benzenovém nebo aromatickém jádře²¹ (včetně methylenových můstků mezi aromatickými kruhy).

Oblasti 60–90 ppm dominují signály celulosy a hemicelulos, určitý podíl připadá také na atomy C postranních alifatických řetězců ligninu. Pás při 55–56 (58) ppm přiřazujeme $\text{O}-\text{CH}_3$ skupinám methylovaných sacharidů v hemicelulosách, do této oblasti přispívají také α -C atomy aminokyselin (56–62 ppm) a alifatické CH_2 skupiny,

vázané na aromatický kruh v ligninu. Výrazný pás s maximem při 72 ppm odpovídá atomům C-2, C-3 a C-5 celulosy; maximum pásu C-1 celulosy je při 105 ppm. Ramena pásu při 64 a 88 ppm odpovídají zbývajícím atomům C-6 a C-4 celulosy, rameno pásu při 103 ppm pochází od C-1 atomu hemicelulos. Pokud podrobíme HK hydrolýze v 6M HCl, maxima při 62–64 a 72–73 ppm odpovídající atomům C v celulose a proteinech se již v NMR spektru neobjevují nebo jsou výrazně nižší.

Pás v oblasti přibližně 95–105 ppm přísluší anomerním uhlíkům v sacharidech, pásy mezi 62 až 80 ppm různým alifatickým alkoholům a sacharidům. Poměr intenzity tohoto pásu (resp. ramene při 99 ppm) k součtu intenzit pásů methinových a methylenových uhlíků s maximy při 73 a 66 ppm poskytuje informace o typech přítomných alifatických alkoholů. Pokud jsou například alifatickými alkoholy výhradně hexosy¹⁵, je poměr I_{99}/I_{73} roven 0,2.

Aromatické strukturní jednotky huminových látek jsou odvozeny od ligninu, polymerní látky rostlinného původu, složené z monomerních jednotek – 4-hydroxycinnamylalkoholu, koniferylalkoholu a sinapylalkoholu. Na obr. 1 jsou znázorněny chemické posuny aromatických atomů C v těchto jednotkách; alifatická CH_2 skupina ligninu, vázaná k aromatickému kruhu, se projevuje signálem při 56 ppm. V aromatické oblasti spektra můžeme rozlišit tři výraznější signály při hodnotách chemických posunů přibližně 115, 130 a 145–150 ppm. Atomy C-2 a C-6 sinapylových (syringylových) jednotek, výrazně zastoupených v dřevě listnatých stromů a v produktech jeho rozkladu, přispívají k pásu při 105 ppm. Při 130 ppm rezonují kvartérní aromatické uhlíky (C-1) a aromatické CH uhlíky, pokud se nenacházejí v poloze *ortho* nebo *para* k *O*-substituovaným aromatickým uhlíkům (C-2 a C-4 v 4-hydroxycinnamyllové jednotce). Atomy C-3 a C-5 ve vazbách β -*O*-4 sinapylalkoholových jednotek a atomy C-3 a C-4 koniferylalkoholových (vanilylových) jednotek, se projevují dubletem při 145 a 148 ppm. Signál při 150 ppm patří *O*-substituovaným aromatickým (fenolickým) uhlíkům. U půdních huminových kyselin může charakter aromatické oblasti spektra prozradit jejich původ. Zatímco lignin jehličnatých stromů je tvořen především jednotkami koniferylalkoholu, lignin listnatých stromů je tvořen z jednotek koniferylalkoholu a sinapylalkoholu a v ligninu trav je vý-



Obr. 1. Strukturní jednotky ligninu, odvozené od 4-hydroxycinnamylalkoholu (I), koniferylalkoholu (II) a sinapylalkoholu (III). Čísla udávají charakteristické chemické posuny aromatických uhlíkových atomů v ^{13}C NMR spektru (ppm)²². R označuje organický zbytek

znamněji zastoupen i 4-hydroxycinnamylalkohol (*p*-kumarylalkohol)²³, což se projevuje i ve složení huminových kyselin.

Maximum v aromatické oblasti (106–165 ppm) bývá u spekter měřených v roztoku pozorováno při nižším poli (135 ppm) než u spekter měřených v pevném stavu (¹³C CP/MAS NMR, 125–130 ppm). Je to způsobeno tím, že při měření v kapalném stavu (na rozdíl od techniky CP/MAS) poskytují signál nesnížené intenzity také kvarterní uhlíkové atomy aromatických jader, kterých je v HK více než nesubstituovaných aromatických atomů C. Ve standardech IHSS (International Humic Substances Society) bylo zjištěno, že v průměru připadá jedna kyselá hydroxyskupina na dva benzenové kruhy²⁴. Z dalších významných výsledků získaných ¹³C NMR vyplynulo¹⁵, že v aromatických strukturách huminových kyselin je vázána průměrně třetina uhlíkových atomů. Tento dnes již obecně přijatý závěr se nedávno pokusil zpochybnit Hanninen²⁵, který předpokládá, že k signálu v aromatické oblasti spektra ve větší míře přispívají alifatické C=C vazby.

Rozhodující vliv na reaktivitu huminových kyselin mají karboxylové skupiny, jejichž stanovení je jedním z hlavních cílů analýzy HK. Značný význam má i strukturální analýza okolí karboxylů²⁶. Karboxylové uhlíky se projevují charakteristickým výrazným pásem v oblasti 165 až 190 ppm s maximem při 173–175 ppm. Tento pás je typický pro všechny HK a FK s výjimkou průmyslově vyráběných lignohumátů, u nichž funkci karboxylu zastává převážně skupina sulfátová a signály v této oblasti pocházejí především od karbonylových uhlíků. V důsledku disociace v alkalickém prostředí bývá maximum pásu karboxylů v LS NMR spektrech ve srovnání se spektry v pevném stavu posunuto o 8–10 ppm k nižším polím²⁷. Část signálu karboxylů může pocházet z uronové kyseliny v hemicelulose, proteinů sorbovaných HK a částečně oxidovaných ligninů. U vzorků HK podrobených hydrolyze v 6M HCl bývá zjišťován nižší obsah karboxylových atomů C, zřejmě v důsledku odstranění aminokyselin po hydrolyze proteinů, úbytku kyselých sacharidů, případně částečné dekarboxylace HK. V oblasti 190–230 ppm bývá pozorován méně intenzivní pás karbonylových atomů uhlíku, který se může projevit také jako rameno pásu karboxylových uhlíků, nebo nemusí být vůbec patrný (například v důsledku deformace základní linie spektra). Obsah karboxylových a karbonylových atomů uhlíku v huminových kyselinách, stanovený metodou LS ¹³C NMR, bývá výrazně vyšší než hodnoty získané spíše semikvantitativní ¹³C CP/MAS NMR spektrometrií v pevném stavu²⁸. Titrace stanovený obsah karboxylových skupin v HK dosahuje v průměru pouze 69±6 % karboxylových struktur²⁴ zjištěných spektrálně (¹³C LS NMR).

3.2. Významné strukturální parametry HK, které lze získat z ¹³C NMR spekter

Hlavním strukturálním údajem, získaným z NMR spekter HK, je jejich aromaticita f_a , často vyjadřovaná²⁹ jako poměr aromatických atomů C (u LS spektrometrie oblast

~106–165 ppm) ke všem atomům C (0–230 ppm, rovnice (2)). Jiní autoři^{30,31} vyjadřují aromaticitu f_a jako podíl součtu aromatických a fenolických atomů C ke všem atomům C s výjimkou karboxylových a karbonylových (vztah (3)), které nelze přiřadit ani alifatickým, ani aromatickým strukturám. Srovnání hodnot f_a různých autorů komplikují kromě odlišných integračních mezi ještě další používané definice aromaticity jako poměru atomů C v aromatické části k atomům C v alifatické části spektra (rovnice (4)), nebo definice obdobná vztahu (2), avšak s korekcí na karboxylové atomy C (výraz (5)).

$$f_a = \frac{I_{106-165}}{I_{0-230}} \quad (2)$$

$$f_a = \frac{I_{106-165}}{I_{0-165}} \quad (3)$$

$$f_a = \frac{I_{106-165}}{I_{0-106}} \quad (4)$$

$$f_a = \frac{I_{106-165}}{I_{0-230} - I_{165-190}} \quad (5)$$

Při výpočtu f_a z ¹³C CP/MAS spekter se uvedené vzorce používají po úpravě oblasti aromatických C (110 až 160 ppm). Dříve se aromaticita vyjadřovala v procentech, dnes převažuje vyjádření desetinným číslem. Je zřejmé, že při prezentaci výsledků je nezbytné uvádět způsob výpočtu aromaticity a při srovnání výsledků s cizími pracemi je obvykle třeba aromaticitu z publikovaných údajů vypočítat. V této práci, podobně jako jinde³², používáme definici podle rovnice (3).

Poměr I_{99}/I_{73} , navržený pro charakterizaci typů alifatických alkoholů v HK a zmíněný v odstavci 3.1, se prakticky nepoužívá. Nepříliš užívaným parametrem je i alifaticita f_{al} , vyjádřená jako poměr alifatických uhlíků k uhlíkům v oblasti spektra 0–165 ppm, nezahrnující karboxylové atomy C:

$$f_{al} = \frac{I_{0-106}}{I_{0-165}} \quad (6)$$

Je evidentní, že součet alifaticity a příslušné aromaticity (vztahy (3) a (6)) je roven jedné a tedy že alifaticita má pouze doplňkový význam.

¹³C NMR spektrometrií se nedávno podařilo zjistit odlišný způsob sorpce HK na jílových minerálech³³. Zatímco alifatické části HK se přednostně sorbují na kaolinitu a montmorillonitu, karboxylové funkční skupiny hrají významnou roli při sorpci HK na goethitu. Bylo tak prokázáno, že huminové kyseliny významným způsobem modifikují sorpční vlastnosti jílových minerálů a jejich interakci s organickými kontaminanty.

Pokusy odvodit biologickou aktivitu huminových

látek přímo z jejich ^{13}C NMR struktury vedly k návržení faktoru biologické účinnosti HK jako poměru obsahu biologicky účinných atomů C (aromatických a karboxylových, 106–230 ppm) k biologicky neúčinným atomům C (alkylovým a O-alkylovým, 0–106 ppm). Zajímavými empirickými indexy jsou hydrofobnost a hydrofilnost huminových kyselin³⁴. Alkylové (0–45 ppm) a aromatické (106–165 ppm) atomy uhlíku tvoří hydrofobní část molekuly HK, zatímco atomy C vázané ve skupinách C–O, C–N a O– a N-alkylové atomy C (45–106 ppm) spolu s karboxylovými atomy C (165–230 ppm) představují hydrofilní části molekuly HK. Procentuálně vyjádřená zastoupení těchto typů atomu uhlíku se nazývají hydrofobnost a hydrofilnost huminových kyselin; jako parametr se používá i poměr hydrofilnosti a hydrofobnosti. Půdní huminové kyseliny, obsahující zpravidla vyšší podíl O-alkylových a karboxylových uhlíků, bývají hydrofilnější, zatímco HK izolované z lignitu a oxyhumolitů jsou většíinou hydrofobnější. Huminové kyseliny s vyšší hydrofobností mají vyšší schopnost interagovat s méně polárními látkami a naopak nižší reaktivitu s polárnějšími látkami. Projevit se to může např. změnou molekulových hmotností HK indukovanou monokarboxylovými kyselinami s různě dlouhým uhlíkatým řetězcem³⁵.

4. Kvantitativní analýza huminových látek ^{13}C NMR spektroskopii

V kvantitativní ^{13}C NMR spektrometrii jsou integrální intenzity signálů úměrné zastoupení jednotlivých typů atomů C ve vzorku. Stanovení různých typů atomů uhlíku v huminových látkách ^{13}C NMR spektroskopii v roztoku však závisí na relaxačních časech T_1 jader ^{13}C atomů. Čím omezenější je pohyb chemických skupin, jejichž atomy ^{13}C měříme, tím delší je relaxační čas T_1 jader těchto atomů a nižší intenzita jejich NMR signálu. Díky své heterogenní povaze se molekuly huminových kyselin mohou vyskytovat v roztoku jako pseudomicely, v nichž hydrofobní fáze sousedí s fází hydrofilní. Čím více převažují v molekule HK hydrofobní skupiny (např. dlouhé alkyly), tím více hydrofobních složek převládá mezi micelami HK³⁶. V takových doménách je poměr rozpuštěné látky k rozpouštědлу velmi nízký, což omezuje molekulární pohyb alifatických složek. V důsledku toho může být při měření ^{13}C NMR v roztoku podhodnocen obsah uhlíkových atomů typu sp³.

Velký význam pro kvantitativní analýzu HK má tvar základní linie spektra, která je u těchto komplikovaných spekter náchylná k deformacím. Pokud není deformace velká, lze před integrací spektra provést její korekci polynomickou funkcí. Při větších problémech s deformací základní linie spektra HK, způsobených tzv. akustickými zázněji, se k jejich potlačení využívá sekvenční ANTIRING³⁷.

Výsledky získané ^{13}C NMR spektroskopii huminových látek nebývají zcela shodné s výsledky tradičních chemických analýz. Příčin je více, jednou z nich může být

nedostupnost části funkčních skupin HK pro chemickou reakci při tradičních analýzách. Naopak při měření NMR spekter může část některých typů ^{13}C atomů rezonovat při jiných chemických posunech než v případě jednoduchých modelových molekul nebo se nemusí ve spektru projevit zcela kvantitativně v důsledku dlouhých relaxačních časů, daných omezenou pohyblivostí. Vyšší obsah paramagnetických iontů ve vzorku, především Fe^{3+} , může způsobovat vymizení signálů okolních jader ^{13}C z důvodů jejich rychlé spin-spinové relaxace. Další komplikace může působit tvorba pseudomicel^{38,39} nebo koloidní povaha roztoku HK, nízká rozpustnost, vliv rozpouštědla na chemický posun aj. ^{13}C NMR spektroskopii tak bývá stanoven poněkud nižší obsah fenolických uhlíkových atomů a vyšší obsah karboxylových a sacharidových uhlíků. Je pravděpodobné, že pásy fenolických atomů mohou splývat s výraznějším pásem karboxylů. Shody výsledků potenciometrického stanovení těchto funkčních skupin a ^{13}C NMR lze dosáhnout speciálními postupy – například methylovací HK⁴⁰ činidlem

Tabulka I

Kódové označení a původ vzorků huminových kyselin a fulvokyselin

Kód	Půdní typ nebo substrát	Lokalita
<i>Huminové kyseliny</i>		
B2	Kryptopodzol	Boubín S, Šumava, horizont O _f
C	Černozem	Střední Čechy, pole, horizont A _p
C3	Kryptopodzol	Boubín JZ, Šumava, horizont O _h
CR	Černozem	Samara, Rusko, step ⁴² , horizont A
P4	Kambizem	Chelčice, jižní Čechy, pole, horiz. A _p
RB	Rašelina II	Branná, jižní Čechy
RP	Rašelina III	Příbraz, jižní Čechy
T1	Podzol	Trojmezí, Šumava, horizont O _i
T2	Podzol	Trojmezí, Šumava, horizont O _f
T5	Podzol	Trojmezí, Šumava, horizont A _h
U2	Kambizem	Chelčice, jižní Čechy, úhor, horiz. A
XB	Oxyhumolit	Lom Václav, Bílina
XF	Komerční HK, čištěná	Fluka, kat. č. 53680
XL	Lignohumát, čištěný	Petrohrad, Rusko
XM	Lignit	Mikulčice, Morava
<i>Fulvokyseliny</i>		
A6F	Podzol	Západní Krkonoše, horizont B _h
B6F	Kryptopodzol	Boubín, Šumava, horizont B _w
N6F	Podzol	Východní Krkonoše, horizont B _h
XRF	Oxyhumolit, čištěný	Carl Roth GmbH, Německo

obohaceným isotopem ^{13}C .

Výhodou NMR spektroskopie HK v roztoku je menší rozšíření signálů vlivem dipolárních interakcí a anizotropie chemického posunu. Ve srovnání s ^{13}C spektroskopií v pevném stavu mají spektra HK měřená v roztoku vyšší rozlišení a lze z nich získat více informací⁴¹. Nezanedbatelná je také větší dostupnost spektrometrů pro měření v roztoku ve srovnání s přístroji na měření v pevné fázi. Nevýhodou LS ^{13}C NMR techniky je vyšší nárok na přípravu vzorku (nutná je dobrá rozpustnost HK a nízký obsah paramagnetických iontů) a podstatně delší čas měření.

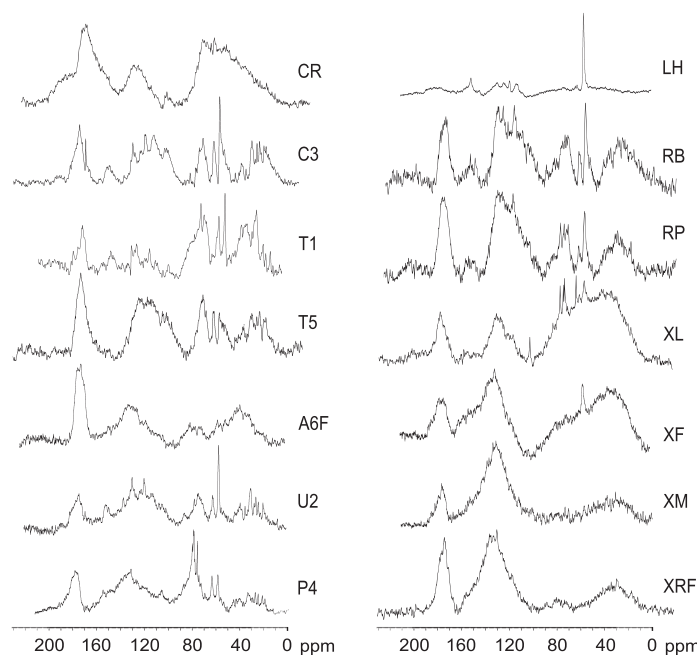
5. LS ^{13}C NMR spektra vybraných huminových kyselin a fulvokyselin

Jedním z cílů naší práce bylo získat strukturní údaje z kvantitativních ^{13}C NMR spekter reprezentativního souboru huminových látek (obr. 2), izolovaných z významných půdních typů a fosilních organických ložisek (rašelina, lignit, oxyhumolit) charakteristických pro Českou republiku (tab. I). Pro srovnání byly do souboru zahrnuty i přečištěná komerční HK (Fluka), HK izolované z lignohumátu a z ruské černozemě. Kromě huminových kyselin bylo analyzováno i několik fulvokyselin, které se od huminových kyselin liší především tím, že mají menší molekuly, jsou rozpustné i v kyselém prostředí ($\text{pH} < 2$) a jejich roztoky jsou světlejší. Výsledky jsou shrnuty v tab. II.

Nejcennějšími strukturními údaji, získanými z ^{13}C NMR spekter HK, jsou aromaticita a obsah karboxylových atomů uhlíku. Z výsledků shrnutých v tab. II je

zřejmé, že vysokou aromaticitou jsou charakteristické HK izolované z oxyhumolitů: HK z dolu Václav u Bíliny se aromaticitou 0,64 blíží HK z leonarditu (USA), pro kterou je uváděna^{43,44} hodnota 0,71–0,78. Z půdních HK dosahují podobné aromaticity jen některé černozemní HK. Podstatně nižší aromaticitu mají HK izolované z lignitu a rašeliny; u HK z oxidovaných lignitů bývá pozorována aromaticita vyšší. Při srovnání rašelinných HK (tab. II, obr. 2) je zřejmá změna struktury v průběhu zrání rašeliny – u starší rašeliny Příbraz mají HK vyšší aromaticitu i obsah karboxylových uhlíků. Poměrně vysoká aromaticita lignohumátů, produkovaných z odpadu při výrobě celulosy, je důsledkem vysokého podílu ligninu v surovině.

Pro černozemní HK uvádějí Rodionov a spol.⁴⁵ aromaticitu 0,47. Vyšší aromaticita půdních HK je zřejmě důsledkem intenzivního obhospodařování půdy, neboť aromatické struktury jsou vůči mikrobiálnímu rozkladu odolnější než *O*-alkyl sloučeniny. Zatímco u HK z neobdělávané stepní černozemě jsme zjistili aromaticitu 0,33, na obhospodařovaném poli⁴⁶ dosáhla aromaticita HK 0,56–0,75. Průměrná aromaticita huminových kyselin ze série solonců (alkalických půd s vysokou koncentrací solí) v kanadském Saskatchewanu⁴⁷ byla $0,525 \pm 0,065$. U HK izolovaných z kambizemě se aromaticita pohybovala v rozmezí 0,35–0,49, obsah karboxylových skupin byl nízký (tab. II). Podobnou aromaticitu měly i HK z lesních půd (kryptopodzol, podzol). Ve svrchních horizontech byl zjištěn nízký obsah karboxylových a vyšší obsah *O*-alkylových uhlíků, což je důsledkem nízkého stupně humifikace a projevuje se i nižší aromaticitou. Při srovnání spekter HK z různých horizontů půdního profilu (T1 a T5, obr. 2) je zřejmý nárůst obsahu karboxylových a aromatic-



Obr. 2. ^{13}C NMR spektra huminových kyselin. Použité kódové značení je uvedeno v tabulce I; bližší informace v textu

Tabulka II

Procentní zastoupení uhlíkových atomů charakterizovaných signály v příslušných oblastech ^{13}C NMR spekter vzorků huminových kyselin a fulvokyselin, aromaticita f_a , poměr hydrofilnosti a hydrofobnosti (H_f/H_o) a parametr biologické aktivity (BiA) vzorků

Kód ^a	Zastoupení (%) ve spektrální oblasti (ppm)				f_a	H_f/H_o	BiA
	0–45	45–106	106–165	165–220			
B2	26,6	30,8	25,6	17,0	0,31	0,91	0,74
C	9,3	11,5	62,6	16,7	0,75	0,39	3,83
C3	21,1	31,5	30,7	16,7	0,37	0,93	0,90
CR	16,6	32,9	24,6	25,9	0,33	1,43	1,02
Leonardit ^b	14,9	7,7	55,4	22,3	0,71	0,43	3,44
P4	12,5	40,9	28,8	17,8	0,35	1,42	0,87
RB	20,7	26,0	37,9	15,4	0,45	0,71	1,14
RP	15,2	23,1	42,5	19,2	0,53	0,73	1,61
T1	24,1	40,4	22,5	13,0	0,26	1,15	0,55
T2	17,9	25,0	43,5	13,6	0,50	0,63	1,33
T5	18,4	30,8	31,4	19,4	0,39	1,01	1,03
U2	16,5	29,3	44,0	10,3	0,49	0,65	1,19
XB	17,1	15,0	56,5	11,4	0,64	0,36	2,11
XF	30,8	24,6	31,0	13,6	0,36	0,62	0,80
XL	7,9	30,7	44,0	17,4	0,53	0,93	1,59
XM	27,9	41,3	18,0	12,7	0,21	1,18	0,44
A6F	20,9	21,9	33,9	23,3	0,44	0,82	1,34
B6F	20,0	18,8	22,5	38,7	0,37	1,35	1,58
N6F	17,7	16,9	28,9	36,4	0,46	1,14	1,89
XRF	18,8	12,7	49,4	19,1	0,61	0,47	2,18

^a Viz tabulka I, ^b převzato z cit.⁴³

kých atomů uhlíku a pokles obsahu *O*-alkyl uhlíků v průběhu zrání půdních huminových kyselin.

Půdní fulvokyseliny měly aromaticitu v rozmezí 0,37 až 0,46 a vysoký obsah karboxylových atomů uhlíku (0,23–0,29). Vyšší aromaticitu (0,61) jsme zjistili u FK z oxyhumolitu. Značně proměnlivou aromaticitu, odrážející vlivy prostředí, mají sladkovodní fulvokyseliny. ^{13}C NMR spektroskopii byly popsány výrazné sezónní změny ve složení jezerních fulvokyselin, jejichž aromaticita se v průběhu roku měnila mezi 0,28–0,35 a 0,16–0,21 v závislosti na antropogenní zátěži povodí⁴⁸.

Studované huminové látky se výrazně lišily parametrem biologické aktivity (tab. II). Nízké hodnoty byly zjištěny u některých půdních HK, zejména z podzolů; příslušné fulvokyseliny měly hodnoty vyšší. U biologicky značně aktivních lignohumátů jsou parametry hydrofilnosti i biologické aktivity podceněné, neboť přítomné sulfoskupiny se ^{13}C NMR spektroskopii nestanoví. Nejvyšší biologická aktivita byla zjištěna pro HK z černozemě, leonarditu a jeho českého protějšku – oxyhumolitu. Protože však tyto

látky měly současně nízký poměr hydrofilnosti a hydrofobnosti, lze předpokládat, že výsledná biologická aktivita je určována kombinací obou faktorů.

6. Závěr

^{13}C NMR spektroskopie v roztoku významnou měrou přispívá k prohloubení znalosti struktury huminových kyselin a spolu s ^{13}C NMR spektroskopii v pevném stavu je základní metodou jejich studia. ^{13}C NMR spektroskopii byl prokázán velký podíl alifatických (sacharidových i alkylových) atomů C v huminových kyselinách a bylo tak překonáno rozšířené mínění, že chemická struktura půdních HK je převážně aromatická⁴⁹. Vzhledem k tomu, že huminové látky tvoří největší frakci organického uhlíku na Zemi, ovlivňují podobné závěry zásadním způsobem představy o stabilitě a koloběhu sloučenin uhlíku v ekosystémech s dalekosáhlými důsledky např. pro odhad obohacování atmosféry oxidem uhličitým.

Při vyhodnocování LS ^{13}C NMR spekter HK doporučujeme: (i) používat standardní integrační hodnoty 0, 45, 105–108, 165 a 200 (230) ppm a (ii) vyjadřovat aromaticitu podle vzorce (3). Při srovnávání s výsledky jiných autorů je nezbytné vzít v úvahu, že nemálo měření bylo provedeno bez optimalizace akvizičních parametrů pro kvantitativní měření, a proto může být srovnatelnost výsledků různých laboratorí problematická i při stejných integračních mezích. Možnosti interpretace ^{13}C NMR spekter huminových kyselin je vhodné rozšířit využitím dalších spektrálních metod – zejména FTIR, pyGC-MS, EPR a UV-VIS spektrometrie. V budoucnu lze očekávat optimalizaci podmínek měření ^{13}C NMR spekter huminových kyselin zaměřenou na stanovení hlavních typů atomů uhlíku a na potlačení nežádoucích jevů, zejména deformace základní linie spektra.

LITERATURA

1. Lal R.: *Science* 304, 1623 (2004).
2. Friebolin H.: *Basic One- and Two-Dimensional NMR Spectroscopy*. 3. vyd. Wiley, New York 1998.
3. Macomber R. S.: *A Complete Introduction to Modern NMR Spectroscopy*. Wiley-Interscience, New York 2008.
4. Buděšínský M., Pelnař J.: *Fyzikálně-chemické metody: nukleární magnetická rezonance* (Kohout L., Hnilíčková J., Slavíková B., ed.), cyklus Org. chemie, sv. 25, ÚOCHB AV ČR, Praha 2000.
5. Novák F., Hrabal R., Bartošová I., Kalčík J.: *Chem. Listy* 99, 236 (2005).
6. Straka P., Klika Z.: *Chem. Listy* 100, 363 (2006).
7. Mathieu N., Olk D. C., Randall E. W.: *Eur. J. Soil Sci.* 51, 379 (2000).
8. Barton D. H. R., Schnitzer M.: *Nature* 1989, 217 (1963).
9. González-Vila F. J., Lentz H., Lüdemann H.-D.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 72, 1063 (1976).
10. Wershaw R. L.: *Environ. Sci. Technol.* 27, 814 (1993).
11. Simpson A.: *Soil Sci.* 166, 795 (2001).
12. Preston C. M., Blackwell B. A.: *Soil Sci.* 139, 88 (1985).
13. Freeman E., Hill D. W., Kaptein R.: *J. Magn. Reson.* 7, 327 (1972).
14. Dai X. Y., Ping C. L., Candler R., Haumaier L., Zech W.: *Soil Sci. Soc. Am. J.* 65, 87 (2001).
15. Wershaw R. L., Leenheer J. A., Kennedy K. R., Noyes T. I.: *Soil Sci.* 161, 667 (1996).
16. Shin H. S., Moon H.: *Soil Sci.* 161, 250 (1996).
17. Bendall M. B., Pegg D. T.: *J. Magn. Reson.* 53, 272 (1983).
18. Simpson A. J., Song G. X., Smith E., Lam B., Novotny E. H., Hayes M. H. B.: *Environ. Sci. Technol.* 41, 876 (2007).
19. Steelink C., Wershaw R. L., Thorn K. A., Wilson M. A., v knize: *Humic Substances II. In Search of Structure* (Hayes M. H. B., MacCarthy P., Malcolm R. L., Swift R. S., ed.), str. 309. Wiley, New York 1989.
20. Schnitzer M., Preston C. M.: *Soil Sci. Soc. Am. J.* 51, 639 (1987).
21. Hanninen K. I.: *Sci. Total Environ.* 62, 193 (1987).
22. Hatcher P. G.: *Org. Geochem.* 11, 31 (1987).
23. Flaig W., Beutelspacher H., Rietz E., v knize: *Soil Components I: Organic compounds, Vol. 1* (Gieseking J. E., ed.), str. 4. Springer-Verlag, New York 1975.
24. Ritchie J. D., Perdue E. M.: *Org. Geochem.* 39, 783 (2008).
25. Hanninen K., v knize: *From Molecular Understanding to Innovative Applications of Humic Substances* (Perminova I. V., Kulikova N. A., ed.), str. 81. Lomonosov State University, Moscow 2008.
26. Deshmukh A. P., Pacheco C., Hay M. B., Myneni S. C. B.: *Geochim. Cosmochim. Acta* 71, 3533 (2007).
27. Conte P., Piccolo A., van Lagen B., Buurman P., de Jager P. A.: *Geoderma* 80, 339 (1997).
28. Watanabe A., Fujitake N.: *Anal. Chim. Acta* 618, 110 (2008).
29. Stevenson F. J.: *Humus Chemistry: Genesis, Composition, Reactions*. 2. vyd. Wiley, New York 1994.
30. Hatcher P. G., Schnitzer M., Dennis L. W., Maciel G. A.: *Soil Sci. Soc. Am. J.* 45, 1089 (1981).
31. Schnitzer M.: *Soil Sci.* 151, 41 (1991).
32. Novák F., Hrabal R., Brus J.: *Chem. Listy* 98, 620 (2004).
33. Ghosh S., Wang Z. Y., Kang S., Bhowmik P. C., Xing B. S.: *Pedosphere* 19, 21 (2009).
34. Piccolo A., Conte P., v knize: *Structure and Surface Reactions of Soil Particles* (Huang P. M., Senesi N., Buffle J., ed.), str. 184. Wiley, New York 1998.
35. Piccolo A., Conte P., Cozzolino A.: *Eur. J. Soil Sci.* 50, 687 (1999).
36. Piccolo A., Nardi S., Concheri G.: *Chemosphere* 33, 595 (1996).
37. Belton P. S., Cox I. J., Hartus R. H.: *J. Chem. Soc., Faraday Trans. 2* 81, 63 (1985).
38. Piccolo A.: *Adv. Agronomy* 75, 57 (2002).
39. Conte P., Spaccini R., Šmejkalová D., Nebbioso A., Piccolo A.: *Chemosphere* 69, 1032 (2007).
40. Leenheer J. A., Noyes T. I., v knize: *Humic Substances II: In Search of Structure* (Hayes M. B. H., MacCarthy P., Malcolm R. L., Swift R. S. ed.), str. 257, Wiley, New York 1989.
41. Schnitzer M., Preston C. M.: *Soil Sci. Soc. Am. J.* 50, 326 (1986).
42. Abakumov E., Fujitake N., Kosaki T.: *Appl. Environ. Soil Sci.*, 2009, Article ID 671359, 5 str, doi:10.1155/2009/671359.
43. Mao J.-D., Hu W.-G., Schmidt Rohr K., Davies G., Ghabbour E. A., Xing B.: *Soil Sci. Am. J.* 64, 873 (2000).
44. Schnitzer M., Dinel H., Paré T., H.-R. Schulte, Ozdoba D., v knize: *Humic Substances. Structures, Models, and Function* (Ghabbour E. A., Davies G., ed.), str. 315. Royal Society of Chemistry, Cambridge 2001.

45. Rodionov A., Amelung W., Haumaier L., Urusevskaja I., Zech W.: *J. Plant Nutr. Soil Sci.* 169, 363 (2006).
46. Dercová, K., Sejáková Z., Skokanová M., Barančíková G., Makovníková J.: *Chemosphere* 66, 783 (2007).
47. Schnitzer M., v knize: *Humic Substances in Soil and Crop Science: Selected Reading*, (MacCarthy P., Clapp C.E., Malcom R.L., Bloom P.R., ed.), str. 65, SSSA, Madison 1990.
48. Tsuda K., Aso S., Kodama H., Yonebayashi K., Fujitake N., v knize: *From Molecular Understanding to Innovative Applications of Humic Substances* (Perminova I. V., Kulikova N. A., ed.), str. 333. Lomonosov State University, Moscow 2008.
49. Schnitzer M., v knize: *Humic Substances in the Global Environment and Implications on Human Health* (Senesi N., Miano T. M., ed.), str. 57. Elsevier, Amsterdam 1994.

F. Novák^a and R. Hrabal^b (^a *Biology Centre, Academy of Sciences of the Czech Republic, České Budějovice*, ^b *NMR laboratory, Institute of Chemical Technology, Prague*): **Quantitative ¹³C NMR Spectroscopy of Humic Acids**

Modern liquid ¹³C NMR spectroscopy is one of the basic methods for qualitative and quantitative analysis of

humic (HA) and fulvic acids (FA). It is an important tool for studying their structure and properties, assessing recalcitrant carbon pools in terrestrial and water ecosystems. The main advantage of the liquid NMR techniques is a better spectral resolution and possibility of exact carbon determination, which is problematic in the solid-state spectroscopy due to the necessity of using cross-polarization. For this reason, the HA/FA measurements by liquid ¹³C NMR spectroscopy serve as standards for evaluation of the results obtained by other analytical methods. Main drawbacks of liquid ¹³C NMR spectroscopy are: (i) requirement for solubility and high purity of samples, in particular of low contents of minerals and paramagnetic ions, (ii) relatively large quantities of the consumed material, (iii) long experimental time, and (iv) baseline problems and broad signals. When using the results published by various authors, it is necessary to take into account that only few analyses were made with optimization of acquisition parameters for quantitative ¹³C NMR measurement and that such comparison may be questionable even when using identical integration limits.

Using the inverse gated decoupling, we measured quantitative ¹³C NMR spectra of HA and FA of typical soils and organic deposits in the Czech Republic. The structure data are presented together with parameters of biological activity and the hydrophobicity/hydrophilicity ratio.