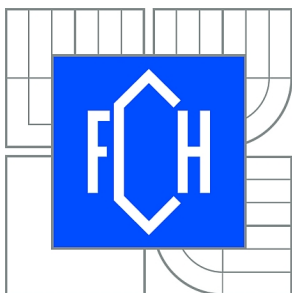


VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA CHEMICKÁ

ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE

FACULTY OF CHEMISTRY

INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

PRŮZKUM APLIKACÍ HUMINOVÝCH KYSELIN V MEDICÍNĚ A KOSMETICE

HUMIC ACIDS IN MEDICINE AND COSMETICS

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

HELENA ŠMÍDOVÁ

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

prof. Ing. MILOSLAV PEKAŘ, CSc.

BRNO 2010



Vysoké učení technické v Brně
Fakulta chemická
Purkyňova 464/118, 61200 Brno 12

Zadání bakalářské práce

Číslo bakalářské práce:	FCH-BAK0276/2008	Akademický rok: 2009/2010
Ústav:	Ústav fyzikální a spotřební chemie	
Student(ka):	Helena Šmídová	
Studijní program:	Chemie a chemické technologie (B2801)	
Studijní obor:	Spotřební chemie (2806R002)	
Vedoucí práce	prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.	
Konzultanti:		

Název bakalářské práce:

Průzkum aplikací huminových kyselin v medicíně a kosmetice

Zadání bakalářské práce:

Hlavní náplň práce bude tvořit internetová a literární rešerše zaměřená na dosud známé teoretické poznatky, patentové přihlášky a skutečné realizace týkající se využití huminových kyselin nebo materiálů, které je obsahují v oblasti humánní i veterinární medicíny a kosmetiky. Výstupem rešerše bude zároveň návrh perspektivních směrů zkoumání v těchto oblastech.

Doplňková experimentální činnost bude zaměřena na základní operace huminové chemie - izolace a charakterizace huminových kyselin.

Termín odevzdání bakalářské práce: 28.5.2010

Bakalářská práce se odevzdává ve třech exemplářích na sekretariát ústavu a v elektronické formě vedoucímu bakalářské práce. Toto zadání je přílohou bakalářské práce.

Helena Šmídová
Student(ka)

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
Vedoucí práce

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
Ředitel ústavu

V Brně, dne 1.12.2008

prof. Ing. Jaromír Havlica, DrSc.
Děkan fakulty

ABSTRAKT

Hlavní náplní této práce bylo tvořit internetové a literární rešerše zaměřené na dosud známé teoretické poznatky, patentové přihlášky a skutečné realizace, týkající se využití huminových kyselin nebo materiálů, které je obsahují, v oblasti humánní i veterinární medicíny a kosmetiky. Výstupem má být zároveň i návrh perspektivních směrů zkoumání v těchto oblastech.

Úvodní část práce pojednává o huminových látkách obecně s důrazem na huminové kyseliny, historii huminové chemie, vzniku huminových látek a jejich struktuře. Druhá část pojednává o lékařských aspektech, farmakologických účincích a použití huminových látek v humánní medicíně, veterinárním lékařství a kosmetice, zároveň zohledňuje huminové látky z pohledu životního prostředí. Třetí experimentální část měla za úkol seznámit se se základy izolace a charakterizace huminových kyselin (proměření IČ a UV/VIS spektra a stanovení vlhkosti a popela ve vzorcích huminových kyselin).

ABSTRACT

The main concern of this study was to form a web and literature search focused on the known theoretical knowledge, patent application and the actual realization, for the use of humic acids or material containing humic acids in human and veterinary medicine and cosmetics. The output is also a proposal to be promising directions in exploring these areas.

The introduction deals with humic substances in general with emphasis on humic acids, history of humic chemistry and structure of humic substances. The second part deals with medical aspects, pharmacological effects and the use of humic substances in human medicine, veterinary medicine and cosmetics, also takes account of humic substances from the perspective of the environment. The task of third experimental part was to learn the basics of isolation and characterization of humic acids (measurement of IR and UV / VIS spectra and determination of moisture and ash in samples of humic acids).

KLÍČOVÁ SLOVA

huminové kyseliny, medicína, kosmetika

KEYWORDS

humic acids, medicine, cosmetics

ŠMÍDOVÁ, H. *Průzkum aplikací huminových kyselin v medicíně a kosmetice*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2009. 37 s. Vedoucí bakalářské práce doc. Ing. Miloslav Pekař, CSc.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citovala. Bakalářská práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího bakalářské práce a děkana FCH VUT.

.....
podpis

PODĚKOVÁNÍ

Velmi děkuji doc. Ing. Miloslavu Pekařovi, CSc. za podnětné rady, vstřícnost a velkou trpělivost při vedení mé bakalářské práce. Zároveň děkuji kolektivu laborantek za pomoc během experimentální části této práce.

OBSAH

1	Úvod.....	7
1.1	Charakterizace huminových látek.....	7
1.1.1	Nehuminové látky	7
1.1.2	Huminové látky	7
1.2	Historie huminové chemie	7
1.3	Vznik HS.....	8
1.3.1	Ligninová teorie	9
1.3.2	Polyfenolová teorie	9
1.4	Struktura HS.....	10
1.4.1	Srovnání HA a FA.....	11
1.4.2	Supramolekulární struktura HS	11
1.4.3	Huminové kyseliny	11
1.4.4	Fulvinové kyseliny	13
1.4.5	Huminy.....	13
2	Lékařské aspekty a použití huminových látek	14
2.1	Historické souvislosti.....	14
2.2	Buňka jako základní stavební jednotka.....	15
2.2.1	Enzymy	15
2.2.2	Vitamíny.....	15
2.2.3	Volné radikály a antioxidanty	16
2.3	Farmakologické účinky huminových látek	16
2.3.1	Antivirová aktivita	16
2.3.2	Protizánětlivé účinky HS.....	18
2.3.3	Vliv HS na krevní srážlivost a fibrinolýzu	19
2.3.4	Estrogenová aktivita.....	20
2.4	Použití huminových látek ve veterinárním lékařství	20
2.5	Použití huminových látek v kosmetice	20
2.6	Huminové látky a životní prostředí.....	20
2.6.1	Mutagenita	21
2.6.2	Toxikologické studie kombinací HA s tenzidy	21
2.6.3	Ochrana před ionizujícím zářením	22
2.6.4	BDF onemocnění	23
3	Experimentální část.....	24
3.1	Izolace huminových kyselin	24
3.1.1	Technické huminové kyseliny.....	24
3.1.2	Čisté huminové kyseliny	24
3.2	Charakterizace huminových kyselin	25
3.2.1	Proměření IČ spektra huminových kyselin v tabletě z KBr	25
3.2.2	Proměření UV/VIS spektra huminových kyselin	25
3.2.3	Stanovení vlhkosti a popela ve vzorcích huminových kyselin.....	25
3.2.4	Elementární analýza	25
4	Diskuze a závěry.....	26

5	Použitá literatura.....	29
6	Seznam použitých zkratk a symbolů	31
7	Seznam příloh	32
8	Přílohy	33

1 ÚVOD

1.1 Charakterizace huminových látek

Mnoho schopností a vlastností půdy závisí na obsahu organického materiálu v půdě (SOM – soil organic matter) a zejména na obsahu huminových látek (HS). Je jednoznačně prokázáno, že huminové látky plní v půdě základní čtyři funkce: akumulární, zásobovací, regulační a ochrannou. Živé organismy, ať už během svého života, ale především po smrti, uvolňují do svého okolí rozkladem tkání mnoho organických látek. Tyto látky následně podléhají chemické a mikrobiologické přeměně za vzniku humusu. Název huminových látek a kyselin je odvozen právě od slova humus. Tato temně zbarvená organická hmota nalézající se na zemském povrchu představuje složitý heterogenní komplex sloučenin, které lze rozdělit na dvě základní skupiny. [3, 8, 18]

- nehuminové látky
- huminové látky

1.1.1 Nehuminové látky

Mezi látky nehuminového charakteru patří téměř všechny biochemické složky původního materialu, které lze přesně chemicky určit. Jsou to např. proteiny, peptidy, aminokyseliny, tuky, vosky, sacharidy, nukleové kyseliny, pryskyřice, pigmenty a jiné nízkomolekulární látky. Tyto sloučeniny jsou lehce napadnutelné mikroorganismy a mají poměrně krátkou životnost. Mohou také dále vstupovat do procesu humifikace. [8, 18]

1.1.2 Huminové látky

Huminové látky jsou s největší pravděpodobností nejrozšířenější organické přírodní sloučeniny na zemském povrchu. Tento materiál patří mezi nejaktivnější komponenty půdy, jeho vlastnosti závisí na stáří a stupni humifikace, tzn. na stupni prouhelnění organické substance. Huminové látky obsahují přibližně čtyřikrát více uhlíku než většina živých organismů. Podle rozpustnosti dělíme půdní HS na huminové kyseliny (HA – humic acids), fulvokyseliny (FA – fulvic acids) a nerozpustné huminy. Akvatické HS se jako významná frakce rozpuštěné organické hmoty (DOM – dissolved organic matter) dělí pouze na HA a FA. Obecně můžeme HS popsat jako kyselou, vysokomolekulární, amorfni směs různých více či méně degradovaných molekul. Čím hlubšímu rozkladu podlehly, tím tmavěji jsou vzniklé produkty zbarveny. [3, 8, 18]

1.2 Historie huminové chemie

První zdokumentovaný pokus o izolaci huminových látek provedl v roce 1786 německý chemik Achard, který zkoumal rašelinu a zavedl první metody izolace a klasifikační schémata. Při působení na rašelinu alkalickým roztokem a následném okyselení byla získána tmavá amorfni hmota, která se jevila v alkalickém prostředí rozpustná a v kyselém prostředí nerozpustná. Pro tento organický materiál byl zaveden termín “Huminstoffe”, v překladu huminové látky. Během svého výzkumu také zaznamenal vyšší hmotnostní výnosy při práci s rašelinou vytěženou z větší hloubky oproti materiálu z vyšších, méně humifikovaných vrstev půdy. [15, 18]

Se známým pojmem humus je spojován švýcarský vědec De Saussure. Popisuje humus jako tmavě zbarvený organický materiál obsažený v půdě a zjistil, že tento materiál je bohatší na obsah uhlíku a zároveň chudší na obsah vodíku a kyslíku než materiál, ze kterého humus vzniká. [15]

První rozsáhlé studie o původu a chemické povaze huminových látek vypracoval v letech 1826 – 1837 německý vědec Sprengel. Mnoho postupů, které objevil, a které vedou k preparaci huminových látek, je dodnes akceptováno a používáno. Jedná se například o okyselení vzorku půdy před samotnou alkalickou extrakcí. Největším přínosem v huminové chemii je jeho studie kyselé povahy huminových kyselin. [15]

Významným přínosem byla práce švédského vědce Berzelia a následně jeho žáka Muldera. Berzelius rozdělil huminové látky do třech skupin podle jejich rozpustnosti a chemických vlastností. Toto rozdělení bylo Mulderem později upraveno na základě rozpustnosti v alkáliích a vodě a také na barevnosti huminových látek na tři skupiny: [15, 18]

- krenické a apokrenické kyseliny (dnes nazývány fulvokyseliny, žlutě až hnědě zbarveny, rozpustné ve vodě v celém rozsahu pH)
- huminové a ulminové kyseliny (hnědě až černě zbarvené, rozpustné v zásadách a nerozpustné v kyselinách)
- huminy a ulminy (nerozpustné ve vodě, kyselinách ani zásadách)

V roce 1889 izoloval Hoppe-Seyler extrahováním HA v alkoholu další skupinu huminových látek, kterou nazval hymatomelanové kyseliny. Mají oproti HA světlejší barvu a obsahují více uhlíku. [15]

Nelze přehlédnout ani Odenovu práci. Zasloužil se o revizi klasifikace HS, poukázal na koloidní charakter huminových látek. Ve své práci označil huminové látky rozpustné ve vodě jako fulvokyseliny a jeho členění HS na HA, FA a huminy je platné dodnes. Objevil význam HS v transportu látek v akvatických systémech a označil je jako hlavní faktor určující zbarvení vody. [15, 18]

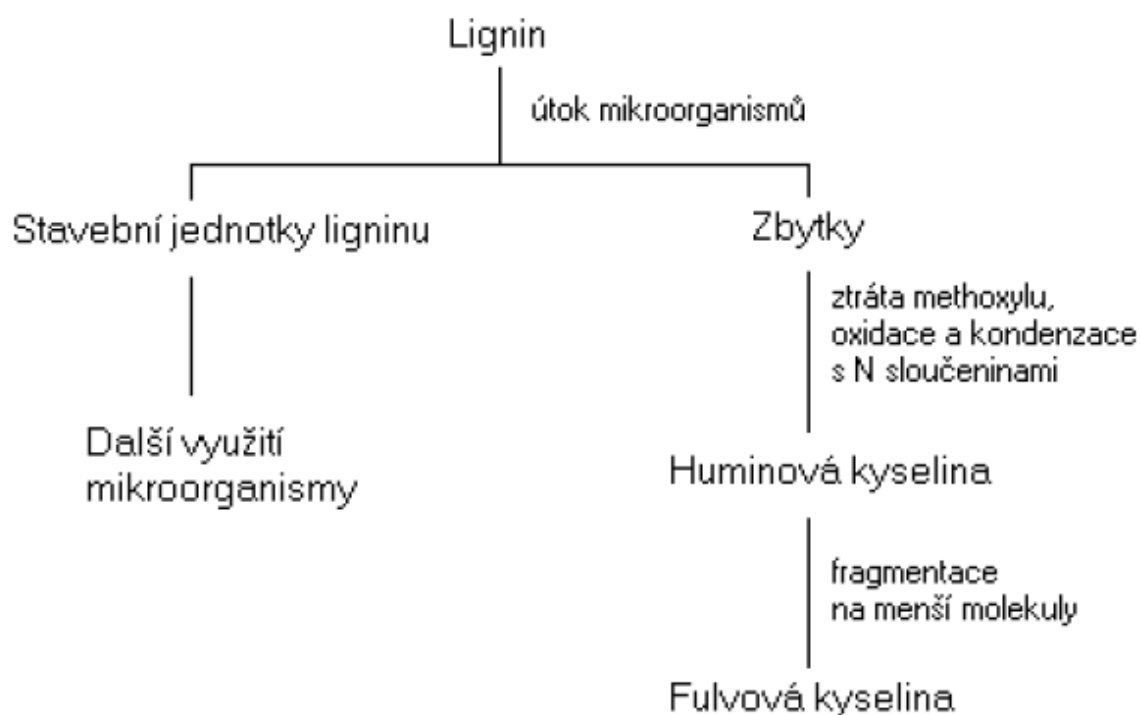
V roce 1981 došlo k založení International Humic Substance Society (IHSS – Mezinárodní asociace pro huminové látky) za účelem sjednocení vědců z mnoha oborů se zájmem o výzkum HS. Mezi cíle IHSS patří shromažďování standardních vzorků HA a FA z půdy, vody a lignitu a kompletace jejich charakterizujících dat. Poskytuje také referenční vzorky jako materiál pro výzkum a pořádá mezinárodní konference. [18]

1.3 Vznik HS

Huminové látky představují specifickou skupinu vysokomolekulárních a nízkomolekulárních látek tmavé barvy. Vznikají v procesu rozkladu organických zbytků v půdě, to znamená v procesu jejich humifikace. [2] Proces humifikace, potažmo vznik huminových látek představuje sled mnoha biochemických reakcí. Samotný proces humifikace je předmětem mnoha spekulací a existuje hned několik teorií, jak by mohl proces probíhat. Mezi nejznámější patří následující dvě teorie.

1.3.1 Ligninová teorie

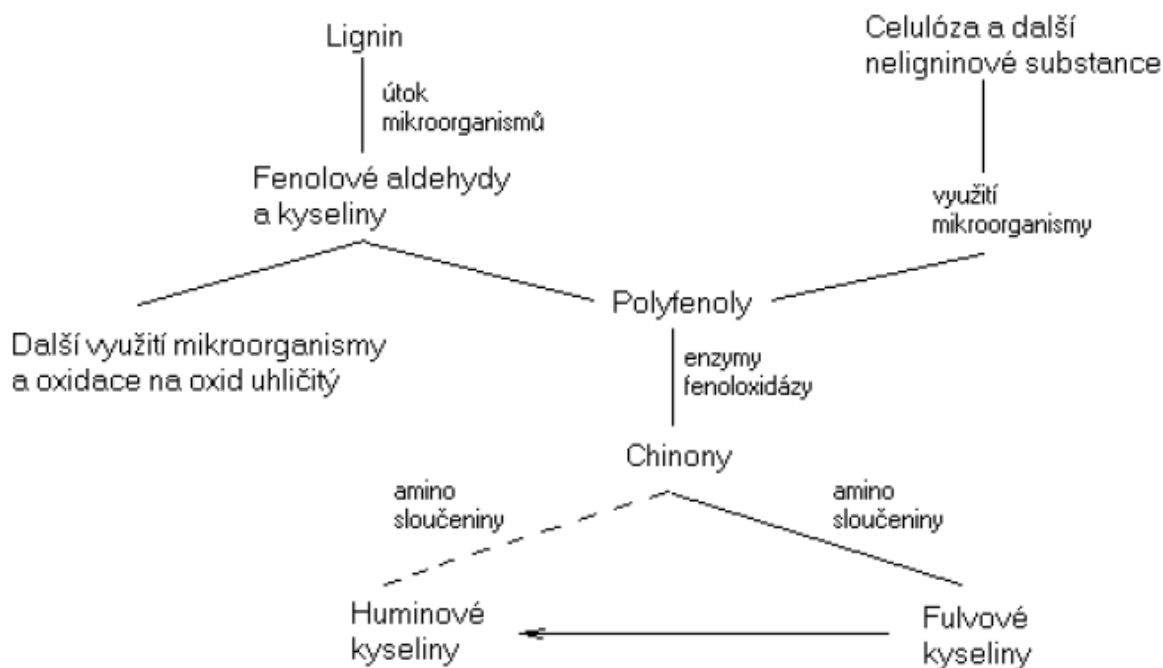
Sledování rozpadu různých rostlinných složek naznačuje, že nejsnáze humifikaci podléhají látky rozpustné ve vodě, pentosany a celulóza. Lignin je rezistentní a hromadí se ve zbytcích rostlinného materiálu za postupné ztráty methoxylových skupin $-\text{OCH}_3$, dále dochází k produkci o-hydroxyfenolů a oxidaci alifatických stran řetězce za vzniku karboxylových skupin $-\text{COOH}$. Také se předpokládá, že lignin při oxidaci reaguje s amoniakem za vzniku produktů, ve kterých se dusík stává součástí cyklických forem. Tyto skutečnosti vedly Fischera a Schadera k závěru, že výchozí látkou pro vznik huminových kyselin byl lignin a svou teorii podepřeli i experimentálně. [8] Tuto teorii znázorňuje obrázek 1.



Obr. 1 Ligninová teorie [8]

1.3.2 Polyfenolová teorie

Polyfenolová teorie postupně nahradila předchozí teorii ligninovou. I zde hraje lignin stále důležitou úlohu, pouze však jiným způsobem. Kyseliny a fenolové aldehydy, uvolněné z ligninu působením mikroorganismů, následně projdou enzymatickou přeměnou na chinony. Ty polymerizují v přítomnosti aminokyselin, ale i bez nich, za vzniku huminových makromolekul. Polyfenoly mohou být syntetizovány mikroorganismy i ze zdrojů neobsahujících lignin. Polyfenoly přejdou enzymatickou oxidací na chinony a následně jsou přeměněny na huminové látky. [8] Polyfenolovou teorii ilustruje obrázek 2.



Obr. 2 Polyfenolová teorie [8]

1.4 Struktura HS

Huminové látky jsou děleny podle rozpustnosti ve zředěných alkalických roztocích na tři frakce: huminové kyseliny, fulvinové kyseliny a huminy. Pokud jde o zastoupení uhlíku, vodíku a kyslíku v huminových látkách, můžeme se setkat jak s hmotnostním procentuálním zastoupením jednotlivých prvků (viz následující podkapitoly), tak i s atomovými poměry indukujícími humifikační status. Poměr H/C se ve vzorku HS může pohybovat od hodnoty mírně klesající pod 1 až do 2. Poměr O/C se může pohybovat od 0 do 2 a bude vyšší v mokřém prostředí.



Obr. 3 Rozdělení huminových látek podle Stevensona [8]

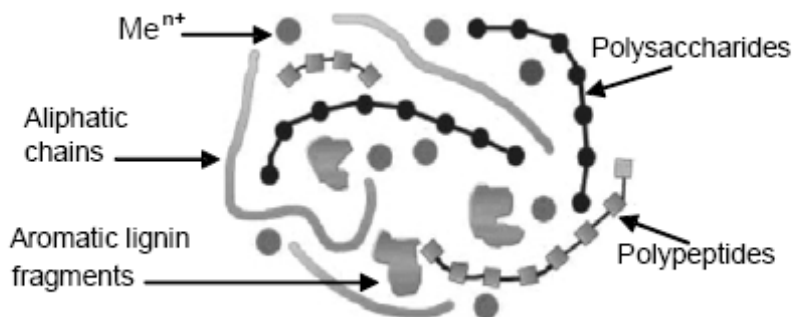
1.4.1 Srovnání HA a FA

- HA obsahují větší množství C, H, N a S a přibližně stejné množství O v porovnání s FA
- HA obsahují méně $-\text{COOH}$ skupin, fenolických OH skupin a $\text{C}=\text{O}$ skupin vázaných v ketonu a více chinoidních $\text{C}=\text{O}$ skupin oproti FA
- HA jsou přibližně dvakrát aromatictější než FA

Zatímco názory na modelové struktury HA a FA se různí, v názoru na teoretickou podobu molekuly huminových látek se vědecká společnost spíše shoduje s tím závěrem, že zřejmě neexistují žádné dvě molekuly HS, které by byly totožné. Chování, vzhled a vlastnosti HS se mohou měnit v závislosti na hodnotě pH a iontové síle, které jsou vystaveny. [11, 18]

1.4.2 Supramolekulární struktura HS

HS akvatického původu se při nízkých koncentracích vyskytují v podobě iontů, při vyšších koncentracích začínají tvořit koloidy. Agregace a disagregace má dopad na biochemické vlastnosti HS a jejich biologickou aktivitu. Struktura HS byla studována za pomoci metody multi-dimensionální NMR. Podle této metody jsou HS popisovány jako makromolekulární agregáty složené ze směsi organických sloučenin o nízké relativní molekulové hmotnosti (< 2 kDa), např. alifatických kyselin, etherů, esterů, alkoholů, aromatických derivátů ligninu, polysacharidů a polypeptidů. Směs těchto sloučenin drží pohromadě díky kombinaci můstkových vazeb, hydrofobních a vodíkových vazebných interakcí a interakcí schopných přenášet náboj. Za dominantní jsou považovány hydrofobní vazebné interakce, což by vysvětlovalo změny ve velikosti agregátů v závislosti na hodnotě pH prostředí. [1, 16]



Obr. 4 Struktura HS dle Simpsona. Agregát tvoří komponenty o nízké relativní molekulové hmotnosti v přítomnosti kationtů kovů [1]

1.4.3 Huminové kyseliny

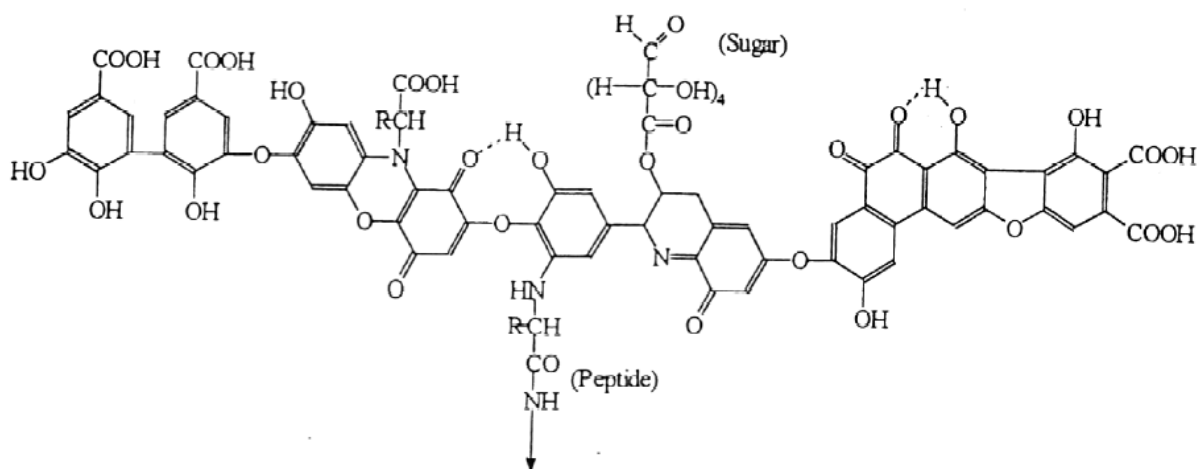
Hmotnostní zastoupení prvků se pohybuje pro uhlík v rozmezí 53,8 – 58,7 %, pro vodík v rozmezí 3,2 – 6,2 %, pro kyslík v rozmezí 31,8 – 51,9 % a pro dusík v rozmezí 0,8 – 4,3 %. Velmi zajímavé je zjištění, že vzorky HA izolované z různých zdrojů (prostředí lesa, pastviny, podzolovité půdy...) a výsledky z různých nezávislých výzkumů vykazují velmi podobné empirické vzorce. Výsledný empirický vzorec: $\text{C}_{36}\text{H}_{30}\text{N}_2\text{O}_{15} \cdot x\text{H}_2\text{O}$, kde x nabývá hodnotu 0 až 15. [3, 17]

Ve své molekulové struktuře mají zabudovány jak hydrofilní, tak i hydrofobní oblasti, proto se lehce sorbují na povrchu částic. Základní složkou strukturních jednotek HA je aromatické jádro fenolického nebo chinoidního typu s účastí dusíkatých sloučenin, jak cyklických, tak alifatických. V důsledku toho mají vliv na takové procesy jako je rozpustnost a schopnost koagulace. Mají acidobazické vlastnosti v široké oblasti pH a řadu fyzikálně-chemických vlastností, jako jsou agregační schopnosti, redoxní schopnosti, vážou ionty kovů, citlivě reagují na světlo a jsou povrchově aktivní. [3, 8]

Pro určení chemické struktury huminových kyselin je velmi užitečná tzv. analýza absorpčních poměrů. Absorpční poměr $A(280\text{ nm})/A(465\text{ nm})$ reflektuje proporcii mezi lignitovými strukturami odolnými vůči humifikaci a množstvím lignitu; poměr $A(280\text{ nm})/A(665\text{ nm})$ reflektuje poměr mezi lignitovými strukturami odolnými vůči humifikaci a strukturami, které silně podléhají humifikaci. Poměr $A(465\text{ nm})/A(665\text{ nm})$ (označován jako $E_{4/6}$) je nejčastěji používaný jako tzv. humifikační index. Tento poměr $A(465\text{ nm})/A(665\text{ nm})$ pro huminové kyseliny je obvykle menší než 5,0 a snižuje se s rostoucí molekulovou vahou a stupněm disperzity. Nízký poměr může značit relativně vysoký podíl aromatických částic a naopak vysoký poměr ukazuje na nízký obsah aromatických částic a relativně vyšší obsah alifatických struktur. Zároveň byl pozorován inverzní vztah mezi tímto poměrem a odolností huminového materiálu. Z toho vyplývá, že huminový materiál s nejvyšším koeficientem $E_{4/6}$ má nejnižší odolnost, a zároveň že více humifikované a více kondensované (aromatické) substance jsou staršího původu.

Předpokládaná struktura huminových kyselin obsahuje mnoho intramolekulárních i intermolekulárních vazeb. Ty způsobují zvýšení jejich stability a umožňují tvorbu sekundárních a terciárních struktur. Huminové molekuly představují náhodně stočené polymery, kde jsou hlavními faktory řídicími molekulovou konformaci koncentrace huminových látek, iontová síla a pH. Při vysokých koncentracích, nízkém pH a vysoké iontové síle mají globulární charakter, naopak při neutrálním pH, slabé iontové síle a nižších koncentracích mají charakter flexibilních lineárních koloidů. [15]

Existuje poměrně velké množství teoretických modelů huminových kyselin, na obrázku 5 je model Stevensonův.

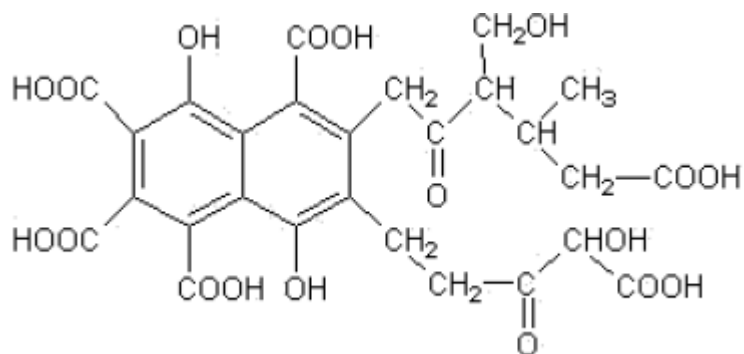


Obr. 5 Modelová struktura HA dle Stevensonova [15]

1.4.4 Fulvinové kyseliny

Hmotnostní zastoupení prvků se pohybuje pro uhlík v rozmezí 40,7 – 50,65 %, pro vodík v rozmezí 3,8 – 7 %, pro kyslík v rozmezí 31,8 – 51,9 % a pro dusík v rozmezí 0,9 – 3,3 %. [17]

I pro strukturu fulvinových kyselin existuje několik teoretických modelů, na obrázku 6 je model Weberův.



Obr. 6 Modelová struktura FA dle Webera [19]

1.4.5 Huminy

Huminy jsou látky nerozpustné ve zředěných alkáliích. Lze je považovat za látky cyklické struktury, podobné huminovým kyselinám, neobsahují však karboxylové a hydroxylové skupiny. Po chemické stránce jsou huminy směsí látek především aromatického charakteru, obsahujících alkyl skupiny na bočních řetězcích. Z funkčních skupin zde byly prokázány pouze karbonylové skupiny. Alkalické roztoky jsou velmi citlivé vůči oxidaci. [9]

2 LÉKAŘSKÉ ASPEKTY A POUŽITÍ HUMINOVÝCH LÁTEK

Huminové látky jsou důležitou biochemickou součástí zemského povrchu. Kromě již tradičního použití HS jako paliv a organických hnojiv jsou také využívány jako výchozí látka s využitím ve zdravotnictví a při výrobě některých specializovaných průmyslových výrobků. Různé typy polymerů HS mají několik společných vlastností, které jim umožňují komunikovat s ostatními biopolymery, stejně jako s organickými a anorganickými sloučeninami o malé molekulové hmotnosti. Huminové kyseliny vstupují do mnoha životních procesů jak u rostlin, tak u živočichů. Jejich úkol spočívá v odstraňování volných radikálů, zvyšují využití a transport živin, katalyzují enzymatické reakce, stimulují metabolismus, podílejí se na chelataci (pevným vázáním iontů těžkých kovů) hlavních i stopových prvků.

Tato kapitola bude zaměřena na použití HS v humánní a veterinární medicíně, aspektech jejich vlivu na životní prostředí a zdraví, dále také na možnosti vytváření biopolymerů z HS a na jejich případné další využití a aplikaci.

2.1 Historické souvislosti

Nejvýznamnějším zdravotnickým použitím HS je nepochybně balneoterapeutické využití rašeliny s ohledem na její terapeutické spektrum a tradici. Hojné využití rašeliny bylo zaznamenáno již v Babylónské a Římské říši. Tradičními oblastmi využití léčebných účinků HS byla gynekologická a revmatická onemocnění. Dnes jsou hojně využívány též v dermatologii a kosmetice. Vedle bahenních koupelí, jejichž účinky spočívají ve vnějším použití rašeliny, se rašelinný materiál používá i ve formě nápojů jako pitná kůra, zejména v případě vnitřních zažívacích a jaterních chorob. V následující tabulce jsou shrnuty nejčastější indikace rašelinové terapie.

Tabulka 1 Vybrané indikace rašelinové terapie a její efekty

Onemocnění	Indikace	Hlavní léčebný účinek
Svalová onemocnění	Degenerativní a deformující artróza Dna Spondylopatie Bechtěrejevova nemoc Osteoporóza Svalový revmatismus Revmatoidní artróza (polyartritis) Rehabilitace pooperačních stavů a úrazů	Hloubková hypertermie zlepšuje cirkulaci krve a regeneruje postižené procesy
Gynekologická onemocnění	Chronická zánětlivá onemocnění Hormonální nerovnováha Bolest v kříži Srůsty gynekologické povahy Sterilita Klimakterické komplikace	Hloubková hypertermie Estrogenová terapie a podpoření endogenní produkce estrogenu Profylaxe trombózy (profibrinolytický efekt)

Kožní onemocnění	Chronický ekzém Neurodermatitida Lupénka (psoriasis)	Aktivace kožního metabolismu a regeneračních procesů, zlepšení krevní cirkulace
------------------	--	---

Tyto diagnózy zahrnují různé poruchy pohybového aparátu, gynekologická a kožní onemocnění. Naopak akutní zánětlivá a infekční onemocnění, onemocnění srdce a cév, stavy po mozkových příhodách a stavy po onkologických operacích jsou obvykle považovány za kontraindikaci tohoto způsobu léčby. Primárním efektem vysokých teplot při rašelinové terapii je unikátní hloubková hypertermie, která zlepšuje krevní oběh, posiluje imunitní systém, poskytuje celkové uvolnění svalů a podporuje regenerační léčebné procesy. Koupele zmírňují záněty, zlepšují pohyblivost a detoxikují organismus. Rašelinové terapie však vykazují léčebné účinky i při nízkých teplotách. Bellomettimu (1977) se jeho studiemi podařilo prokázat příznivý vliv bahenní lázně na léčbu degenerativních onemocnění pohybového aparátu, konkrétně osteoporózy a revmatických onemocnění. Bylo prokázáno, že léčba pozitivně ovlivnila hladinu chondrocytů, interleukinu-1 (IL-1) a TNF- α . Iubitskaia a Ivanov (1999) jasně prokázali značný přínos HA v balneoterapii při léčbě osteoartritidy. Při používání humátu sodného namísto rašeliny byly zjištěny protizánětlivé a lipidomodulační účinky, procedury se sodnými humáty jsou navíc pacienty obvykle velmi dobře snášeny.

2.2 Buňka jako základní stavební jednotka

Naše tělo se skládá z desítek bilionů buněk a každou buňku tvoří množství hlavních, vedlejších a stopových prvků. Jednotlivé buňky, pokud jsou řádně vyživovány, jsou schopné produkovat mnohé ze svých vlastních aminokyselin, enzymů a dalších látek, nezbytných pro metabolické procesy. Kromě dalších procesů každá buňka vyrábí své vlastní enzymy, své vlastní proteiny a dělí se. Je nezbytné pochopit, že celý metabolismus těla je sumou metabolických činností, probíhajících v každé jednotlivé buňce.

2.2.1 Enzymy

Enzymy fungují jako katalyzátor, nevstupují do reakce, ale urychlují ji nebo umožňují její uskutečnění. Enzymy jsou složité proteiny a každá buňka v těle, pokud je správně vyživována, je schopna produkovat enzymy nezbytné pro úplný metabolismus. Výzkum prokázal, že huminové sloučeniny zlepšují enzymatické reakce v buňkách a stimulují jejich vývoj.

2.2.2 Vitamíny

Díky povědomí o úloze vitamínů v naší stravě se v tomto století dramaticky snížil výskyt běžných onemocnění způsobených nedostatkem vitamínů. Je nutné poznamenat, že vitamíny nejsou schopné uskutečnit svou úlohu v buněčném metabolismu bez přítomnosti určitých minerálů. To by mohlo vysvětlovat příznivé účinky huminových a fulvinových kyselin na živé organismy. Tyto sloučeniny dovedou vázat kovy a minerály v biologicky absorbovatelné formě, kterou mohou buňky podle potřeby využít.

2.2.3 Volné radikály a antioxidanty

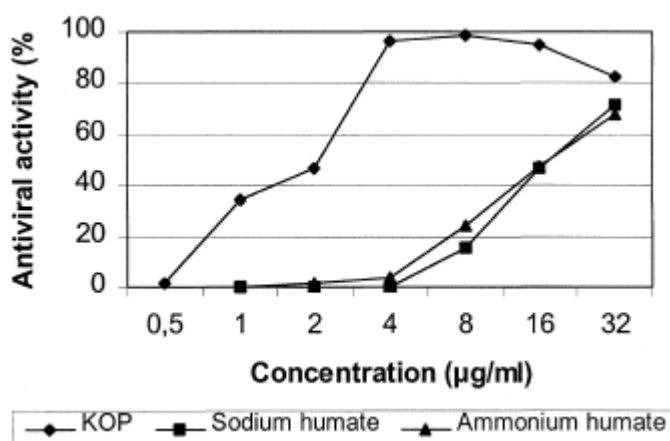
Volné radikály jsou vysoce reaktivní molekuly, které obsahují jeden nebo více nepárových elektronů, kolují v našem organismu, vážou se na tkáně nebo je přímo poškozují. Přítomnost volných radikálů může také zvyšovat riziko zmutování či napadení buněk nejrůznějšími infekcemi. Většinu volných radikálů tvoří radikály kyslíku. Možnou obranou proti všudypřítomným volným radikálům mohou být huminové látky ve funkci antioxidantů. Huminové látky dovedou vytvářet chelátové sloučeniny s těmito radikály, tím je inaktivovat. Tyto sloučeniny jsou následně buď začleněny nebo z těla vyloučeny.

2.3 Farmakologické účinky huminových látek

Navzdory převážně pozitivním zkušenostem s balneoterapeutickou rašelinovou terapií je k dispozici pouze omezené množství poznatků o fyziologických a farmakologických účincích rašelinných složek. Přesto se znalosti biologických účinků HA s ohledem na jejich antivirovou aktivitu, interakci s enzymy, účinky na srážlivost krve a fibrinolýzu, estrogenovou aktivitu a toxikologicky významné interakce s ekologicky škodlivými látkami, během posledních několika desetiletí značně rozšířily. [5]

2.3.1 Antivirová aktivita

Studie antivirových účinků byly započaty po zjištění pozitivních dopadů HS při léčbě slintavky a kulhavky. In-vitro studie s virem Cocksackie A9, chřipkovým virem typu A a virem herpes simplex typu 1 (HSV-1) ukázaly, že HA jsou účinné proti oběma typům DNA virů, obnaženému i obalenému. To samé platí i pro syntetické HA pocházející z polyfenolických sloučenin, které jsou, pokud se jedná o některé účinky, vhodnější než přírodní HA. Jeden z nejaktivnějších antivirových syntetických polymerů je produkt oxidace kyseliny kávové, KOP, jehož účinek na HSV-1 virus in-vitro v porovnání s přirozeně se vyskytujícími HA v rašelině je znázorněn na obrázku 7.



Obr. 7 Antivirová aktivita KOP, humátu sodného a humátu amonného na virus HSV-1.

Další zkoumání potvrdila schopnost polymerů typu HA selektivně inhibovat činnost virů způsobujících oslabení lidské imunity, viru HIV-1, HIV-2, cytomegaloviru (CMV) a virů běžně aplikovaných při očkování. Naopak inhibice nebyla prokázána u polioviru typu 1 (virus dětské obrny), Semliki forest viru, parainfluenza viru typu 3, reoviru typu 1 a Sindbis viru. U adenoviru typu 2 a ECHO viru typu 6 byla sledována malá či žádná reakce na přírodní HA. V tabulce 2 je uveden souhrn testovaných polymerů a jejich selektivní antivirový efekt – hodnoty IC_{50} (poloviční hodnota maximální inhibiční koncentrace) a hodnoty CC_{50} (poloviční hodnota maximální cytotoxické koncentrace). U většiny virů se inhibiční účinek HA a polymerů typu HA projevuje hned v počáteční fázi replikace viru, kdy se virus s buňkou spojuje. Z hlediska mechanismu procesu se zdá, že polyanionické HA okupují či obsazují kladně nabitě glykoproteinové části obalující virus, které jsou nezbytně nutné pro uchycení se viru na povrchu buňky.

Tabulka 2 *Hodnoty CC_{50} a hodnoty IC_{50} pro vybrané HA a polymery HA-typu*

Testovaná látka	Molekulová hmotnost [Da]	Výchozí látka	CC_{50} [μ g/mL]	IC_{50} [μ g/mL]
BOP	5 300	Catechol	69	26
3,4-DHTOP	3 800	3,4-Dihydroxytoluene	> 128	42
POP	8 000	Protocatechuic acid	70	9,6
3,4-DHPOP	6 000	3,4-Dihydroxyphenylacetic acid	> 128	9,6
HYKOP	6 000	Hydrocaffeic acid	> 128	8,0
KOP	6 000	Caffeic acid	> 64	2,3
CHOP	14 000	Chlorogenic acid	> 128	6,4
HYDROP	5 200	Hydroquinone	> 128	3,7
2,5-DHTOP	4 700	2,5-Dihydroxytoluene	> 128	1,6
GENOP	5 500	Gentisinic acid	> 128	2,2
2,5-DHPOP	5 500	2,5-Dihydroxyphenylacetic acid	> 256	0,7
2,5-DHBQOP	3 400	2,5-Dihydroxybenzoquinone	> 512	322
Humát sodný	7 500	neznámá	> 128	18,2
Humát amonný	7 900	neznámá	108	17,8

Efekt HA a polymerů HA-typu byl potvrzen ve fázi replikace herpes viru při experimentech prováděných na zvířatech. Počet poškození rohovky virem HSV-1 sledovaný u infikovaných králíků se výrazně snížil po aplikaci syntetické HA, konkrétně 1 % roztoku KOP do spojivkového vaku oka, ovšem pouze pokud byla aplikace HA provedena současně nebo bezprostředně po kontaktu oka s činitelem infekce. Aplikace KOP neměla na zlepšení stavu žádný efekt byla-li podána s odstupem 1, případně 24 hodin později. Současná pozornost směřuje k prozkoumání profylaktických účinků substancí HA-typu na opětovně se opakující HSV infekce. Bylo prokázáno, že lokální aplikace KOP výrazně snižuje nebo dokonce zcela potlačí experimentálně vyvolanou herpesvirózu pozorovanou

v uchu infikovaných myší. Na základě těchto trvajících účinků se předpokládá, že by mohl být mechanismus procesu objasněn.

U polymerů HA-typu s nízkou molekulovou hmotností (HS 1500, M.W. = 1500 Daltonů) syntetizovaných z hydrochinonu, byla zjištěna silná in-vitro inhibice viru HIV-1. Předmětem zájmu je především proces penetrace viru do hostitelské buňky. HS 1500 prošlo řadou klinických testů, včetně testu na podráždění očí dle Draize a testování rizika potratu prováděného na krysách. Nebyla zjištěna ani přecitlivělost, ani podráždění až do koncentrace 10 % HA.

SP-303 je další fenolický polymer s antivirovými účinky, podařilo se ho izolovat z keře rodu Euphorbiaceae. Tento polymer inhibuje činnost řady respiračních virů jako např. chřipkového viru typu 1, RS viru a chřipkového viru typu A a B. Studie ukázaly, že SP-303 alespoň částečně inaktivuje viry přímou interakcí nebo pomocí hostitelských buněk lipidových membrán. SP-303 v antivirové koncentraci nevyvolává interferonovou či inhibiční vazbu s virem, přesto zabraňuje penetraci RS viru do hostitelské buňky. SP-303 bylo podáváno ve formě malých aerosolových částic v dávce 0,5 – 9,4 mg/kg/den po dobu 3 až 4 dnů myším infikovaným chřipkovým virem typu A/HK a krysám infikovaným virem RS. S rostoucí dávkou rostlo i množství a doba přežití infikovaných hlodavců. Výsledky ukázaly, že HS jsou slibnými kandidáty, spíše však než pro terapeutické, pro profylaktické použití při léčbě virových onemocnění. [5]

Při průzkumu antivirové aktivity syntetických polymerů HA-typu na viru HSV-1 bylo zjištěno, že produkty p-difenolických sloučenin jsou v boji proti HSV-1 viru efektivnější než odpovídající produkty o-difenolických sloučenin. Nejvyšší antivirová aktivita byla sledována u polymeru 2,5-DHPOP. [6]

2.3.2 Protizánětlivé účinky HS

Různé léčebné účinky rašelinové terapie jsou znakem značné protizánětlivé aktivity HS. Taugner (1963) ukázal na modelu edému na tlapkách krys, že humát sodný výrazně zpomaluje vývoj různých druhů edémů oproti stavu bez aplikace humátu. Jak zjistila Klöcking (1968) na stejném modelu, humát amonný izolovaný z rašelinových vod převýšil protizánětlivý účinek humátu sodného a zhruba dvakrát převýšil účinek kyseliny acetylsalicylové a aminophenazonu. Amosova (1990) při svém výzkumu zjistila, že aplikace HA (10 mg/kg) způsobuje potlačení obou fází zánětlivého procesu: fázi sekrece (o 44 %) i fázi šíření (o 50 – 55 %).

Protizánětlivé účinky HS byly podloženy biochemickými výzkumy. Jak demonstroval Schewe (1991), přírodní HA a ještě lépe polymery HA-typu jsou schopny inhibovat lipoxigenázovou cestou činnost AA sloučenin (sloučeniny odvozené od kyseliny arachidonové). AA sloučeniny jsou nedílnou součástí buněčných membrán a zároveň zdrojem pro syntézu mediátorů zánětu na bázi eicosanoidu, např. leukotrienů, tromboxanů a prostacyklinu. U HA stejně jako u většiny polymerů HA-typu, byla zjištěna schopnost potlačit činnost AA sloučenin, které uvolňují lidské promonocytické buňky U937. Inhibice uvolnění AA byla nejvíce patrná v buňkách ošetřených netoxickou koncentrací (20 µg/mL) 3,4-DHPOP (96 %) a 3,4-DHTOP (92%).

Tabulka 3 *Vliv přírodních HA a polymerů HA-typu na % uvolnění AA (42°C, 6 h) z buněk U937, přičemž procento uvolnění AA z neošetřených buněk je 100 %*

Polymer	MEC [µg/mL]	množství uvolněného AA [%]
Humát sodný	80	26,5 ± 8,9
BOP	160	10,1 ± 14,2
3,4 – DHTOP	20	8,1 ± 10,1
3,4 – DHPOP	20	4,3 ± 2,4
KOP	40	18,1 ± 7,1
CHOP	80	34,9 ± 12,6

CHOP, humát sodný, KOP a BOP chrání buňky před poškozením v 65 – 90% případů. Tato zjištění by mohla být směrodatná pro výzkum sloučenin HA-typu z hlediska ochrany membrán.

Na rozdíl od 5-lipoxygenázy a fosfolipázy A₂ (prasečí pankreas), klíčový enzym regulující AA je silně aktivován nízkou koncentrací HA (0,1 – 1 µg/mL) a slabě inhibován vysokými koncentracemi HA.

Zatím je známo jen málo o vlivu molekulové hmotnosti frakce HS na zánět. Syntetický nízkomolekulární HS 1500 (polymer HA-typu) reaguje na zánětlivou aktivitu a je schopen aktivovat lidské neutrofile a uvolňování protizánětlivých cytokinů např. TNF-α. Liang (1998) během výzkumu králičích chondrocytů zaznamenal prodloužení jejich životnosti při použití ethylacetátových komerčních HA značky Aldrich (100 – 500 µg/mL). Poškození těchto buněk jsou připisována na prvním místě superoxidovým radikálům O₂^{•-}, které postupně přechází na H₂O₂, čímž je započata lipidová peroxidace následovaná buněčnou nekrózou. S odvoláním na funkci HS jako donor-akceptujícího systému se Jursik (1994) domnívá, že schopnost HA produkovat stejně jako vázat aktivovaný kyslík, by mohla být důležitým regulačním systémem HS při případném léčení a ničení rakovinových buněk. [5]

2.3.3 Vliv HS na krevní srážlivost a fibrinolýzu

Je zaznamenáván příznivý vliv rašelinové terapie při léčbě, rehabilitaci a prevenci zánětlivých stavů vejcovodů a vaječníků. Jedná se především o pooperační stavy, kdy je zpomalena degradace fibrinu – fibrinolýza. Mesroglí (1988) aplikoval po laparotomii krys pooperační rašelinové koupele pro jejich čisticí a adhezně-inhibiční účinky. Možným vysvětlením by mohla být huminovými kyselinami zapříčiněná degradace fibrinu, způsobená uvolněním tkáňového typu plasminogenového aktivátoru (t-PA). T-PA je považován za regulátor antitrombotického obranného mechanismu. Aktivuje přeměnu plasminogenu na plasmin, který spustí degradační přeměnu nerozpustného fibrinu na rozpustný fibrinogen. HA také inhibuje činnost koagulačního enzymu trombinu, a tím potlačuje formování fibrinových monomerů z fibrinogenu. Ve srovnání s jinými polyanionickými sloučeninami (heparin, pentosanpolysulfát) byly antikoagulační účinky u HA méně výrazné. [5, 7]

2.3.4 Estrogenová aktivita

Od prvního objevení sloučenin estrogenového typu v bitumenových frakcích rašeliny byla provedena řada pokusů se snahou identifikovat povahu těchto látek. Za předpokladu, že jsou steroidní hormony odpovědné za kolpotropické vlastnosti rašeliny, dá se předpokládat, že budou chemickou analýzou velmi nesnadno potvrzeny. Studie na kastrovaných myších v ICR (Institute of Cancer Research, USA) ukázaly jak u přírodních, tak u syntetických HA pozitivní výsledky při Allen-Doisyho testu. Estrogenová aktivita u humátu sodného byla zjištěna v poměru 1/3 000 než u standardních estriolových preparátů.

2.4 Použití huminových látek ve veterinárním lékařství

Ve veterinární medicíně jsou HS úspěšně aplikovány při profylaxi a terapii gastrointestinálních nemocí u malých zvířat. Dále jsou HS využívány jako antidotum při prevenci intoxikace. HS dovedou vázat a případně metabolizovat jedy v gastrointestinálním traktu. HA jsou podávány orálně jako 20 – 30 % vodný roztok suspenze v dávkování 0,5 – 1,0 g/kg dvakrát denně po dobu 3 až 5 dní. Jak zjistil Ridwan (1977) 0,1 % koncentrace HA je dostačující ke snížení hladiny olova a kadmia a minimalizování rizika intoxikace těžkými kovy sledované u krys. Experimenty prováděné na myších ukázaly, že při orálním podání je humát olova méně toxický než acetát olova. Opačné výsledky byly obdrženy při parenterálním (intravenózním) podání stejných sloučenin. Je z toho zřejmé, že zvolený způsob použití je důležitým faktorem, zda kov vázaný na HS bude toxický či netoxický. [5]

2.5 Použití huminových látek v kosmetice

Že mají huminové kyseliny příznivé účinky na stav pleti dokumentují pokusy a závěry zaznamenané v patentu WO 9858655. Na pleti dobrovolnic byl testován krém s příměsí extraktu rašeliny a byla posuzována dvě hlediska: zlepšení hydratace pleti a redukce vrásek a hrubé pokožky.

V prvním případě bylo testováno 20 dobrovolnic ve věku 18 až 60 let s různými typy pleti a byl jim na dobu 30 minut aplikován krém s 5 % obsahem rašelinného extraktu, pokožka byla zároveň testována krémem o stejném složení, pouze bez přídavku rašelinného extraktu. U pokožky ošetřené krémem s rašelinným extraktem došlo k průměrnému zlepšení hydratace pokožky o 21,4 %, u pokožky ošetřené krémem bez rašelinného extraktu došlo ke zlepšení hydratace o 15,2 %.

V druhém případě byla testována pleť šesti žen ve věku 30 až 60 let a byl jim na oblast obličeje aplikován krém s 1 % obsahem rašelinného extraktu, pleť byla zároveň testována i krémem bez obsahu rašelinného extraktu. U pokožky ošetřené krémem s rašelinným extraktem došlo průměrně k redukci vrásek a hrubosti pleti o 29 %, u pokožky ošetřené krémem bez rašelinného extraktu došlo ke zlepšení o 14 %. [20]

2.6 Huminové látky a životní prostředí

Je nesporné, že kvalita životního prostředí má výrazný vliv na zdraví organismů. Právě proto životní prostředí tak úzce souvisí i s medicínou a kosmetikou.

2.6.1 Mutagenita

HS jsou přirozenou součástí životního prostředí, jsou přítomny i v povrchových vodách. HS jsou studovány pro svůj genotoxický potenciál, zvláště produkty chlorace a ozonizace pitné vody s obsahem HS jsou známy jako vysoce aktivní v bakteriálních genotoxických testech. Studie mutagenese prováděné na vzorcích pitné vody ukazují, že 3-chlor-4-(dichlormetyl)-5-hydroxy-(5H)-furanon (MX), jeden z hlavních meziproductů chlorace, je zodpovědný za více než 20% pozorovaných případů mutací. Naopak, in-vivo prováděné testy přinesly opačné závěry, pravděpodobně díky nestabilitě a dobré reaktivitě furanonů. Furanony se objevují v potravinách, především v důsledku Maillardových reakcí mezi cukry a aminokyselinami při zvýšené teplotě. Pro člověka jsou důležitým esenciálním antioxidantem (kyselina askorbová, vitamín C). Přestože jsou furanony mutagenní pro bakterie a jsou schopny způsobit poškození DNA, jsou tyto sloučeniny zároveň i efektivním protikarcinogenním činitelem. Tato skutečnost byla pozorována u laboratorních zvířat, která přišla do kontaktu s karcinogenními látkami jako je např. zo[a]pyren nebo azoxymetan. Důkazy desmutagenní aktivity přinesli ve svých studiích také Cozzi (1993), De Simone (1993) a Ferrara (2000). [5, 14]

2.6.2 Toxikologické studie kombinací HA s tenzidy

Tenzidy jsou často používány v kosmetice jako emulgátory, detergenty, nebo konzervační a čisticí prostředky. Při kombinaci různých druhů tenzidů s přírodními a syntetickými HA byl zjištěn pokles jejich pozorované cytotoxicity. Testovány byly přírodní humát sodný a syntetický polymer HA-typu Na-KOP. Obě látky vykazují nízkou cytotoxicitu u buněk U937. Hodnoty CC_{50} po jedné hodině působení jsou 334 (295 – 377) $\mu\text{g/ml}$ pro humát sodný a 421 (340 – 521) $\mu\text{g/ml}$ pro Na-KOP. Byly použity čtyři skupiny tenzidů, amfolytické (TEGO[®] Betain CKD), neionogenní (Plantacare[®] 2000), anionaktivní (sodium dodecyl sulfát, sodium cetylstearyl sulfát) a kationaktivní (benzalkonium chlorid, didecyldimethylammonium chlorid). K pokusům byly používány uměle kultivované lidské buňky U937. Tenzidy byly na buňkách testovány samostatně a v kombinaci s humátem sodným a Na-KOP. Cytotoxicita byla měřena testovací metodou EZ4U založenou na redukci soli tetrazolia, konkrétně soli XTT. V tabulce 4 jsou uvedeny vypočítané hodnoty CC_{50} tenzidů a jejich kombinací s HA. Vysoké hodnoty CC_{50} korespondují s nízkou hodnotou cytotoxicity a naopak.

Tabulka 4 *Hodnoty CC_{50} tenzidů v přítomnosti a nepřítomnosti HS měřené 1 hodinu po expozici, n je počet experimentů*

Typ	Tenzid	HS	CC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)	Interval spolehlivosti	n
Amfolytické	TEGO [®] Betain CKD	-	34,1	30,4 – 38,2	3
	TEGO [®] Betain CKD	Na-humate	42,5	39,8 – 45,3	3
	TEGO [®] Betain CKD	Na-KOP	33,9	32,0 – 35,9	3

Neionogenní	Plantacare® 2000	-	127,0	119 – 136	3
	Plantacare® 2000	Na-humate	136,0	114 – 162	3
	Plantacare® 2000	Na-KOP	132,0	120 – 145	3
Anionaktivní	Sodium dodecyl sulfate	-	45,6	44,7 – 46,5	7
	Sodium dodecyl sulfate	Na-KOP	51,4	48,9 – 54,1	3
	Sodium cetylstearyl sulfate	-	21,8	18,9 – 25,0	3
	Sodium cetylstearyl sulfate	Na-KOP	22,7	18,2 – 28,2	3
Kationaktivní	Benzalkonium chloride	-	5,0	4,8 – 5,2	10
	Benzalkonium chloride	Na-humate	8,5	7,2 – 10,0	3
	Benzalkonium chloride	Na-KOP	7,0	6,6 – 7,3	3
	Didecyldimethylammonium chloride	-	3,3	3,2 – 3,4	6
	Didecyldimethylammonium chloride	Na-humate	5,4	5,1 – 5,6	3
	Didecyldimethylammonium chloride	Na-KOP	5,5	5,0 – 6,1	3

Z tabulky je patrné, že humát sodný redukuje cytotoxicitu preparátu TEGO® Betain CKD o 20 %, preparátu Plantacare® 2000 o 6 %, benzalkonium chloridu o 41 % a didecyldimethylammonium chloridu o 38 %. Syntetický Na-KOP redukuje cytotoxicitu sodium dodecyl sulfátu o 21 %, benzalkonium chloridu o 28 %, didecyldimethylammonium chloridu o 40 %. Na cytotoxicitu tenzidů TEGO® Betain CKD, Plantacare® 2000 a sodium cetylstearyl sulfátu nemá přidání NA-KOP výrazný vliv. S těmito výsledky se nabízí otázka, zda přidání HA k tenzidům má nějaký vliv na základní vlastnosti tenzidů jako jsou konzervační, pěnicí nebo čistící účinky. [4]

2.6.3 Ochrana před ionizujícím zářením

Oris (1990) ve své práci dokázal, že rozpuštěné HS v rozmezí koncentrací 1 – 7 µg/mL výrazně snižují akutní fotoindukovanou toxicitu u ryb *Pimephales promelas* a *Daphnia magna*. Tento jev je vysvětlován útlumem aktivity vlnové délky UV záření díky rozpuštěným HS. Ochranné účinky HA před poškozením gama zářením ⁶⁰Co, pozorované u samic krys Wistar, byly zaznamenány v patentu WO 9858655. Použité HA byly získány z rašelinišť o stáří 3 000 – 7 000 let. Preparát HA (240 mg/jedinec/den) byl po dobu 7 dní před ozářením aplikován gastrointubací samic krys z kmene Wistar o tělesné hmotnosti v rozmezí 190 – 210 g. Po ozáření následovala čtyřtydenní péče se stejnými dávkami preparátu HA. U jedinců ošetřovaných HA nebylo zjištěno žádné poškození. Nižší dávky HA (90 mg/jedinec/den) měly také pozitivní efekt, ale v menším rozsahu. Tyto poznatky by mohly v budoucnu najít uplatnění např. v prostředcích zmírňující účinky chemoterapie. Podání humátu sodného zkoumaným hlodavcům v jednorázové dávce s odstupem 5 – 10 minut po ozáření smrtelnou dávkou záření ⁶⁰Co vedlo k přežití 43 % jedinců po dobu 60 dnů.

Mimo ochrany proti poškození způsobenému ozářením a podpůrných účinků na regeneraci tkání, HA vykazuje také nepřímé detoxikační účinky, např. působí preventivně proti fotoaktivaci polycyklických aromatických uhlovodíků. Nikkila (1999) demonstroval

redukční účinky HA na toxicitu pyrenu ozářeného UV-B zářením u ryb *Daphnia magna*. Celkový efekt je připisován snížení prostupnosti záření vodou, což působí pokles fotomodifikace rozpuštěného pyrenu, dalším vysvětlením by mohla být přímá interakce pyrenu a HA.

2.6.4 BDF onemocnění

Na jihozápadním pobřeží Taiwanu se vyskytuje endemické onemocnění periferních cév dolních končetin, které má podobné symptomy jako arterioskleróza či trombotická onemocnění. Toto onemocnění je podle hlavního vizuálního příznaku, tmavého až černého zbarvení dolních končetin, nazýváno BFD (blackfoot disease). Za jeden z etiologických faktorů výskytu BFD je považována vysoká koncentrace zelenomodrých fluorescenčních HS a arzenu v pitné vodě. Tato choroba byla vyvolána experimentálně u myši užívajících fluorescenční HS po dobu 22 dnů v denní dávce 5 mg na 20 g hmotnosti těla jedince. Patogeneze tohoto onemocnění nebyla dosud pevně stanovena. Studie in-vitro odhalily poškození lidských erytrocytů vyvolané podáním HA v dávce 5 – 100 µg/mL, vliv zde zřejmě hraje i oxidativní stres. [5]

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

Experimentální část má v této práci pouze doplňkový charakter a jejím úkolem je seznámení se se základními operacemi huminové chemie, izolací a charakterizací HA.

Zdrojem huminových kyselin byl lignit pocházející z neogenní pánve Dolnomoravského úvalu, konkrétně z dolu Mír v oblasti Mikulčice (společnost Lignit s.r.o. Hodonín).

3.1 Izolace huminových kyselin

Izolace HA byla prováděna dvěma způsoby a byly jimi získány dva vzorky huminových kyselin.

3.1.1 Technické huminové kyseliny

První postup je podle kvality získávaných HA nazván jako technický.

Do dvou plastových dvoulitrových lahví jsem odvážíla vždy 60 g pomletého lignitu o vlhkosti 6,28 %. Lignit byl pomlet v kulovém mlýnu po dobu jedné minuty. Jednotlivé navážky jsem zalila 2 l extrakčního roztoku (0,1 M NaOH a 0,084 M $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$) za průběžného promíchávání elektrickým míchadlem. Nádoby s obsahy jsem uložila přes noc na třepačku.

Druhý den jsem suspenze z obou lahví každou zvlášť přefiltrovala přes hustou tkaninu a síto do pětilitrových plastových kádinek. Tuhé zbytky jsem ještě jednou extrahovala podle výše uvedeného postupu, avšak pouze po dobu jedné hodiny. Tyto získané suspenze jsem přelitím přes hustou tkaninu a síto doplnila k odpovídajícím prvním podílům filtrátů, čímž jsem získala dvakrát 4 l filtrátu. Obsah každé kádinky jsem okyselila přibližně 20 % HCl na pH odpovídající hodnotě 1, což jsem kontrolovala pH-metrem. Plastové kádinky jsem následně uložila přes noc do ledničky a zakryta alobalem.

Sedimentovanou vrstvu jsem následující den oddělila od kapaliny odsátím vodní vývěvou. Vysrážené huminové kyseliny v sedimentované části jsem od vody dále oddělila odstředěním v plastových kyvetách o objemu 250 ml, parametry odstředování byly nastaveny následovně: teplota 15 °C, čas 10 min, otáčky 4 000 ot/min. Během odstředování jsem huminové kyseliny třikrát promývala 0,1 – 0,2 M HCl a na závěr jedenkrát destilovanou vodou. Získaný produkt z jedné z navážek jsem sušila v sušárně při 50 °C, druhý produkt jsem použila k další úpravě, viz izolace „čisté“ huminové kyseliny.

3.1.2 Čisté huminové kyseliny

Druhý postup je podle kvality získávaných HA nazván jako čistý.

Získanou sraženinu podle předchozího postupu jsem přelila dvěma litry směsi HCl a HF v dvoulitrové plastové kádince, kterou jsem následně nechala třepat na třepačce do druhého dne. Směs kyselin jsem připravila z 10 ml koncentrované HCl a 20 ml koncentrované HF ve 2 l vody.

Sedimentovanou suspenzi jsem oddělila od kapaliny odlitím a zbylou vodu jsem odstředila podle parametrů výše uvedených v plastových kyvetách o objemu 250 ml. Odstředěné huminové kyseliny jsem promyla jedenkrát vodou a opět dala odstředit, poté jsem získané

humínové kyseliny umístila do dvou dialyzačních membrán. Dialýzu jsem prováděla v 5 l plastové kádince proti destilované vodě, dokud voda nevykazovala negativní reakci na chloridy pomocí 0,1 M AgNO_3 . Voda jsem vyměňovala jedenkrát až dvakrát denně po dobu šesti dnů.

Tuhý produkt z dialyzační membrány jsem oddělila a dala sušit do sušárny při teplotě 50 °C.

3.2 Charakterizace humínových kyselin

3.2.1 Proměření IČ spektra humínových kyselin v tabletě z KBr

Rozmělněný a vysušený vzorek HA (přibližně 2 mg) jsem smísila s nadbytkem vyžíhaného KBr (asi 300 – 400 mg) a ve speciálním lisu jsem vytvořila průhlednou tabletu o průměru asi 1 cm a tloušťce 1 – 2 mm. Ze vzorku technických i čistých HA byly vytvořeny vždy 2 tablety. Na IČ spektrofotometru jsem měřila jejich transmitanci T v závislosti na zvoleném rozsahu vlnové délky od 400 do 4 000 cm^{-1} . Po prvním měření jsem tablety vložila do vakuové sušárny při teplotě 40 °C na dobu čtyř hodin. Poté jsem tablety technických a čistých HA proměřila znovu za stejných podmínek.

3.2.2 Proměření UV/VIS spektra humínových kyselin

Z odváženého množství 0,020 8 g technické humínové kyseliny a 0,021 2 g čisté humínové kyseliny jsem připravila dva roztoky v odměrné baňce o objemu 100 ml dolitím 0,1 M NaOH po značku. Získané roztoky jsem proměřovala na UV/VIS spektrofotometru jako závislost absorbance A na zvolené vlnové délce 200 až 900 nm.

3.2.3 Stanovení vlhkosti a popela ve vzorcích humínových kyselin

Na analytických vahách navážená množství technické a čisté humínové kyseliny jsem vložila do pece na dobu čtyř hodin při teplotě 105 °C pro stanovení vlhkosti.

Vysušené vzorky materiálu jsem dále použila pro stanovení popela, odvážená množství vzorků jsem vložila na dobu čtyř hodin do pece při teplotě 700 °C.

3.2.4 Elementární analýza

Vzorky technických a čistých HA byly dále podrobeny na Ústavu struktury a mechaniky hornin Akademie Věd České republiky elementární analýze, byly stanoveny na CHNS/O mikroanalýzátoru firmy Thermo Finnigan (Carlo Erba).

4 DISKUZE A ZÁVĚRY

Vliv huminových látek na kvalitu lidského zdraví je dlouholetým předmětem výzkumu v oblastech analytické, environmentální, fyzikální a potravinářské chemie, buněčné biologie, molekulární genetiky, farmakologie a toxikologie.

Z kosmetického a medicínského hlediska jsou huminové látky potažmo huminové kyseliny velmi zajímavé pro široké spektrum svých vlastností a možných použití. Rašelina s vysokým obsahem huminových látek nachází již tradiční využití v lázeňství. Jde především o onemocnění pohybového aparátu, kožní a gynekologická. Huminové kyseliny mají antivirové a antifungicidní účinky, působí protizánětlivě a detoxikačně, snižují srážlivost krve, stabilizují hladinu estrogenu, zpomalují rozvoj některých typů rakovinného bujení a chrání před radioaktivním a UV zářením.

Vzhledem k pomalé obnovitelnosti zdroje přírodních huminových kyselin se mi jeví jako velmi důležité soustředit se na výrobu syntetických látek huminového charakteru. S tím souvisí i naléhavá otázka odhalení přesné chemické struktury huminových kyselin. Za nejperspektivnějšími směry ve výzkumu huminových látek považuji studium antivirového potenciálu, dále schopnost vytvářet chelátové sloučeniny s těžkými kovy, vázat toxické látky a absorbovat UV záření. Některé druhy přirozeně se vyskytujících a syntetických biopolymerů typu HA mají z hlediska dosažených výsledků potenciál stát se účinnými léčivy, avšak použití léčiv v terapii nese vysoké nároky na farmakologické důkazy účinnosti, toxikologické bezpečnostní normy a jasně definované chemické složení použitých komponentů. Odhalení přesné struktury huminových kyselin a huminových látek obecně je tedy otázka, jejíž zodpovězení by nepochybně posunulo výzkum těchto látek v mnoha oborech o značný krok vpřed.

Izolováním huminových kyselin z lignitu jsem získala 44 g „technické“ huminové kyseliny a 14 g „čisté“ huminové kyseliny. Za hlavní důvody poklesu výtěžků, a to především v případě čistých huminových kyselin, považuji rozpuštění či vyplavení nečistot anorganického původu z výchozí látky během izolace HA. Dalším důvodem poklesu výtěžků mohly být ztráty při odsávání kapaliny nad sedimentem a samotné filtraci sedimentu.

Spektroskopická měření vzorků technických a čistých HA vykazovala typická spektra publikovaná mnoha autory. Potvrdila se přítomnost charakteristických skupin pro huminové kyseliny, jsou to zejména skupiny karboxylová, fenolová, alkoholová, karbonylová a amidová. Ve všech čtyřech vzorcích se současně potvrdila i přítomnost polysacharidů nebo polysacharidům podobných látek a Si–O příměsí.

Z naměřených hodnot UV/VIS spekter roztoků technických a čistých huminových kyselin jsem získala hodnoty absorbancí A při vlnových délkách 465 nm a 665 nm a výpočtem podílu těchto hodnot jsem dospěla k hodnotě tzv. humifikačního indexu. Pro technické HA jsem výpočtem získala hodnotu humifikačního indexu 3,538 8, pro čisté HA hodnota humifikačního indexu dosáhla hodnoty 2,971 0. Tento poměr $A(465 \text{ nm})/A(665 \text{ nm})$ pro huminové kyseliny je obvykle nižší než 5,0, což výpočty potvrzují. Nižší poměr

v případě vzorku čistých HA může značit relativně vysoký podíl aromatických částic a naopak vyšší poměr u vzorku technických HA ukazuje na nízký obsah aromatických částic a relativně vyšší obsah alifatických struktur. Byl také pozorován inverzní vztah mezi tímto poměrem a odolností huminového materiálu. Huminový materiál s nejvyšším koeficientem $E_{4/6}$ má nejnižší odolnost. Čisté HA tedy oproti technickým HA obsahují vyšší množství aromatických částic, mají vyšší odolnost a jsou to substance staršího původu, jsou více humifikované.

Ve vzorku technických huminových kyselin byla zjištěna vyšší vlhkost a obsah popela než u vzorku čistých huminových kyselin. Pro technické HA byla zjištěna vlhkost 5,09 % a obsah popela 29,38 %, pro čisté HA byla naměřena vlhkost 4,07 % a obsah popela 12,29 %.

Tabulka 5 *Hlavní absorpční pásy IČ spektra [10, 12, 13]*

Vlnočet (cm^{-1})	Skupina
3400 – 3300	vazebné vibrace O–H ve fenolických –OH skupinách (s příspěvkem alifatických –OH skupin a případně N–H)
3030	vazebné vibrace aromatických C–H vazeb
2940 – 2900	vazebné vibrace alifatických C–H vazeb
2930	antisymetrické vazebné C–H vibrace ve skupinách –CH ₂ –
2840	symetrické vazebné C–H vibrace ve skupinách –CH ₂ –
2600	vazebné O–H vibrace karboxylových skupin, vázaných vodíkovým můstkem
1725 – 1720 (– 1710)	vazebné C=O vibrace ve skupině –COOH, s malým příspěvkem ketonů
1717	vazebné C=O vibrace v karbonylech, aldehydech a ketonech
1660 – 1630	vazebné C=O vibrace v amidické skupině (amid I); C=O chinonů; vazebná vibrace C=O v konjugovaných ketonech, vázané vodíkovou vazbou ke skupině –OH
1620 – 1600	aromatické C=C vazebné vibrace; C=O v konjugovaných ketonech, vázané vodíkovou vazbou ke skupině –OH (silně); antisymetrické vazebné interakce –COO [–]
1590 – 1517	symetrická vibrace –COO [–] , deformační vibrace N–H; C=N vazebné vibrace amidu II
1580	vazebné vibrace aromatických C=C, příp. antisymetrické vazebné vibrace –COO [–]
1575	antisymetrická vazebná vibrace aniontu –COO [–]
1540	vazebné vibrace N–H v amidické skupině (amidII)
1525	vazebné vibrace aromatických C=C
1515	vazebné vibrace aromatických C=C, amidu II (deformační N–H vibrace polypeptidů)
(1460 –) 1440	–C–H antisymetrické deformační vibrace alifatických –CH ₃ a –CH ₂ – skupin
1400 – 1390	OH deformační a C–O vazebné vibrace fenolických –OH, C–H deformační vibrace –CH ₂ a –CH ₃ skupin; antisymetrické vazebné vibrace karboxylového anionu –COO [–]
1350	symetrické –COO [–] vazebné vibrace, příp. symetrické deformační vibrace C–CH ₃ v alifatických skupinách

1280 – 1200	vazebné vibrace C–O a deformační vibrace O–H ve skupině –COOH, C–O vazebné vibrace aryletherů
1270	C–OH vazebné vibrace fenolických –OH skupin
1225	vazebné vibrace –C–O a deformační vibrace –OH ve skupinách –COOH
1220	vazebná vibrace C–N (amid III)
1170	–C–OH vazebná vibrace alifatických –OH
1070 (– 970)	C–O vazebné vibrace polysacharidů nebo polysacharidům podobných látek, Si–O příměsi
1070	vazebné vibrace C–C alifatických skupin
830, 775	mimorovinné deformační vibrace aromatické C–H vazby

Tabulka 6 Hodnoty pro humifikační index

	Technické huminové kyseliny	Čisté huminové kyseliny
A ₄₆₅	0,990 5	1,084 1
A ₆₆₅	0,279 9	0,364 9
E _{4/6}	3,538 8	2,971 0

Tabulka 7 Stanovení vlhkosti huminových kyselin

	Technické huminové kyseliny		Čisté huminové kyseliny	
	1. stanovení	2. stanovení	1. stanovení	2. stanovení
Původní navážka (g)	0,303 5	0,298 1	0,298 7	0,304 8
Hmotnost sušiny (g)	0,288 2	0,282 8	0,286 7	0,292 3
Vlhkost (%)	5,05	5,12	4,03	4,11
Průměrná vlhkost (%)	5,09		4,07	

Tabulka 8 Stanovení popela huminových kyselin

	Technické huminové kyseliny		Čisté huminové kyseliny	
	1. stanovení	2. stanovení	1. stanovení	2. stanovení
Navážka vysušeného vzorku (g)	0,279 1	0,281 7	0,279 6	0,283 8
Hmotnost popela (g)	0,081 3	0,083 5	0,034 0	0,035 2
Obsah popela (%)	29,12	29,63	12,15	12,42
Průměrný obsah popela (%)	29,38		12,29	

Tabulka 9 Výsledky elementární analýzy vzorků technických a čistých HA

Vzorek	% W ^a	% A ^d	% C ^d	% H ^d	% N ^d	% S ^d	% O ^d
Čisté HA	4,63	15,56	54,51	4,71	1,03	0,91	26,07
Technické HA	5,18	28,59	41,11	3,72	0,89	0,80	24,09

5 POUŽITÁ LITERATURA

- [1] Bittner M.: Ecotoxicological Aspects of Humic Substances. Disertační práce, Masarykova univerzita, Přírodovědecká fakulta, Brno 2007
- [2] Co jsou to huminové látky. Dostupné 17.8.2009 z:
< <http://www.amagro.com/co-jsou-to-huminove-latky.html> >
- [3] Davies G., Ghabbour E. A.: Humic Acids: Marvelous Products of Soil Chemistry. *Journal of Chemical Education*, Vol. 78, No. 12, p. 1609-1614, 2001
- [4] Klöcking H.-P., Junek R., Mechler M., Schoenherr J., Klöcking R.: In-Vitro Toxicological Study on Combinations of Humic Acids with Surfactants. Humic Substances - Linking Structure to Functions, Proceedings of the 13th Meeting of the International Humic Substances Society. F.H. Frimmel, G. Abbt-Braun, Eds., Schriftenreihe Bereich Wasserchemie Engler-Bunte-Institut der Universität Karlsruhe, 2006, vol. 45-I. ISSN, p. 393-396
- [5] Klöcking R., Helbig B.: Medical Aspects and Application of Humic Substances. In book: Biopolymers for Medical and Pharmaceutical Applications: Humic Substances, Polyisoprenoids, Polyesters, and Polysaccharides, Two Volumes, Steinbüchel A., Marchessault R. H., VILEY-VCH, p. 3-16, Weinheim 2005
- [6] Klöcking R., Helbig B., Pörschmann J., Wutzler P.: The Antiviral Potency of Humic Substances. Humic Substances - Linking Structure to Functions, Proceedings of the 13th Meeting of the International Humic Substances Society. F.H. Frimmel, G. Abbt-Braun, Eds., Schriftenreihe Bereich Wasserchemie Engler-Bunte-Institut der Universität Karlsruhe, 2006, vol. 45-I. ISSN, p. 397-400
- [7] Kotlík R., Dyr J. E.: Tvorba fibrinu a jeho degradace. *Chemické listy*, 102, p. 314 – 318, 2008
- [8] Kovář J.: Využití termoanalytických metod při studiu lignitických huminových látek. Diplomová práce, Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Brno 2003
- [9] Kučerík J.: Aplikace metody Terrela L-Hilla na problém partikulace lignitu. Diplomová práce, Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Brno 1998
- [10] Machovič V., Novák F.: Difuzně-reflexní infračervená spektroskopie půdních bitumenů z oblasti Šumavy. *Chemické listy*, 92, p. 152 – 156, 1998
- [11] Márová L.: Acidobazické vlastnosti půdních roztoků pod listnatým porostem (Moravský kras). Bakalářská práce, Masarykova univerzita, Přírodovědecká fakulta, Brno 2009
- [12] Mikulášková B., Lapčík L. JR., Mašek I.: Lignit – struktura, vlastnosti a použití. *Chemické listy*, 91, p. 160 – 168, 1997
- [13] Novák F., Machovič V., Novotná M.: FTIR spektrometrie huminových látek. *Chemické listy*, subm.to.
- [14] Schnitzel M., Kahn S. U.: Humic Substances in the Environment. M. Dekker, Inc.: New York, New York 1972
- [15] Stevenson F. J.: Humus chemistry. Genesis, composition, reactions. John Wiley & Sons, New York 1994
- [16] Sutton R., Sposito G.: Molecular Structure in Soil Humic Substances: The New View. *Environmental Science & Technology*, Vol. 39, No. 23. 2005
- [17] Tan K. H.: Humic Matter in Soil and the Environment. 2003

- [18] Vlachová K.: Vliv huminových látek na toxicitu komplexních vzorků ze životního prostředí. Bakalářská práce, Masarykova univerzita, Přírodovědecká fakulta, Brno 2007
- [19] Weber J.: Definition of soil organic matter. 2007
- [20] WO 9858655: Method of extract composition control in peat extraction, peat extract, and use of peat extract. Dostupné 12.7.2009 z:
< <http://www.wipo.int/pctdb/en/wo.jsp?IA=F12003000923&DISPLAY=DESC> >

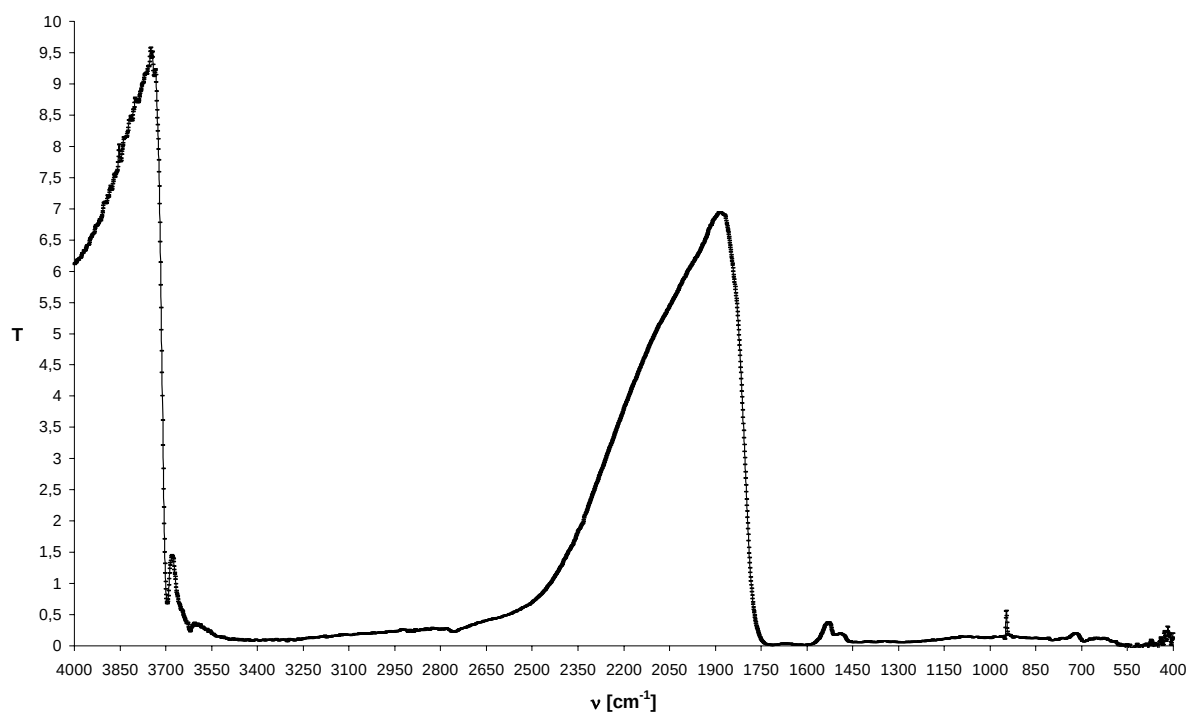
6 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

AA	kyselina arachidonová
BFD	periferní cévní onemocnění dolních končetin
BOP	produkt oxidace katecholu
CC ₅₀	poloviční hodnota maximální cytotoxické koncentrace
CMV	cytomegalovirus
2,5-DHBQOP	produkt oxidace 2,5-dihydroxibenzochinonu
2,5-DHPOP	produkt oxidace 2,5-dihydroxyphenylacetalové kyseliny
3,4-DHPOP	produkt oxidace 3,4-dihydroxyphenylacetalové kyseliny
2,5-DHTOP	produkt oxidace 2,5-dihydroxytoluenu
3,4-DHTOP	produkt oxidace 3,4-dihydroxytoluenu
CHOP	produkt oxidace chlorgenové kyseliny
DNA	kyselina deoxyribonukleová
DOM	rozpuštěná organická hmota
FA	fulvokyseliny
GENOP	produkt oxidace gentisinové kyseliny
HA	humínové kyseliny
HS	humínové látky
HSV-1	virus herpes simplex typu 1
HYDROP	produkt oxidace hydrochinonu
HYKOP	produkt oxidace kyseliny hydrokávové
IC ₅₀	poloviční hodnota maximální inhibiční koncentrace
IČ	infračervený
IHSS	Mezinárodní asociace pro humínové látky
IL-1	interleukin-1
KOP	produkt oxidace kyseliny kávové
M.W.	molekulová hmotnost
MEC	maximální efektivní koncentrace
MX	mutagen 'X'
NMR	nukleární magnetická resonance
POP	produkt oxidace kyseliny protokatechinové
RSV	syncytiální respirační virus
SOM	organický půdní materiál
TNF- α	tumor necrosis faktor alfa
UV	ultrafialové záření
VZ1C	vzorek 1 čisté HA v KBr tabletě
VZ1CV	vzorek 1 čisté HA v KBr tabletě, vakuově vysušený
VZ1T	vzorek 1 technické HA v KBr tabletě
VZ1TV	vzorek 1 technické HA v KBr tabletě, vakuově vysušený
VZ2C	vzorek 2 čisté HA v KBr tabletě
VZ2CV	vzorek 2 čisté HA v KBr tabletě, vakuově vysušený
VZ2T	vzorek 2 technické HA v KBr tabletě
VZ2TV	vzorek 2 technické HA v KBr tabletě, vakuově vysušený

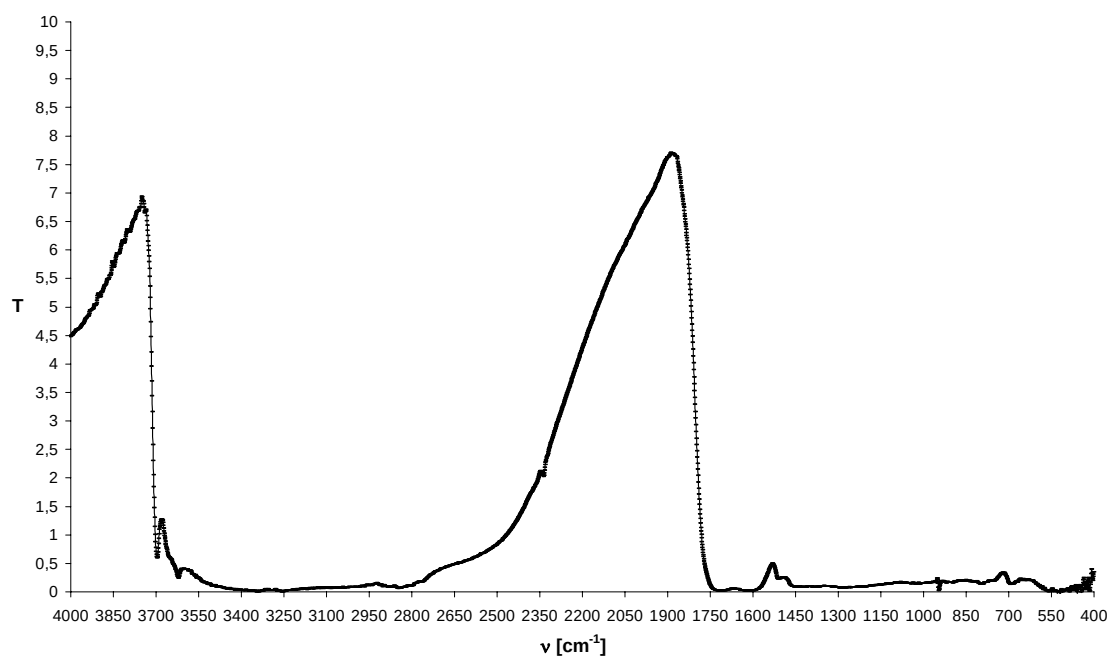
7 SEZNAM PŘÍLOH

Příloha 1	Záznam IČ spektra vzorku VZ1T	33
Příloha 2	Záznam IČ spektra vzorku VZ1TV	33
Příloha 3	Záznam IČ spektra vzorku VZ2T	34
Příloha 4	Záznam IČ spektra vzorku VZ2TV	34
Příloha 5	Záznam IČ spektra vzorku VZ1C.....	35
Příloha 6	Záznam IČ spektra vzorku VZ1CV	35
Příloha 7	Záznam IČ spektra vzorku VZ2C.....	36
Příloha 8	Záznam IČ spektra vzorku VZ2CV	36
Příloha 9	Záznam UV/VIS spektra pro vzorek technické huminové kyseliny.....	37
Příloha 10	Záznam UV/VIS spektra pro vzorek čisté huminové kyseliny.....	37

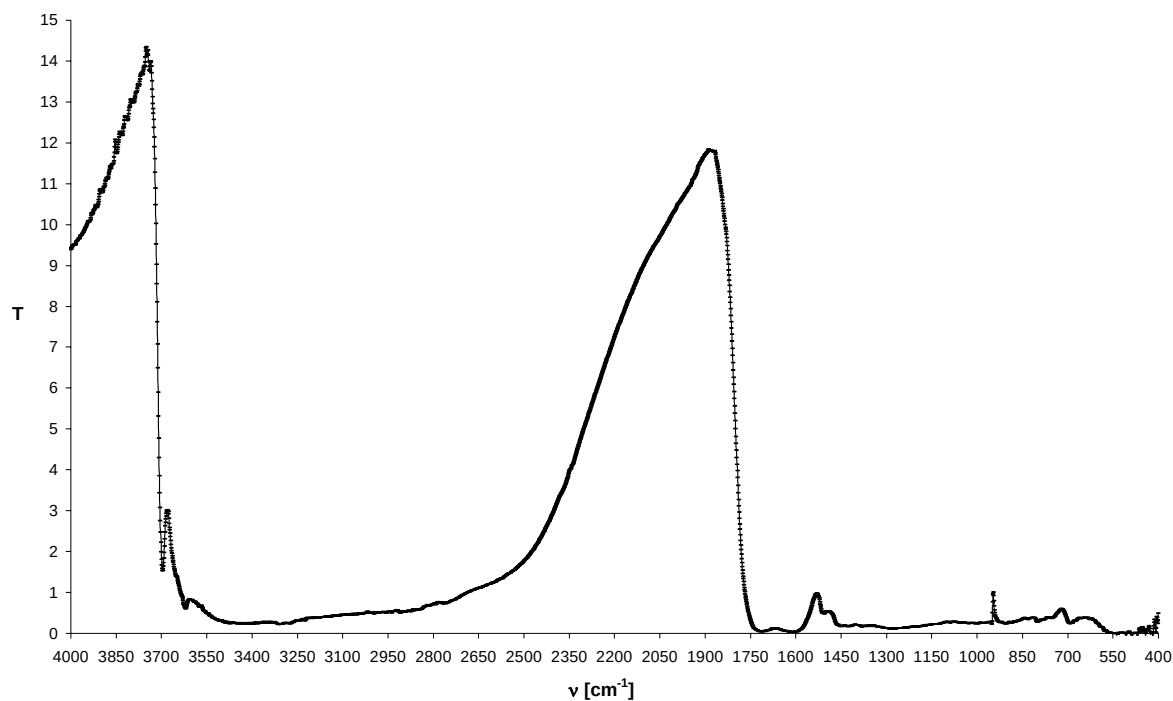
PŘÍLOHY



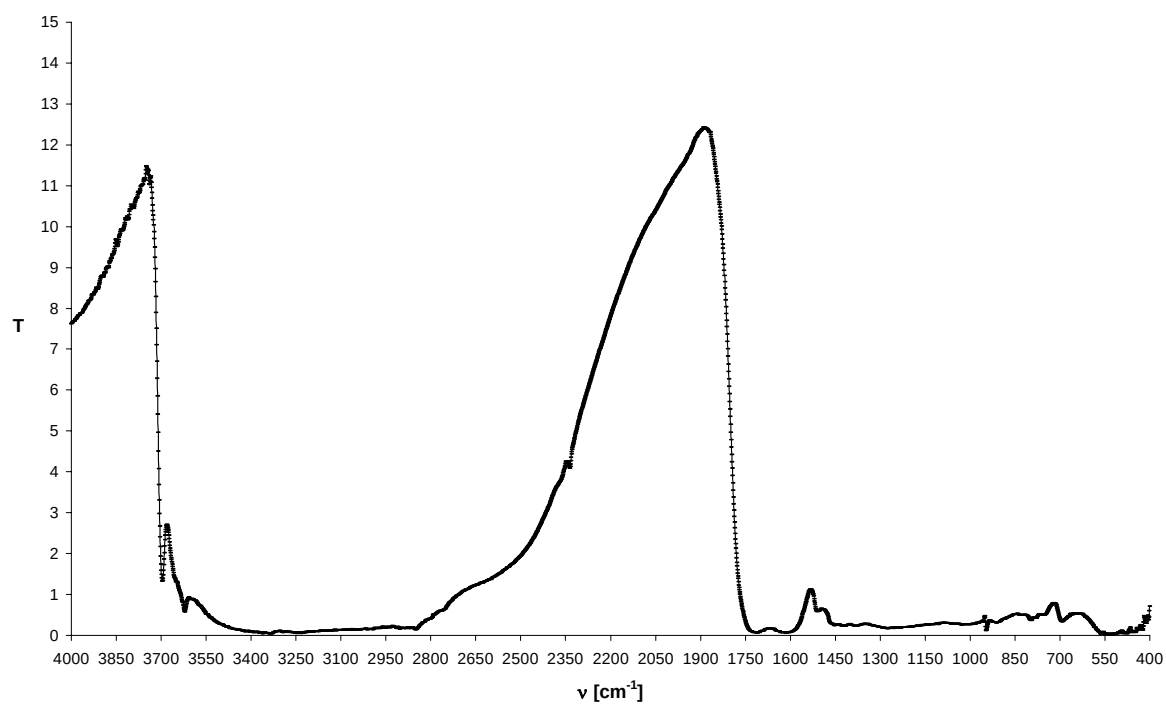
Příloha 1 Záznam IČ spektra vzorku VZ1T



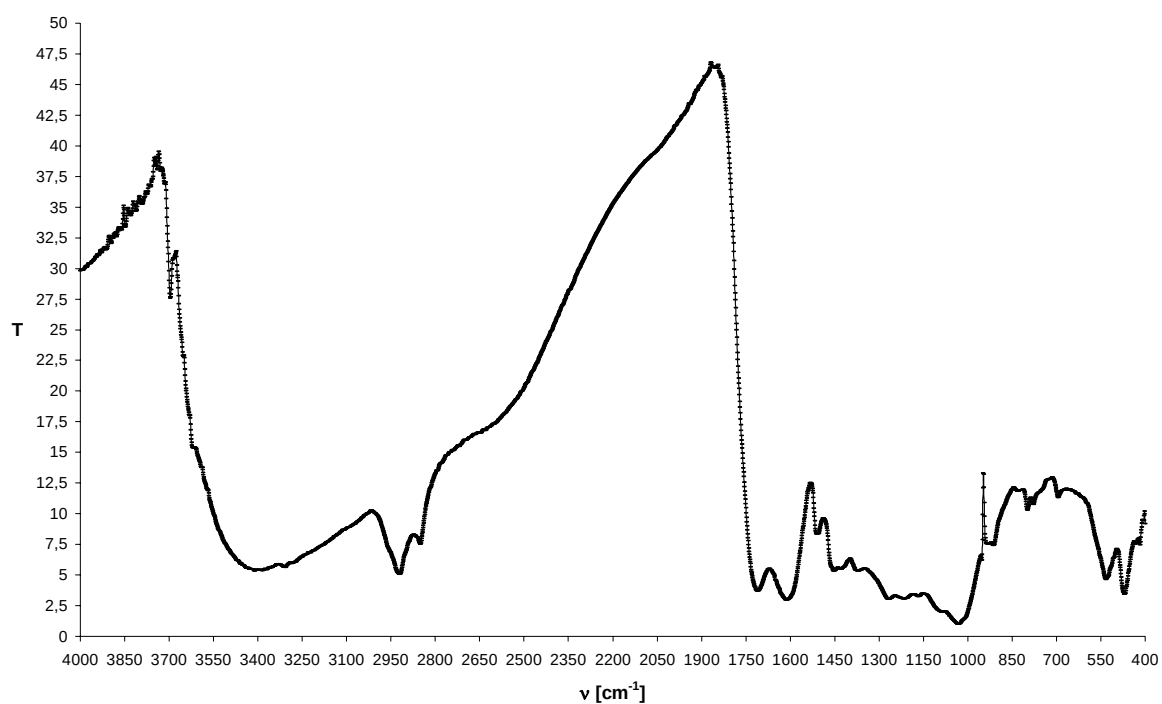
Příloha 2 Záznam IČ spektra vzorku VZ1TV



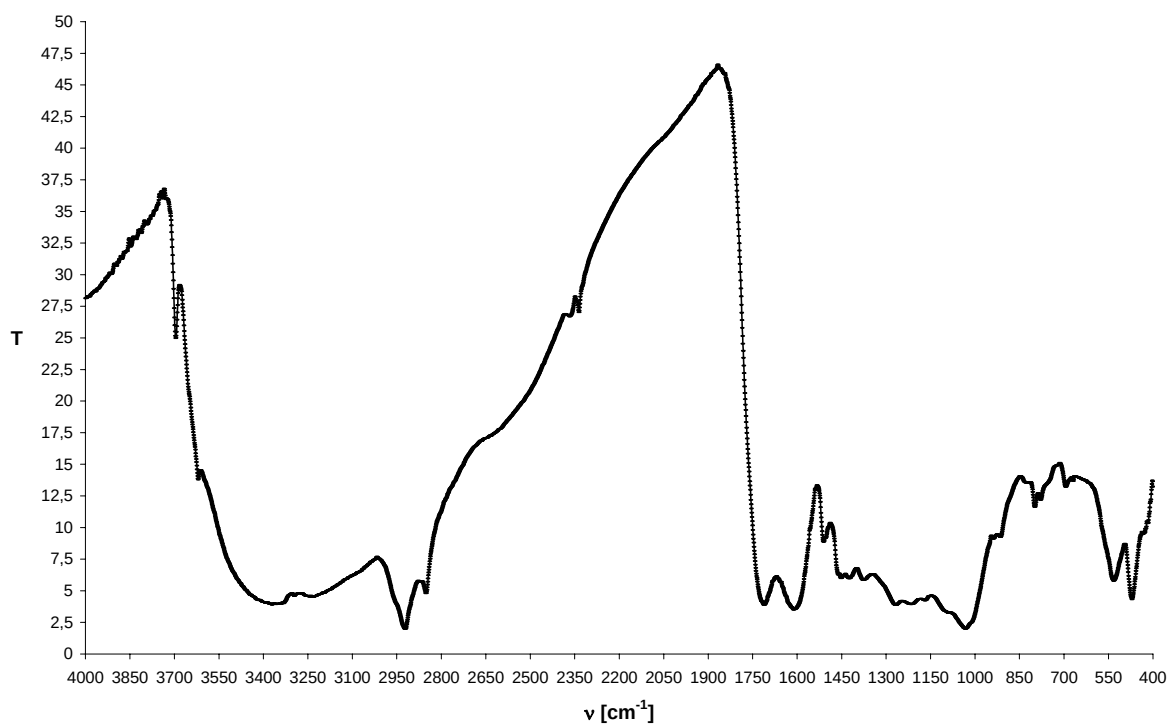
Příloha 3 Záznam IČ spektra vzorku VZ2T



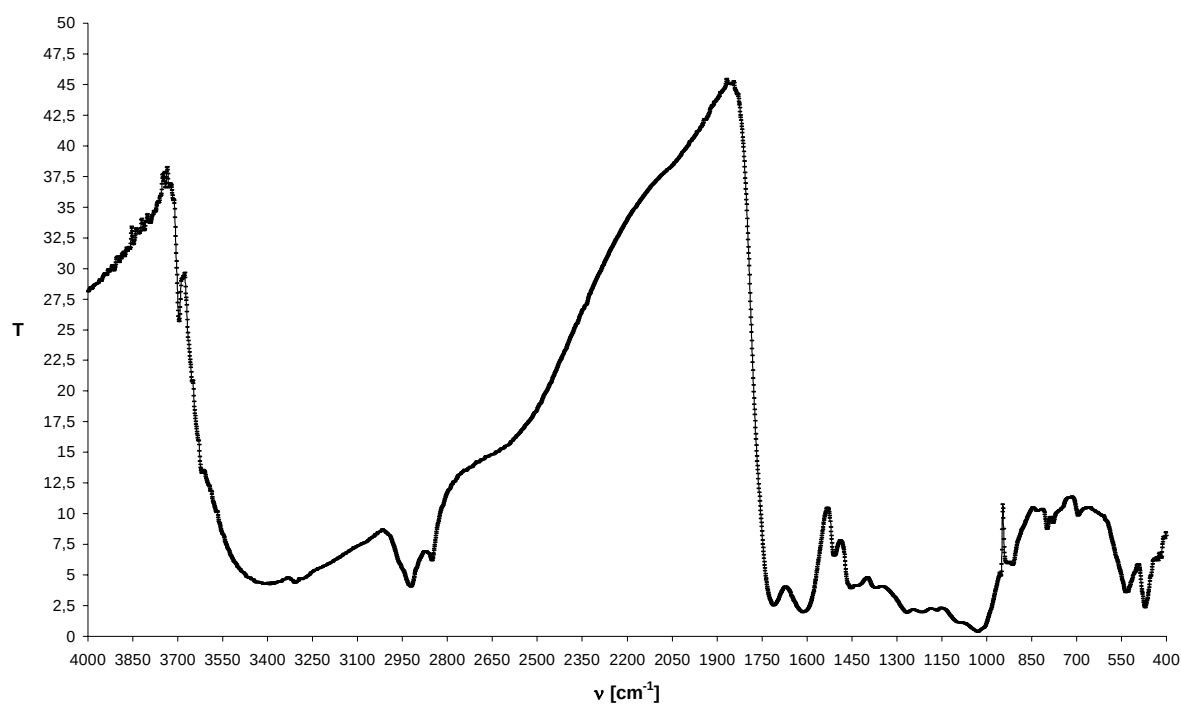
Příloha 4 Záznam IČ spektra vzorku VZ2TV



Příloha 5 Záznam IČ spektra vzorku VZ1C



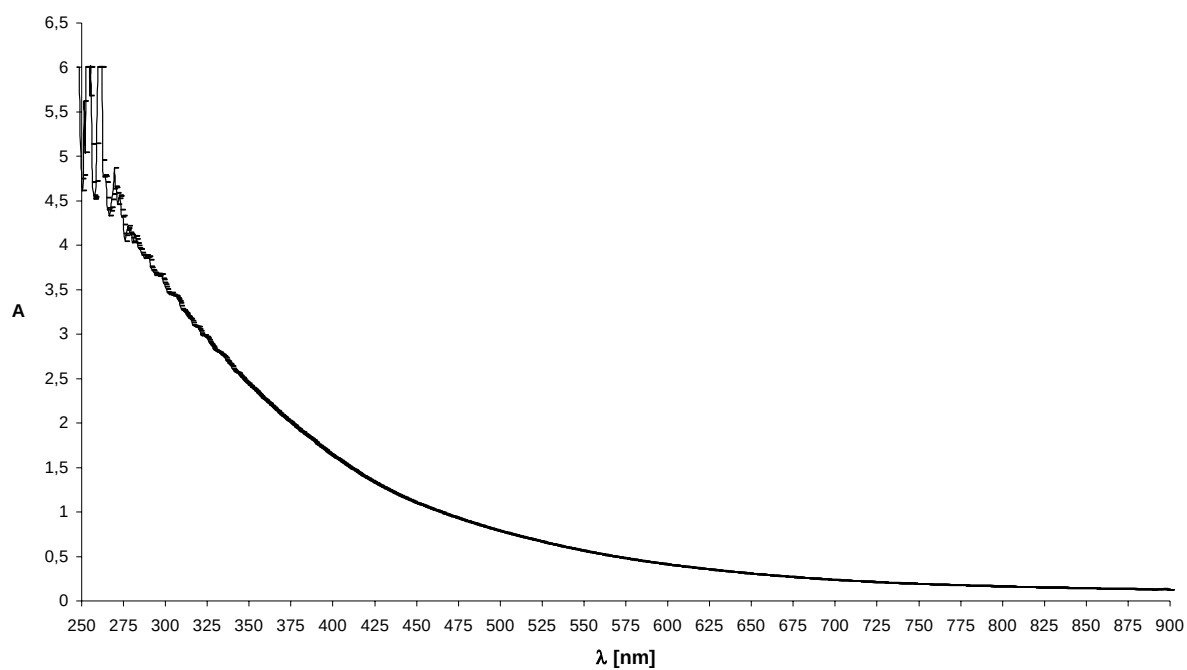
Příloha 6 Záznam IČ spektra vzorku VZ1CV



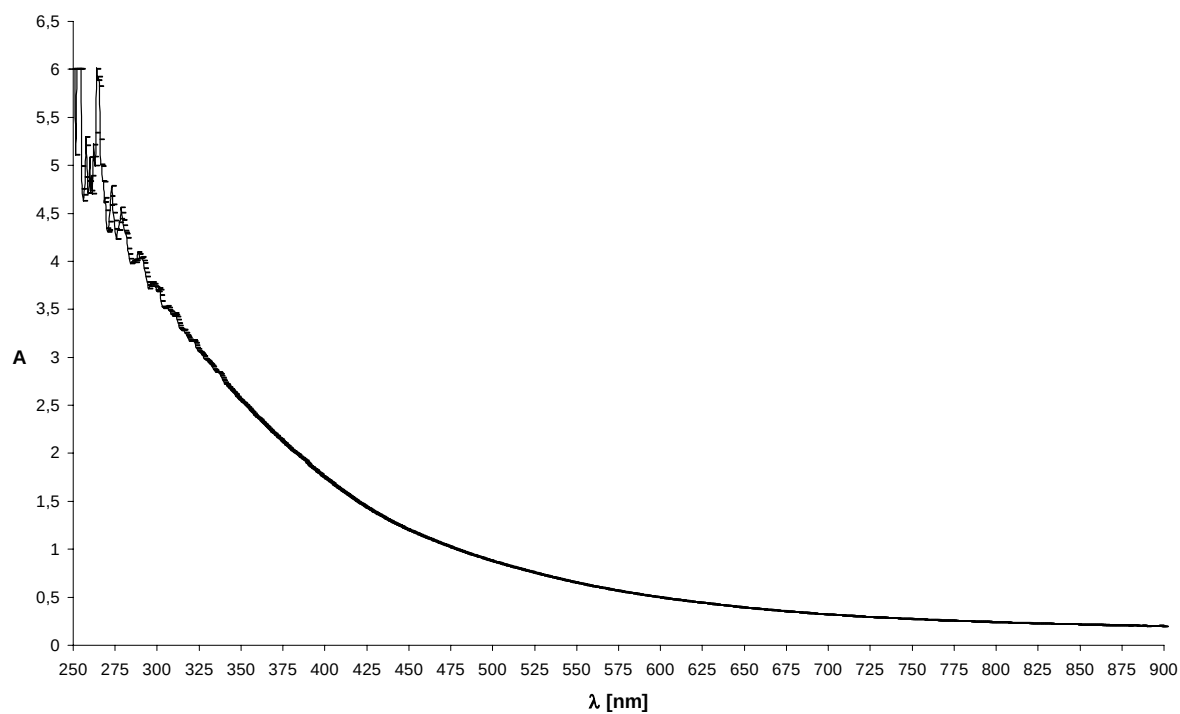
Příloha 7 Záznam IČ spektra vzorku VZ2C



Příloha 8 Záznam IČ spektra vzorku VZ2CV



Příloha 9 Záznam UV/VIS spektra pro vzorek technické huminové kyseliny



Příloha 10 Záznam UV/VIS spektra pro vzorek technické huminové kyseliny