

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 I

Souhrnná zpráva experimentu

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

## Obsah:

<b>1</b>	<b>Kvantitativní a kvalitativní stanovení rozpuštěných huminových látek.....</b>	<b>3</b>
1.1	Stanovení celkového obsahu huminových látek dle ČSN.....	3
1.1.1	Pracovní postup.....	3
1.1.2	Dílčí výsledky .....	3
1.1.3	Dílčí závěr.....	4
1.2	Zpřesněné stanovení celkového obsahu huminových látek spektrofotometricky .....	4
1.2.1	Pracovní postup.....	5
1.2.2	Dílčí výsledky .....	5
1.2.3	Dílčí závěr.....	6
1.3	Kvalitativní charakterizace huminových látek.....	6
1.3.1	Pracovní postup.....	7
1.3.2	Dílčí výsledky .....	7
1.3.3	Dílčí závěr.....	11
<b>2</b>	<b>Analýza těkavých organických látek.....</b>	<b>12</b>
2.1	Analýza par technikou hmotnostní spektrometrie .....	12
2.1.1	Pracovní postup.....	12
2.1.2	Dílčí výsledky .....	12
2.1.3	Dílčí závěr.....	12
2.2	Chromatografická analýza par.....	12
2.2.1	Pracovní postup.....	12
2.2.2	Dílčí výsledky .....	13
2.2.3	Dílčí závěr.....	13
<b>3</b>	<b>Mikrobiální testy.....</b>	<b>14</b>
3.1	Pracovní postup.....	14
3.2	Dílčí výsledky .....	14
3.3	Dílčí závěr .....	15
	<b>Reference: .....</b>	<b>16</b>

# 1 Kvantitativní a kvalitativní stanovení rozpuštěných huminových látek

První linie experimentů se zaměřila na základní kvantitativní a kvalitativní charakterizaci huminových látek, rozpuštěných v analyzované přírodní vodě. Celkový obsah huminových látek (HL) 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. Základní kvalitativní charakteristika rozpuštěných huminových látek byla založena na zjednodušené metodě izolace huminových látek ze vzorku vody a jejich následné spektrální analýze v UV-VIS a infračervené oblasti.

## 1.1 Stanovení celkového obsahu huminových látek dle ČSN

### 1.1.1 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.

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 vzorku vody z vrtu BQ-2 byla provedena v 10 opakováních.

### 1.1.2 Dílčí výsledky

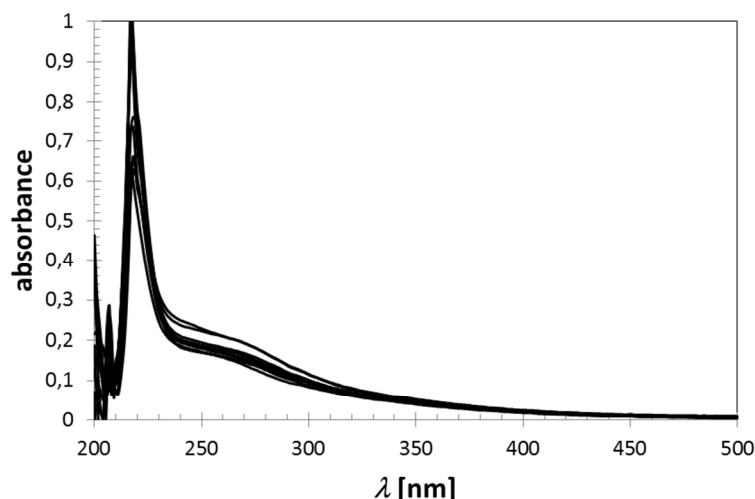
Naměřená UV-VIS spektra deseti získaných výluhů jsou uvedena na Obr. 1. Ve spektrálním rozsahu 200 – 250 nm je spektrum poznamenáno zbytkovým obsahem pentan-1-olu, proto je v této oblasti interpretace spekter prakticky znemožněná. Ve spektrální oblasti od 250 nm výše ovšem spektra vykazují průběh charakteristický 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 Obr. 1 vynechána).

Norma ČSN 75 7536 předepisuje pro určení hmotnostní koncentrace následující výpočet

$$\rho(\text{HL}) = (A - A_0) \cdot K_p$$

kde  $\rho(\text{HL})$  je hmotnostní koncentrace huminových látek v původním analyzovaném vzorku (v mg/dm<sup>3</sup>),  $A$  a  $A_0$  jsou absorbance při 420 nm extraktu vzorku resp. slepého stanovení a  $K_p$  je empirická konstanta definovaná normou pro měřicí kyvety o různé optické dráze ( $K_p = 68$  v případě zde použité kyvety o optické dráze 1 cm).

Výsledek stanovení včetně základních statistických parametrů uvádí tabulka 1.



Obr. 1 UV-VIS spektra re-extraktů huminových látek v NaOH (stanovení dle normy ČSN 75 7536 v deseti opakováních)

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

průměrný obsah HL [mg/dm <sup>3</sup> ]	směrodatná odchylka [mg/dm <sup>3</sup> ]	interval spolehlivosti* [mg/dm <sup>3</sup> ]
1,01	0,10	0,06

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

### 1.1.3 Dílčí závěr

Stanovená hodnota obsahu HL dle normy ČSN 75 7536 ( $1,0 \pm 0,1$  mg/dm<sup>3</sup>) se přesně shoduje s hodnotou, stanovenou Referenční laboratoří přírodních léčivých zdrojů v Karlových Varech (XI-XII/2012, laboratorní protokol č.: RL 254 - 12). Stanovený obsah huminových látek nepřekračuje hranici obvyklou pro podpovrchové vody ( $< 1$  mg/dm<sup>3</sup>, viz např. [1]) a nepředstavuje zdravotní riziko (aktuální limit pro obsah huminových látek v pitné vodě je 2,5 mg/dm<sup>3</sup>).

## 1.2 Zpřesněné stanovení celkového obsahu huminových látek spektrofotometricky

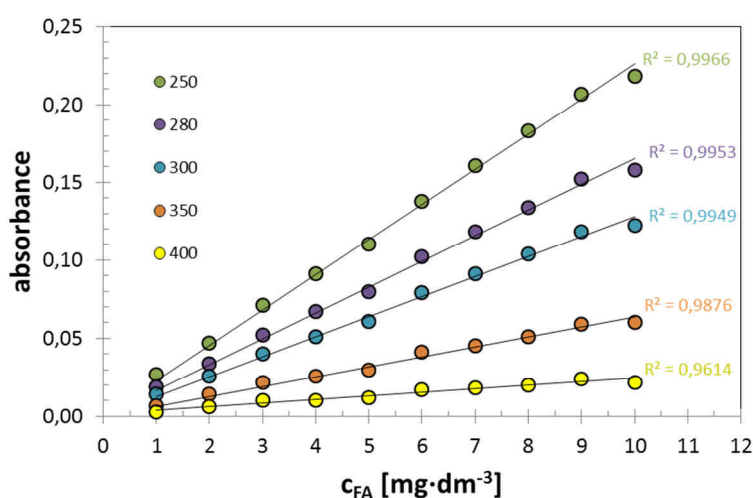
Jedním z kritických nedostatků stanovení celkového obsahu huminových látek postupem dle ČSN 75 7536 je použití empirického koeficientu pro přepočet absorbance re-extraktu při 420 nm na hmotnostní koncentraci HL v původním analyzovaném vzorku. Jak bylo experimentálně ověřeno (viz [2]), tento přepočet zatěžuje výsledek stanovení chybou, která dosahuje různé hodnoty pro huminové látky různého původu a charakteru. Zatímco např. pro rašeliništní FK metoda dává poměrně přesné výsledky, v případě vodních huminových látek je obsah stanovený normou oproti reálnému obsahu navýšen o 25 % - 75 %. Proto byla vedle použití empirického koeficientu provedena také vlastní kalibrace metody porovnáním spekter re-extraktů s UV-VIS spektry roztoků o známé koncentraci referenční huminové látky. Jelikož tvar spekter re-extraktů a některé optické charakteristiky z nich určené (např. parametr E4/E6, viz dále) naznačily, že rozpuštěné huminové látky mají charakter převážně fulvinových kyselin, byl jako referenční materiál zvolen standard Mezinárodní společnosti pro huminové látky (IHSS) Suwannee river Fulvic Acid II (SRFA). Jedná se o fulvinové kyseliny, izolované standardním postupem IHSS z řeky Suwannee, charakterem by tedy měly dobře odpovídat huminovým látkám rozpuštěným v analyzovaném vzorku.

### 1.2.1 Pracovní postup

Ze vzorku referenčního materiálu SRFA (Suwannee River II Fulvic Acid Standard 2S103F), byly připraveny vodné roztoky o známé koncentraci v rozsahu 1 – 10 mg/dm<sup>3</sup>. 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).

### 1.2.2 Dílčí výsledky

Kalibrační křivky (závislost absorbance referenčního roztoku při dané vlnové délce na obsahu rozpuštěných SRFA) jsou uvedeny na Obr. 2.



Obr. 2 Kalibrační křivky absorbance referenčních roztoků (SRFA)

S využitím těchto kalibračních závislostí byl ze dříve stanovených UV-VIS spekter re-extraktů (viz kap. 1.1) stanoven zpřesněný obsah huminových látek v analyzovaném vzorku vody. Průměrná hodnota celkového obsahu rozpuštěných HL byla stanovena z 10 experimentálních opakování, vždy pro 5 vlnových délek, tedy celkově ze souboru 50 hodnot. Výsledná hodnota spolu se základními statistickými charakteristikami jsou uvedeny v tabulce 2.

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

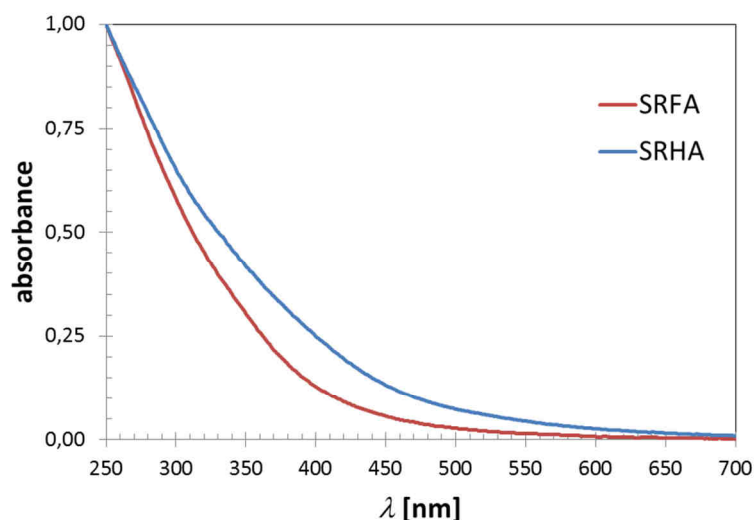
zpřesněný průměrný obsah HL [mg/dm <sup>3</sup> ]	směrodatná odchylka [mg/dm <sup>3</sup> ]	interval spolehlivosti* [mg/dm <sup>3</sup> ]
0,79	0,10	0,03

\* úroveň spolehlivosti = 95 %, velikost souboru = 50 hodnot

Z porovnání hodnot obsahu HL stanovených postupem daným normou ČSN a postupem s vlastní kalibrací je patrné, že normativní postup také v tomto případě nadhodnotil obsah HL v analyzovaném vzorku vody o cca 25%, což dobře koresponduje s již dříve experimentálně ověřenými limitacemi použité normy (viz. [2]).

Zásadním zjištěním této části experimentu byl fakt, že kalibrace metody s použitím standardního vzorku fulvinových kyselin dává prakticky stejnou hodnotu obsahu HL v analyzovaném vzorku vody pro všechny použité vlnové délky, tj. v celém rozsahu 250 – 400 nm (rozptyl průměrných hodnot vypočtených separátně pro jednotlivé vlnové délky byl nižší než rozptyl hodnot experimentálních

opakování při jedné vlnové délce). Jinými slovy, charakter použitého standardu dobře koresponduje s charakterem stanovovaných huminových látek. Tato shoda opět naznačuje, že stanovované huminové látky jsou převážně charakteru fulvinových kyselin. Pokud by totiž analyzovaný vzorek obsahoval vedle fulvinových kyselin také signifikantní koncentraci kyselin huminových, které vykazují odlišné charakteristické spektrum v UV-VIS (především vyšší absorpci záření u vyšších vlnových délek, viz Obr. 3), jejich obsah by se při vyhodnocení experimentálních dat projevil tím, že by kalibrace sestavená ze standardu SRFA především pro vyšší vlnové délky neodpovídala analyzovanému vzorku a stanovený obsah HL ve vzorku by vykazoval zřetelnou závislost na vlnové délce použité při jeho výpočtu.



Obr. 3 Srovnání UV-VIS spekter standardních huminových (Suwannee River Humic Acid Standard, SRHA) a fulvinových (Suwannee River Fulvic Acid Standard, SRFA) kyselin (pro lepší porovnání rozdílného tvaru spekter byla absorbance normalizována pro vlnovou délku 250 nm)

### 1.2.3 Dílčí závěr

Zpřesněná hodnota obsahu HL v analyzovaném vzorku přírodní vody dle normy ČSN 75 7536 s vlastní kalibrací na standard fulvinových kyselin (Suwannee River Fulvic Acid Standard dodaný Mezinárodní společností pro huminové látky) činí  $0,7 \pm 0,1$  mg/dm<sup>3</sup>. Tato hodnota je nižší než při použití empirického koeficientu udávaného normou. Ze srovnání spekter standardu a analyzovaných extraktů dále vyplynulo, že huminové látky v analyzovaném vzorku mají charakter převážně fulvinových kyselin. Podrobněji se charakteru rozpuštěných huminových látek v analyzovaném vzorku věnuje následující podkapitola.

## 1.3 Kvalitativní charakterizace huminových látek

Pro pilotní posouzení kvality huminových látek obsažených v analyzovaném vzorku vody byl nejprve vzorek huminových látek zjednodušenou metodou z 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 v roztoku.

Cílem těchto experimentů nebylo poskytnout komplexní charakterizaci HL, spíše základní představu o jejich kvalitě a původu pro smysluplné nasměrování budoucích podrobnějších analýz. Pro izolaci huminových látek byl za tímto účelem namísto nákladné a časově náročné standardní procedury semikvantitativní chromatografické izolace na iontoměničové koloně dle IHSS [3] zvolen zjednodušený postup založený na lyofilizaci rozpuštěných huminových látek a jejich následné částečné přečištění dialyzací.

### 1.3.1 Pracovní postup

#### *Izolace huminových látek:*

Celkový objem cca 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  $\text{HCO}_3^-$  iontů ve formě plynného  $\text{CO}_2$ ) 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  $\mu\text{m}$ . Filtrát byl následně znovu vymražen a lyofilizován.

#### *Měření UV-VIS a FTIR spekter:*

Ze vzorku částečně přečištěných huminových látek byl připraven vodný roztok o koncentraci 25  $\text{mg}/\text{dm}^3$ . UV-VIS spektrum tohoto roztoku bylo proměřeno na spektrometru Hitachi U3900 v rozsahu vlnových délek 200 – 800 nm.

IČ spektra filtračního koláče, získaného filtrací roztoku izolovaných huminových látek po dialýze, a dále finálního pevného lyofilizátu částečně přečištěných huminových látek byla snímána v rozsahu vlnočtů 4000 – 400  $\text{cm}^{-1}$  FTIR spektrometrem Nicolet i50 formou KBr tablety (navážka vzorku: 2 mg, navážka KBr: 400 mg).

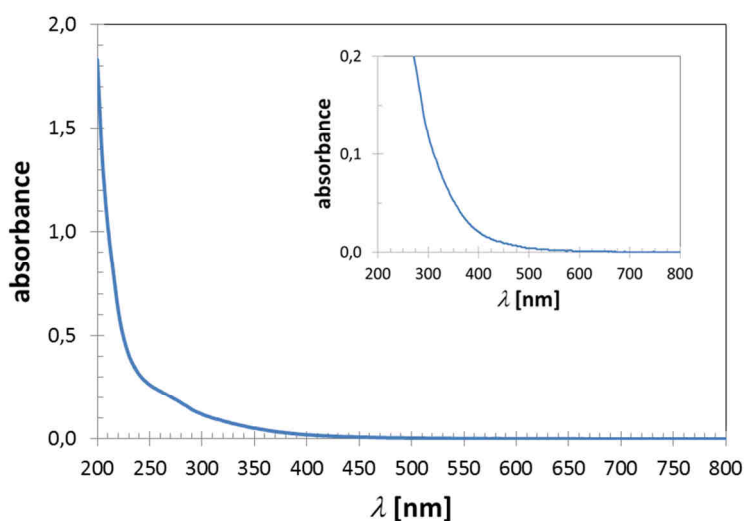
#### *Měření velikosti částic:*

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 a SRHA).

### 1.3.2 Dílčí výsledky

#### *Interpretace UV-VIS spektra HL:*

UV-VIS spektrum vodného roztoku lyofilizátu izolovaných huminových látek je uvedeno na Obr. 4. Již při prvním pohledu spektrum naznačuje charakter spíše nízko humifikovaného materiálu – absorbance roztoku strmě klesá s vlnovou délkou a k absorpci záření v oblasti nad 500 nm prakticky nedochází (viz detail na Obr. 4).



Obr. 4 UV-VIS spektrum vodného roztoku lyofilizátu HL (zásobní roztok o koncentraci 25  $\text{mg}/\text{dm}^3$  zředěn vodou 1:2)

Cenné informace o povaze HL poskytují tzv. spektrální poměry - poměry absorbancí při vybraných vlnových délkách. Tradičně se používá především tzv. „index barevnosti“  $E_4/E_6$  který vyjadřuje poměr absorpance vzorku při 465 nm a při 665 nm. Tento poměr dle [4] částečně vypovídá o stupni kondenzace aromatických jader ve struktuře (a tedy o míře humatizace - čím nižší je poměr  $E_4/E_6$ , tím vyšší stupeň kondenzace jader a tedy i stupeň humatizace materiálu je možné očekávat), klesá s molekulovou hmotností a je závislý na pH roztoku.

Poměr  $E_4/E_6$  byl stanoven měřením zásobního roztoku lyofilizátu (o koncentraci 25 mg/dm<sup>3</sup>), a to proto, aby byla absorpance v dané oblasti vlnových délek dostatečně vysoká. Stanovená hodnota  $E_4/E_6$  je uvedena v Tab. 3 spolu s dalšími optickými charakteristikami (viz dále); pro srovnání jsou všechny diskutované optické poměry vypočteny také pro vodné roztoky standardních vodních huminových (SRHA) a fulvinových (SRFA) kyselin. Hodnota  $E_4/E_6$  analyzovaných huminových látek je vysoká - hodnoty  $E_4/E_6$  blízké 20 jsou známy pouze pro nízko humatizované fulvinové kyseliny. Je ovšem třeba mít na zřeteli, že velmi nízká absorpance při 665 nm zatěžuje absolutní hodnotu tohoto parametru již poměrně značnou chybou. Při srovnání s hodnotami  $E_4/E_6$  referenčních huminových a fulvinových kyselin (viz tab. 3) ovšem přibližná hodnota tohoto parametru potvrzuje, že analyzované huminové látky mají charakter téměř výhradně fulvinových kyselin.

Dalšími strukturními parametry, které se často definují na základě UV-VIS spekter roztoků huminových látek, je poměr absorbancí při vlnových délkách 253 nm a 220 nm (nebo 203 nm)  $A_{253}/A_{220}$  (resp.  $A_{253}/A_{203}$ ). Oba tyto poměry jsou výrazně citlivé na přítomnost polárních substituentů na aromatickém jádře a poskytují tedy informace o typu substituentů ve struktuře studovaných huminových látek. Zvýšení obsahu polárních funkčních skupin (-OH, -COOH) vede k výraznému zvýšení absorpce záření při 253 nm a tím také k růstu poměrů  $A_{253}/A_{203}$  a  $A_{253}/A_{220}$ . Naopak vyšší obsah alifatických substituentů se projeví nižšími hodnotami těchto parametrů. Podrobně se monitoringu vlastností huminových látek prostřednictvím uvedených poměrů věnuje např. [5,6]. V tab. 3 je uveden parametr  $A_{253}/A_{220}$  pro analyzované a referenční HL. Vysoká absorpance v oblasti nízkých vlnových délek (220 nm) naznačuje vysoký obsah aromátů, v kombinaci s vysokým poměrem  $E_4/E_6$  je možné usuzovat, že tato aromatická jádra jsou ve struktuře izolovaná, nikoliv kondenzovaná (což by se projevilo vyšší barevností). Velmi nízká hodnota parametru  $A_{253}/A_{220}$  naznačuje spíše alifatický charakter substituentů a nízkou kyselost analyzovaných HL (tj. nízký obsah karboxylových a fenolových skupin). Také tento parametr potvrzuje dosavadní zjištění, že analyzované huminové látky vykazují nízký stupeň humatizace.

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

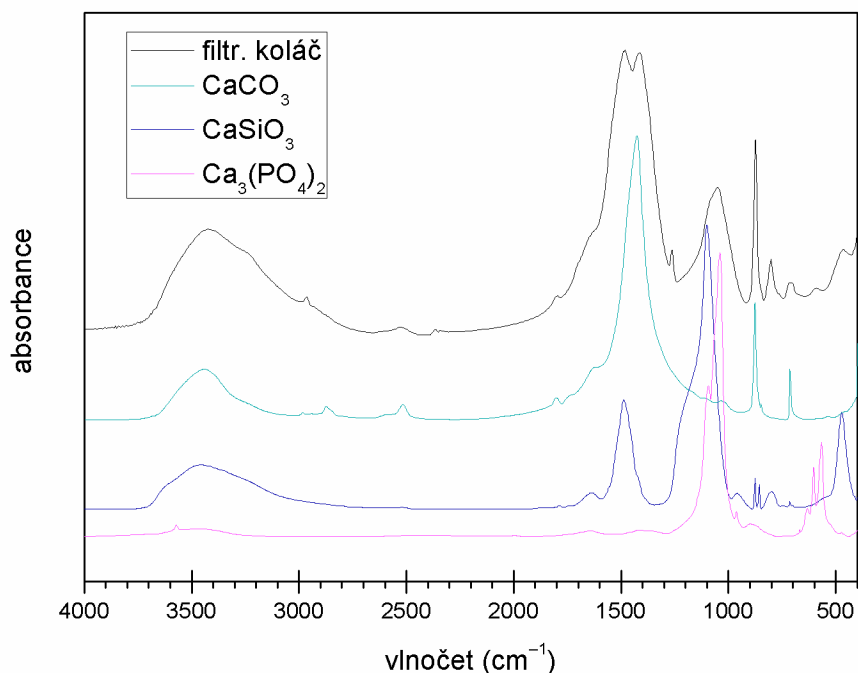
	analyzované HL	referenční fulvinové kyseliny (SRFA)	referenční huminové kyseliny (SRHA)
$E_4/E_6$	20	14	8
$A_{253}/A_{220}$	0,42	0,65	0,70

#### *Interpretace FTIR spekter:*

Vibrační spektrum filtračního koláče, který byl oddělen od roztoku dialyzátu při přečištění izolovaných HL, je uvedeno na Obr. 5. Filtrační koláč byl charakterizován především pro stanovení hlavních anorganických kontaminantů, které jsou ve vzorku obsaženy, jelikož přítomnost těchto kontaminantů se projeví i ve spektru nedokonale přečištěných huminových látek (viz dále). Z interpretace spektra filtračního koláče vyplývá, že hlavní anorganickými kontaminanty reprezentují především uhličitany (resp. hydrogenuhličitany) a křemičitany (v menší míře budou obsaženy další soli – např. fosforečnany). Toto zjištění dobře potvrzuje výsledky analýzy, provedené Referenční laboratoří přírodních léčivých zdrojů v Karlových Varech (XI-XII/2012, laboratorní protokol č.: RL 254

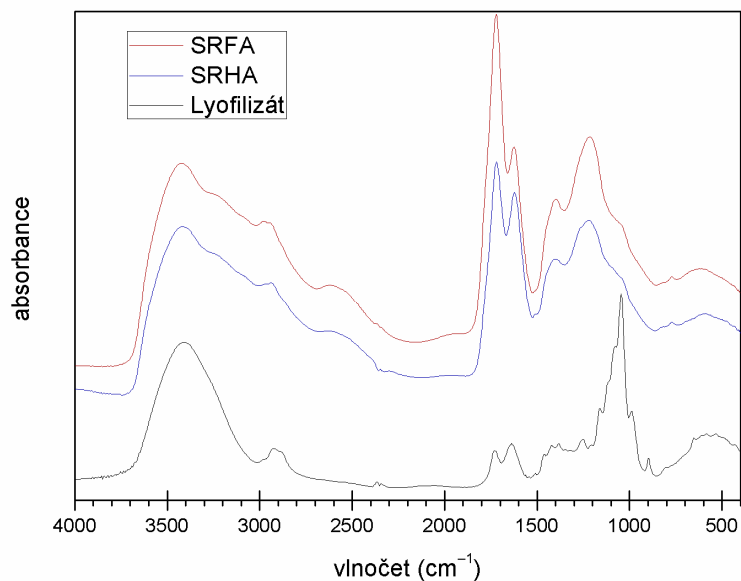


- 12), která stanovila nejvyšší obsah právě pro zmíněné anionty (a dále pro chloridy – ty se ovšem efektivně odstraní dialýzou, což bylo ověřeno přidáním  $\text{AgNO}_3$  ke vzorku přečištěného roztoku).



Obr. 5 *Vibrační spektrum filtračního koláče v porovnání se spektry modelových anorganických složek*

Spektrum lyofilizátu pro přečištění uvádí obr. 6. Široký absorpční pásu v oblasti  $3000 - 3600 \text{ cm}^{-1}$  je charakteristickou známkou přítomnosti  $-\text{OH}$  skupin. V této oblasti se ovšem bude projevovat také vibrace zbytkových anorganických aniontů (viz. srovnání obr. 5 a 6). Organické  $-\text{OH}$  skupiny budou mít spíše charakter alifatických alkoholů (viz charakteristické pásy  $\sim 1150$  a  $1100 \text{ cm}^{-1}$ ), pás fenolů v oblasti  $1200 \text{ cm}^{-1}$  je slabý (srovnej se spektry SRFA a SRHA). Dále je ve spektru patrný vibrační pás  $-\text{C}=\text{O}$  vazby nad  $1700 \text{ cm}^{-1}$ . Podle poměrně úzkého tvaru pásu  $-\text{OH}$  skupin ( $3000 - 3600 \text{ cm}^{-1}$ ) je možné usuzovat na spíše nízký obsah protonizovaných karboxylových  $-\text{COOH}$  skupin (srovnej se spektrem SRFA), což potvrzuje také chybějící široký, málo intenzivní charakteristický pás  $-\text{COOH}$  v oblasti  $2400 - 2700 \text{ cm}^{-1}$ , a také posun pásu, odpovídajícího vibraci  $-\text{C}=\text{O}$ , k vyšším vlnovým číslům ( $1735 \text{ cm}^{-1}$ ). Dle polohy tohoto pásu je karboxylová skupina pravděpodobně ve struktuře přítomna především ve formě esterů karboxylových kyselin, což potvrzuje také charakteristická absorpce v oblasti  $1240 \text{ cm}^{-1}$  a  $1050 \text{ cm}^{-1}$  (také zde se ovšem projeví absorpce zbytkových anorganických kontaminantů a dalších skupin, např. primárních alkoholů). Široký pás v oblasti okolo  $1640 \text{ cm}^{-1}$  zřejmě sdružuje charakteristické pásy  $-\text{C}=\text{C}-$  v alkenech a aromátech a také vibraci disociovaných karboxylových skupin  $-\text{COO}^-$ . Obsah dvojných vazeb  $-\text{C}=\text{C}-$  ve struktuře potvrzuje také přítomnost pásů v oblasti  $\sim 1500 \text{ cm}^{-1}$  (charakteristické pro aromatické sloučeniny) a  $990 \text{ cm}^{-1}$ , resp.  $900 \text{ cm}^{-1}$  (vinylová skupina). Přítomnost alifatických skupin je ilustrována charakteristickými pásy  $-\text{CH}_3$  ( $2970$ ,  $2890$ ,  $1380 \text{ cm}^{-1}$ ) a  $-\text{CH}_2-$  ( $2930$ ,  $1460 \text{ cm}^{-1}$ ) skupin. Pás v oblasti  $1260 \text{ cm}^{-1}$  je pravděpodobně způsoben vibrací aromatických etherů (skupina  $\text{aryl}-\text{O}$ ).

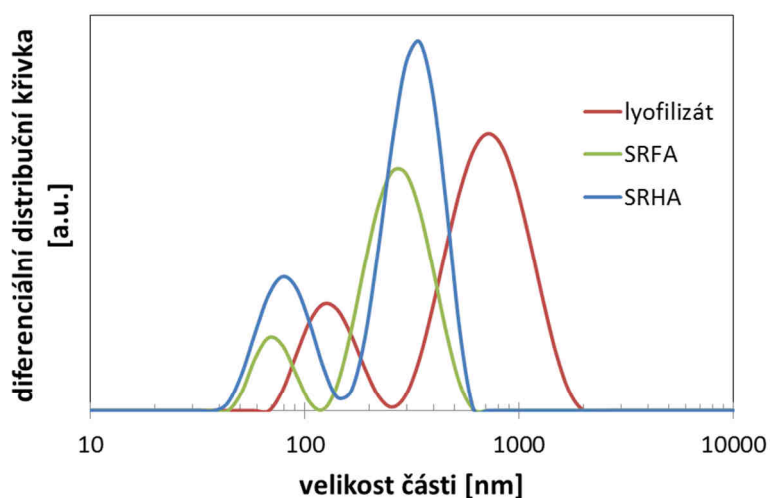


Obr. 5 Vibrační spektrum izolovaných a částečně přečištěných huminových látek v porovnání se spektry referenčních HL (Suwannee River Humic resp. Fulvic Acid)

#### Interpretace výsledků DLS:

Distribuční křivky velikosti částic analyzovaných a referenčních huminových látek ve vodném roztoku při  $\text{pH} \sim 12$  jsou uvedeny na Obr. 6. Je patrné, že velikostí se stanovované huminové látky výrazně (tj. řádově) neliší od referenčních vodných huminových kyselin. 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.

Je třeba zdůraznit, že uvedené měření bylo pouze pilotní, pro ověření, zda se velikost částic analyzovaných HL řádově neliší od velikostí typických pro běžné vodné HL. Pro přesnější stanovení velikosti 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,  $\text{pH}$  apod.).



Obr. 6 Distribuce velikosti částic vodných roztoků lyofilizátu analyzovaných a referenčních HL (stanoveno metodou DLS)

### 1.3.3 Dílčí závěr

Výsledky spektrálních analýz izolovaného a částečně přečištěného vzorku HL naznačují, že se jedná o materiál se spíše nízkým stupněm humatizace (nízký obsah kondenzovaných aromatických jader) a o nízkém obsahu polárních funkčních skupin (karboxylových a fenolových –OH). Optické charakteristiky tohoto materiálu odpovídají spíše fulvinovým než huminovým kyselinám. Pro podrobnější analýzu by bylo vhodné připravit v dostatečném množství vzorek, kompletně zbavený anorganických kontaminantů. Za tímto účelem by bylo třeba použít časově náročnou a nákladnou metodu semikvantitativní izolace podle standardního postupu IHSS, případně v kombinaci s reverzní osmózou (viz např. [7]). Kromě již uvedených strukturních metod by bylo v rámci navazující podrobnější analýzy vhodné zařadit také metodu NMR.

## 2 Analýza těkavých organických látek

Dalším cílem experimentu bylo objasnit chemický původ slabého zápachu naftového charakteru, kterým se dodaná voda vyznačuje vždy krátce po otevření zásobní lahve. Za tímto účelem byly použity 2 metody – hmotnostní spektrometrie a plynová chromatografie.

### 2.1 Analýza par technikou hmotnostní spektrometrie

Pro prvotní screening obsahu organických složek v parách analyzované vody byl zvolen komerční analyzátor plynů – hmotnostní spektrometr Atmospheric Gas Analysis System – QGA, výrobce Hiden Analytical.

#### 2.1.1 Pracovní postup

Vzorek vody (cca 100 ml) byl dávkován do erlenmeyerovy baňky o objemu 500 ml. Baňka byla uzavřena zátkou s utěsněným otvorem a kontinuálně zahřívána po dobu cca 30 min při teplotě cca 50 °C. Po této době byla za trvalého zahřívání do otvoru v zátku vsunuta dávkovací kapilára hmotnostního spektrometru a bylo kontinuálně snímáno hmotnostní spektrum po dobu 3 minut.

#### 2.1.2 Dílčí výsledky

V hmotnostním spektru byly dobře patrné jednotlivé komponenty vzduchu (i minoritní složky, např. argon) a vodní pára. Žádné větší hmoty, odpovídající složitějším organickým látkám, nebyly detekovány. Několik izolovaných hmot, které nebylo možné interpretovat bez předchozí separace (hmoty se nacházely v blízkosti spektrálních čar odpovídajících složkám vzduchu), bylo ve spektru zaznamenáno pouze na počátku snímání (v první minutě) a velmi rychle došlo k jejich vymizení. Intenzita těchto čar byla velmi malá (odpovídala komponentům vzduchu o koncentraci výrazně nižší než 1 %).

#### 2.1.3 Dílčí závěr

Touto technikou se nepodařilo detekovat žádné organické látky, kterým by bylo možné přisoudit charakteristický zápach vody. Bylo zjištěno, že případné organické těkavé látky se v atmosféře nad vzorkem vody vyskytují ve stopových koncentracích a dochází k jejich rychlému vymizení – zřejmě se tedy zakoncentrují nad vzorkem vody ihned po odběru a nedochází k jejich postupnému uvolňování ze vzorku vody (tj. z rozpuštěné formy). Toto pozorování dobře koresponduje s negativním screeningem na širokou škálu organických látek, provedeným Referenční laboratoří přírodních léčivých zdrojů v Karlových Varech (XI-XII/2012, laboratorní protokol č.: RL 254 - 12). Metan, který byl touto laboratoří detekován v poměrně vysoké koncentraci, není možné stanovit metodou hmotnostní spektrometrie bez předchozí separace (např. chromatograficky).

## 2.2 Chromatografická analýza par

Původně plánovaná metoda podrobné analýzy par (FT-IR spektroskopie, měření v plynové cele) byla v návaznosti na předchozí metodou zjištěný nízký, obtížně detekovatelný obsah organických látek nahrazena metodou plynové chromatografie (vysoký obsah vodní páry znemožňuje detekci stopových složek pomocí FTIR). Pro prvotní separaci a obecný screening obsahu vyšších organických složek byla použita kombinace GC-FID, pro podrobnou identifikaci složek kombinace GC-MS.

#### 2.2.1 Pracovní postup

Vzorek vody (cca 100 ml) byl dávkován do erlenmeyerovy baňky o objemu 500 ml. Baňka byla uzavřena parafilmem a kontinuálně zahřívána po dobu cca 30 min při teplotě cca 50 °C. Parafilm byl následně propíchnut plynotěsnou dávkovací stříkačkou a byl odebrán vzorek 10 ml par. Ten byl

injektován do plynového chromatografu Trace GC Ultra, Thermo Scientific (GC-FID), resp. ISQ™ Series Single Quadrupole, Thermo Scientific (GC-MS).

### **2.2.2 Dílčí výsledky**

Ani při chromatografické separaci složek par se nepodařilo detekovat žádné složitější organické látky, kterým by bylo možné přisuzovat zápach analyzované vody. Porovnáním chromatogramů par analyzované vody s chromatogramem par nad ultračistou vodou, odebraných stejným způsobem (stejný způsob ohřevu v totožné nádobě), byly zjištěny jen minimální odlišnosti. Při interpretaci hmotnostních spekter separovaných organických látek byly veškeré analyticky významné separované organické látky identifikovány jako siloxany – jejich přítomnost je experimentálním artefaktem (důsledkem metod odběru a uchování vzorků vody), nikoliv přirozenou složkou analyzované vody. Chromatografy z obou použitých kombinací jsou pro ilustraci přiloženy v přílohách č. 1 - 4.

Je třeba zdůraznit, že uvedené chromatografické metody umožňují separovat a stanovit především složitější organické složky analytu. Obsah nejjednodušších organických látek, které by mohly také být původci zmiňovaného „naftového“ zápachu (např. metan) je obtížně detekovatelný, protože tyto látky budou chromatografem procházet neseparovaně spolu s dalšími majoritními složkami par – především s N<sub>2</sub>, O<sub>2</sub> a vodní párou.

### **2.2.3 Dílčí závěr**

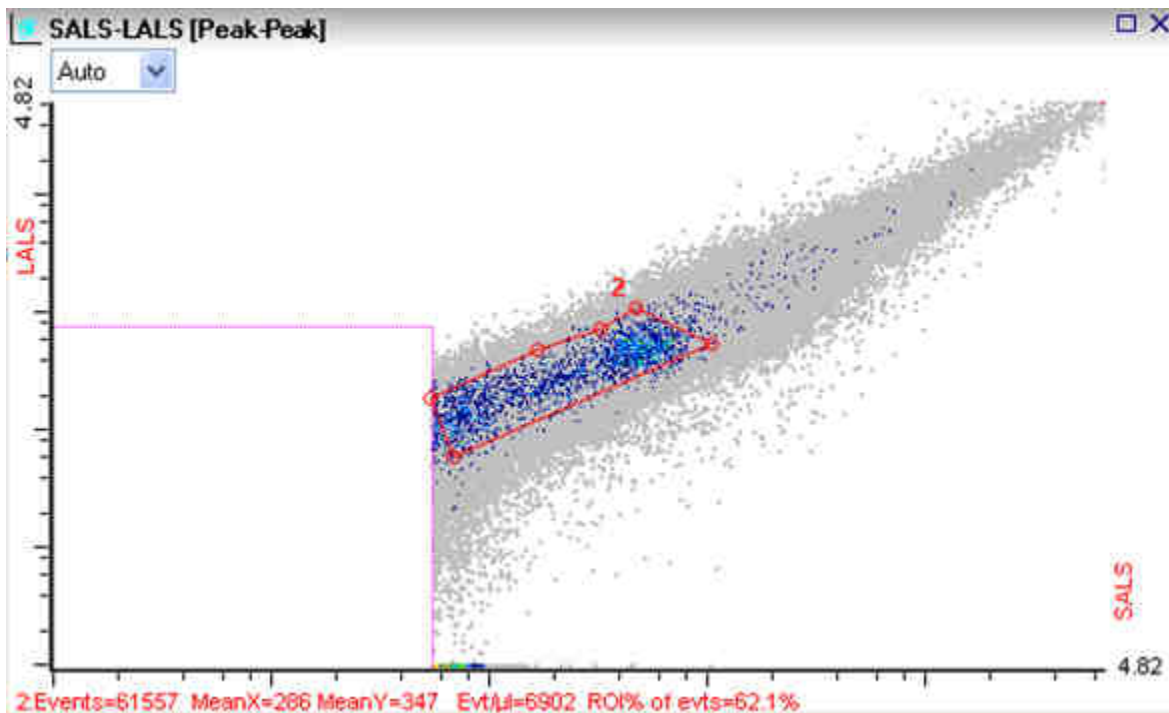
Žádnou z použitých analytických metod se nepodařilo detekovat složky par, kterým by bylo možné přisoudit charakteristický „naftový“ zápach analyzované vody. Výsledky analýz je možné shrnout následovně: je-li zápach způsoben obsahem vyšších organických látek, je obsah těchto složek v parách vody stopový (mimo limit detekce použitých metod), spíše je ovšem původcem zápachu obsah jednoduchých látek typu metanu, které nebylo možné použitými metodami v dané konfiguraci stanovit vedle obsahu majoritních složek par. Pro potvrzení těchto předpokladů je třeba použít složitější a nákladnější analytické nástroje – například techniku SPME (mikroextrakce tuhou fází) pro stanovení stopových množství složitějších organických látek nebo headspace autosampler k plynové chromatografii pro analýzu rozpuštěného metanu, etanu a etylenu ve vodě (viz [8]).

### 3 Mikrobiální testy

#### 3.1 Pracovní postup

Bakteriální mikrobiální vzorku vody, sterilně odebraného přímo z vrtu, byla analyzována pomocí LIVE/DEAD® BacLight™ kitu pro stanovení počtu a viability bakteriálních buněk. Měření bylo provedeno na průtokovém cytometru Apogee A50.

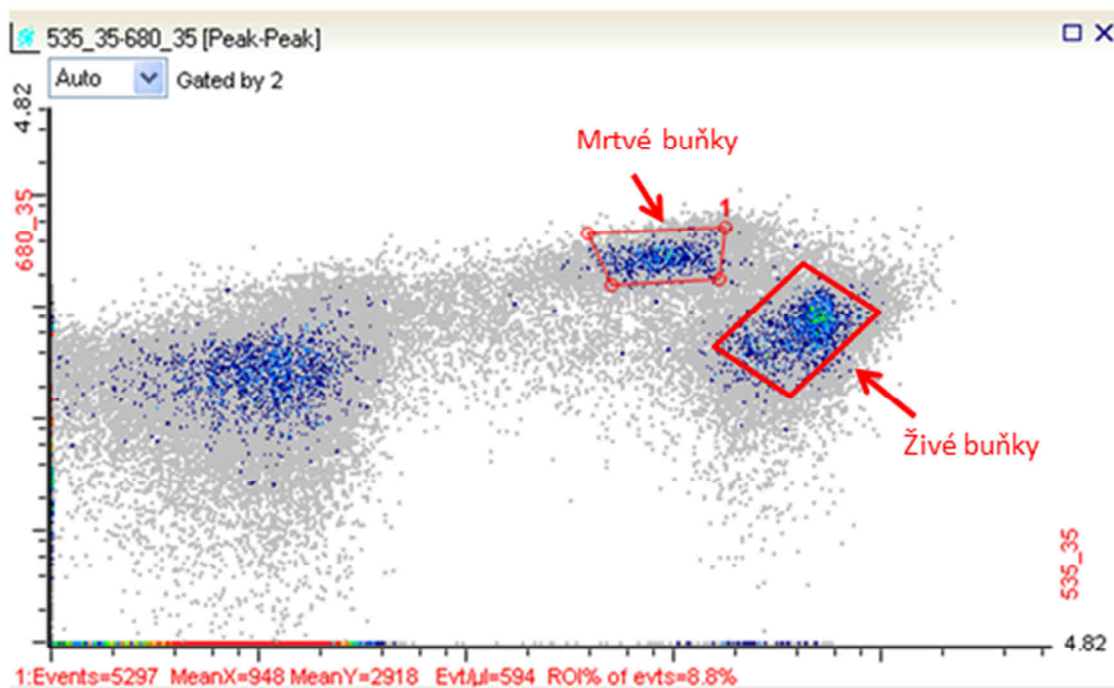
#### 3.2 Dílčí výsledky



Obr. 7 Scattergram analyzovaného vzorku vody

Na Obr. 7 je uveden tzv. scattergram analyzované vody (mapa, která charakterizuje rozptyl světla na buňkách, příp. abiotických částicích podobné velikosti), který v tomto případě slouží jako hrubý parametr pro posouzení mikrobiální aktivity vzorku vody. Červeně označená množina v Obr. 7 představuje grupu odpovídající bakteriálním buňkám. Hrubý odhad koncentrace buněk dle tohoto scattergramu odpovídá 6900 světlo rozptylujících částic v  $\mu\text{L}$  vody, což v případě, že by částice byly tvořeny pouze buňkami, byla velice vysoká hodnota. Vybraná množina částic byla dále podrobena detailní fluorescenční analýze – na základě selektivního obarvení živých resp. mrtvých buněk vhodným fluorescenčním barvivem je při této analýze možné odlišit abiotické částice a v případě částic biotických také živé resp. mrtvé buňky.

Na Obr. 8 je uveden cytogram, na němž jsou vyznačeny podskupiny odpovídající živým a mrtvým buňkám analyzované grupy. Neoznačená grupa odpovídá částicím abiotickým – tj. prachu, různým minerálním příp. organickým aglomerátům atp. Z celkového množství analyzovaných částic ( $\sim 6900$  částic/ $\mu\text{L}$ ) odpovídá celkovému obsahu buněk cca 2000 buněk/ $\mu\text{L}$ , a to v poměru 1400 živých buněk ku 600 buněk mrtvých.



Obr. 8 Cytogram ilustrující viabilitu analyzované skupiny buněk

### 3.3 Dílčí závěr

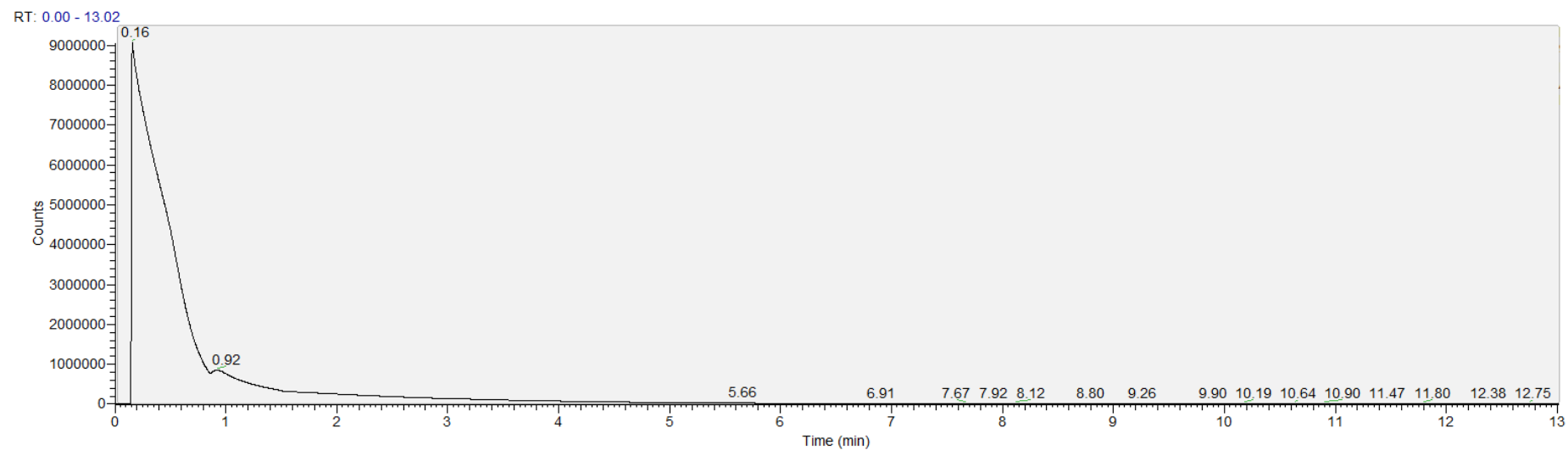
Uvedené výsledky je možné sumarizovat v následujících zjištěních: analyzovaný vzorek vody obsahuje významné množství bakterií, přičemž velká část z nich (více než dvě třetiny) ve viabilní formě. Měření by bylo vhodné zopakovat pro více následných odběrů, a to jednak pro získání výsledků s větší statistickou hodnotou a dále pro posouzení časového vývoje mikrobiální aktivity analyzované vody.

## Reference:

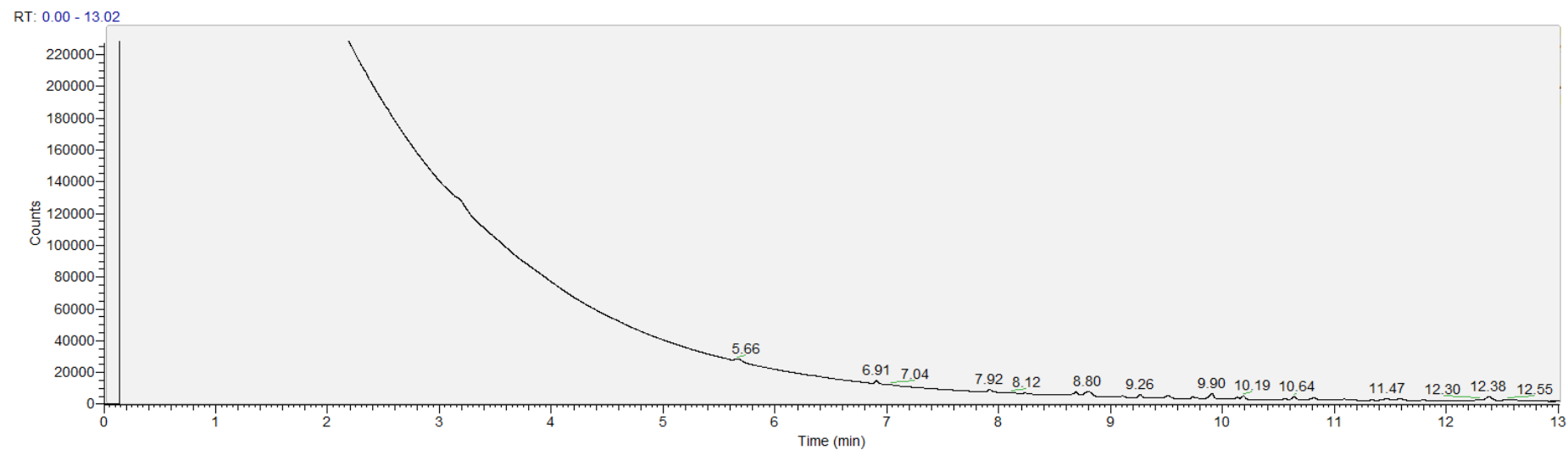
- [1] Frimmel, F.H., 2001. Aquatic humic substances. In: Steinbüchel, A. (Ed.), *Biopolymers*. Vol. 1: Lignin, Humic Substances and Coal. Wiley-VCH, Weinheim, s. 301-324.
- [2] Novák, F.; Šestauberová, M.; Krtička, M. Verification of the Norm TV 75 7536 (content of humic substances in water) by solutions of fulvic and humic acids. *ChemZi*, 9 (2013) 228. ISSN 1336-7242.
- [3] Thurman, E.M.; Malcolm, R.L., *Environ Sci Technol*, 15 (1981), 463-466
- [4] Chen, Y., Senesi, N. a Schnitzer, M. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, 41 (1997) 352-358
- [5] Korshin, G.V., Li, Chi-Wang, Benjamin, M.M. *Wat. Res.* 31 (1997) 1787-1795
- [6] Fuentes, M. et. al. *Org Geochem* 37 (2006) 1949–1959
- [7] Serkiz, S.M. a Perdue, E.M. *Water Res* 24 (1990) 911 – 916
- [8] Kampbell, D. a Vandegrift, S. *J Chromatogr Sci*, 36 (1998) 253 - 256



Příloha 1: Chromatogram par nad vzorkem analyzované vody stanovený metodou GC-FID

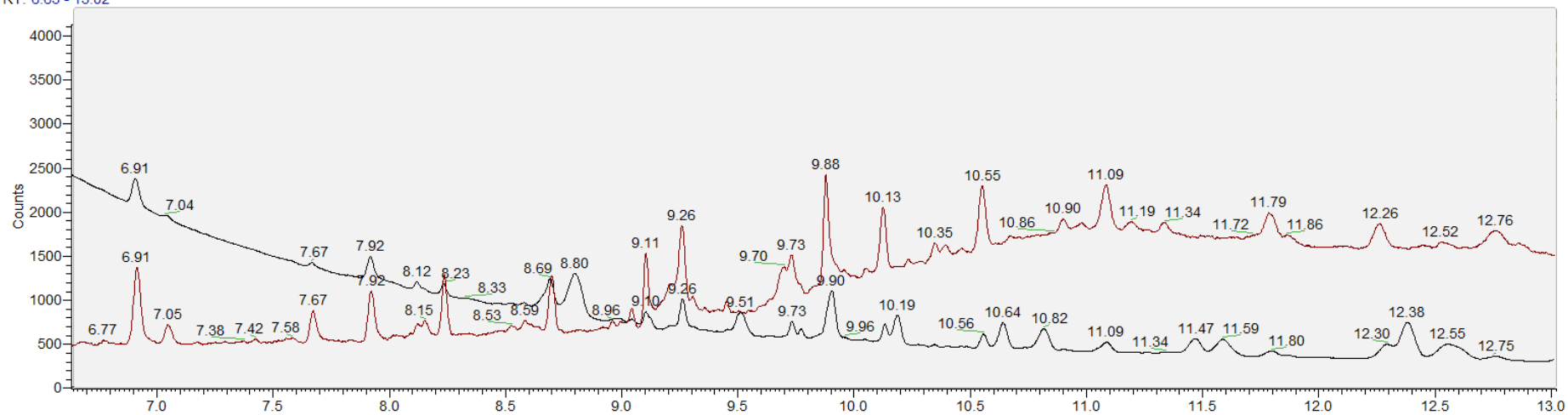


Příloha 2: Chromatogram par nad vzorkem analyzované vody stanovený metodou GC-FID (detail)

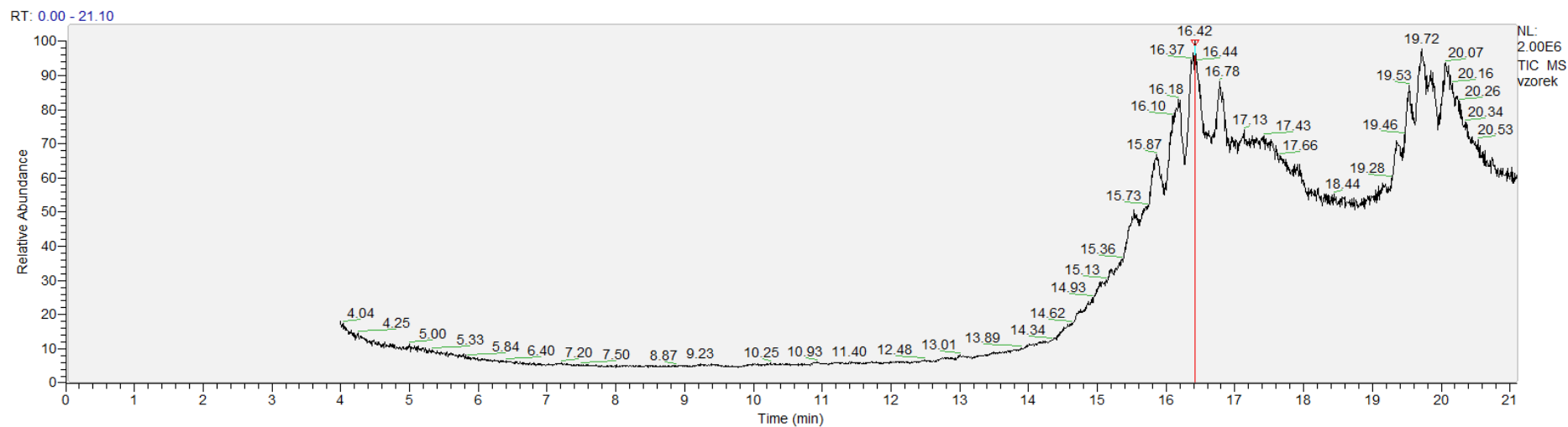


Příloha 3: Srovnání detailu chromatogramu par nad vzorkem analyzované (černě) a ultračisté (hnědě) vody (stanoveno na GC-FID)

RT: 6.63 - 13.02



# Příloha 4: Chromatogram par nad vzorkem analyzované vody stanovený metodou GC-MS



vzorek #1688 RT: 16.41 AV: 1 NL: 1.15E5  
T: + c Full ms [40.00-450.00]

