

VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ
FAKULTA CHEMICKÁ
Purkyňova 118, 612 00 Brno
tel.: 541 149 301, fax: 541 211 697
<http://www.fch.vutbr.cz>



Výzkum využitelnosti vody BQ-2 (Bzenec) pro léčivé účely – etapa II

Souhrnná zpráva experimentu

Zpracoval: Ing. Petr Sedláček, Ph.D.
Brno, prosinec 2014

Obsah:

Úvod.....	3
1 Porovnání celkového obsahu huminových látek.....	3
1.1 Pracovní postup.....	3
1.2 Dílčí výsledky	3
1.3 Dílčí závěr	5
2 Kvalitativní charakterizace huminových látek	6
2.1 Pracovní postup.....	6
2.2 Dílčí výsledky	7
2.3 Dílčí závěr	9

Úvod

Hlavní náplní druhé etapy experimentu *Výzkum využitelnosti vody BQ-2 (Bzenec)* pro léčivé účely bylo porovnání huminových látek (dále HL) obsažených v této přírodní vodě a ve vodě odebírané v lokalitě Anticolana Valley a dodávané pod komerčním názvem Fiuggi, a to z hlediska kvantitativního (celkový obsah HL) i kvalitativního (základní strukturní rysy HL). Obsah a kvalita rozpustných HL představuje důležitý parametr z hlediska hodnocení terapeutických účinků přírodních vod; HL jsou obecně známé svojí schopností poutat (a ve vodném prostředí tím i mobilizovat) kovové ionty [1], mimo to je popsána celá řada přímých pozitivních účinků huminových látek na organismus [2].

1 Porovnání celkového obsahu huminových látek

Celkový obsah huminových látek (HL) ve vzorcích obou vod byl stanoven dle normy ČSN 75 7536 extrakcí z kyselého prostředí do pentan-1-olu a odtud zpět do roztoku hydroxidu sodného. Normativní postup byl následně modifikován pro zpřesnění stanoveného obsahu HL.

1.1 Pracovní postup

Vzorek vody z vrtu BQ-2, odebraný objednatelem (Bohemia Beverage Group s.r.o.) a dodaný k analýze v uzavřeném plastovém kanystru o objemu 10 l, byl před dalším zpracováním uchován při teplotě 4°C, stejně jako vzorky vody Fiuggi, dodané v originálním skleněném balení (lahve o objemu 1 l).

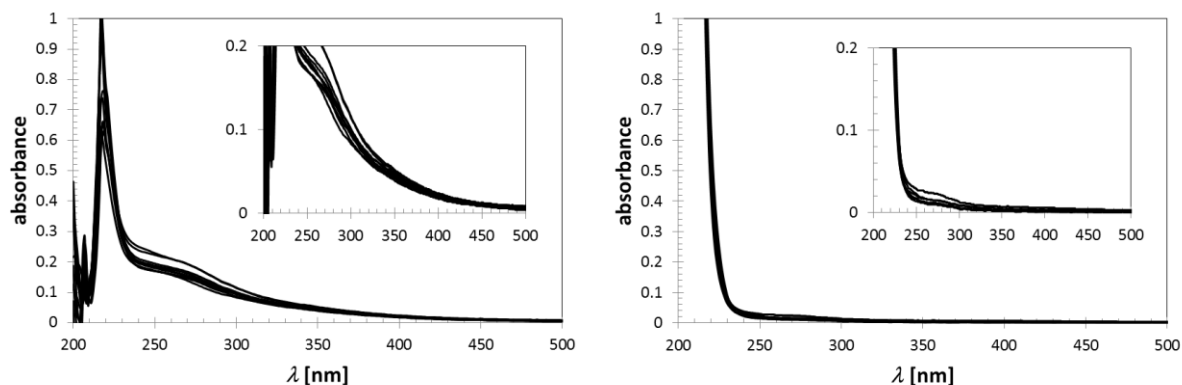
Pro vlastní analýzu bylo do dělicí nálevky odměřeno 250 ml stanovovaného vzorku vody (přefiltrovaného přes membránový filtr o střední velikosti pórů 0,45 μm) a 5 ml koncentrované kyseliny sírové a po přidání 25 ml pentan-1-olu byla směs důkladně protřepána po dobu alespoň 1 min. Následně byla směs ponechána v klidu po dobu 2 hodin pro oddělení fází. Po vypuštění vodné fáze bylo do dělicí nálevky přidáno 25 ml roztoku hydroxidu sodného o koncentraci 0,5 % w/w. Obsah nálevky byl lehce protřepán a volně ponechán k oddělení fází po dobu 10 min. Původně zakalený extrakt huminových látek v hydroxidu byl vypuštěn z dělicí nálevky, ponechán v lednici až do vyčeření a následně bylo změřeno jeho UV-VIS spektrum v rozsahu 200 – 800 nm na spektrofotometru Hitachi U3900 proti čisté vodě. Slepé stanovení bylo provedeno stejným způsobem s použitím ultračisté vody (Milli-Q) namísto vzorku analyzované vody. Analýza vzorků porovnávaných vod (vody z vrtu BQ-2 a vody Fiuggi) byla provedena v 10 opakováních.

Pro zpřesnění stanovených hodnot obsahu HL byla provedena vlastní kalibrace s využitím vhodného standardu huminové látky. Ze vzorku referenčního materiálu SRFA (Suwannee River II Fulvic Acid Standard 2S103F), byly připraveny vodné roztoky o známé koncentraci v rozsahu 1 – 10 mg/dm³. UV-VIS spektra těchto roztoků v rozsahu 200 – 800 nm roztoky byla proměřena proti vodě na spektrometru Hitachi U3900. Pro stanovení koncentrace rozpuštěných huminových látek v analyzovaném vzorku vody byly sestrojeny kalibrační křivky při pěti vybraných vlnových délkách (250, 280, 300, 350 a 400 nm).

1.2 Dílčí výsledky

Naměřená UV-VIS spektra deseti získaných výluhů obou testovaných vod jsou uvedena na Obr. 1. Ve spektrálním rozsahu 200 – 250 nm je spektrum poznamenáno zbytkovým obsahem pentan-1-olu, proto je v této oblasti interpretace spekter prakticky znemožněná. Ve spektrální oblasti od 250 nm výše ovšem spektra vykazují průběh charakteristický pro roztoky s obsahem fulvinových kyselin (FK) – absorbance je nejvyšší v oblasti blízkého UV a poměrně strmě klesá v oblasti VIS, což způsobuje charakteristickou nažloutlou barvu roztoků. Pro vlnové délky vyšší než 500 nm k absorpci světla nedochází (proto byla tato část spektra v obou grafech na Obr. 1 vynechána). Z porovnání spekter

extraktů HL ze vzorků obou testovaných vod je na první pohled patrný vyšší obsah HL v případě vody odebrané z vrtu BQ-2, charakterizovaný markantně vyšší absorbancí re-extraktů v oblasti 250 – 300 nm (viz Obr. 1).



Obr. 1 UV-VIS spektra re-extraktů huminových látek v NaOH pro vzorky vody BQ-2 (vlevo) a Fiuggi (vpravo). Re-extraktů byly získány postupem dle normy ČSN 75 7536 v deseti opakováních.

Základní postup vyhodnocení spekter re-extraktů a výpočtu množství HL obsažených v testované vodě byl popsán v závěrečné zprávě předchozí etapy experimentu. Porovnání výsledků stanovení obsahů HL pro obě testované vody včetně základních statistických parametrů uvádí tabulka 1.

Tab. 1 Výsledky stanovení obsahu huminových látek v porovnávaných vodách dle normy ČSN 75 7536

analyzovaná voda	průměrný obsah HL [mg/dm ³]	směrodatná odchylka [mg/dm ³]	interval spolehlivosti* [mg/dm ³]
BQ-2	1,01	0,10	0,06
Fiuggi	0,17	0,11	0,07

* úroveň spolehlivosti = 95 %, velikost souboru = 10 hodnot

Hlavní nedostatky normovaného postupu byly diskutovány v závěrečné zprávě předchozí etapy experimentu. Jak zde bylo vysvětleno, pro zpřesnění hodnoty obsahu HL je daleko vhodnější použít vlastní kalibraci metody porovnáním spekter re-extraktů s UV-VIS spektry roztoků o známé koncentraci referenční huminové látky (v našem případě byla jako vhodný standard navržena látka Suwannee river Fulvic Acid II – SRFA). Zpřesněné hodnoty stanoveného obsahu HL v obou testovaných vodách uvádí tabulka 2.

Tab. 2 Výsledky stanovení obsahu huminových látek v porovnávaných vodách dle normy ČSN 75 7536 s použitím kalibrace na referenční huminové látky (SRFA)

analyzovaná voda	zpřesněný průměrný obsah HL [mg/dm ³]	směrodatná odchylka [mg/dm ³]	interval spolehlivosti* [mg/dm ³]
BQ-2	0,79	0,10	0,03
Fiuggi	0,08	0,04	0,02

* úroveň spolehlivosti = 95 %, velikost souboru = 10 hodnot

1.3 Dílčí závěr

Stanovený obsah huminových látek v obou dodaných vodách se výrazně liší. Ani u jedné z testovaných vod nepřekračuje tento obsah hranici obvyklou pro podpovrchové vody (cca 1 mg/dm³) a nepředstavuje zdravotní riziko (aktuální limit pro obsah huminových látek v pitné vodě je 2,5 mg/dm³).

Stanovená hodnota obsahu HL dle normy ČSN 75 7536 (1,0 ± 0,1 mg/dm³) pro vodu BQ-2 se přesně shoduje s hodnotou, stanovenou Referenční laboratoří přírodních léčivých zdrojů v Karlových Varech (XI-XII/2012, laboratorní protokol č.: RL 254 - 12). Stanovená průměrná hodnota obsahu HL ve vodě Fiuggi je podstatně vyšší než hodnota, stanovená N. Calacem a kol. (viz. [3]) kvantitativní izolací na iontoměniči (0,07 mg/dm³). Hodnota obsahu dle normy ČSN je ovšem zatížena poměrně velkou relativní chybou (více než 50 %) a stanovené množství HL je navíc pod hranicí použitelnosti této metody (0,5 mg/dm³). S určitostí však tato metoda prokázala fakt, že obsah HL ve vodě odebrané z vrtu BQ-2 je podstatně vyšší než u komerčně dodávané vody Fiuggi.

Zpřesněné hodnoty obsahu HL v analyzovaných přírodních vodách dle normy ČSN 75 7536 s vlastní kalibrací na standard fulvinových kyselin (Suwannee River Fulvic Acid Standard dodaný Mezinárodní společností pro huminové látky) jsou nižší než s použitím normou předepsaného empirického koeficientu pro přepočítání absorbance na obsah HL. Jak bylo ověřeno v předchozí etapě experimentu, tyto hodnoty jsou správnější, protože použitá referenční látka lépe kvalitativně odpovídá stanovovaným HL, které jsou převážně charakteru fulvinových kyselin (viz závěrečná zpráva etapy I). Přestože je zpřesněná průměrná hodnota stanovená pro vodu Fiuggi pod dolní mezí použitelnosti normované metody, velmi dobře souhlasí s obsahem fulvinových látek v této vodě stanoveným v referenci [3] a při uvažované velmi dobré citlivosti a nízké mezí detekce použitého UV-VIS spektrometru je možné ji považovat za poměrně správnou. Ze zpřesněných hodnot obsahů je tak možné konstatovat, že obsah (tj. hmotnostní koncentrace) HL ve vodě odebrané z vrtu BQ-2 je přibližně desetinásobný oproti obsahu HL v komerčně dodávané vodě Fiuggi.

2 Kvalitativní charakterizace huminových látek

Pro základní porovnání kvality huminových látek obsažených v obou analyzovaných vodách (BQ-2 resp. Fiuggi) byl nejprve vzorek huminových látek zjednodušenou metodou z každé vody izolován a následně charakterizován základními spektroskopickými metodami – UV-VIS a FTIR spektroskopií. Dále byla použita metoda dynamického rozptylu světla pro hrubý odhad velikosti částic izolovaných huminových látek ve vodném roztoku.

2.1 Pracovní postup

Izolace huminových látek z vody BQ-2:

Celkový objem 20 l analyzované vody byl rozdělen do lyofilizačních baněk o pracovním objemu 300 ml, vymražen uložením po dobu 48 hod. v mrazničce a následně lyofilizován na laboratorním lyofilizátoru Bench Top 4K ZL (VirTis). Pevný lyofilizát byl poté rozpuštěn v poměru 3 g/100 ml v 0,1M HCl (kyselina byla použita pro odstranění rozpuštěných HCO_3^- iontů ve formě plynného CO_2) a roztok byl částečně přečištěn od zbývajících anorganických kontaminantů dialýzou proti čisté vodě (cut-off dialyzační membrány: 1000 Da) po dobu 24 hod. Pevný nerozpustný podíl, který se v průběhu dialýzy vysrážel v přečišťovaném roztoku byl odstraněn ultrafiltrací přes membránu o velikosti pórů 0,45 μm . Filtrát byl následně znovu vymražen a lyofilizován.

Izolace huminových látek z vody Fiuggi:

Z důvodu podstatně nižšího obsahu HL ve vodě Fiuggi (viz výše) bylo nutné předchozí metodu izolace upravit následujícím způsobem: celkový objem 20 l analyzované vody byl rozdělen do lyofilizačních baněk o pracovním objemu 300 ml, vymražen uložením po dobu 48 hod. v mrazničce a následně lyofilizován na laboratorním lyofilizátoru Bench Top 4K ZL (VirTis). Kompletní množství lyofilizátu bylo následně zbaveno části anorganických nečistot, a to ve dvou krocích: nejprve rozpuštěním ve vodě a ultrafiltrací (odstranění nerozpustných příměsí) a následnou lyofilizací a rozpuštěním lyofilizátu v 0,1M HCl (odstranění rozpuštěných HCO_3^-). Huminové látky obsažené v tomto zakoncentrovaném a částečně přečištěném vodném roztoku byly následně nasorbovány na pevný granulovaný iontoměnič XAD-8 (směs byla třepána po dobu 7 dnů). Po oddělení sorbentu odstředěním byly huminové látky extrahovány do 0,1M roztoku NaOH (směs sorbentu a NaOH byla třepána po dobu 7 dnů) a tento roztok byl dočištěn dialýzou proti čisté vodě (cut-off dialyzační membrány: 1000 Da) po dobu nutnou k ustavení neutrálního pH roztoku. Dialyzát byl nakonec znovu vymražen a lyofilizován.

Měření UV-VIS a FTIR spekter:

Ze vzorku částečně přečištěných huminových látek byl připraven vodný roztok o koncentraci 25 mg/dm³. UV-VIS spektrum tohoto roztoku bylo proměřeno na spektrometru Hitachi U3900 v rozsahu vlnových délek 200 – 800 nm.

IČ spektra finálního pevného lyofilizátu částečně přečištěných huminových látek byla snímána v rozsahu vlnočtů 4000 – 400 cm^{-1} FTIR spektrometrem Nicolet i50 formou KBr tablety (navážka vzorku: 2 mg, navážka KBr: 400 mg).

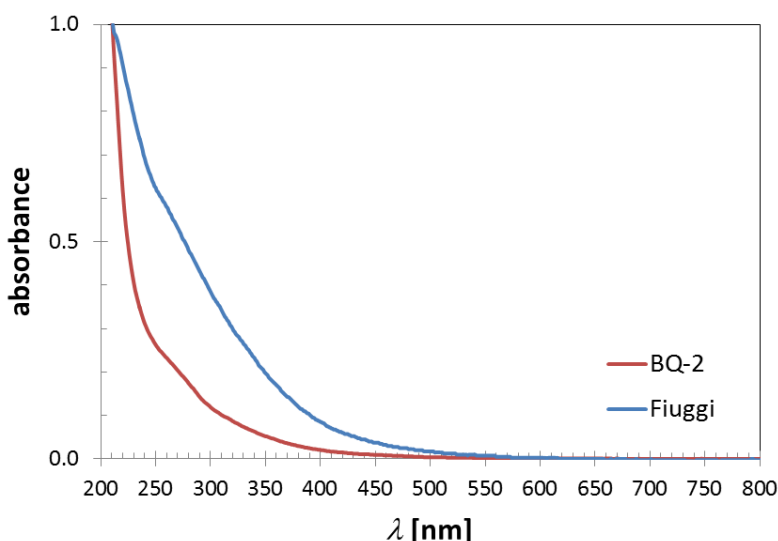
Měření velikosti částic:

Odhad velikosti částic analyzovaných huminových látek ve vodném roztoku byl proveden metodou dynamického rozptylu světla (DLS) na přístroji ZetaSizer Nano ZS (Malvern Instruments). Pro srovnání byl proměřen také vzorek referenčních huminových látek (SRFA).

2.2 Dílčí výsledky

Interpretace UV-VIS spektra HL:

UV-VIS spektra vodných roztoků lyofilizátů izolovaných huminových látek z obou analyzovaných vod jsou uvedena na Obr. 2. Obě spektra vykazují charakter typický spíše pro nízko humifikovaný materiál (absorbance roztoku strmě klesá s vlnovou délkou a k absorpci záření v oblasti nad 500 nm prakticky nedochází (viz detail na Obr. 2). V oblasti nižších vlnových délek však spektra obou vzorků HL vykazují patrné odlišnosti: huminové látky izolované z vody Fiuggi vykazují podstatně vyšší absorpci záření v oblasti 250 – 450 nm ve srovnání s HL izolovanými z vody BQ-2.



Obr. 2 UV-VIS spektra vodných roztoků lyofilizátu HL

Jak již bylo vysvětleno v závěrečné zprávě předchozí etapy experimentu, cenné informace o povaze HL poskytují tzv. spektrální poměry - poměry absorpčních při vybraných vlnových délkách. V uvedené zprávě jsou také podrobně vysvětleny způsoby určení těchto parametrů a jejich vztah s jednotlivými strukturálními charakteristikami huminových látek (včetně literárních referencí). V závěrech této zprávy je také uvedeno, že z vyhodnocení spektrálních charakteristik HL izolovaných z vody BQ-2 vyplývá to, že tyto HL jsou charakteru převážně fulvinových kyselin. Porovnání základních stanovovaných spektrálních charakteristik – poměrů E_4/E_6 a A_{253}/A_{220} – pro HL izolované z vody BQ-2 a vody Fiuggi jsou uvedeny v tabulce 3 (spolu s hodnotami stanovenými pro referenční huminový materiál – fulvinové kyseliny izolované z řeky Suwannee River).

Tab. 3 Spektrální poměry vypočtené z UV-VIS spekter vodných roztoků analyzovaných a referenčních huminových látek

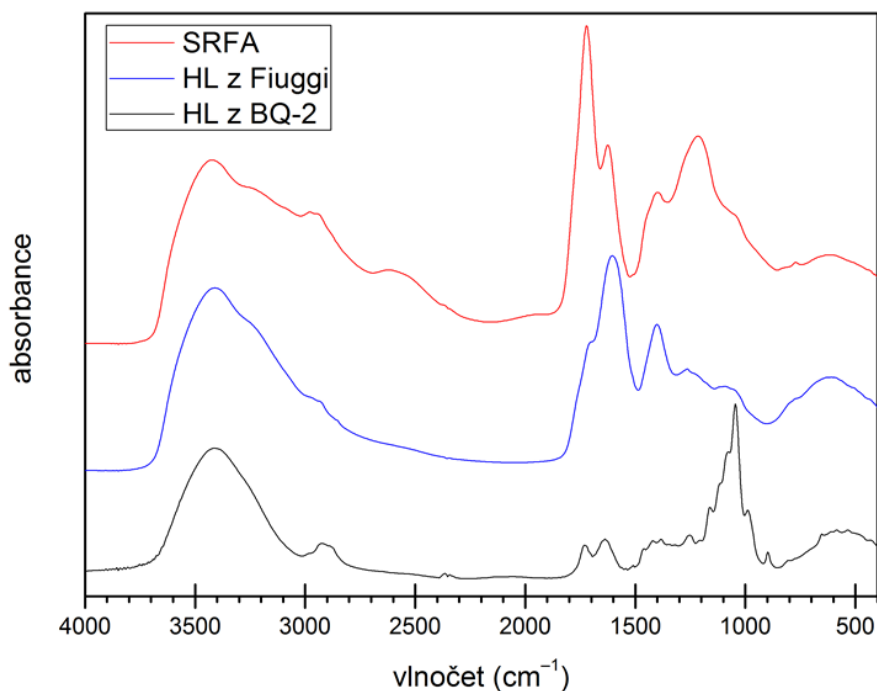
	roztok HL z vody BQ-2	roztok HL z vody Fiuggi	referenční fulvinové kyseliny (SRFA)
E_4/E_6	20	14,09	14
A_{253}/A_{220}	0,42	0,66	0,65

Z uvedených hodnot je patrné mimo jiné to, že spektrální parametry HL izolovaných z vody Fiuggi velmi dobře souhlasí s charakteristikami referenčních fulvinových kyselin SRFA. Oproti tomu charakteristiky fulvinových kyselin izolovaných z vody BQ-2 se nezanedbatelně liší. Vysoká hodnota poměru E_4/E_6 naznačuje podstatně méně humifikovaný charakter fulvinových kyselin ve vodě BQ-2. Nižší hodnota poměru A_{253}/A_{220} pro spektra HL izolovaných z vody BQ-2 naznačuje nižší obsah

polárních substituentů (–OH, –COOH), příp. benzenových jader, a naopak vyšší obsah alifatických skupin v jejich struktuře. To znovu podporuje tvrzení, že HL obsažené ve vodě BQ-2 jsou méně humifikované ve srovnání s HL izolovanými z vody Fiuggi.

Interpretace FTIR spekter:

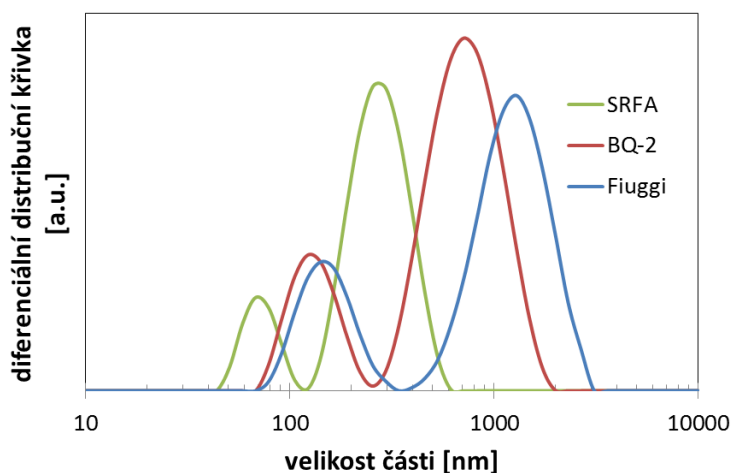
Porovnání IČ spekter HL z vody BQ-2 s HL izolovanými z vody Fiuggi a s referenčními fulvinovými kyselinami uvádí obr. 3. Strukturální informace získané z IČ spektra vzorku HL izolovaných z vody BQ-2 byly shrnuty v závěrečné zprávě předchozí etapy experimentu, proto budou dále komentovány pouze odlišnosti mezi jednotlivými analyzovanými huminovými materiály. Je patrné, že ze všech uvedených materiálů má standardní fulvinový materiál (SRFA) nejvyšší kyselost. Vysoký obsah –COOH skupin ve struktuře HL se projeví především zvýšením širokých absorpčních pásů v oblastech $3000 - 3600 \text{ cm}^{-1}$ a $2400 - 2700 \text{ cm}^{-1}$, dále intenzivním pásem karbonylové skupiny (–C=O) při cca 1720 cm^{-1} a vyšší intenzitou pásů v blízkosti 1400 cm^{-1} (zde se může projevit také přítomnost kyselých fenolických skupin) resp. 1200 cm^{-1} . Při bližším porovnání absorpcí záření v těchto oblastech je patrné, že kyselost vzorku HL izolovaných z BQ-2 vody je naopak nejnižší. Posun absorpce karbonylové –C=O skupiny směrem k vyšším vlnočtům naznačuje u těchto HL přítomnost esterových skupin. Vzorek HL izolovaných z vody Fiuggi vykazuje jednoznačně nejvyšší obsah benzenových struktur (charakterizovaný úzkým absorpčním pásem okolo 1600 cm^{-1}), oproti tomu aromaticita vzorku HL z vody BQ-2 je opět poměrně nízká. Tyto HL naopak vykazují nejvyšší obsah alifatických struktur (–CH₃, –CH₂ skupiny, viz typická kombinace absorpčních pásů v oblasti těsně pod 3000 cm^{-1}). Odlišný charakter spektra HL z vody BQ-2 je způsoben především zbytkovými anorganickými nečistotami (viz předchozí zpráva a odlišný způsob izolace HL z vody Fiuggi). Všechny tyto závěry dobře korespondují se strukturálními informacemi, které poskytla interpretace UV-VIS spekter uvedených fulvinových kyselin. Znovu je potvrzen fakt, že ze všech testovaných huminových materiálů vykazují HL izolované z vody BQ-2 nejnižší stupeň humifikace.



Obr. 3 Vibrační spektra huminových látek izolovaných z obou analyzovaných vod v porovnání se spektry referenčních HL (Suwannee River Fulvic Acid)

Interpretace výsledků měření dynamického rozptylu světla:

Distribuční křivky velikosti částic analyzovaných a referenčních huminových látek ve vodném roztoku při $\text{pH} \sim 12$ jsou uvedeny na Obr. 4. Je patrné, že velikost částic analyzovaných materiálů se výrazně (tj. řádově) neliší. Nejvyšší velikost částic vykazují ve vodném roztoku částice HL izolovaných z vody Fiuggi, nejmenší naopak standardní fulvinové kyseliny SRFA. Je zachován také charakteristický dvoj-disperzní charakter křivky, který naznačuje agregaci molekul huminových látek do větších supramolekulárních celků. Toto chování je typické pro huminové látky bez rozdílu jejich původu. Cílem tohoto experimentu byl ovšem pouze řádový odhad a posouzení případných markantních odlišností ve velikostech částic jednotlivých materiálů, pro přesnější stanovení absolutní hodnoty velikosti HL a pro podrobnější studium jejich agregačního chování by bylo třeba použít přečištěný vzorek HL a dále optimalizovat složení analyzovaného roztoku (vybrat vhodné koncentrace HL, vhodné rozpouštědlo, pH apod.).



Obr. 4 Distribuce velikosti částic vodných roztoků lyofilizátu analyzovaných a referenčních HL (stanoveno metodou DLS)

2.3 Dílčí závěr

Struktura HL izolovaných z obou přírodních vod byla studována základními spektroskopickými metodami (UV-VIS a FT-IR spektroskopie), odhad velikosti částic HL ve vodných roztocích byl proveden měřením dynamického rozptylu světla. Porovnáním základních strukturních charakteristik HL izolovaných z vod BQ - 2 resp. Fiuggi a referenčního vzorku SRFA byl na jednu stranu potvrzen společný fundamentální charakter obou analyzovaných látek (fulvinové kyseliny o spíše nízkém stupni humatizace a obdobné velikosti částic), na druhou stranu však byly prokázány patrné odlišnosti v konkrétní struktuře těchto huminových materiálů. HL izolované z vody BQ-2 vykazují prokazatelně nižší stupeň humifikace, projevující se menší kyselostí a aromaticitou a naopak větším obsahem alifatických substituentů v jejich struktuře.

Reference:

- [1] Buffle, J. (1984). Natural Organic-Matter and Metal-Organic Interactions in Aquatic Systems. *Metal Ions in Biological Systems* 18: 165-221.
- [2] Klocking, R. and B. Helbig (2001). Medical aspects and applications of humic substances. *Biopolymers* 1: 379-392.
- [3] Calace, N., G. D'Ascenzo, et al. (1999). Chemical analysis of water of the Anticolana Valley: Isolation of humic compounds. *Nephron* 81: 93-97.