

WYKORZYSTANIE RÓŻNICZKOWYCH WIDM ABSORPCYJNYCH UV-VIS DO OZNACZANIA NIEKTÓRYCH ZWIĄZKÓW HUMUSOWYCH W TORFACH LECZNICZYCH

APPLICATION OF THE DIFFERENTIAL ABSORPTION UV-VIS SPECTRUM TO ASSAY SOME OF HUMIC COMPOUNDS IN THERAPEUTIC PEATS

Michał Drobnik, Teresa Latour

Zakład Tworzyw Uzdrawiskowych
Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego - Państwowy Zakład Higieny, Poznań

Słowa kluczowe: borowina, związki humusowe, widmo absorpcji, widma różniczkowe

Key words: bath peat, humic substances, absorption spectra, differential spectra

STRESZCZENIE

Wykreślono różniczkowe IV stopnia widma absorpcyjne w zakresie UV-VIS wyizolowanych na drodze selektywnej ekstrakcji (kwasowej, alkoholowej, zasadowej) z preparatu firmy Fluka wzorcowych kwasów: fulwonowych, hymatomelanowych i huminowych. Wyznaczono długości fali, przy których występują wyraźne, dobrze rozdzielone symetryczne piki charakteryzujące określone kwasy. Podobnej procedurze poddano wyizolowane tego samego rodzaju kwasy pochodzące z 4 złóż borowin z terenu Polski. Stwierdzono, że kwasy: hymatomelanowe, fulwonowe i huminowe występują w badanych borowinach typu niskiego w różnych ilościach i w różnych proporcjach pomiędzy borowinami.

ABSTRACT

Delineated were differential 4th degree absorption spectrum UV-VIS range for standardized humid acids produced by "Fluka". These acids were separated through selective extraction (acid, alcoholic, alkaline). Determined was wavelength for which distinct, well separated, symmetrical peaks characteristic for particular compounds were found. The similar procedure were applied to separate the same sort of acids extracted from 4 Polish peat deposits. Certified are the presence of hymatomelanoic acid, fulvic acid, humic acid in examined peat of low type. These acids occurred in different quantity and proportions.

WSTĘP

Torfy lecznicze (borowiny) są bardzo cenionym surowcem balneologicznym, stosowanym w kilkunastu uzdrowiskach polskich [12]. Od 75% do 95% masy organicznej torfu stanowią związki humusowe, zwłaszcza kwasy – złożone ciemnozabarwione biopolimery [18]. Makrocząsteczki tych kwasów zawierają skondensowane π -elektronowe układy węglowe i heterocykliczne oraz łańcuchy alifatyczne z grupami COOH, OH, NH₂, NH, które nadają im cechę słabych anionowych polielektrolitów [19]. Zarówno grupy funkcyjne jak też „gąbczasta” struktura związków humusowych determinują ich dużą pojemność sorpcyjną i zdolności kompleksotwórcze [7, 20]. Wyróżnia się kilka rodzajów

kwasów będących składowymi związków humusowych różniących się masą cząsteczkową, stopniem polimeryzacji, rozpuszczalnością, kwasowością i zawartością tlenu (kwasy: huminowe, hymatomelanowe i fulwonowe [1, 6]. W balneologii związki te uważane są za jeden z najważniejszych czynnych biologicznie składników borowiny [1, 2, 3, 14].

Ze względu na zróżnicowanie budowy tych związków humusowych nie określono dotąd jednoznacznie ich struktury. Jedną z metod wykorzystywaną w badaniach substancji humusowych np. w różnych próbkach glebowych jest spektroskopia absorpcyjna w zakresie UV-VIS z wykorzystaniem funkcji pochodnych [11, 15].

Celem pracy było zbadanie przydatności pochodnych wyższego (II i IV) rzędu do rozdziału rzeczywi-

Adres do korespondencji: Michał Drobnik, Zakład Tworzyw Uzdrawiskowych, Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego – Państwowy Zakład Higieny, 60-823 Poznań, ul. Słowackiego 8, tel. 071 8470182, fax 071 8434970, e-mail: mdrobnik@pzh.gov.pl

stych widm absorpcji, w zakresie bliskiego nadfioletu i w części widzialnej światła, kwasów humatomelanowych, fulwonowych i huminowych - oraz ich różnicowania (identyfikacji) i ilościowego oznaczania w borowinach.

MATERIAŁ I METODY

Materiał do badań stanowiły próbki borowin o naturalnej wilgotności, pobrane systemem kopertowym z głębokości ok. 1 m, z 4 złóż torfów uznanych za surowce lecznicze. Badania właściwości fizyko-chemicznych i chemicznych analizowanych naturalnie wilgotnych borowin wykonano wg metodyki opisanej w Polskiej Normie [16].

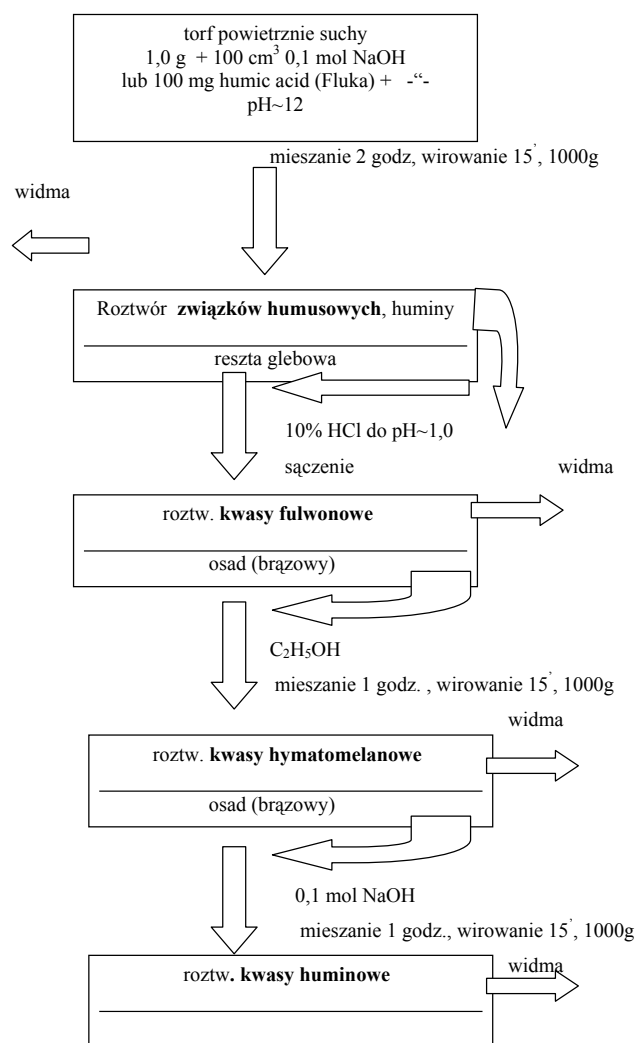
Wg *Bergera* i wsp. [4, 5] struktura ww. kwasów wyizolowanych z torfu zmienia się w zależności od sposobu suszenia próbek (azot, powietrze, liofilizacja), a także kolejności i rodzaju zastosowanych rozpuszczalników w procesie ich ekstrakcji.

Na podstawie spektroskopii IR stwierdzono również, że proces suszenia torfów typu niskiego prowadzi do mineralizacji frakcji drobnocząsteczkowych kwasów huminowych, a proces ekstrakcji zw. humusowych torfu mieszaniną rozpuszczalników organicznych (debitumizacji) powoduje utratę frakcji cząsteczek zawierających struktury alifatyczne bogate w grupy funkcyjne COOH, CO, OH [10]. Najmniejsze zmiany stwierdza się pod wpływem suszenia na powietrzu, aczkolwiek w tych warunkach powstają utwory o charakterze hydrofobowym [8].

W celu uzyskania porównywalnych wyników badań z różnych serii pomiarowych, wszystkie naturalnie wilgotne próbki torfów suszono na powietrzu w takich samych warunkach temperaturowych i czasowych ($22 \pm 1^\circ\text{C}$, 1 tydzień). Następnie borowinę rozcierano w moździerzu i przesiewano przez sita biorąc do analiz frakcje $\phi = 0,25$ mm.

Schemat procedury wyodrębniania frakcji kwasowych związków humusowych z borowiny przy zastosowaniu selektywnej ekstrakcji alkalicznej, kwasowej i alkoholowej, zachowując takie same stosunki: torf/ekstrahent oraz stężenia rozpuszczalników wg *Beera* [3] przedstawiono na rycinie 1.

Spektrogramy wyodrębnionych kwasów wykonano w sposób ciągły w zakresie bliskiego nadfioletu (250-400nm) i części widzialnej światła (400-700nm) z wykorzystaniem spektrofotometru UV-VIS firmy Hitachi model U-1800 przy następujących parametrach pracy: prędkość skanowania 10-800nm/min, szerokość spektralna szczeliny 4 nm, dokładność długości fali $\pm 0,5$ nm, odtwarzalność ustawienia dł. fali $\pm 0,3$ nm, zakres fotometryczny 0 – 3 Abs. Stosowano kuwety kwarcowe lub szklane (VIS) o grubości $d=1$ cm i $d=5$ cm.



Ryc. 1. Schemat frakcjonowania związków humusowych
The fractionate scheme of humus substances

Różniczkowania rzeczywistych widm absorpcji dokonano metodą numeryczną wykorzystując oprogramowanie komputerowe spektrofotometru UV-Solutions. Przy wygładzaniu analizowanych krzywych absorpcji metodą *Savitsky-Golay'a*, ilość punktów użytych do aproksymacji krzywej wybrano doświadczalnie sprawdzając stopnie eliminacji szumów.

Dla porównania wyników tych badań, wykonanych z użyciem omawianych kwasów wyekstrahowanych z borowin, wykonano analogiczne ekstrakty i badania tych związków w preparacie handlowym „Humic acid” firmy *Fluka* stanowiącego wzorcową mieszaninę ww. kwasów. Wszystkie widma wykreślono przy takich samych parametrach pracy spektrofotometru (szybkość i zakres skanowania, zakres, czułość) oraz w identyczny sposób opracowano matematycznie widma rzeczywiste (rząd pochodnej, typ funkcji wygładzania widma, rząd wygładzania, liczba punktów wziętych do obliczeń.).

WYNIKI I DISKUSJA

Wyniki badań właściwości fizyko-chemicznych borowin, które służą do oceny ich przydatności leczniczej oraz określenia typu geologicznego [17] obejmujące m.in. pomiar: odczynu wyciągu wodnego, objętości sedimentacyjnej, chłonności wody, wilgotności oraz zawartości substancji organicznych i mineralnych zestawiono w tabeli 1.

Tabela 1. Właściwości fizykochemiczne oznaczanych borowin
The physicochemical properties of determined peat

Nazwa złoża (uzdrowisko)	Odczyn (pH)	Objętość sedimentacyjna (cm ³ /1g s.m.)	Chłonność wody (g H ₂ O/ 1g s.m.)	Zawartość (%)		
				wody	substancji organicznych	substancji nieorganicznych
Kamień Pomorski (Kamień Pomorski)	7,00	24,68	16,36	90,68	92,0	7,9
Zabłocie (Ustroń)	6,03	16,41	19,80	86,90	89,0	11,0
Bronowo (Połczyn)	6,40	36,25	21,46	92,10	98,9	1,1
Wieniec (Wieniec)	5,72	15,55	9,49	83,60	88,5	11,5

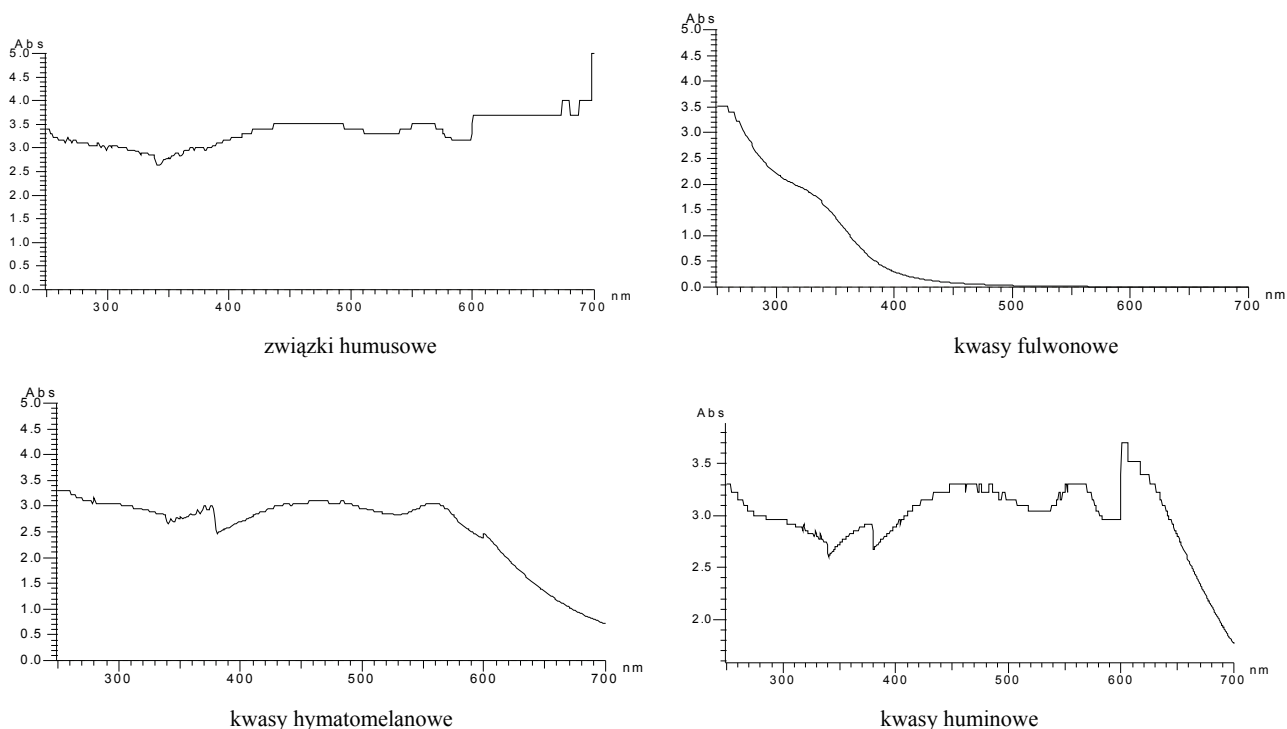
Odczyn wyciągu wodnego świeżej borowiny mieści się w granicach 5,72 – 7,00; objętość sedimentacyjna w przedziale 15,55 – 36,25 cm³/1 g s.m., a chłonność wody wynosiła 9,49 – 21,46 g H₂O/1g s.m., wilgotność 83,6 – 92,1 %. Badane borowiny cechują się wysoką zawartością substancji organicznej wynoszącą 88,5 – 98,9 %.

Stopień humifikacji (rozkładu torfu) wyrażony w skali wg *von Posta* zawarty jest w przedziale H₃ – H₄.

Rzeczywiste widma absorpcyjne wyodrębnionych wzorcowych kwasów hymatomelanowych, - huminowych i -fulwonowych przedstawia rycina 2.

Kształty linii widmowych badanych kwasów humusowych, w zakresie 250 – 700 nm wskazują na brak wyraźnych, dobrze uformowanych i rozdzielonych pików, które pozwoliłyby na identyfikację poszczegól-

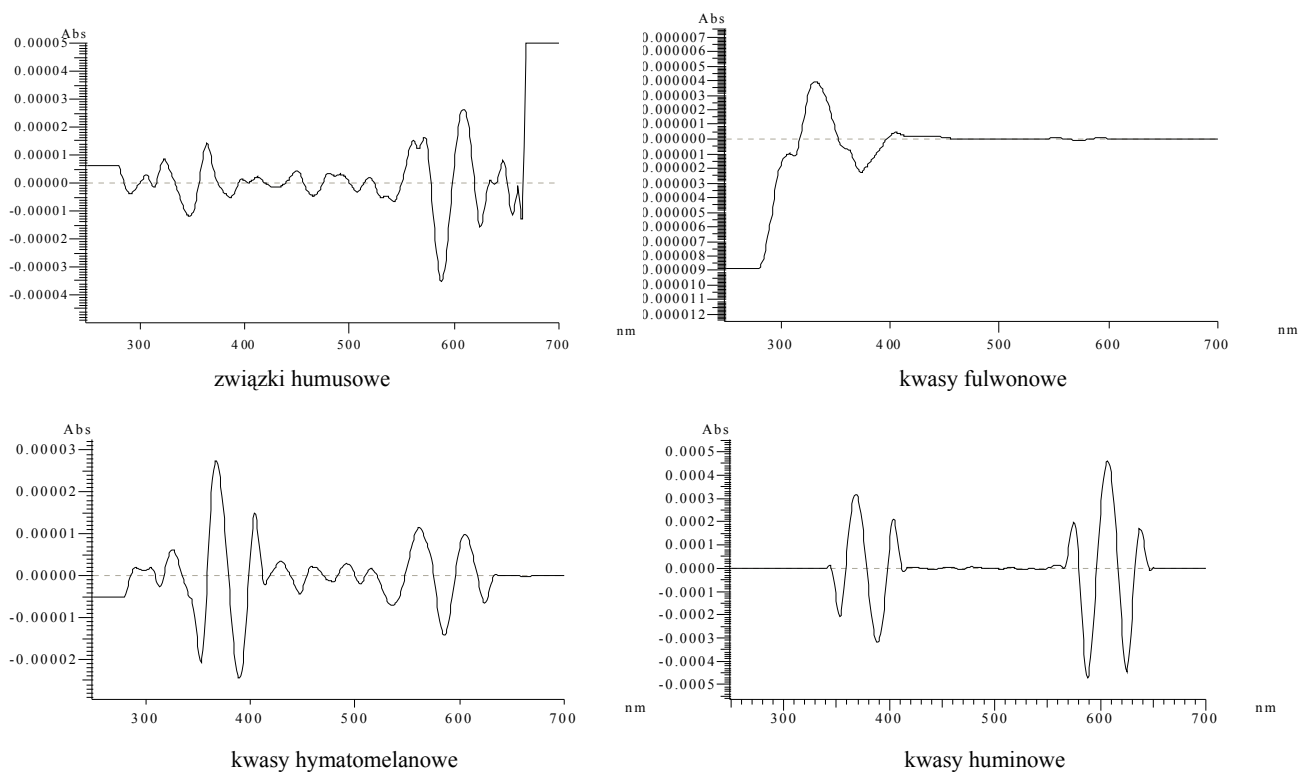
nych związków. W odpowiednich rozcieńczeniach obserwowany jest systematyczny i regularny wzrost krzywych widmowych absorpcji począwszy od $\lambda = 450$ -480 nm tj. od zakresu barwy żółtej promieniowania widzialnego, w kierunku ultrafioletu. Typowe widmo ma kształt linii monotonicznie malejącej. Można zaob-



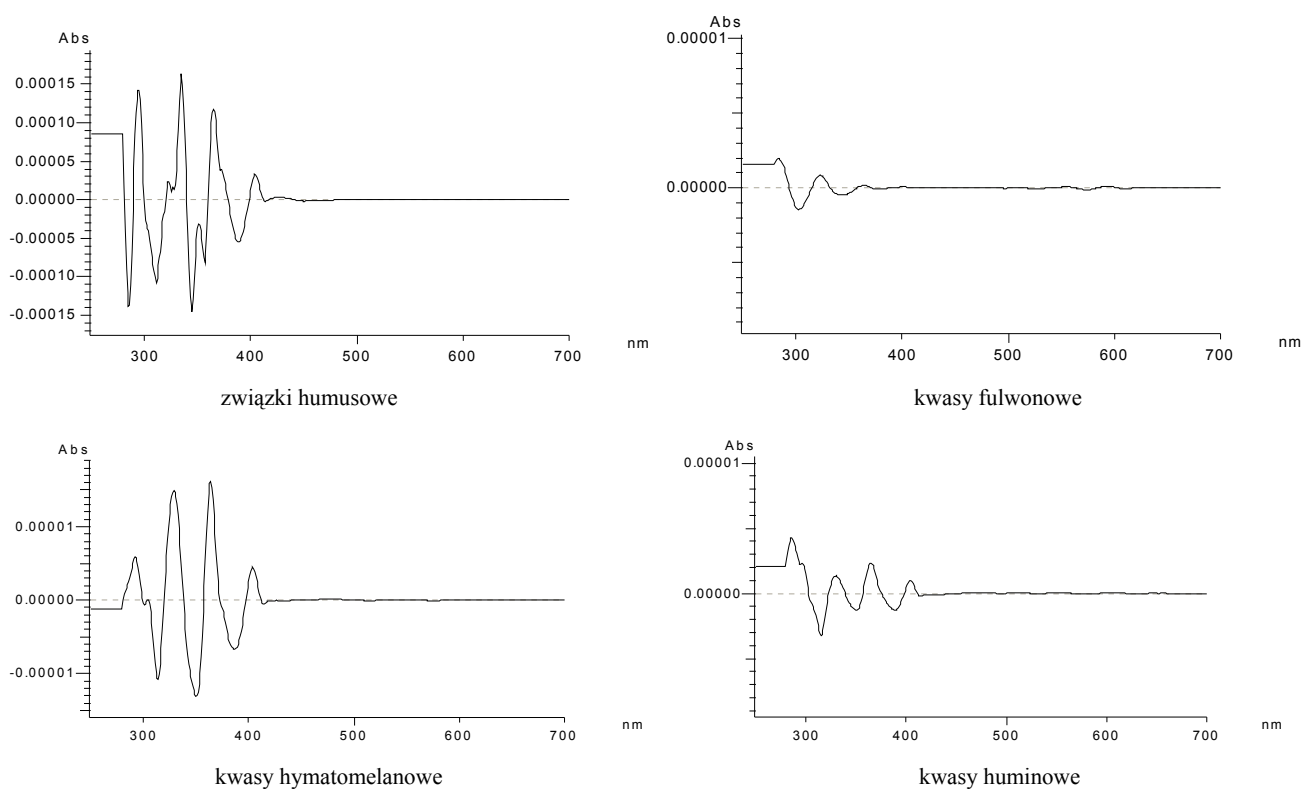
Ryc. 2. Rzeczywiste widma wzorcowych kwasów humusowych: fulwonowych, hymatomelanowych, huminowych (d=1 cm)
The actual absorption spectrum for humus substance: fulvic acid, hymatomelanolic acid, humic acid (d=1 cm)

serwować zwiększone intensywności pasm w zakresie 275-280 nm. Jest to spowodowane w znacznej mierze występowaniem w strukturze związków humusowych

aromatycznego jądra oraz grup o charakterze chinonów i semichinonów stabilizowanych przez mezomerię i



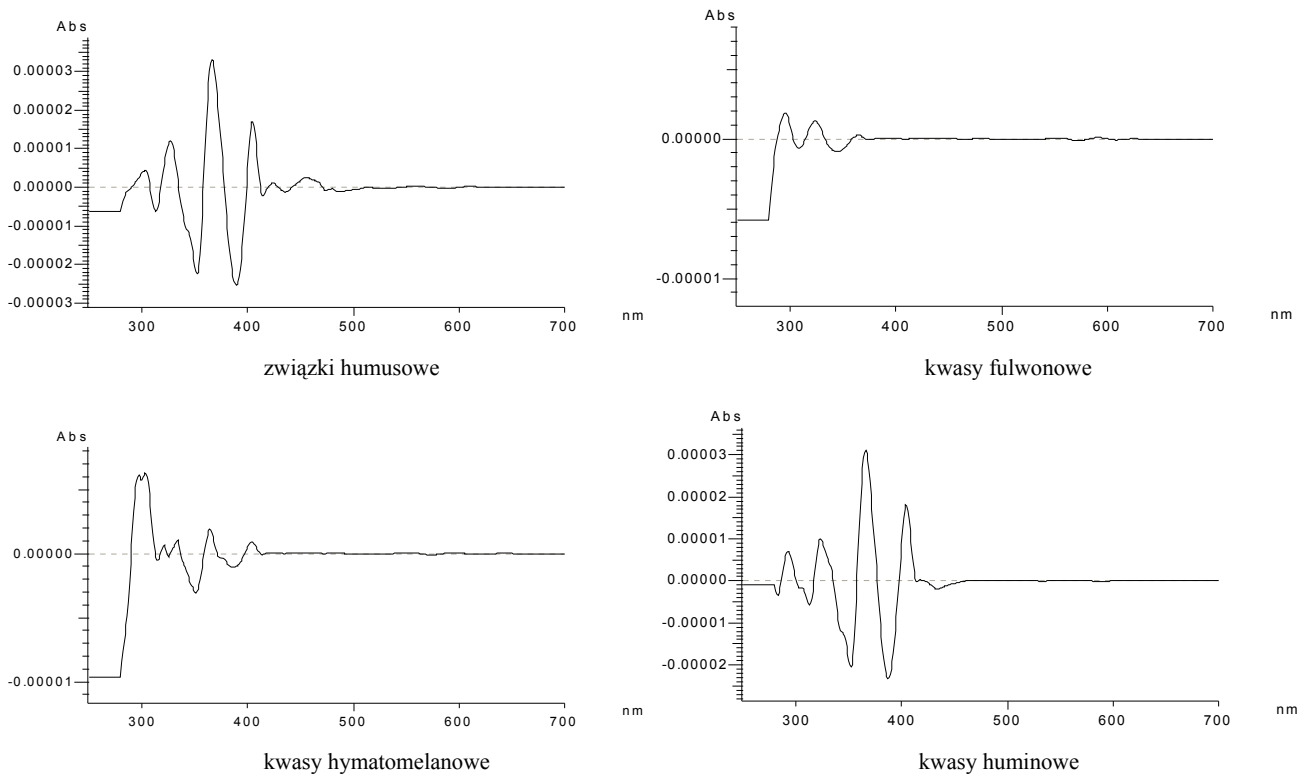
Ryc. 3. Różniczkowe widma absorpcyjne IV stopnia wyizolowanych wzorcowych kwasów ($d=1$ cm)
The 4th degree differential absorption spectra for standardized separated acids ($d=1$ cm)



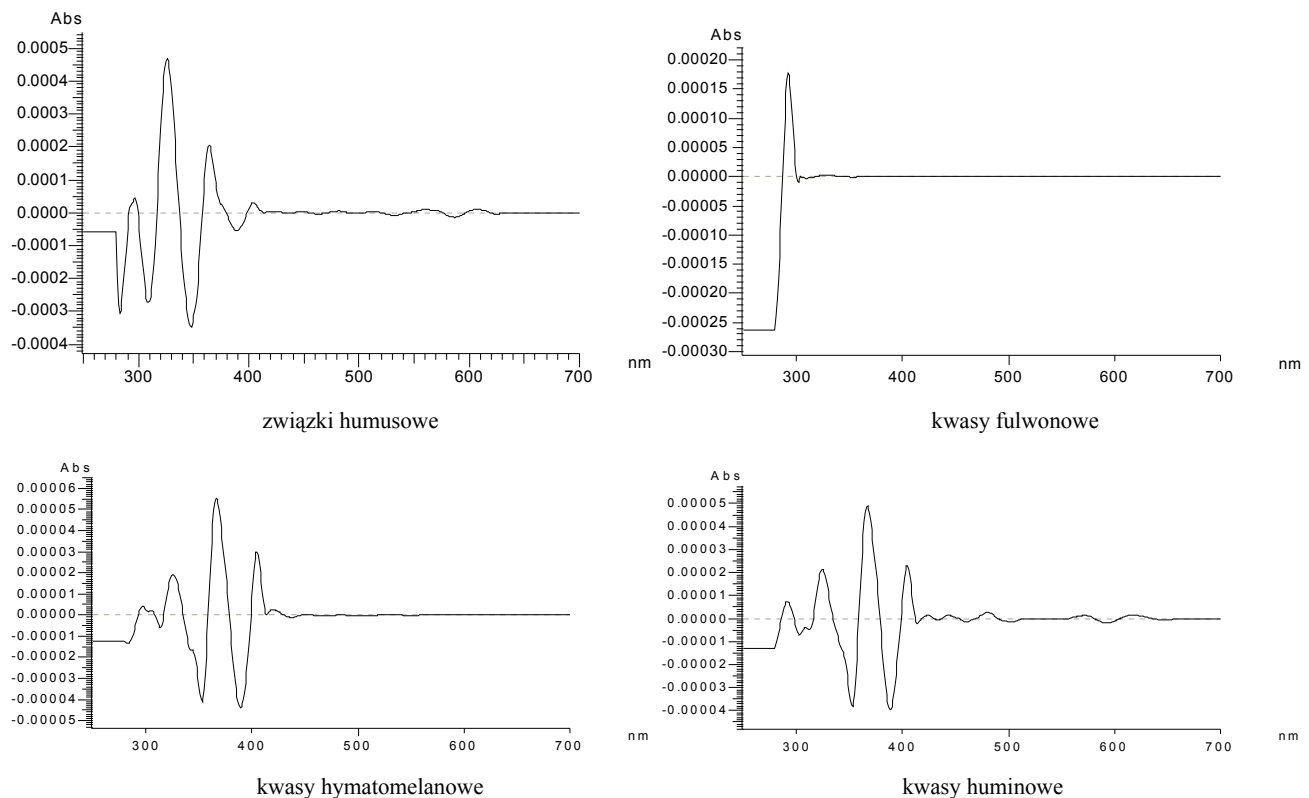
Ryc. 4. Różniczkowe widma absorpcyjne IV stopnia wyizolowanych kwasów z borowiny ze złoża Kamień Pomorski ($d=1$ cm)
The 4th degree differential absorption spectra for acids separated from peat extracted from Kamień Pomorski deposit ($d=1$ cm)

tworzących wewnątrz cząsteczkowe chinhydrony, dające silną barwę [9].

W celu wyodrębnienia ze zwykłego widma absorpcji (o rozmytej strukturze) zmian krzywizn pasm zastosowano spektroskopię różniczkową II i IV rzędu.



Ryc. 5. Różniczkowe widma absorpcyjne IV stopnia wyizolowanych kwasów z borowiny ze złoża Wieniec (d=1cm)
The 4th degree differential absorption spectra for acids separated from peat extracted from Wieniec deposit (d= 1 cm)



Ryc. 6. Różniczkowe widma absorpcyjne IV stopnia wyizolowanych kwasów z borowiny ze złoża Zabłocie (d=1 cm)
The 4th degree differential absorption spectra for acids separated from peat extracted from Zabłocie deposit (d= 1 cm)

Ponieważ w widmach różniczkowych IV rzędu (w odróżnieniu od II rzędu) położenia maksimów odpowiadają położeniom maksimów pasm w rzeczywistym widmie absorpcji oraz cechują się one lepszą rozdzielczością, w opracowaniu przedstawiono tylko widma różniczkowe IV stopnia.

Na rycinie 3 przedstawiono absorpcyjne widma różniczkowe IV stopnia wzorcowych kwasów, uzyskane dla długości drogi optycznej $d=1$ cm.

Wykreślone różniczkowe widma absorpcyjne kwasów: hymatomelanowych, fulwonowych i huminowych wyizolowanych z preparatu handlowego zawierają dobrze rozdzielone, symetryczne piki przy określonych pasmach długości fal promieniowania elektromagnetycznego. Widma te charakteryzują się występowaniem szeregu pików przy wspólnych pasmach długości fal. Są to pasma wspólne dla kwasów hymatomelanowych i huminowych: 365-369 nm, 560-573, 606-607 nm i 324-326 nm.

Piki różnicujące poszczególne frakcje wszystkich rozdzielonych kwasów występują przy długości fali 334 nm (kwasy fulwonowe), 450 nm (kwasy hymatomelanowe), 637 nm (kwasy huminowe).

Ryciny 4-7 przedstawiają różniczkowe widma absorpcyjne (IV stopnia) w zakresie 250-700 nm kwasów wyizolowanych z badanych borowin dla $d=1$ cm.

W zakresie 250-400 nm występują piki, które stwierdzono również w ekstraktach kwasów wzorcowych. Dodatkowy pik występuje jedynie w kwasach huminowych wyekstrahowanych z borowiny ze złoża Bronowo (przy $\lambda=340$ nm).

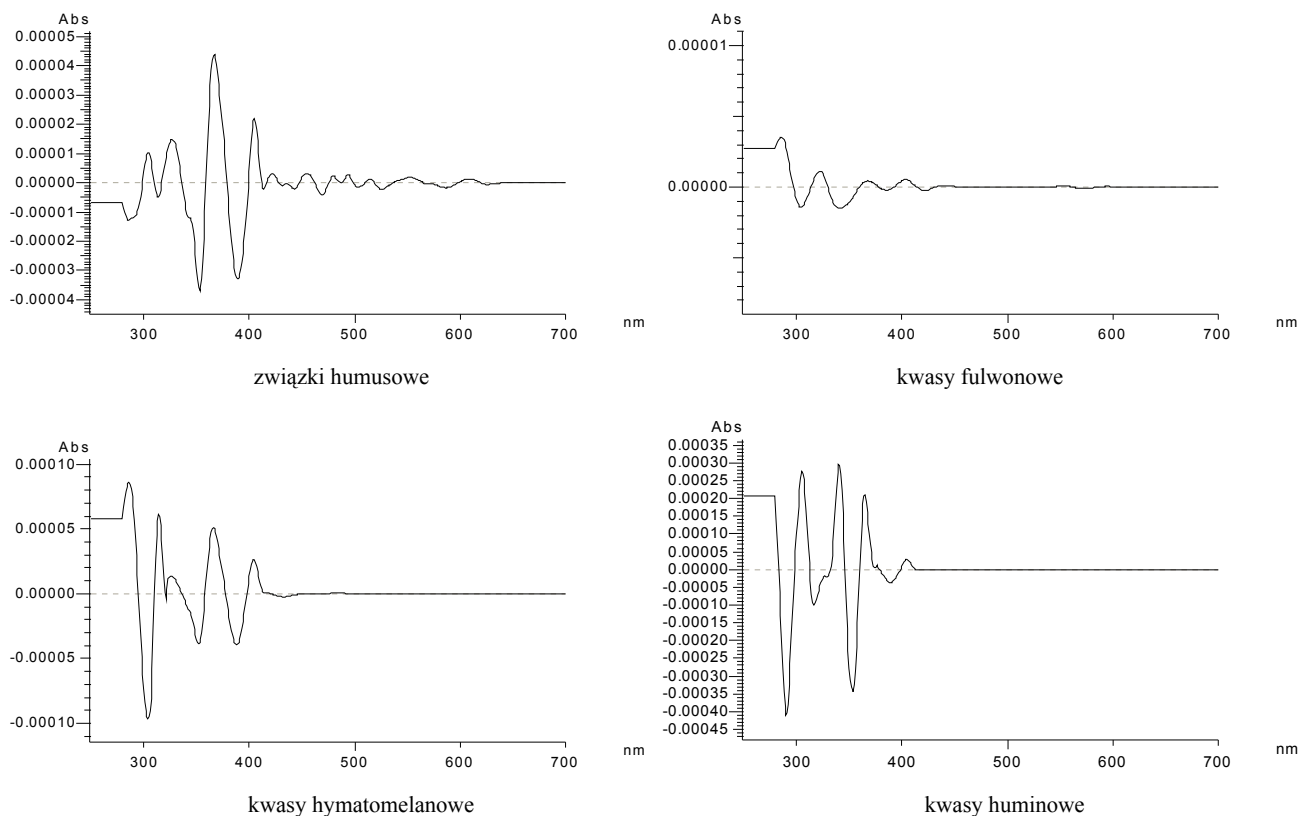
W zakresie 500-700 nm (przy pomiarach absorpcji roztworów w kuwecie 1 cm) nie występują żadne piki, które stwierdzono w kwasach wzorcowych firmy *Fluka*.

Na rycinie 8 przedstawiono widma różniczkowe z wyraźnymi pikami tylko związków humusowych uzyskane w zakresie 500-700 nm dla $d=5$ cm. W zdecydowanie mniejszych wartościach absorpcji występują również piki kwasów hymatomelanowych i huminowych z borowiny ze złoża Zabłocie (Ryc. 9).

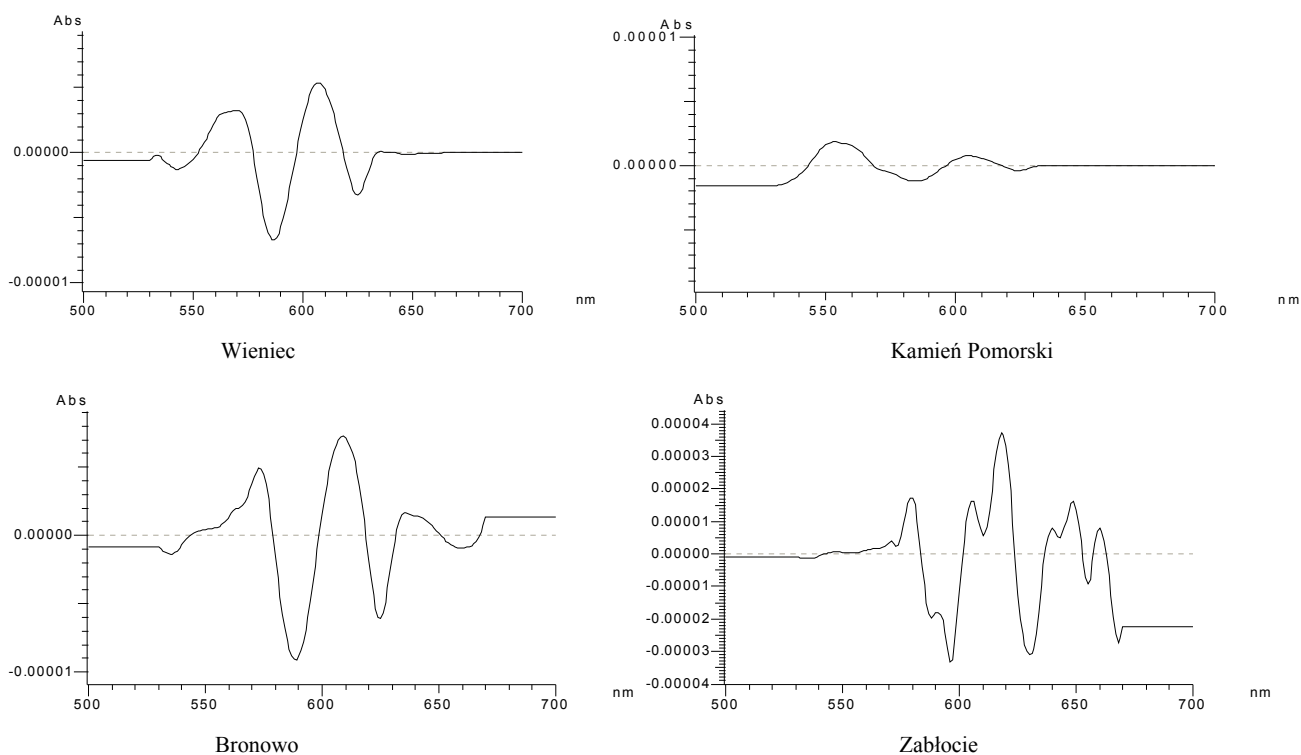
Z pozostałych prób badanych borowin, wykonane widma VIS dla $d=5$ cm nie zawierają żadnych wyraźnych pików (w odróżnieniu od wzorcowych kwasów huminowych i hymatomelanowych) dla których piki w zakresie widzialnym światła są widoczne przy zastosowaniu kuwety 1 cm).

Analizując wielkości pików różniczkowych widm absorpcyjnych poszczególnych frakcji kwasów wyodrębnionych z borowin można ustalić schematycznie następujące zależności ilościowe:

- Kamień Pomorski: kw. hymatomelanowe > kw. fulwonowe = kw. huminowe

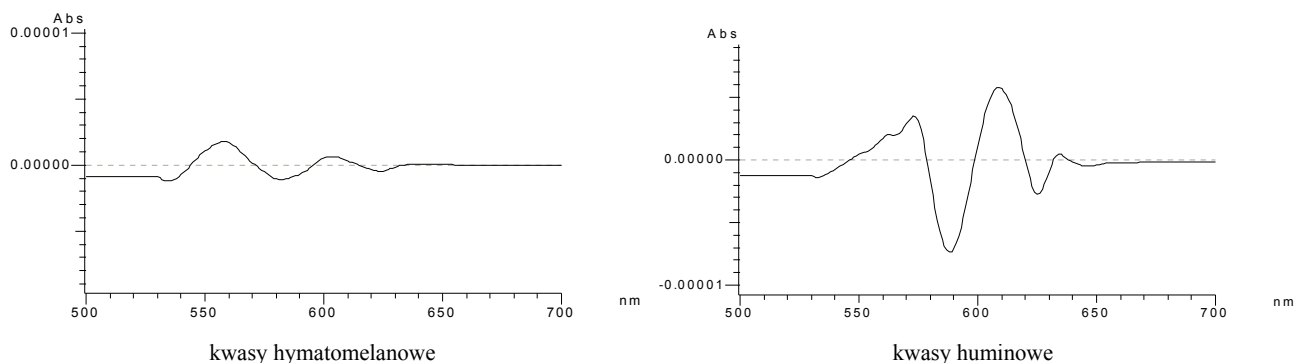


Ryc. 7. Różniczkowe widma absorpcyjne IV stopnia wyizolowanych kwasów z borowiny ze złoża Bronowo ($d=1$ cm)
The 4th degree differential absorption spectra for acids separated from peat extracted from Bronowo deposit ($d=1$ cm)



Ryc. 8. Różniczkowe widma absorpcyjne IV stopnia w zakresie 500-700 nm wyizolowanych z borowin związków humusowych ($d=5\text{cm}$)

The 4th degree differential absorption spectra in the range 500-700 nm of humus substances separated from peat ($d=5\text{ cm}$)



Ryc. 9. Różniczkowe widma absorpcyjne IV stopnia w zakresie 500-700 nm wyizolowanych kwasów z borowiny ze złoża Zabłocie ($d=5\text{ cm}$)

The 4th degree differential absorption spectra in the range 500-700 nm of acids separated from peat extracted from Zabłocie deposit ($d=5\text{ cm}$)

- Wieniec: kw. huminowe > kw. hymatomelanowe > kw. fulwonowe
- Zabłocie: kw. fulwonowe > kw. hymatomelanowe = kw. huminowe
- Bronowo: kw. huminowe = kw. hymatomelanowe > kw. fulwonowe

Z danych dot. właściwości fizyko-chemicznych i chemicznych badanych borowin, przedstawionych w tabeli 1, wynika, że spełniają one wymogi określone w Rozporządzeniu Ministra Zdrowia [17] dla borowin typu niskiego – przydatnych do zabiegów leczniczych.

Różniczkowanie wyższego rzędu widm absorpcyjnych roztworów związków humusowych tj. kwasów

fulwonowych, hymatomelanowych i huminowych pozwala na uzyskiwanie krzywych widmowych charakteryzujących się dobrze rozdzielonymi pikami przy określonych długościach fali promieniowania elektromagnetycznego.

Analiza wielkości pików frakcji kwasów wyodrębnionych z borowin umożliwia ocenę ich udziału ilościowego i wzajemnych stosunków pomiędzy poszczególnymi frakcjami.

Stwierdzono, że najwięcej kwasów huminowych i hymatomelanowych, zawartych jest w borowinie ze złoża Bronowo użytkowanego przez uzdrowisko Połczyn. Spośród badanych borowin, odznacza się ona również optymalnymi właściwościami fizyko-chemicznymi

(największą zdolnością chłonięcia wody, objętością sedymentacyjną, wilgotnością i zawartością substancji organicznych).

Podsumowując należy stwierdzić, że informacje uzyskane na podstawie różniczkowych widm absorpcyjnych w zakresie UV-VIS dla kwasów występujących w borowinach, mogą być wykorzystane w ocenie właściwości fizyko-chemicznych borowiny zwłaszcza stopnia humifikacji masy roślinnej. Dane te mogą być również pomocne przy wyborze borowiny do określonego rodzaju zabiegu, zwłaszcza wówczas gdy pożądanym jest surowiec o dużej zawartości kwasów huminowych. Wykreślanie oraz różniczkowanie widm absorpcyjnych badanych związków może być przydatne do oceny wpływu czynników zewnętrznych - środowiskowych czy też ewentualnych zmian podczas magazynowania i przygotowywania borowiny do zabiegu.

WNIOSKI

1. Różniczkowanie widm absorpcyjnych IV stopnia kwasów humusowych występujących w borowinach pozwala uzyskać krzywe widmowe z charakterystycznymi pikami przy określonych długościach fali promieniowania elektromagnetycznego w zakresie UV-VIS.
2. Wielkość pików różniczkowych widm absorpcyjnych umożliwia ocenę udziału ilościowego i wzajemnych stosunków pomiędzy kwasami huminowymi, hymatomelanowymi i fulwonowymi.

PIŚMIENNICTWO

1. *Banaszkiewicz W., Drobnik M.*: Wpływ borowiny naturalnej i roztworu izolowanych kwasów huminowych na niektóre wskaźniki przemiany materii i równowagi kwasowo-zasadowej u zwierząt doświadczalnych. *Roczn. PZH* 1994, XLV, 353-360.
2. *Banaszkiewicz W., Drobnik M.*: Die biologische Wirkung isolierter Huminsäuren und von Naturtorf als Moortränke bei Versuchtieren. *Int. Peat Therapy Symposium, Bad-Pyrmont* 2-7 may 1994.
3. *Beer A.M., Sagorchev P., Lukanov J.*: Isolation of biologically active fractions from the water-soluble components of fulvic and ulmic acids from peat. *Phytomedicine* 2002, 9, 659-666.
4. *Berger R., Wiatrowska E., Gołębiowska D.*: Wpływ sposobu suszenia i procesu debitemizacji na wydajność ekstrakcji i skład frakcyjny kwasów humusowych torfu niskiego. *Metody badań substancji humusowych ekosystemów wodnych i lądowych. AR, Szczecin* 2004, 131-134.
5. *Berger R., Wiatrowska E., Gołębiowska D.*: Wpływ sposobu suszenia i procesu debitemizacji na właściwości spektralne kwasów huminowych (KH) torfu niskiego.

- Metody badań substancji humusowych ekosystemów wodnych i lądowych. *AR, Szczecin* 2004, 135-139.
6. *Black A.P., Christman R.F.*: Chemical Characteristics of Fulvic acids. *Jour. American Water Works Association* 1963, 55, 897-906.
 7. *Fukushima M., Nakayasu K., Tanaka S., Nakamura H.*: Chromium(III) binding abilities of humic acids. *Anal. Chim. Acta* 1995, 317, 195-206.
 8. *Gawlik J.*: The influence of the moorshing process of peats on changes of their water capacity caused by thermal drying. *Pol. J. Soil.* 1988, 31(2), 15-21.
 9. *Gołębiowska D.*: Spektrometria absorpcyjna w zakresie UV-VIS: Parametry i sposoby analizy widm absorpcji związków humusowych. *Metody badań substancji humusowych ekosystemów wodnych i lądowych. AR, Szczecin* 2004, 15-25.
 10. *Gołębiowska D., Jażdżikowska A., Sienkiewicz M., Gawlik A.*: Wpływ uwilgotnienia i procesu debitemizacji na widma IR kwasów huminowych z torfu. *Metody badań substancji humusowych ekosystemów wodnych i lądowych. AR, Szczecin* 2004, 141-146.
 11. *Grabowski J.*: Spektroskopia elektronowa UV-VIS. *W: Biospektroskopia. PWN, Warszawa* 1989, 51-103.
 12. *Kucharski M.*: Złoże borowiny udokumentowane w kategorii "B" i uznane za lecznicze. *Baln. Pol.* 1995, XXXVII, 1, 90-94.
 13. *Listvan I.I.*: Chemische Torfsubstanzen und Torfprodukte - Erfahrungen aus Weissrussland. *Telma* 1996, 26, 163-170.
 14. *Lishtvan I.I., Puntus F.A., Naumova G.W., Dolidovitch E.F.*: Die Anwendung vor Torfen und Mudden der chemischen und Peloid-Therapie. *Wirkungsmechanismen der Moortherapie. Telma* 1975, 5, 277-307.
 15. *Milewska J., Gołębiowska D.*: Zastosowanie czwartych pochodnych do analizy widm absorpcji kwasów huminowych w zakresie UV-VIS. *Zesz. Probl. Post. Nauk. Rol.* 1993, 411, 213-220.
 16. PN-Z-11003-3/2001: Borowiny. Analiza fizyczno-chemiczna i mikrobiologiczna
 17. Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 13.4.2006r w sprawie zakresu badań niezbędnych do ustalenia właściwości leczniczych naturalnych surowców leczniczych i właściwości leczniczych klimatu, kryteriów ich oceny oraz wzoru świadectwa potwierdzającego te właściwości. *Dz. U. Nr. 80, poz. 565.*
 18. *Schulten R.*: The three-dimensional structure of humic substances and soil organic matter studied by computational analytical chemistry. *Fresenius J. Anal. Chem.* 1995, 351, 62-73.
 19. *Senesi N., Miano T.M.*: Humic Substances in the Global Environment and Implications on Human Health. Elsevier Amsterdam 1994.
 20. *Warwick P., Hall Read D.*: A comparative study employing three different models to investigate the complexation properties of humic and fulvic acids. *Radiochim. Acta* 1994, 66/67, 133-140.

Otrzymano: 16.02.2009

Zaakceptowano do druku: 10.07.2009