

Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего
профессионального образования
«Омская государственная медицинская академия»
Министерства здравоохранения Российской Федерации

На правах рукописи



Савченко Ирина Александровна

ХИМИКО-ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ГУМИНОВЫХ
ВЕЩЕСТВ САПРОПЕЛЯ ОЗЕРА ГОРЧАКОВО

14.04.02 – фармацевтическая химия, фармакогнозия

Диссертация
на соискание ученой степени
кандидата фармацевтических наук

Научный руководитель:
кандидат фармацевтических наук,
доцент Е.А. Лукша

Омск – 2015

СОДЕРЖАНИЕ

Введение.....	5
Список сокращений.....	10
Глава 1. СОВРЕМЕННЫЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЯ О СТРОЕНИИ, МЕТОДАХ ВЫДЕЛЕНИЯ И СВОЙСТВАХ ГУМИНОВЫХ ВЕЩЕСТВ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ).....	12
1.1. Природные источники гуминовых веществ.....	12
1.2. Характеристика ресурсного потенциала сапропелевых гуминовых веществ на территории Российской Федерации....	13
1.3. Современная классификация гуминовых веществ.....	19
1.4. Проблемы и принципы изучения состава, структуры и свойств гуминовых кислот.....	22
1.5. Методы выделения и модификации гуминовых веществ...	27
1.6. Методы исследования гуминовых кислот.....	30
1.7. Биологическая активность гуминовых веществ.....	36
1.8. Применение гуминовых веществ в медицине.....	39
1.9. Проблемы стандартизации.....	41
Заключение по главе 1.....	43
Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДИКИ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	45
2.1. Характеристика объектов исследования.....	45
2.2. Метод отбора проб.....	46
2.3. Методики определения экотоксикантов в объектах исследования.....	47
2.4. Методики выделения гуминовых веществ из сапропеля.....	48
2.5. Методики изучения элементного состава гуминовых веществ.....	55
2.6. Методики определения подлинности структурных компонентов гуминовых веществ.....	56

2.7. Методики определения показателей чистоты гуминовых веществ.....	58
2.8. Исследование морфологии поверхности гуминовых веществ.....	59
2.9. Спектроскопические методы исследования гуминовых веществ.....	59
2.10. Методики количественного определения функциональных групп кислотного характера	60
2.11. Методы исследования сорбционных свойств и антиоксидантной активности сапропеля и гуминовых веществ.....	64
2.12. Валидационная оценка аналитических методик.....	66
2.13. Методы статистической обработки результатов исследований.....	67
Глава 3. ОПТИМИЗАЦИЯ ВЫДЕЛЕНИЯ ГУМИНОВЫХ ВЕЩЕСТВ ИЗ САПРОПЕЛЯ.....	68
3.1. Фармакогностическая оценка сапропеля озера Горчаково как источника гуминовых веществ.....	68
3.2. Результаты определения экотоксикантов в сапропеле.....	70
3.3. Состав сапропеля озера Горчаково.....	72
3.4. Изучение влияния физических факторов на количественный выход и свойства гуминовых веществ.....	74
Заключение по главе 3.....	81
Глава 4. ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ГУМИНОВЫХ ВЕЩЕСТВ САПРОПЕЛЯ ОЗЕРА ГОРЧАКОВО.....	83
4.1. Результаты определения экотоксикантов в гуминовых веществах.....	83
4.2. Исследование химических свойств гуминовых веществ....	84
4.3. Результаты элементного анализа гуминовых веществ.....	86

4.4. Результаты исследования морфологии поверхности гуминовых веществ методом сканирующей электронной микроскопии.....	89
4.5. Спектральные характеристики гуминовых веществ.....	92
4.6. Количественное определение функциональных групп, обладающих кислотными свойствами.....	101
4.7. Результаты исследования сорбционных свойств и антиоксидантной активности гуминовых веществ.....	108
Заключение по главе 4.....	111
Глава 5. ПОКАЗАТЕЛИ КАЧЕСТВА САПРОПЕЛЯ И ГУМИНОВЫХ ВЕЩЕСТВ.....	112
5.1. Показатели качества сапропеля как источника гуминовых веществ.....	112
5.2. Показатели качества гуминовых веществ активированных.....	122
Заклучение по главе 5.....	134
Выводы.....	135
Список литературы.....	137
Приложения.....	165

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность. Одной из приоритетных задач фармации в современном мире является создание отечественных лекарственных средств на основе сырья природного происхождения. Сапропель, как возобновляемый природный ресурс, является перспективным сырьем для выделения и получения гуминовых веществ. Гуминовые вещества (ГВ) представляют собой сложные высокомолекулярные полидисперсные соединения стохастического характера, обладающие биологической активностью. Исследования последних десятилетий свидетельствуют о том, что строение и свойства гуминовых веществ зависят не только от вида исходного сырья, но и от месторождения конкретного сырьевого источника [98, 192].

Воздействие различных факторов (ультразвук, УФ-свет, температура и др.), применяемых в процессе выделения ГВ для повышения их биодоступности и увеличения выхода из природных объектов, изменяет их структуру и свойства, что в итоге влияет на биологическую активность конечного продукта [92, 103, 108, 182].

Данные по исследованию биологической активности гуминовых веществ, достаточные сырьевые ресурсы экологически чистого и доступного для переработки источника ГВ – сапропеля на территории Омской области, определяют перспективность изучения гуминовых соединений для внедрения в медицинскую практику. В связи с этим проведение комплексного сравнительного химико-фармацевтического исследования гуминовых веществ из сапропеля озера Горчаково, является актуальным.

Цель и задачи исследования.

Целью работы явилось химико-фармацевтическое изучение гуминовых веществ сапропеля озера Горчаково Тюкалинского района Омской области.

Для достижения поставленной цели необходимо было решить следующие задачи:

– изучить химический состав сапропеля озера Горчаково и определить содержание в нем экотоксикантов;

- изучить влияние различных физических и химических факторов на процесс извлечения гуминовых веществ из сапропеля;
- определить химический состав и установить спектральные характеристики выделенных гуминовых веществ;
- выявить оптимальные критерии качественной и количественной стандартизации сапропеля и гуминовых веществ;
- разработать нормативную документацию на сапропель и РСО «Гуминовые вещества».

Научная новизна. В результате исследования химического состава сапропеля озера Горчаково Тюкалинского района Омской области установлено, что органическая часть сапропеля включает липофильные компоненты, гуминовые вещества, в т.ч. гуминовые и гиматомелановые кислоты, фульвокислоты, водорастворимые и легкогидролизуемые вещества и негидролизуемый остаток. Исследуемый сапропель не содержит в составе хлорорганические пестициды, удельная эффективная активность природных радионуклидов в образцах сапропеля не превышает предельно допустимые значения для лечебных грязей, содержание тяжелых металлов в объектах анализа не превышает гигиенические нормативы. Установлено, что доминирующей группой БАВ сапропеля являются гуминовые вещества. Определены числовые показатели (влажность, зольность, содержание гуминовых веществ).

Исследована зависимость выхода гуминовых веществ из сапропеля от различных физических факторов (УЗ-кавитация, УФ-облучение, температура). При выделении гуминовых веществ из сапропеля использовано УФ-облучение щелочного гидролизата с целью получения модифицированных гуминовых соединений. Изучены свойства выделенных гуминовых веществ. Адаптированы методики качественного и количественного определения гуминовых веществ. Впервые показана возможность применения метода Бозма с кондуктометрической фиксацией точки эквивалентности для количественного определения гуминовых веществ.

Практическая значимость. На основании данных химического и фармакогностического анализа разработаны: проект ФСП «Сапропель озера Горчаково»; проект ФСП «Гуминовые вещества активированные»; проект ТУ «Гуминовые вещества активированные озера Горчаково – стандартный образец»; методические рекомендации «Количественное определение функциональных групп кислотного характера в гуминовых веществах методом Боэма с кондуктометрической фиксацией конечной точки титрования».

Методы исследования. Применительно к проблематике диссертации использован комплекс спектральных (УФ, ИК, ЯМР), экстракционных, химических, микроскопических, биохимических и статистических методов исследований, а также современные методики сбора и обработки исходной научной информации.

Степень внедрения. Разработанные методические рекомендации внедрены в рабочий процесс ООО «Биолит», г. Томск, используются при проведении научно-исследовательских работ в лаборатории резистентности животных института ветеринарной медицины и биотехнологии ФГБОУ ВПО ОмГАУ им. П. А. Столыпина, а также в учебном процессе кафедры фармацевтической, аналитической и токсикологической химии ГБОУ ВПО «Омская государственная медицинская академия», кафедры фармацевтической химии ГБОУ ВПО «Тюменская государственная медицинская академия».

На защиту выносятся:

- данные изучения химического состава сапропеля озера Горчаково Тюкалинского района Омской области;
- результаты изучения влияния различных факторов на процесс выделения гуминовых веществ из сапропеля;
- результаты исследования физико-химических свойств выделенных из сапропеля гуминовых веществ;
- методики качественного и количественного определения гуминовых веществ.

Апробация полученных результатов. Основные положения работы доложены и обобщены на научно-практических конференциях: 66-ой региональной конференции по фармации и фармакологии «Разработка, исследование и маркетинг новой фармацевтической продукции» (Пятигорск, 2011); Всероссийской научно-практической конференции «Актуальные проблемы фармацевтической науки и практики» (Владикавказ, 2013), Всероссийской научно-методической конференции с международным участием «Инновационные технологии в фармации», посвященной 95-летию Иркутского государственного медицинского университета (Иркутск, 2014); Всероссийском съезде фармацевтических работников (Москва, 2014), Всероссийской научно-практической конференции «Теоретические и прикладные исследования в области естественных и гуманитарных наук» (Прокопьевск, 2014).

Связь задач исследования с проблемным планом фармацевтических наук. Диссертационная работа выполнена в соответствии с планом научных исследований ГБОУ ВПО «Омская государственная медицинская академия» Минздрава России, тематикой проблемной комиссии «Актуальные проблемы лекарствоведения в Сибирском регионе №7».

Личный вклад автора. Автор принимал участие в определении цели исследования и путей ее реализации, планировании и выполнении экспериментов. Автором проводились химические, фармакологические виды исследований, анализ, статистическая обработка, научное обоснование и обобщение полученных результатов. Согласно сформулированным задачам подготовлены доклады, тезисы и статьи, оформлена диссертация, автореферат, представленные к защите.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности. Научные положения диссертации соответствуют формуле специальности 14.04.02 – фармацевтическая химия, фармакогнозия, конкретно пунктам 2, 3 и 6.

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 13 работ, в том числе 8 статей в изданиях Перечня ВАК МОиН РФ.

Объем и структура диссертационной работы. Диссертация изложена на 209 печатных страницах, состоит из введения, обзора литературы, 4 глав

экспериментальной части, выводов, списка цитируемой литературы, состоящего из 282 источников, в том числе 75 на иностранных языках, и включает 32 рисунка, 31 таблицу и 8 приложений.

Благодарность. Автор выражает глубочайшую благодарность и признательность главному научному сотруднику СО РАН Института проблем переработки углеводов, доктору химических наук, профессору Георгию Валентиновичу Плаксину за помощь в проведении исследований.

Список сокращений:

АлАТ – аланинаминотрансфераза;

АсАТ – аспартатаминотрансфераза;

АОА – антиоксидантная активность;

БАВ – биологически активные вещества;

ВРВ – водорастворимые вещества;

ГВ – гуминовые вещества;

ГВА – гуминовые вещества активированные;

ГМК – гиматомелановые кислоты;

ГК – гуминовые кислоты;

ГОСТ – государственный отраслевой стандарт;

ГСО – Государственный стандартный образец;

ГФ – Государственная фармакопея;

ГХЦГ – гексахлорциклогексан;

ДДД – дихлордифенилдихлорэтан;

ДДТ – дихлордифенилтрихлорэтан;

ДДЭ – дихлордифенилдихлорэтилен;

ДМСО – диметилсульфоксид;

ДМФА – диметилформамид;

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота;

ИК – инфракрасная спектроскопия;

ЛГВ – легкогидролизуемые вещества;

ЛД₅₀ – среднелетальная доза;

ЛС – лекарственное средство;

НГО – негидролизуемый остаток;

ОСТ – отраслевой стандарт;

ОФС – общая фармакопейная статья;

ПЭГ – полиэтиленгликоль;

ПДК – предельно допустимая концентрация;

РСО – рабочий стандартный образец;

СФ – спектрофотометрия, спектрофотометр;

т.н. – точная навеска;

ТГВ – трудногидролизуемые вещества;

ТСХ – хроматография в тонком слое сорбента;

УФ – ультрафиолетовый;

ХОП – хлорорганические пестициды;

ФК – фульвовые кислоты;

ФГ – функциональные группы;

ФС – фармакопейная статья;

ФСП – фармакопейная статья предприятия;

ЭПР – электронный парамагнитный резонанс;

ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота;

ЯМР – ядерно-магнитный резонанс.

ГЛАВА 1. СОВРЕМЕННЫЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЯ О СТРОЕНИИ, МЕТОДАХ ВЫДЕЛЕНИЯ И СВОЙСТВАХ ГУМИНОВЫХ ВЕЩЕСТВ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

1.1. Природные источники гуминовых веществ

Среди биологически активных веществ природного происхождения особое место занимают гуминовые вещества (ГВ), представляющие собой полидисперсные биополимеры сложного строения с высокой молекулярной массой [17, 82, 89, 90, 119, 251]. Большой интерес ученых к гуминовым веществам, проявляемый в последние несколько десятилетий, объясняется их важными биологическими функциями и широкой распространенностью в природе [4, 13, 14-16, 42, 132, 215, 225, 233-236]. На основе ГВ созданы разнообразные препараты для сельского хозяйства, ветеринарии и ряд биологически активных добавок, применяемых в медицинской практике.

Гуминовые вещества являются одними из главных компонентов органического вещества твердых горючих ископаемых, торфов, морских и озерных донных отложений, почв [132, 259, 276].

Наиболее богатым природным источником гуминовых веществ является окисленный бурый уголь, представляющий собой природное ископаемое, формирующееся в земле на протяжении миллионов лет химическим и биологическим разложением доисторических растений и животных. Содержание гуминовых веществ в нем составляет до 85% [112, 132, 261]. Добыча бурого угля затруднена, так как запасы его залегают на глубине 100 м и более, и при добыче он способен к самовозгоранию [65]. Этот природный ресурс является практически невозобновляемым.

Второй по значимости источник гуматов — торф, представляющий собой осадочное возобновляемое полезное ископаемое, образовавшееся путем биохимического разложения болотных растений. Содержание гуминовых веществ в торфе составляет от 5 до 52% [28, 93, 95]. Использовать этот природный ресурс сложно, так как основная часть торфа находится в труднодоступных

неосушенных болотах. Кроме того, при торфяных разработках нарушаются естественные экосистемы [76].

Третий по объему добычи источник гуминовых веществ — сапропель. Содержание ГВ в сапропелях изменяется в широком диапазоне от 6,7 до 71,2 % [84]. С современных позиций сапропель классифицируют как исчерпаемый и одновременно возобновляемый природно-сырьевой ресурс, что определяет преимущество использования сапропеля в качестве источника гуминовых веществ [10, 83, 91, 102, 117, 119, 135]. Параллельно при добыче сапропеля происходит очистка заиляющихся озер, что благоприятно сказывается на их экологическом состоянии [84, 228].

Наименьшее количество гуминовых веществ содержится в почвах: от 1 до 12% [132]. При этом ГВ в почвах находятся в составе сложных органоминеральных комплексов, которые не всегда являются экологически безопасными. Кроме того, влияние антропогенных факторов на почвенные ресурсы настолько интенсивно, что позволяет отнести этот природный источник ГВ к категории «относительно возобновляемых».

Таким образом, наиболее перспективным природным источником гуминовых веществ является сапропель, как доступный и возобновляемый природно-сырьевой ресурс.

1.2. Характеристика ресурсного потенциала сапропелевых гуминовых веществ на территории Российской Федерации

Сапропель – это сложный органоминеральный комплекс, формирующийся на дне водоемов в результате аэробных и анаэробных микробиологических, физико-химических и механических процессов из остатков растительных и животных организмов, а также поступающих извне органических и минеральных примесей [84].

Озера, в которых идет образование сапропелей, являются своеобразным природным биореактором, в котором происходят биологические и абиотические процессы. Многообразие продуцентов и микроорганизмов, участвующих в этом

процессе, а также органические и минеральные примеси, обуславливают разнообразный состав образующихся биологически активных веществ (БАВ). Органическая часть сапропеля представлена гуминовыми веществами, аминокислотами, углеводами, липидами, витаминами и т.д. Неорганическая (минеральная) часть сапропеля состоит из макро-, микро- и ультрамикроэлементов, их оксидов, кислот, оснований и солей. Для количественной характеристики минеральных компонентов сапропеля применяют показатель «зольность». Для оценки целесообразности использования сапропелей в качестве источника гуминовых веществ одним из решающих факторов является количественное преобладание органической составляющей по отношению к неорганической. Перспективным считается сырье с показателем зольности не выше 30 % [10, 46, 74, 134, 195, 202].

Химический состав и свойства сапропелей могут значительно отличаться в зависимости от месторождения, так как имеют большое значение условия формирования донного слоя, а также разнообразие растительного и животного мира самого озера [46, 52, 74, 93, 143, 165, 196, 247].

Геологические ресурсы озерного сапропеля с прогнозируемыми запасами в РФ превышают 500 млрд. м³ [84, 91]. Распространены озерные сапропели практически по всей территории России, однако большая их часть относится к Центральному и Северо-Западному регионам РФ. Значительная часть их может служить доступным и дешевым сырьем для получения биологически активных веществ.

Рассматривая распределение сапропелевых запасов по экономическим районам России, следует отметить их неравномерное размещение и наибольшую встречаемость в Центральном, Западно-Сибирском и Северо-Западном районах (рисунок 1).

Наиболее изученными, с учетом запасов и детальности разведки месторождений сапропеля, являются Центральный и Северо-Западный районы [46, 91, 84].



Рисунок 1 – Доли запасов сапропеля на территории РФ по различным экономическим районам

Учитывая низкую плотность населения Западно-Сибирского региона, расположение сапропелевых залежей вдали от сельскохозяйственных угодий, отсутствие промышленных загрязнений озер, обуславливает перспективность изучения и добычи сапропеля в Западно-Сибирском экономическом районе.

В озерах Западной Сибири сосредоточены огромные залежи сапропелей. 75% разведанных запасов сапропеля Западно-Сибирского региона сосредоточено в Омской области. В настоящее время в регионе обследовано около 200 озер общей площадью 25757 га. Все имеющиеся ресурсы сапропеля сосредоточены в 10 районах Омской области: Большереченском, Большеуковском, Знаменском, Колосовском, Крутинском, Саргатском, Тарском, Тевризском, Тюкалинском, Усть-Ишимском [85, 134, 135, 195-197]. Основные запасы сапропеля приурочены к пресным озерным водоемам, частично сапропели залегают в основании торфяных залежей [27, 197].

Детально разведаны 26 озерных месторождений сапропеля (суммарные запасы – 4,5 млн. т) в Большереченском, Знаменском, Тарском районах, запасы

остальных озерных месторождений предварительно оценены в 152,3 млн. т. Запасы сапропеля продолжают накапливаться и сегодня, и, по оценкам специалистов, ежегодно прирастают более чем на 100 тыс. т [85, 196, 136]. Однако следует отметить, что сапропель только 4 озер с общим запасом 1461 тыс. т эксплуатируется, 25 озер подготовлено к эксплуатации, 120 озер имеют перспективные залежи [27, 85].

Разведанные запасы сапропеля исследованы, в основном, с целью сельскохозяйственного использования в качестве удобрений и добавки в корма животных. В связи с этим является перспективным изучение запасов сапропеля Омской области по промышленным категориям для глубокой переработки с целью использования в химической и фармацевтической промышленности.

По данным проведенных исследований по изучению Омских сапропелей для применения в качестве лечебных грязей («Инструкция по разведке озёрных месторождений сапропеля РСФСР», 1988 г.) из разведанных запасов сапропелевого сырья в Омском регионе пригодно около 400 тыс. т. Наибольшее количество сапропеля находится в озёрах Тюкалинского – 210 тыс. т, Большереченского – 65 тыс. т и Саргатского районов – 16 тыс. т. Эти сапропелевые ресурсы относятся к классу перспективных и требуют комплексного изучения [85, 135, 195].

Освоение сапропелевых залежей требует как количественной оценки запасов сырья, так и оценки его качественных показателей с целью обеспечения возможностей дифференцированного выбора сырьевых источников для конкретного направления использования сырья, способа его разработки и эксплуатации. Как было отмечено ранее, при оценке перспективности использования сапропеля в качестве сырья для получения гуминовых веществ важное значение имеет содержание в нем органических веществ.

В таблице 1 приведены основные показатели, характеризующие сапропелевые месторождения озер Омской области [196]. Наиболее перспективным сырьевым источником для использования в медицинских целях является сапропель с наибольшим содержанием органических веществ.

Таблица 1 – Основные показатели, характеризующие сапропелевые месторождения Омской области

Озеро (месторождение)	Влажность, %	рН	Содержание, % на сухое вещество						
			Зольность, %	Органическое вещество, %	Азот общий	Азот нитр.	Фосфор общий	Калий общ.	СаО
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Большереченский район									
Пахарово	81,1	6,95	30,4	69,6	3,04	0	0,26	0,37	2,63
Чebak	40,2	7,54	86,8	13,2	0,41	0	0,18	0,85	3,40
Тюкалинский район									
Горчаково	84,6	7,55	26,1	73,9	3,16	0	0,40	0,36	2,40
Пучай	44,3	5,50	29,7	68,6	2,20	0,03	0,50	0,20	2,86
Саргатский район									
Темное	82,7	8,28	41,9	58,1	1,68	0	0,18	0,26	15,0
Большой Калмакуль	73,1	8,30	64,3	35,7	1,70	0	0,12	0,93	2,75

Как видно из таблицы, максимальное количество органического вещества содержится в сапропеле озера Горчаково Тюкалинского района Омской области и составляет 73,9%.

По органолептическим показателям сапропель озера Горчаково – темно-коричневый, без запаха. При изучении ботанического состава сапропеля установлено, что в нем содержится аморфного детритуса – 5-10% от сухого вещества, остатки высших растений – до 15%, спор и пыльцы растений – до 5%, глины и песка – от 5 до 25%, водорослей: сине-зеленых – 20-40%, десмидиевых – 5%, золотистых – 5%, разножгутиковых – до 5% от сухого вещества [196].

Средний элементный состав органической массы сапропеля озера Горчаково следующий (%): углерода – 50-61, кислорода – 30-37, водорода – 5,5-7,7, азота – 3,0-5,5, серы – 1,5-2,2 [196]. В исследуемом сапропеле количественно определены витамины: каротин – 6,23 мг/кг; витамин В₂ – 12,24 мг/кг; витамин В₁₂ – 121,7 мкг/кг. Содержание аминокислот составляет 10,2% от сухого вещества [196].

Бактериологические исследования сапропеля показали отсутствие возбудителей сальмонеллеза, сибирской язвы, анаэробной и синегнойной микрофлоры, патогенного протей, кишечной палочки [196].

Невысокое содержание органического вещества и азота в сапропелях озер Чебак, Темное, Большой Калмакуль не позволяет рекомендовать их к использованию в качестве природных источников биологически активных веществ.

Во всех обследованных озерах содержание радиоактивных элементов, пестицидов и тяжелых металлов не превышает гигиенических нормативов для лечебных грязей [195-197].

Таким образом, особенная ценность и конкурентоспособность Омских сапропелей заключается в том, что они являются одними из наиболее экологически чистых и богатых биогенными веществами в России [5, 85, 113, 134, 195-197].

В настоящее время в Омской области добычей сапропеля, научно-экспериментальными разработками и производством продуктов на его основе занимается ЗАО «Сибирская органика». В промышленном производстве продукты, полученные из сапропеля, используются в виде сорбентов для сбора нефти, очистки питьевой воды и коммунальных стоков, в сельском хозяйстве - как кормовые добавки, удобрения и ветеринарные препараты. В медицине сапропель применяют в оздоровительных и косметологических целях. Сапропель, как лечебная грязь, используется в Центре красоты и релаксации санатория «Колос» (г. Омск). Опыт применения сапропелевых обертываний продемонстрировал высокую эффективность антицеллюлитных, противовоспалительных, регенерирующих процедур.

Однако, более перспективным является направление переработки сапропелей с целью извлечения из него наиболее активных групп соединений и создания на их основе лекарственных препаратов.

1.3. Современная классификация гуминовых веществ

Анализ литературных источников показал, что в основном изучены гуминовые вещества, выделенные из бурого угля и торфа [7, 14, 28, 60, 64, 81, 88, 95, 112, 142, 176, 203, 245, 265]. Гуминовые вещества сапропелей изучены в меньшей степени.

Гуминовые вещества – это сложные системы высокомолекулярных органических соединений природного происхождения, представляющие собой полифункциональные структуры ароматической, алициклической и гетероциклической природы, замещенные алкильными цепями с различными функциональными группами [132, 281]. Сложность строения гуминовых веществ вызвана различными факторами и условиями их формирования, а также существенное влияние на состав и свойства ГВ оказывают способы извлечения их из природных объектов [43, 78, 103, 108, 171, 182, 183, 201, 227].

В отличие от большинства биологически активных соединений природного происхождения, биосинтез которых генетически обусловлен и упорядочен, образование гуминовых веществ происходит хаотично. Донные органические остатки разлагаются до более простых соединений, а затем из этих соединений происходит синтез сложных органических веществ, сопровождающихся конденсацией и полимеризацией исходных соединений [256, 265]. Реакции синтеза и разложения идут практически непрерывно. В результате накапливаются наиболее устойчивые соединения [84, 219].

История изучения гуминовых веществ насчитывает более двухсот лет. Впервые эти вещества выделены из торфа немецким химиком Ф. Ахардом в 1786 году [209]. В двадцатом веке изучением ГВ, преимущественно в рамках почвоведения, занимались ученые Л. А. Христева, М. А. Кононова, Т. А. Кухаренко и другие, а также ряд зарубежных исследователей.

Огромный вклад в изучение гуминовых веществ внес доктор биологических наук, заслуженный профессор Московского государственного университета им. М. Ю. Ломоносова, заслуженный деятель науки Российской Федерации, Дмитрий Сергеевич Орлов (1928-2007). Он предложил свою собственную схему строения

молекул гуминовых кислот, сформулировал признаки, характерные для этого класса соединений, разработал кинетическую теорию гумификации.

Общепринятая классификация гуминовых веществ, предложенная Д. С. Орловым, основана на различной растворимости ГВ в воде, кислотах и щелочах [117, 119, 265, 272]. По этой классификации гуминовые вещества делят на прогуминовые вещества, гумусовые кислоты и гумин (негидролизующий остаток) (рисунок 2).

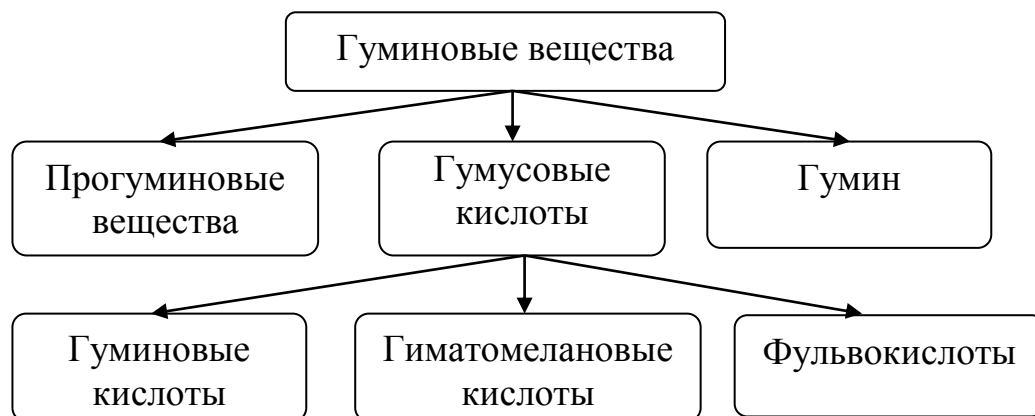


Рисунок 2 – Классификация гуминовых веществ по Д. С. Орлову

Прогуминовые вещества представляют собой неспецифические органические компоненты разложившихся растительных и животных остатков темно-коричневого цвета. К ним относятся: низкомолекулярные органические кислоты, аминокислоты, углеводы, липиды и продукты их трансформации. Их называют «молодые» гуминоподобные соединения. В дальнейшем они подвергаются окислительной полимеризации и превращаются в гуминовые кислоты. Прогуминовые вещества частично растворимы в воде. Соединения изучены очень мало [102].

Гумин (негидролизующий остаток) - совокупность минеральных комплексов гуминовых и фульвовых кислот. Гумин практически нерастворим в щелочах, кислотах и органических растворителях. В составе гумина могут содержаться некоторые неспецифические соединения (целлюлоза, лигнин, хитин) [8, 102, 117].

Гумусовые кислоты - специфические органические соединения от желтого до темно-коричневого цвета. Выделяют их способом, впервые предложенным немецким ученым Ф. Ахардом, используя в качестве растворителей растворы

щелочей и нейтральных солей [209]. Гумусовые кислоты в зависимости от способности растворяться в тех или иных растворителях разделяют на гуминовые, гиматомелановые и фульвокислоты [89, 119].

Фракцией гумусовых кислот, растворимой в щелочах и практически нерастворимой в воде и кислотах, являются гуминовые кислоты. С одновалентными катионами (K^+ , Na^+ , NH_4^+) гуминовые кислоты образуют легко растворимые в воде соли - гуматы. При взаимодействии ГК с двух- и трехвалентными катионами (Ca^{2+} , Mg^{2+} , Al^{3+} , Fe^{3+}) образуются осадки [21, 97, 120, 162].

Фракцией гумусовых кислот, растворимой в спирте, являются гиматомелановые кислоты (ГМК). Растворы ГМК в спирте имеют темно-красную окраску. Отличительной особенностью этих соединений является способность интенсивно поглощать электромагнитное излучение в интервале $1700-1720\text{ см}^{-1}$ [90, 102, 131]. Доля данной группы (или фракции) в процентном соотношении в составе гуминовых веществ незначительна [29, 71]. Молекулы гиматомелановых кислот содержат карбоксильные, метоксильные и гидроксильные группы. Изучение элементного состава молекул показало высокое содержание углерода (более 60%) в их структуре [75].

Фракция гумусовых кислот, растворимая в воде, щелочах и кислотах представляет собой фульвокислоты (ФК). К ФК относят все кислоторастворимые органические вещества, остающиеся в растворе после осаждения гуминовых кислот. ФК выделяют посредством сорбции на полимерных смолах или активированном угле [205, 211]. Молекулы фульвокислот обладают более выраженными кислотными свойствами, они гидрофильны, более окислены и содержат меньшее количество углерода, чем молекулы ГК; с одно- и двухвалентными катионами (K^+ , Na^+ , NH_4^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+}) образуют соли, растворимые в воде; в сильнощелочной среде могут осаждаться ионами бария [100, 119, 216, 243].

В настоящее время не существует согласованной классификации и номенклатуры гуминовых веществ, так как отсутствует единая теоретическая и

экспериментальная база по изучению данных соединений. Деление гуминовых веществ на группы весьма условно и основано на различной растворимости соединений в разбавленных водных растворах кислот, щелочей или других растворителей. Однако разделить гуминовые вещества на конкретные фракции не всегда возможно, так как все выделяемые формы сопутствуют друг другу и взаимосвязаны [119]. Некоторые исследователи отрицают существование отдельных фракций гуминовых веществ (ФК и ГМК), считая, что они получаются искусственным путём при обработке сырья щелочью. В связи с этим ряд авторов под термином «гуминовые кислоты» понимают гумусовые кислоты, гуминовые вещества и не выделяют отдельных фракций этих соединений (рисунок 2) [98, 138, 156].

Многие исследователи отмечают необходимость создания единой номенклатуры и терминологии ГВ, а также разработки критериев стандартизации данных соединений по более объективным аналитическим показателям, а не по способам извлечения их из природных объектов [64, 156, 180, 185].

1.4. Проблемы и принципы изучения состава, структуры и свойств гуминовых кислот

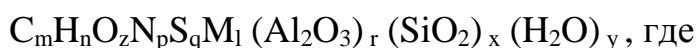
Гуминовые кислоты являются высокомолекулярными, полифункциональными соединениями ароматической, гетероциклической и алициклической природы [89]. В последнее время гуминовые кислоты рассматривают как самоорганизующиеся супрамолекулярные системы молекул переменного состава и нерегулярного строения [53, 256, 269, 273, 282].

Растворимость, реакционная способность, биологическая активность гуминовых кислот зависят от условий их формирования, способов выделения из природного сырья, от размеров и конфигурации макромолекул [138, 163, 190, 204, 239, 255, 279]. В отличие от индивидуальных органических соединений, для которых характерны монодисперсность и постоянное значение молекулярной массы, гуминовые кислоты полидисперсны, то есть обладают набором молекулярных масс. Поэтому их характеризуют молекулярно-массовым распределением, на основании которого рассчитывают среднюю молекулярную

массу [25, 138]. Молекулярная масса гуминовых кислот, определенная химическими методами, составляет 1300-130000, физические методы осмометрии, криоскопии и вискозиметрии дают величины 700-26000, методы центрифугирования и светорассеяния - 30000-80000. По данным Д. С. Орлова среднечисловые молекулярные массы гуминовых кислот почв равны 1500-600000 [120].

Сложности с определением молекулярной массы гуминовых веществ, высокий процент зольности этих соединений, привели к необходимости определения их элементного состава. Внимание к этому диагностическому признаку было обращено, начиная с классических работ исследователей XIX века, изучавших гуминовые соединения. ГВ характеризуются элементным составом, принципиально отличным от живого органического вещества. Кроме того, данные по элементному составу могут быть использованы для классификации и выяснения генетической взаимосвязи различных классов гуминовых веществ [132]. В целом, элементный состав является одним из главных признаков, по которым идентифицируют эти природные вещества.

Обычно под элементным составом гуминовых кислот понимают состав их органической части, то есть количество атомов углерода, водорода, кислорода, азота, серы. Однако, помимо органической части, в состав гуминовых кислот входит и неорганическая часть, которая состоит из зольных элементов (преимущественно ионов металлов, оксидов кремния и алюминия) и гигроскопической влаги. Поэтому в общем виде брутто-формулу гуминовых кислот записывают следующим образом [78, 117]:



M – ионы металлов;

m, n, z, p, q, l, r, x, y – стехиометрические коэффициенты.

Различными авторами [75, 117, 261] установлено, что гуминовые кислоты содержат 45-60 % углерода, 30-35 % кислорода, 3-7 % водорода, 3-5 % азота, 1-3% серы и ионы металлов, состав которых во многом зависит от источника формирования ГК.

Элементный анализ позволяет получить только общее представление о составе гуминовых кислот. Но для изучения взаимосвязи строения гуминовых соединений и проявляемого ими биологического действия необходимо знать конкретные структурные фрагменты и функциональные группы исследуемых веществ.

В процессе установления молекулярного строения гуминовых веществ рядом авторов [114, 265, 272] разработано несколько гипотетических моделей, характеризующих гуминовые кислоты. В настоящее время получить мономолекулярные фракции ГВ не удалось. Поэтому при создании формул гуминовых соединений возможно смоделировать лишь структурную ячейку, представляющую собой минимальную по размеру часть молекулы, которая содержит все важнейшие структурные фрагменты [114].

Согласно наиболее общим представлениям, макромолекулы кислот состоят из каркасной (негидролизуемой) и периферической (гидролизуемой) части [90, 114, 131, 179, 265]. Негидролизуемая часть представлена ароматическими фрагментами с различными функциональными группами: карбоксильными, альдегидными, метокси-, amino- и амидогруппами, спиртовыми и фенольными гидроксильными. В состав гидролизуемой части, ковалентно связанной с каркасной, входят моно- и полисахариды, полипептиды, аминокислоты, в незначительных количествах могут содержаться жирные кислоты и другие соединения [78].

Гипотетическая схема строения структурной ячейки по Д.С. Орлову (рисунок 3) отражает именно такие данные о структуре молекулы ГК [114]:

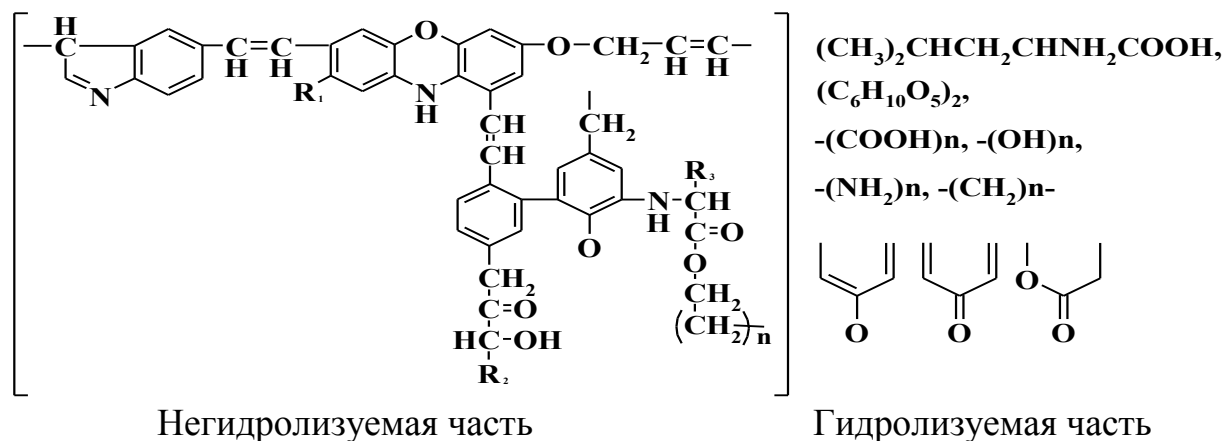


Рисунок 3 – Схема строения структурной ячейки ГК по Д. С. Орлову (1985 г.)

Однако наиболее широкое распространение получила гипотетическая модель ГК по Ф. Стивенсону (рисунок 4). Согласно его гипотезе [272], молекула ГК включает в себя бензольные кольца с карбоксильными и фенольными группами, азотсодержащие гетероциклы, хиноидные структуры, и все они связаны между собой мостиками через азот и кислород.

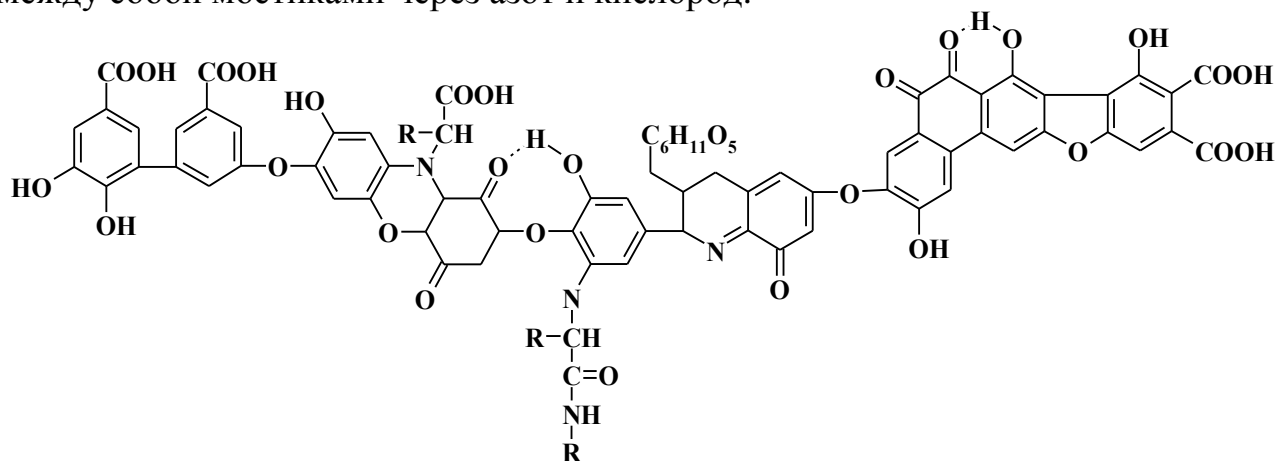


Рисунок 4 – Схема строения структурной ячейки ГК по Ф. Стивенсону (1993 г.)

Модель гуминовой кислоты авторов Х-Р. Шультена и М. Шнитцера представлена не как структурная ячейка, а как условный тип макромолекулы с нестрого определенной массой и составом (рисунок 5) [265].

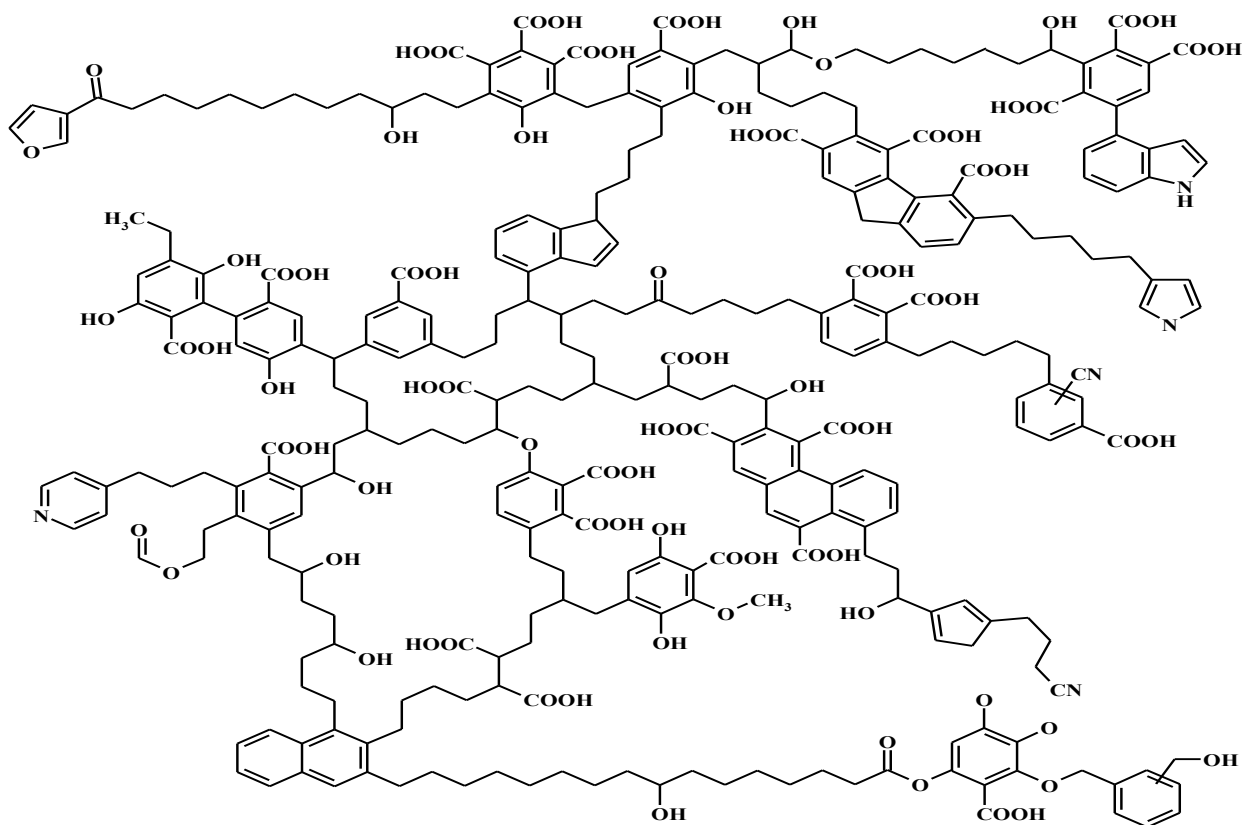


Рисунок 5 – Схема строения ГК по Х-Р. Шультену, М. Шнитцеру (1997 г.)

В настоящее время ни одна из предложенных схем строения гуминовых кислот не нашла подтверждения при изучении структуры исследуемых соединений современными физико-химическими методами. Кроме того, современные структурные модели гуминовых кислот необъяснимы с позиций биохимического происхождения молекул ГК.

Таким образом, точных молекулярных формул ГК не существует, все предложенные варианты имеют характер схем и отражают только общий состав соединений. Открытыми остаются вопросы о пространственном расположении атомов в молекулах гуминовых кислот. Особенностью строения ГК является также наличие большого количества функциональных групп.

Гуминовые кислоты – химически неоднородные соединения, содержащие различные типы функциональных групп в разной пропорции и конфигурации [102, 119, 265]. В настоящее время в структуре гуминовых кислот обнаружено более десяти различных типов кислород-, азот- и серосодержащих функциональных групп: карбоксильные, фенольные и спиртовые гидроксильные, карбонильные, хиноидные, метоксильные, сложноэфирные, енольные, амино-, амидо- и имидогруппы, сульфо-, тиольные и дисульфидные группы [60, 62, 80, 94, 240, 241]. Состав функциональных групп и структура молекулярных фрагментов гуминовых кислот зависят от их источника и способа выделения [119, 103, 131, 138, 201, 274, 277].

Таким образом, сложность строения гуминовых кислот, наличие большого количества функциональных групп, возможность образовывать межмолекулярные и внутримолекулярные связи, обуславливает широкий спектр взаимодействий, в которые могут вступать гуминовые кислоты.

Наличие таких групп, как карбоксильные, карбонильные, фенольные и гидроксильные в сочетании с ароматическими структурами, обеспечивает способность гуминовых кислот к ионному и донорно-акцепторному взаимодействию. ГК активно участвуют в сорбционных и окислительно-восстановительных процессах [3, 26, 44, 81, 114, 139, 237, 238]. Таким образом, эти факты доказывают, что гуминовые кислоты имеют сложноорганизованную,

стохастическую структуру молекул, способны вступать в реакции конденсации различного типа и окислительно-гидролитического расщепления. Окислительно-восстановительные свойства гуминовых кислот объясняются наличием в их структуре гидрохинонных фрагментов [59, 69, 113].

Многие авторы указывают на проблему выделения и идентификации в молекулах ГК структурных компонентов, которые в максимальной степени обладают функциональной активностью. Современные физико-химические методы исследования позволяют более детально изучить состав, функциональные группы и химические свойства гуминовых кислот, а значит, способствуют идентификации наиболее реакционноспособной части молекул ГК, что в дальнейшем должно быть основой стандартизации данных соединений.

1.5. Методы выделения и модификации гуминовых веществ

В работах авторов [103, 105, 108, 114, 155, 182, 183, 201, 227, 259] было установлено, что метод выделения влияет на структуру и свойства гуминовых веществ.

В настоящее время существует значительное количество методов выделения гуминовых веществ. Наиболее распространены методы, основанные на способности гуминовых веществ растворяться в щелочных растворах при $\text{pH} > 7,0$ и осаждаться из растворов при подкислении до $\text{pH} < 2,0$ [11, 114, 132]. Для получения гуматов применяют гидроксиды натрия и калия, аммиак, натрия гидрокарбонат, натрия фторид, натрия ацетат, натрия пиррофосфат, натрия оксалат. Причем для извлечения гуминовых кислот раствор натрия гидроксида может применяться в различных концентрациях (от 0,08% до 10%). Количество требуемых щелочных обработок может составлять от 1 до 10. Экстрагирование проводится в различных температурных интервалах (от 20°C до 100°C).

Одним из методов, основанных на способности гуминовых соединений растворяться в щелочных растворах, является разработанный Николаем Николаевичем Бамбаловым фракционно-групповой метод выделения гуминовых веществ [11]. Данный метод состоит из последовательных стадий:

1) обработка природного источника ГВ хлороформом с целью удаления битумов;

2) экстракция 0,1М раствором натрия гидроксида и 0,1М раствором натрия пирофосфата с целью извлечения гуминовых веществ;

3) последовательный гидролиз 5% и 72% растворами серной кислоты с целью получения фракций водорастворимых, легкогидролизуемых и трудногидролизуемых веществ;

4) подкисление щелочных растворов гуминовых веществ до $pH=1,0$ для осаждения гуминовых кислот, фульвокислоты остаются в растворе;

5) высушивание гуминовых веществ при невысоких температурах (30-40⁰С).

Достоинствами данного метода являются возможность выделения гуминовых веществ в «мягких» условиях, при которых гуминовые кислоты меньше подвергаются деструкции, простота методики и отсутствие специального оборудования [43].

Наряду с методом Н. Н. Бамбалова для выделения ГВ используют также метод Инсторфа, метод С. С. Драгунова, метод И. В. Тюрина, метод Пономаревой-Николаевой, метод Кононовой-Бельчиковой, метод Ефимова-Васильевой. Данные методы различаются последовательностью выделения отдельных групп органического вещества, а также составом и концентрацией применяемых растворителей. Недостатком большинства из этих способов является то, что извлекаемые гуминовые вещества подвергаются довольно жестким химическим воздействиям, приводящим к изменению структуры гуминовых соединений и гидролизу их полимерных молекул, что снижает их биологическую активность [12, 43, 72, 83, 98, 103, 190].

В настоящее время существуют научные публикации о разработке способов повышения эффективности действия гуминовых веществ путем применения различных методов химической модификации исходных соединений [111, 183, 227, 254, 270]. Авторы предлагают обрабатывать ГВ растворами азотной кислоты, вводить в структуру галогены, окислять растворами перманганата калия и т.д. Данные приемы позволяют снизить молекулярную массу гуминовых кислот и тем

самым увеличить их растворимость и, как следствие, проницаемость через клеточную мембрану. Некоторые способы позволяют увеличить содержание различных функциональных групп, отдельные из которых являются ответственными за биологическую активность: карбоксильные, фенольные и хиноидные группы.

Некоторые методы извлечения гуминовых веществ предполагают использование энергоемких технологий и больших материальных затрат на оборудование и теплоносители [183, 278]. При указанных способах выделения выход ГВ составляет от 2 до 40% [142, 201].

В литературе имеются данные по химическому и электрохимическому окислению ГВ на стадии выделения с целью увеличения их биодоступности [111, 204]. Авторами показано, что окисление ГВ на стадии выделения приводит к повышению содержания в структуре модифицированных ГВ ионогенных карбоксильных групп, а, значит, и увеличению сорбционной способности выделенных ГК [24, 26, 258].

Для увеличения выхода гуминовых веществ и повышения их биодоступности некоторые авторы предлагают проводить выделение ГВ с применением ультразвуковой кавитации, температурного и др. видов воздействия на природный источник ГВ [108, 132, 141, 159, 182].

Использование ультразвуковых установок в процессе выделения гуминовых веществ позволяет повысить их выход практически в два раза, что было подтверждено экспериментальным путем учеными Самарского государственного университета [142]. Однако недостатком данного метода является наличие нефтедегтярного запаха полученного комплекса [108].

Существует способ выделения гуминовых веществ путем сочетания экстракции с вымораживанием. Этот метод использовал Г. Варшал [21]. Достоинством метода автор считает незначительное окисление ГВ, что изменяет их реакционную способность. К недостаткам относятся трудоёмкость, энергозатратность получения гуминовых веществ и значительная продолжительность проведения процесса [21].

Изучением влияния УФ-света на ГВ занимались томские ученые: О. Н. Чайковская, Е. В. Мальцева, Н. В. Юдина, И. В. Соколова и др. Авторы [146, 170, 171, 270] предполагают, что при облучении гуминовых веществ УФ-светом в их молекулах образуются свободные радикалы, которые являются активными реакционными центрами. Фотохимические свойства гуминовых веществ изучены недостаточно, хотя и известно, что они могут поглощать свет и переносить световую энергию к другим компонентам водных растворов, при этом в ряде случаев влияя на фотолиз экотоксикантов [244]. Некоторые исследователи предполагают, что гуминовые кислоты после облучения УФ-светом могут производить активные формы кислорода и фотоиндуцировать превращения гербицидов [250]. Обнаружено, что ГВ могут действовать как фотосенсибилизаторы при облучении светом с длинами волн более 290 нм [263].

Исследование влияния УФ-облучения на свойства гуминовых веществ является актуальной задачей, так как позволяет понять процессы, происходящие в структуре молекул гуминовых соединений под влиянием естественного облучения и дает возможность модифицировать ГВ с целью увеличения их биодоступности.

Таким образом, биологическая активность ГК в наибольшей степени определяется структурой их молекул, а также количеством и пространственным расположением функциональных групп (ФГ) [47]. Поэтому значительный интерес с точки зрения модификации гуминовых веществ представляют методы, позволяющие уменьшить молекулярную массу ГК и одновременно увеличить количество ФГ или активных центров, что в конечном итоге может привести к увеличению реакционной способности выделенных соединений.

1.6. Методы исследования гуминовых кислот

Гетерогенность, полифункциональность и стохастический характер ГК обуславливают широкую вариабельность их химических и биологических свойств [77, 102, 252, 256, 267, 269]. В связи с этим требуется особый методологический подход к изучению структуры ГК, отличный от методов классической химии, ориентированных на изучение регулярно организованных веществ, выделенных в

чистом виде. Важным является применение так называемых неразрушающих методов, позволяющих изучить нативные гуминовые кислоты. На современном этапе используют различные методы исследования ГК: методы спектроскопии в УФ-, видимой, ИК- областях, ядерный магнитный (ЯМР) и электронный парамагнитный (ЭПР) резонанс, флуоресцентный анализ, методы электронной микроскопии, хроматографии, термического анализа и другие [1, 22, 30, 70, 77, 86, 87, 174, 178, 198, 208, 210, 213, 222, 232, 280]. Большинство методов и диагностических признаков, по которым в настоящее время идентифицируют гуминовые соединения, разработаны учеными-почвоведом. Однако разработанные критерии стандартизации ГВ не всегда согласуются с принципами классической химии.

Спектроскопия в УФ- и видимой областях. Спектры поглощения гумусовых кислот в интервале длин волн от 220 до 750 нм имеют характер пологих кривых без четко выраженных полос или максимумов поглощения [30, 42, 87, 96, 114, 164, 171, 245]. Для характеристики ГВ, как полидисперсных систем, вместо молярного коэффициента поглощения принято использовать коэффициент экстинкции $E_{465}^{0,001\%}$, который рассчитывается аналогично, но на произвольно выбранную единицу концентрации [114]. Коэффициент экстинкции характеризует оптическую плотность гуминовых соединений только при одной условно выбранной длине волны, обычно это 465 нм. Еще одним диагностическим признаком ГВ является коэффициент цветности (E_4/E_6), равный отношению оптических плотностей при 465 и 650 нм и характеризующий крутизну падения кривой и соответственно характер окраски гумусовых кислот [14, 42, 78].

По современным представлениям окраска гумусовых кислот и соответственно характер их электронных спектров обусловлены развитой системой сопряженных двойных связей [119]. Ароматические фрагменты обуславливают окраску гумусовых кислот, алифатические боковые цепи, не несущие двойных связей (полисахариды, полипептиды, насыщенные углеводороды), практически не окрашены. Авторами [83, 121] экспериментально доказано, что по значениям E-величин можно характеризовать отношение

углерода ароматических структур к углероду боковых радикалов. Чем выше ароматичность структур, тем меньше соотношение E_4/E_6 [121].

На характер спектра и интенсивность окраски, кроме цепи сопряжения, влияют электронодонорные и электрофильные заместители, присоединенные к сопряженной системе. Они изменяют подвижность π -электронов системы, что увеличивает вероятность электронных переходов. Это может вызвать смещение максимума поглощения в длинноволновую область и повысить оптическую плотность. Интенсивность окраски и характер спектров ГК зависят от реакции среды, а также могут измениться под влиянием окислителей или ультрафиолетового облучения [121, 171].

Инфракрасная спектроскопия позволяет установить характер атомных группировок, их содержание, природу химической связи в гуминовых веществах. Совокупность и интенсивность полос поглощения позволяют судить о соотношении ароматических и алифатических фрагментов в структуре гуминовых кислот [121].

ИК-спектры гуминовых веществ имеют характерный облик и постоянный набор полос поглощения, позволяющий отличить их от соединений других классов и служить одним из критериев стандартизации данных соединений [2, 22, 30, 87, 96, 115, 116, 121, 129, 273]. Типичный ИК-спектр поглощения, характерный для гуминовых кислот [121], приведен на рисунке 6.

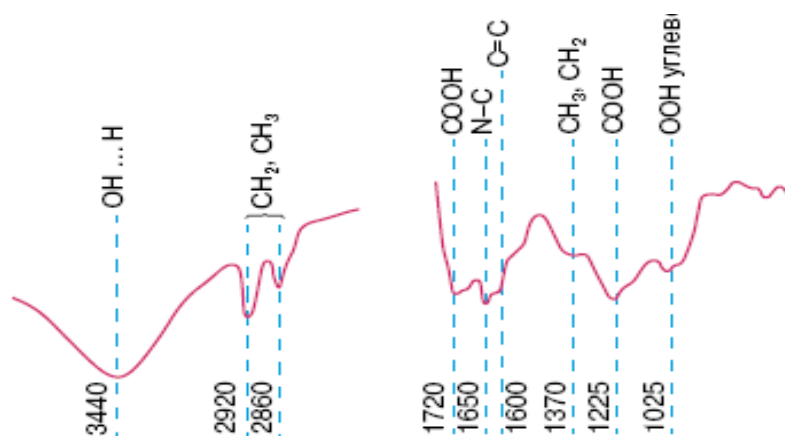


Рисунок 6 – Инфракрасный спектр поглощения гуминовых кислот

ЯМР спектроскопия. Поскольку углерод является основным элементом гуминовых веществ, то для получения данных о типе углерода и его

относительном содержании в различных структурных фрагментах широко используется ^{13}C ЯМР спектроскопия. Основным преимуществом данного метода является получение количественной информации о распределении углерода по структурным группам в молекулах без какой-либо предварительной пробоподготовки и химической модификации ГВ. Следует отметить, что ^{13}C ЯМР несет информацию только об атоме углерода и не позволяет напрямую судить о таких структурных показателях, как молекулярная масса и взаимное расположение фрагментов [70, 78, 104, 154, 161, 184, 191, 208, 222, 230, 257].

ЭПР спектроскопия. Электронный парамагнитный резонанс является важным методом для изучения гуминовых кислот, позволяющим охарактеризовать парамагнитный центр органической молекулы. Парамагнитная активность, под которой понимается концентрация свободных радикалов органической природы, является показателем биохимической активности ГК [180]. Наличие парамагнетизма молекул гуминовых соединений отражается на ЭПР-спектрах в виде одиночного узкого сигнала, указывающего на наличие свободных радикалов [178, 198].

Флуоресцентный анализ. Гуминовые кислоты относятся к флуоресцирующим природным соединениям [171, 187]. Фотохимические свойства гуминовых кислот изучены мало, хотя известно [101, 171, 268], что ГК могут производить активные формы кислорода после облучения и в ряде случаев влиять на фотолиз других органических веществ. Спектры флуоресценции растворов ГК представляют собой широкую полосу от 350 до 600 нм с максимумом в районе 450-500 нм, положение которого зависит от происхождения гуминовых веществ [130, 248].

Электронная микроскопия. Метод электронной микроскопии позволяет изучить форму поверхности и молекулярную организацию гуминовых соединений. С помощью метода ультратонких срезов исследуют внутреннее строение гуминовых веществ. Д. С. Орлов на основании электронно-микроскопических исследований обнаружил, что диспергированные молекулы

гуминовых кислот имеют округлую, возможно плоскую дискообразную форму [53, 121].

Минеральная часть гуминовых кислот может быть определена с помощью *атомно-адсорбционного, рентгено-флуоресцентного и спектрального атомно-эмиссионного анализа*.

Таким образом, следует отметить, что современные физико-химические методы позволяют установить ориентировочную структуру гуминовых соединений.

Для диагностики гуминовых кислот Д. С. Орлов предложил использовать комплекс признаков, из которых основными являются [121]:

- содержание углерода в пределах 46—61%;
- содержание азота от 3 до 6%;
- специфический характер электронных спектров поглощения при условии, что E-величины 0,001 %-ных растворов при длине волны 465 нм находятся в пределах 0,01 — 0,20, если толщина поглощающего слоя равна 1 см;
- специфический характер инфракрасных спектров поглощения в диапазоне 2—10 мкм.

Однако оптимальных методов и методик стандартизации гуминовых соединений на сегодняшний день не существует. Актуальной является задача разработки количественной оценки гуминовых кислот с учетом их химической структуры.

Наиболее распространенными методами определения функциональных групп кислотного характера в гуминовых веществах являются титриметрические методы: баритовый, кальций-ацетатный, алкалиметрический и ацидиметрический.

Баритовый метод определения общей кислотности, основанный на добавлении избытка бария гидроксида и титровании его остатка раствором хлористоводородной кислоты, требует больших затрат времени, приводит к сдвигу равновесия и неполному количественному протеканию реакции, поэтому дает заниженные результаты [79].

Кальций-ацетатный метод, основанный на добавлении избытка кальция ацетата и последующем титровании выделившейся уксусной кислоты раствором щелочи, сводится к вовлечению в реакцию не только карбоксильных и фенольных групп, но и замещенных фенолов, что приводит к низкой воспроизводимости результатов. Кроме того, кислотные группы, прочно связанные внутримолекулярными водородными связями, в нейтральной среде не вступают в реакции осаждения [137], что также дает заниженные результаты определения исследуемых групп.

Алкалиметрический и ацидиметрический методы в водных и неводных (пиридин, этилендиамин, ДМФА, ДМСО и др.) средах [48] с применением индикаторов приводит к уменьшению точности результатов, связанному с маскированием окраски индикатора собственной темно-коричневой окраской растворов ГК.

При использовании потенциометрической индикации конечной точки титрования возникают трудности, связанные с отсутствием четко выраженных перегибов индивидуальных групп на кривых титрования, что требует последующей математической обработки результатов (расчет дифференциальных кривых, рК функциональных групп и др.). Кроме того, ГК являются полиэлектролитами, несут большой рН-зависимый отрицательный заряд, что приводит к внутри- и межмолекулярным электростатическим взаимодействиям между функциональными группами ГК [61], что также является причиной неточной интерпретации результатов.

Прямое и обратное потенциометрическое титрование также дают разные результаты [61], что связано с определением кислотных групп при разных значениях рН (в обратном титровании рН около 10-11). В результате содержание исследуемых групп при прямом титровании ниже, чем в обратном. Причинами таких результатов могут явиться как неполное взаимодействие фенольных групп (титруются при рН более 10,5) при титровании растворами щелочей, так и сложная структура молекул ГК и медленное взаимодействие с раствором титранта определяемых групп.

Для определения фенольных, карбоксильных, а также гидроксильных групп, образующихся при гидролизе лактонных и ангидридных циклов в образцах углеродсодержащих материалов (активных углях, графитах, углеродных нанотрубках), часто применяется метод Х. П. Бозма [133, 226]. Метод Х. П. Бозма основан на различной кислотности функциональных групп и расширяет возможности количественного определения титриметрическим методом. При обработке раствором щелочи раскрываются лактонные и ангидридные циклы с образованием $-OH$ и $-COOH$ групп, которые нейтрализуются вместе со свободными реакционноспособными карбоксильными и гидроксильными группами. При обработке раствором натрия карбоната определяются суммарно карбоксильные и гидролизуемые лактонные группы, а при взаимодействии с натрия гидрокарбонатом исследуют количество только карбоксильных групп [217, 218]. Применение кондуктометрической индикации конечной точки титрования [156] в методе Бозма позволяет увеличить точность получаемых результатов и избежать трудностей, характерных для потенциометрии.

В целом, химическую и биологическую активность гуминовых кислот обуславливает множество параметров: размер и форма молекул, количество и характер функциональных групп, наличие парамагнитных центров и сопряженных связей, способность к межмолекулярному взаимодействию. Несмотря на многочисленные исследования в области химии ГК, вопросы, связанные с прогнозированием их биологической активности на основании изучения их структуры, еще не решены.

1.7. Биологическая активность гуминовых веществ

Еще в 40-х годах прошлого столетия под руководством академика В. П. Филатова были разработаны биостимулирующие препараты (ФиБС и др.), где одним из компонентов с выраженной физиологической активностью являлись гуминовые вещества. Публикации последних лет свидетельствуют о возросшем интересе многих ученых к данному классу соединений, что объясняется разнообразной биологической активностью ГВ, определенной экспериментальным путем [50, 64, 88, 97, 145, 157, 162, 181, 200, 206, 242].

Структурные особенности ГК позволяют им участвовать в разнообразных биохимических реакциях, образовывать комплексные соединения, влиять на фотохимические процессы и т.д. Кроме того, гуминовые кислоты могут служить источником структурных фрагментов органических макромолекул при биосинтезе, происходящем в живых организмах. Ряд авторов отмечает, что ГК проявляют поверхностно-активные свойства как коллоидные системы [42, 63, 66, 100, 220]. Все эти вышеперечисленные свойства ГК и обуславливают их разнообразную биологическую активность. Однако выделить в структуре макромолекулы ГК участок или функциональные группы, определяющие конкретный вид биологической активности, является очень сложной задачей. Различные физико-химические свойства ГК, разветвленное нерегулярное строение молекулы, наличие большого количества функциональных групп и их пространственное расположение способствуют одновременному протеканию различных реакций, а, значит, и проявлению широкого спектра биологической активности [4, 82, 107, 110, 112, 119, 225, 249, 271].

В литературе встречаются достаточно противоречивые данные о взаимосвязи интенсивности фармакологического действия с величиной молекулярной массы ГК. Так, ряд авторов [229, 233-236] отмечает, что противовирусная активность ГК тем выше, чем больше молекулярная масса молекулы. Однако публикации других исследователей [56, 169] свидетельствуют об обратной зависимости.

При рассмотрении вопроса взаимосвязи биологической активности ГК с их структурой, большинство ученых отмечают, что наличие в негидролизуемой части гетероциклического азота является одной из причин их высокой биологической активности [110, 139, 169]. Целый ряд исследователей [13, 42, 49, 63, 109, 120, 177, 212, 223] считает, что активной частью молекулы, отвечающей за фармакологический эффект, является гидролизуемая часть с функциональными группами кислотного характера, и чем их больше, тем выше биологическая активность.

Таким образом, большинство авторов считает, что физиологическая активность гуминовых кислот во многом зависит от структуры макромолекулы ГК, наличия гетероатомов и функциональных групп [63, 82, 185, 224].

В экспериментах выявлены антибактериальная, противовоспалительная, антиоксидантная, гепатопротекторная, противовирусная активность ГК [4, 17, 18, 19, 45, 63, 126, 160, 194]. Вместе с тем достоверных сведений о механизмах действия гуминовых кислот на биологические объекты нет.

Опыты *in vivo* и *in vitro* показали, что гуматы проявляют антиоксидантную активность [4, 113, 262]. Это объясняется структурными особенностями ГК и, прежде всего, наличием большого количества хиноидных групп, являющихся катализаторами окислительно-восстановительных реакций [6, 49, 51, 58, 153].

Целый ряд публикаций посвящен противовоспалительной активности ГК [63, 185, 281], изученной на моделях острого и хронического воспаления. Возможный механизм противовоспалительного действия объясняется способностью ГК снижать генерацию кислородных радикалов и уменьшать потребление кислорода активированными фагоцитами.

В настоящее время проведено достаточно много исследований по изучению противовирусной активности ГК [49, 72, 176, 233, 275]. Анализ этих данных показал, что некоторые исследователи объясняют механизм противовирусного действия ГК способностью их полимерных молекул препятствовать адсорбции вируса на клеточной мембране.

Существуют публикации о сорбционных свойствах гуминовых кислот [24, 26, 44, 169, 193]. Механизм адсорбции гуминовыми кислотами объясняется их способностью проявлять свойства комплексообразователей, а не механических энтеросорбентов. Этим они отличаются от поверхностно-активных адсорбентов (активированный уголь, силикаты и минералы глины) [162].

Таким образом, анализ литературных данных показал, что гуминовые кислоты имеют широкий спектр биологической активности. Они способны проявлять противовоспалительный, антибактериальный, противовирусный, мембранотропный и другие эффекты. В то же время, анализ литературных данных

не дает достаточно ясного ответа на вопрос о том, какие именно особенности структуры молекул ГК определяют их биологическую активность. Кроме того, химическому составу ГК каждого месторождения присущи индивидуальный набор функциональных групп, молекулярная масса, соотношение ароматической и алифатической части, что в конечном итоге и определяет биологически активные свойства объекта. В связи с этим, ГК каждого вида сапропеля, выделенные по определенной методике, будут иметь индивидуальные характеристики, что обуславливает необходимость исследования их физико-химических и биологических свойств. На сегодняшний день в медицине и ветеринарии используется целый ряд комплексных препаратов и БАД на основе ГК.

1.8. Применение гуминовых веществ в медицине

В настоящее время на основе гуминовых веществ в России и за рубежом создан ряд биологически активных добавок (БАД). Ранее в медицинской практике применялись лекарственные препараты на основе гуминовых кислот. В научной литературе имеются публикации по разработке лекарственных препаратов на основе гуминовых веществ, но ни один из них в медицинскую практику не внедрен [15, 186]. Перечень этих средств представлен в таблице 2.

Таблица 2 – Лекарственные препараты и БАД на основе ГВ

Наименование, производитель	Состав	Применение
1	2	3
Препараты на основе гуминовых веществ, ранее применяемые в медицинской практике		
Гуминат (Guminati) – раствор для инъекций, таблетки Лаборатория фармакологии Института им. В.П. Филатова, Украина, г. Одесса	Гуминовые кислоты, аминокислоты, углеводы, микроэлементы	Антитоксическое, антиоксидантное, радиопротекторное действие [15]
Гумизоль (Humisolum) ОАО «Таллинский химико-фармацевтический завод», Эстония, г. Таллин	0,01% раствор гуминовых кислот в изотоническом растворе натрия хлорида	Биогенный стимулятор, активизирует регенеративные процессы в организме, улучшает обмен веществ [15]
Пелоидодистиллят (Peloidodistillatum) ООО «Биостимулятор», Украина, г. Одесса	Отгон лиманных грязей	Биогенный стимулятор [15]
Торфот (Torfotum) Solco Basel P. Z., Польша	Отгон торфа	Биогенный стимулятор [15]

1	2	3
БАД на основе гуминовых веществ, производимые в РФ		
Гумивит порошок по 0,5 гр. №10 ООО НПК «Ково», Россия, г. Владивосток	Очищенные гуминовые вещества	Интоксикации организма (эндотоксикозы), инкорпорации радионуклидов; гепатиты, холециститы, заболевания желудка и кишечника (гастриты, гастроэнтериты, колиты, дизентерия, пищевые отравления); иммунодефицитные состояния, анемии, лейкопении; нарушение белкового обмена и функций ферментов (ферментопатии) [126]
Гумивит – Н порошок по 2,0 гр. №5 ООО НПК «Ково», Россия, г. Владивосток	Высокоочищенное гуминовое соединение, изготовленное из бурых окисленных углей, с высоким содержанием гуминовых кислот	Сорбент, биорегулятор, повышает эластичность, очищает и улучшает обменные свойства кожи [126, 15]
«Мумие очищенное горноалтайское» ООО «Травы Алтая» Россия, с. Красногорское	Гуминовые кислоты, аминокислоты в сочетании с микроэлементами и витаминами	Применяют при переломах, травмах, ожогах, заболеваниях ЖКТ, верхних дыхательных путей, урогенитального тракта, кожных заболеваниях, стрессах [144, 264]
БАД на основе гуминовых веществ, производимые за рубежом		
«Oxyhumate-k» by state-owned company Enerkom, ЮАР	Калиевая соль оксигуминовых кислот	Стимулятор иммунной системы [15]
«Reach for Life - colloidal minerals XL with fulvic acid» by Organics Australia Online, Австралия	Гуминовые, фульвокислоты, аминокислоты и минералы	Улучшает метаболизм, является источником незаменимых аминокислот и минералов [15]
«Avirol™» by Access Nutraceuticals, Inc.™, США	Экстракт гуминовых и фульвокислот	Стимулятор иммунной системы, детоксицирующее действие [15]
«Humic & Fulvic Acid» by Nano Health Solutions, США	Гуминовые, фульвовые кислоты и минералы	Укрепляет иммунную систему, улучшает пищеварение, источник минералов [15]
«Vitality Boost HA» by Live Superfoods, США	Гуминовые кислоты, фульвокислоты, макро- и микроэлементы, аминокислоты	Фульвокислоты и гуминовые кислоты являются органическими носителями минеральных элементов и детоксикантов [15]
«RF2 Liquid Plant Minerals» by EDC Wellness Corporation, Канада	Гуминовые кислоты и коллоидные минералы	Улучшает пищеварение, источник жидких минералов [15]
«Colloidal Minerals XL with Fulvic Acid» by Vital 02, Австралия	Коллоидные минералы с фульвокислотами	Источник макро- и микроэлементов, укрепляет иммунную систему, детоксикация организма [15]

1	2	3
Экспериментальные ЛС на основе гуминовых веществ		
Солвирал (Solviral™) «Laub BioChemicals Corporation», США	Синтетическое гуминовое вещество	Обладает высокой степенью ингибирования вирусов: HSV-1 и HSV-2 (вирус герпеса 1-го и 2-го типов), EBV (вирус Эпштейн-Бара), HCMV (цитомегаловирус человека), ветряной оспы, гриппа (типа А и В), геморрагической лихорадки, HIV (вирус иммунодефицита человека), HCV (вирус гепатита С) [15]
Олипифат™ ООО «Лигфарм», Россия, г. Москва	Гидролизный окисленный лигнин и пирофосфат натрия в соотношении 1:1	Оказывает цитотоксическое действие на перевиваемых стационарных культурах опухолей человека [16, 67]

Производители данной продукции описывают довольно широкий спектр лечебных свойств этих БАДов, но данная информация не подкреплена доклиническими и клиническими доказательствами [15, 67, 99].

Таким образом, анализ литературных данных показал, что на сегодняшний день в Реестре ЛС РФ не зарегистрировано ни одного лекарственного препарата на основе гуминовых кислот. На фармацевтическом рынке РФ представлены только БАДы, содержащие в своем составе гуминовые соединения.

1.9. Проблемы стандартизации гуминовых веществ

Основным препятствием к распространению в медицине препаратов на основе гуминовых веществ является сложность их стандартизации. Разработка лекарственных препаратов на доклиническом этапе предполагает установление структуры действующего соединения и определение оптимальных методов и методик его стандартизации для контроля качества. Однако знаний о составе и строении гуминовых веществ, имеющих на сегодняшний день, недостаточно для распространения на них общепринятых в фармакологии и фармации представлений о субстанциях лекарственных средств. Кроме того, при разработке методов стандартизации лекарственных препаратов природного происхождения, следует соблюдать принцип унификации методик качественного обнаружения и количественного определения действующих компонентов в ряду: «сырье –

субстанция – лекарственный препарат». Стандартизация сапропеля сопряжена с рядом проблем, из которых наиболее важной является отсутствие нормативной документации, регламентирующей его качества, как сырья для производства лекарственных препаратов. В настоящее время существует ГОСТ на сапропель, устанавливающий основные показатели его качества как органического удобрения [35]. И. В. Федько был создан проект фармакопейной статьи на «Торф низинный медицинский», являющийся источником гуминовых кислот [185]. Основные показатели качества торфа в проекте ФС определены в соответствии со статьей «Методы анализа лекарственного растительного сырья» (ГФ XI изд., вып. 1. стр. 256). Однако отнести сапропель к лекарственному растительному сырью невозможно, так как он является сложным органоминеральным комплексом, состоящим из остатков как растительного, так и животного происхождения.

Таким образом, одной из важных задач является создание нормативного документа, регламентирующего качество сапропеля, как сырья для получения субстанции гуминовых веществ.

Методологические основы и единые критерии стандартизации гуминовых соединений, как субстанции для производства лекарственных препаратов, в настоящее время также не разработаны. Это объясняется сложностью структуры гуминовых соединений, многообразием способов выделения их из природных объектов, невозможностью использования многих классических методов аналитической химии для идентификации и количественного определения гуминовых веществ, отсутствием стандартных образцов для их стандартизации. М. В. Гостищевой разработан проект фармакопейной статьи предприятия «Гуминовые кислоты торфа», включающий оценку сырьевого источника, определения подлинности и качества ГК, согласно регламентирующим требованиям [42]. Однако многие показатели качества гуминовых кислот зависят не только от сырьевого источника, но и от способа выделения их из природных объектов.

Таким образом, накопленный экспериментальный опыт использования гуминовых веществ требует выработки единых критериев оценки качества и

методов стандартизации исследуемых соединений, что в конечном итоге будет способствовать их более широкому использованию в медицинской практике.

Кроме того, доклинический этап оценки целесообразности внедрения лекарственных средств на основе гуминовых веществ предполагает проведение токсикологических исследований. Потенциальная токсичность гуминовых веществ может быть обусловлена их специфической молекулярной структурой и высокой адсорбционной активностью производящего сырья – сапропеля. Сапропель, как осадочная порода биогенного происхождения, потенциально обладает способностью концентрировать экотоксиканты физической, химической и биологической природы. Ввиду того, что подавляющее большинство экотоксикантов обладает мутагенным и канцерогенным эффектами, в основе которых лежит повреждение генетического аппарата соматической клетки, наиболее приемлемым решением является применение экспрессных и интегральных методов оценки генотоксичности.

Заключение по главе 1

В этой главе на основании литературных данных определено, что в озерах Западной Сибири сосредоточены огромные залежи сапропеля – донного отложения пресных водоемов, являющегося ценным органоминеральным сырьем. Месторождения сапропеля Омской области достаточно хорошо изучены: проведена их геологическая разведка, налажена добыча, исследованы экологическая безопасность и состав. Полученные данные свидетельствуют о перспективности использования сапропеля в медицине в качестве источника биологически активных веществ.

Наиболее представительной группой БАВ в составе органического вещества сапропеля являются гуминовые вещества, обладающие широким спектром биологической активности. Данные литературы свидетельствуют о широком применении БАД на основе гуминовых веществ как в России, так и за рубежом.

Однако свойства гуминовых веществ изучены недостаточно, так как на сегодняшний день не существует общепринятой методологии изучения и оценки

качества гуминовых веществ ввиду сложности их химического строения, полиморфизма состава и связанных с этим определенных трудностей при идентификации отдельных фракций. В результате в Государственном реестре лекарственных средств РФ не зарегистрировано ни одного лекарственного препарата на основе гуминовых веществ. Следовательно, разработка методологических основ стандартизации гуминовых веществ в ряду «сырье – субстанция – препарат» является актуальной задачей.

Актуальным также является проведение исследований по разработке способа модификации гуминовых веществ на стадии выделения с целью уменьшения их молекулярной массы, увеличения растворимости и количества различных функциональных групп в структуре молекул, что, в свою очередь, может повысить биодоступность гуминовых соединений.

Внедрение лекарственных средств на основе гуминовых веществ предполагает изучение их химико-фармакологических свойств, разработку способов модификации и подбор критериев стандартизации как сырьевого источника гуминовых соединений, так и самих гуминовых веществ.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДИКИ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Характеристика объектов исследования

Объектами исследования служили:

1) Образцы сапропеля озера Горчаково Тюкалинского района Омской области.

Образцы предоставлялись ЗАО НПО «Вега-2000-Сибирская органика» на протяжении 4 лет (2010-2013 годы), их общая масса составила около 200 кг.

Таблица 3 – Наименование и количество исследуемых образцов сапропеля

Год отбора проб	Наименование образца	Масса образца, кг
2010	Образец сапропеля №1	50,0
2011	Образец сапропеля №2	50,0
2012	Образец сапропеля №3	50,0
2013	Образец сапропеля №4	50,0

Нативный сапропель предварительно высушивали до воздушно-сухого состояния.

Высушенный сапропель представляет собой порошок темно-коричневого цвета с вкраплениями растительных и животных остатков, без запаха.

2) Гуминовые вещества, выделенные из сапропеля.

Гуминовые вещества представляют собой порошок темно - коричневого цвета, без запаха.

3) Гуминовые вещества, подвергнутые УФ-облучению на стадии выделения из сапропеля (рабочее название: «гуминовые вещества активированные» - ГВА).

Гуминовые вещества активированные представляют собой порошок темно - коричневого цвета с характерным блеском, без запаха.

Под термином «гуминовые вещества» понимали сумму гуминовых соединений, извлекаемых из сапропеля щелочными растворами при $pH > 7,0$ и осаждаемых растворами кислот при $pH < 2,0$.

4) Гуминовые вещества активированные—стандартный образец — высокоочищенные гуминовые вещества, подвергнутые УФ-облучению на стадии выделения из сапропеля, отвечающие требованиям ТУ (Приложение 3) и используемые в целях стандартизации гуминовых веществ активированных.

При разработке и оформлении проекта ФС на сапропель и ФС на гуминовые вещества руководствовались отраслевыми стандартами [122, 123, 124, 125] и методическими указаниями Министерства Здравоохранения РФ [151].

2.2. Метод отбора проб

Ежегодно индивидуальные пробы были отобраны из донного отложения в удалении 5 м от прибрежной кромки на глубине 1,5 м, каждая проба составляла около 50 кг. Затем отобранные пробы высушивали до воздушно-сухого состояния и упаковывали в полиэтиленовый герметичный контейнер. Сырье хранили в темном прохладном месте, используя по мере необходимости.

Точечные, средние и аналитические пробы отбирали согласно методикам, описанным в [125].

Морфологические признаки объектов исследования изучали и выявляли невооруженным глазом, с помощью лупы (10х), а также с помощью стереоскопического микроскопа МБС-10 (8х; 16х; 32х; 56х) по общепринятым методикам [39, 40].

Микроскопические признаки сырья устанавливали на плоскостных микропрепаратах сапропеля в соответствии с методиками, приведенными в ОФС ГФ XI. При подготовке к микроскопированию образцы сапропеля измельчали на предметном стекле шпателем. В качестве фиксирующей жидкости использовали воду и глицерин. Для получения объективных результатов анализировали не менее десяти препаратов [39, 40]. Препараты изучали под микроскопом

МИКМЕД-1 (увеличение 7x8; 7x20; 7x40). Объекты фиксировали цифровым фотоаппаратом «Samsung L-210» и с помощью фотонасадки Celestron. Снимки обрабатывали на компьютере в программе «Adobe Photoshop CS».

2.3. Методики определения экотоксикантов в объектах исследования

Гамма-спектрометрический анализ сапропеля проводили на базе ФГУ «Центр лабораторного анализа и технических измерений по Омской области». Исследование проводилось на гамма-спектрометре сцинтилляционном «Гамма – 1С» (ЗАО НПЦ Аспект, Россия). Метод гамма-спектрометрии основан на регистрации гамма-излучения проб в различных участках спектра, в которых преобладает излучение определяемых элементов. Данным методом возможно одновременное определение урана, радия, тория и калия в исследуемых пробах. На избирательной регистрации излучений, связанных с последовательным распадом короткоживущих изотопов, основан способ временной селекции воспринимаемых излучений. Обработка результатов измерений проводилась с помощью компьютерной программы «LSRM 16». Удельная эффективная активность рассчитывалась по формуле:

$$A_{(уд.эфф.)} = 0,085 \times A_{(уд.К-400)} + A_{(уд.Ра-226)} + 1,31 \times A_{(уд.Тh-232)}$$

$$A_{(уд.эфф.)} = 0,085 \times A_{(уд.К-400)} + A_{(уд.Ра-226)} + 1,31 \times A_{(уд.Тh-232)}, \text{ где}$$

$A_{(уд.эфф.)}$ – удельная эффективная активность, Бк/кг;

$A_{(уд.К-400)}$ – удельная активность калия, Бк/кг;

$A_{(уд.Ра-226)}$ - удельная активность радия, Бк/кг;

$A_{(уд.Тh-232)}$ - удельная активность тория, Бк/кг.

Атомно-эмиссионная спектрометрия относится к методам элементного анализа, основанным на изучении спектров испускания свободных атомов и ионов в газовой фазе. Метод позволяет провести определение химического состава вещества по спектру излучения его атомов под влиянием источника возбуждения [148].

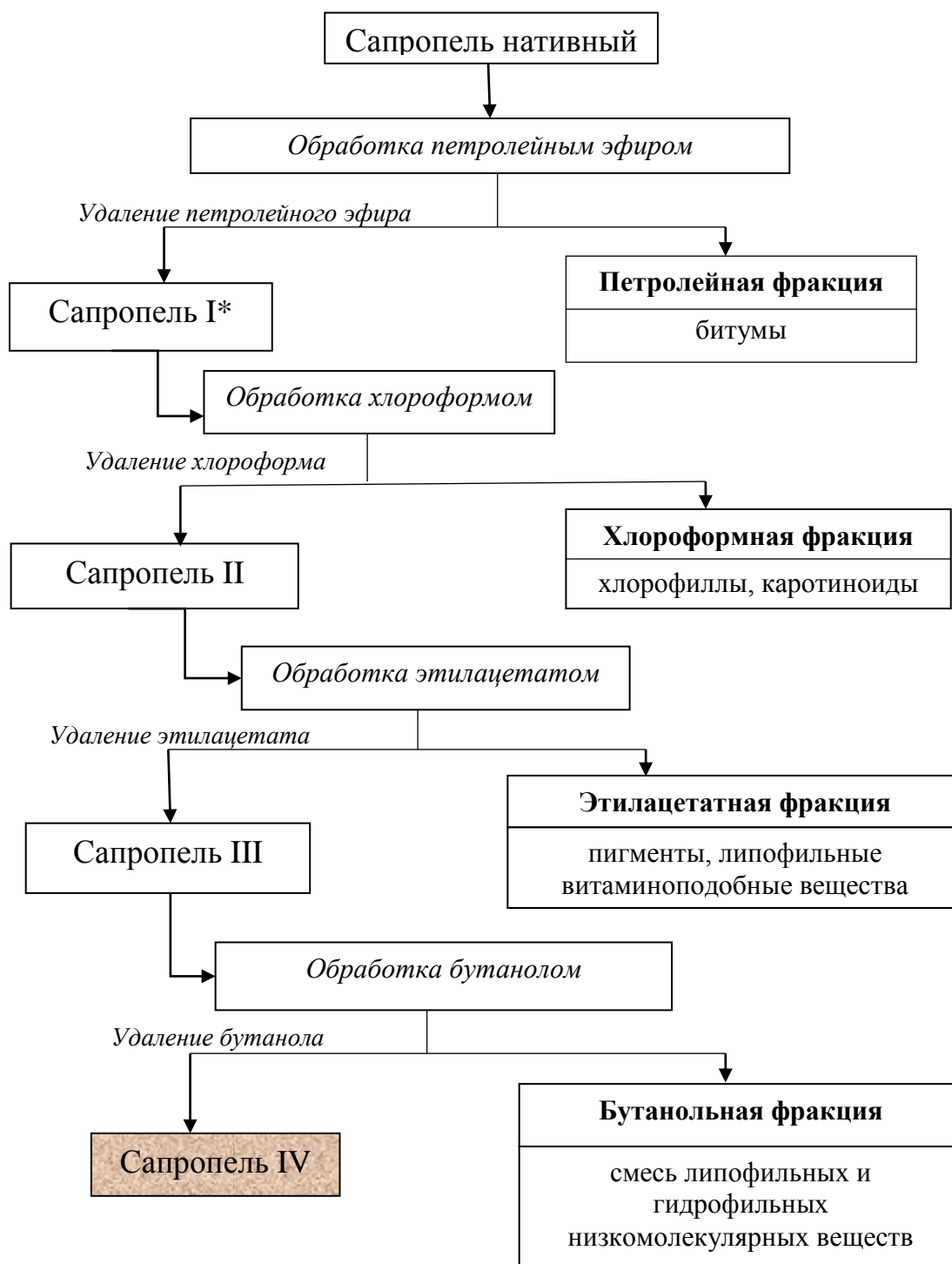
Определение проводили на базе ФГУ «Центр лабораторного анализа и технических измерений по Омской области» на приборе iCap 6300 Duo (Thermo Electron Corporation, США) в оптической области длин волн от 200 до 1000 нм. Обработку результатов выполняли с помощью компьютерной программы DUO (v8).

Определение хлорорганических пестицидов (ХОП) в сапропеле выполняли газохроматографическим методом с электрозахватным детектором на хроматографе «Хроматэк-Кристалл 5000» (ЗАО СКБ Хроматэк, Россия) с колонкой НР-5 (60 м × 0,32 мм, толщина пленки 1,00 μм). Экстракцию ХОП и хроматографирование выполняли по методике ГОСТа [34]. Результаты рассчитывали методом абсолютной калибровки.

2.4. Методики выделения гуминовых веществ из сапропеля

Групповой состав органического вещества сапропеля определяли поэтапным экстрагированием растворителями с различной полярностью. В результате были выделены следующие группы соединений: липофильные фракции, гуминовые вещества: гуминовые и гиматомелановые кислоты, фульвокислоты, водорастворимые и легкогидролизуемые вещества и негидролизуемый остаток.

Методика выделения липофильной фракции. Выделение липофильной фракции из сапропеля проводили по схеме, представленной на рисунке 7.



Примечание: * - римскими цифрами обозначена сапропелевая масса после обработки органическим растворителем

Рисунок 7 – Схема выделения БАВ сапропеля

Определение количественного содержания липофильной фракции проводили по следующей методике: навеску сапропеля массой 100 г, предварительно высушенного на воздухе при комнатной температуре, измельченного и просеянного через сито с диаметром отверстий 1,0 мм, поэтапно

обрабатывали органическими растворителями (петролевым эфиром, хлороформом, этилацетатом, бутанолом) в течение 24 часов. Органические вытяжки количественно переносили в колбы емкостью 250 мл для отгонки растворителей. Остатки после отгонки переносили количественно во взвешенные на аналитических весах бюксы. Бюксы с липофильными фракциями оставляли в вытяжном шкафу для удаления остатков растворителей, а затем доводили до постоянной массы в сушильном шкафу при температуре, обеспечивающей полное удаление органических растворителей (не более 60°C). Рассчитывали разность между весом бюкса с липофильными фракциями и пустыми бюксами. Полученные количества суммировали и находили общее содержание липофильной фракции в сапропеле по формуле:

$$X = \frac{m_{\text{лип.фр}} \times 100 \times 100}{m_{\text{can}} \times (100 - W)}, \text{ где}$$

X – выход липофильной фракции, в %;

$m_{\text{лип.фр}}$ – масса липофильной фракции, в г;

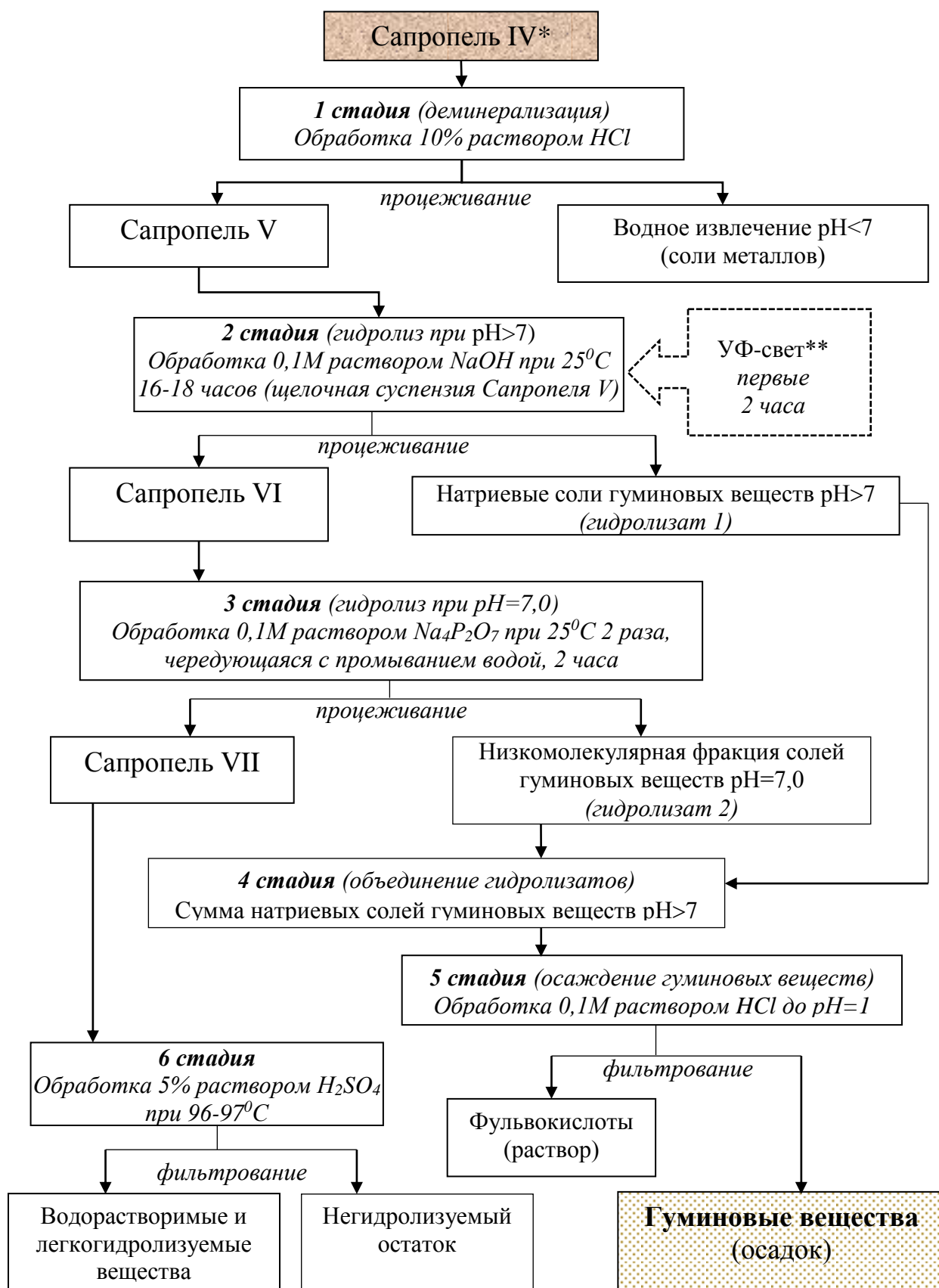
m_{can} – масса взятого сапропеля, в г;

W – потеря в массе при высушивании (влажность), в %.

Методика выделения гуминовых веществ. Гуминовые вещества выделяли из сапропеля, обозначенного на рисунке 7 как «Сапропель IV», после последовательной обработки органическими растворителями с возрастающей полярностью.

Схема выделения ГВ представлена на рисунке 8. На первой стадии проводили деминерализацию сапропеля для разрушения органоминеральных комплексов и удаления солей металлов (карбонатов, сульфидов и др.).

Стадия I (деминерализация): осадок сапропеля IV заливали 10 % раствором кислоты хлористоводородной в соотношении 1:5 без температурного воздействия с целью предотвращения деструкции органических веществ. Содержимое емкости несколько раз встряхивали в течение 30 мин, отстаивали до отслоения осадка и фильтровали. В фильтрате определяли наличие сульфид-ионов, карбонат-ионов, ионов кальция, магния и железа.



Примечание: * - см. рис. 7; ** - при выделении ГВА

Рисунок 8 – Схема выделения гуминовых веществ

Обработку сапропеля кислотой хлористоводородной проводили до отрицательной реакции фильтрата на определяемые ионы. Определение ионов в фильтрате проводили согласно методике, указанной в общей фармакопейной статье в ГФ XI, ч.1, стр.159 «Общие реакции на подлинность». В осадке (Сапропель V) содержится сумма гуминовых веществ и негидролизуемые соединения.

Стадия 2 (щелочной гидролиз сапропеля с целью выделения гуматов): осадок (Сапропель V) заливали 0,1 М раствором натрия гидроксида в соотношении 1:5 при 25°C 4 раза по 16-18 часов. В результате получали щелочную суспензию Сапропеля V, содержащую сумму натриевых солей гуминовых веществ.

Стадия 3 (выделение низкомолекулярной фракции ГВ): сапропель VI обрабатывали 0,1 М раствором натрия пиродифосфата с рН=7,0 при 25°C 2 раза. Обработку чередовали с промыванием водой. В результате в растворе содержалась низкомолекулярная фракция натриевых солей гуминовых веществ.

Стадия 4 (получение суммы натриевых солей гуминовых веществ): объединяли полученные гидролизаты, процеживали их через ватно-марлевый тампон, а затем фильтровали через бумажный складчатый фильтр. В результате получали раствор натриевых солей гуминовых веществ.

Стадия 5 (осаждение ГВ): к полученному раствору добавляли 0,1 М раствор кислоты хлористоводородной до рН 1-2. Кислоту добавляли медленно, при постоянном перемешивании. Наблюдалось обильное выпадение аморфного осадка гуминовых веществ. Очистку осадка ГВ проводили растворением его в 0,1 М растворе натрия гидроксида и повторным осаждением 0,1 М раствором кислоты хлористоводородной. Полученный осадок отфильтровывали через беззольный складчатый фильтр. Осадок ГВ на фильтре промывали водой очищенной до нейтральной реакции по универсальной индикаторной бумаге. Осадок, высушенный в сушильном шкафу при температуре 60°C до воздушно-сухого состояния, представляет собой порошок темно-коричневого цвета. Выход гуминовых веществ рассчитывали по формуле:

$$X = \frac{m_{гв} \times 100 \times 100}{m_{can} \times (100 - W)}, \text{ где}$$

X – выход гуминовых веществ, в %;

$m_{гв}$ – масса выделенных гуминовых веществ, в г;

m_{can} – масса взятого сапропеля, в г;

W – потеря в массе при высушивании (влажность), в %.

В фильтрате остаются фульвокислоты (ФК), их соли и другие органические примеси. Для очистки фульвокислот от примесей фильтрат пропускали через активированный уголь (10 г). Раствор пропускали через катионит КУ-2 в H^+ - форме. Жидкости давали стекать со скоростью 2-3 капли в минуту. Колонку промывали свежeproкипяченной и охлажденной очищенной водой до нейтральной реакции на метиловый оранжевый. Фильтрат представляет собой раствор светло-желтого цвета, содержащий сумму ФК. Для получения ФК в твердом виде раствор высушивали и получали порошок фульвокислот темно-красного цвета. Выход ФК рассчитывали по формуле:

$$X = \frac{m_{фк} \times 100 \times 100}{m_{can} \times (100 - W)}, \text{ где}$$

X – выход фульвовых кислот, в %;

$m_{фк}$ – масса выделенных фульвовых кислот, в г;

m_{can} – масса взятого сапропеля, в г;

W – потеря в массе при высушивании (влажность), в %.

Стадия 6 (выделение водорастворимых (ВРВ), легкогидролизующихся (ЛГВ) веществ и негидролизующего остатка): сапрпель VII, освобожденный от липидов и гуминовых веществ, обрабатывали 5 % раствором кислоты серной при температуре 96-97°C в течение 2 часов. После чего надосадочную жидкость сливали, остаток в колбе повторно заливали тем же количеством кислоты, и гидролиз продолжали ещё 2 часа при тех же условиях. Содержимое колбы фильтровали через бумажный складчатый фильтр. Осадок на фильтре промывали водой очищенной до нейтральной реакции на универсальную индикаторную бумагу. Фильтр с осадком сушили на воздухе и снимали с фильтра во взвешенный бюкс, затем подсушивали до воздушно-сухого состояния в сушильном шкафу при

40°C. Полученный остаток взвешивали, учитывая потери на фильтре, и определяли массу остатка после гидролиза по формуле:

$$X = \frac{m_{(врв+лгв)} \times 100 \times 100}{m_{can} \times (100 - W)}, \text{ где}$$

X – выход водорастворимых и легкогидролизуемых веществ, в %;

$m_{врв+лгв}$ – масса выделенных ВРВ и ЛГВ, в г;

m_{can} – масса взятого сапропеля, в г;

W – потеря в массе при высушивании (влажность), в %.

Осадок, свободный от гуминовых, водорастворимых и легкогидролизуемых веществ, представляет собой негидролизуемую часть сапропеля. Негидролизуемый остаток высушивали при температуре 110°C. Выход негидролизуемого остатка определяли по формуле:

$$X = \frac{m_{нго} \times 100 \times 100}{m_{can} \times (100 - W)}, \text{ где}$$

X – выход негидролизуемого остатка, в %;

$m_{нго}$ – масса выделенного негидролизуемого остатка, в г;

m_{can} – масса взятого сапропеля, в г;

W – потеря в массе при высушивании (влажность), в %.

Методика выделения гуминовых веществ с использованием УФ облучения и ультразвука. Обоснование и подбор условий выделения гуминовых веществ приведены в Главе 3. При разработке оптимальных способов выделения гуминовых веществ проводили УФ-облучение гуминовых соединений на разных стадиях выделения в термостатируемых кюветах (20–22°C) с помощью ртутной разрядной лампы при длине волны 254 нм (HNS G5W обр Osram) и 365 нм (PL-S 9W/08 Black Light Philips) на расстоянии 10 см в течение различных промежутков времени (от 5 до 240 минут) и при различной температуре (от 25°C до 100°C).

Выделение гуминовых веществ по методике, описанной выше, но на стадии 2, щелочную суспензию Сапропеля V (рисунок 8) подвергали УФ-облучению в термостатируемых кюветах (20–22°C) с помощью ртутной разрядной лампы при

длине волны 254 нм (HNS G5W obr OSRAM) на расстоянии 10 см в течение первых 2 часов из 16-18 часов, во время которых происходит осаждение.

При разработке условий выделения ГВ использовали ультразвуковой диспергатор УЗД2-0,1/22 с рабочей частотой 22 кГц, амплитудой механических колебаний 25 мкм и мощностью 100 Вт.

2.5. Методики изучения элементного состава гуминовых веществ

Элементный анализ проводили методом пиролизной хроматографии на автоматическом CHNS/O элементном анализаторе «Vario Micro cube» (Elementar GmbH, Германия). Метод основан на сочетании высокотемпературного сжигания пробы в кислороде с последующим восстановлением оксидов, газохроматографическим разделением продуктов пиролиза в токе гелия и детектировании продуктов катарометром. Результаты элементного анализа были скорректированы, исходя из зольности и влажности объектов. Вещества предварительно сушили в вакуум-эксикаторе над пентоксидом фосфора в течение суток. Влажность определяли по приросту массы образца после высушивания в результате выдерживания его на воздухе в течение 12 часов. Сожжение пробы проводили в двух отдельных реакторах (определение С, Н, N и О) с самостоятельным обогревом, подсоединенных к соответствующей хроматографической колонке. При пользовании одной из колонок выход из второй служил сравнительной линией детектора. Исследования проводили на базе Института проблем переработки углеводов СО РАН, г. Омск.

Расчет атомных отношений произведен по формулам [118, 121]:

$$H/C = \frac{[(\%H/\%C)] \times 12,011}{1,00794}; \quad C/N = \frac{[(\%C/\%N)] \times 14,0067}{12,011}; \quad O/C = \frac{[(\%O/\%C)] \times 12,011}{15,9994}$$

Вычисление атомного отношения Н/С по результатам ЯМР спектроскопии проводили по формулам, приведенным в работе Д. В. Ковалевского [78]:

$$\frac{H}{C} = \frac{(2/3 \cdot (C_{Ar} + C_{ArO}) + 5/3 \cdot C_{Alk-O} + 2 \cdot C_{Alk})}{\sum C}, \text{ где}$$

C_{Alk} - С- и Н-замещенные алифатические атомы углерода;

C_{Alk-O} - O-замещенные алифатические атомы углерода.

Степень ароматичности: $C_{Ar}/C_{Alk} = (C_{Ar} + C_{ArO}) / (C_{H_n} + C_{Carb})$;

Содержание полисахаридных фрагментов: $C_{Carb} = CH_2O + OCH + OSO$.

Составление брутто формулы и расчет минимального значения молекулярной массы гуминовых веществ проводили согласно методике Д. С. Орлова [121]:

1) выражали элементный состав в молях элемента на 100 г вещества; для этого процентное содержание элементов делили на их атомные массы;

2) находили элемент, содержание атомов которого составляло минимальное количество;

3) определяли, сколько атомов других элементов приходится на один атом элемента, находящегося в минимальном количестве; для этого делили найденное количество всех элементов на значение содержание атома, находящегося в минимальном количестве;

4) умножали найденные величины на наименьшее число, приводящее все значения к целому числу атомов, поскольку в молекуле не может быть дробного числа атомов;

5) рассчитывали минимальную молекулярную массу гуминового вещества.

Найденные таким способом минимальные молекулярные массы определяют нижнюю границу возможных реальных молекулярных масс [121].

2.6. Методики определения подлинности структурных компонентов гуминовых веществ

Для определения структурных компонентов и функциональных групп в молекулах гуминовых соединений 1,0 г испытуемых веществ растворяли в 100 мл 0,1 М раствора натрия гидроксида, полученный раствор фильтровали и проводили испытание согласно методикам, указанным в общей фармакопейной статье «Общие реакции на подлинность» ГФ XI, ч. 1, стр. 159 и по общепринятым методикам:

Карбонильная группа: к 5 каплям раствора исследуемого образца прибавляли 10 капель реактива Несслера, при наличии карбонильной группы образуется осадок красно-коричневого цвета.

Кетонная группа: к 1 мл раствора исследуемого образца прибавляли 0,5 мл раствора кислоты хлористоводородной, 0,5 мл раствора 2,4-динитрофенилгидразина, нагревали на водяной бане в течение 2 мин, о присутствии кетогруппы судили по образованию желтого окрашивания.

Карбоксильная группа, спиртовой гидроксил, фенольный гидроксил: к 1 мл раствора исследуемого образца прибавляли 0,5 мл раствора железа хлорида, образование раствора сине-фиолетового цвета указывает на наличие определяемых групп.

Сложноэфирная группа: к 5 каплям раствора исследуемого образца прибавляли 1-2 капли 1М раствора гидроксиламина гидрохлорида и 1 каплю 1 М раствора натрия гидроксида. Через 2-3 мин добавляли 1 каплю 1 М раствора кислоты уксусной, перемешивали и добавляли 1 каплю раствора меди сульфата, при наличии сложноэфирной группы образуется раствор красно-коричневого цвета.

Ароматическая первичная аминогруппа: на газетную бумагу помещали 2 капли раствора исследуемого образца и добавляли 2 капли раствора кислоты хлористоводородной, пятно приобретает лимонно-желтый цвет в присутствии первичных ароматических аминов.

Определение ковалентно связанной серы: 1) к 1 мл раствора исследуемого образца прибавляли 1 мл раствора натрия гидроксида, кипятили в течении 1 мин. К полученному раствору прибавляли 0,5 мл раствора свинца ацетата, в присутствии ковалентно связанной серы образуется осадок черного цвета;

2) к 1 мл раствора исследуемого образца прибавляли 1 мл калия нитрата, кипятили в течение 1 мин. К полученному раствору прибавляли 0,5 мл раствора бария хлорида, при наличии серы образуется белый осадок, нерастворимый в разведенных минеральных кислотах.

Непредельные C=C связи: к 1 мл раствора исследуемого образца прибавляли по каплям 0,5 М раствор калия перманганата, обесцвечивание раствора свидетельствует о наличии непредельных связей.

2.7. Методики определения показателей чистоты гуминовых веществ

Определение растворимости проводили согласно методике, указанной в общей фармакопейной статье «Растворимость» ГФ XII, ч. 1, стр. 92 - (ОФС 42-0049-07) [41].

Определение окраски раствора гуминовых веществ проводили согласно методике, указанной в общей фармакопейной статье «Степень окраски жидкостей» ГФ XII, ч.1, стр. 93 - (ОФС 42-0050-07) [41].

Прозрачность и степень мутности раствора гуминовых веществ определяли согласно методике, указанной в общей фармакопейной статье «Прозрачность и степень мутности жидкостей» ГФ XII, ч. 1, стр. 98 - (ОФС 42-0051-07) [41].

Определение летучих веществ и воды проводили согласно методике, указанной в ГФ XI, вып. 1, стр.176 [39].

Определение золы общей (зольности) и золы, нерастворимой в 10% растворе хлористоводородной кислоты, проводили согласно методикам, указанным в ГФ XII, ч. 1, стр. 115 и ГФ XI, вып. 2, стр. 25 [39, 40].

Определение сульфатной золы проводили согласно методике, указанной в общей фармакопейной статье «Сульфатная зола» (ОФС 42-0056-07) в ГФ XII, ч. 1, стр. 115 [41].

Испытания на чистоту и допустимые пределы примесей проводили путем сравнения с эталонными растворами, устанавливающими предел содержания данной примеси, после проведения реакции согласно методикам, указанным в ГФ XI, вып. 1, стр. 165 и ГФ XII, ч. 1, стр. 118 [39, 41].

Определение тяжелых металлов в зольном остатке гуминовых кислот проводили по методу 1, указанному в общей фармакопейной статье «Тяжелые металлы» (ОФС 42-0059-07) в ГФ XII, ч. 1, стр. 121 [41].

Измерение pH растворов проводили на pH-метре «Мультитест ИПЛ-101-1» (НПП Семико, Россия). Калибровка электродной системы прибора проводилась с помощью градуировочного графика автоматически на основании измеренных значений ЭДС в пяти стандартных растворах. В процессе градуировки контролировалась исправность электродов по крутизне электродной функции.

2.8. Исследование морфологии поверхности гуминовых веществ

Исследование морфологии поверхности образцов проводили с использованием сканирующего электронного микроскопа JEOL JSM-6610LV («JEOL», Япония), оснащённого энергодисперсионным анализатором INCAx-Act («Oxford Instruments», Япония). Диспергированный образец помещали на предметный столик микроскопа и вакуумировали до остаточного давления 10^{-5} мм рт. ст. Исследования проводили на базе Института проблем переработки углеводородов СО РАН, г. Омск.

2.9. Спектроскопические методы исследования гуминовых веществ

Спектры в ультрафиолетовой (УФ) и видимой областях регистрировали на спектрофотометре UNICO-2802S («UNICO», США) в кварцевых кюветах с толщиной слоя 1 см в диапазоне от 190 до 1100 нм. Отношения оптических плотностей при 465 и 650 нм (E_4/E_6) рассчитывали для 0,001% растворов гуминовых веществ, в качестве растворителя использовали 0,1 М раствор натрия гидроксида.

Спектроскопию в инфракрасной области проводили на ИК-Фурье спектрометре «Infracum FT – 801» (Россия) в таблетках KBr в соотношении 1:100, в интервале значений частот от 500 до 4000 см^{-1} . Измерение проводили на базе

БУОО «Территориальный центр по сертификации и контролю качества лекарственных средств Омской области». Расшифровку полученных спектров проводили согласно справочным данным [148].

Спектры флуоресценции записывали на флуориметре AvaSpec-2048 (Avantes, Голландия) для растворов гуминовых соединений с концентрацией 20 мг/л, полученных растворением в 0,05 М растворе натрия гидрокарбоната, в интервале длин волн от 460 до 720 нм. Исследования проводили на базе Института проблем переработки углеводов СО РАН, г. Омск.

Спектроскопия ядерного магнитного резонанса. Фрагментный состав гуминовых соединений определяли методом спектроскопии ЯМР на спектрометре AVANCE III™ 400 (Bruker Analytic GmbH, Germany) с рабочей частотой на ядрах ^{13}C 100,63 МГц. Спектры ЯМР ^{13}C регистрировали в твердой фазе в эксперименте с кросс-поляризацией и вращением под магическим углом (CPMAS ^{13}C ЯМР) [222]. Навески соединений (100-200 мг) помещали в ротор из оксида циркония с внешним диаметром 4 мм и вращали со скоростью 10 кГц. Использовали импульсную последовательность RAMP CP (линейное увеличение амплитуды радиочастотного поля при переносе поляризации), время аквизиции (At) – 34 мс, задержка между импульсами (RD) – 5 с, число накоплений – 2000. Спад свободной индукции (ССИ) дополняли нулями до 4096 точек и проводили экспоненциальное умножение (70 Гц). При фазовой коррекции фиксировали фактор первого порядка равным – 45°. Шкалу выставляли по сигналу углерода карбоксильной группы глицина (176.1 м.д.). Исследования проводили на базе Института проблем переработки углеводов СО РАН, г. Омск.

2.10. Методики количественного определения функциональных групп кислотного характера

Исследование количества функциональных групп проводилось по методу Бозма [217, 218] с кондуктометрической фиксацией конечной точки титрования на лабораторном анализаторе «Мультитест КСЛ» (НПП Семико, Россия) при

температуре $20 \pm 2^\circ\text{C}$. Методика основана на взаимодействии карбоксильных, лактонных и гидроксильных (фенольных) групп с основаниями различной силы (NaHCO_3 , Na_2CO_3 , NaOH) и на разной активности функциональных групп по отношению к реагентам.

Определение количества карбоксильных групп. В каждую из трех конических колб помещали около 0,00025 – 0,25 г (точная навеска) испытуемого материала. К навеске приливали 25 мл 0,01 М раствора натрия гидрокарбоната. Смесь энергично встряхивали на продольном встряхивателе в течение 30 мин и фильтровали через плотный бумажный фильтр для тонких осадков. Из фильтрата отбирали 3 пробы по 5 мл, переносили в коническую колбу емкостью 50 мл и титровали 0,01 М раствором кислоты хлористоводородной. Определяли количество кислоты хлористоводородной, пошедшей на титрование, как среднее из трех испытаний (*b*).

Выполняли контрольное титрование 3 проб по 5 мл 0,01 М раствора натрия гидрокарбоната 0,01 М раствором кислоты хлористоводородной и определяли количество кислоты хлористоводородной, пошедшей на титрование контрольной пробы (*a*).

Содержание карбоксильных групп N_1 рассчитывали по формуле:

$$N_1 = \frac{[(a - b) \times 0.01 \times K \times 25]}{(m \times 5)} = \frac{[(a - b) \times 0.01 \times K \times 5]}{m} [\text{ммоль/г}], \text{ где}$$

a - количество 0,01 М раствора кислоты хлористоводородной, пошедшей на титрование контрольной пробы, мл;

b - количество 0,01 М раствора кислоты хлористоводородной, пошедшей на титрование анализируемой пробы (фильтрата), мл;

25 - объем 0,01 М раствора натрия гидрокарбоната, взятого для обработки, мл;

5 - объем фильтрата, взятый для титрования, мл;

K - поправочный коэффициент для раствора кислоты хлористоводородной;

m - навеска образца, г.

Определение суммарного количества карбоксильных и лактонных групп. В каждую из трех конических колб помещали около 0,00025 – 0,25 г (точная навеска) испытуемого образца. К навеске приливали 25 мл 0,01 М раствора натрия карбоната. Смесь энергично встряхивали на продольном встряхивателе в течение 30 мин и фильтровали через плотный бумажный фильтр для тонких осадков. Из фильтрата отбирали 3 пробы по 5 мл, переносили в коническую колбу емкостью 50 мл и титровали 0,01 М раствором кислоты хлористоводородной. Определяли количество кислоты хлористоводородной, пошедшей на титрование, как среднее из трех испытаний (*b*).

Выполняли контрольное титрование 3 проб по 5 мл 0,01 М раствора натрия карбоната 0,01 М раствором кислоты хлористоводородной и определяли количество кислоты, пошедшей на титрование контрольной пробы (*a*).

Содержание суммы карбоксильных и лактонных групп N_2 рассчитывали по формуле:

$$N_2 = \frac{[(a - b) \times 0.01 \times K \times 25]}{(m \times 5)} = \frac{[(a - b) \times 0.01 \times K \times 5]}{m} [\text{ммоль/г}], \text{ где}$$

a - количество 0,01 М раствора кислоты хлористоводородной, пошедшей на титрование контрольной пробы, мл;

b - количество 0,01 М раствора кислоты хлористоводородной, пошедшей на титрование анализируемой пробы (фильтрата), мл;

25 - объем 0,01 М раствора натрия карбоната, взятого для обработки, мл;

5 - объем фильтрата, взятый для титрования, мл;

K - поправочный коэффициент для раствора кислоты хлористоводородной;

m - навеска образца, г.

Определение количества гидроксильных, карбоксильных и лактонных групп (сумма). В каждую из трех конических колб помещали около 0,00025 – 0,25 г (точная навеска) испытуемого образца. К навеске приливали 25 мл 0,01 М раствора натрия гидроксида. Смесь энергично встряхивали на продольном встряхивателе в течение 30 мин и фильтровали через плотный бумажный фильтр для тонких осадков. Из фильтрата отбирали 3 пробы по 5 мл, переносили в

коническую колбу емкостью 50 мл и титровали 0,01 М раствором кислоты хлористоводородной. Определяли количество кислоты хлористоводородной, пошедшей на титрование, как среднее из трех испытаний (*b*).

Выполняли контрольное титрование 3 проб по 5 мл 0,01 М раствора натрия гидроксида 0,01 М раствором кислоты хлористоводородной и определяли количество кислоты хлористоводородной, пошедшей на титрование контрольной пробы (*a*).

Содержание суммы гидроксильных, карбоксильных и лактонных группировок N_3 рассчитывали по формуле:

$$N_3 = \frac{[(a-b) \times 0.01 \times K \times 25]}{(m \times 5)} = \frac{[(a-b) \times 0.01 \times K \times 5]}{m} [\text{ммоль/г}], \text{ где}$$

a - количество 0,01 М раствора кислоты хлористоводородной, пошедшей на титрование контрольной пробы, мл;

b - количество 0,01 М раствора кислоты хлористоводородной, пошедшей на титрование анализируемой пробы (фильтрата), мл;

25 - объем 0,01 М раствора натрия гидроксида, взятого для обработки, мл;

5 - объем фильтрата, взятый для титрования, мл;

K - поправочный коэффициент для раствора кислоты хлористоводородной;

m - навеска образца, г.

Содержание лактонных групп рассчитывали по разности $N_2 - N_1$, а содержание гидроксильных групп рассчитывали по разности $N_3 - N_2$.

Методика количественного определения гуминовых веществ активированных. 0,25 г гуминовых веществ активированных помещали в мерную колбу на 500 мл, растворяли в 100 мл 0,01 М раствора натрия гидрокарбоната и доводили объем раствора тем же растворителем до метки. Полученный раствор встряхивали на продольном встряхивателе в течение 30 мин и фильтровали через плотный бумажный фильтр для тонких осадков. Затем 25 мл фильтрата при постоянной температуре раствора $25 \pm 1^\circ\text{C}$ титровали 0,01 М раствором кислоты хлористоводородной и определяли показатель удельной электропроводности в конечной точке титрования.

Массовую концентрацию гуминовых веществ активированных определяли, используя градуировочный график зависимости выходного сигнала удельной электропроводности (мСм/м), рассчитанного при титровании карбоксильных функциональных групп методом Боэма, от массы навески гуминовых веществ. Количественное содержание гуминовых веществ активированных в процентах (X) в пересчете на абсолютно сухое сырье рассчитывали по формуле:

$$X = \frac{m \times 500 \times 100 \times 100}{0,25 \times (100 - W) \times 25}, \text{ где}$$

m – масса гуминовых веществ активированных в граммах, найденная по калибровочному графику;

W – потеря в массе при высушивании гуминовых веществ активированных в процентах.

Построение калибровочного графика. 1,0 г гуминовых веществ активированных – стандартного образца, высушенных до постоянной массы, помещали в мерную колбу на 500 мл, растворяли в 100 мл 0,01 М раствора натрия гидрокарбоната и доводили объем раствора тем же растворителем до метки. Из этого раствора готовили серию разбавленных растворов, содержащих гуминовых веществ соответственно 0,0025; 0,005; 0,0075; 0,01; 0,0125 г в 25 мл раствора. Полученные растворы встряхивали на продольном встряхивателе в течение 30 мин и фильтровали через плотный бумажный фильтр для тонких осадков, затем при постоянной температуре раствора $25 \pm 1^\circ\text{C}$ титровали 0,01 М раствором кислоты хлористоводородной и определяли показатель удельной электропроводности в конечной точке титрования.

2.11. Методы исследования сорбционных свойств и антиоксидантной активности сапропеля и гуминовых веществ

Сорбционную емкость объектов исследования определяли *in vitro* по йоду и метиленовому голубому. В качестве препарата сравнения использовали измельченные таблетки угля активированного производства ЗАО «Медисорб» РФ,

удовлетворяющие требованиям ФСП 42-0306-7709-06 «Уголь активированный» [188]. Определение сорбционной емкости по йоду проводили согласно методике [168], включающей кипячение в растворе кислоты хлористоводородной, встряхивание с раствором йода в растворе калия иодида и последующем титровании раствором натрия тиосульфата. Сорбционную емкость по йоду рассчитывали по формуле:

$$E_{I_2} = \frac{12,7 \cdot (V_1 - V_2)}{m}, \text{ где}$$

E_{I_2} – сорбционная емкость по йоду в мг/г;

V_1 - объем раствора натрия тиосульфата, идущего на титрование исходного йодного раствора, мл;

V_2 - объем раствора натрия тиосульфата, идущего на титрование йодного раствора после добавления сорбента, мл;

m - масса образца, г.

Исследование сорбционной емкости по метиленовому голубому [168] заключалось в добавлении к навеске гуминовых веществ 15 % раствора метиленового голубого, встряхивании и постепенном прибавлении этого же раствора по 1 мл по мере обесцвечивания. Сорбционную емкость (осветляющую способность) по метиленовому голубому рассчитывали по формуле:

$$E_{m/g} = 5 \cdot n, \text{ где}$$

$E_{m/g}$ - сорбционная емкость по метиленовому голубому в мг/г;

n – объем раствора метиленового голубого в мл, добавка последней порции которого (1 мл) не обесцветилась в течение 5 минут при контакте с испытуемым образцом.

Изучение антиоксидантной активности сапропеля и выделенных гуминовых веществ проводили *in vitro* на модели ингибирования аутоокисления адреналина в щелочной среде в присутствии исследуемых веществ. При этом скорость реакции оценивали спектрофотометрически по величине оптической плотности накапливающегося продукта, поглощающего электромагнитное излучение при длине волны 347 нм [128]. Для проведения реакции аутоокисления к 2 мл бикарбонатного буфера (рН=10,65) добавляли 0,1 мл 0,1% раствора

адреналина гидрохлорида и через 10 минут определяли оптическую плотность на спектрофотометре UNICO-2802S (США) при длине волны 347 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм (A_1). К растворам адреналина, приготовленным в аналогичных условиях, прибавляли 0,03 мл 1% щелочных растворов сапропеля, ГВ, ГВА или 1% водного раствора стандартного образца, затем определяли оптическую плотность (A_2). В качестве стандартного образца использовали известный антиоксидант – кислоту аскорбиновую.

Антиоксидантную активность (АОА) рассчитывали по формуле:

$$АОА = \frac{A_1 - A_2}{A_1} \times 100\%, \text{ где}$$

A_1 – оптическая плотность раствора адреналина гидрохлорида без добавления объекта исследования;

A_2 – оптическая плотность раствора адреналина гидрохлорида с добавлением объекта исследования.

2.12. Валидационная оценка аналитических методик

Валидация аналитических методик имеет целью определение одной или большего числа из следующих категорий измерений – специфичности, точности, сходимости, линейности и других характеристик, конкретное сочетание которых предопределяется разновидностью того или иного испытания [147, 148].

Основными валидационными характеристиками аналитических методик являются:

Специфичность, или избирательность (selectivity), методики проявляется в способности аналитического испытания измерять содержание анализируемого вещества в пробе в составе других компонентов. Избирательность выражают в величине систематической ошибки или в % погрешности между измеренной и истинной (теоретической) величиной.

Правильность, или точность (accuracy), методики выражает степень соответствия фактического параметра препарата его расчетному значению. Для

измерения точности проводятся испытания при искусственно создаваемых нагрузках, и определяется степень результативности анализов – пробу, характеристики которой известны, смешивают с наполнителями, а фактический параметр препарата сопоставляют с результатом контрольного исследования. Точность принято выражать в величине систематической ошибки или в % погрешности между измеренной и истинной величинами (экспериментальное значение/действительное значение $\times 100$ %).

Прецизионность, или сходимость (precision), измерений проявляется в степени соответствия между серией измерений, полученных в итоге контрольного исследования. Эту категорию принято выражать в коэффициенте вариации (% CV). CV представляет собой среднеквадратическое отклонение экспериментальных величин, поделенное на концентрацию анализируемого вещества. В измерениях принято использовать внутрианалитическую сходимость (повторяемость) и межаналитическую сходимость (воспроизводимость).

Линейность (linearity) заключается в потенциале контрольного исследования получать результаты испытаний, которые прямо пропорциональны концентрации анализируемого вещества в пробе. Определение этого параметра позволяет уточнять диапазон измерений конкретного аналитического испытания. Линейность принято измерять в виде углового коэффициента линии регрессии и ее дисперсии или в виде коэффициента смешанной корреляции (R_2) и коэффициента корреляции (R).

2.13. Методы статистической обработки результатов исследований

Статистическую обработку полученных результатов проводили путем расчета средней (X_{cp}) и средней квадратичной ошибки (m), граничных значений доверительного интервала ($X_{cp} \pm \Delta x$). О достоверности различий судили, используя параметрический (t -критерий Стьюдента) и непараметрические (T -критерий Манна-Уитни, Даннета) методы [23, 40, 106, 167]. Расчеты проводили с использованием программ Statistica 6.0 и SPSS 12.0.

ГЛАВА 3. ОПТИМИЗАЦИЯ ВЫДЕЛЕНИЯ ГУМИНОВЫХ ВЕЩЕСТВ ИЗ САПРОПЕЛЯ

3.1. Фармакогностическая оценка сапропеля озера Горчаково как источника гуминовых веществ

Химический состав и свойства сапропелей могут значительно отличаться в зависимости от месторождения, а также от разнообразия растительного и животного мира озера [73, 136, 173]. При оценке перспективности использования сапропеля в медицинской практике в качестве источника гуминовых веществ важное значение имеет содержание в нем органической части, так как гуминовые соединения являются доминирующей группой БАВ органического вещества сапропелей, обладающей биологической активностью [10, 84, 138, 143, 175].

Современные требования по внедрению в медицинскую практику новых видов лекарственного сырья природного происхождения включают в себя не только детальное исследование химического состава, но и разработку методик диагностики сырья по их микроскопическим признакам.

На данном этапе нашей задачей явилось выделение диагностически значимых признаков для создания и оформления проекта нормативной документации: ФС «Сапропель озера Горчаково».

Результаты микроскопического исследования образцов сапропеля представлены на рисунке 9.

При рассмотрении микропрепаратов сапропеля видны частицы зеленых, коричневых и серых оттенков (рисунок 9 а, б). Растительные и животные остатки в сапропеле присутствуют в виде частиц в стадии глубокого разложения.

Наиболее характерным повторяющимся диагностическим признаком является наличие диатомовых водорослей (*Diatomeae*). В поле зрения микроскопа наблюдаются одиночные билатеральные створки панцирей диатомей (рисунок 9 в, г, д, е).

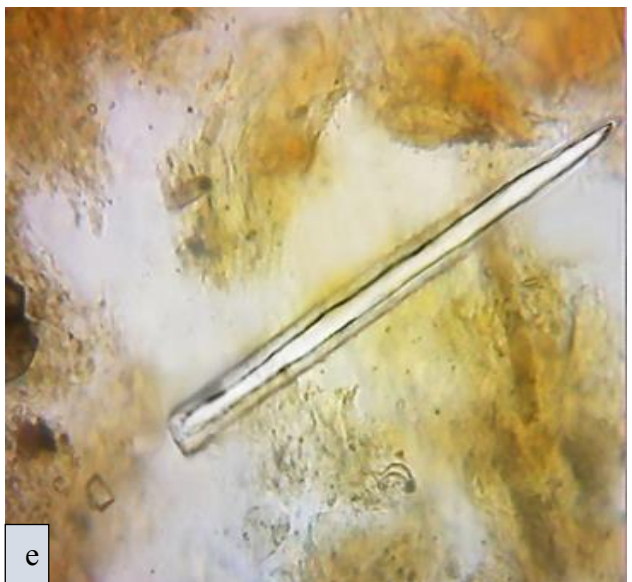
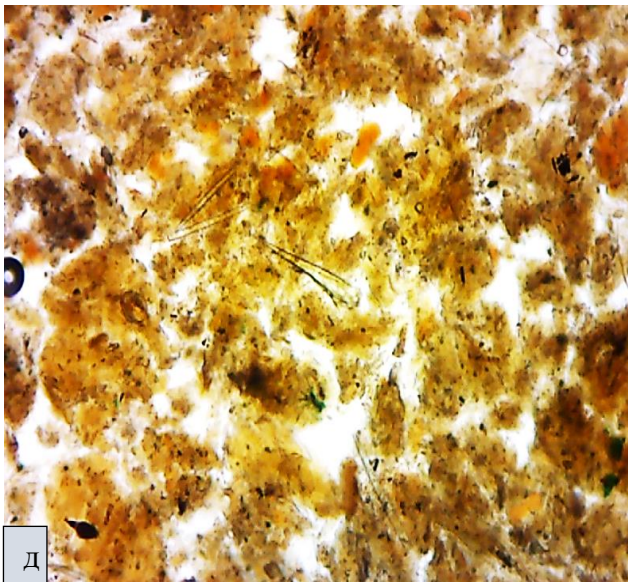
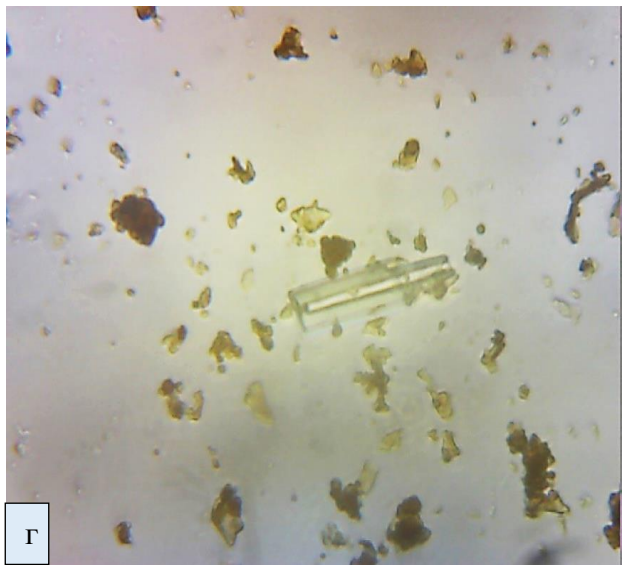
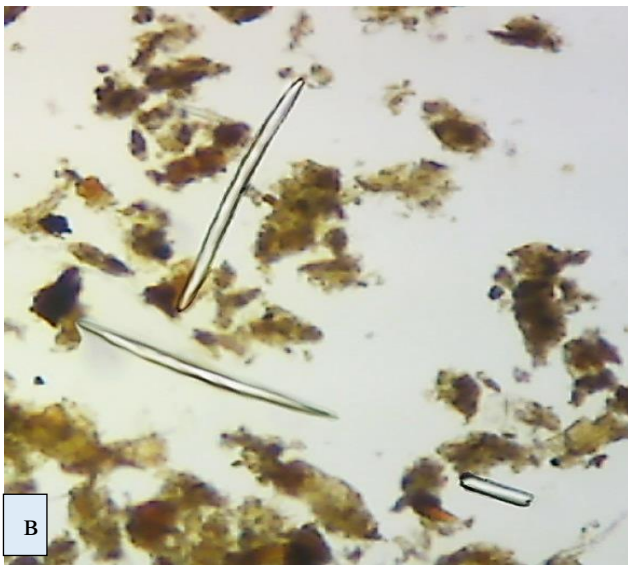
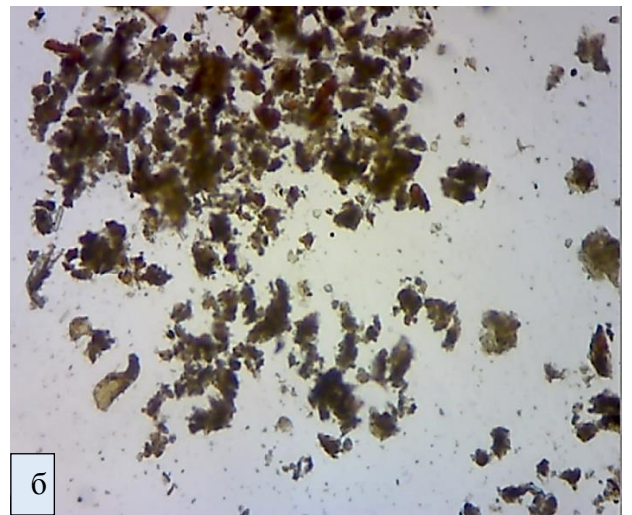
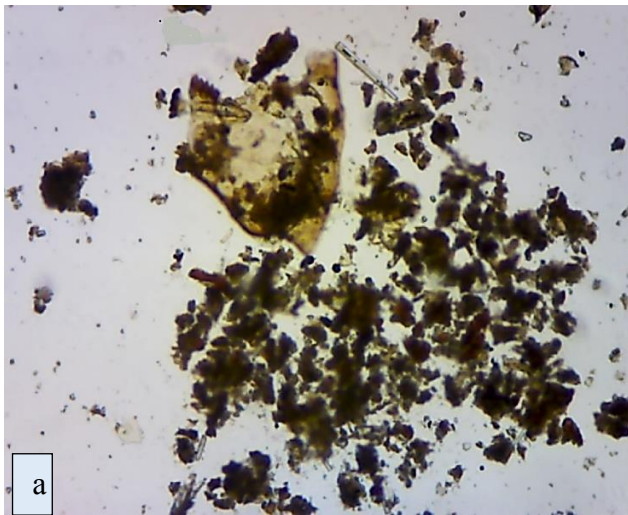


Рисунок 9 – Фрагменты микроскопического строения сапропеля озера Горчаково
(а, б $\times 20$, в, г, д, е $\times 40$)

Провести видовую идентификацию остатков организмов с целью зафиксировать диагностически значимые микро-признаки сапропеля озера Горчаково не представляется возможным.

Особенности процесса формирования сапропеля и химические свойства веществ, входящих в его состав, не исключают возможности загрязнения сапропеля радионуклидами, пестицидами и тяжелыми металлами, оказывающими негативное влияние на организм человека [76, 181, 214, 221].

Таким образом, необходимо разработать методы оценки основных параметров качества сапропеля как сырья, используемого в дальнейшем для выделения гуминовых веществ.

3.2. Результаты определения экотоксикантов в сапропеле

Для проверки экологической безопасности сапропеля озера Горчаково было проведено определение γ -активности радионуклидов, содержания тяжелых металлов и хлорорганических пестицидов (ХОП) в исследуемых образцах.

Результаты измерения радиоактивности образцов сапропеля гамма-спектрометрическим методом представлены в таблице 4.

Таблица 4 – Удельная активность природных радионуклидов в образцах сапропеля*

Естественный радионуклид	Удельная активность, Бк/кг	ПДК, Бк/кг
Калий-40 (K-40)	$55,0 \pm 1,5$	не > 370
Цезий-137 (Cs-137)	$24,9 \pm 0,8$	
Торий-232 (Th-232)	$0,95 \pm 0,04$	
Радий-226 (Ra-226)	<0,03	

*Образец сапропеля №4

Согласно полученным данным, удельная эффективная активность природных радионуклидов, содержащихся в образцах сапропеля, входит в диапазон средних значений в почве для местности в Омской области и не превышает предельно допустимые значения, указанные в СанПиН [158].

Результаты атомно-эмиссионного анализа сапропеля с учетом суточного поступления с продуктами питания, токсичной и летальной дозы [166] представлены в таблице 5.

Таблица 5 – Содержание микро- и макроэлементов в образцах сапропеля* озера Горчаково

Элементы	Содержание, мг/кг от массы воздушно сухого сырья	Суточное поступление, мг [166]	Суточная токсичная доза / летальная доза
Ca	33907 ± 169	800-1500	нетоксичен / -**
Mg	17208 ± 88	200-400	нетоксичен / -
Fe	16667 ± 85	6-40	200 мг / 7-35 г
Cu	1,700 ± 0,011	0,50-6,0	250 мг / -
Al	0,100 ± 0,007	2,45	5,0 г / -
Zn	11,00 ± 0,08	40	150-600 мг / 6 г
As	<0,05	0,04-1,4	50 мг / 340 мг
Mn	<0,05	0,4-10,0	40 мг / -
Pb	22,0 ± 0,2	0,06-0,5	1 мг / 10 г
Hg	0,21 ± 0,01	0,01-0,02	0,4 мг / 150-300 мг
Cd	0,46 ± 0,012	0,007-3	330 мг / 1,5-9 г
Ni	0,39 ± 0,01	0,3-0,5	50 мг / -

Примечание:* Образец сапропеля №4; ** «-» - нет данных

Результаты исследования нативного сапропеля методом атомно-эмиссионной спектроскопии показывают, что содержание металлов в объектах анализа не превышает гигиенических нормативов [166].

Хроматографический анализ образца сапропеля показал отсутствие в нём ХОП (таблица 6).

Таблица 6 – Содержание ХОП в образце сапропеля*

Пестицид	Концентрация, мкг/кг
α -ГХЦГ (гексахлорциклогексан)	<0,1
гексахлорбензол	<0,1
β -ГХЦГ (гексахлорциклогексан)	<0,1
линдан	<0,1
ДДЭ (дихлордифенилдихлорэтилен)	<0,1
ДДД (дихлордифенилдихлорэтан)	<0,1
ДДТ (дихлордифенилтрихлорэтан)	<0,1

*Образец сапропеля №4

Приведенные значения концентраций ХОП находятся ниже предела обнаружения для данного метода и, соответственно, не превышают требования нормы, указанные в ГОСТ [34, 36].

Таким образом, исследуемый сапропель является безопасным по экологическим показателям и может использоваться для выделения гуминовых веществ с целью возможного получения на их основе лекарственных препаратов.

3.3. Состав сапропеля озера Горчаково

При изучении состава сапропелей на первоначальном этапе необходимо провести оценку соотношения количества веществ неорганической (минеральной) и органической природы. Данное соотношение определяет тип сапропеля и является постоянной характеристикой, указывающей на качество исходного сырья для получения гуминовых веществ. Среднее значение минеральной части (зольность) составило $26,2 \pm 0,49\%$, что позволяет отнести сапропель озера Горчаково к органическому типу.

Минеральный состав сапропеля озера Горчаково (таблица 5) был нами изучен методом атомно-эмиссионного анализа. Установлено, что в состав минеральной части сапропеля входят макро- и микроэлементы: кальций, магний, алюминий, железо, медь, цинк, марганец, кобальт и др.

Известно, что органическая часть сапропеля представляет собой совокупность растительных и животных остатков и продуктов их распада. В

состав органической части входят продукты жизнедеятельности микроорганизмов, витамины, полимерные соединения, образовавшиеся в процессе биотермической и абиотической деструкции и синтеза органических веществ, а также другие биологически активные вещества [31, 135].

В результате изучения органической части сапропеля озера Горчаково был количественно определен её групповой состав. Результаты изучения группового состава в зависимости от года исследования представлены в таблице 7.

Таблица 7 – Групповой состав органической части сапропеля озера Горчаково (в % на воздушно-сухое вещество)

Год исследования	Органическая часть, %				
	Липофильная фракция	Гуминовые вещества (гуминовые и гиматомелановые кислоты)	Фульвовые кислоты	Водорастворимые и легкогидролизующие вещества	Негидролизующий остаток (гумин)
2010	3,11 ± 0,07	25,42 ± 0,56	1,30 ± 0,03	15,34 ± 0,34	28,11 ± 0,62
2011	2,90 ± 0,06	25,71 ± 0,57	1,42 ± 0,03	14,81 ± 0,33	27,91 ± 0,62
2012	3,22 ± 0,07	25,83 ± 0,57	2,33 ± 0,05	15,02 ± 0,33	27,75 ± 0,61
2013	3,30 ± 0,07	26,30 ± 0,58	2,95 ± 0,06	15,26 ± 0,34	27,53 ± 0,61
2010-2013(ср. значение)	3,13 ± 0,07	25,82 ± 0,57	2,00 ± 0,04	15,11 ± 0,34	27,83 ± 0,62

Установлено, что органическая часть сапропеля состоит из следующих фракций: вещества, извлекаемые органическими растворителями; водорастворимые и легкогидролизующие вещества; негидролизующий остаток (гумин); гуминовые вещества, состоящие из гуминовых и гиматомелановых кислот; фульвовые кислоты.

Содержание фракции, извлекаемой органическими растворителями, составило от 2,90% до 3,30% от массы сухого сапропеля. Гидролизующие вещества, переводимые в растворимое состояние под действием минеральных кислот, составили от 14,81% до 15,34% от массы воздушно-сухого сырья. Это прежде всего аминокислоты и углеводы, что было подтверждено результатами качественных химических реакций на данные соединения, проведенные нами по общепринятым методикам.

Гуминовые вещества, извлекаемые растворами щелочей, составили от 26,72% до 29,25% от массы навески сухого сапропеля. Из них содержание гуминовых и гиматомелановых кислот составило в среднем 25,82%, фульвокислот около 2%. Негидролизуемый остаток составил от 27,53% до 28,11% от общей массы сапропеля. Общее количество органической части в 2010 году составило 73,28%, в 2011 году – 72,75%, в 2012 году – 74,15% и в 2013 году – 75,34%. Как видно из данных таблицы 7, содержание гуминовых веществ, как наиболее важной составляющей органической части, ежегодно незначительно увеличивается. Содержание негидролизуемого остатка, напротив, снижается. По мнению ряда авторов [121, 138], в результате разложения негидролизуемого остатка возможно формирование молекул гуминовых веществ. В целом, эти показатели свидетельствуют о процессе гумификации – образовании специфических гуминовых веществ в результате трансформации органических остатков [38].

3.4. Изучение влияния физических факторов на количественный выход и свойства гуминовых веществ

Биологическая активность гуминовых веществ во многом зависит от их молекулярной структуры, растворимости, количества и состава функциональных групп [63, 82, 185, 224]. Свойства гуминовых веществ, выделенных разными способами, в каждом конкретном случае индивидуальны. В настоящее время в ряде работ опубликованы результаты по разработке способов повышения биодоступности гуминовых веществ путем применения различных методов модификации исходных соединений на стадиях выделения [183, 201, 227]. Данные приемы позволяют снизить молекулярную массу гуминовых кислот и тем самым увеличить их растворимость, а значит и биодоступность. Однако в большинстве случаев предлагаемые условия слишком жесткие, что приводит к разрушению структуры исходных гуминовых веществ.

Таким образом, задача настоящего исследования состоит в том, чтобы разработать методы, позволяющие, во-первых, максимально сохранить гуминовый каркас, во-вторых, получить гидрофильные фракции гуминовых

соединений, что позволит расширить спектр применения исследуемых соединений.

В настоящее время рядом исследователей изучено влияние различных факторов в процессе выделения гуминовых веществ из природных объектов на их количественный выход и качественный состав [103, 108, 171, 182]. Нами проведен анализ сведений о влиянии ультразвуковой кавитации и температуры на выход гуминовых веществ, определены достоинства и недостатки разработанных методов.

Более перспективными представляются работы авторов [170, 171], в которых изучалось влияние УФ-света на гуминовые вещества и была установлена зависимость между временем воздействия УФ-света и проявляемой антиоксидантной активностью гуминовых соединений. В целом, УФ-облучение наиболее близко к естественным процессам, происходящим в условиях формирования ГВ. Воздействие УФ-света, возможно, позволит изменять свойства исследуемых соединений, не нарушая при этом структуры гуминового каркаса.

Нами были разработаны условия выделения гуминовых веществ различными способами. На первом этапе исследований гуминовые вещества получали по схеме, представленной на рисунке 8. В дальнейшем, для увеличения выхода ГВ из сапропеля и изменения свойств выделенных соединений с целью повышения биодоступности, были предприняты попытки воздействия УФ-облучения различной интенсивности, ультразвуковой кавитации и температуры на разные стадии процесса. Критерием эффективности воздействия физических факторов на гуминовые вещества служили их выход из сапропеля (%), количество карбоксильных функциональных групп, являющихся одними из структурных фрагментов, ответственных за проявляемую биологическую активность ГВ, и способность выделенных гуминовых соединений ингибировать свободнорадикальное аутоокисление адреналина (антиоксидантная активность). Результаты сравнительной оценки ГВ, выделенных без воздействия физических факторов и под влиянием УФ-облучения, ультразвуковой кавитации и температуры, представлены в таблице 8.

Таблица 8 – Влияние физических факторов на выход, содержание карбоксильных групп и антиоксидантную активность гуминовых веществ

№ п/п	Объект	Условия выделения ГВ			Выход ГВ, %	Содержание карбоксильных групп в 0,05 % растворе выделенных ГВ, ммоль/г	Антиоксидантная активность выделенных ГВ, %***
		УФ-свет, λ, или ультразвук, ν	Температура	Время воздействия, мин			
1	2	3	4	5	6	7	8
1	Сапрпель IV*	254 нм	22°C	5	25,77	2,09	21,3
				30	25,56	2,11	20,5
				60	25,13	2,13	19,9
				120	23,17	2,22	20,6
				180	24,11	2,19	19,8
				240	25,05	2,15	18,4
		365 нм	22°C	5	25,82	2,11	21,3
				30	25,79	2,13	20,8
				60	25,22	2,15	21,1
				120	24,84	2,19	19,9
				180	24,97	2,09	19,7
				240	25,12	2,14	19,6
		22 кГц	22°C	5	23,70	2,02	19,4
				10	22,10	1,98	19,0
2	Щелочная суспензия Сапрпеля V**	-	25°C	16-18 часов	25,80	2,14	21,1
			60°C		26,11	2,12	21,9
			100°C		19,34	1,34	16,7
			-25°C		22,17	1,84	18,9
		22 кГц	22°C	5	24,80	1,98	19,3
				10	25,70	2,05	20,7

1	2	3	4	5	6	7	8
2	Щелочная суспензия Сапроделя V**	254 нм	25°C	5	24,16	2,16	26,5
				30	23,18	2,19	28,3
				60	22,23	2,27	28,4
				120	21,00	2,38	29,7
				180	20,83	2,31	29,5
				240	16,15	1,65	18,6
			60°C	5	24,19	2,16	26,3
				30	23,21	2,19	27,5
				60	22,08	2,27	29,4
				120	20,95	2,35	29,5
				180	20,66	2,30	28,8
				240	15,96	1,59	18,5
			100°C	5	19,07	1,36	17,5
				30	18,35	1,30	16,8
				60	18,52	1,24	15,4
				120	16,20	1,26	14,9
				180	15,56	1,17	13,8
				240	14,12	1,12	13,5
		365 нм	25°C	5	25,50	2,19	21,3
				30	24,91	2,15	21,1
				60	23,85	2,18	20,0
				120	23,59	2,19	21,9
				180	23,99	2,16	20,1
				240	22,17	1,99	19,9
60°C	5		25,65	2,21	19,2		
	30		24,99	2,19	20,3		
	60		23,96	2,16	21,4		
	120		24,01	2,22	22,6		
	180		24,25	2,09	22,4		
	240		23,11	1,89	20,1		

1	2	3	4	5	6	7	8
2	Щелочная суспензия Сапропеля V**	365 нм	100°C	5	19,97	1,97	20,2
				30	18,99	1,82	19,3
				60	19,03	1,85	19,6
				120	18,22	1,79	19,5
				180	18,96	1,74	18,9
				240	17,34	1,63	17,5
3	Гуминовые вещества**	254 нм	20°C	5	-	2,15	22,7
				30		2,17	22,8
				60		2,22	23,1
				120		2,24	23,2
				180		2,23	23,1
				240		2,06	20,7
		365 нм	20°C	5	-	2,12	21,0
				30		2,13	21,2
				60		2,16	21,4
				120		2,19	21,8
				180		2,18	21,5
				240		2,16	21,0

Примечание: *получение Сапропеля IV см. рис. 7;

**получение щелочной суспензии Сапропеля V и гуминовых веществ см. рис. 8;

***активность вещества сравнения аскорбиновой кислоты – 73%

Анализ полученных результатов показал, что максимальный выход гуминовых веществ происходит при условии выделения их из сапропеля без воздействия УФ-облучения на щелочную суспензию Сапропеля V (Глава 2 рисунок 8) при температуре 60°C и составляет 26,11 %. Выход гуминовых веществ в тех же условиях, но при температуре 25°C, составил 25,8 %, что существенно не отличается от выхода гуминовых веществ под воздействием температуры и, соответственно, свидетельствует об экономической нецелесообразности применения повышенных температур для увеличения выхода гуминовых соединений. Кроме того, повышение температуры приводит к снижению количества карбоксильных функциональных групп (ФГ) и антиоксидантной активности выделенных соединений, а воздействие температуры 100°C резко снижает выход гуминовых веществ, что, возможно, свидетельствует об их разрушении под влиянием высоких температур.

Воздействие низких температур на щелочную суспензию Сапропеля V также не дало увеличения выхода гуминовых веществ, при этом произошло незначительное уменьшение количества карбоксильных групп и антиоксидантной активности.

Под воздействием ультразвука происходит незначительное увеличение выхода гуминовых веществ, однако их биологическая активность при этом снижается, так как уменьшается количество карбоксильных ФГ и антиоксидантной активности. Кроме того, под воздействием ультразвуковой кавитации щелочная суспензия Сапропеля V превращается в коллоидную систему, что в значительной степени затрудняет дальнейший процесс выделения гуминовых веществ, и чем дольше степень воздействия ультразвуком, тем более вязким становится гидролизат. При действии ультразвуковой кавитации на сапропель не происходит увеличения выхода гуминовых веществ, и биологические свойства их при этом не изменяются.

Анализируя результаты воздействия УФ-облучения на разные объекты (таблица 8), можно сделать вывод, что под действием УФ-света длиной волны 254 нм и 365 нм на Сапропель IV (Глава 2 рисунок 7) не происходит существенного

изменения выхода гуминовых веществ, количества карбоксильных ФГ и антиоксидантной активности в сравнении с результатами без использования ультрафиолета.

Воздействие УФ-света на выделенные гуминовые вещества также не приводит к существенному изменению их свойств, так как содержание карбоксильных ФГ и АОА практически не изменяется по сравнению с гуминовыми веществами, не подвергавшимися облучению в процессе выделения.

Максимальное изменение свойств гуминовых веществ происходит при действии на 2 стадии на щелочную суспензию Сапропеля V УФ-облучения с длиной волны 254 нм в течение 120 минут. При этих условиях было обнаружено наибольшее содержание карбоксильных ФГ и максимальная антиоксидантная активность.

Ранее И. В. Соколовой было показано, что воздействие УФ-света (365 нм) не оказывает существенного влияния на биологические свойства и структуру гуминовых веществ [170]. Полученные нами результаты согласуются с данными работы И. В. Соколовой.

Таким образом, воздействие УФ-света с длиной волны 254 нм при температуре 25°C в течение 120 минут приводит к максимальному изменению свойств гуминовых веществ, что подтверждается увеличением содержания карбоксильных ФГ и степени выраженности антиоксидантной активности.

В ходе исследования было установлено, что размер осаждаемых частиц гуминовых веществ из щелочных растворов также свидетельствует о влиянии УФ-облучения на свойства гуминовых соединений. Гуминовые вещества, выделенные без УФ-облучения, на стадии осаждения медленно выпадают в осадок в виде крупных хлопьевидных конгломератов и при высыхании представляют собой аморфный порошок, состоящий из крупных частиц, мало растворимый в горячей воде. Гуминовые вещества, выделенные под воздействием УФ света, быстро осаждаются в виде частиц гораздо меньшего размера и при высыхании представляют собой мелкий аморфный порошок, умеренно растворимый в горячей воде.

Таким образом, было установлено, что воздействие ультрафиолета на стадии щелочного гидролиза приводит к образованию веществ, которые по качественным и количественным характеристикам отличаются от гуминовых веществ, полученных по классической методике.

Разработка методики выделения гуминовых веществ с применением ультрафиолетового облучения позволила определить следующие оптимальные параметры, способствующие выходу гуминовых веществ с максимальным содержанием карбоксильных групп и проявляющих наибольшую антиоксидантную активность: УФ-облучение гуминовых веществ на стадии щелочного гидролиза (рисунок 8, стадия 2) с помощью ртутной разрядной лампы при длине волны 254 нм в течение 120 минут при температуре 25°C.

В дальнейшей работе в отношении объектов исследования мы использовали следующие рабочие названия: гуминовые вещества, выделенные по классической методике, получили наименование «гуминовые вещества» или «ГВ», гуминовые вещества, выделение которых проводилось под воздействием ультрафиолетового света – «гуминовые вещества активированные» или «ГВА». Термин «активированные» в отношении ГВА применен нами в контексте понятия «наличие более активных свойств по сравнению с ГВ».

Свойства более быстро осаждаться из облученного гидролизата, лучше растворяться в горячей воде, присутствие большего числа карбоксильных групп и большей степени антиоксидантной активности, позволяют предполагать более высокую химическую и, как следствие, биологическую активность ГВА.

Заключение по главе 3

Таким образом, на первоначальном этапе следует провести предварительную оценку исходного сырья - сапропеля с целью изучения его экологической безопасности и обоснования возможности использования как источника БАВ. Необходимым условием является стандартизация природного сырья на основе которого предполагается разработка лекарственных препаратов.

Для сапропеля важными являются показатели, характеризующие количество его органической и минеральной частей. Чем выше процент органической части в нативном сырье, тем большее количество БАВ в нем содержится. Наиболее важной составляющей органической части сапропеля являются гуминовые вещества, которые во многом определяют биологическую активность сырья [138, 143, 175].

Провести видовую идентификацию остатков организмов по диагностически значимым микро-признакам сапропеля озера Горчаково не представляется возможным. Методы определения тяжелых металлов, хлорорганических пестицидов, зольности, количественного содержания гуминовых веществ могут быть использованы при разработке нормативной документации, регламентирующей качество исходного сырья – сапропеля.

Нами подтверждено, что свойства гуминовых веществ определяются не только источником их формирования, но и способом выделения из природного объекта, что согласуется с работами ряда авторов [103, 108, 171, 182, 183, 201, 227].

Таким образом, при разработке способа выделения гуминовых веществ из сапропеля было установлено, что воздействие УФ-света с длиной волны 254 нм при температуре 25°C в течение 120 минут приводит к максимальному изменению свойств гуминовых веществ, о чем свидетельствует увеличение количества карбоксильных ФГ и степени антиоксидантной активности.

Дальнейшие исследования гуминовых соединений были проведены в сравнительном аспекте свойств ГВ, выделенных из сапропеля без воздействия УФ-облучения, и ГВ, подвергнутых активирующему влиянию УФ-света.

ГЛАВА 4. ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ГУМИНОВЫХ ВЕЩЕСТВ САПРОПЕЛЯ ОЗЕРА ГОРЧАКОВО

4.1. Результаты определения экотоксикантов в гуминовых веществах

Удельная эффективная активность природных радионуклидов, содержащихся в образцах исходного сапропеля, не превышала предельно допустимые значения для лечебных грязей, а концентрация ХОП находилась ниже предела обнаружения для данного метода, в связи с чем нами не проводилось определение этих показателей в выделенных гуминовых веществах.

ГВ и ГВА, выделенные из сапропеля озера Горчаково, были исследованы методом атомно-эмиссионной спектрометрии.

Таблица 9 – Содержание микро- и макроэлементов в гуминовых веществах

Элементы	Содержание, мг/кг сухого вещества		Суточное поступление, мг [166]	Суточная токсичная доза / Летальная доза
	ГВ	ГВА		
Ca	1412 ± 7	1407 ± 7	800-1500	нетоксичен / -*
Mg	423 ± 2	421 ± 2	200-400	нетоксичен / -
Fe	513 ± 3	509 ± 3	6-40	200 мг / 7-35 г
Cu	0,700 ± 0,004	0,600 ± 0,003	0,50-6,0	250 мг / -
Al	<0,05	<0,05	2,45	5,0 г / -
Zn	6,00 ± 0,05	5,90 ± 0,05	40	150-600 мг / 6 г
As	<0,05	<0,05	0,04-1,4	50 мг / 340 мг
Mn	<0,05	<0,05	0,4-10,0	40 мг / -
Pb	8,60 ± 0,07	8,40 ± 0,06	0,06-0,5	1 мг / 10 г
Hg	<0,05	<0,05	0,01-0,02	0,4 мг / 150-300 мг
Cd	<0,05	<0,05	0,007-3	330 мг / 1,5-9 г
Ni	<0,05	<0,05	0,3-0,5	50 мг / -

Примечание:* «-» - нет данных

Анализ полученных данных свидетельствует о следовых количествах в изучаемых образцах мышьяка и марганца, а содержание тяжелых металлов в выделенных гуминовых веществах уменьшилось в несколько раз по сравнению с нативным сапропелем: концентрация свинца снизилась в 2,6 раз, ртути - в 4,2 раза, кадмия - в 9,2 раза, никеля - в 7,8 раз. Необходимо отметить, что в исследуемой фракции гуминовых веществ содержатся такие жизненно необходимые для человека элементы, как кальций, марганец, магний, медь, железо, цинк. При этом количественное содержание каждого элемента в составе гуминовых веществ не превышает суточной потребности взрослого человека в микро- и макроэлементах [166].

4.2. Исследование химических свойств гуминовых веществ

Большое разнообразие функциональных групп и структурных единиц в молекулах ГВ затрудняет определение их состава и основных показателей качества, необходимых для дальнейшей стандартизации выделенных объектов. Поэтому применение таких методов, как электронная микроскопия, элементный анализ, спектроскопические и электрохимические методы, позволяет получить индивидуальные данные о составе и свойствах ГВ в зависимости от сырьевого источника и способов их выделения.

В таблице 10 представлены основные свойства ГВ в зависимости от способа их выделения.

Сравнительная характеристика ГВ и ГВА, показала, что данные соединения различаются по органолептическим свойствам и растворимости. ГВ – крупный аморфный порошок, мало растворимый в горячей воде. ГВА – мелкий аморфный порошок, умеренно растворимый в горячей воде.

Установлено, что выход гуминовых веществ, выделенных из сапропеля с использованием УФ-облучения, незначительно снизился, что может быть объяснено разрывом двойных связей в молекулах гуминовых кислот под действием кванта света, приводящим к распаду молекулы гуминовой кислоты на

несколько фрагментов [121] и, соответственно, увеличению доли растворимой фракции гуминовых соединений, которые остаются в растворе.

Таблица 10 – Сравнительная характеристика гуминовых веществ и гуминовых веществ активированных

Объект	Выход, %*	Описание	Растворимость	Зола общая, %	Зола, нерастворимая в кислоте хлористоводородной, %	pH 1% водных растворов	Потеря в массе при высушивании, %
Гуминовые вещества	25,80 ± 0,25	Крупный аморфный порошок темно-коричневого цвета без запаха	Практически нерастворим в воде, мало растворим в горячей воде, растворим в растворах щелочей, мало растворим в хлороформе и спирте	2,24 ± 0,13	менее 0,01	5,85 ± 0,03	3,650 ± 0,133
Гуминовые вещества активированные	21,00 ± 0,23	Мелкий аморфный порошок темно-коричневого цвета без запаха	Практически нерастворим в воде, умеренно растворим в горячей воде, растворим в растворах щелочей, мало растворим в хлороформе и спирте	2,13 ± 0,11	менее 0,01	5,35 ± 0,05	4,120 ± 0,125

* от массы сапропеля

Содержание общей золы фракции гуминовых веществ в 10 раз ниже, чем такое значение в сапропеле и составило в среднем 2,24 % для ГВ и 2,13 % для ГВА. Этот результат отражает эффективность стадии деминерализации при выделении гуминовых веществ. Содержание золы, нерастворимой в кислоте хлористоводородной, в гуминовых веществ менее 0,01%, что вероятно свидетельствует о низком содержании соединений кремния в выделенных фракциях.

Анализ результатов испытаний на чистоту и допустимые пределы примесей (таблица 11) выделенных фракций ГВ и ГВА показал отсутствие превышений

количественного содержания примесей в исследуемых образцах. Это доказывает эффективность очистки гуминовых веществ от солей металлов на стадии деминерализации. Показатель содержания примесей хлоридов отражает полноту очистки гуминовых веществ на последней стадии выделения.

Таблица 11 – Результаты определения предельного содержания примесей в гуминовых веществах и гуминовых веществах активированных

Показатель	Содержание в ГВ и ГВА	Предельное содержание по ГФ XII	
		мкг/мл	%
хлориды	не более 0,02%	2	0,0002
сульфаты	не более 0,02%	10	0,001
тяжелые металлы	не более 0,001%	5	0,00005

Цветность водных растворов гуминовых веществ соответствует эталону коричнево-желтого оттенка ВУ 1.

Качественный анализ ГВ, проведенный химическими методами не дает достоверных результатов подтверждения наличия в их структуре тех или иных функциональных групп.

В целом, для разработки критериев стандартизации выделенных соединений необходимо проведение комплекса физико-химических методов анализа.

4.3. Результаты элементного анализа гуминовых веществ

Результаты элементного анализа позволяют охарактеризовать ГВ и получить определенную информацию о некоторых их свойствах. С помощью этого метода можно судить не только о процентном содержании различных элементов, но и рассчитать такие параметры, как ненасыщенность и степень окисленности ГВ.

Результаты элементного анализа и атомные отношения для ГВ и ГВА представлены в таблице 12.

Таблица 12 – Элементный состав и атомные отношения для ГВ и ГВА

Год исследования	Образец	Элементный состав*, масс. %				Атомные отношения		
		С	Н	N	О	H/C	C/N	O/C
2010	ГВ	54,56	5,73	4,87	34,84	1,25	13,06	0,48
	ГВА	52,84	5,53	4,43	37,20	1,25	13,91	0,53
2011	ГВ	53,17	5,82	4,86	34,95	1,30	12,76	0,49
	ГВА	51,95	5,51	4,41	38,13	1,26	13,74	0,55
2012	ГВ	53,08	5,72	4,92	35,17	1,28	12,58	0,49
	ГВА	50,17	5,56	4,42	39,85	1,32	13,24	0,59
2013	ГВ	55,01	5,86	4,89	33,56	1,27	13,12	0,46
	ГВА	52,13	5,50	4,44	37,93	1,26	13,69	0,55
Средние значения элементного состава ГВ		46-61**	4-6***	3-6**	30-40***	1,0-1,6***	11-15**	0,4-0,8***

*В пересчете на беззольную сухую навеску (влажность 7%);

** Д. С. Орлов, 1990;

***Rice and MacCarthy, 1991

Анализируя средние значения содержание азота в исследуемых ГВ (4,89 масс. %) и ГВА (4,43 масс. %) и углерода (54,96 масс. % и 51,77 масс. % соответственно) можно отметить, что, в целом, они удовлетворяют требованиям диагностических признаков гуминовых кислот по Д. С. Орлову [121], согласно которым содержание азота должно быть от 3 до 6 масс. % и углерода - от 46 до 61 масс. %.

Для характеристики изменений в строении ГВА, происходящих в процессе воздействия УФ-света, особый интерес представляет степень окисленности, рассчитываемая как атомное соотношение O/C. Среднее соотношение O/C для

ГВА составляет 0,56, для ГВ – 0,48, что косвенно указывает на увеличение количества кислородсодержащих групп под воздействием УФ-облучения.

Содержание кислорода косвенно характеризует количество кислородсодержащих функциональных групп [121]. Для исследуемых ГВА отмечены более высокие средние значения (38,28 масс. %) содержания кислорода по сравнению с ГВ (34,63 масс. %), что может быть связано с увеличением в их структуре карбоксильных, лактонных и гидроксильных групп [14, 64, 98]. Полученные данные согласуются с результатами количественного определения функциональных групп по методу Бозма.

Отношение Н/С является важным показателем, характеризующее степень ароматичности или ненасыщенности. Так, при соотношении $H/C < 1$ можно говорить о преобладании в структуре гуминовых кислот ароматических фрагментов. Если это отношение находится в диапазоне $1,0 < H/C < 1,4$, то структура гуминовых кислот носит преимущественно алифатический характер [121]. ГВ и ГВА имеют близкие значения среднего показателя данного отношения: 1,28 и 1,27 соответственно, что указывает на преобладание в их составе алифатических фрагментов ($H/C > 1$) [117].

Об относительно высоком количестве амидных и аминогрупп могут свидетельствовать данные атомного отношения C/N [14, 75]. Незначительное увеличение атомного отношения C/N в ГВА объясняется уменьшением количества углерода.

Расчет минимальной молекулярной массы ГВ и ГВА проводили по методу Д. С. Орлова, используя данные элементного состава [121].

Брутто-формулы гуминовых веществ и их минимальные молекулярные массы представлены в таблице 13.

Таблица 13 – Минимальные молекулярные массы для ГВ и ГВА

Образец	Брутто-формула	Минимальная M_r
ГВ	$C_{39}H_{49}O_{19}N_3$	863,83
ГВА	$C_{27}H_{34}O_{15}N_2$	626,57

Таким образом, элементный анализ подтверждает наличие структурных различий молекул ГВ и ГВА. Однако данный метод не дает информации о реакционных центрах и функциональных группах в структуре исследуемых соединений. Для прогноза реакционной способности гуминовых веществ и разработки методов их стандартизации необходимы дополнительные спектральные исследования.

4.4. Результаты исследования морфологии поверхности гуминовых веществ методом сканирующей электронной микроскопии (SEM)

Изменение морфологии поверхности гуминовых веществ под действием фотохимической активации оценивали методом сканирующей электронной микроскопии. Микрофотографии гуминовых веществ и гуминовых веществ активированных представлены на рисунках 10 – 12.

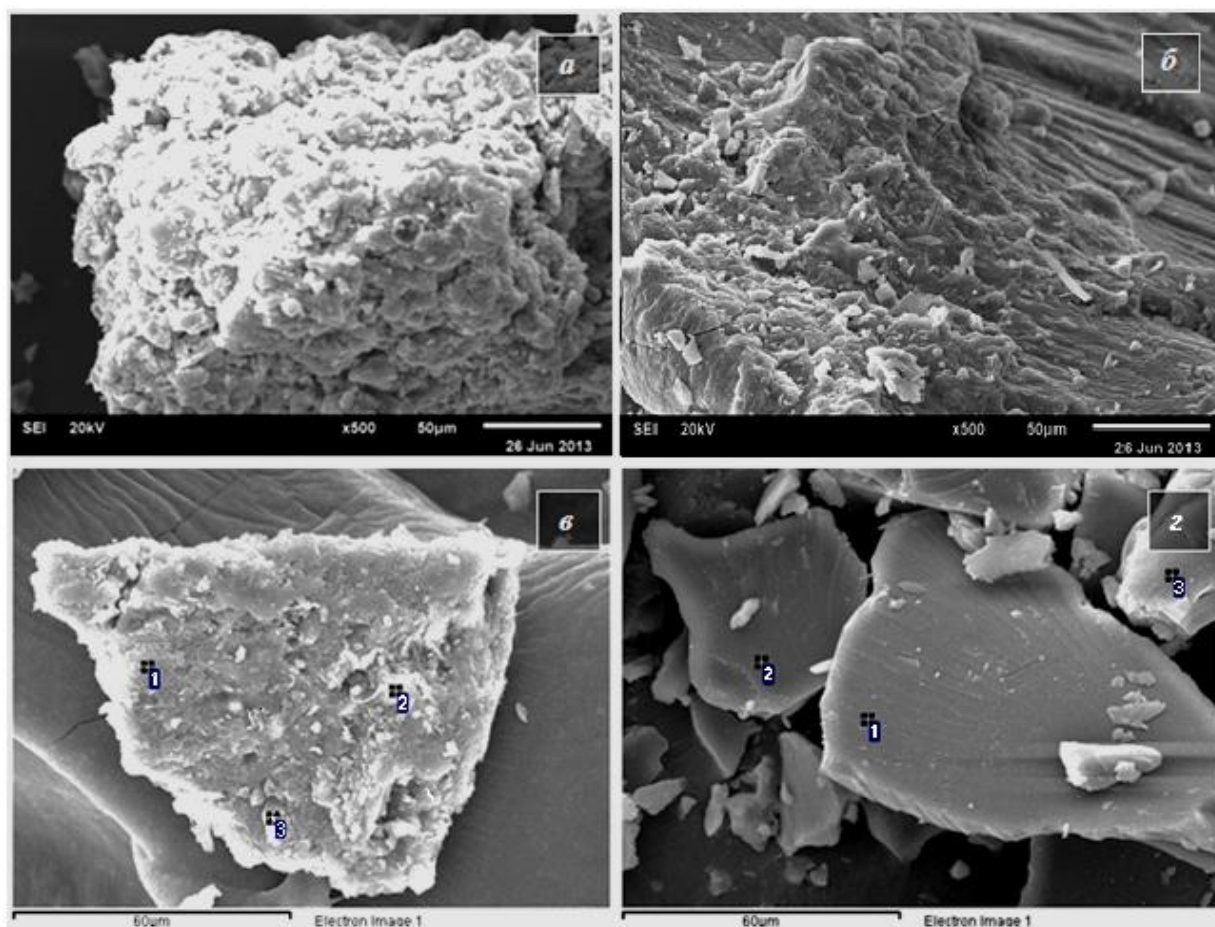


Рисунок 10 – Микрофотографии поверхности гуминовых веществ (а, $\times 500$; в, $\times 1000$) и гуминовых веществ активированных (б, $\times 500$; г, $\times 1000$)

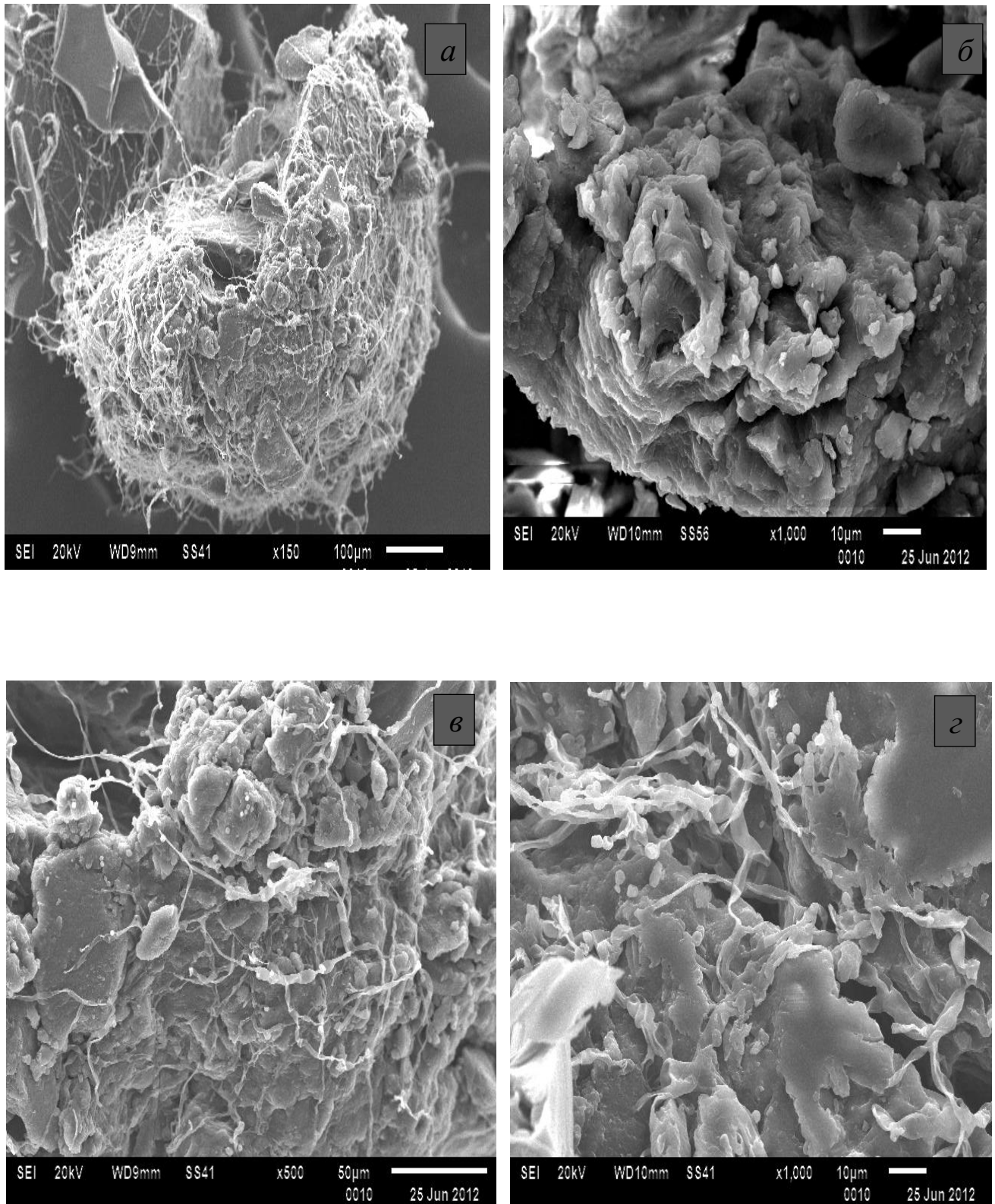


Рисунок 11 – Микрофотографии поверхности гуминовых веществ (а, $\times 150$; б, $\times 500$; в, г, $\times 1000$)

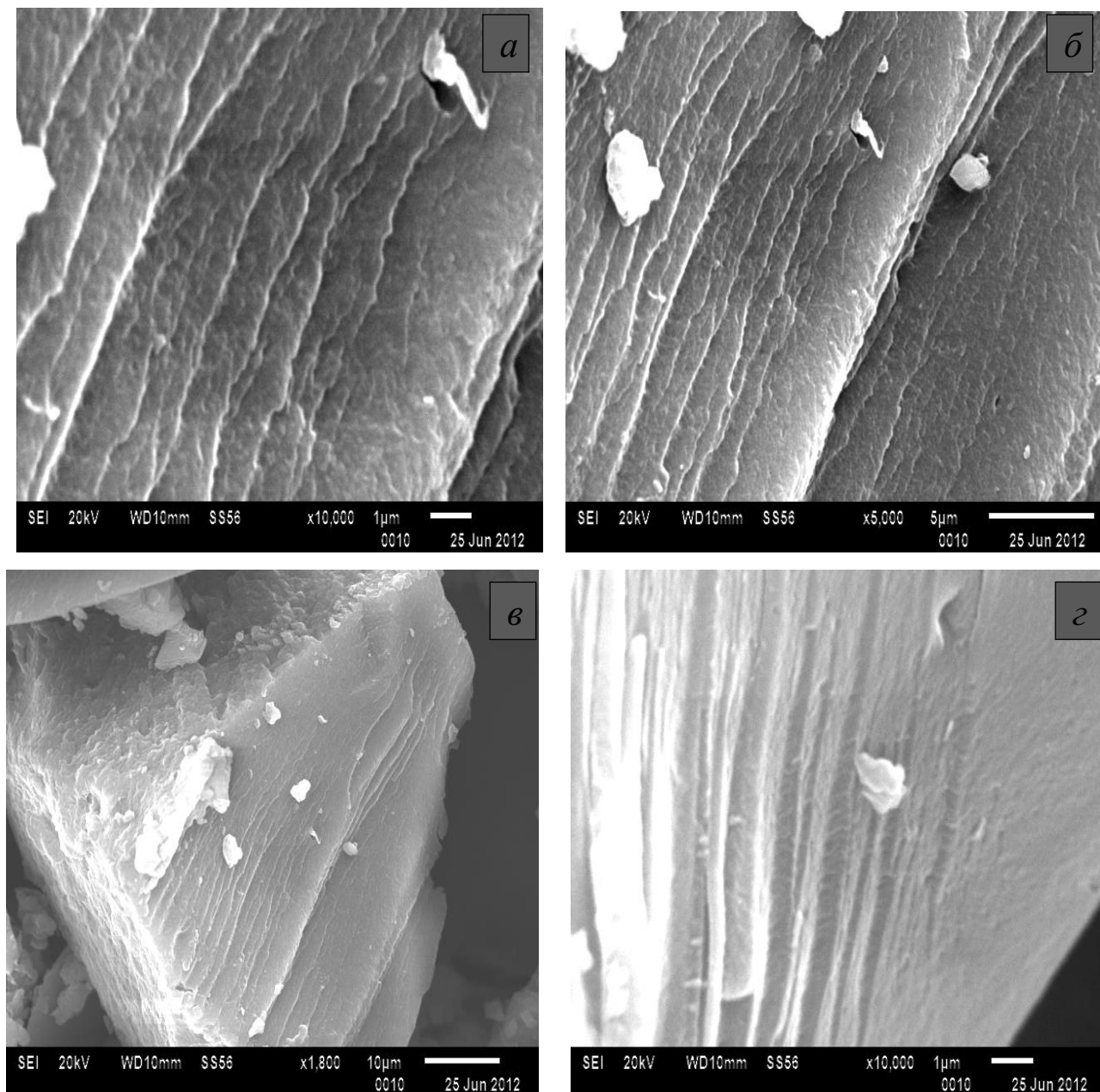


Рисунок 12 – Микрофотографии поверхности гуминовых веществ активированных (а, $\times 10000$; б, $\times 5000$; в, $\times 1800$; г, $\times 10000$)

Гуминовые вещества (рисунок 10 (а, в) и рисунок 11) имеют глобулярную структуру, причем крупные ассоциаты образованы более мелкими нерегулярными частицами.

Гуминовые вещества активированные (рисунок 10 (б, г) и рисунок 12) имеют слоистую структуру, образованную параллельно расположенными слоями. Возможно, воздействие УФ-света на щелочной раствор гуминовых веществ в

процессе выделения приводит к получению макромолекул с линейной структурой, которые в дальнейшем формируют упорядоченные многослойные агрегаты с практически гладкой поверхностью.

Таким образом, полученные результаты показали изменение конформации макромолекул ГВА и их поверхности за счет фотохимической деструкции. Полученные данные подтверждают результаты исследований, свидетельствующих о разрушении цепи двойных углерод-углеродных связей в молекулах ГВ при фотохимическом воздействии [171].

В целом, этот метод позволяет оценить различия в морфологии поверхности молекул ГВ и ГВА. Однако диагностических признаков, по которым возможно было бы провести стандартизацию гуминовых соединений данным методом, установлено не было.

4.5. Спектральные характеристики гуминовых веществ

Возможности метода спектроскопии в УФ и видимой областях для идентификации хромофорных функциональных групп в сложных органических соединениях, к которым относятся гуминовые вещества, ограничены, т.к. их спектры являются результатом перекрывания максимумов различных хромофоров и не позволяют получать информацию о составе исследуемых соединений.

Ультрафиолетовая спектроскопия гуминовых веществ.

На рисунке 13 представлены электронные спектры 0,001 % растворов ГВ и ГВА в УФ и видимой областях (растворитель 0,1 М раствор натрия гидроксида). Спектры имеют характерный для гуминовых веществ вид. Спектр ГВА отличается от спектра ГВ максимумом при 265 нм - область вторичных В-полос, обусловленная переходами $A_{1g} \rightarrow B_{2u}$, а также более сильным поглощением в диапазоне от 220 до 300 нм, что может свидетельствовать о присутствии большего количества полисопряженных фрагментов и/или об уменьшении доли периферической части в структуре ГВА. Полосы поглощения в данном диапазоне, вероятнее всего, соответствуют $\pi \rightarrow \pi^*$ переходам полиенов, полиароматических

фрагментов, их кислородсодержащих производных и вследствие ионизации фенольных гидроксиллов [117].

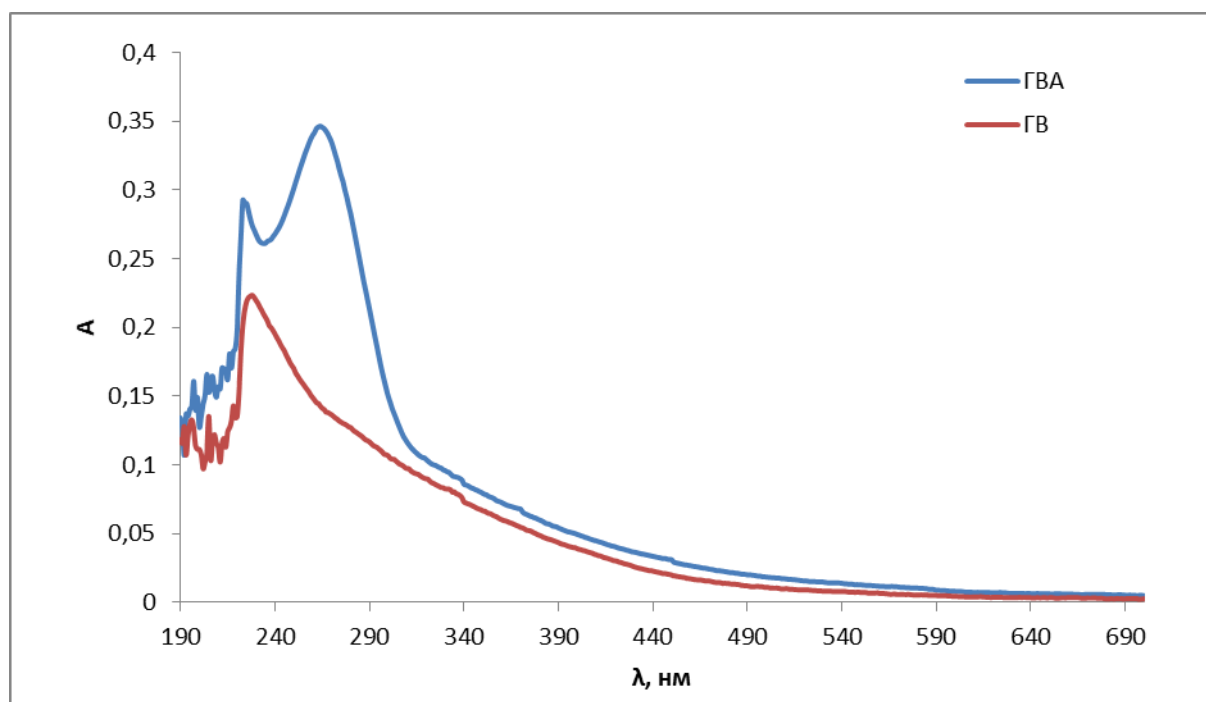


Рисунок 13 – Электронные спектры поглощения растворов 0,001% ГВ и ГВА в УФ и видимой областях

Представленные в таблице 14 значения хроматического коэффициента $E_{465}^{0,001\%}$ и E_4/E_6 находятся в пределах, характерных для гуминовых кислот [117]. Ввиду того, что основной вклад в окраску данных соединений вносят сопряженные системы каркасной («негидролизуемой») части с кислородсодержащими группами, а периферическая («гидролизуемая») часть практически не окрашена, данные характеристики позволяют оценить вклад негидролизуемой части в структуру молекулы ГВ и содержание в ней кислорода. Наблюдаемое снижение коэффициента цветности для ГВА может свидетельствовать об увеличении содержания полисопряженных фрагментов и увеличении степени их окисленности по сравнению с ГВ, что согласуется с полученными ранее данными элементного анализа. Сравнение коэффициентов экстинкции также подтверждает данное заключение. Величина хроматического коэффициента свидетельствует о преобладании ароматических фрагментов.

Таблица 14 – Спектроскопические коэффициенты для ГВ и ГВА

Образец	E_{465}/E_{650}	$E_{465}^{0,001\%}$	$E_{650}^{0,001\%}$
ГВ	4,92	0,01625	0,0033
ГВА	4,18	0,02519	0,00603

Таким образом, вид спектральных линий и спектроскопические коэффициенты позволяют оценивать изменения в структуре гуминовых веществ, происходящие при облучении их УФ светом. Кроме того, электронные спектры поглощения и оптические коэффициенты могут быть использованы при разработке методов стандартизации ГВ.

Инфракрасная спектроскопия гуминовых веществ.

Спектроскопия в инфракрасной области (ИК-спектроскопия) является информативным методом исследования строения индивидуальных органических соединений. Анализ ИК-спектров гуминовых соединений и отнесение тех или иных полос поглощения к валентным или деформационным колебаниям связано с определенными трудностями, так как ИК-спектр поглощения ГВ, как сложных молекул, состоит из большого числа полос (часто перекрывающихся) различной интенсивности. Однако колебательные полосы поглощения определенных химических связей и групп атомов имеют близкие частоты независимо от того, в состав каких молекул они входят [148]. Как следствие, спектральная информация, извлекаемая из ИК-спектров гуминовых веществ, ограничивается идентификацией основных функциональных групп.

Полученные ИК-спектры гуминовых веществ и гуминовых веществ активированных согласуются с рисунками спектров, приведенными в литературе [42, 116, 138]. По ним со значительной степенью вероятности можно отнести исследуемые объекты к классу гуминовых соединений и использовать в дальнейшем для стандартизации выделенных веществ. Однако наряду с общностью гуминовых веществ, как особого класса соединений, ИК-спектры

позволяют выявить и некоторые их структурные особенности, обусловленные способом получения ГВ.

ИК-спектр гуминовых веществ представлен на рисунке 14.

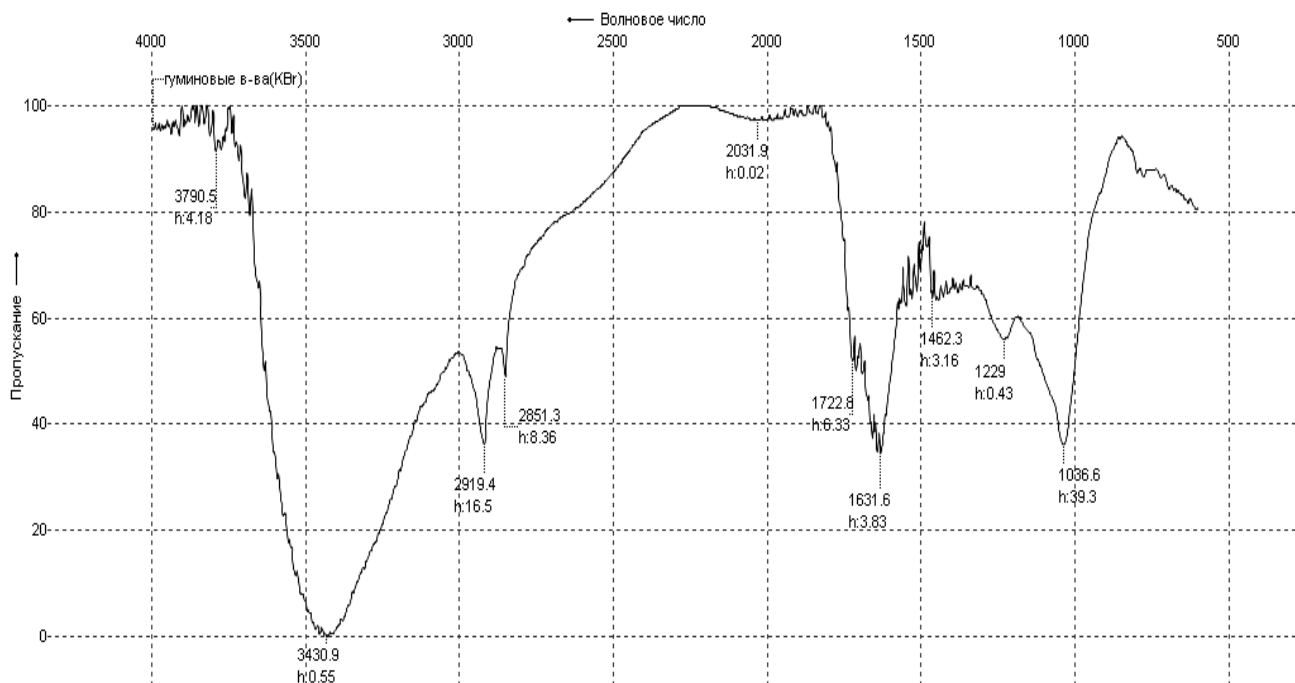


Рисунок 14 – ИК-спектр гуминовых веществ

Широкая полоса поглощения при 3430 см^{-1} говорит о наличии -OH групп, связанных межмолекулярными водородными связями. Полоса поглощения при 2920 см^{-1} обусловлена валентными колебаниями -CH_2 и -CH_3 в алифатической цепи, а поглощение при 1462 см^{-1} свидетельствует о деформационных колебаниях C-H в предельном алифатическом радикале. Полоса поглощения средней интенсивности при 1722 см^{-1} характеризует наличие -C=O в карбоксильной и в карбонильной группах.

Поглощение при 1630 см^{-1} характерно для валентных колебаний связи -C=C- , сопряженной с C=O или COOH группами, а наличие полосы при 1600 см^{-1} соответствует связи -C=C- ароматического кольца, которая образует центральную (каркасную) часть структуры гуминовых кислот. Плоскостные деформационные колебания C-H ($1070\text{-}960\text{ см}^{-1}$) в том числе указывают на различные типы замещения бензольного кольца.

Полоса в области 1229 см^{-1} относится к валентным колебаниям C-O фенольных и карбоксильных групп, а сильное поглощение при 1036 см^{-1}

соответствует валентным колебаниям связи С-О первичных и вторичных спиртовых групп. Наличие данных полос указывает на присутствие кислородсодержащих функциональных групп в структуре гуминовых веществ.

Для изучения влияния УФ-излучения на состав и количество функциональных групп в молекулах гуминовых соединений нами также использованы данные ИК-спектроскопии.

ИК-спектры гуминовых веществ активированных представлены на рисунке 15.

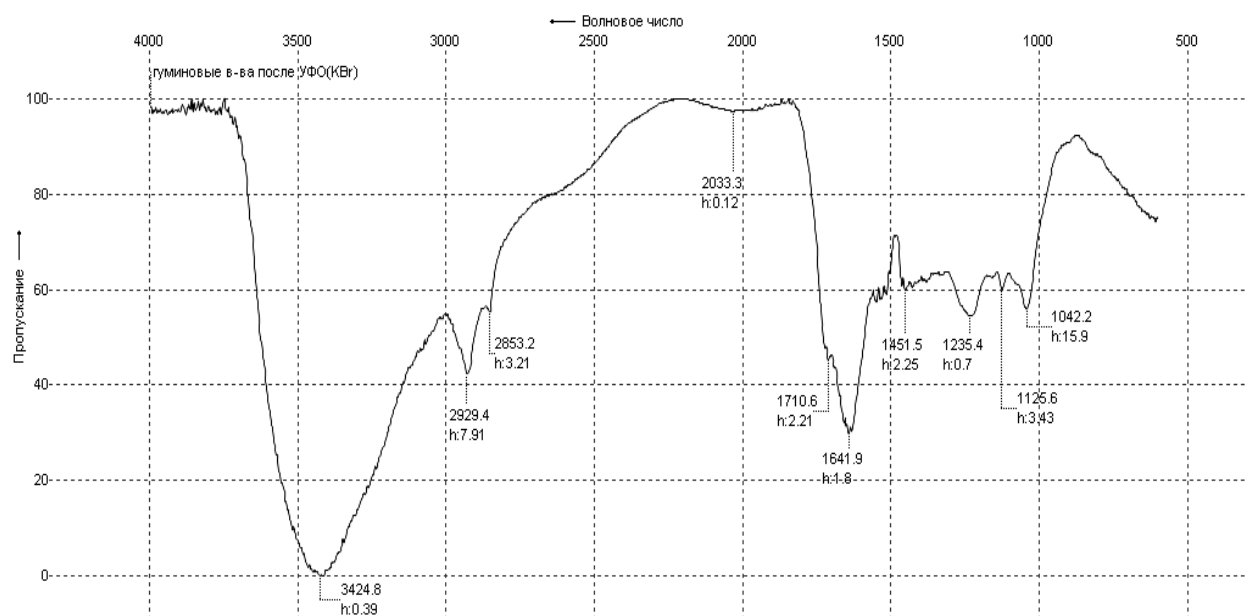


Рисунок 15 – ИК-спектр гуминовых веществ активированных

Сравнение ИК-спектров исследуемых образцов свидетельствует о близости состава ГВ и ГВА по функциональным группам. Однако, в образцах, подвергнутых фотохимической деструкции, происходит снижение интенсивности полос поглощения при 2919 и 2851 см⁻¹, соответствующих валентным колебаниям алифатической С-Н-связи.

На рисунке 16 представлены фрагменты ИК- спектров гуминовых веществ и гуминовых веществ активированных. Наибольшие изменения в ИК-спектре ГВА наблюдаются в области 1100–900 см⁻¹, где происходит уменьшение поглощения, соответствующего валентным колебаниям С-О-связей первичных и вторичных спиртовых групп и С-О-С-связей, в том числе в полисахаридных фрагментах.

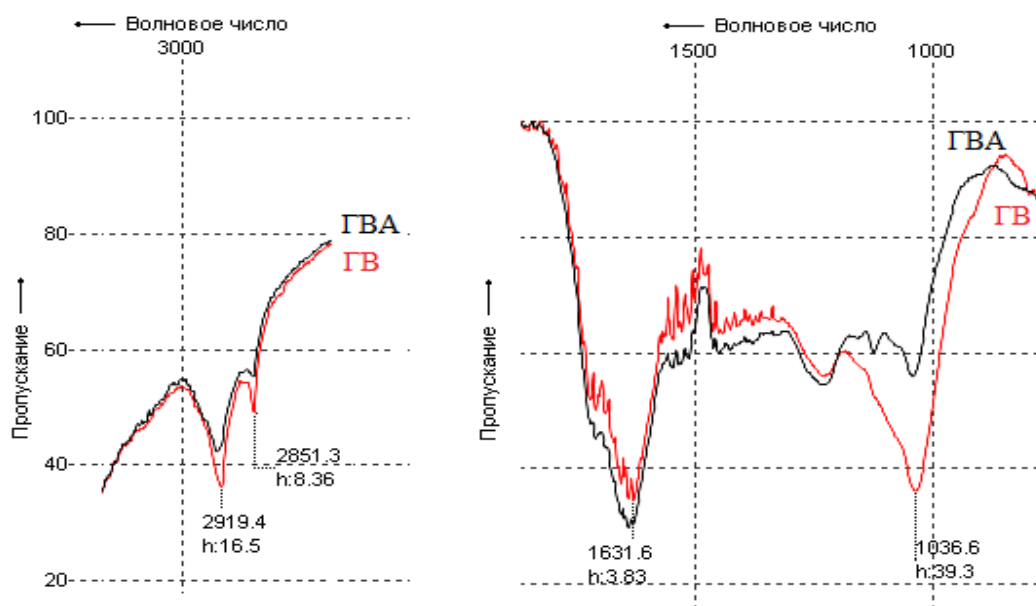


Рисунок 16 – Фрагменты ИК-спектров ГВА и ГВ

Для ГВА незначительно уменьшается поглощение в области $1750\text{--}1550\text{ см}^{-1}$, соответствующей валентным колебаниям карбонильной группы в составе хинонов и непредельных сопряженных кетонов, и увеличивается поглощение при $1645\text{--}1600\text{ см}^{-1}$, характерное для валентных колебаний связи --C=C-- , сопряженной с C=O или COOH группами.

В целом, ИК-спектроскопия исследуемых образцов показала, что ГВ и ГВА имеют близкое химическое строение, но в активированных гуминовых веществах снижено количество алифатических фрагментов и увеличилось содержание карбонильных (хиноидных) и карбоксильных групп. Снижение количества алифатических фрагментов возможно за счет разрушения низкомолекулярных фракций гуминовых соединений и периферийной части макромолекул под воздействием облучения УФ-светом. По всей видимости, увеличение содержания карбонильных и карбоксильных групп в молекулах ГВА связано с окислением и фотодеструкцией макромолекул гуминовых соединений в процессе их выделения под действием УФ-света.

Флуоресцентная спектроскопия гуминовых веществ.

На рисунке 17 представлены спектры флуоресценции исследуемых образцов, из которых видно, что интенсивность флуоресценции ГВА увеличилась практически в 2 раза по сравнению с ГВ, что, вероятно, показывает возможность

преобразования макромолекулы гуминовых веществ в более мелкие под действием УФ-света в процессе выделения. Полученные результаты не противоречат данным, приведенным в работах [171, 246].

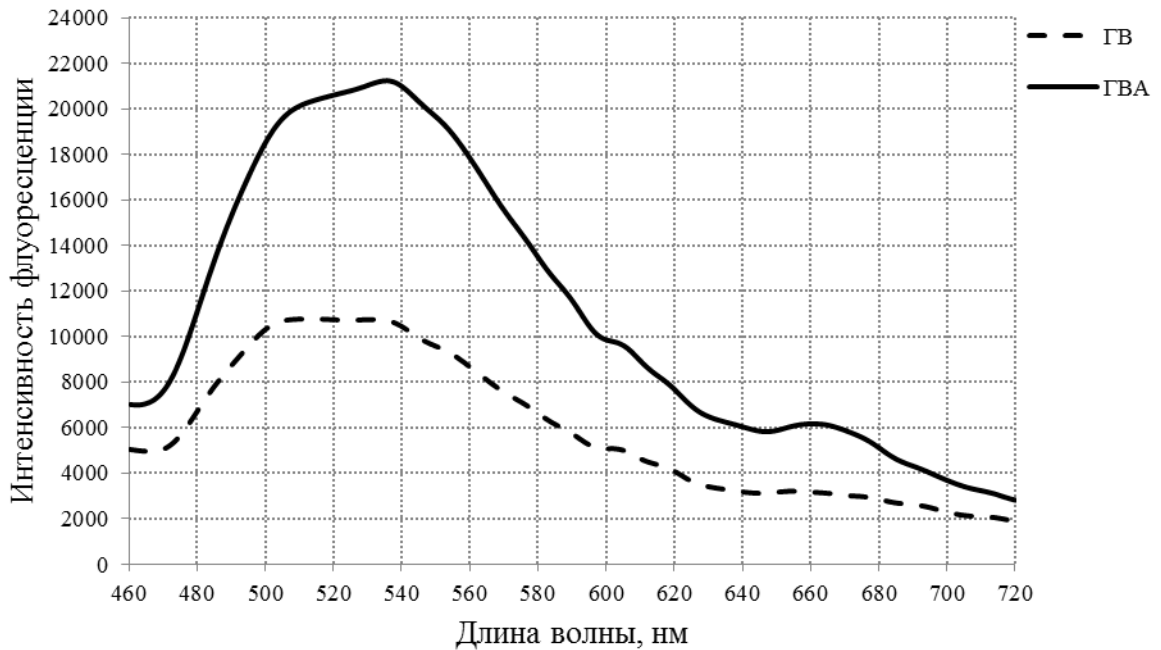


Рисунок 17 – Спектры флуоресценции гуминовых веществ и гуминовых веществ активированных

В спектрах флуоресценции наблюдаются максимумы поглощения при 530 нм, 605 нм и 660 нм. Широкая эмиссионная полоса в интервале 500-540 нм (плато) является результатом наложения спектров нескольких флуорофоров в составе образцов, в частности полиароматических колец [130].

Данные флуоресцентного анализа образцов показали, что концентрация фотосенсибилизирующих хромофоров выше в ГВА по сравнению с ГВ, что также может свидетельствовать о меньшей молекулярной массе их молекул. Полученные результаты согласуются с данными, приведенными в работе [146].

Однако применение данного метода достаточно ограничено, так как биологические объекты, как правило, сильно рассеивают свет, что приводит к усилению экранирующего эффекта. В связи с этим при проведении флуоресцентного анализа необходимо стремиться уменьшить светорассеяние, используя специальные приемы пробоподготовки. Все это затрудняет использование данного метода в целях стандартизации гуминовых соединений.

ЯМР спектроскопия гуминовых веществ.

Методом твердофазной спектроскопии с кросс-поляризацией и вращением под «магическим углом» (CPMAS ^{13}C ЯМР) были получены спектры высокого разрешения. Определение количественного содержания углерода в структурных фрагментах проводили, используя рекомендации, предложенные в работах [148, 222].

Полученные спектры были проинтегрированы по девяти примерным интервалам (м.д.): 48–5 (алифатические фрагменты); 58–48 (метоксильные ($-\text{OCH}_3$) группы); 64–58 (О- и N-метилензамещенные ($\text{CH}_2-\text{O,N}$) фрагменты); 90–64 (О- и N-метинзамещенные ($\text{CH}-\text{O,N}$) фрагменты, преимущественно в полисахаридах); 108–90 (полуацетальный углерод в углеводных фрагментах); 145–108 (углерод незамещенных и алкилзамещенных ароматических фрагментов); 165–145 (углерод фенолов, ароматических эфиров или аминов); 187–165 (углерод карбоксильных групп и их производных); 220–187 (карбонильный углерод в альдегидах и кетонах) [78]. CPMAS ^{13}C ЯМР спектры ГВ и ГВА представлены на рисунке 18.

В целом спектры ГВ и ГВА имеют схожий вид. Основные различия проявляются в алифатическом регионе (48-5 м.д.): в процессе активации увеличилось относительное содержание метильных ($\text{CH}_3-\text{C}(\text{O})-\text{O}-$, $\text{CH}_3-\text{CH}=\text{CH}-$) и метиленовых групп в α - и β -положении к амино- или карбоксигруппе (42.1 м.д.) [257]. Также снизилась интенсивность сигналов углерода углеводных фрагментов в области 60, 70 и 100 м.д. Данные по количественному содержанию углерода в структурных фрагментах представлены в таблице 15.

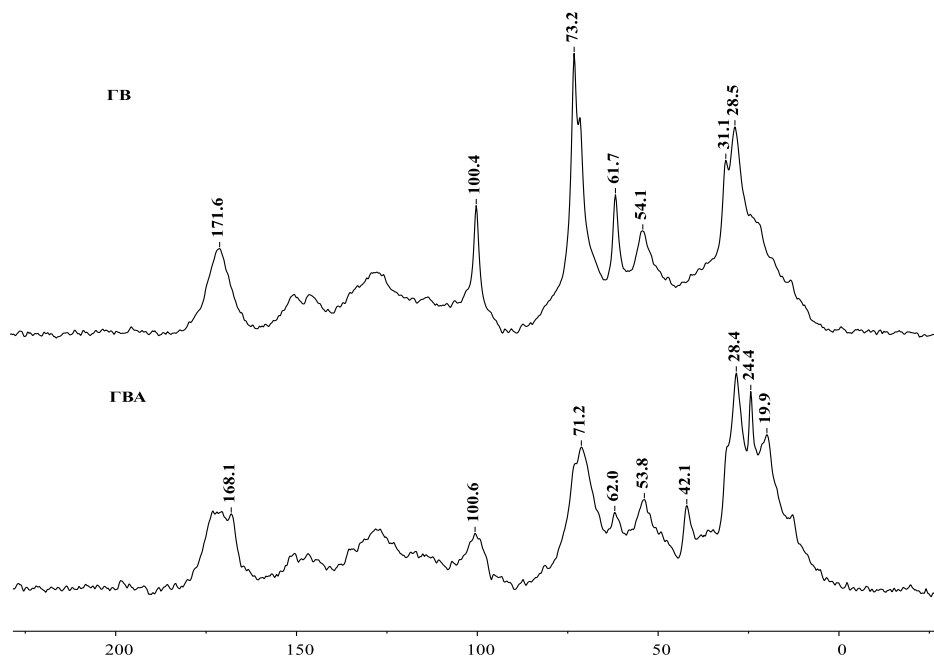


Рисунок 18 – СPMAS ^{13}C ЯМР спектры гуминовых веществ и гуминовых веществ активированных

Таблица 15 – Интегральная интенсивность сигналов СPMAS ^{13}C ЯМР спектров гуминовых веществ и гуминовых веществ активированных

Объект	Интегральная интенсивность для интервалов (м.д.), %									$\frac{C_{Ar}^*}{C_{Al}}$	C_{Carb}^* *, %
	48–5	58–48	64–58	90–64	108–90	145–108	165–145	187–165	220–187		
	CH_n	CH_3O	CH_2O	OCH	OCO	C_{Ar}	C_{ArO}	COO	C=O		
ГВ	35,5	8,0	5,3	18,7	6,2	14,7	4,3	7,2	0,1	0,26	30,1
ГВА	40,2	7,3	4,1	15,3	5,2	14,4	4,6	8,6	0,4	0,26	24,6

*Степень ароматичности $C_{Ar}/C_{Alk}=(C_{Ar}+C_{ArO})/(C_{Hn}+C_{Carb})$ [78]

**Содержание углеводных фрагментов $C_{Carb}=\text{CH}_2\text{O}+\text{OCH}+\text{OCO}$ [78]

Анализ фрагментного состава показывает, что ГВ и ГВА отличаются низким содержанием ароматического углерода и высоким содержанием углерода алифатических цепей и полисахаридов и, как следствие, низкой степенью ароматичности (0,26 %), которая характеризует соотношение ароматических и алифатических фрагментов. Необходимо отметить, что под действием УФ света, в ГВА происходит снижение доли углерода в составе полисахаридов (на 19 %) по

сравнению с ГВ. Полученные результаты согласуются с данными ИК-спектроскопии [155]. Также в результате активации происходит увеличение количества кислородсодержащих фенольных (на 7 %), карбоксильных (на 17 %) и карбонильных групп (в 4 раза), что согласуется с данными элементного анализа.

Ввиду известной проблемы, связанной с регистрацией количественных спектров [253], нами была выполнена проверка полученных результатов в сравнении с данными элементного анализа. Проверку выполняли по методике, предложенной в работе [78]. Вычисленные по результатам ЯМР спектроскопии атомные отношения Н/С составили для ГВ и ГВА 1,37, что в среднем на 8 % выше результатов элементного анализа (таблица 11).

Таким образом, выполненные расчеты показали, что выбранные условия регистрации CP/MAS ^{13}C ЯМР спектров позволяют получать качественную и количественную информацию о структуре ГВ. Однако необходимость значительного количества времени для построения ЯМР спектров и некоторые экономические факторы ограничивают возможность применения метода для стандартизации гуминовых веществ.

4.6. Количественное определение функциональных групп, обладающих кислотными свойствами

В настоящее время доказано, что гуминовые кислоты являются гетерогенными и полидисперсными соединениями, для которых не установлено точное значение молекулярной массы [81, 121], в связи с чем невозможно провести количественное определение гуминовых соединений как индивидуальных веществ. Согласно данным литературы [47, 63, 82], биологическая активность гуминовых веществ во многом определяется количеством функциональных групп кислотного характера. Для количественного определения кислородсодержащих функциональных групп мы использовали метод Бозма с кондуктометрической индикацией конечной точки титрования.

На рисунке 19 представлены зависимости удельной электропроводности растворов (κ) от объема титранта (V_T) при титровании функциональных групп 0,05 % растворов гуминовых кислот методом Бозма при кондуктометрической фиксации конечной точки титрования.

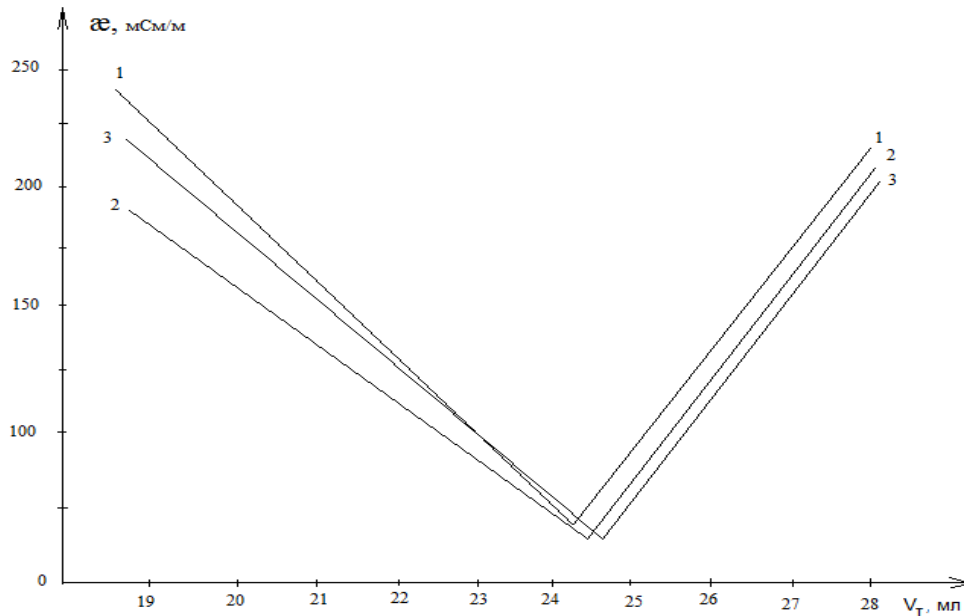


Рисунок 19 – Кривые кондуктометрического титрования функциональных групп по методу Бозма:

- 1 - титрование суммы всех групп кислого характера (в растворе NaOH);
- 2 - титрование суммы карбоксильных и лактонных групп (в растворе Na_2CO_3);
- 3 - титрование карбоксильных групп (в растворе $NaHCO_3$).

Представленные графики свидетельствуют, что кривые титрования имеют изломы, соответствующие конечным точкам титрования карбоксильных групп (кривая 3), суммы карбоксильных и лактонных групп (кривая 2) и суммы всех функциональных групп кислого характера (кривая 1).

Исследование содержания функциональных групп кислого характера в зависимости от концентрации ГВ (таблица 16) показало, что при изменении концентрации раствора гуминовых веществ от 0,01 до 0,1% количество карбоксильных и гидроксильных групп снизилось почти в 2 раза, а лактонных - в 1,2 раза. При дальнейшем увеличении концентрации растворов гуминовых веществ от 0,1 до 0,5% количество карбоксильных групп снижается в 3 раза, лактонных и гидроксильных - в 1,3-1,4 раза. Увеличение концентрации ГВ от

0,001 до 0,01% и от 0,5 до 1,0% приводит к тому, что количество кислых функциональных групп практически не изменяется. Из приведенных данных видно, что в диапазоне концентраций от 0,01% до 0,05% зависимость содержания функциональных групп от концентрации растворов гуминовых веществ носит линейный характер. Графическая зависимость отражена на графиках (рисунки 20 - 22).

Таблица 16 – Зависимость содержания функциональных групп от концентрации ГВ ($X \pm m$, X – среднее значение, m – доверительный интервал, $n=30$)

Концентрация ГВ, %	Карбоксильные группы, ммоль/г	Сумма карбоксильных и лактонных групп, ммоль/г	Лактонные группы, ммоль/г	Сумма карбоксильных, лактонных и гидроксильных групп, ммоль/г	Гидроксильные группы, ммоль/г
0,001	2,910 ± 0,065	4,280 ± 0,095	1,370 ± 0,030	7,970 ± 0,177	3,690 ± 0,082
0,01	2,900 ± 0,064	4,260 ± 0,094	1,360 ± 0,030	7,940 ± 0,176	3,680 ± 0,081
0,02	2,690 ± 0,060	4,020 ± 0,089	1,330 ± 0,030	7,440 ± 0,165	3,420 ± 0,076
0,05	2,140 ± 0,048	3,360 ± 0,075	1,220 ± 0,027	5,750 ± 0,128	2,390 ± 0,053
0,10	1,500 ± 0,033	2,630 ± 0,060	1,130 ± 0,026	4,530 ± 0,099	1,900 ± 0,043
0,25	0,560 ± 0,012	1,470 ± 0,033	0,910 ± 0,020	3,150 ± 0,070	1,680 ± 0,037
0,50	0,500 ± 0,012	1,340 ± 0,031	0,840 ± 0,019	2,910 ± 0,064	1,570 ± 0,035
1,00	0,490 ± 0,012	1,310 ± 0,031	0,820 ± 0,018	2,870 ± 0,064	1,560 ± 0,035

Полученные результаты согласуются с результатами, приведенными в работах [61, 79, 265], и показывают, что при увеличении концентрации гуминовых веществ в растворе происходит изменение пространственного расположения атомов и группировок, т.е. изменяется конформация молекул, происходит их укрупнение и деформация структуры. Кроме того, при увеличении концентрации ГВ сокращается расстояние между молекулами, и функциональные группы могут вступать в межмолекулярные взаимодействия, образовывать внутримолекулярные и межмолекулярные водородные связи, а при низких концентрациях гуминовых веществ количество свободных и доступных функциональных групп возрастает. В результате часть активных групп будет

заклучена внутри центральной части «ядра», экранирована фрагментами других молекул и практически недоступна для химического взаимодействия.

Согласно полученным результатам (таблица 17) содержание функциональных групп кислотного характера (карбоксильных, лактонных и гидроксильных) в активированных гуминовых веществах увеличилось в 1,1-1,5 раза.

Таблица 17 – Зависимость содержания функциональных групп от концентрации ГВА ($X \pm m$, X – среднее значение, m – доверительный интервал, $n=30$)

Концентрация ГВА, %	Карбоксильные группы, ммоль/г	Сумма карбоксильных и лактонных групп, ммоль/г	Лактонные группы, ммоль/г	Сумма карбоксильных, лактонных и гидроксильных групп, ммоль/г	Гидроксильные группы, ммоль/г
0,001	3,200 ± 0,081	5,260 ± 0,117	2,060 ± 0,055	9,710 ± 0,215	4,450 ± 0,099
0,01	3,190 ± 0,079	5,230 ± 0,115	2,040 ± 0,053	9,650 ± 0,214	4,420 ± 0,097
0,02	2,820 ± 0,070	4,730 ± 0,104	1,910 ± 0,050	8,540 ± 0,189	3,810 ± 0,085
0,05	2,390 ± 0,053	3,980 ± 0,088	1,590 ± 0,035	8,840 ± 0,152	2,860 ± 0,063
0,10	1,810 ± 0,040	3,170 ± 0,070	1,360 ± 0,030	5,300 ± 0,118	2,130 ± 0,047
0,25	0,560 ± 0,012	1,650 ± 0,036	1,090 ± 0,024	3,670 ± 0,081	2,020 ± 0,045
0,50	0,550 ± 0,012	1,470 ± 0,032	0,920 ± 0,021	3,200 ± 0,071	1,730 ± 0,038
1,00	0,530 ± 0,012	1,430 ± 0,032	0,900 ± 0,020	3,150 ± 0,069	1,720 ± 0,038

Следовательно, в ходе получения ГВА при облучении УФ-светом, возможно, происходит деструкция экранирующих периферических комплексов полисахаридов и аминокислот, изменение пространственного расположения молекул, высвобождение функциональных групп, в связи с чем увеличивается их доступность для химического взаимодействия.

Проведенные исследования показали возможность применения метода Бозма для количественного определения содержания карбоксильных, лактонных и гидроксильных групп в гуминовых веществах.

Для включения предложенного метода в нормативную документацию, характеризующую качество гуминовых веществ, оптимальная концентрация

растворов, необходимая для проведения испытаний, рекомендуется в линейном диапазоне от 0,01 до 0,05%. Графическая зависимость отражена на графиках (рисунки 20 - 22).

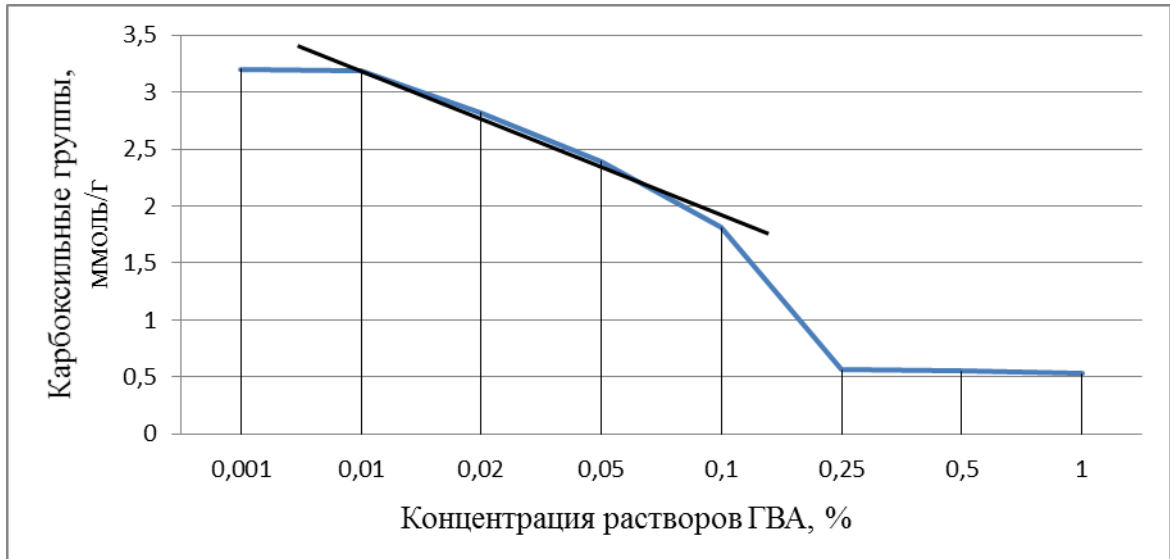


Рисунок 20 – График зависимости концентрации растворов гуминовых веществ активированных и количества карбоксильных функциональных групп

В результате установлено, что в интервале концентраций растворов гуминовых веществ активированных от 0,01 до 0,05 % при определении карбоксильных групп график имеет линейный характер и описывается уравнением $Y = 3,2985 - 18,6923 \cdot X$, коэффициент корреляции равен 0,972.

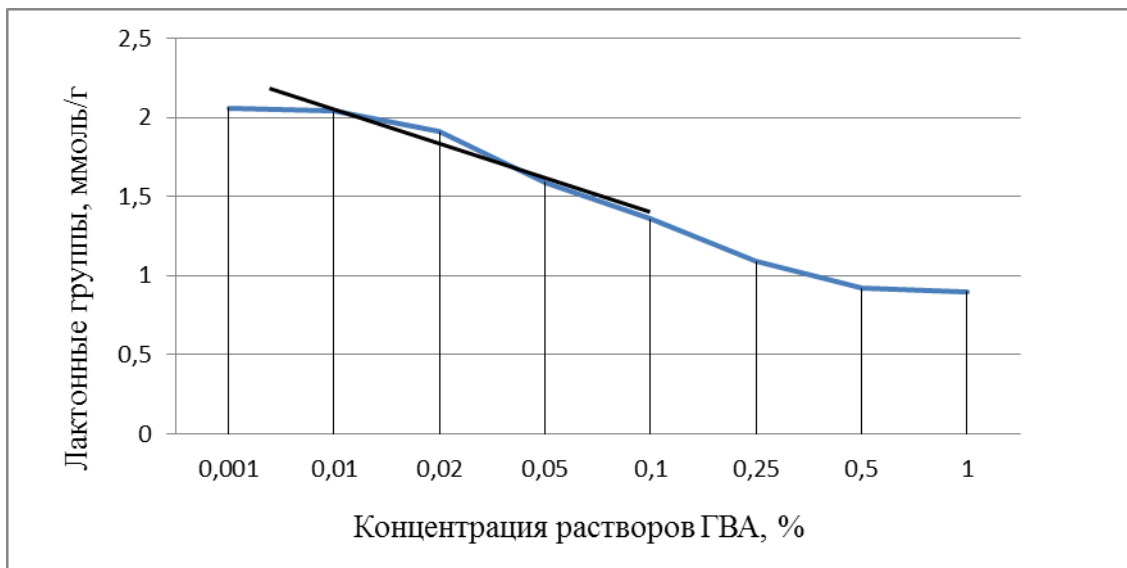


Рисунок 21 – График зависимости концентрации растворов гуминовых веществ активированных и количества лактонных функциональных групп

В результате установлено, что в интервале концентраций растворов гуминовых веществ активированных от 0,01 до 0,05 % при определении лактонных групп график имеет линейный характер и описывается уравнением $Y = 2,1431 - 11,1154 \cdot X$, коэффициент корреляции равен 0,999.

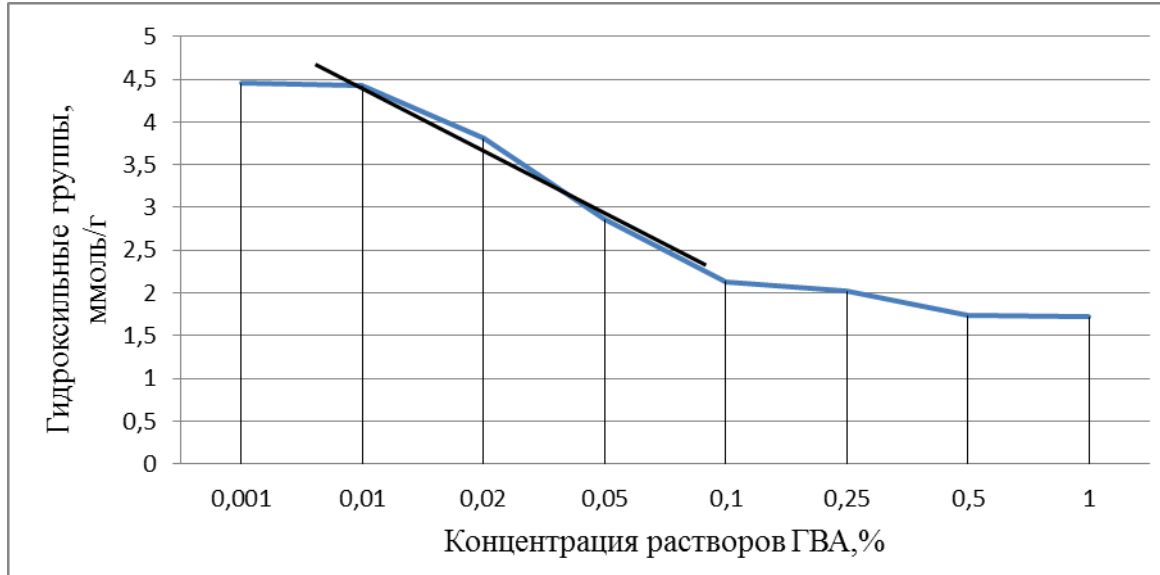


Рисунок 22 – График зависимости концентрации растворов гуминовых веществ активированных и количества гидроксильных функциональных групп

В результате установлено, что в интервале концентраций растворов гуминовых веществ активированных от 0,01 до 0,05 % при определении гидроксильных групп график имеет линейный характер и описывается уравнением $Y = 4,6915 - 37,3077 \cdot X$, коэффициент корреляции равен 0,988.

Следует отметить, что для количественного определения функциональных групп в молекулах гуминовых веществ предлагаемый метод является наиболее приемлемым, так как характеризуется высокой экспрессностью, простотой, доступностью измерительных приборов и достаточной точностью. Кроме того, кондуктометрическая индикация конечной точки титрования позволяет увеличить точность получаемых результатов и устранить недостатки потенциометрии [61]. Однако актуальной остается проблема измерения единиц концентрации. Для включения данного метода в нормативный документ, регламентирующий качество гуминовых веществ, необходимо использовать единицы измерения концентрации гуминовых соединений, принятые в фармацевтическом анализе.

Нами разработана методика, которая может служить одним из способов количественного определения гуминовых веществ и, соответственно, в дальнейшем использоваться при стандартизации гуминовых соединений.

При разработке методики в качестве стандартного образца использовали высокоочищенные гуминовые вещества активированные, отвечающие требованиям технических условий (Приложение 3).

При определении карбоксильных функциональных групп методом Боэма (таблица 17) были последовательно зарегистрированы сигналы удельной электропроводности растворов гуминовых веществ активированных – стандартного образца в порядке возрастания их концентрации в конечной точке титрования.

Для исключения случайных результатов и усреднения данных выполняли три последовательных измерения для каждого из градуировочных растворов.

Таблица 18 – Показатели удельной электропроводности гуминовых веществ активированных - стандартного образца в конечной точке титрования при определении карбоксильных групп

№ п/п	Удельная электропроводность, мСм/м	Концентрация раствора ГВА - стандартного образца, %
1	58,0	0,01
2	58,6	0,02
3	59,2	0,03
4	59,8	0,04
5	60,4	0,05

В результате был построен градуировочный график зависимости удельной электропроводности раствора гуминовых веществ активированных - стандартного образца в конечной точке титрования от взятой навески гуминовых соединений (рисунок 23).

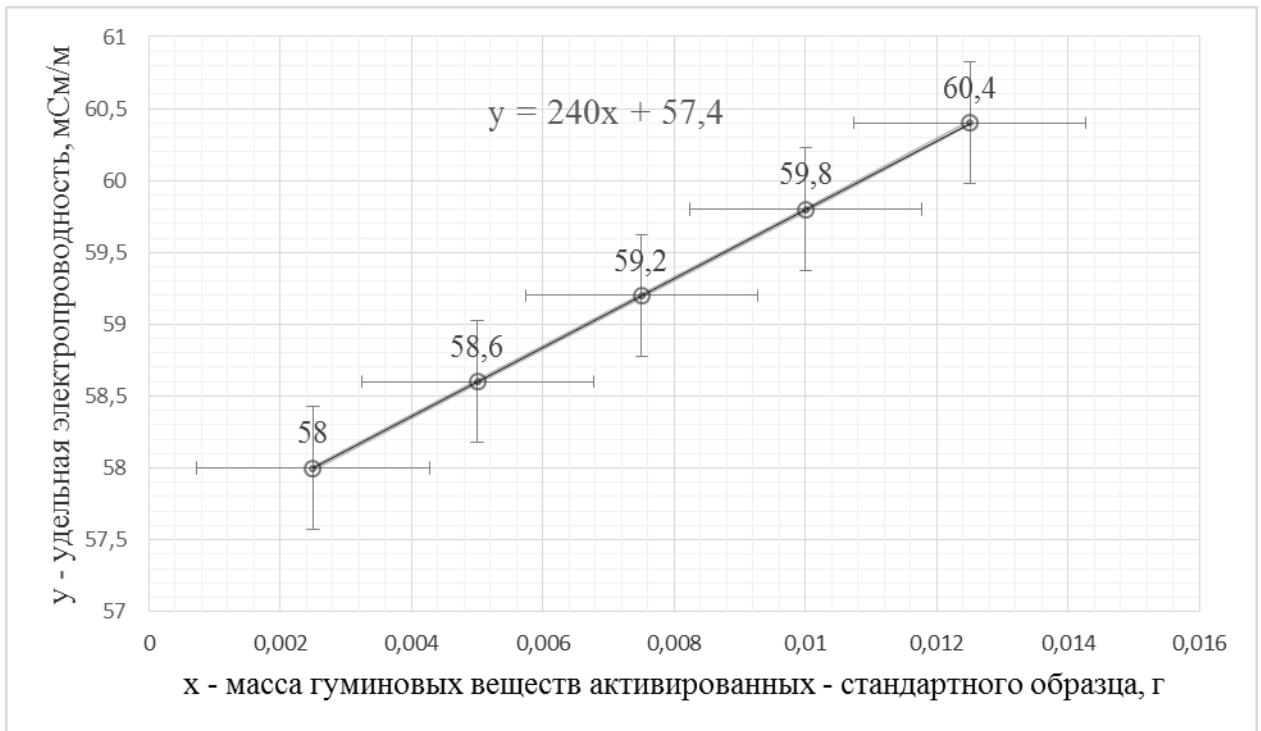


Рисунок 23 – Градуировочный график зависимости показателя удельной электропроводности растворов ГВА – стандартного образца от массы навески

Количественное содержание ГВА в процентах рассчитывали по формуле (Глава 2), используя построенный градуировочный график зависимости выходного сигнала удельной электропроводности (мСм/м) от массовой концентрации гуминовых веществ активированных – стандартного образца.

4.7. Результаты исследования сорбционных свойств и антиоксидантной активности гуминовых веществ

Анализ сорбционных свойств гуминовых веществ. Результаты исследования сорбционной емкости по йоду и метиленовому голубому приведены в таблице 19. Известно [168], что йодное число характеризует количество микропор (диаметр пор менее 2 нм), а по адсорбции метиленового голубого судят о количестве мезопор (диаметр от 2 нм до 50 нм) и макропор (более 50 нм).

Таблица 19 – Результаты определения сорбционных свойств гуминовых веществ и сапропеля

Вещество \ Характеристика	Сорбционная емкость по йоду, мг/г	Сорбционная емкость по метиленовому голубому, мг/г
Активированный уголь	670 ± 23	680 ± 27
ГВА	195 ± 6	270 ± 10
ГВ	162 ± 5	240 ± 8
Сапропель	147 ± 4	140 ± 4

Данные таблицы свидетельствуют, что активированный уголь, взятый в качестве препарата сравнения, обладает наибольшей сорбционной емкостью (680 ± 27 мг/г по метиленовому голубому и 670 ± 23 мг/г по йоду). Такой результат согласуется с литературными данными [207] и объясняется тем, что уголь обладает большой площадью поверхности за счет специальной активации в процессе его производства, которая проводится обработкой водяным паром или диоксидом углерода.

Согласно полученным данным, ГВ и ГВА обладают выраженной адсорбцией по метиленовому голубому (270 ± 10 мг/г и 240 ± 8 мг/г), что характеризует макропористость объектов. Адсорбция метиленового голубого и йода поверхностью гуминовых веществ, возможно, происходит путем физической сорбции за счет ван-дер-ваальсовых и гидрофобных взаимодействий. Кроме того, гуминовые вещества могут проявлять химическое взаимодействие с молекулой метиленового голубого за счет образования водородных связей, реакций лигандного обмена и донорно-акцепторных взаимодействий [207], что объясняет их сорбционную активность.

Сорбционная емкость по метиленовому голубому и по йоду у сапропеля значительно ниже, чем у гуминовых веществ, что свидетельствует о небольшом количестве микро-, макро- и мезопор и невозможности химического взаимодействия между функциональными группами сапропеля и указанными реагентами.

Таким образом, результаты исследования *in vitro* показали наличие мягких сорбционных свойств гуминовых веществ. Однако, гуминовые вещества, подвергнутые УФ-воздействию на стадии выделения, обладают несколько большей сорбционной емкостью, что объясняется увеличением количества пор под воздействием ультрафиолетового облучения.

Результаты исследования антиоксидантной активности сапропеля, ГВ и ГВА приведены на рисунке 24.

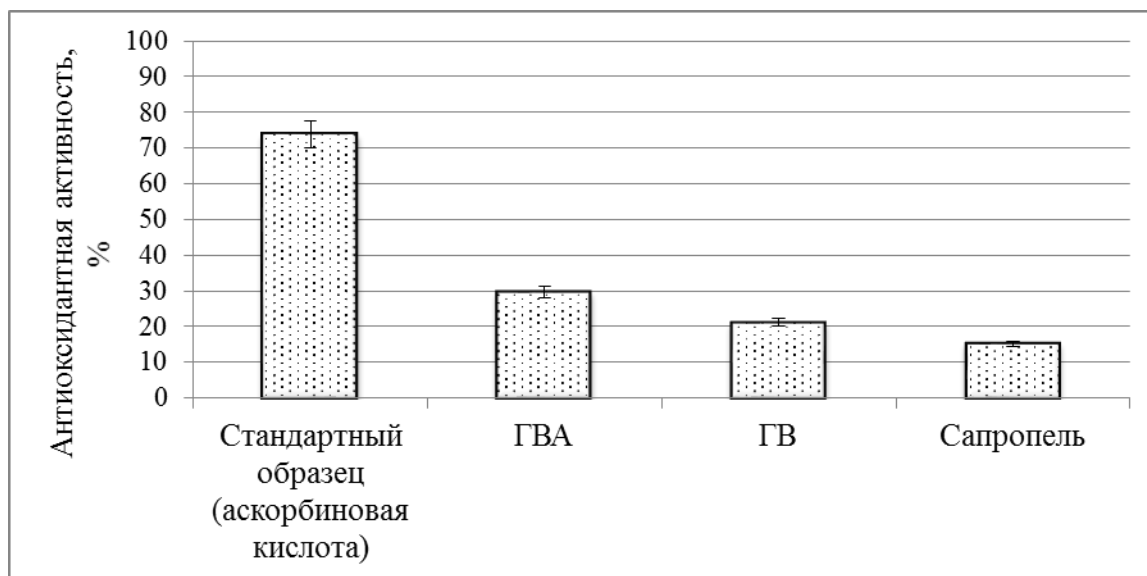


Рисунок 24 – Изменение АОА в зависимости от объекта исследования

В целом, все исследуемые вещества проявляют антиоксидантную активность, поскольку величина АОА превышает 10% [172, 189]. При этом, наименьшей активностью (15,2%) обладает сапропель. Для гуминовых веществ способность ингибировать свободнорадикальное аутоокисление адреналина примерно в 1,5 раза больше, чем у сапропеля, а у ГВА активность увеличивается уже в 2 раза.

Проведенные исследования показали, что наибольшее значение АОА выявлено у гуминовых веществ (ГВА), подвергнутых щелочному фотолизу, что может быть связано с увеличением содержания кислородсодержащих функциональных групп (фенольных, карбонильных и хиноидных) и степени ненасыщенности связей в молекуле [155].

Заключение по главе 4

Таким образом, обобщая результаты главы 4, можно сделать вывод, что ГВ, выделенные из сапропеля по традиционной методике, и ГВ, подвергнутые фотохимической активации на стадии выделения, по ряду физико-химических свойств отличаются друг от друга. В структуре ГВА снизилось количество алифатических остатков, и увеличилось количество кислородсодержащих функциональных групп и полисопряженных фрагментов, произошли изменения конформации макромолекул ГВА и их поверхности. В результате фотодеструкции ГВА произошло повышение их растворимости, и, возможно, уменьшение молекулярной массы их молекул. Изменения, произошедшие в структуре и физико-химических свойствах гуминовых веществ под действием УФ-света, повлияли и на сорбционные и антиоксидантные свойства выделенных соединений. ГВА обладают большей сорбционной емкостью по сравнению с ГВ и проявляют более выраженную антиоксидантную активность.

Для внедрения исследуемых соединений в медицинскую практику необходима стандартизация как сырьевого источника ГВ - сапропеля, так и самих гуминовых веществ.

На следующем этапе встает вопрос о разработке проекта фармакопейной статьи «Сапропель озера Горчаково», как источника гуминовых веществ, и проекта фармакопейной статьи «Гуминовые вещества активированные», как более перспективной субстанции для внедрения в медицинскую практику.

ГЛАВА 5. ПОКАЗАТЕЛИ КАЧЕСТВА САПРОПЕЛЯ И ГУМИНОВЫХ ВЕЩЕСТВ

5.1. Показатели качества сапропеля озера Горчаково, как источника гуминовых веществ

Согласно проведенным нами исследованиям было установлено, что сапропель озера Горчаково является экологически безопасным сырьем природного происхождения, содержащим комплекс биологически активных веществ, основную долю которого составляют гуминовые соединения. Как было указано в Главе 1, запасы озерного сапропеля на территории Омской области значительны и доступны для переработки [5, 134, 195].

Таким образом, сапропель является перспективным объектом для создания на его основе лекарственных препаратов. Для внедрения лекарственных средств на его основе необходима стандартизация исходного сырья. В настоящее время не существует фармакопейных статей, регламентирующих качество природных источников гуминовых веществ. Как было отмечено ранее (Глава 1), в настоящее время существует ГОСТ на сапропель, устанавливающий основные показатели его качества как органического удобрения [35]. Томскими учеными [42, 185] были разработаны проекты фармакопейных статей на торф и выделенные из него гуминовые кислоты. Однако некоторые диагностические признаки, по которым проведена стандартизация торфа, невозможно использовать для стандартизации сапропеля. Сапропель является сложным органоминеральным комплексом и его нельзя отнести ни к лекарственным средствам растительного или животного происхождения, ни к фармацевтическим субстанциям. Проведенный в Главе 3 анализ сапропеля позволил выделить его основные диагностические признаки, как источника гуминовых веществ, на основе которых необходимо разработать проект ФС, регламентирующей подлинность и доброкачественность исходного сырья.

Проект оформлен в соответствии с требованиями [124].

Название ФС и введение. Название Фармакопейной статьи предлагаем «Сапропель озера Горчаково».

Введение предлагаем в следующей форме «Настоящая фармакопейная статья распространяется на добытый и высушенный сапропель озера Горчаково Тюкалинского района Омской области и применяемый для получения гуминовых веществ».

Внешние признаки. Сапропель, измельченный и высушенный до воздушно-сухого состояния, – порошок темно-коричневого цвета с вкраплениями, без запаха. При рассмотрении микропрепаратов сапропеля видны частицы зеленых, коричневых и серых оттенков, наблюдаются одиночные билатеральные створки панцирей диатомей.

Растворимость. Все испытываемые образцы были практически нерастворимы в воде, умеренно растворимы в растворах щелочей, мало растворимы в хлороформе, спирте и эфире. Сапропель при растворении в вышеперечисленных растворителях образует мутные растворы, соответствующее указание приведено в проекте ФС.

Подлинность. Для разработки методики оценки подлинности нами были использованы данные литературы и результаты собственного химико-фармакологического исследования сапропеля, которое выявило ведущую роль в проявляемой фармакологической активности основной группы БАВ – гуминовых веществ, обеспечивающих антиоксидантный, ранозаживляющий и противовоспалительные эффекты.

Для качественного обнаружения гуминовых веществ в сапропеле нами предложен метод ИК-спектроскопии, как наиболее информативный. Для увеличения достоверности результатов испытания проводили, используя каждый раз не менее 5 проб образцов.

Методика. 0,1 г сухого сапропеля заливают 100 мл 0,1 М раствора натрия гидроксида, нагревают на водяной бане при постоянном перемешивании, затем фильтруют через бумажный фильтр. К фильтрату добавляют порциями по 5 мл

0,1 М раствор кислоты хлористоводородной до рН 2,0. Осадок центрифугируют, промывают водой до рН 7,0 и сушат до постоянной массы.

Высушенные гуминовые вещества растирают в ступке с калия бромидом в соотношении 1:100, запрессовывают в таблетку, помещают в прибор и снимают спектр в интервале значений частот от 4000 до 400 см^{-1} .

С целью валидации данной методики была проведена запись ИК-спектров 5 образцов, приготовленных в стандартных условиях из 1 мг одного и того же образца гуминовых веществ и 100 мг КВr. Значимых различий в ИК-спектрах, записанных для анализируемых образцов, выявлено не было. Если нормировать ИК-спектры по одной из полос, то они совпадают в пределах инструментальной погрешности ИК-спектрометра.

ИК-спектр гуминовых веществ должен соответствовать представленному на рисунке 25 спектру.

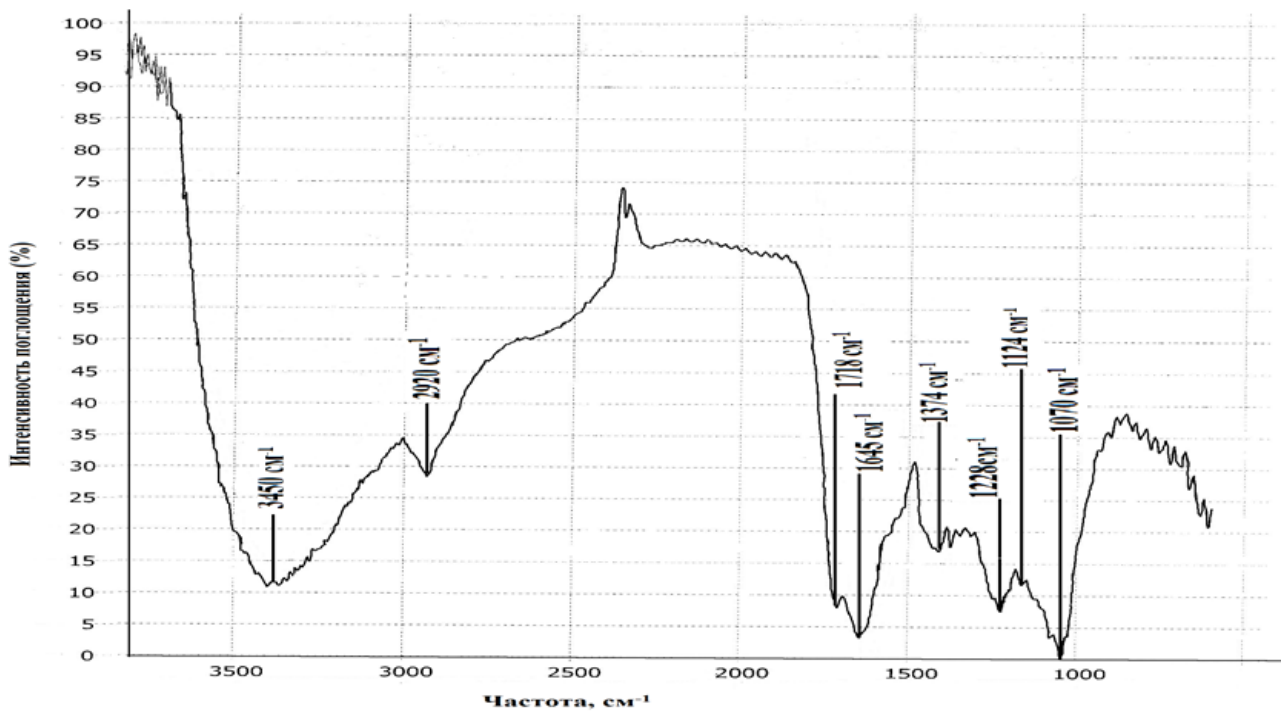


Рисунок 25 – ИК-спектр гуминовых веществ

Числовые показатели сапропеля. Определение основных числовых показателей проводили согласно методикам ГОСТ Р 54000-2010 и ГФ XI и ГФ XII издания [39-41].

Влажность сапропеля определяли при температуре 100-105°C, высушивая навески до постоянной массы. Потеря массы сырья при высушивании колебалась от 11,81 % до 14,87 % (таблица 20). Предлагаем внести в нормативную документацию показатель влажности не более 15 %. ГФ XI, вып. 1, стр. 176 [39].

При анализе образцов сырья показатель *золы общей* составлял от 24,8 % до 27,3 % (таблица 20). В нормативном документе данный показатель будет составлять не более 28,0 %. ГФ XII, ч. 1, стр. 115 [41].

Содержание *золы, нерастворимой в 10% растворе кислоты хлористоводородной*, колебалось в незначительных пределах от 0,75 % до 0,95 %, в нормативный документ предлагаем ввести данный показатель не более 1,0 %. ГФ XI, вып. 1, стр. 24 [39].

Сапропель должен выдерживать требования *микробиологической чистоты* согласно ОФС 42–0016–04 (категория 4А) и ГФ XII, ч. 1, стр. 160. В сапропеле должны отсутствовать возбудители сальмонеллеза, сибирской язвы, анаэробной и синегнойной микрофлоры, патогенного протей, кишечной палочки [41].

При определении содержания *тяжелых металлов* 2 г сапропеля взбалтывали с 20 мл воды при нагревании и фильтровали. 10 мл полученного фильтрата должны выдерживать испытания на тяжелые металлы (не более 0,001%) ГФ XII, ч. 1, стр. 121 [41].

Удельная эффективная активность радионуклидов, содержащихся в образцах сапропеля, не должна превышать предельно допустимые значения, указанные в СанПиН [158].

Должны отсутствовать остаточные количества *хлорорганических пестицидов*, определение которых проводится по ГОСТ Р 53217-2008.

Таблица 20 – Итоговые результаты определения числовых показателей сапропеля

№	Показатель	№ образца				
		1	2	3	4	5
1	Влажность, %	12,39	11,81	13,52	12,41	14,87
2	Зола:					
	Зола общая, %	26,8	27,3	26,0	24,8	26,2
	Зола, нерастворимая в 10% растворе кислоты хлористоводородной, %	0,84	0,75	0,87	0,95	0,82
3	Примеси:					
	Тяжелые металлы	Не более 0,001%	Не более 0,001%	Не более 0,001%	Не более 0,001%	Не более 0,001%
	Остаточные количества хлорорганических пестицидов	*	*	*	*	*

* - не обнаружено

Количественное определение. По результатам собственных химических и фармакологических исследований установлено, что в сапропеле важнейшей группой БАВ являются гуминовые вещества, поэтому целесообразно проводить стандартизацию сырья по этой группе БАВ.

Количественное содержание ГВ в исходном сырье – сапропеле устанавливали гравиметрическим методом, согласно ГОСТ 9517-94 для определения общего выхода гуминовых кислот [33].

Методика. Около 10 г сапропеля (точная навеска) заливают 100 мл 0,1 М раствора натрия гидроксида, настаивают в течение 30 минут при постоянном перемешивании, затем нагревают на водяной бане в течение 1 часа и фильтруют. К фильтрату добавляют порциями по 5 мл 10% раствор кислоты хлористоводородной до pH=2 и прекращения выпадения осадка. Осадок центрифугируют и промывают порциями водой до pH=6-7. Полученные гуминовые вещества помещают в предварительно высушенный бюкс и сушат до постоянной массы в сушильном шкафу при температуре 100-105°C. После чего рассчитывают содержание гуминовых веществ в % к исходной навеске сапропеля.

Процентный выход гуминовых веществ представлен в таблице 21.

Таблица 21 – Выход гуминовых веществ из сапропеля озера Горчаково, %

Год исследования	Выход гуминовых веществ, %
2010	25,4 ± 0,38
2011	25,7 ± 0,41
2012	25,8 ± 0,42
2013	26,3 ± 0,44

Данные таблицы показывают, что содержание гуминовых веществ, в зависимости от года исследования, варьирует от 25,4 % до 26,3 %. В проект ФС заложен показатель не менее 25,0 %.

Статистическая обработка результатов количественного определения гуминовых веществ представлена в таблице 22.

Таблица 22 – Метрологическая характеристика методики количественного определения гуминовых веществ в сапропеле

n	X_{cp}	S^2	S	S_r	$t(0,95)$	$X_{cp} \pm \Delta x$
20	25,80	$16,8 \times 10^{-2}$	$41,0 \times 10^{-2}$	$1,59 \times 10^{-2}$	2,09	$25,8 \pm 0,18$

Важнейшим критерием оценки аналитической методики служит доказательство ее валидности, включающей взаимосвязанную систему характеристик – специфичность, линейность, прецизионность (воспроизводимость) и точность [9, 20, 231].

Сравнение зависимости между взятой навеской сапропеля для количественного определения гуминовых веществ гравиметрическим методом и их выходом показало, что предложенная методика имеет линейный характер. Результаты исследований представлены в таблице 23, графическая зависимость отражена на графике (рисунок 26).

Таблица 23 – Зависимость выхода гуминовых веществ от навески сапропеля

№ п/п	Навеска сапропеля, г	Выход гуминовых веществ, г
1	10,0	2,54
2	20,0	5,08
3	30,0	7,63
4	40,0	10,20
5	50,0	12,71
6	60,0	15,24
7	70,0	17,80
8	80,0	20,31
9	90,0	22,86
10	100,0	25,60

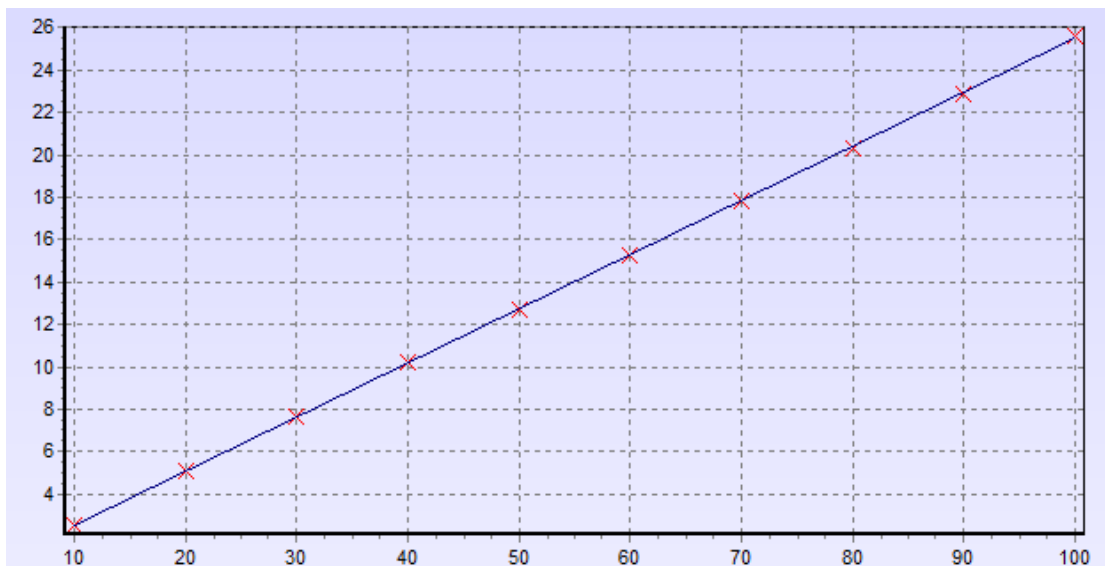


Рисунок 26 – Градуировочный график зависимости навески сапропеля от количества выделенных гуминовых веществ

По оси абсцисс – навеска сапропеля, г; по оси ординат – содержание гуминовых веществ в сапропеле, г.

В результате установлено, что график имеет линейный характер и описывается уравнением $Y=0,255 \cdot X - 0,0273$ при содержании гуминовых веществ в сапропеле от 2,54 до 25,6 г. Коэффициент корреляции (r) равен 0,999, что

позволяет использовать данную методику для количественного определения гуминовых веществ в исходном сырье.

Для установления прецизионности (воспроизводимости) проводили 7 параллельных определений, затем вычисляли величину стандартного отклонения (SD) и относительного стандартного отклонения (RSD) (таблица 24).

Таблица 24 – Результаты определения прецизионности методики определения гуминовых веществ гравиметрическим методом в сапропеле

№ п/п	Найденное содержание гуминовых веществ, %	Метрологические характеристики
1	25,65	$X_{cp}=25,9129 \%$ $SD=0,4018$ $RSD=1,55 \%$
2	25,69	
3	26,14	
4	25,31	
5	25,88	
6	26,23	
7	26,49	

В разработанной методике величина относительного стандартного отклонения менее 5%, что характеризует надежность анализа в выбранных условиях.

Для определения точности методики проанализировали 9 образцов сапропеля на 3 уровнях концентраций в пределах аналитической области.

Для оценки полученных результатов использовали открываемость (R), которая, согласно требованиям нормативной документации, должна находиться в пределах $\pm 2 \%$ [37].

В результате получены 9 значений открываемости, для которых вычисляли величину стандартного отклонения (SD) и относительного стандартного отклонения (RSD) (таблица 25).

Таблица 25 – Результаты определения точности методики гравиметрического определения гуминовых веществ в сапропеле

№ п/п	Уровень	Навеска сырья, г	Найденное содержание ГВ, г	Расчетное содержание ГВ, г	Открываемость (R), %	Метрологические характеристики
1	1	5,0214	1,288	1,301	99,00	$R_{cp}=99,47\%$ $SD=0,3647$ $RSD=0,366 \%$
2	1	5,0841	1,309	1,317	99,39	
3	1	5,0112	1,283	1,298	98,84	
4	2	10,0251	2,585	2,598	99,50	
5	2	10,0058	2,593	2,593	100	
6	2	10,0361	2,590	2,600	99,62	
7	3	20,0223	5,161	5,188	99,48	
8	3	20,0147	5,166	5,186	99,61	
9	3	20,0235	5,178	5,188	99,81	

Результаты определения точности методики показали, что теоретические и экспериментальные значения количественного содержания гуминовых веществ в сапропеле практически полностью совпадают. Величина относительного стандартного отклонения (RSD) не превышает 5 %, а открываемость R составляет 99,47 %, что характеризует точность методики как удовлетворительную.

Установлено, что предлагаемая методика количественного определения гуминовых веществ гравиметрическим методом в сапропеле является специфичной, воспроизводимой и точной, что дает возможность рекомендовать данную методику для контроля качества сапропеля, как источника для получения гуминовых веществ.

В соответствии с проектом ФС «Сапрпель озера Горчаково», содержание гуминовых веществ должно быть не менее 25,0 %.

Срок хранения. Для обоснования сроков хранения образцы сапрпеля закладывали на хранение в соответствии с действующей нормативной документацией ОСТ 42-3-84 «Сырье лекарственное растительное. Порядок установления сроков годности».

Образцы измельченного сапрпеля анализировали в течение 4 лет по показателю качества «Количественное определение». Анализ сырья проводили с периодичностью 6 месяцев. Полученные результаты (рисунок 27) позволяют установить срок годности – 4 года для высушенного и измельченного сырья «Сапрпель озера Горчаково» и использованы для разработки проекта ФС (Приложение 1).



Рисунок 27 – Результаты изучения сроков годности сапрпеля

Хранение осуществляется по ГОСТ 17768-90 и ГФ XI, вып. 1, с. 296 в сухих, чистых, хорошо вентилируемых помещениях, не зараженных амбарными вредителями, защищенных от воздействия прямого солнечного света.

Срок годности – 4 года (время наблюдения). Предельные сроки годности нуждаются в дальнейшем уточнении.

5.2. Показатели качества гуминовых веществ активированных

Следующим шагом после разработки методологических основ стандартизации сапропеля, как источника гуминовых веществ, в ряду «сырье – субстанция – препарат» является создание нормативного документа, регламентирующего качество самих гуминовых соединений, как субстанции для производства препаратов.

Результаты собственных сравнительных исследований по изучению структуры, свойств и фармакологической активности ГВ и ГВА показали, что более перспективной является субстанция гуминовых веществ активированных.

В проекте ФС описаны внешние признаки гуминовых веществ активированных сапропеля озера Горчаково, показатели доброкачественности, обоснован выбор основных функциональных групп, по которым проведена стандартизация субстанции в соответствии с требованиями, предъявляемыми к качеству лекарственных средств, нормами и методиками их определения [124].

Название ФС и введение. Название Фармакопейной статьи предлагаем «Гуминовые вещества активированные».

Введение предлагаем в следующей форме «Настоящая фармакопейная статья распространяется на гуминовые вещества активированные, получаемые из сапропеля озера Горчаково Тюкалинского района Омской области с использованием УФ-облучения на стадии щелочного гидролиза и применяемые для получения лекарственных средств».

Описание. Гуминовые вещества активированные, выделенные из сапропеля с применением УФ-света, представляют собой аморфный порошок темно-коричневого цвета, без запаха.

Растворимость. Растворимость определяли по способности гуминовых веществ активированных растворяться в разных растворителях, принятых Государственной фармакопеей. Все испытуемые образцы были практически нерастворимы в воде, умеренно растворимы в горячей воде, растворимы в растворах щелочей, мало растворимы в хлороформе и спирте. Гуминовые

вещества активированные при растворении в вышеперечисленных растворителях образуют мутные растворы, соответствующее указание приведено в проекте ФС.

Подлинность. Наличие в молекулах гуминовых веществ хромофорных и ауксохромных групп, обуславливающих их темную окраску, позволяет использовать метод спектрофотометрии в УФ- и видимой областях для их идентификации.

Методика. Точную навеску гуминовых веществ активированных (около 0,1 г) растворяют в 100 мл 0,1 М раствора натрия гидроксида, 1 мл полученного раствора помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл и доводят водой очищенной до метки, перемешивают и снимают спектр полученного раствора в интервале от 190 до 900 нм. Раствор сравнения: 1 мл 0,1 М раствора натрия гидроксида в 100 мл воды очищенной. УФ-спектр поглощения испытуемого раствора гуминовых веществ активированных в интервале длин волн от 190 до 900 нм должен иметь характерный максимум при длине волны 265 ± 2 нм.

Отношения оптических плотностей при 465 и 650 нм (E_4/E_6), рассчитывали для 0,001% растворов гуминовых веществ активированных. Коэффициент цветности составил $4,18 \pm 0,02$.

С целью валидации (специфичность) данной методики была проведена запись УФ-спектров растворов 10 образцов, приготовленных в стандартных условиях из одного и того же образца гуминовых веществ активированных. Для объективной оценки спектральных характеристик гуминовых веществ было проведено сравнительное исследование спектров стандартных образцов гуминовых веществ активированных и испытуемых гуминовых веществ активированных, полученных в одинаковых условиях (рисунки 28, 29). Значимых различий в УФ спектрах анализируемых образцов не выявлено. Коэффициент цветности укладывается в указанные интервалы (таблица 26).

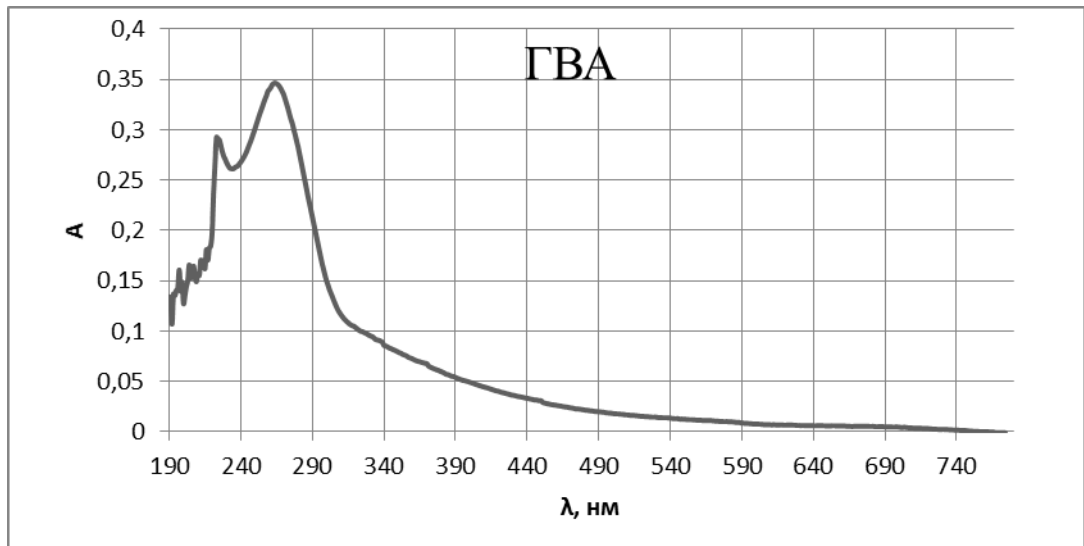


Рисунок 28 - Спектр поглощения 0,001% раствора ГВА в УФ- и видимой областях



Рисунок 29 - Спектр поглощения 0,001% раствора ГВА - стандартного образца в УФ- и видимой областях

Таблица 26 – Метрологическая характеристика методики определения коэффициента цветности для гуминовых веществ

Спектроскопический коэффициент	n	X_{cp}	S^2	S	S_r	t (0,95)	$X_{cp} \pm \Delta x$
Коэффициент цветности (E_4/E_6)	10	4,18	$2,5 \times 10^{-3}$	$1,88 \times 10^{-2}$	$1,19 \times 10^{-2}$	2,26	$4,184 \pm 0,036$

Спектроскопия в инфракрасной области в интервале $4000-400\text{ см}^{-1}$ позволяет идентифицировать гуминовые вещества по ширине, форме, положению полос поглощения. Как было показано в Главе 1, инфракрасные спектры являются характерным диагностическим признаком гуминовых соединений.

Инфракрасный спектр, снятый в диске с калия бромидом, в области от 4000 до 400 см^{-1} по положению полос поглощения должен соответствовать рисунку спектра гуминовых веществ активированных (Глава 4, рисунок 15).

С целью валидации данной методики была проведена запись ИК- спектров 5 образцов, приготовленных в стандартных условиях из 1 мг одного и того же образца гуминовых веществ активированных и 100 мг KBr . Также был записан ИК-спектр РСО гуминовых веществ, выделенных под воздействием УФ-света. Значимых различий в ИК спектрах, записанных для анализируемых образцов, не выявлено (рисунок 30).

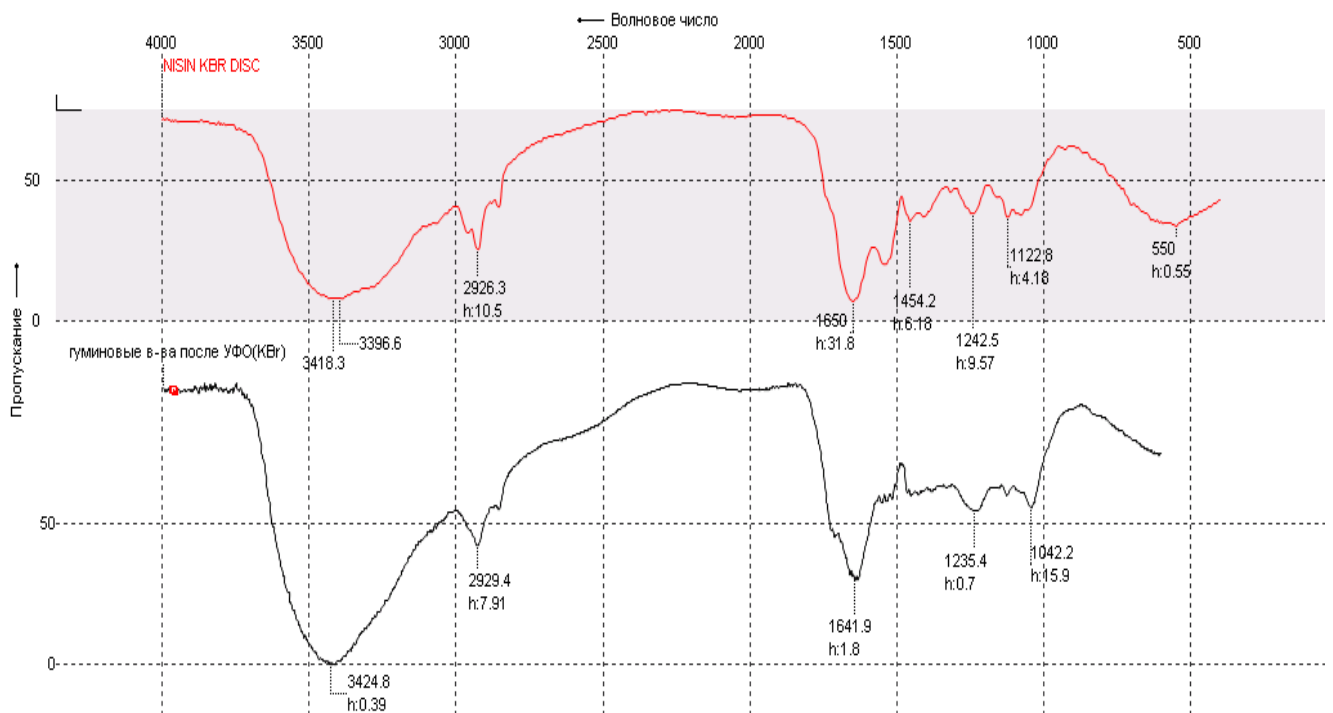


Рисунок 30 – ИК-спектры РСО гуминовых веществ (обозначен красным) и гуминовых веществ, выделенных из сапропеля под воздействием УФ-света (обозначен черным)

Определение влажности гуминовых веществ. Влажность гуминовых веществ активированных определяли при температуре $100-105^{\circ}\text{C}$, высушивая навески до постоянной массы. Потеря массы гуминовых веществ активированных

при высушивании колебалась от 2,1 % до 4,2 %. Предлагаем внести в нормативную документацию показатель влажности не более 5 %.

Содержание сульфатной золы составляло от 0,07 до 0,08 %.

Сульфатная зола из 1,0 г (точная навеска) субстанции не должна превышать 0,1 %. ГФ XII, ч. 1, стр. 115 [41].

Определение содержания тяжелых металлов в гуминовых веществах активированных. Определение содержания тяжелых металлов и токсичных элементов в гуминовых веществах активированных проводили методом атомно-эмиссионной спектрометрии (Глава 4).

Сульфатная зола из 1 г субстанции должна выдерживать испытания на тяжелые металлы (не более 0,001%) ГФ XII, ч. 1, стр. 121 [41].

Определение содержания хлоридов в гуминовых веществах активированных.

1,0 г субстанции встряхивают в течение 5 мин с 20 мл воды и фильтруют. 2 мл фильтрата, разведенного водой до 10 мл, должны выдерживать испытания на хлориды (не более 0,02% в субстанции) ГФ XI, вып. 1, стр. 165 [39].

Определение содержания сульфатов в гуминовых веществах активированных.

10 мл фильтрата, полученные в испытании на Хлориды, должны выдерживать испытания на сульфаты (не более 0,02% в субстанции) ГФ XI, вып. 1, стр. 165 [39].

Определение микробиологической чистоты гуминовых веществ активированных. Оценку микробиологической чистоты гуминовых веществ активированных проводили в 5 образцах ежегодно согласно методике, изложенной в ГФ XII, ч. 1, стр. 160 [41]. Результаты исследований представлены в таблице 27.

По общему числу аэробных бактерий, грибов и бактерий кишечной группы исследуемые образцы гуминовых веществ активированных соответствуют нормативным требованиям.

Таблица 27 – Определение микробиологической чистоты в образцах гуминовых веществ активированных сапропеля озера Горчаково

Год исследования	Число микроорганизмов					
	В исследуемых образцах			Нормативное		
	Общее число аэробных бактерий	Общее число грибов	Escherichia coli, Salmonella, Pseudomonas aeruginosa	Общее число аэробных бактерий	Общее число грибов	Escherichia coli, Salmonella, Pseudomonas aeruginosa
1	2	3	4	5	6	7
2010	менее 10^4	менее 10^2	отсутствуют	Не более 10^4 в 1г или в 1 мл	Не более 10^2 в 1г или в 1 мл	Отсутствие
2011	менее 10^4	менее 10^2	отсутствуют			
2012	менее 10^4	менее 10^2	отсутствуют			
2013	менее 10^4	менее 10^2	отсутствуют			

Количественное определение гуминовых веществ активированных.

Проведенные исследования показали возможность применения метода Боэма для количественного определения содержания карбоксильных, лактонных и гидроксильных групп в гуминовых веществах.

Для включения предложенного метода в нормативную документацию, характеризующую качество гуминовых веществ активированных, оптимальная концентрация растворов, необходимая для проведения испытаний, рекомендуется в линейном диапазоне от 0,01 до 0,05%.

Нами разработана методика количественного определения гуминовых веществ активированных, основанная на зависимости показателя удельной электропроводности растворов гуминовых веществ активированных от количества карбоксильных функциональных групп. Карбоксильные группы титруются самостоятельно, а не суммарно с другими функциональными группами

кислотного характера, поэтому именно по ним проводилась разработка методики количественного определения ГВА.

Методика количественного определения гуминовых веществ.

0,25 г гуминовых веществ активированных помещали в мерную колбу на 500 мл, растворяли в 100 мл 0,01 М раствора натрия гидрокарбоната и доводили объем раствора тем же растворителем до метки. Полученный раствор встряхивали на продольном встряхивателе в течение 30 мин и фильтровали через плотный бумажный фильтр для тонких осадков. Затем 25 мл фильтрата при постоянной температуре раствора $25 \pm 1^\circ\text{C}$ титровали 0,01 М раствором кислоты хлористоводородной и определяли показатель удельной электропроводности в конечной точке титрования.

Массовую концентрацию гуминовых веществ активированных определяли, используя градуировочный график зависимости выходного сигнала удельной электропроводности (мСм/м), рассчитанного при титровании карбоксильных функциональных групп методом Боэма, от массы навески ГВА. Количественное содержание гуминовых веществ активированных в процентах (X) в пересчете на абсолютно сухое сырье рассчитывали по формуле:

$$X = \frac{m \times 500 \times 100 \times 100}{0,25 \times (100 - W) \times 25}, \text{ где}$$

m – масса гуминовых веществ активированных в граммах, найденная по калибровочному графику;

W – потеря в массе при высушивании гуминовых веществ активированных в процентах.

Построение калибровочного графика.

1,0 г гуминовых веществ активированных – стандартного образца, высушенного до постоянной массы, помещали в мерную колбу на 500 мл, растворяли в 100 мл 0,01 М раствора натрия гидрокарбоната и доводили объем раствора тем же растворителем до метки. Из этого раствора готовили серию разбавленных растворов, содержащих гуминовые вещества активированные – стандартный образец соответственно 0,0025; 0,005; 0,0075; 0,01; 0,0125 г в 25 мл

раствора. Полученные растворы встряхивали на продольном встряхивателе в течение 30 мин и фильтровали через плотный бумажный фильтр для тонких осадков, затем при постоянной температуре раствора $25 \pm 1^\circ\text{C}$ титровали 0,01 М раствором кислоты хлористоводородной и определяли показатель удельной электропроводности в конечной точке титрования.

Статистическая обработка результатов количественного определения гуминовых веществ активированных представлена в таблице 28.

Таблица 28 – Метрологическая характеристика методики количественного определения гуминовых веществ активированных

n	X_{cp}	S^2	S	S_r	$t(0,95)$	$X_{cp} \pm \Delta x$
10	97,78	2,37	0,648	$1,57 \times 10^{-2}$	2,26	$97,78 \pm 1,1$

Результаты анализа образцов показали, что содержание гуминовых веществ активированных в исследуемой субстанции составляет $97,78 \pm 1,1\%$.

Важнейшим критерием оценки аналитической методики служит доказательство ее валидности, включающей взаимосвязанную систему характеристик – специфичность, линейность, прецизионность (воспроизводимость) и точность [9, 20, 231].

Специфичность методики определяется химической реакцией, лежащей в основе метода. Метод основан на взаимодействии карбоксильных групп в структуре гуминовых веществ с натрия гидрокарбонатом.

Для обоснования линейной зависимости предлагаемой методики строили градуировочный график зависимости показателя удельной электропроводности растворов ГВА – стандартного образца от массы навески, рассчитывали уравнение регрессии и коэффициент корреляции. Данные для расчетов представлены в таблице 29, графическая зависимость отражена на графике (рисунок 31).

Таблица 29 – Показатели удельной электропроводности гуминовых веществ активированных – стандартного образца в конечной точке титрования при определении карбоксильных групп

№ п/п	Удельная электропроводность, мСм/м	Концентрация раствора ГВА, %
1	58,0	0,01
2	58,6	0,02
3	59,2	0,03
4	59,8	0,04
5	60,4	0,05

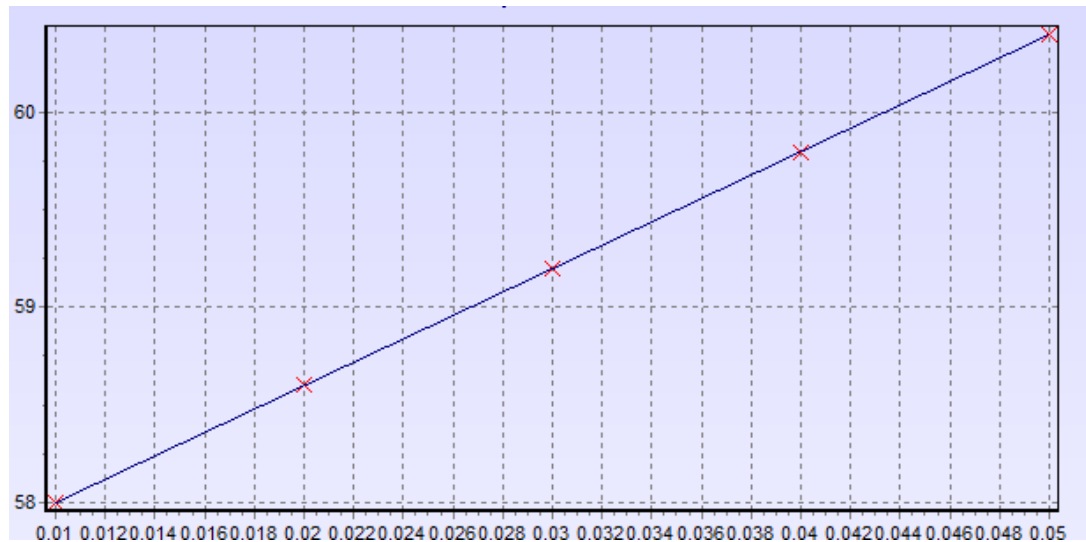


Рисунок 31 - Градуировочный график зависимости показателя удельной электропроводности растворов ГВА от массы навески

По оси абсцисс – содержание гуминовых веществ активированных, г; по оси ординат – удельная электропроводность растворов ГВА.

В результате установлено, что график имеет линейный характер и описывается уравнением $Y=240 \cdot X + 57,4$ при навеске гуминовых веществ активированных от 0,01 до 0,05 г. Коэффициент корреляции (r) равен 0,999, что свидетельствует о линейной связи значения удельной электропроводности растворов гуминовых веществ активированных от массы взятой навески. Это

позволяет использовать данную методику для количественного определения гуминовых веществ активированных в данном диапазоне концентраций.

Для установления прецизионности (воспроизводимости) проводили 7 параллельных определений, затем вычисляли величину стандартного отклонения (SD) и относительного стандартного отклонения (RSD) (таблица 30).

Таблица 30 – Результаты определения прецизионности методики определения гуминовых веществ активированных

№ п/п	Найденное содержание гуминовых веществ активированных, %	Метрологические характеристики
1	97,3	$X_{cp}=97,6 \%$ $SD=5,143 \times 10^{-1}$ $RSD=5,30 \times 10^{-3} \%$
2	98,4	
3	96,5	
4	99,2	
5	98,6	
6	96,9	
7	96,3	

В разработанной методике величина относительного стандартного отклонения менее 5%, что характеризует надежность анализа в выбранных условиях.

Точность аналитической методики количественного определения подтверждалась на всем диапазоне применения. Оценка проводилась путем сравнения полученного результата с ожидаемым значением. Для определения точности методики проанализировали 9 образцов на 3 уровнях концентраций в пределах аналитической области.

Для оценки полученных результатов использовали открываемость (R), которая, согласно требованиям нормативной документации, должна находиться в пределах $\pm 2 \%$ [37]. В результате получены 9 значений открываемости, для которых вычисляли величину стандартного отклонения (SD) и относительного стандартного отклонения (RSD) (таблица 31).

Таблица 31 – Результаты определения точности методики количественного определения гуминовых веществ активированных

№ п/п	Уровень	Навеска ГВА, г	Найденное содержание ГВА, %	Расчетное содержание ГВА, %	Открываемость (R), %	Метрологические характеристики
1	1	0,0996	39,15	39,80	98,37	$R_{cp}=99,63\%$ $SD=0,279$ $RSD=2,80 \times 10^{-3} \%$
2	1	0,1011	39,95	40,40	98,88	
3	1	0,1029	41,08	41,21	99,69	
4	2	0,1502	59,91	60,10	99,69	
5	2	0,1508	60,24	60,30	99,90	
6	2	0,1511	60,46	60,4	100,1	
7	3	0,2455	98,5	98,6	99,90	
8	3	0,2491	98,6	98,6	100	
9	3	0,2498	98,7	98,6	100,1	

Результаты определения точности методики показали, что теоретические и экспериментальные значения количественного содержания гуминовых веществ активированных практически полностью совпадают. Величина относительного стандартного отклонения (RSD) не превышает 5 %, а открываемость R составляет в среднем 99,63 %, что характеризует точность методики как удовлетворительную.

Установлено, что предлагаемая методика количественного определения гуминовых веществ активированных является специфичной, воспроизводимой, точной и линейной в диапазоне концентраций 0,01-0,05 %, что предполагает

рекомендовать данную методику для контроля качества гуминовых веществ активированных, как источника для получения лекарственных средств.

В соответствии с проектом ФС «Гуминовые вещества активированные», содержание гуминовых веществ активированных должно быть не менее 95%.

Срок хранения. Для обоснования сроков хранения образцы гуминовых веществ активированных закладывали на хранение в соответствии с действующей нормативной документацией ОФС 42-0075-07 «Сроки годности лекарственных средств».

В образцах гуминовых веществ активированных в течение 3 лет проводили количественное определение функциональных групп кислотного характера с периодичностью 6 месяцев. Полученные результаты (рисунок 32) позволяют установить срок годности 3 года для «Гуминовых веществ активированных» и будут использованы для разработки проекта ФС.

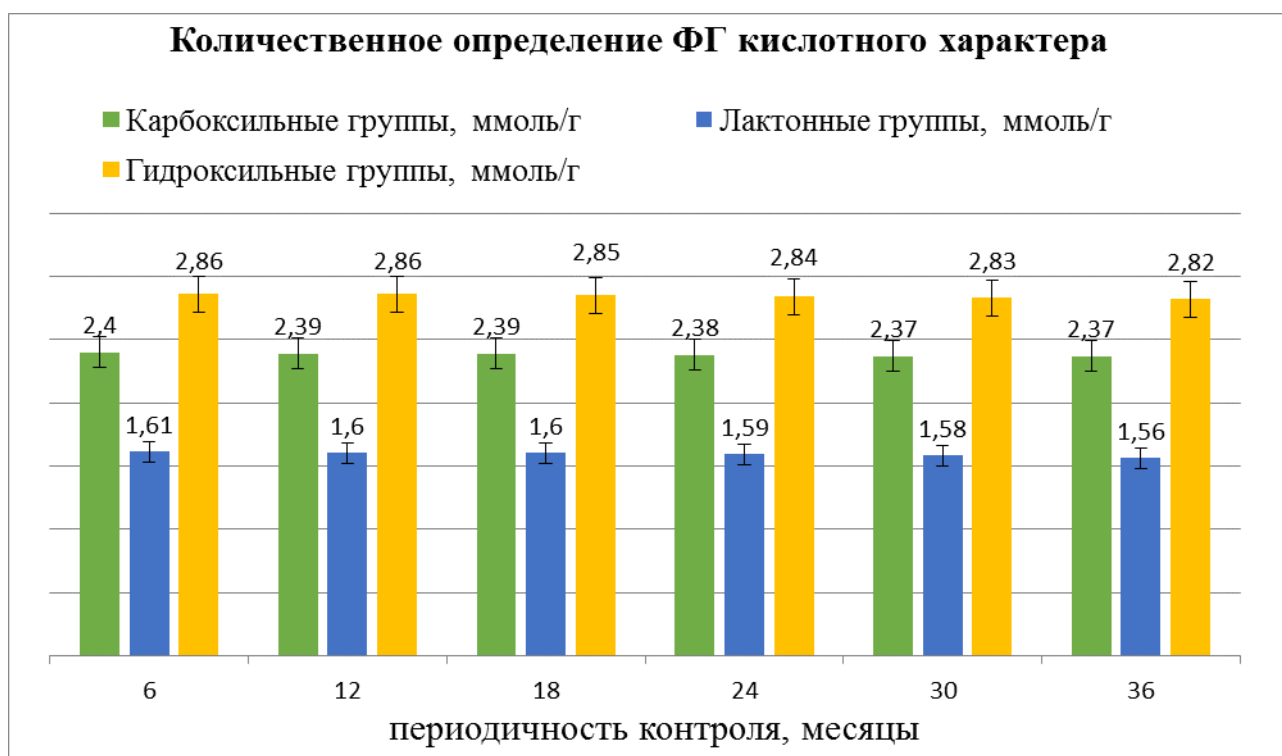


Рисунок 32 – Результаты изучения сроков годности гуминовых веществ активированных

Хранение осуществляется по ГОСТ 17768-90 и ГФ XI, вып.1, с. 296 в сухих, чистых, хорошо вентилируемых помещениях, не зараженных амбарными вредителями, защищенных от воздействия прямого солнечного света.

Срок годности – 3 года (время наблюдения). Предельные сроки годности нуждаются в дальнейшем уточнении.

Полученные данные по стандартизации гуминовых веществ активированных сапропеля озера Горчаково Тюкалинского района Омской области, включающие оценку исходного сырья, подлинности, доброкачественности и количественного содержания гуминовых веществ активированных, согласно регламентирующим требованиям, внесены нами в проект ФС «Гуминовые вещества активированные» (Приложение 2).

Заключение по главе 5

В данной главе представлены основные критерии оценки качества исходного сырья – сапропеля озера Горчаково и выделенных из него под действием УФ-света гуминовых веществ. На основании этих критериев в соответствии с действующей нормативной документацией создан проект фармакопейной статьи «Сапропель озера Горчаково» (Приложение 1) и проект фармакопейной статьи «Гуминовые вещества активированные» (Приложение 2).

ВЫВОДЫ

1. На основании данных научной литературы по содержанию гуминовых веществ в сырье природного происхождения, а также территориальных запасов, экологической безопасности, доступности переработки сапропеля в озерах Западной Сибири установлено, что одним из перспективных источников гуминовых веществ может являться сапропель озера Горчаково Тюкалинского района Омской области.

2. В результате определения экотоксикантов было установлено, что исследуемый сапропель не содержит в составе хлорорганические пестициды, удельная эффективная активность природных радионуклидов в образцах сапропеля не превышает предельно допустимые значения для лечебных грязей, содержание тяжелых металлов в объектах анализа не превышает гигиенические нормативы. Бактериологические исследования сапропеля показали отсутствие в нем возбудителей сальмонеллеза, сибирской язвы, анаэробной и синегнойной микрофлоры, патогенного протей, кишечной палочки.

3. Установлено, что состав органической части сапропеля представлен следующими группами соединений: липофильные фракции ($3,1 \pm 0,07\%$), гуминовые вещества: гуминовые и гиматомелановые кислоты ($25,8 \pm 0,57\%$), фульвокислоты ($2,0 \pm 0,04\%$), водорастворимые и легкогидролизуемые вещества ($15,1 \pm 0,34\%$) и негидролизуемый остаток ($27,8 \pm 0,62\%$).

4. На основании сравнительного анализа гуминовых веществ, выделенных из сапропеля и гуминовых веществ, подвергнутых фотохимической активации в процессе выделения, установлено, что под воздействием УФ-облучения происходят изменения физико-химических свойств гуминовых соединений. Результаты исследований показали, что более выраженными сорбционными свойствами и антиоксидантной активностью обладают гуминовые вещества активированные.

5. На основании выявленных особенностей структуры сапропеля и гуминовых веществ активированных разработаны критерии стандартизации исходного сырья – сапропеля и выделенных из него гуминовых веществ.

Предложены методики определения подлинности сапропеля и количественного определения основной группы БАВ в сапропеле – гуминовых веществ. Разработаны методики определения подлинности гуминовых веществ активированных методом ИК-спектроскопии и их количественного определения методом Бозма с кондуктометрической фиксацией точки эквивалентности. Валидационный анализ показал соответствие методик критериям правильности, прецизионности, специфичности и линейности.

6. Создан проект фармакопейной статьи предприятия «Сапропель озера Горчаково» и проект фармакопейной статьи предприятия «Гуминовые вещества активированные».

Список литературы

1. Аввакумова, Н. П. Термодинамические функции в ряду гумусовых кислот пелоидов / Н. П. Аввакумова, М. А. Криволапова, М. Н. Глубокова // Материалы научно-практической конференции «Современная фармация: образование, наука, бизнес». – Тюмень: ТюмГМА. – 2014. – С. 135-136.
2. Аввакумова, Н. П. Сравнительный анализ ИК спектров гумусовых кислот пелоидов / Н. П. Аввакумова, М. А. Криволапова, М. Н. Глубокова Е. Е. Катунина, И. В. Фомин // Современные исследования медико-биологических наук: совершенствование диагностики, разработка средств профилактики и терапии болезней. Сборник материалов международной научной конференции, Россия, г. Киров, 26-28 июня 2013 г. под ред. проф. Л. В. Натрус. – Киров, 2013. – С. 31-38.
3. Аввакумова, Н. П. Природа защитного действия гуминовых веществ различного генеза / Н. П. Аввакумова, М. А. Криволапова, А. В. Жданова, М. Н. Глубокова, И. В. Фомин, Е. Е. Катунина // Известия Самарского научного центра РАН. – 2012. – т. 14. – № 1-8. – С. 2104 - 2107.
4. Аввакумова, Н. П. Антиоксидантные свойства гуминовых веществ пелоидов / Н. П. Аввакумова, А. Я. Герчиков, В. Р. Хайруллина, А. В. Жданова // Химико-фармацевтический журнал. – 2011. – № 3. – С. 50-51.
5. Адеева, Л. Н. Определение химического состава сапропеля / Л. Н. Адеева, Т. А. Коваленко, О. И. Кривонос, Г. В. Плаксин, Н. Н. Струнина // Химия и химическая технология. – 2009. – Т. 52. – вып. 3. – С. 121-123.
6. Андреев, Г. М. Влияние препарата «Лигфол» на организм коров и эффективность их оплодотворения в условиях хозяйств Ленинградской области / Г. М. Андреев, К. В. Племяшов, Д. Н. Пудовкин, Л. С. Фогель // Сборник докладов «Итоги и перспективы применения гуминовых препаратов в продуктивном животноводстве, коневодстве и птицеводстве». – Москва, 2006. – С. 36-40.
7. Андреева, Д. Б. Гуминовые вещества низинного торфа и бурого угля Забайкалья: автореф. дис. ...канд. биол. наук: 06.01.04 / Андреева Дарима

Бальжинимаевна. – Улан-Удэ, 2002. – 21 с.

8. Анисимов, М. М. Некоторые химические и медико-биологические свойства гуминовых кислот. / М. М. Анисимов, Г. Н. Лихацкая // Труды растениеводства и животноводства. – Хабаровск, 2001. – Т. 2. – С. 34-44.
9. Арзамасцев, А. П. Валидация аналитических методов / А. П. Арзамасцев, Н. П. Садчикова, Ю. Я. Харитонов // Фармация. 2006. – № 4. – С. 4-12.
10. Бакшеев, В. Н. Сапропель: вчера, сегодня и завтра / В. Н. Бакшеев. – Тюмень, 1998. – 80 с.
11. Бамбалов, Н. Н. Фракционно-групповой состав органического вещества целинных и мелиорированных торфяных почв / Н. Н. Бамбалов, Т. Я. Беленькая // Почвоведение. – 1998. – № 12. – С. 1431-1437.
12. Бамбалов, Н. Н. Изменение элементного состава лигнина в процессе гумификации / Н. Н. Бамбалов // Почвоведение. – 2011. – № 10. – С. 1193–1200.
13. Батуев, Б. Ц. Оценка физиологической активности гуминовых веществ окисленных углей (Бурятия) / Б. Ц. Батуев, Е. В. Золотоев, Н. В. Бодоев, И. П. Быков, А. Д. Дашицыренова // Химия в интересах устойчивого развития. – 2005. – № 13. – С. 501-505.
14. Белоусов, М. В. Исследование химических и токсических свойств гуминовых кислот низинного древесно-травяного торфа Томской области / М. В. Белоусов, Р. Р. Ахмеджанов, М. В. Гостищева, М. С. Юсубов, А. В. Матвеевко // Бюллетень сибирской медицины. – 2009. – №4 (2). – С. 27-33.
15. Беркович, А. М. Применение гуминовых и гуминоподобных препаратов в ветеринарии и медицине [Электронный ресурс] / А. М. Беркович // Режим доступа: <http://www.humipharm.ru/research/prim.pdf> свободный. – (дата обращения 28.03.2014).
16. Бузлама, А. В. Сравнительная характеристика антиоксидантного действия олипифата и динофена / А. В. Бузлама // Новые технологии в биологии и медицине: сб. науч. тр. – Воронеж. – 2004. – С. 23-25.
17. Бузлама, А. В. Анализ фармакологических свойств, механизмов действия и

- перспектив применения гуминовых веществ в медицине / А. В. Бузлама, Ю. Н. Чернов // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2010. – Т. 73. – № 9. – С. 43-48.
18. Бузлама, А. В. Параметры острой токсичности солей гуминовых кислот / А. В. Бузлама, Ю. Н. Чернов, А. И. Сливкин // Вестник ВГУ, Серия: Химия. Биология. Фармация. – 2014. – № 1. – С. 111-115.
19. Бузлама, А. В. Изучение антитоксических свойств солей гуминовых кислот в экспериментальных исследованиях / А. В. Бузлама, Ю. Н. Чернов, Ю. М. Дронова, М. А. Астанина // Научные ведомости БЕЛГУ, серия Медицина, Фармация. – 2011. – №22 (117). – Вып. 16. – С. 214–221.
20. Валидация аналитических методик для производителей лекарств. Типовое руководство предприятия по производству лекарственных средств, подготовленное Федеральным союзом фармпроизводителей Германии (ВАН), пер. Ж. И. Аладышевой, О. Р. Спицкого / Под ред. В. В. Береговых. – М.: Литерра, 2008. – 132 с.
21. Варшал, Г. М. Геохимическая роль гумусовых кислот в миграции элементов / Г. М. Варшал, Т. К. Велюханова, И. Я. Кошечева. // Гуминовые вещества в биосфере. М.: Наука, 1993. – С. 97-116.
22. Васильев, А. В. Инфракрасная спектроскопия органических и природных соединений / А. В. Васильев, Е. В. Гриненко, О. А. Щукин, Т. Г. Федупина. – СПб.: Изд-во СПбГЛТА, 2007. – 54 с.
23. Вершинин, В. И. Планирование и математическая обработка результатов химического эксперимента: уч. пособие / В. И. Вершинин, Н. В. Перцев. – Омск : Изд-во ОмГУ, 2005. – 216 с.
24. Ветрова, О. В. Закрепление гуминовых кислот на поверхности силикагеля через слой полиметиленгуанидина / О. В. Ветрова, М. С. Бурметьева, М. А. Гавриленко // Известия Томского политехнического университета. – 2013. – Т. 322. – № 3. – С. 18-21.
25. Водяницкий, Ю. Н. Методы расчета ароматичности гумусовых кислот / Ю. Н. Водяницкий // Почвоведение. – 2001. – № 3. – С. 289-294.

26. Вязова, Н. Г. Сорбционные свойства гуминовых кислот / Н. Г. Вязова, В. Н. Крюкова, В. П. Латышев // Химия твёрдого топлива. – 1999. – № 6. – С. 47-50.
27. Вяткин, И. А. Сапропелевые ресурсы Омской области: история изучения и применения, минерально – сырьевая база, перспективы развития / И. А. Вяткин, Т. Н. Лустова, Г. А. Вяткина // Материалы международной научно-практ. конфер. «Сапропель и продукты его переработки». Омск: ОмГАУ. – 2008. – С. 7 - 12.
28. Гаврильчик, А. П. Трансформация форм торфа при антропогенном воздействии / А. П. Гаврильчик, Т. Я. Кашинская, под ред. И. И. Лиштвана – Минск: Беларус. навука, 2013. – 305 с.
29. Глебова, Г. И. Гиматомелановые кислоты почв / Г. И. Глебова. – М., 1985. – 73 с.
30. Глубокова, М. Н. Стандартизация биологически активной субстанции «гуминовые кислоты пелоидов» методом спектрофотометрии / М. Н. Глубокова, А. В. Жданова, Е. Е. Катунина // Сборник трудов II международной научной конференции молодых ученых-медиков. В 3-х томах. – Курск: ГОУ ВПО КГМУ Росздрава, 2008. – Т. III. – С. 275-277.
31. Горбуновская, О. М. Новые методические подходы к анализу вещественного состава сапропелей / О. М. Горбуновская, В. Б. Курзо, Т. К. Будай // ХТТ. – 2001. – № 2. – С. 73–81.
32. ГОСТ 12.1.007 76. Система стандартов безопасного труда. Вредные вещества. Классификация и общие требования безопасности. – М.: Издательство стандартов, 1976. – 6 с.
33. ГОСТ 9517-94 (ИСО 5073-85). Методы определения выхода гуминовых кислот. Межгосударственный стандарт. – Минск, 1996.
34. ГОСТ Р 53217-2008. Качество почвы. Определение содержания хлорорганических пестицидов и полихлорированных бифенилов. Газохроматографический метод с электрозахватным детектором. – М.: Стандартиформ, 2008. – 23 с.

35. ГОСТ Р 54000-2010. Удобрения органические. Сапропели. Общие технические условия. – М.: Стандартинформ, 2010. – 16 с.
36. ГОСТ 31858-2012 - Вода питьевая. Метод определения содержания хлорорганических пестицидов газожидкостной хроматографией. – М.: Стандартинформ, 2013. – 18 с.
37. ГОСТ Р ИСО 5725-2002 «Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений» В 6 ч. – Введ. 23.04.02. – М.: Госстандарт России; Изд-во стандартов, 2002.
38. ГОСТ 27593-88. ПОЧВЫ. Термины и определения– М.: Стандартинформ, 2006. – 11 с.
39. Государственная фармакопея СССР. – Вып. 1 / МЗ СССР. – 11-е изд., доп. – М.: Медицина, 1987. – 335 с.
40. Государственная фармакопея СССР. – Вып. 2. / МЗ СССР. – 11-е изд., доп. – М.: Медицина, 1990. – 398 с.
41. Государственная фармакопея Российской Федерации. 12-е изд. – ч. 1 – М.: Научный центр экспертизы средств медицинского применения, 2007. – 704 с.
42. Гостищева, М. В. Химико-фармакологическое исследование нативных гуминовых кислот торфов Томской области: автореф. дис. ...канд. фарм. наук: 15.00.02 / Гостищева Мария Владимировна. – Пермь, 2008. – 23 с.
43. Гостищева, М. В. Сравнительная характеристика методов выделения гуминовых кислот из торфов с целью получения гуминовых препаратов / М. В. Гостищева, И. В. Федько, Е. О. Писниченко // Доклады ТУСУРа. Автоматизированные системы обработки информации, управления и проектирования. – 2004. – С.66-69.
44. Гречищева, Н. Использование модельных органоминеральных комплексов на основе гуминовых кислот и каолинита для изучения процессов сорбции ПАУ водных и почвенных сред / Н. Гречищева, В. Холодов, И. Вахрушкина и др. // Научно-технический журнал. Защита окружающей среды в нефтегазовом комплексе. – 2012. – Т. 5. – С. 21-26.
45. Григоренко, В. Б. Лигфол – механизм действия, клиническое применение,

- некоторые выводы. // «Ветеринарная жизнь». – №4. – 2006. – С. 21-24.
46. Гурин, Э. В. Запасы сапропеля Ярославской области и рекомендации по их использованию // Материалы научно - практической конференции «Состояние и перспективы освоения недр, охрана окружающей среды Ярославской области и Верхне-Волжского региона». – Ярославль, Изд-во ЯрИПК, 2004. – С. 31-36.
47. Данченко, Н. Н. Функциональный состав гумусовых кислот: определение и взаимосвязь с реакционной способностью / Н. Н. Данченко. – М., 1997. – 53 с.
48. Данченко, Н. Н. Определение карбоксильной кислотности гумусовых кислот титриметрическими методами / Н. Н. Данченко, И. В. Перминова, А. В. Гармаш, А. В. Кудрявцев // Вестник Московского университета. Серия 2. Химия. – 1998. – т. 39. – № 2. – С. 127-131.
49. Дёмин, В. В. Механизм действия гуминовых веществ на живые клетки / В. В. Дёмин, В. А. Терентьев, Ю. А. Завгородняя // Тезисы докладов II международной конференции «Гумусовые вещества в биосфере». – М., СПб. – 2003. – С. 34-35.
50. Дмитрук, С. Е. Грибковые заболевания и альтернативные возможности фототерапии / С. Е. Дмитрук, Н. Э. Коломиец, В. С. Дмитрук, О. А. Мальцева // Бюллетень Сибирского отделения РАМН. Томск. – 2001. – С. 9-14.
51. Долгополов, В. Н. Опыт применения «Гумивала» для улучшения продуктивности КРС, свиней и птиц / В. Н. Долгополов // Сборник докладов «Итоги и перспективы применения гуминовых препаратов в продуктивном животноводстве, коневодстве и птицеводстве». – Москва. – 2006. – С. 40-43.
52. Драгунов, С. С. Физиологически активные вещества каоустобиолитов / С. С. Драгунов // Химия твердого топлива. – 1967. – № 1. – С. 17-26.
53. Дударчик, В. М. Электронномикроскопические исследования гуминовых кислот / В. М. Дударчик, Т. П. Смычник // Почвоведение. – 2003. – № 11. – С. 1335-1341.
54. Дурнев, А. Д. Генотоксические поражения и болезни / А. Д. Дурнев, А. К.

- Жанатаев, О. В. Шредер, В. С. Середенина // Молекулярная медицина. – 2013. – № 3. – С. 3-19.
55. Дурнев, А. Д. Генотоксикология соединений растительного происхождения / А. Д. Дурнев, А. С. Лапицкая // Экологическая генетика. – 2012. – т. X. – № 3. – С. 41-52.
56. Духанина, И. Я. Влияние состава экстрактов торфа и биогумуса на их физиологическую активность / И. Я. Духанина, А. Л. Верещагин, Е. Ю. Егорова, Н. В. Степанова // Химия растительного сырья. – 1998. – № 4. – С. 47-51.
57. Жанатаев, А. К. Методические аспекты оценки ДНК повреждений методом ДНК-комет / А. К. Жанатаев, В. А. Никитина, Е. С. Воронина, А. Д. Дурнев // Прикладная токсикология. – 2011. – № 2 (4). – С 29-37.
58. Жилиякова, Т. П. Торфотон - перспективный противоязвенный препарат / Т. П. Жилиякова, О. П. Панина, Л. В. Ратахина, Е. П. Зуева // Сибирский журнал «Гастроэнтерология и гепатология». – 1999. – № 8-9. – С. 108-109.
59. Журавлев, А. И. Развитие идей Б. Н. Тарусова о роли цепных процессов в биологии / А. И. Журавлев // Биоантиокислители и регуляции метаболизма в норме и патологии. – М., 1982. – 36 с.
60. Жмакова, Н. А. Структура гуминовых кислот торфа / Н. А. Жмакова, В. П. Стригуцкий, Г. В. Наумова // Гуминовые вещества в биосфере. – М., 1993. – С. 50-54.
61. Заварзина, А. Г. Кислотно-основные свойства гуминовых кислот различного происхождения по данным потенциометрического титрования / А. Г. Заварзина, В. В. Дёмин // Почвоведение. – 1999. – №10. – С. 1246-1254.
62. Закис, Г. Ф. Функциональный анализ лигнинов и их производных / Г. Ф. Закис. – Рига: Зинатне, 1987. – 230 с.
63. Зыкова, М. В. К вопросу об исследованиях биологической активности гуминовых кислот // Материалы VIII Всероссийской с международным участием научной школы «Болота и биосфера». – Томск: ТГПУ. – 2012. – С. 47-56.

64. Зыкова, М. В. Стандартизация гуминовых кислот низинного древесно-травяного вида торфа / М. В. Зыкова, М. В. Белоусов, А. М. Гурьев, Р. Р. Ахмеджанов, М. С. Юсубов // Химико-фармацевтический журнал. – 2013. – № 12. – С. 53-56.
65. Игишев, В. Г. Борьба с самовозгоранием угля в шахтах / В. Г. Игишев. – М.: Недра, 1987. – 176 с.
66. Инишева, Л. И. Метод исследования биологической активности гуминовых кислот торфов и сапропелей / Л. И. Инишева, Р. Т. Тухватулин, М. В. Гостищева // Вестник Алтайского государственного университета. – 2008. – № 6 (44). – С. 29-33.
67. Карамов, Э. В. Синтетическое производное гуминатов Олипифат как анти-ВИЧ-агент в индивидуальном и комбинированном применении. / Э. В. Карамов, Г. В. Корнилаева, М. Р. Хаитов, А. М. Беркович // Иммунология. – 2009. – № 5. – С. 260-263.
68. Карнаухов, А. П. Адсорбция. Текстура дисперсных и пористых материалов. / А. П. Карнаухов. – Новосибирск: Наука, 1999. – 470 с.
69. Карпюк, Л. А. Алкоксисильные производные гуминовых веществ: синтез, строения и сорбционные свойства: дис...канд. хим. наук: 02.00.03, 03.00.16 / Карпюк Леонид Александрович. – М., 2008. – 177 с.
70. Калабин, Г. А. Количественная спектроскопия ЯМР природного органического сырья и продуктов его переработки / Г. А. Калабин, Л. В. Каницкая, Д. Ф. Кушнарев. – М., 2000. – 408 с.
71. Катунина, Е. Е. Влияние гиматомелановых кислот пелоидов на развитие острого воспаления / Е. Е. Катунина, Н. П. Аввакумова, М. А. Семионова // Материалы V Конгресса молодых ученых и специалистов «Наука о человеке». – Томск: СибГМУ. – 2004. – 413 с.
72. Кашицкий, Э. С. Технологические аспекты получения и использования лечебных препаратов из торфов и сапропелей / Э. С. Кашицкий, В. М. Козин, В. С. Улащик, Л. Г. Барабанов, Г. В. Наумова // Известия Белорусской Инженерной Академии. – 1999. – № 2 (8). – С. 53-56.

73. Кирейчева, Л. В. Сапропели: состав, свойства, применение / Л. В. Кирейчева, О. Б. Хохлова – М.: Рома, 1998. – 124 с.
74. Кирейчева, Л. В. Зольный состав различных фракций органического вещества сапропеля / Л. В. Кирейчева, О. Б. Хохлова // Почвоведение. – 2000. – № 9. – С. 1983-1985.
75. Кирейчева, Л. В. Элементный состав гуминовых веществ сапропелевых отложений / Л. В. Кирейчева, О. Б. Хохлова // Вестник РАСХН. – 2000. – №4. – С. 59-62.
76. Ковалева, Е. И. Оценка антропогенного воздействия на болотные экосистемы в районах нефтедобычи // Материалы VIII Всероссийской с международным участием научной школы «Болота и биосфера». – Томск: ТГПУ. – 2012. – С. 196-201.
77. Ковалевский, Д. В. Выбор условий регистрации количественных ^{13}C ЯМР - спектров гумусовых кислот / Д. В. Ковалевский, А. Б. Пермин, И. В. Перминова, В. С. Петросян // Вестн. МГУ. Сер. 2. Химия – 2000. – Т. 41. – № 1. – С. 39-43.
78. Ковалевский, Д. В. Исследование структуры гуминовых методами спектроскопии ЯМР ^1H и ^{13}C : дис.... канд. хим. наук. – М. 1998. – 140 с.
79. Ковтун, А. И. Потенциометрическое титрование солей гуминовых кислот / А. И. Ковтун, С. Л. Хилько, В. И. Рыбаченко // Наукові праці Донецького національного технічного університету. Серія: Хімія і хімічна технологія. – 2010. – Вип. 15 (163). – С. 15-20.
80. Комиссаров, И. Д. Гуминовые препараты / И. Д. Комиссаров // Тюмень, 1974. – 267 с.
81. Комиссаров, И. Д. Молекулярная структура и реакционная способность ГК / И. Д. Комиссаров, Л. Ф. Логинов // Гуминовые вещества в биосфере. – М., 1993. – С. 36-45.
82. Комиссаров, И. Д. Химическая природа и биологическое действие гуминовых кислот // Изучение и хозяйственное использование торфяных и сапропелевых ресурсов. – Тюмень, 2006. – С. 315-321.

83. Кононова, М. М. Органическое вещество почвы. Его природа, свойства и методы изучения / М. М. Кононова – М.: Изд-во АН СССР, 1963. – 314 с.
84. Косов, В. И. Сапропель. Ресурсы, технологии, геоэкология / В. И. Косов. – СПб.: Наука. – 2007. – 224 с.
85. Красницкий, В. М. Качественная оценка сапропелевого сырья Омской области / В. М. Красницкий, Г. Д. Аверина // Материалы научно- практической конференции "Сапропель и продукты его переработки". – Омск, ОмГАУ, 4-5 декабря 2008 г. – С. 12-14.
86. Кривонос, О. И. Исследование продуктов термической переработки сапропелей Омской области / О. И. Кривонос, Г. В. Плаксин, И. А. Савченко и др. // Омский научный вестник. Серия «Актуальные проблемы лекарствоведения». – 2006. – №3 (37). – С. 168-174.
87. Кудярова, А. Ю. Об информативности электронных спектров гумусовых веществ // Почвоведение. – 2001. – № 11. – С. 1323-1331.
88. Куликова, Н. А. Современные подходы к исследованию биологической активности гуминовых веществ / Н. А. Куликова, О. И. Филиппова, Д. П. Аброськин, О. И. Кляйн // Биодиагностика в экологической оценке почв и сопредельных сред: Тезисы докладов Международной конференции – М.: БИНОМ. Лаборатория знаний. – 2013. – С. 116 - 119.
89. Кухаренко, Т. А. Об определении понятия и классификации гуминовых кислот / Т. А. Кухаренко // Химия твёрдого топлива. – 1979. – №5. – С. 3-11.
90. Кухаренко, Т. А. О молекулярной структуре ГС / Т. А. Кухаренко // Гуминовые вещества в биосфере. – М., 1993. – С. 27-35.
91. Ларгина, И. Ф. Геология сапропелевых отложений / И. Ф. Ларгин, Н. И. Шадрин // КПИ. Калинин. – 1989. – С. 86.
92. Лебедева, Г. Ф. Химическая модификация торфяных гуминовых кислот с целью повышения их биологической активности / Г. Ф. Лебедева, Т. А. Яркова, В. В. Платонов, В. А. Проскуряков // ЖПХ. – 2005. – Т. 78. – Вып. 5. – С. 870-872.
93. Лиштван, И. И. Проблемы комплексного использования торфа и сапропеля. /

- И. И. Лиштван // Материалы шестой научной школы «Болота и биосфера». – Томск: ЦНТИ. – 2007. – С. 98-108.
94. Лиштван, И. И. Новые принципы моделирования структуры гуминовых кислот / И. И. Лиштван, В. П. Стригуцкий, Н. Н. Бамбалов, Б. И. Лиогонький, Л. С. Любченко // Вести АН БССР. Серия химических наук. – Мн. – 1990. – № 4. – С. 7-10.
95. Лиштван, И. И. Гуминовые кислоты торфа и препараты на их основе / И. И. Лиштван, Ф. Н. Капуцкий, Ю. Г. Янута и др. // Природопользование. – 2004. – Вып. 10. – С. 114-119.
96. Лиштван, И. И. Спектральные исследования фракций гуминовых кислот / И. И. Лиштван, Ф. Н. Капуцкий, Ю. Г. Янута и др. // Химия твердого топлива. – 2006. – № 4. – С. 3-11.
97. Лиштван, И. И. Взаимодействие гуминовых кислот с ионами металлов и структура металлгуминовых комплексов / И. И. Лиштван, Ф. Н. Капуцкий, Ю. Г. Янута и др. // Вестник БГУ. – 2012. – Сер. 2. № 2. – С. 12-16.
98. Лиштван, И. И. Фракционирование гуминовых кислот как метод получения стандартизованных гуминовых материалов / И. И. Лиштван, Ф. Н. Капуцкий, А. М. Абрамец, Ю. Г. Янута, Г. С. Мониц, В. Н. Алейникова, Н. С. Глухова // Вестник БГУ. – 2012. – Сер. 2. № 2. – С. 7-11.
99. Лободин, К. А. Лигфол для коррекции воспроизводительной функции коров / К. А. Лободин, А. Г. Нежданов, В. С. Бузлама // Ветеринария. – 2006. – № 3. – С. 39-44.
100. Лунева, А. С. Гумусное состояние и коллоидно-химические свойства гуминовых веществ почв Европейской части СНГ, развитых на карбонатных породах: дис. ...канд. с.-х. наук / А. С. Лунева. – СПб. Пушкин. – 2005. – 221с.
101. Майоров, Ф. А. Лазерно-индуцированная флуоресценция органических примесей в питьевой воде / Ф. А. Майоров, Ю. П. Мешалкин, Ю. А. Политова // Оптика атм. и океана. – 2000. – Т. 13. – № 10. – С. 914–917.
102. Мартынова, Н. А. Химия почв: органическое вещество почв: учеб.-метод.

- пособие / Н. А. Мартынова. – Иркутск: Изд-во ИГУ – 2011. – 255 с.
103. Марыганова, В. В. Воздействие вида экстрагента на структуру извлекаемых из торфа гуминовых кислот / В. В. Марыганова, Н. Н. Бамбалов, С. В. Пармон // Химия твердого топлива. – 2003. – № 1. – С. 3–10.
104. Марыганова, В. В. Исследование структуры гуминовых и фульвокислот методом ^{13}C -ЯМР - спектроскопии / В. В. Марыганова, Н. Н. Бамбалов, В. П. Стригуцкий, С. В. Рыков // Доклады НАН Беларуси. Серия Химических Наук. – 1994. – Т. 38. – № 4. – С. 52-55.
105. Марыганова, В. В. Особенности химического состава и структуры гуминовых кислот, выделенных последовательной экстракцией пирофосфатом и гидроксидом натрия / В. В. Марыганова, Н. Н. Бамбалов, Л. Ю. Тычинская // Химия твердого топлива. – 2006. – № 3. – С 3-11.
106. Медик, В. А. Руководство по статистике в медицине и биологии. В 2-х томах / В. А. Медик, М. С. Токмачев, Б. Б. Фишман // Под ред. проф. Ю. М. Комарова. Т. 1. Теоретическая статистика. – М.: Медицина, 2000. – 412 с.
107. Метод предварительной оценки физиологической активности гуминовых и гуминоподобных веществ / В. В. Платонов [и др.] // Вестник новых медицинских технологий. – 2010. – № 3. – С. 26-28.
108. Москаленко, Т. В. Структурные превращения гуминовых кислот торфов при экстрагирования под действием магнитного и ультразвуковых полей / В. А. Михеев, О. С. Данилов // Химия растительного сырья. – 2011. – № 4 – С. 283-286.
109. Наумова, Г. В. Новые гуминовые препараты фунгицидного и бактерицидного действия на основе торфа / Г. В. Наумова [и др.] // Гуминовые вещества в биосфере: Тр. 4-ой Всероссийской конф.: М. – 2007. – С. 497–502.
110. Наумова, Г. В. Связь молекулярной структуры гуминовых кислот и их биологической активности / Г. В. Наумова, В. П. Стригуцкий, Н. А. Жмакова, Т. Ф. Овчинникова. // Химия твёрдого топлива. – 2001. – № 2. – С. 3-13.
111. Наумова, Г. В. Изменение биологической активности гуминовых кислот при их окислительно-гидролитической деструкции / Г. В. Наумова, Т. Ф.

- Овчинникова, Н. А. Жмакова, Н. Л. Макарова // Природопользование. – 2001. – вып. 7. – С. 123-125.
112. Новикова, Л. Н. Структурные особенности и биологическая активность гуминовых кислот углей / Л. Н. Новикова, Т. Е. Чеченина, Ю. Н. Яковлева и др. // Почвоведение. – 2001. – № 3. – С. 333-337.
113. Ноздрунова, А. А. Химический состав и окислительные свойства жидких продуктов термической переработки сапропелей / А. А. Ноздрунова // Химия растительного сырья. – 2008. – № 4. – С. 141-146.
114. Орлов, Д. С. Гуминовые вещества в биосфере // Соровский образовательный журнал. – 1997. – № 2. – С. 56-63.
115. Орлов, Д. С. ИК-спектры поглощенных гуминовых кислот / Д. С. Орлов, О. Н. Розанова, С. Г. Матюхина // Почвоведение. – 1962. – №1. – С. 17-25.
116. Орлов, Д. С. Инфракрасные спектры почв и почвенных компонентов. / Д. С. Орлов, Н. Н. Осипова. – М.: МГУ, 1988. – 89 с.
117. Орлов, Д. С. Гумусовые кислоты почв и общая теория гумификации / Д. С. Орлов. – М.: МГУ, 1990. – 325 с.
118. Орлов, Д. С. Степень бензоидности гуминовых кислот и способ ее определения / Д. С. Орлов, В. А. Барановская, А. А. Околелова // Доклады АН СССР. – М., 1987. Т. 293. – № 6. – С. 1479.
119. Орлов, Д. С. Свойства и функции гуминовых веществ / Д. С. Орлов // Гуминовые вещества в биосфере. – М., 1993. – С. 16-27.
120. Орлов, Д. С. Влияние молекулярных параметров ГК на их физиологическую активность / Д. С. Орлов, В. В. Дёмин, Ю. А. Завгородняя // Доклады РАН. – 1997. – т. 354. – № 6. – С. 843-845.
121. Орлов, Д. С. Химия почв / Д. С. Орлов, Л. К. Садовникова, Н. И. Суханова // М.: Высшая школа, 2005. – 561 с.
122. ОСТ 42 -506 96. Стандарт отрасли. Порядок разработки, согласования и утверждения нормативной документации на лекарственные средства и лекарственное растительное сырье. – М., 1996. – 49 с.
123. ОСТ 42-3-84. Лекарственные средства. Порядок установления сроков,

- годности. – М.: Издательство стандартов, 1984. – 48 с.
124. ОСТ 91.500.05.001-00. Стандарты качества лекарственных средств. Основные положения. – М., 2000. – 65 с.
125. ОФС 42-0013-03. Правила приемки лекарственного растительного сырья и методы отбора проб / Гос. инспекция за качеством лекарств, средств и изделий мед. техники. Взамен ГФ XI, вып 1, стр. 267; Введ. 16.06.2003 до 16.06.2008. – Б.м., [б.г.] – 15 с.
126. Основные итоги медико-биологического тестирования “Гумивита” как биологически активной добавки к пище / Владивостокский государственный медицинский университет; рук. Петров В. А. – Владивосток. – 2000. – 13 с.
127. Оценка генотоксических свойств методом ДНК-комет in vitro. Методические рекомендации. // М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора. – 2010. – 15 с.
128. Патент 2144674. РФ Сирота Т. В. G01N33/52 Способ определения антиоксидантной активности супероксиддисмутазы и химических соединений / Т. В. Сирота №99103192/14: заявл. 24.02.1999; опубл. 20.01.2000. – 8 с.
129. Панкратова, К. Г. Использование диффузной отражательной ИК-спектроскопии для экспрессной оценки содержания гуминовых кислот в гуминовых препаратах / К. Г. Панкратова, В. И. Щелоков, Ю. Г. Сазонов // Агрохимия. – 2005. – №7. – С. 77-86.
130. Пацаева, С. В. Влияние температуры и УФ излучения на спектрально-люминесцентные характеристики растворенного органического вещества / С. В. Пацаева, В. В. Фадеев, Е. М. Филиппова, В. В. Чубаров // Вестник Московского университета. – 1991. – Т. 32, вып. 6. – С. 71-75.
131. Перминова, И. В. Анализ, классификация и прогноз свойств гумусовых кислот: дис...док. хим. наук / И. В. Перминова. – М., 2000. – 359 с.
132. Перминова, И. В. Гуминовые вещества – вызов химикам XXI века // Химия и жизнь. – 2008. – № 1. – С. 50 – 56.
133. Петренко, Д. Б. Модифицированный метод Боэма для определения

- гидроксильных групп в углеродных нанотрубках / Д. Б. Петренко // Электронный журнал «Вестник Московского государственного областного университета». – 2012. – Вып. 1 – Химия. – С. 157-160. [сайт]. URL: <http://www.evestnik-mgou.ru> (дата обращения 05.03.2014).
134. Плаксин, Г. В. Использование сапропелей и продуктов их переработки в различных отраслях экономики. / Г. В. Плаксин, А. К. Чернышев, В. И. Зайнчковский, В. А. Левицкий и др. // Материалы VIII Всероссийской с международным участием научной школы «Болота и биосфера». Томск: ТГПУ. – 2012. – С. 104-109.
135. Плаксин, Г. В. Сапропель, как источник химических продуктов / Г. В. Плаксин, В. А. Лихолобов, О. И. Кривонос // Материалы международной научно-практ. конфер. «Сапропель и продукты его переработки». Омск: ОмГАУ. – 2008. – С. 5-7.
136. Платонов, В. В. Особенности химического состава и биологическая активность сапропелей / В. В. Платонов, О. С. Половецкая // Вестник новых медицинских технологий – 2012 – N 1. – <http://medtsu.tula.ru/VNMT/Bulletin/E2012-1/4066.pdf> (дата обращения 25.03.2014).
137. Подтероб, А. П. Некоторые характеристики торфяных гумусовых кислот месторождения «Гумановщина» / А. П. Подтероб // Вестник БГУ. Серия 2. – 2011. – № 1. – С. 23-29.
138. Попов, А. И. Гуминовые вещества: свойства, строение, образование / А. И. Попов – СПб.: Изд-во С.-Петербур. ун-та, 2004. – 248 с.
139. Потапова, И. А. Выделение и исследование токсических и терапевтических свойств солей гуминовых кислот и возможности применения их как пищевой добавки / И. А. Потапова, Е. В. Бурова, П. П. Пурыгин // Башкирский химический журнал. «Коршуновские чтения». – 2012. – Том 19. – № 5.
140. Приказ МЗ СССР № 1045-73 от 6.04.1973 г. «Санитарные правила по устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев)».

141. Прутенская, Е. А. Микробиологическая конверсия растительных отходов в гуминовые вещества: автореф. дис. ...канд. биол. наук / Е. А. Прутенская – Москва – 2008. – 19 с.
142. Пурыгин, П. П. Гуминовые кислоты: их выделение, структура и применение в биологии, химии и медицине. / П. П. Пурыгин, И. А. Потапова, Д. В. Воробьев // Самарский государственный медицинский университет [Электронный ресурс]. Режим доступа: <http://www.sworld.com.ua/simpoz3/92.pdf> открытый (дата обращения 23.03.2014).
143. Пушкарева, Т. А. Сапропели озер Сибири для курортно – рекреационных целей / Т. А. Пушкарева, Т. М. Тронова, Н. Г. Клопотова, М. Г. Бородин // Материалы VII Всероссийской с международным участием научной школы «Болота и биосфера». Томск: ТГПУ. – 2010. – С. 223-228.
144. Регистр лекарственных средств России: энциклопедия лекарств. / ред. Г. Л. Вышковского. – М.: РЛС-МЕДИА, 2014. – 22-е изд. – 1368 с.
145. Результаты кооперированного клинического изучения препарата олипифат у больных диссеминированной меланомой и раком почки / М. Б. Бычков [и др.] // Российский биотерапевтический журнал. – 2007. – Т. 6, № 1. – С. 29 - 35.
146. Ришар, К. Роль фракционирования при изучении фотохимических свойств гумусовых веществ / К. Ришар, Ж. Гийо, Ж.-П Агуер и др. // Рос. хим. ж. – 2008. – т. LI. – № 1. – С. 107-113.
147. Руководство по валидации методик анализа лекарственных средств / под ред. Н. В. Юргеля [и др.]; Разработчики В. Л. Багирова [и др.]. – М.: Фармацевтическая промышленность, 2007. – 58 с.
148. Руководство по инструментальным методам исследований при разработке и экспертизе качества лекарственных препаратов / Под ред. Быковского С. Н., проф., д.х.н. Василенко И. А., к.м.н. Харченко М. И. и др. – М. Изд-во Перо, 2014. – 656 с.:ил.
149. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных

- средств. Часть первая / Под ред. А. Н. Миронова. – М.: Гриф и К, 2012. — 944 с.
150. Руководство по статистике в медицине и биологии. В 2-х томах / Под ред. Ю. М. Комарова. Т. 1. Теоретическая статистика. М.: Медицина, 2000. – 412 с.
151. Руководство по стандартизации лекарственных средств / Под ред. Р. У. Хабриева, В. Л. Багировой, В. Б. Герасимова. – М.: Медицина, 2006. – 352 с.
152. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ / Под общей редакцией член-корр. РАМН, проф. Р.У. Хабриева. 2-изд., перераб и доп. – М.: ОАО Изд-во «Медицина», 2005. – 832 с.
153. Ряднов, А. А. Влияние «Лигфола» при разных сроках его введения до отъема на гуморальные неспецифические факторы защиты поросят - отъемышей / А. А. Ряднов, Е. В. Петухова, В. В. Саломатин // Сборник докладов «Итоги и перспективы применения гуминовых препаратов в продуктивном животноводстве, коневодстве и птицеводстве». – Москва. – 2006. – С. 43-47.
154. Савченко, И. А. Спектроскопическое исследование гуминовых веществ сапропеля Омского Прииртышья / И. А. Савченко, И. Н. Корнеева, Е. А. Лукша // Омский научный вестник. Серия «Ресурсы земли. Человек». – 2012. – № 2 (114). – С. 56-60.
155. Савченко, И. А. Изменение свойств гуминовых веществ под воздействием УФ-света / И. А. Савченко, И. Н. Корнеева, Г. В. Плаксин, Е. А. Лукша, Д. С. Гончаров // Фундаментальные исследования. – 2013. – №10. Ч. 12. – С. 2705-2709.
156. Савченко, И. А. Новый подход к решению проблемы стандартизации гуминовых кислот / И. А. Савченко, И. Н. Корнеева, Г. В. Плаксин, Е. А. Лукша, Д. С. Гончаров // Современные проблемы науки и образования. – 2013. – № 3; URL: www.science-education.ru/109-9305. (дата обращения: 08.03.2014).
157. Савченко, И. А. Изучение общетоксического действия гуминовых веществ озерного сапропеля / И. А. Савченко, И. Н. Корнеева, Е. А. Лукша //

- Сибирский медицинский журнал (Иркутск). – 2014. – № 2. – С. 75-78.
158. Санитарные правила и нормативы СанПиН 2.6.1.2523-09 «Нормы радиационной безопасности НРБ-99/2009» (утв. постановлением Главного государственного санитарного врача РФ от 7 июля 2009 г. № 47).
159. Саловарова, В. П. Введение в биохимическую экологию. / В. П. Саловарова, А. А. Приставка, О. А. Берсенева // Иркутск: Изд-во Иркут. гос. ун-та. – 2007. – С.160.
160. Саратиков, А. С. Новые гепатопротективные и противовоспалительные препараты пелоидов / А. С. Саратиков, В. Н. Буркова, А. И. Венгеровский, Е. А. Кураколова. – Томск: Изд-во Том. ун-та. – 2004. – 178 с.
161. Сартаков, М. П. Спектроскопия ЯМР ^{13}C гуминовых кислот торфов среднего Приобья / М. П. Сартаков // Химия растительного сырья. – 2008. – № 3. – С. 135-139.
162. Сартаков, М. П. Адсорбционная способность гуминовых кислот торфов среднего Приобья / М. П. Сартаков // Вестник Алтайского государственного аграрного университета. – 2011. – № 4 (78). – С. 60-64.
163. Сенькевич, Л. П. Особенности образования и структуры гуминовых кислот сапропелей различного генезиса. / Л. П. Сенькевич, Б. В. Курзо, В. В. Кухарчик, З. М. Фролова // Химия твердого тела. – 1996. – № 5. – С. 19-25.
164. Сильверстейн, Р. Спектрометрическая идентификация органических соединений / Р. Сильверстейн, Ф. Вебстер, Д. Кимл. – М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2011. – 557 с.
165. Сифоркина, Л. Н. Целебные свойства Плахинской грязи / Л. Н. Сифоркина // Вестник Мединфо. – 2006. – № 59. – С. 8-9.
166. Скальный, А. В. Микроэлементы для вашего здоровья / А. В. Скальный. – 2-е изд., испр. и доп. – М.: издательский дом «ОНИКС 21 век», 2004. – 320 с.
167. Смагунова, А. Н. Методы математической статистики в аналитической химии / А. Н. Смагунова, О. М. Карпукова. Ростов-на-Дону: Феникс, 2012. – 352 с.
168. Смирнов, А. Д. «Сорбционная очистка воды» / А. Д. Смирнов // Л.: Химия,

1982. – 168 с.
169. Смирнова, Ю. В. Механизм действия и функции гуминовых препаратов / Ю. В. Смирнова, В. С. Виноградова // *Агрохимический вестник*. – 2004. – №1. – С. 22-23.
170. Соколова, И. В. Влияние гуминовых кислот на фотопроцессы в водных средах / И. В. Соколова, О. Н. Чайковская // *Вестник ТГПУ*. – 2008. – № 4. – С. 42-46.
171. Соколова, И. В. Флуоресцентные и фотохимические свойства гуминовых кислот / И. В. Соколова, О. Н. Чайковская // *Оптика атмосф. и океана*. – 2006. – Т. 19. – № 2–3. – С. 244-247.
172. Способ определения антиоксидантной активности супероксиддисмутазы и химических соединений: пат. 2144674 Рос. Федерация. № 99103192/14; заявл. 24.02.1999; опубл. 20.01.2000. 4с.
173. Стеклов, Н. А. О генетической классификации сапропелей / Н. А. Стеклов, Е. Д. Ильина // *Проблемы использования сапропелей в народном хозяйстве*. – Минск: Наука и техника, 1976. – С. 63-73.
174. Степанов, А. А. Применение ЯМР спектроскопии для характеристики гуминовых веществ / А. А. Степанов, Л. В. Жаркова, Е. А. Степанова // *Почвоведение*. – 1997. – № 2. – С. 173-177.
175. Степанова, Е. А. Характеристика гуминовых кислот сапропелей / Е. А. Степанова, Д. С. Орлов // *Почвоведение*. – 1996. – № 10. – С. 1186-1191.
176. Степченко, Л. М. Использование гуминовых препаратов из торфа в сельском хозяйстве: состояние проблемы и перспективы развития / Л. М. Степченко // *Материалы V Научной школы «Болото и биосфера»*. – Томск. – 2006. – С. 119-125.
177. Стом, Д. И. Возможные механизмы биологического действия гуминовых веществ / Д. И. Стом [и др.] // *Сибирский медицинский журнал*. – 2008. – №6. – С. 76-79.
178. Стригуцкий, В. П. Исследование структуры гуминовых кислот методом нелинейной ЭПР-спектроскопии / В. П. Стригуцкий, Ю. Ю. Навоша, Т. П.

- Смычник, Н. Н. Бамбалов // Почвоведение. – 1992. – № 1. – С. 147-151.
179. Стригуцкий, В. П. Подобие структур ароматического ядра нативного гуминового комплекса и препаратов гуминовых кислот / В. П. Стригуцкий, Н. Н. Бамбалов, С. Г. Прохоров // Химия твёрдого топлива. – 1996. – № 6. – С. 29-32.
180. Сухих, А. С. Эпоксимодифицированные полисахаридные гели в химии гуминовых, гуминоподобных веществ и препаратов на их основе. Дисс. ... канд. фарм. наук: 15.00.02 / А. С. Сухих – Кемерово, 2007. – 151 с.
181. Сухих, А. С. Перспективы применения гуминовых и гуминоподобных кислот в медицине и фармации / А. С. Сухих, П. В. Кузнецов // Медицина в Кузбассе. – 2009. – № 1. – С. 10-14.
182. Тюнина, М. А. Влияние вибромагнитного воздействия на выход и состав гидрофильных и липофильных биологически активных веществ из сапропеля / М. А. Тюнина, К. А. Дычко, Г. Л. Рыжова // Химия растительного сырья. – 2012. – № 2. – С. 155–163.
183. Уразова, Т. С. Модификация структуры гуминовых кислот в процессе механохимической обработки бурого угля / Т. С. Уразова, А. Л. Бычков, О. И. Ломовский // Сборник научных трудов II Всероссийской научно-технической конференции молодых ученых, аспирантов и студентов с международным участием «Высокие технологии в современной науке и технике» ВТСНТ – Томск. – 2013. – С. 141-143.
184. Фёдорова, Т. Е. ЯМР-спектроскопия гуминовых кислот различного происхождения / Т. Е. Фёдорова, Д. Ф. Кушнарёв, Н. В. Вашукевич и др. // Почвоведение. – 2003. – № 10. – С. 1213-1217.
185. Федько, И. В. К вопросу об использовании биологически активных гуминовых в медицине / И. В. Федько, М. В. Гостищева, Р. Р. Исмадова // Химия растительного сырья. – 2005. – № 1. – С. 49–52.
186. Филов, В. А. Новый отечественный многофункциональный препарат Олипифат (Лигфол) / В. А. Филов, А. М. Беркович // Бюллетень международной научной хирургической ассоциации. – 2006.– Т. 1. – № 2.

187. Флуоресценция наночастиц растворенного органического вещества в природной воде / А. С. Милюков [и др.] // Вестник Московского университета. – 2007. – № 6. – С. 34-38.
188. ФСП 42-0306-7709-06 Уголь активированный. – 2006. – 6 с.
189. Хасанова, С. Р. Сравнительное изучение антиоксидантной активности растительных сборов / С. Р. Хасанова, Т. И. Плеханова, Д. Т. Гашимова и др // Вестник ВГУ. Серия: Химия. Биология. Фармация. – 2007. – № 1. – С. 163-166.
190. Холодов, В. А. Строение гуминовых кислот, извлекаемых в ходе последовательной щелочной экстракции из чернозема / В. А. Холодов, А. И. Константинов, Е. Ю. Беляева, Н. А. Куликова, А. В. Кирюшин, И. В. Перминова // Почвоведение. – 2009. – № 10. – С. 1177–1183.
191. Холодов, В. А. Строение гуминовых кислот почв зонального ряда по данным спектроскопии ЯМР ^{13}C / В. А. Холодов, А. И. Константинов, А. В. Кудрявцев, И. В. Перминова // Почвоведение. – 2011. – № 9. – С. 1064–1073.
192. Чухарева, Н. В. Исследование кинетики термически активированных изменений состава и свойств торфяных гуминовых кислот / Н. В. Чухарева, Л. В. Шишмина // Известия Томского политехнического университета. 2005. – Т. 308. – № 4. – С. 116-122.
193. Шарипкина, А. Я. Профилактическое действие гумата натрия при интоксикации организма крыс четыреххлористым углеродом / А. Я. Шарипкина, В. П. Колотенко // Гуминовые удобрения. Теория и практика их применения: Тр. ДСХИ. – Днепропетровск, 1983. – Т. 9. – С. 131-134.
194. Шарова, Л. Г. Показатели неспецифической резистентности бычков при введении в рацион гумата натрия / Л. Г. Шарова // Аграрная наука. – 2003. – № 3. – С 25-26.
195. Шмаков, П. Ф. Сапропелевые ресурсы озер Омской области и их рациональное использование / П. Ф. Шмаков, А. Г. Третьяков, В. А. Левицкий // Кормовые ресурсы Западной Сибири и их рациональное использование: материалы науч. конф. Омск. – 2005. – С. 51–70.

196. Шмаков, П. Ф. Химический состав и некоторые свойства сапропелей озёр Омской области / П. Ф. Шмаков, Г. В. Плаксин, В. А. Левицкий // *Материалы международной научно-практ. конфер. «Сапропель и продукты его переработки»*. Омск: ОмГАУ. – 2008. – С. 69-75.
197. Шмаков, П. Ф. Сапропель – природный дар регионов Западной Сибири / П. Ф. Шмаков, А. Г. Третьяков, В. А. Левицкий // *Материалы международной научно-практ. конфер. «Сапропель и продукты его переработки»*. Омск: ОмГАУ. – 2008. – С. 61-68.
198. Шпынова, Н. В. Спектральные характеристики гуминовых кислот органогенных отложений Обь – Иртышского Междуречья / Н. В. Шпынова, М. П. Сартаков // *Вестник Югорского государственного университета* – 2010 г. – Выпуск 4 (19). – С. 88-91.
199. Этическая экспертиза биомедицинских исследований: Практические рекомендации / Под ред. Ю. Б. Белоусова. – М., 2005. – 156 с.
200. Юбицкая, Н. С. Гумат натрия в лечении больных остеоартрозом / Н. С. Юбицкая, Е. М. Иванов // *Вопросы курортологии, физиотерапии и лечебной физкультуры*. – 1999. – № 5. – С. 22-24.
201. Юдина, Н. В. Структурные особенности гуминовых кислот торфов, выделенных разными способами / Н. В. Юдина, В. И. Тихова // *Химия растительного сырья*. – 2003. – № 1. – С. 93–96.
202. Юдина, Н. В. Параметры оценки биологической активности органического вещества сапропелей/ Н. В. Юдина, С. И. Писарева, А. С. Саратиков // *Химия растительного сырья*. – 1998. – № 4. – С. 29–32.
203. Юдина, Н. В. Оценка биологической активности гуминовых кислот торфов / Н. В. Юдина, С. И. Писарева, А. С. Саратиков // *Химия твёрдого топлива*. – 1996. – № 5. – С. 31-34.
204. Юдина, Н. В. Механохимическая активация как способ получения из торфа высокоэффективных препаратов стимулирующего действия // *Материалы пятой научной школы «Болота и биосфера»*. – Томск. – 2006. – С. 81-87.
205. Якименко, О. С. Фульвокислоты и фульвокислотная фракция гумуса:

- природа, свойства и методы выделения. Аналитический обзор / О. С. Якименко // Почвоведение. – 2001. – № 12. – С. 1448-1459.
206. Якименко, О. С. Гуминовые препараты и оценка их биологической активности для целей сертификации / О. С. Якименко, В. А. Терехова // Почвоведение – 2011. – № 11. – С. 1334-1343.
207. Янута, Ю. Г. Получение и регулирование свойств сорбционных материалов на основе гуминовых веществ торфа: автореф. дис. ... канд. техн. наук: 05.17.07 / Ю. Г. Янута. – Минск, 2006. – 19 с.
208. Abraham, R. J. Proton and Carbon-13 NMR spectroscopy / R. J. Abraham, P. Loftus. – London: Heyden, 1978. – 230 p.
209. Achard, F. Chemische Untersuchung des Torfes / F. Achard // Grell's-chem. Ann, 1786. – Bd. 2. – 391 p.
210. Adani, F. Compost effect on soil humic acid: NMR study / F. Adani, P. Genevini, F. Tambone, E. Montoneri // Chemosphere. – 2006. – Vol. 65. – P. 1414-1418.
211. Alegret, S. Characterization of fulvic acids from acid soils from Catalonia / S. Alegret, R. Alio, E. Casassas // Agrochimica. – 1989. – Vol. 33. – № 1-2. – P. 31-40.
212. Altleri, F. DNA damage and repair: from molecular mechanisms to health implications / F. Altleri, C. Grillo, M. Macerony et. al. // Antioxid Redox Signal. – 2008. – № 10 (5). – P. 891-937.
213. Analytical separation and detection methods for flavonoids / E. de Rijke [et al.] // J. Chromatogr A. – 2006. – Vol. 1112, Issues 1–2. – P. 31-63.
214. Andre, C. Construction and evaluation of a humic acid column: implication for pesticide risk assessment/ C. Andre, T. T. Truong, M. Robert // Anal. Chem. – 2005. – V. 77. – pp. 4201- 4206.
215. Avvakumova, N. P. Structural components and biological activity among humic substances of low-mineralized silt sulphide muds / N. P. Avvakumova, A. V. Zhdanova // International humic substances society “From molecular understanding to innovative applications of humic substances”. – Moscow-St. Peterburg. – 2008. – P. 100-104.

216. Baes, A. U. Fulvic acid ultraviolet-visible spectra: influence of solvent and pH / A. U. Baes, P. R. Bloom // *Soil. Sci. Soc. Acoer. J.* – 1990. – Vol. 54. – № 5. – P. 1248-1254.
217. Boehm, H. P. Chemical identification of surface groups / H. P. Boehm // *Advances in catalysis and related subjects.* – 1966. – № 16. – P. 197–274.
218. Boehm, H. P. Surface oxides on carbon and their analysis: a critical assessment / H. P. Boehm // *Carbon.* – 2002. – V. 40. – P. 145–149.
219. Bollag, J.-M. Detoxification of aquatic and terrestrial sites through binding of pollutants to humic substances / J.-M. Bollag, K. Mayers // *Sci. Total Environ* – 1992. – V. 117/118. – P. 357-366.
220. Choudhry, G. G. Interaction of Humic Substances with Environmental Chemistry / G. G. Choudhry // *The Handbook of Environmental Chemistry. V. 2. Part B. Reactions and Processes* (Vol. Ed. O. Hutzinger). Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, 1982. – P. 103–128.
221. Christian, E. W. *Ecology of Humic Substances in Freshwaters* / E. W. Christian. – Springer, 2003. – 332 p.
222. Conte, P. State of the art of CPMAS ¹³C NMR spectroscopy applied to natural organic matter / P. Conte, R. Spaccini, A. Piccolo // *Progr. Nucl. Magn. Res. Spect.* – 2004. – № 44. – P. 215–223.
223. Davis, C. C. Implications of aqueous silica sorption to iron hydroxide mobilization of iron colloids and interference with sorption of arsenate and humic substances / C. C. Davis, W. R. Knocke, M. Edwards // *Environ. Sci. Technol.* – 2001. – V. 1. – № 35 (15). – P. 3158-3162.
224. Evangelista, S. The effect of structure and a secondary carbon source on the microbial degradation of chlorophenoxy acids / S. Evangelista, D. G. Cooper, V. Yargeau // *Chemosphere.* – 2010. – V. 79. – P. 1084–1088.
225. Flaig, W. Humic substances and associated small molecules from peats in balneology. International humic substances society / W. Flaig. – Nagoya, 1990. – 226 p.
226. Goertzen, S. L. Standardization of the Boehm titration. Part I. CO₂ expulsion and

- endpoint determination / S. L. Goertzen, K. D. Theriault, A. M. Oickle // *Carbon*. – 2010. – V. 48. – P. 256-259.
227. Gondal, M. A. Laser photo-oxidative degradation of 4,6-dimethyldibenzothiophene / M. A. Gondal, H. M. Masoudi, J. Pola. // *Chemosphere*. – 2008. – V. 71. – № 9. – P. 1765–1768.
228. Hayes, M. H. B. Adsorption of triazine herbicides on soil organic matter, including a short review on soil organic matter chemistry. / M. H. B. Hayes // *Residue Rev.* 1970. – V. 32. – P. 131-174.
229. Helbig, B. Anti-herpes simplex virus type 1 activity of humic acids-like polymers and their o-phenolic starting compounds / B. Helbig, R. Klocking, P. Wutzler // *Antiviral chemical Chemotherapy*. – 1997. – № 8. – pp. 265-273.
230. Hertkorn, N. Comparative analysis of partial structures of a peat humic and fulvic acid using one and two dimensional nuclear magnetic resonance spectroscopy / N. Hertkorn, A. B. Permin, I. V. Perminova, D. V. Kovalevskii, M. V. Yudov, A. Kettrup // *J. Environ. Qual.* – 2002. – V. 31. – P. 375–387.
231. Huber, L. Validation of analytical Methods: Review and Strategy, LC-GC 1997-1, Version February 21 / L. Huber // *BioPharm.* – 1999. – Vol. 12. – P. 64-66.
232. Kholodov, V. Structure of humic acids in zonal soils from c-13 nmr data / V. Kholodov, A. Konstantinov, A. Kudryavtsev, I. Perminova // *Eurasian Soil Science*. – 2011. – V. 44. – № 9. – P. 976-983.
233. Klocking, R. Anti HSV-1 activity of synthetic humic acids-like polymers derived from p-diphenolic starting compounds / R. Klocking // *Antiviral chemical Chemotherapy*. – 2002. – № 13. – pp. 241-249.
234. Klocking, H.-P. In vitro toxicological study on combinations of humic acids with surfactants / H.-P. Klocking, R. Junek, M. Mechler, Ju. Schenherr, R. Klocking // *Proceedings of the 13th International Humic Substances Society «Humic Substances - Linking Structure to Functions»*. Band 45-1. – Karlsruhe, Germany. – 2006. – pp. 393-396.
235. Klocking, R. The antiviral potency of humic substances / R. Klocking, B. Helbig, Ju. Porschmann, P. Wutzler // *Proceedings of the 13th International Humic*

- Substances Society «Humic Substances - Linking Structure to Functions». Band 45-1. – Karlsruhe, Germany. – 2006. – pp. 397-400.
236. Klöcking, R. Medical aspects and applications of humic substances / R. Klöcking, B. Helbig // Biopolymers for medical and pharmaceutical applications. – 2005. – pp. 3-16.
237. Komissarov, L. P. The present day knowledge of physical and chemical properties of peat humic acids / L. P. Komissarov, L. F. Loginov // 10th International Peat Congress. – Stuttgart. – 1996. – Vol. 2. – pp. 52-59.
238. Kopinke, F. D. Sorption of organic pollutants on anthropogenic humic matter / F. D. Kopinke, J. Porschman, U. Stottmeister // Environ. Sci. Technol. – 1995. – V.29. – p. 941-950.
239. Kulovaara, M. Impact of radiation on aquatic humic substances / M. Kulovaara, P. Corin, P. Backlund // Chemosphere. – 1996. – V. 33. – P. 783-790.
240. Lavti, D. L. Oxygen-containing functional groups of humic acid of soil organic matter / D. L. Lavti, K. V. Paliwai // Journal of Indian Society of Science. – 1999. – № 1. – P. 30-36.
241. Li, L. Characterization of humic acids fractionated by ultrafiltration / L. Li, Z. Zhao, W. Huang, P. Peng, G. heng, Ji. Fu // Organic Geochemistry. – 2004. – № 35. – pp. 1025-1037.
242. Luciono, P. Bioactivity and chemical characteristics of humic acids from tropical soils sequence / P. Luciono, B. Daniel, G. Jader et al. // Soil Science. – V. 173. – № 9. – 2008. – pp. 624-637.
243. Manciualea, A. A fluorescence quenching study of the interaction of Suwannee River fulvic acid with iron oxide nanoparticles / A. Manciualea, A. Baker, J. R. Lead // Chemosphere. – 2009. – V. 76. – P. 1023–1027.
244. Mekkaoui, M. Photostability and photostabilizing effect of humic acids / M. Mekkaoui, M. Elizzouzim // Intern. Journal of Photoenergy. – 2000. – V. 2. – P. 55-56.
245. Mielnik, L. Spectroscopic examination of Humic Substances extracted from the lake bottom sediments / L. Mielnik // Humic Substances in the Envirowment. –

2003. – Vol. 3. – № 3/4. – pp. 33-36.
246. Milori, D. M. B. P. Humification Degree of Soil Humic Acids Determined by Fluorescence Spectroscopy / D. M. B. P. Milori, L. Martin-Neto, C. Bayer, J. Mielniczuk, V. S. Bagnato // *Soil Science*. – Vol. 167. – No. 1. – 2002. – pp. 739-749.
247. Murray, R. D. H. The Naturally Occurring Coumarins. Progress in the Chemistry of Organic Natural Products / R. D. H. Murray // Springer. Verlag. – Wien, 2002. – V. 83. – 673 p.
248. Murphy, K. R. Distinguishing between terrestrial and autochthonous organic matter sources in marine environments using fluorescence spectroscopy / K. R. Murphy, C. A. Stedmon, T. D. Waite, G. M. Ruiz // *Marine Chemistry*. – 2008. – V. 108. – P. 40–58.
249. Panina, O. Increase of productivity of farm animals with the help of oxidate, a peat humic preparation / O. Panina, T. Zhilyakova // International Symposium «Peat Therapy on it's way into the next Millenium». – Germany. – 1999. – pp. 233-245.
250. Paul, A. Photochem. Photobiol. / A. Paul // *Soil Science*. – 2004. – V. 3. – № 3. – P. 273.
251. Pena-Mendez, E. M. Humic substances—compounds of still unknown structure: applications in agriculture, industry, environment, and biomedicine / E. M. Pena-Mendez, J. Havel, J. Patocka // *J. Appl. Biomed.* – 2005. – V. 3. – №. 1. – p. 13-24.
252. Perdue, E. M. Analytical constraints on the structural features of humic substances / E. M. Perdue // *Geochim. Cosmochim. – Acta* 48. – 1984. – pp. 1435-1443.
253. Peuravuori, J. Critical comments on accuracy of quantitative determination of natural humic matter by solid state ^{13}C NMR spectroscopy / J. Peuravuori, P. Ingman, K. Pihlaja // *Talanta*. – 2003. – № 59. – P. 177-189.
254. Perminova, I. V. Size-exclusion chromatography of humic substantes complexities of data interpretation attributable to non-size exclusion effects / I. V. Perminova // *Soil Science*. – 1999. – V. 164. – P. 834-840.
255. Perminova, I. V. Preparation and use of humic coatings covalently bound to silica

- gel for Np (V) and Pu (V) sequestration. / I. V. Perminova, L.A. Karpouk, N. S. Shcherbina, S. A. Ponomarenko, St. N. Kalmykov, K. Hatfield // *J. Alloys and Compounds*. – 2007. – V. 444-445. – P. 512-517.
256. Piccolo, A. The supramolecular structure of humic substances / A. Piccolo // *Soil Sci.* – 2001. – V. 166. – № 11. – P. 810–832.
257. Piccolo, A. Carbon-13 Nuclear Magnetic Resonance Spectra of soil humic substances extracted by different mechanisms / A. Piccolo, L. Campanella, B. M. Petronio // *Soil Science Society of America Journal*. – 1990. – № 54. – pp. 750-756.
258. Ramus, K. Influence of Dissolved Humic Substances on the Mass Transfer of Organic Compounds across the Air-Water Interface / K. Ramus, F. Kopinke, A. Georgi // *Chemosphere*. – V. 86. – №. 2. – 2012. – pp. 138-143.
259. Rashid, M. A. *Geochemistry of marine humic compounds* Springer Verlag // M. A. Rashid. – New York. – 1985. – 134 p.
260. Report of the AVMA Panel on Euthanasia. // *JAVMA* 2001. – Vol. 218 (5). – P. 669-696. URL: <http://www.research.ucf.edu/Compliance/pdf/EUTHA~17.PDF> (дата обращения 09.04.2014).
261. Ricca, G. Structural investigations of humic acids from leonardite by spectroscopic methods and thermal analysis / G. Ricca, L. Federico, C. Astori, R. Gallo // *Geoderma*. – 1993. – V. 57. – № 3. – pp. 263-274.
262. Saldan, V. I. Study of Huminat on the human RH line cells / V. I. Saldan // 12th International Peat Congress «Wise use of Peatlands». – Tampere, Finland. – 2004. – pp. 1205-1208.
263. Sanlaville, Y. Photosensitized degradation of terbuthylazine in water / Y. Sanlaville, S. Guittonneau, M. E. Mansour // *Chemosphere* 1996. – V. 33. – № 2. – P. 273.
264. Schepetkin, I. A. Characterization and biological activities of humic substances from mumie / I. A. Schepetkin, A. I. Khlebnikov, S. Y. Ah et al. // *Journal of agricultural and food chemistry*. – 2003. – V. 51. – №. 18. – P. 5245-5254.
265. Schnitzer, M. The synthesis, chemical structure, reaction and functions of humic

- substances / M. Schnitzer // Humic substances effect on soil and plants. – 1986. – № 3. – P. 26-28.
266. Sharp, P. E. The Laboratory Rat / P. E. Sharp // Boca Raton: CRC Press LLC, 1998. – 204 p.
267. Shcherbina, N. S. Nonreversible Immobilization of Water-Borne Plutonium onto Self-Assembled Adlayers of Silanized Humic Materials / N. S. Shcherbina, S. N. Kalmykov, L. A. Karpouk, S. A. Ponomarenko, K. Hatfield, R. Haire, I. V. Perminova // Environ. Sci. Technol. – 2014. – № 48 (4). – P. 2226-2233.
268. Sierra, M. M. D. 3D-Fluorescence Spectroscopic Analysis of HPLC Fractionated Estuarine Fulvic and Humic Acids / M. M. D. Sierra, M. Giovanela, E. Parlanti, E. J. Soriano-Sierra // J. Braz. Chem. Soc. – 2006. – Vol. 17. – № 1. – P. 113-124.
269. Sorkina, T. A. Nature-inspired soluble iron-rich humic compounds: new look at the structure and properties // T. A. Sorkina, A. Yu. Polyakov, N. A. Kulikova, A. E. Goldt, O. I. Philippova, A. A. Aseeva, A. A. Veligzhanin, Ya. V. Zubavichus, D. A. Pankratov, E. A. Goodilin, I. V. Perminova / Journal of Soils and Sediments. – May 2013. – P. 1-8.
270. Sosnin, E. A. Development and Applications of Novel UV and VUV Excimer and Exciplex Lamps for the Experiments in Photochemistry / E. A. Sosnin, I. V. Sokolova, V. F. Tarasenko // In Book: Photochemistry Research Progress (Eds by A. Sanchez, S.J. Gutierrez). Nova Science Publishers. – 2008. – P. 225–269.
271. Stepchenco, L. M. Influence of Natural humic preparations on the Stage of general adaptation syndrome / L. M. Stepchenco // 12th International Peat Congress «Wise use of Peatlands». – Tampere, Finland. – 2004. – pp. 433-435.
272. Stevenson, F. J. Humic Chemistry: Genesis, Composition, Reactions / F. J. Stevenson // John Wiley & Sons. New York. – 1994. – pp. 34-41.
273. Sutton, R. Molecular structure in soil humic substances: the new view / R. Sutton, G. Sposito // Environ. Sci. Technol. – 2005. – V. 39. – № 23. – P. 9009–9015.
274. Swift, R. S. Organic matter characterization (chap 35) / R. S. Swift // Methods of soil analysis. Madison, WI: Soil Science Society of America, – 1996. – Part 3. – P. 1018–1020.

275. Thiel, K.-D. In vitro studies of the antiviral activity of ammonium humate against herpes simplex virus type 1 and type 2 / K.-D. Thiel, R. Klocking, H. Schweizer, M. Sprossig // *Virology*. – 1963. – № 21. – pp. 661-662.
276. Thurman, E. M. *Humic Substances in Soil, Sediment and Water* / E. M. Thurman. – Wiley-Interscience. – 1985. – 87-104 p.
277. Tikhova, V. D. Analysis of humic acids from various soils using acid hydrolysis / V. D. Tikhova, V. P. Fadeeva, M. I. Dergacheva, M. M. Shakirov // *Russian J. of Applied Chemistry*. – 2008. – V. 81. – № 11. – P. 1957-1962.
278. Urazova, T. S. Mechanochemical Modification of Humic Acids to Create Microreactor Particles Absorbing Inorganic Pollution / T. S. Urazova, A. L. Bychkov, O. I. Lomovsky // *Second International Conference of CIS IHSS on Humic Innovative Technologies «Natural and engineered nanoparticles in clean water and soil technologies» (Moscow, Russia, October 29 – November 2, 2012)* : book abstr. – Moscow, 2012. – P. 77
279. Yamauchi, N. Structural Features of Humic Acid of the Coastal Sediment in Ariake Sea Tidelands: Use of Humic Acid as an Environmental Indicator for River Basins and Coastal Regions / N. Yamauchi, W. Toyodome, K. Umeda, N. Nishida, T. Murae // *Analytical Sciences*. – 2004. – Vol. 20. – № 10. – pp. 1453-1457.
280. Yu, H. B. Fluorescence Spectroscopic Properties of Dissolved Fulvic Acids from Salined Flavo-aquic Soils around Wuliangshuai in Hetao Irrigation District, China / H. B. Yu, B. D. Xi, W. C. Ma, D. L. Li at al. // *Soil Science Society of America Journal* – V. 75. – № 4. – 2011. – pp. 1385-1393.
281. Ziechmann, W. Humic substances and their Medical Effectiveness / W. Ziechmann // *10th International Peat Congress*. – Stuttgart. – 1996. – Vol. 2. – pp. 546-554.
282. Wershaw, R. L. A new model for humic materials and their interactions with hydrophobic organic chemicals in soil-water and sediment-water systems / R. L. Wershaw // *J. Contam. Hydrol.* – 1986. – № 1. – P. 29–45.

ПРИЛОЖЕНИЯ

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

УТВЕРЖДАЮ

_____ Ф.И.О.

« » _____ г.

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ КАЧЕСТВА ЛЕКАРСТВЕННОГО СРЕДСТВА

ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ ПРЕДПРИЯТИЯ (ПРОЕКТ)

САПРОПЕЛЬ ОЗЕРА ГОРЧАКОВО**ФСП 42-XXXX-XX**
Вводится впервые

Срок введения установлен
с « __ » _____ 20 __ г.Срок действия установлен
до « __ » _____ 20 __ г.

Настоящая фармакопейная статья распространяется на добытый и высушенный сапропель озера Горчаково Тюкалинского района Омской области и применяемый для получения гуминовых веществ.

ИЗДАНИЕ ОФИЦИАЛЬНОЕ**ПЕРЕПЕЧАТКА ВОСПРЕЩЕНА**

Сапрпель озера Горчаково
Спецификация

Показатели качества	Методы испытания	Нормы
1	2	3
Описание	Органолептический, ГФ XII, ч. 1	Порошок темно-коричневого цвета с вкраплениями, без запаха
Растворимость	ГФ XII, ч. 1, стр. 92	Практически нерастворим в воде, умеренно растворим в растворах щелочей, мало растворим в хлороформе, спирте и эфире. При растворении образуются мутные растворы
Подлинность	ИК-спектроскопия	Должен соответствовать рисунку
Потеря в массе при высушивании	ГФ XI, вып. 1, стр. 176	Не более 15 %
Тяжелые металлы	ГФ XII, ч. 1, стр. 121	Не более 0,001 %
Зола общая	ГФ XII, ч. 1, стр. 115	Не более 28,0 %
Зола, нерастворимая в 10% растворе кислоты хлористоводородной	ГФ XI, вып. 2, стр. 24	Не более 1,0 %
Микробиологическая чистота	ОФС 42-0016-04	Категория 4А
Количественное определение	Гравиметрический	Не менее 25,0 % гуминовых веществ
Упаковка		По 0,5 кг в пакеты полиэтиленовые
Маркировка		В соответствии с ФСП
Условия хранения		В сухом, защищенном от света месте при температуре не выше 25°C
Срок годности		4 года

Описание. Порошок темно-коричневого цвета с вкраплениями, без запаха.

Растворимость. Практически нерастворим в воде, умеренно растворим в растворах щелочей, мало растворим в хлороформе, спирте и эфире. При растворении образуются мутные растворы.

Подлинность:

0,1 г сухого сапропеля заливают 100 мл 0,1М раствора натрия гидроксида, нагревают на водяной бане при постоянном перемешивании, затем фильтруют через бумажный фильтр. К фильтрату добавляют порциями по 5 мл 0,1М раствор кислоты хлористоводородной до прекращения выпадения осадка. Осадок центрифугируют, сушат до постоянной массы.

Выделенные гуминовые вещества (точная навеска) растирают в ступке с калия бромидом в соотношении 1:100 и запрессовывают в таблетку при давлении 7,5-10 т/см² в течение 2-5 мин под вакуумом 2-3 мм рт. ст., помещают в прибор и снимают спектр в интервале значений частоты от 400 до 4000 см⁻¹.

Спектр инфракрасного поглощения гуминовых веществ должен соответствовать представленному на рисунке спектру.

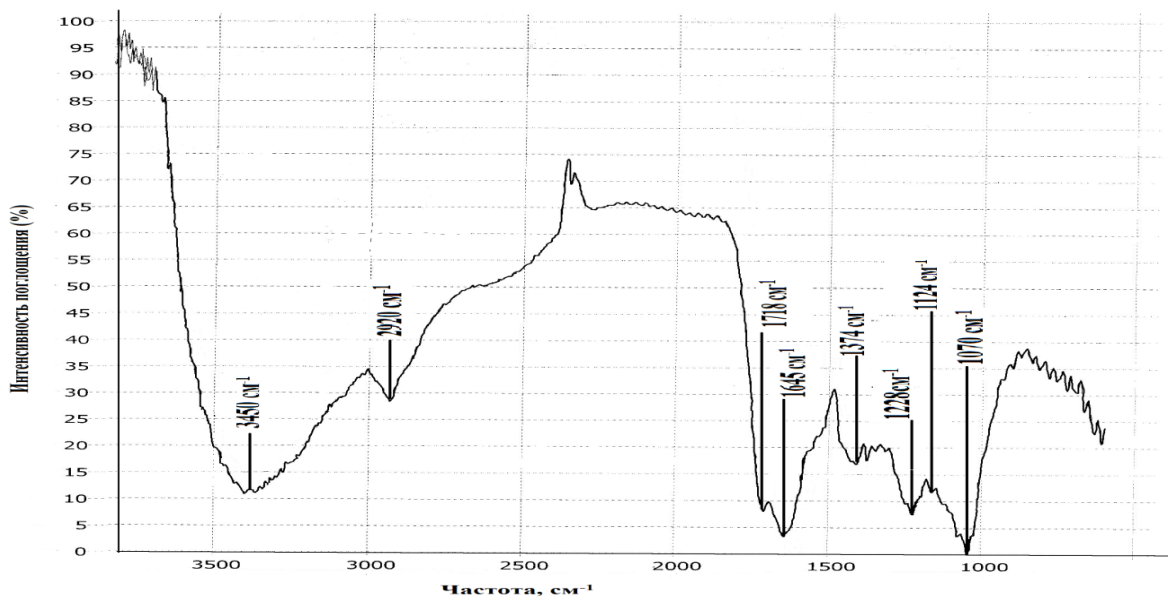


Рисунок - Спектр инфракрасного поглощения гуминовых веществ

Потеря в массе при высушивании. Около 1,0 г сапропеля (точная навеска) сушат при температуре 100-105°C до постоянной массы. Потеря в массе должна быть не более 15 % (ГФ XI, вып. 1, с. 176).

Тяжелые металлы. Сапропель должен выдерживать испытание на тяжелые металлы (не более 0,001 %) (ГФ XII, ч. 1, стр.121).

Общая зола. Общая зола из 1,0 г (точная навеска) сапропеля не должна превышать 28,0 % (ГФ XII, ч. 1, стр.115).

Зола, нерастворимая в 10% растворе кислоты хлористоводородной. Не более 1,0 % (ГФ XI, вып. 2, стр. 24).

Микробиологическая чистота. Сапропель должен выдерживать требования ОФС 42–0016–04 по микробиологической чистоте (категория 4А): не более 10 аэробных бактерий; 10 дрожжевых и плесневых грибов в 1 г при отсутствии *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*.

Количественное определение:

Около 10 г сапропеля (точная навеска) заливают 100 мл 0,1 М раствора натрия гидроксида, настаивают в течение 30 минут при постоянном перемешивании, затем нагревают на водяной бане в течение 1 часа и фильтруют. К фильтрату добавляют порциями по 5 мл 10% раствор кислоты хлористоводородной до рН 2 и прекращения выпадения осадка. Осадок центрифугируют и промывают порциями водой до рН 6-7. Полученные гуминовые вещества помещают в предварительно высушенный бюкс и сушат до постоянной массы в сушильном шкафу при температуре 100-105°C. После чего рассчитывают содержание гуминовых веществ в % к исходной навеске сапропеля.

Содержание гуминовых веществ в сапропеле должно быть не менее 25,0%.

Упаковка. По 0,5 кг в двойные пакеты из пленки полипропиленовой упаковочной марки УП-40, УП-50 по ТУ 6-49-0203534-73-91 или пленки полиэтиленовой по ГОСТ 10354-82, снабженные этикеткой из бумаги

этикеточной по ГОСТ 7625-86 или бумаги писчей по ГОСТ 18510-87. Для герметизации горловины пакетов запаивают сварным швом и вкладывают в мешок бумажный по ГОСТ 2226-88 или в ящик из картона гофрированного по ГОСТ 159-629-83. В каждый мешок (ящик) вкладывают или на его стенку наклеивают этикетку из бумаги этикеточной по ГОСТ 7625-86 или бумаги писчей по ГОСТ 15810-87.

Транспортная тара в соответствии с РД 9301-006-057449470-93.

Маркировка. На этикетке указывают предприятие изготовитель и его товарный знак, название препарата, количество, условия хранения, регистрационный номер, номер серии, срок годности, штриховой код.

Надписи на упаковочном листе в соответствии с ГОСТ 17768-90.

Маркировка транспортной тары в соответствии с ГОСТ 14192-96.

Транспортирование. В соответствии с ГОСТ 17768-90.

Хранение. В сухом, защищенном от света месте, при температуре не выше 25°C.

Срок годности. 4 года (время наблюдения).

Примечание.

Методики анализа, реактивы и титрованные растворы, приведенные в настоящей фармакопейной статье, описаны в соответствующих разделах Государственной Фармакопеи XI издания, выпуск 1,2 и Государственной Фармакопеи XII издания.

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

УТВЕРЖДАЮ

_____ Ф.И.О.
« » _____ г.

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ КАЧЕСТВА ЛЕКАРСТВЕННОГО СРЕДСТВА

ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ ПРЕДПРИЯТИЯ (ПРОЕКТ)**ГУМИНОВЫЕ ВЕЩЕСТВА АКТИВИРОВАННЫЕ****ФСП 42-XXXX-XX****Вводится впервые**

Срок введения установлен

с «__» _____ 20 __ г.

Срок действия установлен

до «__» _____ 20 __ г.

Настоящая фармакопейная статья распространяется на гуминовые вещества активированные, получаемые из сапропеля озера Горчаково Тюкалинского района Омской области с использованием УФ-облучения на стадии щелочного гидролиза и применяемые для получения лекарственных средств.

Гуминовые вещества активированные
Спецификация

Показатели качества	Методы испытания	Нормы
1	2	3
Описание	Органолептический	Аморфный порошок темно-коричневого цвета, без запаха
Растворимость	ГФ XII, ч. 1, стр. 92	Практически нерастворим в воде, умеренно растворим в горячей воде, растворим в растворах щелочей, мало растворим в хлороформе и спирте. При растворении в указанных растворителях образует мутные растворы
Подлинность: ИК-спектр	ИК-спектроскопия	Должен соответствовать рисунку
Спектр в УФ- и видимой областях	Спектрофотометрия	Спектр поглощения раствора в диапазоне длин волн 190-900 нм должен обладать максимумом при длине волны 265±2 нм
Коэффициент цветности (E ₄ /E ₆)	Спектрофотометрия	Коэффициент цветности должен быть не менее 4,16 и не более 4,20
Потеря в массе при высушивании	ГФ XI, вып. 1, стр. 176	Не более 5%
Хлориды	ГФ XI, вып. 1, стр. 165	Не более 0,02%
Сульфаты	ГФ XI, вып. 1, стр. 165	Не более 0,02%
Сульфатная зола	ГФ XII, ч. 1, стр. 115	Не более 0,1%
Тяжелые металлы	ГФ XII, ч. 1, стр. 121	Не более 0,001%
Микробиологическая чистота	ГФ XII, ч. 1, стр. 160	Категория 3.2.
Количественное определение: Содержание гуминовых веществ активированных	Кондуктометрическое титрование	Не менее 95%
Упаковка		По 1 кг в мешки бумажные многослойные
Маркировка		В соответствии с ФСП
Условия хранения		В сухом, защищенном от света месте при температуре не выше 25°C
Срок годности		3 года

Описание. Аморфный порошок темно-коричневого цвета, без запаха.

Растворимость. Практически нерастворим в воде, умеренно растворим в горячей воде, растворим в растворах щелочей, мало растворим в хлороформе и спирте. При растворении в указанных растворителях гуминовые вещества активированные образуют мутные растворы.

Подлинность:

Инфракрасная спектроскопия. Гуминовые вещества активированные (точная навеска) растирают в ступке с калия бромидом в соотношении 1:100 и запрессовывают в таблетку при давлении 7,5—10 т/см² в течение 2—5 мин под вакуумом 2—3 мм рт. ст., помещают в прибор и снимают спектр в интервале значений частоты от 400 до 4000 см⁻¹. Спектр инфракрасного поглощения гуминовых веществ активированных должен соответствовать представленному на рисунке спектру.

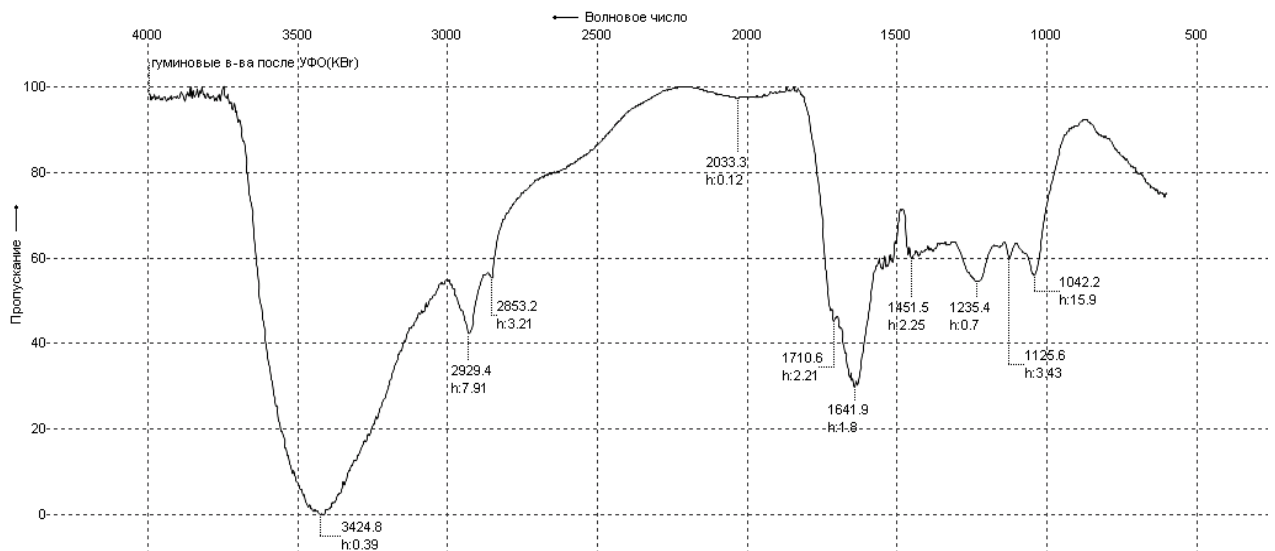


Рисунок - Спектр инфракрасного поглощения ГВА

Ультрафиолетовая спектроскопия. Около 0,1 г гуминовых веществ активированных (точная навеска) растворяют в 100 мл 0,1 М раствора натрия гидроксида. 1 мл полученного раствора помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл и доводят водой очищенной до метки, перемешивают и снимают спектр полученного раствора в интервале от 190 до 900 нм. Раствор сравнения: 1 мл 0,1 М раствора натрия гидроксида в 100 мл воды очищенной.

Спектр гуминовых веществ активированных должен иметь характерный максимум при длине волны 265 ± 2 нм.

Отношение оптических плотностей при 465 и 650 нм (E_4/E_6), рассчитанное для 0,001% растворов гуминовых веществ активированных, должно быть в пределах 4,16-4,20.

Потеря в массе при высушивании. Около 1,0 г препарата гуминовых веществ активированных (точная навеска) сушат при температуре 100-105°C до постоянной массы. Потеря в массе должна быть не более 5 % (ГФ XI, вып. 1, с. 176).

Хлориды. 1,0 г субстанции встряхивают в течение 5 мин с 20 мл воды и фильтруют. 2 мл фильтрата, разведенного водой до 10 мл, должны выдерживать испытания на хлориды (не более 0,02% в субстанции) (ГФ XI, вып. 1, стр. 165).

Сульфаты. 10 мл фильтрата, полученные в испытании на Хлориды, должны выдерживать испытания на сульфаты (не более 0,02% в субстанции) (ГФ XI, вып. 1, стр. 165).

Сульфатная зола. Сульфатная зола из 1,0 г (точная навеска) гуминовых веществ активированных не должна превышать 0,1 % (ГФ XII, ч. 1, стр. 115).

Тяжелые металлы. Препарат должен выдерживать испытание на тяжелые металлы (не более 0,001 %; ГФ XII, ч. 1, стр. 121).

Микробиологическая чистота. Препарат должен выдерживать требования по микробиологической чистоте категории 3.2. (ГФ XII, ч. 1, стр. 160).

Количественное определение:

0,25 г гуминовых веществ активированных помещают в мерную колбу на 500 мл, растворяют в 100 мл 0,01 М раствора натрия гидрокарбоната и доводят объем раствора тем же растворителем до метки. Полученный раствор встряхивают на продольном встряхивателе в течение 30 мин и фильтруют через плотный бумажный фильтр для тонких осадков. Затем 25 мл фильтрата при постоянной температуре раствора $25 \pm 1^\circ\text{C}$ титруют 0,01 М раствором кислоты хлористоводородной и определяют показатель удельной электропроводности в конечной точке титрования.

Массовую концентрацию гуминовых веществ активированных определяют, используя градуировочный график зависимости выходного сигнала удельной электропроводности (мСм/м), рассчитанного при титровании карбоксильных функциональных групп методом Боэма, от массы навески гуминовых веществ активированных.

Количественное содержание гуминовых веществ активированных в процентах (X) в пересчете на абсолютно сухое сырье рассчитывают по формуле:

$$X = \frac{m \times 500 \times 100 \times 100}{0,25 \times (100 - W) \times 25}, \text{ где}$$

m – масса гуминовых веществ активированных, найденная по калибровочному графику, г;

W – потеря в массе при высушивании гуминовых веществ активированных, %.

Содержание гуминовых веществ активированных в пересчете на абсолютно сухое вещество должно быть не менее 95%.

Построение калибровочного графика.

1,0 г гуминовых веществ активированных – стандартного образца, высушенных до постоянной массы, помещают в мерную колбу на 500 мл, растворяют в 100 мл 0,01 М раствора натрия гидрокарбоната и доводят объем раствора тем же растворителем до метки. Из этого раствора готовят серию разбавленных растворов, содержащих гуминовых веществ активированных соответственно 0,0025; 0,005; 0,0075; 0,01; 0,0125 г в 25 мл раствора. Полученные растворы встряхивают на продольном встряхивателе в течение 30 мин и фильтруют через плотный бумажный фильтр для тонких осадков, затем при постоянной температуре раствора $25 \pm 1^\circ\text{C}$ титруют 0,01 М раствором кислоты хлористоводородной и определяют показатель удельной электропроводности в конечной точке титрования.

Упаковка.

Порошок гуминовых веществ активированных упаковывается по 1 кг в мешки бумажные многослойные по ГОСТ 2226-88; в мешки полипропиленовые из пропилена окрашенного по ГОСТ 26-996-86 для лекарственных средств или пищевых продуктов.

На мешки наклеивают этикетку из бумаги этикеточной по ГОСТ 7625-86, бумаги писчей по ГОСТ 18 510-87.

Транспортная тара в соответствии с РД 9301-006-057449470-93.

Маркировка.

На этикетке указывают предприятие изготовитель и его товарный знак, название препарата, количество, условия хранения, регистрационный номер, номер серии, срок годности, штриховой код.

Надписи на упаковочном листе в соответствии с ГОСТ 17768-90. Маркировка транспортной тары в соответствии с ГОСТ 14192-96.

Хранение. В сухом, защищенном от света месте, при температуре не выше 25°C.

Срок годности. 3 года.

Примечание.

- 1.Методики анализа, реактивы и титрованные растворы, приведенные в настоящей фармакопейной статье предприятия, описаны в соответствующих разделах Государственной Фармакопеи XI издания, выпуск 1, 2, и Государственной Фармакопеи XII издания.
- 2.Удельная электропроводность воды очищенной, используемой для приготовления растворов в количественном определении, не должна превышать 5,1 мкСм/см при температуре 25°C.

Государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего профессионального образования
«Омская государственная медицинская академия»
Министерства здравоохранения Российской Федерации

УТВЕРЖДАЮ

**ГУМИНОВЫЕ ВЕЩЕСТВА АКТИВИРОВАННЫЕ-СТАНДАРТНЫЙ
ОБРАЗЕЦ**

Технические условия

ТУ

(Вводятся впервые)

Срок введения с “_” _____ 20_г.

Срок действия до “_” _____ 20_г.

...

Настоящие технические условия распространяются на гуминовые вещества активированные – стандартный образец, применяемый для стандартизации гуминовых вещества активированных, выделенных из сапропеля озера Горчаково Тюкалинского района Омской области с использованием УФ-облучения на стадии щелочного гидролиза и применяемые для получения лекарственных средств.

Обозначения при заказе и в документации: “Гуминовые вещества активированные – стандартный образец” ТУ _____. Требования технических условий являются обязательными. Данные технические условия используются в целях регистрации и сертификации.

I. ТЕХНИЧЕСКИЕ ТРЕБОВАНИЯ

1.1. Гуминовые вещества активированные – стандартный образец должен соответствовать требованиям настоящих технических условий и изготавливается из сапропеля озера Горчаково Тюкалинского района Омской области с применением УФ-облучения по схеме.

1.2. Гуминовые вещества активированные – стандартный образец по физико-химическим и органолептическим показателям должен соответствовать требованиям и нормам, указанным в таблице.

Таблица

Наименование показателя	Норма	Метод испытания
Внешний вид	Аморфный порошок темно-коричневого цвета, без запаха	по п. 4.2
Растворимость	Практически нерастворим в воде, умеренно растворим в горячей воде, растворим в растворах щелочей, мало растворим в хлороформе и спирте. При растворении в указанных растворителях образует мутные растворы	ГФ XII, ч. 1, ОФС 42-0049-07, с. 92
Подлинность	Ультрафиолетовый спектр 0.001% раствора гуминовых веществ активированных-стандартного образца в 0,1 М растворе натрия гидроксида в области длин волн от 190 до 900 нм содержит максимум поглощения при длине волны 265 ± 2 нм. Приложение А.	по п. 4.3.1
	Инфракрасный спектр гуминовых веществ активированных-стандартного образца, высушенного при температуре $102-105^\circ\text{C}$ до постоянной массы (4 ч), снятый в таблетке KBr в области от 450 до 4000 см^{-1} ,	по п. 4.3.2

	должен соответствовать спектру, приведенному в Приложении Б.	
	¹³ С-ЯМР спектр гуминовых веществ активированных-стандартного образца в твердой фазе в интервале 10-180 м.д. должен содержать только те сигналы, что и в спектре, приведенном в Приложении В.	по п. 4.3.3
Отношение оптических плотностей при 465 и 650 нм, (E ₄ /E ₆)	Для 0,001% растворов гуминовых веществ активированных-стандартного образца, должно быть в пределах 4,16±4,20.	по п. 4.4
Посторонние примеси	В ¹³ С-ЯМР спектре гуминовых веществ активированных-стандартного образца в твердой фазе в интервале 10-180 м.д. должны присутствовать только те сигналы, что и в спектре, приведенном в Приложении В.	

1.3. Упаковка

По 0.050 г во флаконы из стекломассы с винтовой горловиной типа ФВ-10-20-ОС-1 по ОСТ 64-2-71-80, укупоренные полиэтиленовыми пробками с навинчиваемыми пластмассовыми крышками типа 1.1-20 по ОСТ 64-2-87-81, залитые парафином по ГОСТ 23683-79. Флаконы завертывают в бумагу оберточную по ГОСТ 8273-75 и упаковывают в пачку из картона коробочного типа или типа хром-эрзац по ГОСТ 7933-89. На флаконы, бумагу и пачку наклеивают этикетки из бумаги этикеточной по ГОСТ 7625-86 или бумаги писчей по ГОСТ 18510-87.

1.4. Маркировка

На этикетке указывают предприятие-изготовитель, его товарный знак и адрес, название стандарта на русском языке, количество, условия хранения, регистрационный номер, номер серии, срок годности, «Перед применением высушивают при температуре от 102 до 105°С в течение 4 ч».

2. ТЕХНИКА БЕЗОПАСНОСТИ

2.1. Работа со стандартными образцами проводится в хорошо проветриваемом помещении, оборудованном приточно-вытяжной вентиляцией.

3. ПРАВИЛА ПРИЕМКИ

3.1. Приемку и контроль качества гуминовых веществ активированных-стандартного образца осуществляют в соответствии с ОСТ 42-504-96 и настоящими техническими условиями.

3.2. Гуминовые вещества активированные-стандартный образец поставляют сериями.

3.2.1. Под серией понимают определенное количество продукта, полученное за один технологический цикл, в одних и тех же условиях, упакованного в однородную тару и оформленного одним документом о качестве.

3.2. Каждая серия гуминовых веществ активированных-стандартного образца должна сопровождаться аналитическим паспортом, оформленным в соответствии с ОСТ 42-504-96.

3.3. Каждая серия гуминовых веществ активированных-стандартного образца должна быть проанализирована на предприятии-изготовителе аналитическим отделом.

3.4. Для контроля качества гуминовых веществ активированных-стандартного образца от каждой серии продукта отбирают среднюю пробу. Точечные пробы отбирают из разных мест серии. Объединенную пробу, составленную из точечных проб, тщательно перемешивают, делят пополам, помещают в две чистые сухие банки. Один образец анализируют, другой упаковывают, пломбируют и отправляют на арбитражное хранение сроком на 5 лет.

3.5. При получении неудовлетворительных результатов хотя бы по одному из показателей проводят повторный анализ по всем показателям из удвоенного количества проб, отобранных из той же серии. Результаты повторных испытаний являются окончательными и распространяются на всю серию.

4. МЕТОДЫ ИСПЫТАНИЯ

4.1. Методы испытаний по ГФ XII, ч. 1, ОФС 42-0049-07, с. 92 с дополнениями, указанными в п. 4.2, 4.3, 4.4, 4.5 настоящих технических условий.

4.2. Определение внешнего вида.

Внешний вид определяют визуально, рассыпав небольшое количество образца тонким слоем на лист белой бумаги.

4.3. Подлинность.

4.3.1. УФ-спектр.

4.3.1.1. Оборудование и посуда, необходимая для проведения анализа:

Спектрофотометр регистрирующий ультрафиолетового диапазона

Весы лабораторные аналитические по ГОСТ 24104-88

Колба мерная вместимостью 100 мл по ГОСТ 1770-74

4.3.1.2. Реактивы и растворы, необходимые для проведения анализа:

Натрия гидроокись по ГОСТ 4328-77

4.3.1.3. Проведение анализа.

Около 0,1 г гуминовых веществ активированных-стандартного образца (точная навеска) растворяют в 100 мл 0,1 М раствора натрия гидроксида. 1 мл полученного раствора помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводят водой очищенной до метки и перемешивают. УФ-спектр регистрируют согласно ГФ XII, ч. 1, ОФС 42-0042-07, с. 56, в интервале от 190 до 900 нм, используя в качестве раствора сравнения 1 мл 0,1 М раствора натрия гидроксида в 100 мл воды очищенной.

4.3.2. ИК-спектр.

4.3.2.1. Оборудование и посуда, необходимая для проведения анализа:

Автоматизированный ИК-Фурье спектрометр типа ФТ-801

Пресс-форма для прессовки дисков

Ступка агатовая с пестиком

4.3.2.2. Реактивы и растворы, необходимые для проведения анализа:

Калия бромид для ИК-спектроскопии

4.3.2.3. Проведение анализа.

3 мг гуминовых веществ активированных-стандартного образца тщательно растирают в агатовой ступке с 300 мг калия бромида для ИК-спектроскопии. С помощью пресс-формы для прессовки микротаблеток формируют диск согласно ГФ XII, ч. 1, ОФС 42-0043-07, с. 62. ИК-спектр регистрируют согласно ГФ XII, ч. 1, ОФС 42-0043-07, с. 62.

4.3.3. ^{13}C -ЯМР спектр.

4.3.3.1. Оборудование и посуда, необходимая для проведения анализа:

ЯМР-спектрометр AVANCE III™ 400 (Bruker Analytic GmbH, Germany) с рабочей частотой на ядрах ^{13}C 100,63 МГц.

4.3.3.2. Проведение анализа.

Навеску гуминовых веществ активированных - стандартный образец (100-200 мг) помещают в ротор из оксида циркония с внешним диаметром 4 мм и вращают со скоростью 10 кГц. Используют импульсную последовательность RAMP CP (линейное увеличение амплитуды радиочастотного поля при переносе поляризации), время аквизиции (At) – 34 мс, задержка между импульсами (RD) – 5 с, число накоплений – 2000. Спад свободной индукции (ССИ) дополняют нулями до 4096 точек и проводят экспоненциальное умножение (70 Гц). При фазовой коррекции фиксируют фактор первого порядка равным – 45°. Шкалу

выставляют по сигналу углерода карбоксильной группы глицина (176.1 м.д.). ^{13}C -ЯМР спектр регистрируют согласно ГФ XII, ч. 1, ОФС 42-0046-07, с. 73.

4.4. Определение удельного показателя поглощения.

4.4.1. Оборудование и посуда, необходимая для проведения анализа:

Спектрофотометр регистрирующий ультрафиолетового диапазона

Весы лабораторные аналитические по ГОСТ 24104-88

Колба мерная вместимостью 100 мл по ГОСТ 1770-74

4.4.1.2. Реактивы и растворы, необходимые для проведения анализа:

Натрия гидроокись по ГОСТ 4328-77

4.4.1.3. Проведение анализа.

Раствор гуминовых веществ активированных-стандартного образца для проведения анализа готовят, как описано в п. 4.3.1.3. Далее измеряют оптическую плотность полученного раствора на спектрофотометре согласно ГФ XII, ч. 1, ОФС 42-0042-07, с. 56 при длине волны 465 нм и 650 нм в кювете с толщиной слоя 100 мм. В качестве раствора сравнения используют 1 мл 0,1 М раствора натрия гидроксида в 100 мл воды очищенной. Рассчитывают отношение оптических плотностей при 465 и 650 нм, (E_4/E_6)

4.5. Посторонние примеси.

Анализ выполняется в соответствии с п. 4.3.3 настоящих технических условий. В ^{13}C -ЯМР спектре гуминовых веществ активированных-стандартного образца в твердой фазе в интервале 10-180 м.д. должны присутствовать только те сигналы, что и в спектре, приведенном в Приложении В.

5. ТРАНСПОРТИРОВКА И ХРАНЕНИЕ

5.1. Транспортирование и хранение гуминовых веществ активированных-стандартного образца должно осуществляться в соответствии с ГОСТ 17768-90.

5.2. Хранение гуминовых веществ активированных-стандартного образца проводится в сухом, защищенном от света месте.

6. ГАРАНТИИ ИЗГОТОВИТЕЛЯ

6.1. Изготовитель гарантирует соответствие качества гуминовых веществ активированных-стандартного образца требованиям настоящих технических условий при соблюдении потребителем условий транспортирования и хранения, установленных настоящими техническими условиями.

6.2. Срок годности 5 лет.

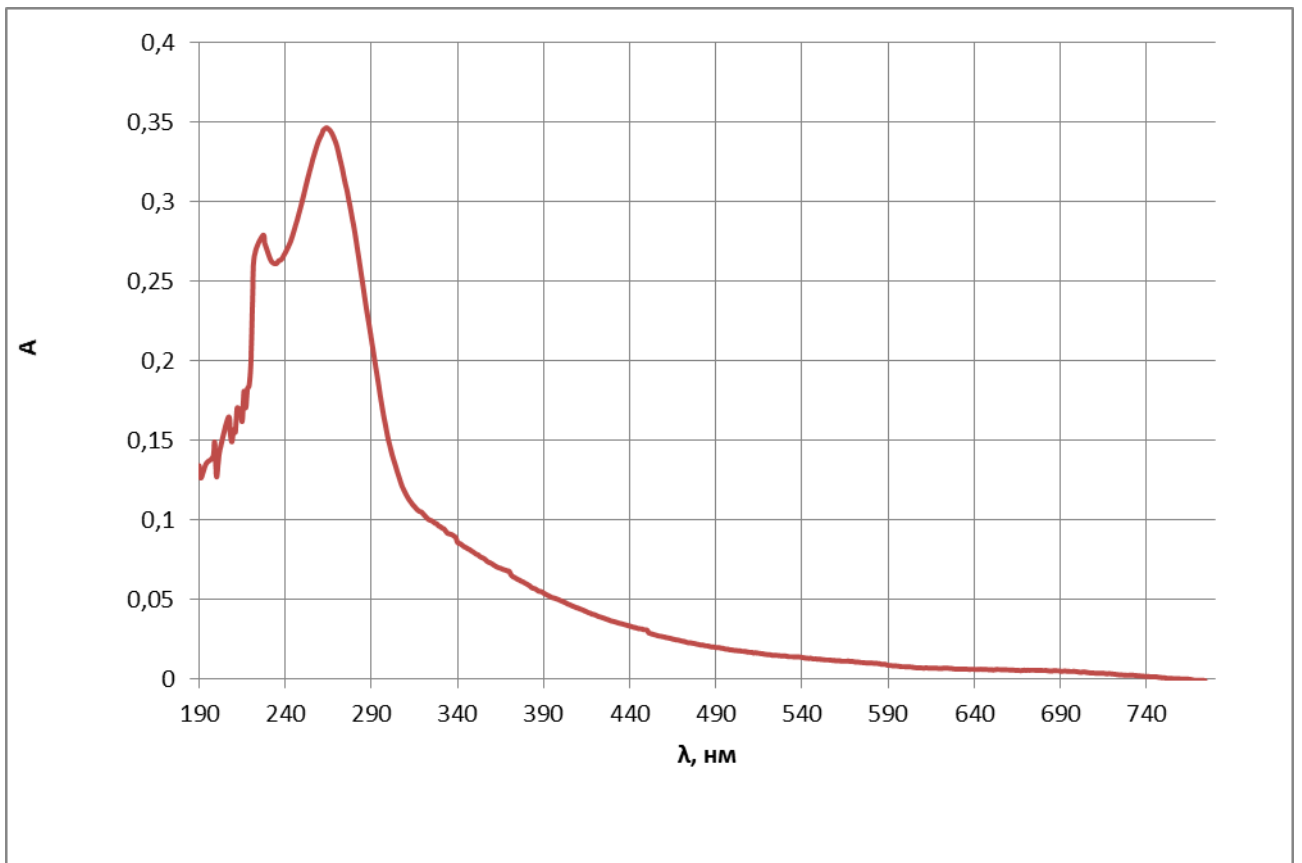


Рисунок - УФ-спектр гуминовых веществ активированных-стандартного образца в 0,1 М растворе натрия гидроксида

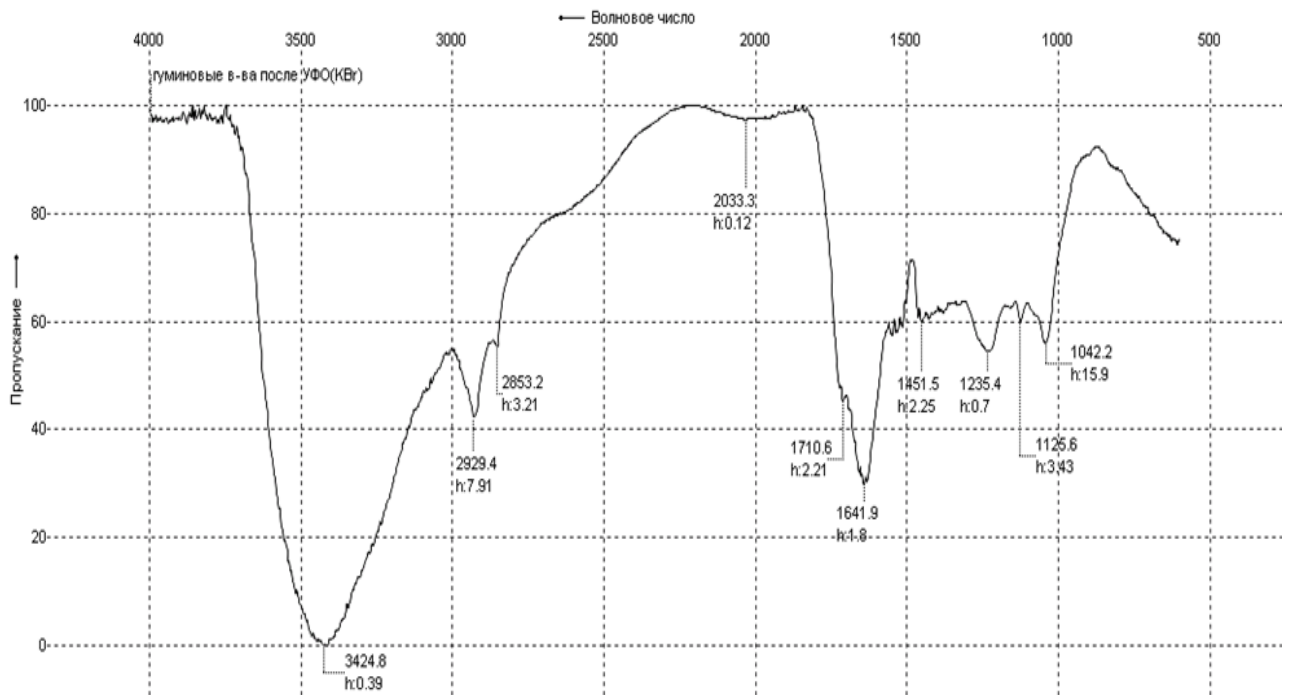


Рисунок - ИК-спектр гуминовых веществ активированных-стандартного образца в диске калия бромиде.

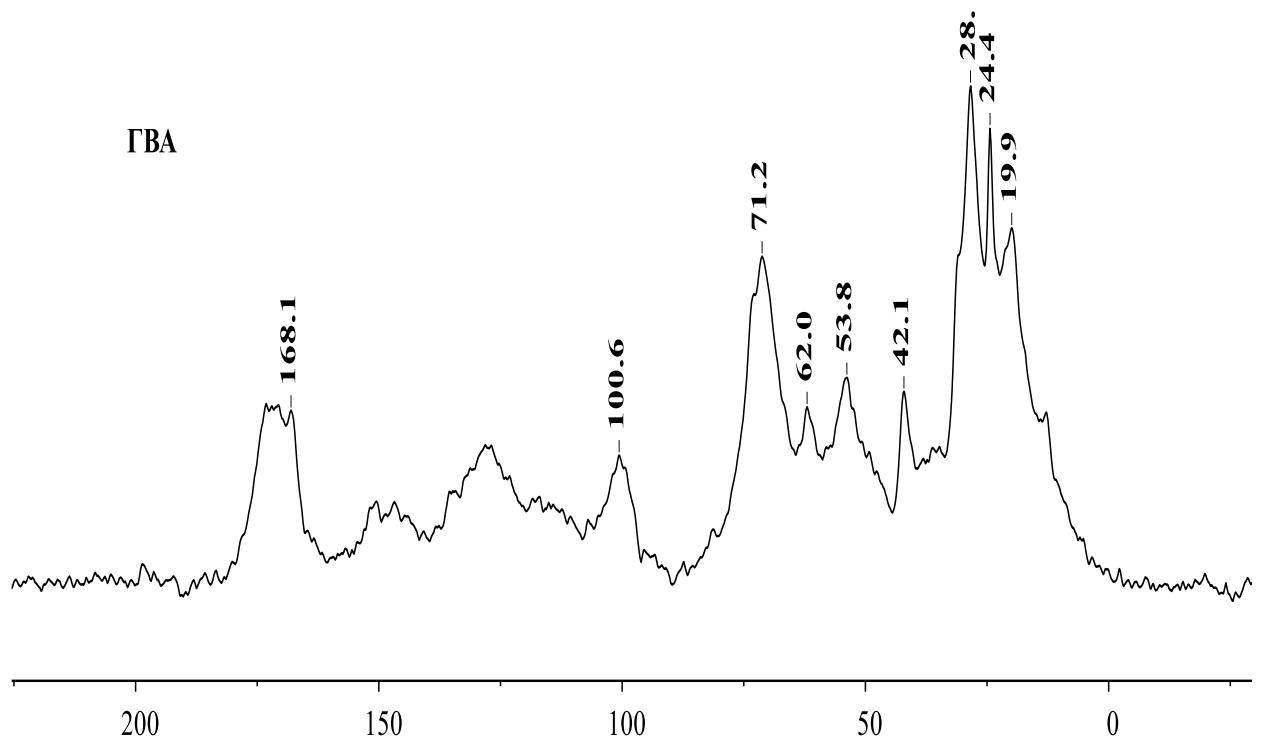


Рисунок - ^{13}C -ЯМР-спектр гуминовых веществ активированных-стандартного образца.

ПЕРЕЧЕНЬ

Приложение Г

нормативной документации, на которую даны ссылки в настоящих технических условиях

ГФ XII, ч. 1, ОФС 42-0042-07, с. 56	Спектрофотометрия в ультрафиолетовой и видимой областях
ГФ XII, ч. 1, ОФС 42-0043-07, с. 62	Спектрометрия в инфракрасной области
ГФ XII, ч. 1, ОФС 42-0046-07, с. 73	Спектроскопия ядерного магнитного резонанса
ГФ XII, ч. 1, ОФС 42-0049-07, с. 92	Растворимость
ГОСТ 1770-74	Посуда мерная лабораторная стеклянная. Цилиндры, Мензурки, колбы, пробирки
ГОСТ 7625-86	Бумага этикеточная
ГОСТ 7933-89	Картон для потребительской тары
ГОСТ 8273-75	Бумага оберточная
ГОСТ 14192-96	Маркировка грузов
ГОСТ 17768-90	Средства лекарственные. Упаковка, маркировка, транспортирование и хранение
ГОСТ 18510-87	Бумага писчая
ГОСТ 23693-79	Парафин
ГОСТ 24104-88	Весы лабораторные общего назначения и образцовые
ГОСТ 4328-77	Натрия гидроокись
ОСТ 42-504-96	Контроль качества лекарственных средств на промышленных предприятиях и в организациях. Основные положения
ОСТ 64-2-71-80	Банки и флаконы из стекломассы с винтовой горловиной для лекарственных средств. Типы и размеры
ОСТ 64-2-87-81	Средства укупорочные пластмассовые к банкам и флаконам для лекарственных средств. Типы и основные размеры
ТУ 64-1-1411-76	Шкаф сушильный электрический лабораторный

БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ САПРОПЕЛЯ И ГУМИНОВЫХ ВЕЩЕСТВ

Особенности химической структуры гуминовых веществ, а именно наличие функциональных групп с высокой реакционной способностью, предполагает не только разнообразные свойства исследуемых соединений, но и широкий спектр их биологической активности. Однако, несмотря на ряд общих структурных элементов гуминовых веществ, они могут проявлять различную биологическую активность, что объясняется полиморфизмом их химического состава, в связи с чем только экспериментальные данные могут подтвердить наличие той или иной биологической активности исследуемых соединений.

В настоящее время в медицинской практике имеется достаточно ограниченное количество лекарственных препаратов, оказывающих комплексное воздействие при лечении ожоговых ран [144]. Опираясь на данные литературных источников [3, 4, 49, 88], мы предположили, что ГВ могут оказывать комплексное воздействие на течение раневого процесса. В связи с этим, нами были проведены экспериментальные исследования сорбционных свойств гуминовых веществ, их антиоксидантной, ранозаживляющей, противовоспалительной и антигрибковой активностей, а также изучена острая и хроническая токсичность исследуемых соединений.

Методы исследования сапропеля и гуминовых веществ in vitro.

Антигрибковые свойства сапропеля и гуминовых веществ исследовали *in vitro* методом двукратных серийных разведений в жидкой питательной среде Сабуро по методике С. А. Вичкановой в соответствии с Методическими рекомендациями по изучению противогрибковой активности лекарственных средств [149]. Точную навеску испытуемых веществ (10 мг) помещали в пробирки и растворяли в 1 мл 0,01% раствора натрия гидроксида, а затем добавляли 9 мл воды очищенной. Получали исходное разведение исследуемых объектов (1000 мкг/мл). Путем последовательных разведений получали ряд убывающих концентраций. После этого в каждую пробирку засеивали по 0,2 мл культуры

патогенных грибов, равную по мутности 1 млрд. бактериального стандарта, разведенного в 10 раз. В качестве препарата сравнения использовали препарат «Нитрофунгин». Антигрибковую активность исследуемых образцов выражали в фунгистатическом титре, оцениваемом в весовых единицах (мкг на 1 мл питательной среды).

В качестве тест-культур использовали штаммы *Aspergillus niger* 163/3685, *Candida albicans* 4337, *Trichophyton rubrum* 248/700, *Trichophyton mentagrophites* var. *interdigitale* ВКПГ – 268, *Microsporum canis* ВКПГ – 326/316, полученные в отделе микологии центрального кожно-венерологического института Министерства Здравоохранения России (г. Москва) и во Всероссийской коллекции патогенных грибов при Всероссийском центре по глубоким микозам и микогенной аллергии (г. Санкт-Петербург).

Методы исследования гуминовых веществ in vivo. При исследовании гуминовых веществ in vivo все манипуляции с животными проводились в соответствии с этическими нормами и соблюдением правил гуманного обращения с лабораторными животными, отраженными в «Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей» (Страсбург, 1985) [199, 260]. Лабораторные животные содержались в соответствии с Приказом Минздравсоцразвития России от 23 августа 2010 г. № 708н «Об утверждении правил лабораторной практики», практическими рекомендациями «Этическая экспертиза биомедицинских исследований» [140].

При проведении всех исследований соблюдали принцип парных аналогов, т.е. животные контрольных и опытных групп подбирались с учетом половых и возрастных параметров, содержались в равнозначных условиях с одинаковым рационом кормления.

Исследование острой токсичности гуминовых веществ проводили на половозрелых белых беспородных мышах-самцах массой 17-19 г и половозрелых белых беспородных крысах массой 190-210 г.

Острую токсичность оценивали при однократном внутрижелудочном и внутрибрюшинном способах введения ГВ и ГВА. Для каждого препарата использовали 84 мыши и 84 крысы: по 6 голов на дозу и контроль. При выборе доз руководствовались данными о токсичности гуминовых кислот, которые, согласно ряда исследований, являются малотоксичными веществами [17]. Выбор максимальной дозы для внутрижелудочного и внутрибрюшинного способа введения определялся растворимостью препаратов в воде и максимальным допустимым объемом для данного способа введения и вида животного [149, 152]. Внутрижелудочно исследуемые вещества вводили животным в виде суспензии в крахмальном клейстере в дозах 2500, 4500 и 6500 мг/кг, контрольной группе вводили водный раствор крахмала. Внутрибрюшинно гуминовые вещества вводили в виде 7% водных растворов с рН=7,0 в дозах 750, 1250, 1750 мг/кг, контрольной группе вводили воду для инъекций в объеме максимальной дозы. Наблюдения за животными вели в течение 14 суток после введения. В период наблюдения оценивали наличие симптомов интоксикации, внешний вид животных, изменения двигательной активности, потребления корма и питья.

Изучение хронической токсичности гуминовых соединений проводили на 60 самцах и самках белых крыс. Животные были поделены на 10 групп (четыре опытные и одна контрольная для двух способов введения). Изучаемые гуминовые вещества вводили крысам опытных групп ежедневно внутрижелудочно и внутрибрюшинно в дозах 100 и 500 мг/кг в течение 30 календарных дней. Контрольным животным вводили воду для инъекций в объеме 0,2 мл. В период эксперимента оценивали общее состояние животных (внешний вид, состояние шерстного покрова и видимых слизистых оболочек, суточное потребление корма и воды, динамику изменения массы тела), их поведение, реакцию на внешние раздражители. В конце опыта у животных всех групп была взята кровь для гематологических и биохимических исследований, и проведено визуальное патоморфологическое исследование внутренних органов [152].

Оценку генотоксичности проводили методом ДНК-комет (Comet-assay), основанным на регистрации различной подвижности в постоянном электрическом

поле фрагментов ДНК лизированных клеток, заключенных в агарозный гель. Миграция ДНК к аноду приводит к появлению "хвоста", параметры которого зависят от степени поврежденности ДНК. Неповрежденная часть молекулы ДНК при визуализации имеет вид светящейся точки и носит рабочее название "голова".

Генотоксическую активность растворов гуминовых соединений изучали по сравнению с цитостатическим препаратом (положительным контролем), генотоксикантом сравнения - циклофосфамидом.

Эксперимент проводили на белых беспородных инбредных крысах-самцах массой 220-250 г, содержащихся в стандартных условиях вивария [140]. Все животные были рандомизированы на 12 групп по 6 особей в каждой.

Водные растворы натриевых солей гуминовых веществ в концентрации 1% и 7% вводили внутривентрикулярно или интраперитонеально в дозах 100 мг/кг и 500 мг/кг веса животного один раз в сутки на протяжении 12 дней. Препарат сравнения (циклофосфамид) вводили однократно в виде 2% раствора в принятой в такого рода исследованиях дозе 20 мг/кг веса животного [152]. Контрольной группе внутривентрикулярно или интраперитонеально вводили воду для инъекций в эквивалентных объемах.

По окончании эксперимента животных усыпляли под эфирным наркозом и производили забор венозной крови в количестве 1 мл в вакуумные пробирки типа Vacutainer. Кровь доставлялась на анализ в течение 30 мин.

Клетки крови обрабатывались в соответствии с методом ДНК-комет по следующим этапам: получение гель-слайдов с подложкой из агарозы и суспензии исследуемых клеток, помещение клеток в агарозный гель и нанесение на гель-слайды, лизис, щелочная денатурация, электрофорез, фиксация, окрашивание и микроскопический анализ [55, 127]. Электрофорез проводили в геле при напряжении 2 В/см в течение 15 минут. Для окрашивания использовали люминесцентный краситель SIBR Green I, степень повреждения ДНК фиксировали с помощью флуоресцентного микроскопа (ЛОМО, МИКМЕД 6, фильтр возбуждения, дихронное зеркало, запирающий фильтр, объектив 20X). Сканирование и обработку ДНК-комет выполняли с помощью программы CASP.

В работе использовали следующие реактивы: основной лизирующий раствор: 10 mM Tris-HCl (pH=10), 2,5 M раствор NaCl, 100 mM раствор натрия ЭДТА; рабочий лизирующий раствор: основной лизирующий раствор, Triton X-100 и ДМСО до конечных концентраций 1 и 10%. Для электрофореза применяли растворы: основные 10 M раствор NaOH (раствор А) и 200 mM раствор натрия ЭДТА (раствор Б); рабочий раствор для электрофореза – 300 mM раствор NaOH, 1 mM раствор натрия ЭДТА (pH>13). Фиксация микропрепаратов проводилась 70% раствором этилового спирта.

Длина "хвоста" ДНК-комет и другие измеряемые параметры (длина ДНК-комет, диаметр "головы" и т.д.) зависят от условий проведения экспериментальных исследований, в связи с чем для сопоставления полученных результатов был выбран критерий "TailDNA%" (доля ДНК в "хвосте" кометы), отражающий степень повреждения ДНК [57].

Изучение специфической активности сапропеля и гуминовых веществ проводили на половозрелых белых беспородных крысах массой 190-210 г.

Изучение ранозаживляющего действия сапропеля и гуминовых веществ проводили согласно руководству по проведению доклинических исследований лекарственных средств [152], при этом для удобства дозирования и нанесения указанных объектов использовалась их 5% суспензия в полиэтиленгликоле (ПЭГ-400).

Для создания модели ожоговой раны у 32 крыс-самцов под эфирным наркозом эпилировали кожу в межлопаточной области спины, термическое воздействие проводили с помощью заполненной кипящей водой стеклянной пробирки с плоским дном диаметром 16 мм. Время экспозиции - 30 сек. Лабораторные животные были рандомизированы на 4 группы по 8 особей в каждой. Интактной группе животных на ожоговую рану наносили растворитель (ПЭГ-400). Исследуемой группе 1 наносили сапропель в виде 5% суспензии в ПЭГ-400; исследуемой группе 2 - ГВ (5% суспензия в ПЭГ-400); исследуемой группе 3 – ГВА (5% суспензия в ПЭГ-400). Изучаемые составы и растворитель (ПЭГ-400) наносили по три капли в центр раны сразу же после формирования

ожога и далее каждый день до момента полного заживления. Динамику ранозаживления оценивали путем сравнения планиметрически измеренных площадей ожогов в группах и сопоставления времени полного заживления ожоговой раны. Измерения проводили на 1, 3, 7, 10 и 14-е сутки, общее время наблюдения – 19 суток.

Противовоспалительную активность определяли на модели отека, вызванного однократным субплантарным введением в заднюю конечность экспериментальным животным 0,1 мл 2% раствора флогогена - формалина [149]. Лабораторные животные были рандомизированы на 5 групп по 8 особей в каждой. Объектами исследования служили 5% суспензии сапропеля, гуминовых веществ и гуминовых веществ активированных в ПЭГ-400. В качестве позитивного контроля (препарата сравнения) использовали - препарат «Диклофенак» в виде геля. Суспензии образцов наносили на лапу (слегка втирая и накладывая пластырь с марлей) - за 2 часа до введения флогогена: исследуемой группе 1 - сапропель (5% суспензия в ПЭГ-400); исследуемой группе 2 – ГВ (5% суспензия в ПЭГ-400); исследуемой группе 3 – ГВА (5% суспензия в ПЭГ-400). Группе интактных животных наносили эквивалентное количество растворителя (ПЭГ-400). Животным контрольной группы по аналогичной схеме наносили гель «Диклофенак».

Об интенсивности воспаления (X) судили по массе отека через 3 часа, процент прироста отека рассчитывали по формуле:

$$X = \frac{m_6 - m_3}{m_3} \times 100\% , \text{ где}$$

m_6 – масса больной конечности, г;

m_3 – масса здоровой конечности, г.

Критерием эффективности по данному тесту принято считать достоверное уменьшение отека лапы не меньше чем на 30 % по сравнению с контролем [149].

Результаты исследований

Результаты исследования противогрибковой активности сапропеля, ГВ и ГВА представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Противогрибковые свойства объектов исследования

Объекты исследования	Фунгистатический титр тест-культур (мкг/мл)				
	Trichophyton mentagrophytes	Trichophyton rubrum	Microsporium canis	Aspergillus niger	Candida albicans
Исследуемая группа 1 (сапропель)	125	125	62,5	н/а	н/а
Исследуемая группа 2 (ГВ)	62,5	62,5	62,5	н/а	н/а
Исследуемая группа 3 (ГВА)	62,5	62,5	31,2	н/а	н/а
Контрольная группа (препарат сравнения – нитрофунгин)	15,6	15,6	15,6	125	500

Примечание: н/а – антигрибковой активности не наблюдалось при концентрации вещества в 1000 мкг/мл.

Исследуемые объекты неэффективны в отношении штаммов *Aspergillus niger* и *Candida albicans*. В то же время ГВ и ГВА задерживают рост возбудителей дерматофитии и микроспории (*Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton rubrum* и *Microsporium canis*), но уступают препарату «Нитрофунгин».

При изучении острой токсичности ГВ и ГВА установлено, что исследованные вещества во всех дозах не вызывали гибели животных в течение 2 недель наблюдения. Общее состояние и поведение животных по всем показателям не отличалось от контрольных групп. Согласно существующей классификации (ГОСТ 12.1.007-76), исследуемые вещества соответствуют IV классу «Вещества малоопасные» ($LD_{50} > 5000$ мг/кг массы тела). Введение заведомо токсичной дозы (6500 мг/кг) мышам и крысам per os также не вызывало гибели животных.

В эксперименте по оценке хронической токсичности установлено, что изучаемые соединения не вызывали изменений общего состояния, поведения животных, клинические симптомы отравления отсутствовали. В опытных группах наблюдалось изменение внешнего вида крыс: увеличение длины стержня волоса на спинной и боковой дорожках линии волосяного покрова, по сравнению с контролем. Животные равномерно прибавляли в массе.

Результаты гематологического анализа крови крыс представлены в таблице 2.

Таблица 2 – Гематологические показатели крови крыс после 30-ти дневного введения гуминовых веществ в дозе 100 и 500 мг/кг ($X \pm \sigma x$, X – среднее значение, σx – стандартная ошибка среднего, n – количество животных в группе)

Показатель, ед. измерения	Норма**	Группа				
		Контрольная, n=6	ГВ		ГВА	
			100 мг/кг, n=6	500 мг/кг, n=6	100 мг/кг, n=6	500 мг/кг, n=6
1	2	3	4	5	6	7
Внутрижелудочный способ введения						
Лейкоциты, $10^9/\text{л}$	3-17	7,28±1,02	7,19±1,11	8,72±1,76	7,21±1,01	7,97±1,34
Эритроциты, $10^{12}/\text{л}$	5-10	7,58±0,44	7,57±0,68	7,58±0,83	7,66±0,83	7,92±0,77
Тромбоциты, $10^9/\text{л}$	200- 1500	583,7±20,9	577,3±20,6	605,3±19,8	582,0±18,1	619,0±20,5
Гемоглобин, г/л	110- 190	134,0±4,6	135,4±5,7	138,0±5,0	135,1±4,2	138,9±5,3
Гематокрит, %	34–48	46,04±1,30	46,20±1,27	44,06±1,27	46,09±1,29	43,21±1,30
Нейтрофилы, %	13-26	20,94±7,01	21,11±8,80	21,32±7,96	22,07±5,14	20,9±7,61
Лимфоциты, %	65-83	69,88±7,56	71,2±8,52	70,9±7,58	70,65±7,90	70,76±8,24
Моноциты, %	0-4	2,60±1,72	2,67±1,67	2,97±2,05	2,44±1,87	2,7±1,79
Эозинофилы, %	0-4	1,49±0,62	1,45±0,77	1,46±0,80	1,66±0,69	1,4±0,84
Базофилы, %	0-1	0	0	0	0	0
Внутрибрюшинный способ введения						
Лейкоциты, $10^9/\text{л}$	3-17	7,30±1,06	8,13±1,06	15,72±1,93*	7,81±0,59	10,30±1,12
Эритроциты, $10^{12}/\text{л}$	5-10	7,59±0,11	7,67±0,80	8,18±0,74	7,86±0,91	8,10±0,91
Тромбоциты, $10^9/\text{л}$	200- 1500	591,3±30,5	627,3±27,3	835,3±21,4*	602,0±21,7	819,0±16,4*
Гемоглобин, г/л	110- 190	132,4±5,1	136,1±6,0	143,1±4,8*	138,5±4,6	148,5±3,6*
Гематокрит, %	34–48	45,74±1,52	43,22±1,30	40,57±1,23*	41,09±1,31	38,80±1,46*
Нейтрофилы, %	13-26	20,77±8,94	21,29±7,19	25,29±6,15	20,87±6,32	24,87±4,53
Лимфоциты, %	65-83	72,63±9,96	69,23±8,71	65,85±8,01	71,09±5,20	67,00±5,86
Моноциты, %	0-4	2,59±1,52	2,81±1,85	4,81±2,29	2,56±2,03	3,77±2,58
Эозинофилы, %	0-4	1,91±0,85	1,92±0,82	1,97±0,77	1,98±0,74	2,16±0,68
Базофилы, %	0-1	0	0	0	0	0

Примечания: *результаты опытных групп статистически значимо отличаются от контрольной группы с $p < 0,05$, **[149, 266]

В группах, получавших ГВ в дозе 500 мг/кг внутрибрюшинно, установлено статистически значимое увеличение числа лейкоцитов (в 2,2 раза) и тромбоцитов (на 41%), также вырос гемоглобин (на 8%) и снизился гематокрит (на 11%). В группах, получавших ГВА в дозе 500 мг/кг внутрибрюшинно, установлено статистически значимое увеличение количества тромбоцитов (на 38%), гемоглобина (на 12%) и снижение гематокрита (на 15%). Следует отметить, что все перечисленные изменения находятся в пределах физиологической нормы для данного вида животных. При внутрижелудочном способе введения исследуемых веществ статистически значимых отличий гематологических показателей в опытных и контрольных группах не установлено.

Результаты биохимического анализа сыворотки крови крыс после курса введения ГВ и ГВА (таблица 3) показывают отсутствие статистически значимых изменений в сравнении с контрольной группой, что может свидетельствовать об отсутствии негативного влияния гуминовых веществ на функциональную деятельность внутренних органов животных.

Таблица 3 – Биохимические показатели сыворотки крови крыс после 30-ти дневного введения гуминовых веществ в дозе 100 и 500 мг/кг ($X \pm \sigma x$, X – среднее значение, σx – стандартная ошибка среднего, n – количество животных в группе)

Показатель, ед. измерения	Группа				
	контрольная, n=6	ГВ		ГВА	
		100 мг/кг, n=6	500 мг/кг, n=6	100 мг/кг, n=6	500 мг/кг, n=6
1	2	3	4	5	6
Внутрижелудочный способ введения					
Общий белок, г/л	67,10±4,90	67,30±4,70	68,00±5,10	66,90±5,70	68,80±6,00
Глюкоза, ммоль/л	5,60±1,20	5,50±1,20	5,70±1,10	5,70±1,00	5,70±1,10
Мочевина, ммоль/л	5,55±1,04	5,61±1,19	5,48±1,18	5,54±1,08	5,63±1,13
Креатинин, мкмоль/л	59,70±1,80	60,00±1,80	60,70±1,50	59,60±1,60	60,00±1,30
АсАТ, Е/л	143,30±7,80	142,10±11,40	144,60±10,70	142,10±10,30	143,00±12,10
АлАТ, Е/л	129,60±10,80	129,60±11,00	132,10±10,40	129,70±9,80	130,30±10,10
Щелочная фосфатаза, Е/л	246,30±24,00	248,40±22,80	250,60±27,30	247,80±21,60	251,10±22,10

Внутрибрюшинный способ введения					
1	2	3	4	5	6
Общий белок, г/л	68,40±5,70	69,10±4,90	71,10±6,00	65,50±6,40	69,50±5,80
Глюкоза, ммоль/л	5,60±1,10	5,40±1,60	6,00±1,00	5,70±0,80	5,90±1,10
Мочевина, ммоль/л	5,53±1,06	5,73±1,22	5,42±1,13	5,34±1,19	5,70±1,08
Креатинин, мкмоль/л	60,20±1,20	60,10±2,10	63,10±1,80	59,40±1,50	60,40±1,60
АсАТ, Е/л	141,30±9,00	140,20±10,30	146,60±11,60	141,10±12,30	144,00±10,70
АлАТ, Е/л	128,90±11,50	130,30±10,50	136,30±9,40	129,40±10,80	137,80±11,10
Щелочная фосфатаза, Е/л	247,60±21,20	257,40±23,20	268,40±29,70	250,80±19,40	253,80±26,20

При патоморфологическом исследовании было отмечено потемнение цвета гиподермы в месте введения растворов гуминовых веществ, местно-раздражающего действия не обнаружено. Внешний осмотр состояния внутренних органов патологических изменений не выявил.

Таким образом, гуминовые вещества сапропеля и гуминовые вещества, подвергнутые УФ облучению на стадии выделения, при внутрижелудочном введении мышам и крысам являются малотоксичными и относятся к IV классу опасности. Гуминовые вещества и гуминовые вещества активированные при многократном внутрижелудочном и внутрибрюшинном введении крысам в течение месяца в дозах 100 и 500 мг/кг не вызывают нарушений функционального состояния основных органов и систем организма.

Для дальнейшей оценки безопасности гуминовых веществ было изучено их воздействие на клеточный генетический материал, и, таким образом, определена *степень генотоксичности* биологически активных компонентов сапропеля.

Результаты оценки генотоксического эффекта гуминовых веществ и гуминовых веществ активированных при внутрижелудочном введении приведены в таблице 4.

Таблица 4 – Исследование ДНК-повреждений при внутрижелудочном введении растворов (для каждой группы n=6, $X \pm m$, X – среднее значение, m – ошибка среднего)

Группы Показатель	Контрольная группа	Опытная группа 1 (ГВ)		Опытная группа 2 (ГВА)		Опытная группа 3 (Циклофосфамид)
		100 мг/кг	500 мг/кг	100 мг/кг	500 мг/кг	20 мг/кг
TailDNA%	1,9 ± 0,28	3,1 ± 0,39*	6,3 ± 0,64*	1,8 ± 0,25	2,0 ± 0,26	5,7 ± 0,59*

Примечание: *результаты опытных групп статистически значимо отличаются от контрольной группы с $p < 0,05$

Изучение степени деградации ДНК ядросодержащих клеток крови крыс при внутрижелудочном введении растворов ГВА в дозах 100 и 500 мг/кг не выявило статистически значимых отличий от контрольной группы при $p < 0,05$ (таблица 4).

На микрофотографиях (рисунок 1) отчетливо просматривается яркое ядро при практически полном отсутствии "хвоста", что свидетельствовало об отсутствии генотоксического эффекта в контрольной группе (рисунок 1а) и при внутрижелудочном введении обеих доз ГВА (рисунок 1б и 1в) в отличие от клеток с поврежденной ДНК после введения циклофосфамида (рисунок 1г).

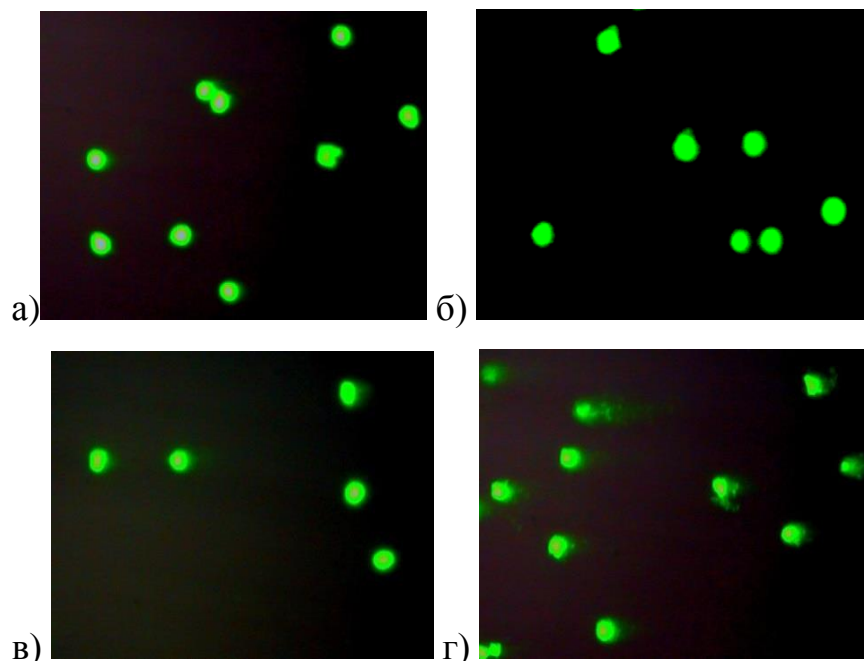


Рисунок 1 – Микрофотографии ДНК-комет ядросодержащих клеток крови крыс после внутрижелудочного введения: а) воды для инъекций (контрольная группа), б) раствора ГВА в дозе 100 мг/кг, в) раствора ГВА в дозе 500 мг/кг, г) раствора циклофосфамида

Выраженный генотоксический эффект по сравнению с контролем наблюдается при внутрижелудочном введении ГВ. Так, введение раствора ГВ в дозе 100 мг/кг (рисунок 2а) приводит к увеличению ДНК-повреждений в 1,6 раза ($p < 0,05$) по отношению к контрольной группе.

В ходе проведенного исследования установлено, что генотоксичность раствора ГВ в дозе 500 мг/кг сопоставима с таковой для циклофосфида и сопровождается трехкратным повышением поврежденности ДНК (рисунок 2б) по сравнению с контролем.

Таким образом, нами установлена дозозависимость генотоксического эффекта растворов ГВ при внутрижелудочном введении.

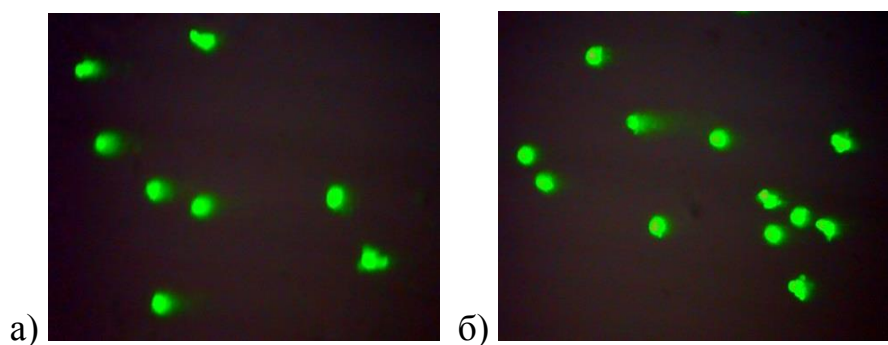


Рисунок 2 – Микрофотографии ДНК-комет ядродержащих клеток крови крыс после внутрижелудочного введения: а) раствора ГВ в дозе 100 мг/кг, б) раствора ГВ в дозе 500 мг/кг

В таблице 5 представлены результаты изучения ДНК-повреждений лейкоцитов периферической крови крыс при внутрибрюшинном введении исследуемых веществ.

Таблица 5 – Исследование ДНК-повреждений при внутрибрюшинном введении растворов (для каждой группы $n=6$, $X \pm m$, X – среднее значение, m – ошибка среднего)

Группы / Показатель	Контрольная группа	Опытная группа 1 (ГВ)		Опытная группа 2 (ГВА)		Опытная группа 3 (Циклофосфамид)
		100 мг/кг	500 мг/кг	100 мг/кг	500 мг/кг	20 мг/кг
TailDNA%	$2,1 \pm 0,30$	$3,7 \pm 0,48^*$	$6,4 \pm 0,65^*$	$2,0 \pm 0,26$	$2,0 \pm 0,27$	$6,7 \pm 0,68^*$

Примечание: *результаты опытных групп статистически значимо отличаются от контрольной группы с $p < 0,05$

Результаты изучения генотоксической активности при внутрибрюшинном введении растворов ГВ в дозах 100 и 500 мг/кг демонстрируют повышение уровня поврежденности ДНК в 2 раза по отношению к контролю ($p < 0,05$). Наибольшая степень повреждения ДНК лейкоцитов периферической крови крыс зарегистрирована при внутрибрюшинном введении циклофосфида и раствора ГВ в дозе 500 мг/кг (увеличение в 3,2 и 3 раза соответственно).

При данном способе введения растворов ГВА в дозах 100 и 500 мг/кг не выявлено статистически достоверного ($p < 0,05$) повышения генотоксичности исследуемых веществ по сравнению с контрольной группой, что, возможно, связано с изменением их состава и структуры в результате воздействия УФ-света в процессе их извлечения [155].

Исследование генотоксических свойств гуминовых соединений, выделенных из озерного сапропеля разными методами, указывает на очевидную связь между влиянием вводимых соединений и цитогенетической нестабильностью, что свидетельствует об их генотоксическом воздействии на ядродержащие клетки крови крыс.

Проведенные методом ДНК-комет исследования выявили наличие разной степени специфической активности растворов ГВ и ГВА на фоне отсутствия общетоксических свойств [157].

Установлен дозозависимый эффект проявления генотоксичности при внутрижелудочном и внутрибрюшинном способах введения растворов ГВ, которые индуцируют ДНК-повреждения ядродержащих клеток крови крыс, что приводит к нарушению целостности ДНК и может привести к мутациям. Следовательно, исследуемые ГВ обладают мутагенностью и могут быть потенциальными канцерогенами, поскольку мутагенез следует рассматривать как первичный механизм инициации канцерогенеза [54, 212].

Показано, что растворы ГВА по сравнению с растворами ГВ в дозах 100 и 500 мг/кг не имеют выраженной и статистически достоверной (при $p < 0,05$) генотоксической активности в отношении лейкоцитов периферической крови крыс. Выявленные в ходе исследований различия в фармакодинамике ГВ и ГВА,

на наш взгляд, могут быть объяснены способами получения данных соединений и изменением их структуры, состава и свойств.

Результаты исследований специфической фармакологической активности ГВ и ГВА. Для обоснования использования гуминовых веществ в медицинской практике нами была проведена оценка их фармакологических свойств. При выборе фармакологических тестов руководствовались сведениями научной литературы и результатами проведенных физико-химических исследований.

Результаты исследования ранозаживляющей активности сапропеля, ГВ и ГВА представлены в таблице 6. Полученные данные показывают, что в начальный период (1-3 сут.) лечение практически не влияет на течение ожоговой травмы. Планиметрические измерения площади термического ожога свидетельствуют, что достоверные отличия в скорости заживления ран относительно интактной группы животных наблюдались с 7 суток эксперимента, при этом наибольшая эпителизация была зафиксирована в исследуемой группе 3 (23 % относительно интактной группы животных).

Таблица 6 – Результаты оценки ранозаживляющей активности исследуемых объектов (n = 8; $X \pm m$, X – среднее значение, m – доверительный интервал)

Группы животных	Площадь термического ожога, мм ²					Время полного заживления с восстановлением волосяного покрова, сут
	1 сутки	3 сутки	7 сутки	10 сутки	14 сутки	
Интактная (ПЭГ-400)	245,1±3,9	250,4±6,8	226,4±5,7	179,8±6,3	30,1±7,2	19
Исследуемая группа 1 (сапропель)	250,3±2,7	248,1±3,9	208,0±4,1*	132,1±4,7*	21,6±5,1*	18
Исследуемая группа 2 (ГВ)	252,9±5,3	250,6±4,9	196,7±5,1*	144,2±3,7*	20,6±4,9*	18
Исследуемая группа 3 (ГВА)	254,0±4,2	239,3±3,6	175,2±4,8*	115,6±5,0*	10,9±6,4*	17

Примечание: * различия статистически достоверны при $p \leq 0,05$ по сравнению с интактной группой

На 14 сутки процент уменьшения площади ожога относительно исходных значений составил: для исследуемой группы 1 – 91,37 %, исследуемой группы 2 – 91,85 %, исследуемой группы 3 – 95,70 %. Среднее время заживления термической раны с восстановлением волосяного покрова составило 18 суток, при этом наименьшее значение наблюдалось в исследуемой группе 3 (17 суток).

Установлено, что сапропель, ГВ и ГВА обладают ранозаживляющей активностью, приводят к достоверному уменьшению площади раны уже на 7 сутки и сокращению сроков заживления по сравнению с интактной группой. При этом наибольшей активностью обладают ГВА, а ранозаживляющее действие ГВ находится на уровне сапропеля. Следует отметить, что при нанесении исследуемых соединений на кожу экспериментальных животных не было зафиксировано наличие раздражающего эффекта.

Результаты оценки противовоспалительной активности сапропеля, ГВ и ГВА представлены в таблице 7. При субплантарном введении 2 % раствора формалина наблюдалось формирование воспалительного отека задней конечности у крыс, прирост массы отека при этом составлял в среднем 65,52 %. Применение геля «Диклофенак» (препарата сравнения) снижало прирост массы отека на 39,9 % по сравнению с интактной группой животных.

Таблица 7 – Результаты изучения противовоспалительной активности объектов исследования ($n = 8$; $X \pm m$, X – среднее значение, m – доверительный интервал)

Группы животных	Прирост массы отека лапы после введения формалина, %	Уменьшение массы отека (среднее значение), %
Интактная (контроль растворителя)	$65,52 \pm 2,82$	–
Контрольная (препарат сравнения – Диклофенак)	$39,35 \pm 2,27^*$	39,9
Исследуемая группа 1 (сапропель)	$50,65 \pm 4,68^{* \#}$	22,7
Исследуемая группа 2 (ГВ)	$47,63 \pm 3,0^{* \#}$	27,3
Исследуемая группа 3 (ГВА)	$45,14 \pm 2,25^{* \#}$	31,1

Примечание. Различия статистически достоверны при $p \leq 0,05$: * – по сравнению с контролем; # – с препаратом сравнения (диклофенак)

Как видно из таблицы 7, все исследуемые объекты проявили местное антиэкссудативное действие и препятствовали развитию острой воспалительной реакции у животных. Активность сапропеля и ГВ практически одинакова, под воздействием ГВА отек уменьшился на 31,1 %.

Критерием эффективности противовоспалительного действия следует считать достоверное уменьшение отека лапы не меньше чем на 30% по сравнению с интактной группой [149]. Из всех изучаемых объектов данный показатель превышает только ГВА, при этом среднее значение угнетения отека в случае применения ГВ близко к 30 %. Следует отметить, что противовоспалительная активность всех исследуемых образцов уступает препарату сравнения – диклофенаку.

Наличие ранозаживляющего и противовоспалительного действия ГВ и ГВА можно связать с их антиоксидантной активностью, так как одним из факторов воспаления является генерация активных форм кислорода, связывание которых и приводит к уменьшению воспалительной реакции и ускорению процессов заживления раны.

Более высокая ранозаживляющая и противовоспалительная активность ГВА по сравнению с ГВ возможно связана с изменением их состава и структуры на стадии выделения под действием УФ-света.

Таким образом, обобщая полученные результаты, можно сделать вывод о том, что ГВ и ГВА обладают низкой токсичностью (IV класс – «вещества малоопасные»). Однако установлен дозозависимый эффект проявления генотоксичности растворов ГВ при их внутрижелудочном и внутрибрюшинном введении экспериментальным животным. Растворы ГВА по сравнению с растворами ГВ не имеют выраженной и статистически достоверной (при $p < 0,05$) генотоксической активности.

Скрининговые исследования фармакологической активности гуминовых веществ *in vitro* и *in vivo* выявили наличие у них антигрибковых, ранозаживляющих и противовоспалительных свойств.

В целом, ГВ и ГВА обладают разной степенью специфической фармакологической активности, при этом наиболее перспективными для внедрения в медицинскую практику являются гуминовые вещества активированные. На наш взгляд, сочетание противовоспалительной, ранозаживляющей и антигрибковой активности ГВА определяет перспективность создания на их основе лекарственных форм для комплексной терапии кожных повреждений различной этиологии.

Результаты экспериментального изучения свойств ГВ как генотоксикантов предполагает наличие у них цитостатической активности, что при дальнейшем изучении, возможно, предопределит их применение в качестве цитостатических препаратов.

Выявленные фармакологические эффекты гуминовых веществ связаны с наличием в их структуре определенных функциональных групп и, в целом, объясняются свойствами исследуемых соединений.

Приложение 5

УТВЕРЖДАЮ

Директор ООО «Биолит»

В.Н. Буркова

«23» сентября 2014 г.

М.П.

АКТ ВНЕДРЕНИЯ



1. Предложение для внедрения: Методические рекомендации «Количественное определение функциональных групп кислотного характера в гуминовых веществах методом Бозма с кондуктометрической фиксацией конечной точки титрования».

2. Кем разработано: коллективом авторов фармацевтического факультета ГБОУ ВПО «Омская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 2014 г.


3. Авторы: старший преподаватель кафедры фармацевтической, аналитической и токсикологической химии ГБОУ ВПО ОмГМА, И.А. Савченко, зав. кафедрой фармацевтической, аналитической и токсикологической химии ГБОУ ВПО ОмГМА, канд. фарм. наук Е.А. Лукша.

4. Где внедрено: ООО «Биолит», г. Томск.

5. Эффективность внедрения: обеспечение контроля качества лекарственного вещества «Гуминовые вещества активированные сапропеля».

6. Замечания и предложения: целесообразно рекомендовать использование при контроле качества лекарственного вещества «Гуминовые вещества активированные сапропеля».

Ответственный за внедрение

 (Буркова Е.В.)

УТВЕРЖДАЮ

Ректор ФГБОУ ВПО ОмГАУ

им. П.А. Столыпина

С.Л. Петуховский

«19» сентября 2014 г.

**АКТ ВНЕДРЕНИЯ**

(использования) результатов диссертационной работы

Савченко Ирины Александровны,

представленной на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук по специальности 14.04.02 – фармацевтическая химия, фармакогнозия


Комиссия в составе:

Председатель комиссии: начальник научно-исследовательского отдела ФГБОУ ВПО ОмГАУ Чарушин В.В.

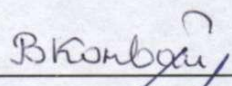

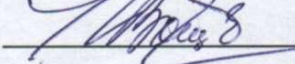
Члены комиссии: научный консультант лаборатории резистентности животных ИВМиБ ОмГАУ, доктор медицинских наук, профессор Конвай В.Д., канд. вет. наук, доцент Зайнчковский В.И., канд. вет. наук, научный сотрудник лаборатории Вошатынский Е.И.

составили настоящий акт о том, что результаты диссертационной работы Савченко И.А., оформленные в виде методической рекомендации «Количественное определение функциональных групп кислотного характера в гуминовых веществах методом Боэма с кондуктометрической фиксацией конечной точки титрования», используются при проведении научно-исследовательских работ в лаборатории резистентности животных института ветеринарной медицины и биотехнологии федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего профессионального образования «Омский государственный аграрный университет имени П.А. Столыпина».

Председатель:


 _____ В.В. Чарушин

Члены комиссии:


 _____ В.Д. Конвай

 _____ В.И. Зайнчковский

 _____ Е.И. Вошатынский



УТВЕРЖДАЮ
Ректор ГБОУ ВПО ТюмГМА
Минздрава России
И. В. Медведева
2014 г.

АКТ ВНЕДРЕНИЯ

(использования) результатов диссертационной работы

Савченко Ирины Александровны

**«Химико-фармакологическое исследование
гуминовых веществ сапропеля озера Гочаково»,**

представленной на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук по специальности 14.04.02 – фармацевтическая химия, фармакогнозия

Комиссия в составе:

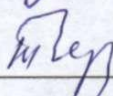
Председатель - заведующий кафедрой фармацевтической химии, д-р фарм. наук, профессор Д. Ф. Нохрин; члены комиссии: доцент кафедры фармацевтической химии, канд. хим. наук Т. П. Чурина, доцент кафедры фармацевтической химии, канд. фарм. наук Л. И. Котлова

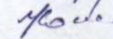
составили настоящий акт о том, что результаты диссертационной работы И. А. Савченко, оформленные в виде методической рекомендации «Количественное определение функциональных групп кислотного характера в гуминовых веществах методом Бозма с кондуктометрической фиксацией конечной точки титрования» внедрены в учебный и научно-исследовательский процесс студентов, интернов и соискателей кафедры фармацевтической химии Государственного бюджетного образовательного учреждения высшего профессионального образования «Тюменская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации (Тюменская область, г. Тюмень, ул. Одесская д. 54) при разработке экспериментальных методик количественного определения биологически активных соединений в лекарственном сырье природного происхождения.

Председатель:


_____ Д. Ф. Нохрин

Члены комиссии:

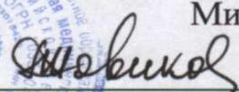

_____ Т. П. Чурина


_____ Л. И. Котлова

УТВЕРЖДАЮ

Ректор ГБОУ ВПО ОмГМА

Минздрава России

 А.И. Новиков

«10» октября 2014 г.

**АКТ ВНЕДРЕНИЯ**

(использования) результатов диссертационной работы

Савченко Ирины Александровны,

представленной на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук по специальности 14.04.02 – фармацевтическая химия, фармакогнозия

Комиссия в составе:

Председатель – заведующая кафедрой фармацевтической, аналитической и токсикологической химии канд. фарм. наук, доцент Лукша Елена Александровна; члены комиссии: канд. хим. наук, доцент Корнеева Ирина Николаевна, канд. фарм. наук, ст. преподаватель Погодин Илья Сергеевич

составили настоящий акт о том, что результаты диссертационной работы И. А. Савченко, оформленные в виде методической рекомендации «Количественное определение функциональных групп кислотного характера в гуминовых веществах методом Боэма с кондуктометрической фиксацией конечной точки титрования», внедрены в учебный процесс кафедры фармацевтической, аналитической и токсикологической химии при подготовке обучающихся по дисциплине «фармацевтическая химия» и интернов по специальности «фармацевтическая химия и фармакогнозия» Государственного бюджетного образовательного учреждения высшего профессионального образования «Омская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации (644043 Омская область, г. Омск, ул. Ленина, 12) при разработке экспериментальных методик количественного определения биологически активных соединений в лекарственном сырье природного происхождения.

Председатель:



Е. А. Лукша

Члены комиссии:




И. Н. Корнеева

И. С. Погодин