

УДК 547.992:615838.7:616-073.584
© Коллектив авторов, 2018

Н.П. Аввакумова, М.А. Кривопалова, М.Н. Глубокова, А.В. Жданова, Е.Е. Катунина

ИССЛЕДОВАНИЕ СТРУКТУРЫ ГУМУСОВЫХ КИСЛОТ ПЕЛОИДОВ

ФГБОУ ВО «Самарский государственный медицинский университет»

Минздрава России, г. Самара

Высокая биологическая активность гуминовых веществ определяет необходимость исследования гумусовых кислот низкоминерализованных иловых сульфидных грязей. Актуальность изучения гумусовых кислот как индивидуальной фракции обусловлена простотой технологического извлечения их из нативной грязи и высоким выходом конечного продукта по сравнению с отдельными фракциями гуминовых веществ (гуминовые, гиматомелановые и фульвовые кислоты). В ходе исследования предложена методика выделения гумусовых кислот пелоидов, определен их элементный состав, выполнен ИК-, ЯМР13С- спектральный анализы. Результаты элементного анализа позволяют отнести выделенный препарат к классу гуминовых. На основании спектральных характеристик выявлены некоторые особенности строения и функционально-группового состава гумусовых кислот пелоидов. Совокупность полученных данных доказывает наличие в молекулярной структуре гумусовых кислот пелоидов ароматического конгломерата, в составе которого преобладают карбоксильные, карбонильные, спиртовые функциональные группы, а также значительное число алкильных групп.

Ключевые слова: гумусовые кислоты, пелоиды, элементный состав, спектральные характеристики.

N.P. Avvakumova, M.A. Krivopalova, M.N. Glubokova, A.V. Zhdanova, E.E. Katunina

THE STUDY OF THE STRUCTURE OF HUMIC ACIDS OF PELOIDS

High biological activity of humic substances determines the need for a research of humic acids of the low-mineralized silt sulphidic mud. The relevance of study of humic acids as individual fraction is connected with simplicity of their technological extraction from native dirt and substantial output of the final product in comparison with separate fractions (humic, hymatomelanic and fulvic acids) of humic substances. According to the method proposed in the work, the humic acids of peloids are isolated, their elemental composition is determined, IR, UV, NMR13C spectral analysis is performed. The results of elemental analysis allow us to refer the selected drug to the class of humic. On the basis of spectral characteristics some features of structure and functional group composition of humic acids of peloids are revealed. The obtained data proves the presence of aromatic conglomerate in the molecular structure of humic acids of peloids. In composition of this conglomerate carboxyl, carbonyl, alcohol functional groups predominate, as well as a significant number of alkyl groups.

Key words: humic acids, peloids, elemental composition, spectral characteristics.

Иловые сульфидные грязи характеризуются низкой степенью минерализации и являются источником экологически безопасных природных лекарственных субстанций. Исследования в области разработок новых биологически активных соединений показали, что гуминовые вещества различного генеза обладают репаративным, иммуномоделирующим, противовоспалительным, антиоксидантным действием [1-3]. Доказана противогрибковая и противовирусная активности гуминовых кислот, наиболее характерные для гуматов, содержащих ионы биогенных металлов [4,5]. Гуминовые вещества представляют собой сложную систему органических высокомолекулярных соединений, включающих гумин и гумусовые кислоты. В составе гумусовых кислот (ГСК) путем щелочной, спиртовой и кислотной экстракций выделяют гуминовые, гиматомелановые и фульвовые кислоты [6,7], которые являются продуктами частичной деструкции исходной макромолекулы. Являясь индивидуальной субстанцией, ГСК пелоидов обладают уникальными физико-химическими свойствами и присущими только им биологической активностью. Актуальность детального исследования ГСК обуслов-

лена простотой их извлечения из нативной грязи с использованием менее ресурсозатратной технологии, более высоким выходом продукта по сравнению с отдельными фракциями и, следовательно, является экономически целесообразным. В литературе информация о гумусовых кислотах пелоидов представлена незначительным количеством публикаций [3].

Целью исследования явилось изучение структуры гумусовых кислот и их производных.

Материал и методы

Объектом исследования явились гумусовые кислоты низкоминерализованных иловых сульфидных грязей Самарского региона, выделенные по следующей методике: деминерализацию грязи осуществляли многократной обработкой 2 моль/л раствором хлороводородной кислоты до отрицательной реакции на сульфид-ионы (проба с ацетатом свинца). Осадок переносили на бумажный фильтр и промывали водой до отрицательной реакции на ионы кальция (проба с оксалатом аммония) и хлорид-ионы (проба с нитратом серебра). Экстракцию гумусовых кислот проводили раствором натрия гидроксида в концентрации 0,5 моль/л, промывая отмытый от ионов осадок. Полученный раствор отфильтровывали и пропускали через делитель-

ную воронку, заполненную катионитом КУ-2 в Н-форме. При этом контролировали pH элюента, который характеризовался кислой реакцией. Раствор высушивали при температуре 35–40°C с принудительной вентиляцией. Полученный образец, представляющий собой черные, блестящие, чешуйчатые кристаллы, подвергали элементному анализу на анализаторе EA-1108 (Carlo Erba, Италия) при температуре 1010°C в постоянном потоке гелия.

Спектры поглощения растворов ГСК в видимой области получены на спектрофотометре СФ-56. Пробу для анализа получали растворением сухой навески ГСК в 0,01М растворе натрия гидроксида с последующим выдерживанием на водяной бане при температуре 40–60° С. Полученные темноокрашенные растворы отфильтровывали через бумажный фильтр и нейтрализовали раствором хлороводородной кислоты до pH 7,4 и доводили дистиллированной водой до определенного объема для получения 0,001% раствора. Для сравнительной характеристики препаратов использовали соотношение поглощения при $\lambda = 465$ и $\lambda = 665$ ($E_4:E_6$).

ИК-спектры полученных образцов снимали на ИК-Фурье спектрофотометре Spectrum 100 (Perkin Elmer, Швейцария). Пробы для анализа готовили прессованием таблеток с калия бромидом.

Спектры ЯМР ^{13}C регистрировали на спектрометре «Bruker Avance-400» (100,62 МГц) (Германия) в растворе D_2O с числом накоплений $N=128$ и цифровым разрешением 0,2 Гц/т. В качестве растворителя использовали 0,1 М раствор NaOD в D_2O . Спектры электронного парамагнитного резонанса (ЭПР) получали на спектрометре «Bruker EMX plus X» (Германия). В качестве эталона интенсивности и g-фактора использовали стандарт 1,1'-дифенил-2-пикрилгидразил (ДФПГ).

Результаты и обсуждение

Результаты элементного анализа ГСК, приведенные в табл. 1, показывают, что полученные образцы характеризуются низкой зольностью. Содержание углерода и водорода в составе ГСК несущественно отличается от аналогичных величин гуминовых и гиматомелановых кислот, количество углерода и водорода для всех перечисленных фракций находится в интервале 55 – 60 и 4 – 5,5% (масс.). Содержание азота и кислорода в ГСК составляет 4,16 и 34,97% (масс.), что находится на уровне общепринятых значений для фракций гумусовых кислот. Следует отметить, что количественные характеристики ГСК в целом близки по значению к аналогичным показателям гуминовых и гиматомелановых кислот, но не являются среднеарифметическим значением этих параметров отдельных фракций.

Таблица 1

Элементный состав гумусовых кислот пелоидов (в массовых и мольных процентах)

Образец ГСК	Содержание элементов				Атомные соотношения	
	С	Н	N	O	H/C	O/C
% масс.	55,78±0,01	4,01±1,30	4,16±0,91	34,97±0,14	0,86	0,47
% моль.	41,60±0,74	35,88±1,42	2,66±0,58	19,56±0,07	–	–

Рассчитанное по общепринятым формулам [8] отношение содержания водорода к углероду, равное 0,86, находится в интервале значений гуминовых и гиматомелановых кислот [9, 10] и показывает наличие в составе ГСК как алифатических, так и ароматических фрагментов. Значение отношения содержания кислорода к углероду составляет 0,47, что указывает на относительно небольшое количество кислорода, и близко по значению к показателю гуминовых кислот (0,46).

Спектр поглощения выделенных ГСК в интервале от 200 до 700 нм представляет собой плоскую, ниспадающую в сторону больших длин волн кривую. Соотношение $E_4:E_6$ для исследуемого образца имеет небольшие колебания и в среднем составляет 2,38.

На ИК-спектре (см. рисунок) в интервале значений 3200–3430 см^{-1} находится интенсивный пик, свидетельствующий о наличии ОН-групп, связанных водородными связями. Али-

фатические фрагменты (CH_3 , CH_2) обуславливают пики в области 2920 и 2850 см^{-1} . Интенсивные полосы в области 1710 и 1600 см^{-1} связаны с присутствием карбонильной группы как в виде свободной карбоксильной, так и в ионной карбоксилатной форме. В области 1400 см^{-1} присутствуют пики, соответствующие деформационным колебаниям С-О, С-С. Широкая полоса в области 1300–1000 см^{-1} относится к колебаниям С-О различной природы.

Сравнительный анализ ИК-спектров ГСК и гуминовых кислот [10] показывает, что они имеют близкое строение, структурными элементами которого являются сходные функциональные группы карбонильной, спиртовой и алифатической природы.

В спектрах ЯМР ^{13}C сигналы имеют широкий мало разрешенный профиль, что связано с перекрыванием нескольких сигналов. В силу гетерогенности и полидисперсности ГСК окружение атомов углерода, входя-

щих в структуру гумусовых кислот пелоидов, разнородно. В области 55-18 м.д. спектры характеризуются сигналами, соответствующими

атомам углерода метиленовых групп, а в области 18-21 м.д. – метильным заместителям (табл. 2).

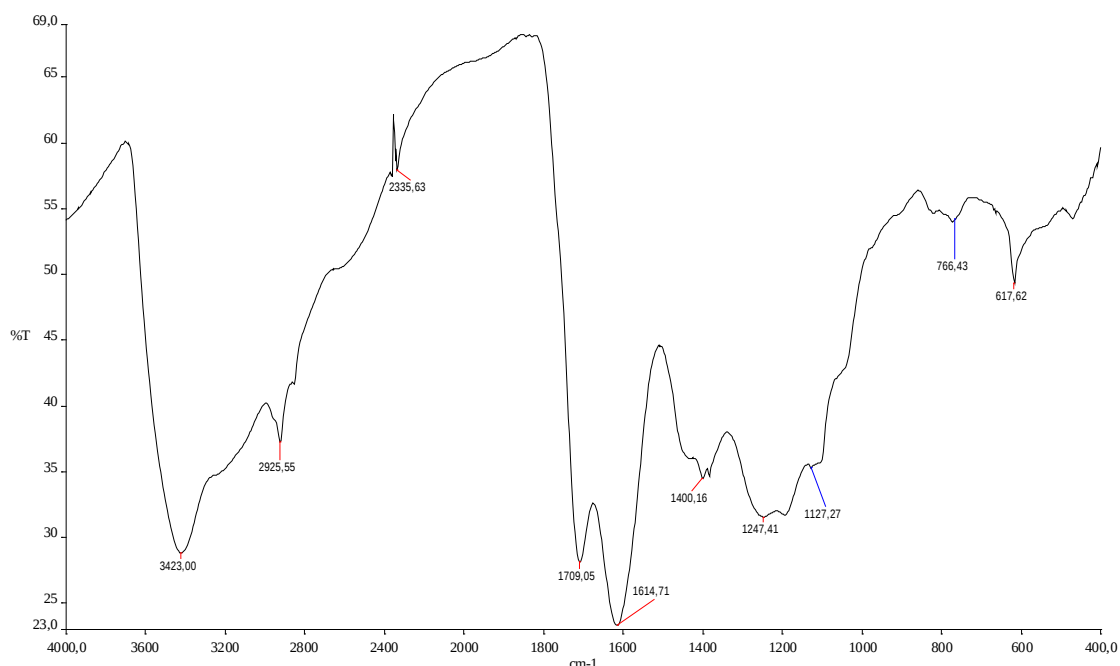


Рис. ИК-спектр гумусовых кислот пелоидов

Таблица 2

Значения химических сдвигов ЯМР ^{13}C ГСК

Показатель	Группы					
	C=O	COOH	C _{аром} -O	C _{аром}	C-O	C _{алиф}
Δ , м.д.	202,59	168,46	147,78	108,02	87,95	18,27
	204,00	174,29		115,65	68,47	24,26
	209,83			118,67	79,71	
	218,86			119,87	56,03	
				122,69		
				125,68		

В интервале значений химических сдвигов 100–150 м.д. обычно присутствуют сигналы, которые можно отнести к атомам углерода как ароматического, так и олефинового происхождения. В диапазоне 105–144 м.д. исследуемой фракции присутствует сложный мультиплет, соответствующий атомам углерода как ненасыщенного, так и Н-замещенного ароматического характера. Карбоксильные атомы углерода характеризуются сигналом в области значений химических сдвигов 164–184 м.д., сильнополюсный сдвиг которых указывает на присутствие в α -положении электроноакцепторных заместителей типа NH_2 или OH . Пик со значением 174 м.д. можно связать с наличием атомов углерода сложноэфирных фрагментов. Пики в области 180-220 м.д. отвечают карбонильному атому углерода, связанному с алифатическим фрагментом.

Основные параметры ЭПР, такие как интенсивность, форма и ширина резонансной линии и g -фактор, позволили оценить концентрацию неспаренных электронов в образце гумусовых кислот. На спектре идентифицируется ин-

тенсивная широкая линия с $g=2,003$, что указывает на присутствие свободных радикалов. Содержание парамагнитных центров, которое составляет $3,66 \times 10^{15}$ спин/г, рассчитывали по известной концентрации спинов угольного пека. Высокое количество парамагнитных центров в гумусовых кислотах пелоидов характеризует наличие свободных радикалов, концентрация которых составляет 15×10^{16} спин/г.

Выводы

1. Полученные результаты элементного и спектрального анализов позволяют отнести выделенную субстанцию гумусовых кислот низкоминерализованных иловых сульфидных грязей к природному классу гуминовых веществ.

2. Гумусовые кислоты пелоидов обладают макромолекулярной структурой, включающей конденсированный ароматический агрегат, в боковых ответвлениях которого находятся фрагменты алифатического типа. Ароматический компонент, по-видимому, состоит преимущественно из колец хиноидного типа и имеет кислородсодержащие заместители различного типа.

3. Наличие парамагнитных центров в структуре гумусовых кислот определяет перспективность применения субстанции в качестве антиоксидантного природного средства с высокой биологической активностью.

Сведения об авторах статьи:

Аввакумова Надежда Петровна – д.б.н., профессор, зав. кафедрой общей, биоорганической и бионеорганической химии ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России. Адрес: 443001, г. Самара, ул. Арцыбушевская, 171. Тел./факс: 8(846)337-56-46.

Кривопадова Мария Ариевна – к.х.н., доцент кафедры общей, биоорганической и бионеорганической химии ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России. Адрес: 443001, г. Самара, ул. Арцыбушевская, 171. Тел./факс: 8(846)337-56-46.

Глубокова Мария Николаевна – к.фарм.н., доцент кафедры общей, биоорганической и бионеорганической химии ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России. Адрес: 443001, г. Самара, ул. Арцыбушевская, 171. Тел./факс: 8(846)337-56-46.

Жданова Алина Валитовна – к.фарм.н., доцент кафедры общей, биоорганической и бионеорганической химии ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России. Адрес: 443001, г. Самара, ул. Арцыбушевская, 171. Тел./факс: 8(846)337-56-46. E-mail: avzhdanova@mail.ru.

Катунина Елена Евгеньевна – к.б.н., доцент кафедры общей, биоорганической и бионеорганической химии ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России. Адрес: 443001, г. Самара, ул. Арцыбушевская, 171. Тел./факс: 8(846)337-56-46.

ЛИТЕРАТУРА

1. Полуянова, И.Е. Биологическая активность гуминовых веществ, получаемых из торфа, и возможности их использования в лечебной практике / И.Е. Полуянова // Международные обзоры: клиническая практика и здоровье. – 2017. – № 4. – С.114-122.
2. Аввакумова, Н.П. Противовоспалительная активность препаратов в ряду гумусовых кислот низкоминерализованных иловых сульфидных грязей / Н.П. Аввакумова // Международный журнал по иммунореабилитации. – 2002. – Т. 4, № 1. – С. 190-191.
3. Аввакумова, Н.П. Биохимические аспекты терапевтической эффективности гумусовых кислот лечебных грязей / Н.П. Аввакумова. – Самара: ГП Перспектива, 2002. – 124 с.
4. Пат. 2340328 РФ. Средство, обладающее противомикробным и противогрибковым действием / А.У. Зиганшин и др. Опубликовано 10.12.2008. - Бюлл. 34. Заявка 2007137174/15, 27.09.2007.
5. Пат. 2407535 РФ. Биологически активное средство для лечения дерматозов / В.В. Чаков. Опубликовано: 27.12.2010 Бюл. № 36. Заявка: 2008144455/15, 10.11.2008
6. Пат. №2480224 РФ. Способ получения биологически активной субстанции гуминовых кислот из низкоминерализованных иловых сульфидных грязей /Н.П. Аввакумова, М.А. Кривопадова, И.В. Фомин. Опубликовано: 27.04.2013 Бюл. № 12. Заявка: 2011101024/15, 12.01.2011
7. Чуков, С.Н. Структурно-функциональные параметры органического вещества почв в условиях антропогенного воздействия / С.Н. Чуков. – СПб.: СПбГУ, 2001. – 216 с.
8. Орлов, Д.С. Гумусовые кислоты почв и общая теория гумификации / Д.С. Орлов // Химия почв. – М.: МГУ, 1992. – 325 с.
9. Chilot, G. Exploring the high-mass components of humic acid by laser desorption ionization mass spectrometry /G. Gilot, O.Gilot, J.Race/ Rapid Commun. Mass spectrometry. – 2008. – №10. – pp.1528-1532.
10. Аввакумова, Н.П. Некоторые особенности функционально-группового состава гумусовых кислот пеллоидов / Н.П.Аввакумова, М.А.Кривопадова, И.В.Фомин, А.В.Жданова // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. – 2010.- № 11. - С.24-27.

REFERENCES

1. Poluyanova, I.E. Biologicheskaya aktivnost' guminovykh veshchestv, poluchaemykh iz torfa, i vozmozhnosti ikh ispol'zovaniya v lechebnoi praktike (Biological activity of humic substances derived from peat, and the possibility of their use in medical practice) Mezhdunarodnye obzory: klinicheskaya praktika i zdorov'e, 2017, № 4, p.114-122. (in Russian)
2. Avvakumova, N.P. Protivovospalitel'naya aktivnost' preparatov v ryadu gumusovykh kislot nizkomинерализovannykh ilovykh sul'fidnykh gryazei (Anti-inflammatory activity of drugs in the range of humic acids of low-mineralized silt sulfide mud) Mezhdunarodnyi zhurnal po immunoreabilitatsii, 2002, vol. 4, № 1, p. 190-191. (in Russian)
3. Avvakumova, N.P. Biokhimicheskie aspekty terapevticheskoi effektivnosti gumusovykh kislot lechebnykh gryazei (Biochemical aspects of therapeutic effectiveness of humic acids of therapeutic muds). Samara: GP Perspektiva, 2002, 124 p. (in Russian)
4. Ziganshin A.U. et al.. Sredstvo, obladayushchee protivomikrobnym i protivogribkovym deistviem (Means having antimicrobial and antifungal action) Pat. 2340328 RF. 10.12.2008, Byull. 34, Zayavka 2007137174/15, 27.09.2007. (in Russian)
5. Chakov V.V. Biologicheskii aktivnoe sredstvo dlya lecheniya dermatozov (Biologically active agent for the treatment of dermatoses) Pat. 2407535 RF. 27.12.2010 Byul. № 36. Zayavka: 2008144455/15, 10.11.2008(in Russian)
7. Avvakumova N.P., Krivopalova M.A., Fomin I.V. Pat. №2480224 RF. Sposob polucheniya biologicheskii aktivnoi substantsii guminovykh kislot iz nizkomинерализovannykh ilovykh sul'fidnykh gryazei (A method for producing a biologically active substance of humic acids from low-mineralized silt sulfide mud) 27.04.2013 Byul. № 12. Zayavka: 2011101024/15, 12.01.2011(in Russian)
8. Chukov, S.N. Strukturno-funktsional'nye parametry organicheskogo veshchestva pochv v usloviyakh antropogennogo vozdeistviya (Structural and functional parameters of soil organic matter under anthropogenic influence) SPb.: SPbgu, 2001, 216 p. (in Russian)
9. Orlov, D.S. Gumusovye kisloty pochv i obshchaya teoriya gumifikatsii Khimiya pochv (Soil Humus acids and the General theory of humification). Moscow, MGU, 1992, 325 p. (in Russian)
10. Chilot, G., Gilot O., Race J. Exploring the high-mass components of humic acid by laser desorption ionization mass spectrometry. Rapid Commun. Mass spectrometry, 2008, №10, pp.1528-1532. (in English)
11. Avvakumova N. P., Krivopalova M. A., Fomin I. V., Zhdanova A. V. Some features of the functional group composition of humic acids of peloids. Problems Of Biological, Medical And Pharmaceutical Chemistry, 2010, № 11, p.24-27. (in Russian)