

MICHAŁ DROBNIK¹, TERESA LATOUR¹, BEATA KRAWCZYK²

BADANIA PREPARATÓW BOROWINOWYCH Z WYKORZYSTANIEM SPEKTROFOTOMETRII ABSORPCYJNEJ UV-VIS

THE EXAMINATION OF PEAT PREPARATIONS BY THE UV-VIS ABSORPTION SPECTROPHOTOMETRY

¹Zakład Tworzyw Uzdrawiskowych
Państwowy Zakład Higieny
60 – 823 Poznań, ul. Słowackiego 8
e-mail: mdrobnik@pzh.gov.pl
Kierownik: dr T. Latour

²Przedsiębiorstwo Farmaceutyczne „Sulfhur Zdrój” EXIM,
28-100 Busko Zdrój, ul Rokosza 18

Określono przydatność analitycznej metody spektrofotometrycznej UV-VIS do kontroli efektywności procesów technologicznych stosowanych przy produkcji różnego rodzaju preparatów borowinowych - ze szczególnym uwzględnieniem zawartości w nich kwasów huminowych, fulwonowych i hymatomelanowych.

Słowa kluczowe: borowina, kwasy humusowe, spektrofotometria, widmo absorpcyjne
Key words: peat, humic acid, spectrophotometry, absorption spectra

WSTĘP

W chemicznym i fizyko-chemicznym oddziaływaniu zabiegów balneoterapeutycznych z zastosowaniem borowiny tj. torfów zawierających od 75% - 95% substancji organicznych, największy udział mają związki humusowe zwłaszcza kwasy humusowe. Są to polimery składające się z rdzenia aromatycznego (typu fenoli) połączonego z aminokwasami, cukrami, peptydami, kwasami alifatycznymi [8, 11, 19]. Związki humusowe warunkują stan koloidalny, właściwości sorpcyjno-wymiennikowe, pH oraz czynne działanie biologiczne borowiny [13, 14].

W oparciu o analizę pierwiastkową i właściwości fizyczne (rozpuszczalność) wydzielono trzy typy kwasów humusowych - różniących się między sobą: masą cząsteczkową (600-3000 g/mol), liczbą grup funkcyjnych i stopniem polimeryzacji. Są to: kwasy huminowe, kwasy hymatomelanowe i fulwokwasy [2, 15]. Ze względu na zróżnicowanie budowy tych kwasów nie można jednoznacznie określić ich struktury. Wg danych piśmiennictwa [6] zawartość węgla oraz intensywność ich zabarwienia wzrasta wraz ze wzrostem masy cząsteczkowej, a ze wzrostem stopnia polimeryzacji maleje rozpuszczalność, kwasowość i zawartość tlenu w poszczególnych związkach.

W ostatnich kilkunastu latach szereg firm zarówno farmaceutycznych jak też kosmetycznych podjęło produkcję różnorodnych preparatów torfowych, stosowanych w postaci: past, balsamów, toników, maści, żelu i kremów. Zawierają one m.in. kwasy huminowe, którym przypisuje się główną rolę w procesach regeneracyjnych tkanek np. skóry, w tym właściwości antyoksydacyjne.

Czynne działanie biologiczne omawianych kwasów zależy też od składu chemicznego surowca, z którego otrzymuje się preparat torfowy a także w dużym stopniu od sposobu izolowania kw. humusowych np. przez frakcjonowanie oraz od obróbki termicznej preparatu [4,12].

W rutynowych badaniach borowin oznacza się łącznie kwasy huminowe i hymatomelanowe metodą grawimetryczną, a kwasy fulwonowe spektrofotometrycznie. Każdą z tych metod poprzedza ich izolacja i frakcjonowanie rozdziel.

Celem pracy było określenie przydatności metody spektrometrii UV-VIS do identyfikacji i oznaczania zawartości związków humusowych w preparatach borowinowych oraz określenia wpływu procesów produkcyjnych na strukturę tych związków. Temat pracy podjęto w związku z rejestracją preparatów borowinowych jako farmaceutycznych, w której wymagana jest znajomość metody analitycznej pozwalającej na zbadanie efektywności procesów technologicznych (różniących się m.in. rodzajem użytych ekstrahentów oraz odczynem (pH) środowiska reakcji - z udziałem różnego typu peloidów) stosowanych przy otrzymywaniu preparatów borowinowych.

MATERIAŁ I METODY

Wykonano spektrogramy różnych ekstraktów borowinowych w zakresie bliskiego nadfioletu (200-400nm) i części widzialnej światła (400-800nm) z wykorzystaniem spektrofotometru UV-VIS model U-1800 firmy Hitachi przy następujących parametrach pracy: prędkość skanowania 10-400nm/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.

W badaniach użyto:

- 1) wzorcowy roztwór kwasów humusowych przygotowany z preparatu f. Fluka, składający się z kwasów huminowych, hymatomelanowych i fulwonowych – o wyjściowym stężeniu 100mg/100 ml 0,1 mol NaOH;
- 2) frakcje: kwasy huminowe, hymatomelanowe i fulwonowe wyizolowane wg *Hermanowicza* [9] z w/w roztworu;
- 3) ekstrakty wodne - (1 kg borowiny + 2 kg wody) z borowin: typu niskiego, pochodzących ze złóż: „Kamień Pomorski”, „Ustron” i „Mielec” oraz z kostki borowinowej „Iwonka” tj. mieszaniny borowiny i soli Iwonickiej (f-my „Sulphur”);
- 4) ekstrakty wodne uzyskane z kostki borowinowej „Iwonka” ogrzewane w temperaturze 50 °C, 80°C oraz poddane sterylizacji w 123°C.

Odczyn badanych roztworów (temp. ok. 20°C) mierzono za pomocą pH/jonometru mikrokomputerowego typu CI-316 (f. „Elmetron”) z wykorzystaniem czujnika temperatury Pt-100 (f. Elmetron) i elektrody pH-metrycznej ERH-11 (f. Hydromet).

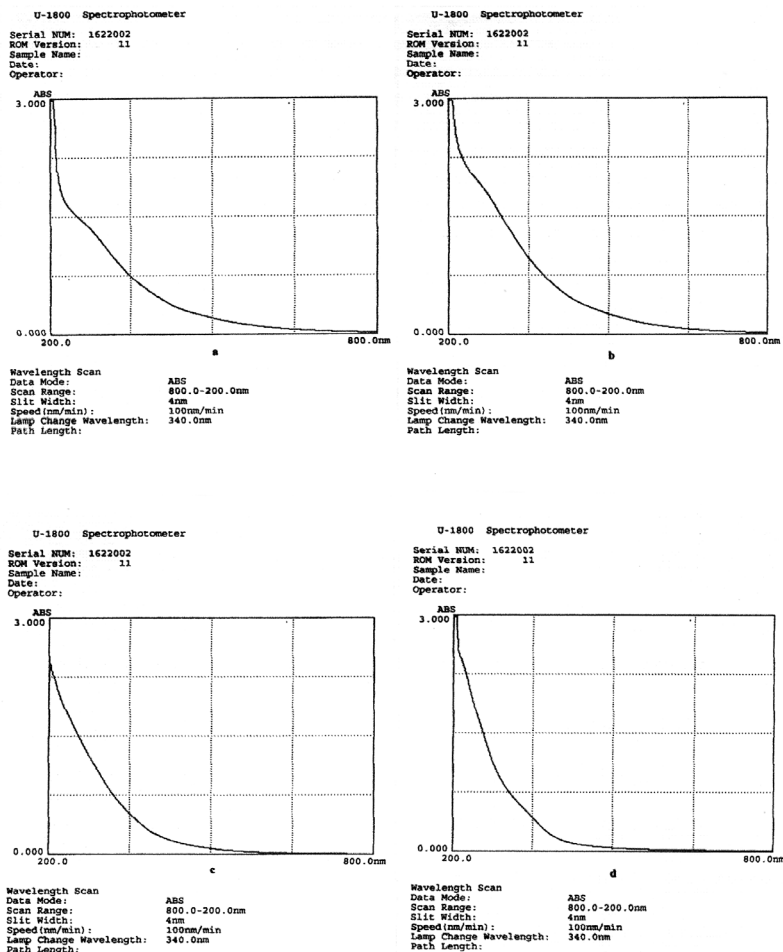
Absorbancję (odpowiednio rozcieńczonych) badanych roztworów mierzono przy długościach fali:

- 254 i 436 nm - wg *Freseniusa* i wsp. są to długości wykorzystywane przy pomiarach rozpuszczonego węgla organicznego (DOC), [5];
- 420 nm - wg *Freseniusa* i wsp., *Hermanowicza* i wsp. tę długość fali stosuje się przy pomiarach absorbancji roztworów barwy żółto-brunatnej w celu określenia m.in. zawartości kwasów humusowych w wodach naturalnych [1, 5, 9];

- 465 i 665 nm – wg *Ilnickiego* oraz *Maryganovej* służących do pomiaru gęstości optycznej [10,16]. Stosunek absorbancji przy tych długościach fali jest wskaźnikiem udziału poszczególnych kwasów humusowych wskazującym na stopień humifikacji borowiny.
- Próby rozcieńczano wodą oraz alkoholem etylowym, dla których graniczna dł. fali przy grubości naczynka 1 cm wynosi odpowiednio 204 i 191 nm [17].

WYNIKI

Widma absorpcyjne UV-VIS (dla przykładu w zakresie 200-800 nm, przy prędkości skanowania 100 nm/min) roztworu wzorcowego kwasów humusowych oraz ich frakcji (kwasów fulwonowych, huminowych i hymatometalowych) przedstawiono na ryc.1.



Ryc. 1. Widma absorpcyjne UV-VIS wzorcowych kwasów humusowych (a) oraz ich frakcji: kwasów huminowych (b), kwasów hymatomelanowych (c), kwasów fulwonowych (d).
The UV-VIS spectra of humus acids (a), humic acids (b), hymatomelanolic acids (c) and fulvic acids (d)

W tabeli I zestawiono wartości ABS roztworów omawianych kwasów przy wybranych długościach fali promieniowania elektromagnetycznego: 254, 420, 436, 465 i 665 nm.

Tabela I. Wartości absorbancji wzorcowych roztworów kwasów: humusowych, hymatomelanowych, fulwonowych i huminowych przy wybranych długościach fali promieniowania UV-VIS
The absorbance values of the standard humic acid: hymatomelanolic acid, fulvic acid and humic acid, measured in UV-VIS spectra

Rodzaj kwasu	Stężenie/ rozcieńczenie	Absorbancja dla λ [nm]				
		254	420	436	465	665
humusowe	A	> 3	> 3	>3	> 3	1,122
	5 x rozc.	> 3	1,541	1,342	1,080	0,208
	10 x rozc.	2,921	0,782	0,677	0,546	0,103
	20 x rozc.*	1,462	0,383	0,332	0,266	0,049
	100 x rozc.	0,291	0,075	0,066	0,053	0,010
huminowe	B	> 3	> 3	> 3	> 3	1,564
	5 x rozc.	> 3	2,319	2,051	1,658	0,264
	25 x rozc.*	1,928	0,489	0,422	0,335	0,052
	125 x rozc.	0,405	0,102	0,089	0,071	0,014
hymatomelanowe	C	> 3	0,890	0,729	0,505	0,036
	5 x rozc.*	1,419	0,176	0,143	0,102	0,008
fulwonowe	D*	1,526	0,106	0,085	0,059	0,011

A – 100mg „humic acid“ f. Fluka / 100 ml 0,1 n NaOH (pH=12,39) **B** – po usunięciu kwasów fulwonowych z roztw. **A**, osad rozpuszczono w 10 ml 0,1 n NaOH (pH=11,68) **C** – 100mg „humic acid“ f. Fluka / 100 ml 99,8% C₂H₅OH **D** – 20 ml roztw. **A** + 2 ml 10% HCL (pH=1,65)

* - dla tych stężeń przedstawione są widma absorpcyjne (ryc 1).

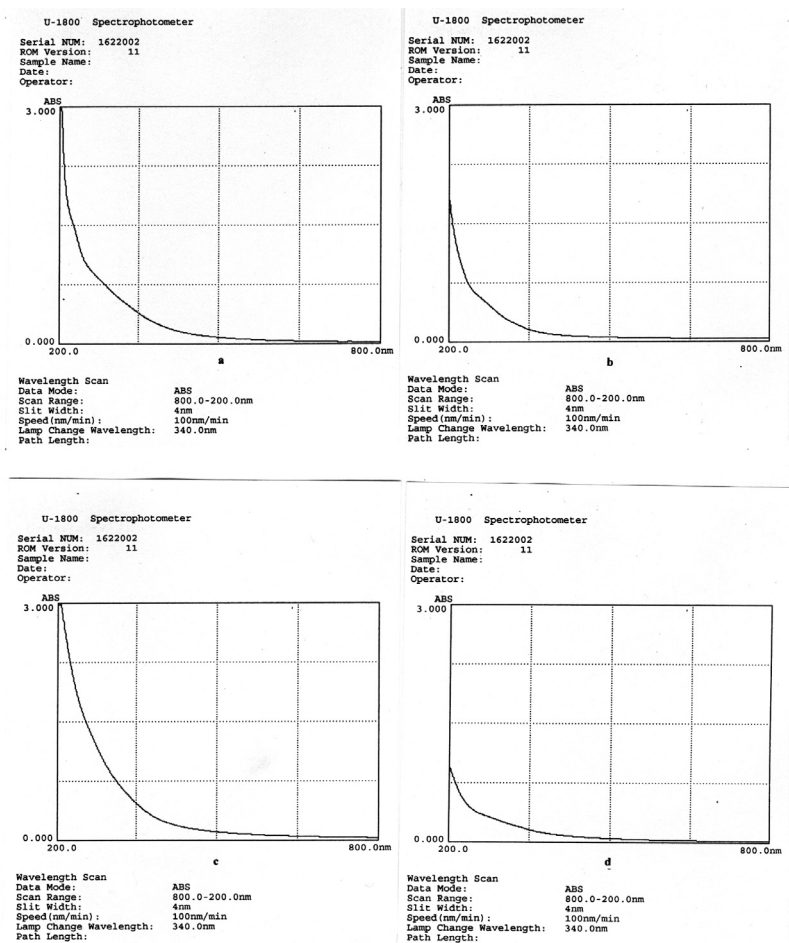
Z przedstawionych w tej tabeli danych wynika, że stosunek A_{465}/A_{665} największą wartość (średnio 13,4) osiąga dla frakcji kwasów hymatomelanowych. Dla pozostałych rodzajów omawianych kwasów stosunek ten waha mieści się w granicach wartości średnich 5,30 – 5,93.

Tabela II. Wartości absorbancji badanych ekstraktów borowinowych przy wybranych długościach fali promieniowania UV-VIS
The absorbance values of the measured peat extracts by the UV-VIS spectra

Ekstrakt borowinowy	Rozcieńczenie / odczyn (pH)	Absorbancja dla λ [nm]				
		254	420	436	465	665
Iwonka	bez rozc. / 8,51	> 3	1,222	1,019	0,757	0,174
	2 - krotne rozc.	> 3	0,605	0,503	0,373	0,086
	4 - krotne rozc.	1,893	0,316	0,264	0,197	0,052
	8 - krotne * rozc.	0,961	0,161	0,135	0,101	0,027
Kamień Pomorski	bez rozc. / 5,53	1,086	0,125	0,115	0,102	0,072
	2 - krotne * rozc.	0,577	0,075	0,068	0,060	0,039
Mielec	bez rozc. / 4,54	2,921	0,361	0,309	0,241	0,081
	2 - krotne * rozc.	1,471	0,190	0,164	0,133	0,046
	4 - krotne rozc.	0,727	0,092	0,079	0,063	0,021
Ustroń	bez rozc. * / 6,01	0,358	0,076	0,068	0,056	0,022

* - dla tych stężeń przedstawione są widma absorpcyjne (ryc. 2)

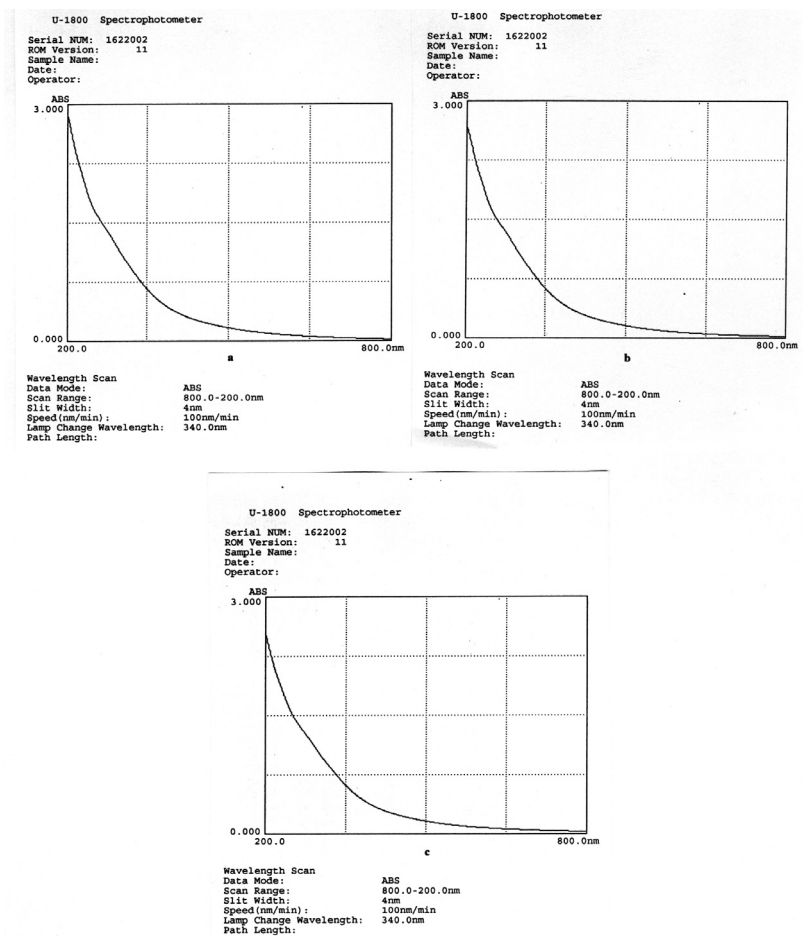
Wyniki wartości absorbancji dotyczące wodnych wyciągów z borowin pochodzących z różnego złoża: („Mielec”, „Iwonka”, „Kamień Pomorski”, „Ustroń”) zawarto z tabeli II. Ryc. 2 przedstawia widma absorpcyjne w/wym. ekstraktów borowinowych.



Ryc. 2. Widma absorpcyjne UV-VIS wodnych ekstraktów borowinowych z: kostki borowinowej „Iwonka” (a), borowiny - „Kamień Pomorski” (b), - „Mielec” (c), - „Ustroń” (d)
The UV-VIS spectra of the peat extracts: from the peat-product „Iwonka” (a), from peat beds: „Kamień Pomorski” (b), „Mielec” (c) and „Ustroń” (d)

Z tabeli II wynika, że największą wartość stosunku absorbancji przy długości 465 nm do absorbancji przy $\lambda = 665$ nm dla porównywalnych stężeń ekstraktów borowin stwierdzono w borowinie „Iwonka” (ok. 4,06), następnie „Mielec” (śr. 2,96), „Ustroń” (śr. 2,54) i „Kamień Pomorski” (1,48).

Na ryc. 3 przedstawiono widma absorpcyjne ekstraktu otrzymanego z kostki borowinowej „Iwonka”, która składa się w 85 % z borowiny, 5 % szlamu iwonicckiego i 10 % iwonicckiej soli leczniczej – poddanej procesom termicznym (w zakresie temperatur 50 –123°C).



Ryc. 3. Widma absorpcyjne UV-VIS ekstraktów z kostki borowinowej „Iwotka” poddanych obróbce termicznej: 50°C (a), 80°C (b), sterylizacji 123°C (c)

The UV-VIS spectra of the extracts from the peat-product „Iwotka” after heat at 50°C (a), 80°C (b) and after sterilisation 123°C (c)

Z tabeli III zawierającej wartości absorbancji dla ekstraktów tej borowiny ogrzewanej do różnej temperatury wynika, że w rezultacie wzrostu temp. ogrzewania z 50°C do 80°C oraz sterylizacji w temp. 123°C obserwowany jest wzrost stosunku A_{465}/A_{665} w granicach 16,5 % i 12,7 %.

Wykreślono także krzywą kalibracji wzorcowych kwasów humusowych w zakresie stężeń 1-30 mg/100ml przy $\lambda=420\text{nm}$. Obliczono metodą najmniejszych kwadratów stałe równania regresji krzywej kalibracji przyjmującej postać prostej wg równania $y=0,0576x + 0,007$.

Tabela III. Wartości absorpcji ekstraktów wodnych z kostki borowinowej „Iwonka“ poddanych obróbce termicznej przy wybranych długościach fali promieniowania UV-VIS
The absorbance values of the extracts from peat-product „Iwonka“ after heating this extracts by the UV-VIS spectra

Temperatura obróbki	Stężenie roztworu [%]	Absorbancja dla λ [nm]				
		254	420	436	465	665
50 °C	2,0 *	> 3	1,107	0,963	0,761	0,190
	1,0	2,769	0,558	0,486	0,384	0,097
	0,5 **	1,445	0,292	0,255	0,203	0,053
80 °C	2,0	> 3	1,146	0,995	0,784	0,170
	1,0	> 3	0,579	0,503	0,396	0,087
	0,5 **	1,526	0,288	0,250	0,197	0,043
123 °C	2,0	> 3	1,189	1,035	0,819	0,181
	1,0	> 3	0,608	0,529	0,418	0,095
	0,5 **	1,604	0,310	0,270	0,214	0,049

* - W tabeli podano stężenie roztworu przyjmując stężenie wyciągu borowinowego otrzymanego z f. Sulfhur jako 100 %.

** - dla tych stężeń przedstawione są widma absorpcyjne (ryc. 3).

OMÓWIENIE WYNIKÓW

Prostoliniowość krzywej kalibracyjnej wskazuje na brak odchyżeń od prawa absorpcji *Bouguera-Lamberta-Beera* dla badanego układu. Oznacza to, że analiza absorpcyjna przy długości fali 420 nm może być stosowana do oznaczeń ilościowych badanych kwasów humusowych.

Z uwagi na to, że handlowy preparat kwasów humusowych jak i wyizolowane z niego poszczególne frakcje są mieszaniną związków o różnej masie cząsteczkowej, przy wykreślaniu widma absorpcyjnego zastosowano szeroki zakres UV-VIS. Kształty linii widmowych badanych ekstraktów kwasów humusowych, w zakresie 200 – 800nm wskazują na brak wyraźnych, dobrze uformowanych i rozdzielonych pików, które pozwoliłyby na identyfikację poszczególnych związków. 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. Intensywny wzrost przebiegu linii na tym odcinku zwłaszcza ultrafioletu może być wynikiem udziału charakterystycznych grup chromoforowych występujących w badanych kwasach humusowych. Są to ugrupowania atomów zawierających elektrony π , np. (C=C max. absorpcji dla $\lambda = 185$ nm; C=O $\lambda = 188, 279$ nm; C₂H₆ $\lambda = 200, 256$ nm). Możliwy jest też wpływ auksochromowych podstawników (-CH₃ $\lambda = 262$ nm; -OH $\lambda = 275$ nm) powodujących przesunięcie pasma absorpcji w kierunku fal dłuższych i zmiany wartości absorpcji.

Wg danych z piśmiennictwa [7] do charakterystyki związków humusowych najczęściej używany jest parametr „absorpcyjny” tzn. stosunek absorpcji przy dł. fali 465 i 665 nm. Stosunek ten przy dowolnie wybranych długościach fali nie zależy od stężenia, jeśli tylko roztwór spełnia prawo absorpcji (B-L-B). Powyższe długości fali zostały wybrane przez *Welte'go* [20], który stwierdził, że stosunek absorpcji w długofalowej części widma widzialnego

świadczy o „lepszej” jakości humusu. Absorbancja w zakresie widzialnym także wg innych autorów [18] rośnie wraz z ogólną ilością węgla oraz ze wzrostem ciężaru cząsteczkowego kwasów huminowych i fulwowych. *Chen* i in. [3] w wyniku przeprowadzonych badań wykazał, że stosunek A_{465}/A_{665} jest ujemnie skorelowany z rozmiarem cząsteczek kwasów huminowych a więc i z ciężarem cząsteczkowym. Wg tego autora pomiędzy A_{465}/A_{665} a odczynem i zawartością: O,C,COOH oraz ogólną kwasowością istnieje zależność kwadratowa. Nie stwierdził też żadnego bezpośredniego związku pomiędzy A_{465}/A_{665} a ilością skondensowanych pierścieni aromatycznych w w/wym kwasach.

Na podstawie uzyskanych wyników w niniejszym opracowaniu, wyrażających stosunek absorbancji roztworów zmierzonych przy dł. fali 465 i 665 nm można wnioskować, że spośród frakcji uzyskanych z modelowych kwasów humusowych maksymalną wartość A_{465}/A_{665} wykazują kwasy hymatomelanowe. Świadczy to o mniejszej masie cząsteczkowej tych związków, mniejszej zawartości w nich związków aromatycznych a większej alifatycznych w porównaniu z pozostałymi frakcjami kwasów [16]. Z badanych preparatów borowinowych największym „wskaźnikiem humifikacji” cechuje się preparat kostka borowinowa „Iwonka”.

Wzbogacenie tej borowiny w ilości 10% solą iwonicką powoduje wprowadzenie do preparatu borowinowego dodatkowych soli nieorganicznych i mikropierwiastków. Dodana sól, powodując wzrost pH ekstraktu do ($> 8,0$) zwiększa rozpuszczalność zw. huminowych. W skład tej soli wchodzi m.in. aniony nieorganiczne (Cl, J, Br) stanowiące grupy absorbujące w zakresie głębokiego ultrafioletu. Z wielkości max. absorpcji tych chromoforów (zwłaszcza J, Br) wynika, że dodatek do borowiny soli iwonickiej powoduje wzrost wartości absorbancji badanego preparatu ale na granicy zastosowanego dolnego zakresu długości fal-200 nm [17].

Ogrzewanie tej borowiny do temp. 50°C nie powoduje istotnej zmiany w wartościach stosunku A_{465}/A_{665} . Dalsze ogrzewanie powoduje wyraźny wzrost wskazujący, że nastąpiło zmniejszenie masy cząsteczkowej, spadek spolimeryzowania jądra aromatycznego kwasów humusowych i zmniejszenie zawartości ugrupowań aromatycznych przy zwiększeniu alifatycznych [16].

Nieznaczny wzrost wartości A_{420} stwierdzony w wyniku ogrzewania ekstraktów borowinowych „Iwonka” prawdopodobnie związany jest ze zmianą struktury analizowanych kwasów. Można przypuszczać, że powstają tzw. „brunatne” kwasy huminowe. Charakteryzujące się one silniejszym charakterem kwasowym oraz mniejszą masą cząsteczkową i zawierają w swych strukturach stosunkowo dużo ugrupowań alifatycznych [10].

Uzyskane wyniki, przedstawione w niniejszym opracowaniu wskazują, że ilościowa analiza różnicowania kwasów humusowych zawartych w borowinach przy zastosowaniu metody spektrometrii UV-VIS jest niemożliwa z uwagi na brak dobrze ukształtowanych i rozdzielonych pików tzw. „absorbancji własnej” [17].

Z uwagi na prostoliniowy przebieg krzywej kalibracyjnej modelowych kwasów humusowych, spektrofotometryczną metodę poprzez pomiar absorbancji przy $\lambda = 420$ nm oraz stosunek A_{465}/A_{665} można jednak wykorzystać do badania zawartości zw. humusowych w różnych ekstraktach oraz oceny wpływu zastosowanych procesów technologicznych w ich produkcji.

WNIOSKI

1. W widmie absorpcyjnym modelowych kwasów humusowych jak też roztworów badanych tych kwasów w zakresie UV-VIS nie obserwuje się wyraźnych i rozdzielonych pików.
2. Pomiar absorbancji roztworu mierzonej przy $\lambda = 420$ nm pozwala na ilościowe oznaczenie łącznej zawartości kwasów huminowych, hymatomelanowych i fulwonowych.
3. Pomiar A_{420} i stosunku A_{465}/A_{665} można wykorzystać do analizy preparatów borowinowych tj. oznaczania w nich kwasów humusowych i efektywności procesów fizyczno-chemicznych zastosowanych w toku ich produkcji.

M. Drobnik, T. Latour, B. Krawczyk

BADANIA PREPARATÓW BOROWINOWYCH Z WYKORZYSTANIEM
SPEKTROFOTOMETRII ABSORPCYJNEJ UV-VIS

Streszczenie

W badaniu ekstraktów z borowin naturalnych i produkowanych z nich preparatów borowinowych zastosowano pomiary absorbancji w zakresie $\lambda = 200 - 800$ nm.

Obserwowano stopniowy wzrost widm absorpcyjnych począwszy od 450 nm w kierunku fal krótszych. Stwierdzono także prostoliniowość krzywej kalibracji w roztworze kwasów humusowych (preparat handlowy) przy $\lambda = 420$ nm. Określono stosunek A_{465}/A_{665} , którego wartości wskazują na udział wielkocząsteczkowych związków aromatycznych o różnej budowie chemicznej. Stwierdzono, że przy zastosowaniu spektrometrii w zakresie widzialnym można dokonać oceny wpływu zastosowanych technik produkcyjnych przy wytwarzaniu preparatów borowinowych.

M. Drobnik, T. Latour, B. Krawczyk

THE EXAMINATION OF PEAT PREPARATIONS BY THE UV-VIS
ABSORPTION SPECTROPHOTOMETRY

Summary

For the testing of natural peat extracts and preparations produced from them absorbance measurements in the range $\lambda = 200 - 800$ nm were used. The progressive increase of absorption spectra from 450 nm to short waves was observed. The curve calibration was rectilinear in a solution of humus acid (commercial preparation) when $\lambda = 420$ nm. The proportion A_{465}/A_{665} value indicates on participation of macromolecular aromatic compounds of different chemical structure. The application of spectrometry in the visible range enables the estimation of the influence of the applying technologies in peat preparations production.

PIŚMIENNICTWO

1. BN-90/9567-18/08 – dotycząca oznaczania metodą kolorymetryczną zawartości kwasów humusowych w wodach.

2. *Black A.P., Christman R.F.*: Chemical Characteristics of Fulvic acids. Jour. American Water Works Association. 1963, 55, 897-906.
3. *Chen Y., Senesi N., Schnitzer M.*: Information provided on humic substances by $E_{4/6}$ ratios. Soil Sci Soc, Am.J. 1977, 352-358.
4. *Drobnik M.*: Biologiczne oddziaływanie kwasów huminowych i fulwonowych zawartych w preparatach borowinowych funkcją stężenia czy postaci? Baln. Pol. 1995, 3-4, 79-83.
5. *Fresenius W., Quentin K.E., Schneider W.*: WaterAnalysis. A Practical Guide to Physico-Chemical, Chemical and Microbiological Water Examination and Quality Assurance. Springer –Verlag Berlin Heidelberg 1988, 547-549.
6. *Ghabbor E.A.*: Humic Substances-Structures, Models and Function, Royal Society of chemistry, 1998, 19-39.
7. *Golebiowska D.*: Spektrofotometria absorpcyjna w zakresie UV-VIS. Parametry i sposoby analizy widm absorpcyjnych związków humusowych. Opr. Metody badań substancji humusowych ekosystemów wodnych i lądowych. Wyd. AR, Szczecin, 2004, str.15-25.
8. *Grasset L., Ambles A.*: Structure of humin and humic acid from an acid soil as revealed by phase transfer catalyzed hydrolysis. Org. Geochem. 1998, 29(4), 881-891.
9. *Hermanowicz W., Dożańska W., Dojlido J., Koziorowski B.*: Fizyczno-chemiczne badania wody i ścieków. Arkady, W-wa, Wyd. I, 1976, 260-261.
10. *Ilnicki P.*: Torfowiska i torf. Wyd. AR Poznań, 2002, str. 436- 475.
11. *Kawatsuka S., Tsutsuki K., Kumada K.*: Elementary composition of humic acids. Chemical Studies on soil humic acids. J.Soil. Sci. Plant. Nutr. 1978, 24, 337-347.
12. *Knauf H., Fuchs V., Küchnert M.*: Chemische Isolierung von Huminsäuren aus Natur-stoffen unter Berücksichtigung tosisch wirkender Nebenprodukte. Mat. Symposium „Torf in der Medizin“-Bad Elster 22-24.IX.1981,I, 43-58.
13. *Lishtvan I.I., Puntus F.A., Naumova G.W., Dolidovitch E.F.*: Die Anwendung vor Torfen und Mud-den der chemischen und Peloid-Therapie. Wirkungmechanismen der Moortherapie. Telma, 1975, 5, 277-307.
14. *Lishtvan I.I.*: Physikalischemische Grundlagen des Torf- und Spropelieninsatzes in der Medi-zin. Mat. Symposium „Torf in der Medizin.Bad Elster, 22-24.IX.1981, I,1-12.
15. *Listvan I.I.*: Chemische Torfsubstanzen und Torfprodukte – Erfahrungen aus Weissrussland. Telma, 1996, 26, 163-170
16. *Maryganova V.*: Impact of various genesis on chemical structure of peat humic substances. Proc.11th Int. Peat Congr. Quebec, 2000, 618-626.
17. Poradnik fizykochemiczny. Wyd. II, WNT, Warszawa, 1974 r rodz. 4.3, 202-232.
18. *Schnitzer M., Khan S.U.* Humic substances ih the environement, MarcelDekker Inc. New York, 1972, 57-60.
19. *Senesi N.*: Molecular and Quantitative Aspects of Chemistry of Fulvic Acid and Its Interactions with Metal Ions and Organic Chemicals. Anal. Chim. Acta, 1992, 232, 51-75.
20. *Welte E.*: Neuere Ergebnisse der Humusfoschung. Angew. Chem. 1955,67,153-155.

Otrzymano: 2007.05.2007