

УДК 547.992.2, 537.363

Пурыгин П.П., Потапова И.А., Воробьев Д.В.
ГУМИНОВЫЕ КИСЛОТЫ: ИХ ВЫДЕЛЕНИЕ, СТРУКТУРА И
ПРИМЕНЕНИЕ В БИОЛОГИИ, ХИМИИ И МЕДИЦИНЕ

Самарский государственный университет, Центр медицинских инноваций
доктора Воробьева Д.В.

Введение

Гуминовые вещества есть почти повсюду в природе. Это основная органическая составляющая почвы, воды, а также твердых горючих ископаемых. Гуминовые кислоты содержатся в таких породах как бурый уголь, сапрпель и торф. Бурый уголь больше всего содержит гуминовых кислот до 86%, то есть отходы добычи бурого угля – основной источник гуминовых веществ, а это решает многие экологические проблемы.

Возможности гуминовых веществ безграничны, они находят практическое применение в различных областях промышленности: так, они могут быть использованы, например, в медицине, в ветеринарии, в нефтедобывающей промышленности, где они применяются для рекультивации нефтезагрязненных почв, выполняя протекторную функцию, связывая тяжелые металлы, радионуклиды и органические токсиканты, тем самым препятствуя попаданию их в почву.

1. Актуальность проблемы

Современными научными исследованиями установлено, что гуминовые препараты безвредны для животных и человека, не обладают аллергенным, анафилактическим, тератогенным, эмбриотоксическим и канцерогенным действием при использовании в рекомендуемых дозах.

В настоящее время гуминовые кислоты нашли широкое применение в косметологии и грязелечении, как БАДы, так как они могут сорбировать ксенобиотики и антигены, производные гуминовых кислот могут применяться в

качестве редокс- и комплексообразующих агентов. В нефтеперерабатывающей промышленности гуминовые кислоты применяют для рекультивации нефтезагрязненных земель.

В связи с этим имеется большая потребность в этих эффективных, экологически безопасных препаратах, какими и являются препараты на основе гуминовых кислот.

История изучения гуминовых веществ насчитывает более двухсот лет. Впервые немецкий химик Ф. Ахард выделил их из торфа и сообщил о них в 1786 г [1], поэтому именно немецкие ученые разрабатывали первые схемы выделения и классификации гуминовых веществ, а также ввели и сам термин – «гуминовые вещества» (производное от латинского *humus* – «земля» или «почва»). Гуминовыми веществами занимались и русские, и советские ученые, а также исследователи из зарубежных стран. В 1981 г. было принято решение о создании Международного общества по изучению гуминовых веществ (International Humic Substances Society – IHSS). Среди ученых, которые активно занимались и занимаются исследованием гуминовых веществ, следует назвать проф. д.б.н. Д.С. Орлова и проф. д.х.н. И.В. Перминову (МГУ) [1].

Как известно, биосфера включает в себя 3 основных компонента: живое вещество; биогенное вещество (органо-минеральные и органические продукты, созданные живым веществом); биокосное вещество (минеральные вещества, образующиеся в результате взаимодействия живых организмов с неживой природой) [1, 2].

Органические вещества, которые входят в состав почв – важнейшего компонента биосферы, делятся по своему происхождению, характеру и функциям на 2 большие группы: органические остатки и гумус.

Гумус играет одну из главных ролей в круговороте веществ в природе и поддержании почвенного плодородия, а гуминовые вещества являются основной частью органического вещества почвы – гумуса. Они участвуют в миграции катионов, снижают негативное действие токсичных веществ, влияют на развитие организмов и тепловой баланс планеты.

В отличие от синтеза биополимеров, протекающего по заданному генетическому коду, процесс образования гуминовых веществ подчиняется статистическим принципам [3–5]. По этой причине ГВ представляют собой смесь макромолекул переменного состава и нерегулярного строения [6, 7].

Гуминовые вещества состоят из гумусовых кислот, гумина и прогуминовых веществ.

Термин «гумусовые кислоты» применяют в качестве обобщающего названия, обозначающего гуминовые, фульвокислоты и гиматомелановые кислоты, которые разделяют по их растворимости в кислотах и щелочах [5, 6, 8, 9].

Гуминовые и фульвокислоты представляют собой смесь высокомолекулярных соединений, имеющих в своем составе различные функциональные группы, способные к химическим взаимодействиям.

Гуминовые кислоты – фракция, группа гумусовых кислот, растворимая в щелочах и нерастворимая в кислотах (при $\text{pH} < 2$). Химический состав молекул гуминовых кислот в черноземных почвах можно выразить брутто-формулой $\text{C}_{18}\text{H}_{15}\text{O}_8\text{N}$. Их соли носят название гуматов. ГК слабо растворимы в воде, с одновалентными катионами (K^+ , Na^+ , NH_4^+) образуют водорастворимые соли, а с двух- и трехвалентными катионами (Ca^{2+} , Mg^{2+} , Al^{3+} , Fe^{3+}) легко выпадают в осадок.

Гуминовые кислоты имеют разветвленную молекулярную структуру, включающую большое количество функциональных групп и активных центров, в них содержатся: азот, калий, фосфор, а так же такие микроэлементы, как молибден, медь, цинк, железо и т.д., все это обуславливает физические, химические и биологические свойства гуминовых кислот и их влияние на растения и почву.

Гиматомелановые кислоты (ГМК) – группа гумусовых кислот, растворимых в этаноле, которые выделяются экстракцией этиловым спиртом из гуминовой кислоты. В растворе имеют вишнёво-красный цвет. Впервые выделены и описаны немецким физиологом Хоппе-Зейлером (Hoppe-Seyler)

в 1889 г. Большой вклад в изучение гиматомелановых кислот внесла Г.И. Глебова из МГУ им. М.В. Ломоносова.

ГМК содержат метоксильные, карбоксильные и гидроксильные группы, для них характерно высокое содержание углерода (более 60%), высокая интенсивность полосы $1700\text{--}1720\text{ см}^{-1}$ в инфракрасных спектрах [10].

Фульвокислоты – фракция, растворимая и в щелочах, и в кислотах, Эта фракция остается после осаждения гуминовых. Химический состав фульвокислот можно выразить брутто-формулой $C_{14}H_{19}O_{12}N$ (по Д.С. Орлову). Фульвокислоты более светлые по окраске, чем гуминовые кислоты, в них содержится меньшее количество углерода, хорошо растворяются в воде. С катионами натрия, магния, калия и т.д. образуют соли, хорошо растворяющиеся в воде. Ионами кальция и бария в сильнощелочной среде ($pH > 10$) часть ФК может осаждаться. С трёхвалентными катионами ФК, в зависимости от условий, при которых протекает реакция, могут или выпадать в осадок, или образовывать водорастворимые комплексные соединения. Фульвокислоты можно рассматривать либо как продукты разложения гуминовых кислот, либо их предшественников [11].

Гумин – это тот остаток, который остается после извлечения гуминовых кислот, он не растворяется в воде и представляет собой совокупность ГК и ФК, которые прочно связаны с минералами, а также некоторые неспецифические соединения (например, целлюлоза, хитин, лигнин, углистые частицы и др.) [12].

Прогуминовые вещества (или меланины) представляют собой высокомолекулярные темноокрашенные пигменты биогенного происхождения, образующиеся при окислительной полимеризации фенольных соединений, включая и азотсодержащие [13].

Подвиды гумусового вещества

Фракция	Щелочь	Кислота	Спирт
Фульвокислота	Растворимая	Растворимая	–
Гиматомелановая кислота	Растворимая	Нерастворимая	Растворимая
Гуминовая кислота	Растворимая	Нерастворимая	Нерастворимая
Гумин	Нерастворимая	Нерастворимая	Нерастворимая

2. Последние разработки по перспективным технологиям для получения гуминовых препаратов

О способе выделения гуминовой кислоты из торфа Ф. Ахард писал так: «Экстракты из торфа, полученные посредством каустической щелочи, я насытил купоросной кислотой. Смесь потемнела и казалась темно-коричневой, почти черной, осадок опустился на дно» [1]. Этот способ применяют практически до сих пор для выделения ГВ из любых природных тел. Иными словами, ГВ извлекают растворами щелочей, затем осаждают кислотой гуминовые кислоты и гиматомелановые кислоты, тогда как в растворе остаются фульвокислоты и неспецифические вещества [14].

Степень извлечения ГК существенно зависит от условий экстракции: от вида реагентов, концентрации растворов, времени контакта торфа с раствором, температуры, соотношения объемов торфа, бурых углей и раствора [14].

Из последних работ по перспективным технологиям для получения гуминовых препаратов на сегодняшний день являются следующие:

1. Экстракция с окислением торфа пероксидом водорода, показавшая самую высокую степень экстрагирования. Экстракция с ультразвуковой обработкой раствора также может стать эффективным способом получения гуминовых препаратов, принимая во внимание сокращение продолжительности процесса [15].

2. Технология получения из бурого угля растворимых гуминовых веществ, которая заключается в переводе органической массы угля в водорастворимые продукты при обработке угля пероксидом водорода в водно-органической среде при комнатной температуре и нормальном давлении.

3. Н.В. Чухарева исследовала методы извлечения гуминовых кислот. По ее мнению, выделение гуминовых кислот необходимо проводить, не нарушая строения ядра их молекул и без примесей органических и неорганических соединений, входящих в состав сложного органо-минерального комплекса массы твердых горючих ископаемых [16]. По выделению гуминовых кислот из твердых горючих ископаемых выполнено множество исследований, описано около ста различных экстрагентов. Обычно, для извлечения гуминовых кислот из торфа применяют разбавленные растворы щелочей, прежде всего NaOH, реже растворы карбонатов щелочных металлов. Часто используется водный раствор аммиака [16].

4. Разработка технологий получения гуминовых кислот, где гуминовые препараты рассматривались как наночастицы, была проведена учеными Дальневосточного государственного университета. Они исследовали состав и свойства наноструктурированных объектов естественного происхождения выделенных из почв и перспективу их применения [17].

5. Одна из технологий извлечения гуминовых кислот из бурых углей (совместная работа Московского государственного университета и Бурятского государственного университета) заключалась в том, что гуминовые кислоты выделяли из образцов бурого угля традиционным способом водно-щелочной экстракции с последующим их осаждением в кислой среде, а также с использованием апротонного растворителя – диметилсульфоксида, чтобы оценить влияние условий экстракции на получаемые результаты. Экстракция диметилсульфоксидом проводилась путем встряхивания измельченного угля с диметилсульфоксидом в пропорции 1 : 20 при комнатной температуре в течение часа с последующим центрифугированием полученного раствора при 14000 об/мин в течение 10 мин. Затем надосадочную жидкость разбавляли

ацетонитрилом в соотношении 1 : 10. Осадок отделяли и высушивали в вакууме при температуре 50 °С. Далее высушенный осадок растворяли в диметилсульфоксиде 1 : 10 и всю процедуру повторяли. С целью контроля за тем, что диметилсульфоксид извлекает исключительно гуминовые кислоты, устанавливался факт полной растворимости полученного продукта в щелочных водных растворах и осаждения его в кислых [18].

7. Разработка технологии и подбор оптимальных режимов по выделению гуминовых препаратов в Самарском государственном университете [19].

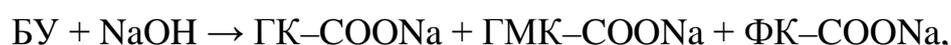
Это, естественно, не все разработки на сегодняшний день.

3. Выделение гуматов калия и натрия и гуминовых кислот из бурых углей (кафедра органической, биоорганической и медицинской химии СамГУ)

Сотрудниками кафедры разработаны методы выделения гуминовых кислот и гуматов калия и натрия.

Гуминовые кислоты выделяли из образцов бурого угля традиционным способом водно-щелочной экстракции с последующим их осаждением в кислой среде.

Реакции извлечения ГК сводятся к следующим уравнениям:



где БУ – бурые угли, содержащее гуминовые вещества, ГК – остаток гуминовой кислоты, ФК – фульвокислоты, ГМК – гиматомелановой кислоты.

Экстракция ГК осуществлялась 1, 2 и 4% NaOH и KOH. Если к полученному щелочному экстракту добавить какой-либо кислоты до pH 1–2, то выпадет осадок гуминовой и гиматомелановой кислот, а фульвокислоты останутся в растворе. При осаждении ГК использовались концентрированные

H_2SO_4 и H_3PO_4 до pH 2. Осадок отделяли центрифугированием и промывали дистиллированной водой до нейтральной среды. Для получения гуматов калия и натрия использовали те же кислоты до pH 7,2.

Нами были модифицированы методики по выделению гуминовых кислот из бурых углей, экспериментально подобраны концентрации, температура, время проведения реакции. Определено, что наиболее полное выделение гуминовых кислот происходит при экстракции 4% раствором щелочи, более высокая концентрация щелочи не сказывается на более полном извлечении гуминовых кислот, оптимальное время реакции – 4 часа, нагревание более 4 часов также не сказывается на более полном извлечении гуминовых кислот.

Использована температура 80 °С – при более высоких температурах для обработки исходного сырья сильно снижается выход ГК (с 4% до 2%) и значительно изменяется состав получаемых продуктов.

Осадки гуминовой и гиматомелановой кислот легкоотделимы, их высушивали и получали темно-бурые или почти черные порошки.

Выделены гуминовые кислоты из бурых углей различных месторождений (Иркутское, Красноярское, Уфимское, Подмосковье) при различных величинах pH среды, температурах и концентрациях гуминовых кислот.

Определение в образцах гуминовых кислот, выделенных из бурых углей различных месторождений, содержания ковалентно связанной неорганики показало, что независимо от источника происхождения и способа экстракции содержание магния, алюминия, железа, натрия, кальция, калия и кремния приблизительно одинаково, и суммарно составляет величину около 1%.

4. Выделение гуминовых кислот с применением ультразвука

Исследования, проведенные в последнее время, показали, что практическое значение препаратов на основе гуминовых кислот чрезвычайно велико. Степень извлечения ГК существенно зависит от условий экстракции: от вида реагентов, концентрации растворов, времени контакта бурых углей с раствором, температуры, соотношения объемов углей и раствора.

Последними разработками по перспективным технологиям для получения гуминовых препаратов на сегодняшний день являются:

1) экстракция с окислением торфа пероксидом водорода, показавшая самую высокую степень экстрагирования;

2) экстракция с ультразвуковой обработкой раствора – эффективный способ получения гуминовых препаратов, принимая во внимание сокращение продолжительности процесса.

Гуминовые кислоты извлекали из бурых углей 4% раствором NaOH, используя ультразвуковую ванну «Сапфир» с цифровым управлением (частота – 35 кГц, мощность генератора – 55 Вт, температура реакционной среды – 80 °С). Выход гуминовых кислот составил 7,4%, что в 2 раза превышает выход в ранее использованных методиках.

Окисление пероксидом водорода не использовалось, так как происходит достаточно сильное окисление гуминовых кислот, что может привести к деструкции их и сопутствующих веществ в бурых углях, с образованием токсических и канцерогенных веществ. Этот метод требует дополнительных исследований.

5. ИК-спектр гуминовых кислот, выделенных из бурого угля

В общих приближениях ИК спектры по наличию характеристических полос поглощения подтверждают аналогичное молекулярное строение изученных гуминовых кислот. Метод ИК спектроскопии широко используется для анализа ГК. Преимуществами метода являются информативность по функциональному составу, экспрессность и возможность анализа веществ без дополнительного фракционирования. Это позволяет получать более достоверную информацию о строении макромолекул ГК, чем при химическом анализе, так как химическое воздействие на ГК обычно приводит к необратимым структурным изменениям. Кислородсодержащие группы ГК, например, не могут быть количественно определены методами химического функционального анализа [20]. Данные ИК спектра гуминовых кислот

извлеченных из бурых углей мы сравнивали со спектром из литературных данных, приведенным на рис.1.

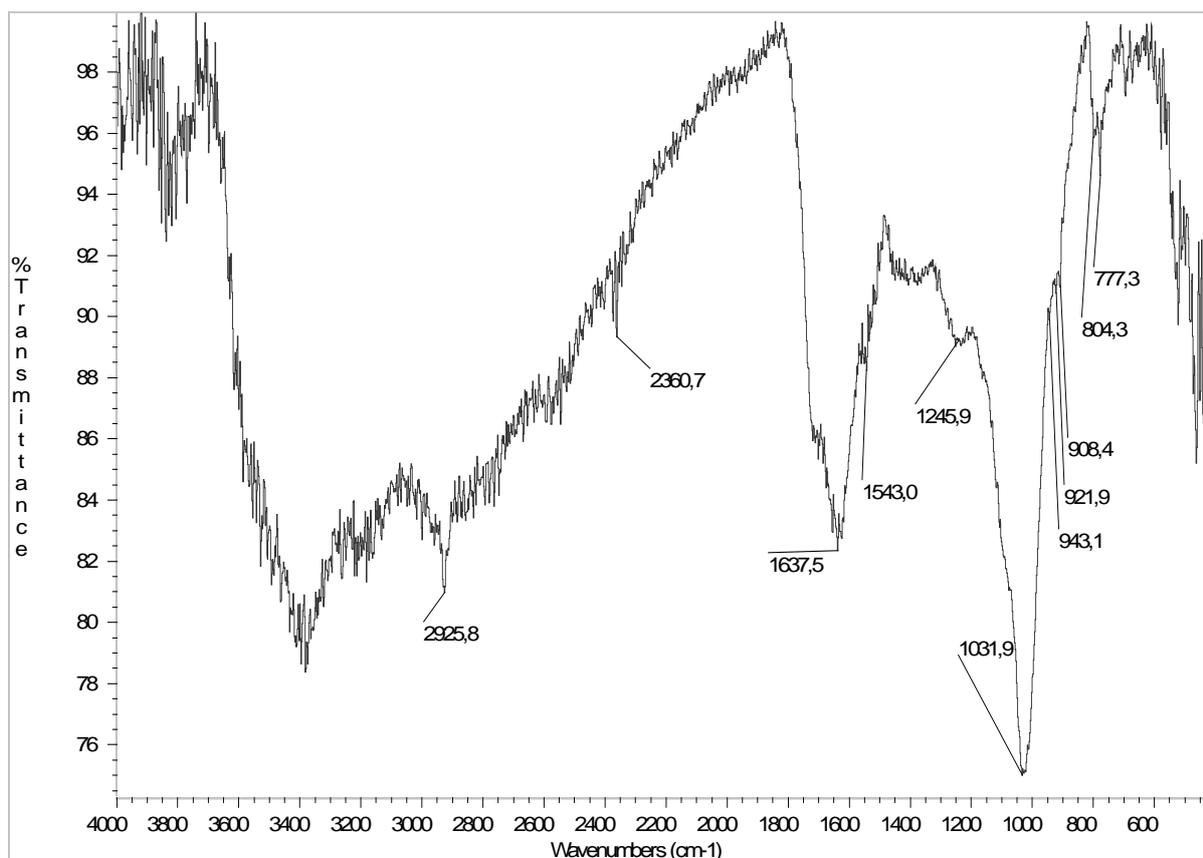


Рис.1. Характеристика инфракрасных спектров поглощения гуминовых кислот

В спектрах ГК обнаружены интенсивные полосы поглощения при 3500–3400 cm^{-1} , отнесенные к гидроксильным группам (фенольные, спиртовые и OH-группы в карбоксильных группах), 2920, 1370 cm^{-1} – относятся к длинным метиленовым цепочкам, 2860 cm^{-1} – к метильным концевым группам. Полосы поглощения при длинах волн 1720 cm^{-1} соответствуют карбоксильным группам (C=O в карбоксильных группах), 1600 cm^{-1} свидетельствуют о наличии бензоидных структур (C=C в ароматических системах), 1225 cm^{-1} – OH-группы в карбоксильных группах, 1025 cm^{-1} – OH-группы углеводов, 1650 cm^{-1} – C=N в имино-группах (рис.2).

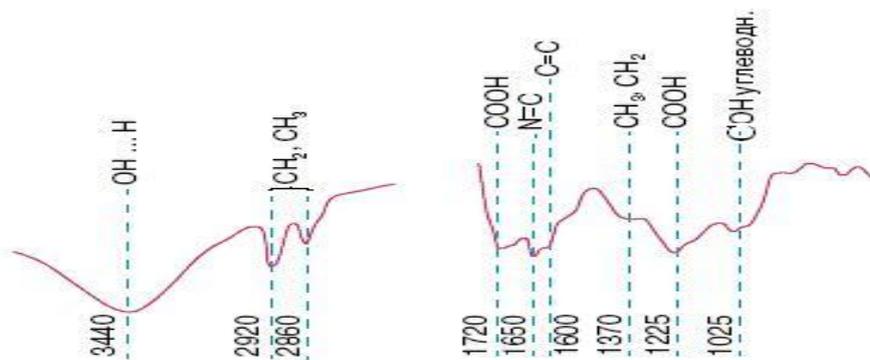


Рис.2. Характеристика инфракрасных спектров поглощения гуминовых кислот, используемых в эксперименте

б. Применение гуминовых веществ для рекультивации загрязненных почв и вод.

Гуминовые вещества пытаются применять для очистки и рекультивации территорий, загрязненных органическими веществами и нефтепродуктами, а также тяжелыми металлами. Уже разработаны и используются твердые сорбенты на основе гуминовых веществ, так как наличие гидрофобного каркаса в гуминовых веществах определяет их способность связывать нефтяные углеводороды.

Наряду со связывающими свойствами гуминовые вещества имеют ярко выраженные поверхностно-активные свойства. Поэтому их добавляют для лучшей растворимости гидрофобных органических веществ (например, нефтепродуктов). Гуминовые вещества входят в состав буровых растворов, а также служат основой растворов, предназначенных для промывания водоносных горизонтов, загрязненных ароматическими веществами. Также для этих целей используют синтетические ПАВ, но, в отличие от них, гуминовые вещества совершенно безопасны для природы.

Самарским государственным университетом проводились исследования в полевых и лабораторных условиях. Для полевых исследований использовалась территория на 165 км нефтепровода «Куйбышев – Лисичанск» в месте аварии 01.01.2007 г.

Проведенные исследования вносили определенный вклад в общую и прикладную экологию и являются экологической основой для дальнейшего

изучения биодegradации нефтезагрязненных земель. Полученные результаты могут быть использованы в качестве основы прогнозирования объема инвестиций в эколого-восстановительные мероприятия по ликвидации экологических последствий масштабных разливов нефти с получением наивысших показателей экономической эффективности, обеспечивающей минимальный объем природоохранных затрат.

Полученные результаты показывают, что внесение ГВ способствует более эффективной биорекультивации нефтезагрязнения.

Это позволяет рекомендовать гуминовые вещества для интенсификации процесса разложения нефти микроорганизмами.

Обработка загрязненных нефтепродуктами почв гуминовым концентратом (ГК) обеспечивает эффективную сорбцию углеводородов и активизацию микробиологических процессов, в результате чего происходит ускоренная деструкция нефтепродуктов и очистка почвы. При этом улучшаются основные агрохимические свойства и повышается плодородие почв.

Лабораторией экоаналитического контроля филиала ОАО «Приволжскнефтепровод» Самарского РНУ и преподавателями и аспирантами кафедры органической, биоорганической и медицинской химии СамГУ в период с мая по август месяц 2008 г. проводились испытания технологии для детоксикации участков почв, загрязненных нефтемаслопродуктами. В силу специфики объекта, испытания включали лабораторные и полевые работы.

Определялось содержание нефтепродуктов в загрязненной почве до и после обработки гуминовым концентратом, основные физико-химические характеристики необработанной и обработанной ГК почвы, проводилось биологическое тестирование выращиванием растений на необработанных и обработанных ГК почвах.

При этом водоудерживающая способность почвы увеличилась на 62,7%, а содержание доступного для растений фосфора возросло на 15%, то есть не только происходит очистка почвы, но и восстановление ее основных свойств.

Последнее обстоятельство подтверждается результатами биотестирования в лабораторных и полевых условиях. Как видно из таблицы 2, при исходном уровне загрязнения почвы нефтемаслопродуктами 1,2% (среднезагрязненные почвы), содержание нефтепродуктов в обработанной ГК почве снижается до 0,2% (незагрязненные почвы).

Таблица 2

Основные физико-химические характеристики незагрязненной и загрязненной нефтепродуктами почвы до и после обработки гуминовым концентратом

Параметры	Незагрязненная почва	Загрязненная почва до обработки	Загрязненная почва после обработки ГК
Содержание углеводородов в почве, %	0,2	1,2	0,2
Водоудерживающая способность почвы W, %	28,7	26,3	42,8
Содержание доступного растениям фосфора, P ₂ O ₅ мг/100 г почвы	0,9	0,6	1,5
pH водной вытяжки	6,9	7,0	7,0
Содержание органического углерода, %	0,5	0,9	1,8

В лабораторных условиях из засеянных в загрязненную нефтемаслопродуктами почву проросло только 1,5% семян кукурузы, при этом развитие их корневой системы, на которую действовали нефтемаслопродукты, привело к гибели растений.

Из засеянных в загрязненную нефтемаслопродуктами и обработанную ГК почву взошло 88% семян. Такой процент всхожести практически полностью совпадает с процентом всхожести семян в стандартных условиях. Растения нормально развивались в течение всего периода вегетационных испытаний.

В полевых условиях на загрязненной нефтемаслопродуктами почве семена не взошли, в то время как на обработанной гуминовым концентратом почве семена взошли, растения нормально развивались и произошло полное закрытие участка травянистым покровом.

Установлено, что при внесении ГК в почву исчезает характерный запах нефтепродуктов, образуется характерный слой, который предотвращает движение нефтемаслопродуктов вниз по почвенному профилю, то есть происходит поверхностная и объемная локализация очага загрязнения.

Таким образом, при обработке загрязненных нефтемаслопродуктами почв гуминовыми кислотами происходит быстрое восстановление основных свойств почвы.

Применение данной технологии эффективно как для восстановления загрязненных почв, так и для предупреждения распространения и локализации очагов новых загрязнений с одновременной детоксикацией нефтемаслопродуктов.

Сегодня гуминовые препараты являются едва ли не единственным средством восстановления плодородия почв и экодетоксикантами в современных технологиях рекультивации и переработки замазученных грунтов.

7. Использование гуминовых веществ в виде БАДов.

Одним из перспективных направлений использование гуминовых кислот – создание на их основе экологически чистых натуральных кормовых добавок и ветеринарных препаратов для птиц, сельскохозяйственных животных, рыб, домашних питомцев, косметические и лечебные препараты для человека [21].

Сложности, возникающие на пути создания гуминовых лекарственных препаратов и их активного внедрения в ветеринарную практику, такие же, как и в медицине – стандартизация ГВ естественного происхождения, требуемая при регистрации лекарственных препаратов. Поэтому основной формой использования ГВ в ветеринарии является кормовая добавка, для которой требования по стандартности, естественно, ниже.

В практике ветеринарной медицины природные ГВ, их различные модификаты (главным образом натрия, калия, аммония) и комбинированные препараты.

Комплекс исследований безопасности препарата включал в себя изучение токсичности гуминовых веществ.

Изучение острой токсичности гуминовых препаратов проводилось в соответствии с правилами лабораторной практики (GLP), Приказом МЗ РФ № 267 от 19.06.2003 г «Об утверждении правил лабораторной практики», Руководством по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ (2005 г).

Белым беспородным крысам (23 особи) обоего пола массой 200–220 г ежедневно вводили внутривентрально в дозах 2, 3, 4, 5 мл гумата натрия. За животными вели наблюдения в течение 14 дней, отмечая клиническую картину отравления и гибель животных.

Крыс кормили как обычно в лабораториях, в условиях свободного доступа к пище и воде. Все манипуляции с животными осуществлялись в марте месяце, в первой половине дня.

Изучение острой токсичности гуминовых препаратов на основе гуматов натрия показало, что пероральное введение не приводит к каким-либо изменениям в поведении животных.

Результаты изучения острой токсичности представлены в таблице 3 (табл.3).

Таблица 3

Оценка летальности животных

Объем, мл	Доза, мг/кг	Концентрация %, масс.	Гуминовые препараты на основе гуматов натрия	
			погибло	выжило
5	227	1	0	5
5	455	2	0	5
5	682	3	0	5

5	909	4	2	3
---	-----	---	---	---

Как видно из таблицы 3, введение гумата натрия крысам перорально в объеме 5 мл и дозе 909,1 мг/кг приводит к гибели 40% исследуемых животных.

В ходе эксперимента отмечалось уменьшение массы экспериментальных животных в опытных группах относительно контрольной группы (табл. 4).

Таблица 4

Изменение массы животных при оценке острой токсичности экстракта гуминовых кислот

Препарат и способ введения	Доза, мг/кг	Изменение массы, г к исходной		
		1 сутки	7 сутки	14 сутки
Контрольная группа	227	170,2±3,1	171,3±3,7	175,5±3,3
	455	168,7±2,9	171,9±2,7	172,5±3,7
	682	169,4±3,7	172,4±3,4	173,9±2,9
	909	169,9±2,7	173,4±2,9	173,9±3,2
Суспензия гуминовых кислот внутрижелудочно	227	169,7±4,2	175,8±4,4	185,3±3,9
	455	162,1±3,5	164,7±3,3	160,5±3,6
	682	155,2±3,3	151,5±3,4	145,3±3,3
	909	149,9±3,3	143,5±2,8	139,1±3,6

Таким образом, результаты указанных экспериментов показали, что гуминовые кислоты относятся к группе малотоксичных веществ, вызывают отсроченную гибель животных и нарушения жизненно важных функций организма и может использоваться как пищевая и кормовая добавка [22].

8. Исследование возможности применения гуминовых кислот при грязелечении и при различных заболеваниях.

В применении гуминовых кислот при грязелечении им отводится «скромная» роль детоксиканта, который выводит скопившиеся в слоях кожи токсины и яды, часто являющиеся причиной многих кожных и аллергических заболеваний.

Гуминовые кислоты к тому же обладают различными лечебными свойствами: проникая в неповреждённую кожу, они питают клеточные мембраны, стимулируют ферментную и метаболическую деятельность, восстанавливают нервные волокна, удаляют из кожи 95% ионов тяжелых металлов, токсинов и микрофлоры, оказывают противовоспалительное воздействие на животные ткани, и, являясь активным компонентом лечебной грязи, эффективно используются для лечения заболеваний опорно-двигательной системы [23–25].

Сочетание постоянного или импульсного биполярных электрических токов и гуминовых кислот способствуют более эффективному воздействию лечебных факторов на организм пациента. Данные факторы определяют спазмолитический, секреторный, обезболивающий эффект, стимуляцию обменных процессов, крово- и лимфотока, регенерацию поврежденных тканей.

Таким образом, действие биологически активных веществ в нашем случае гуминовых кислот, в сочетании с физическим фактором (электрический ток), основанное на механизмах, включающих рефлекторную и гуморальную регуляцию систем организма, позволяет достичь высокого терапевтического эффекта в соответствии с показаниями.

В связи с этим нами проведены исследования воздействия импульсного тока от ЭС ДиаДЭНС-ПКМ на состав гуминовой кислоты.

ДЭНС-форез – способ введения лекарственных веществ посредством биполярных импульсных токов от аппаратов динамической электронейростимуляции (патент на изобретение № 2290217(РФ) М., 2004 г. Воробьев Д.В.) способствуют более эффективному трансдермальному введению гуминовых препаратов (ГП) и более выраженному клиническому эффекту в комплексном лечении заболеваний опорно-двигательной системы. Отмечен выраженный обезболивающий эффект, улучшение микроциркуляции мягких тканей сустава и его функции [25,26].

Однако действие биполярных импульсных электрических токов на свойства и состав ГК ранее изучено не было.

На кафедре биоорганической, органической и медицинской химии Самарского государственного университета (зав. кафедрой проф. Пурыгин П.П.), проведена ИК спектроскопия гуминовых кислот до и после 30 минутного воздействия на нее импульсными токами от аппарата ДиаДЭНС-ПКМ на частотах 77, 140 и 200 Гц. Результаты исследования показали, что импульсные токи не изменили свойств гуминовой кислоты [27].

На кафедре химии фармацевтического факультета СамГМУ (зав. кафедрой проф. Шаталаев И.Ф.) методом денситометрии была исследована возможность введения гумата натрия в полиакриламидный гель способом ДЭНС-фореза. Результаты обрабатывали при помощи компьютерного денситометра АФ-1. Общее количество введенного в гель гумата натрия способом ДЭНС-фореза в среднем составило 56,2%. В контрольной пробе, без подключения тока – 43,8%. Разница составила в среднем 12,4% [28, 29].

Гуминовые кислоты, наряду с липидами, являются одним из главных биоактивных компонентов пелатов. Пелаты имеют преимущество перед всеми другими генетическими типами пелоидов, т.к. обладают самым высоким лечебным и косметическим эффектом [30].

На кафедре общей, бионеорганической и биоорганической химии СамГМУ (зав. кафедрой проф. Аввакумова Н.П.) методом колориметрии исследована возможность введения пелоидопрепарата гуминового ряда в кожу способом ДЭНС-фореза. Экспериментально, установлено, что поглощение кожей пелоидопрепарата в основном опыте количественно увеличилось на 12,4% по сравнению с контрольным [31].

В микробиологической лаборатории отделения Советского района г. Самары ФБУЗ «Центра гигиены и эпидемиологи Самарской области» (зав. отделением к.б.н. Радучева Е.А.) были проведены исследования влияния растворов лечебной грязи курорта Сергиевские минеральные воды различной концентрации на микрофлору небных миндалин – *St. aureus*, *St. epidermidis*, *E.coli*, *Haemophilus influenzae*, *St. viridans*, *Neisseria perflava*, согласно методическим указаниям МУК 4.2.1980-04. Полученные результаты показали

выраженное бактериостатическое действие грязевых растворов уже при концентрации 25%, что представляет собой интерес в лечении заболеваний суставов протекающих на фоне хронических инфекционных процессов.

9. Физиологическое действие гумата натрия, введенного перкутанно с помощью ДЭНС-фореза

Для проведения исследований использовали здоровых животных (5 белых беспородных крысах мужского пола с массой 160–180 г), содержащихся на стандартном рационе питания.

На предварительно выбритую кожу крыс накладывали прокладку, пропитанную 1% раствором гумата натрия. Лекарственные прокладки готовили из одного-двух слоев фильтровальной бумаги. Прокладки размещали параллельно друг другу, вдоль тела крысы, затем к прокладкам подсоединяли электроды. В первый день ДЭНС-форез проводили при частоте импульсов 77 Гц в течение 3 минут. Во второй день увеличивали время до 5 минут. В третий – до 7 минут. Во второй серии эксперимента увеличивали концентрацию гумата калия до 5% по массе, в третьей серии эксперимента – до 10%. В каждой серии эксперимента брали образцы крови исследуемых крыс до и после электрофореза с целью установления физиологического действия гумата калия.

Физиологическое воздействие введенных методом ДЭНС-фореза гуматов натрия на организм крыс отслеживали по содержанию в крови лейкоцитов, гемоглобина, эритроцитов, а также по скорости осаждения эритроцитов (СОЭ) и цветовому показателю. Результаты эксперимента представлены в таблице 5 (табл.5).

Таблица 5

Результаты введения 1, 5 и 10% раствора гумата натрия перкутанно в
ткани крыс методом ДЭНС-фореза

Группа крыс	Концентрация гумата натрия, %	СОЭ, мм/ч	Лейкоциты, г/л	Гемоглобин, г/л	Эритроциты, г/л	Цвет. показ., г/л	P
Контрольная (n=5)	–	2±0,5	7,5±0,8	97±2	3,1±0,5	1,01±0,08	≤0,05
При введении гумата натрия перкутанно (n=5)	1	3±0,2	7,6±0,6	89±1	2,6±0,8	0,95±0,09	≤0,05
	5	4±0,3	7,8±0,7	85±3	3,0±0,3	0,95±0,08	≤0,05
	10	3±0,5	7,5±0,9	90±2	2,5±0,4	1,03±0,05	≤0,05

Из данных, представленных в таблице 5, видно, что введение гумата натрия привело лишь к незначительному изменению состава крови подопытных крыс. Анализ крови был без признаков воспаления. Количество лейкоцитов не выходило за пределы физиологической нормы. Можно отметить пониженные значения гемоглобина у животных, подвергшихся введению гуматов натрия. Также видно, что скорость осадения эритроцитов у крыс опытной группы превосходил аналогичные показатели крови крыс контрольной группы. Важно отметить отсутствие какой-либо зависимости между составом крови крыс и концентрацией вводимого гумата натрия.

Таким образом, можно сделать вывод, что гуматы натрия можно применять при лечении остеоартрозов.

Проведено введение гумата натрия в биологические ткани крыс перкутанно с помощью ДЭНС-фореза. Образцы крови до и после эксперимента были идентичны, что говорит о возможности применения растворов гумата натрия при лечении остеоартрозов [32].

Другие способы применения гуминовых веществ пока остаются трудно выполнимыми. Основная причина – та самая гетерогенность структуры, которая, с одной стороны, дает чрезвычайно широкий спектр свойств, а с

другой — неспецифичность действия, которая не позволяет создать гуминовые вещества более направленного действия. Например, для рекультивации сред, загрязненных гидрофобными органическими соединениями, нужны гуминовые препараты, обладающие повышенным сродством по отношению к загрязняющим веществам, то есть тоже гидрофобные. А вот при создании микроудобрений на основе гуминовых веществ они, наоборот, должны быть гидрофильными и прекрасно растворяться в воде. Поэтому, чтобы повысить эффективность применения гуминовых препаратов в конкретной области и расширить спектр их применения, надо научиться направленно менять их свойства. Наши дальнейшие разработки направлены на модификацию гуминовых веществ с целью изменения их физико-химических свойств.

Выводы

1. Установлено, что более полное выделение гумата натрия происходит при экстракции 4% раствором щелочи при температуре 80 °С и времени реакции 4 часа.

2. Впервые были проведены исследования по воздействию импульсного тока от ЭС ДиаДЭНС-ПКМ на состав и свойства гумата натрия. Показано, что сочетание постоянного или импульсного биполярных электрических токов не меняют его состав.

3. Изучена эффективность введения раствора гумата натрия в 7,5% полиакриламидный гель общей модели биологической ткани способом ДЭНС-фореза. Проведенные исследования показали возможность введения компонента грязевого раствора – гумата натрия – в полиакриламидный гель.

4. Проведено введение гумата натрия в биологические ткани крыс перкутанно с помощью ДЭНС-фореза. Образцы крови до и после эксперимента были идентичны, что говорит о возможности применения растворов гумата натрия при лечении остеоартрозов.

5. Впервые изучалась острая токсичность гумата натрия на белых беспородных крысах-самцах. Результат эксперимента показал, что 5 мл. гумата натрия является летальной дозой для 40% особей.

6. Впервые было достигнуто увеличение выхода гуминовых кислот за счет ультразвуковой обработки растворов гуматов натрия и калия в 2 раза – с 3,7 до 7,4% от общей массы бурого угля.

Литература:

1. Орлов Д.С. Гуминовые вещества в биосфере // Статьи Соровского Образовательного журнала в текстовом формате. Химия. – МГУ им. М.В. Ломоносова, 1997 // Интернет-сайт <http://www.pereplet.ru/obrazovanie/stsoros/260.html>.

2. Горовая А.И., Орлов Д.С., Щербенко О.В. Гуминовые вещества. – Киев: Наукова думка. 1995. – 304 с.

3. Humic substances and their role in the environment. Rep. of Dahlem workshop, Berlin, 1987. John Wiley & Sons Limited. S. Bernhard. Dahlem Konferenzen. 1988. P.133–148.

4. Bollag J.-M., Mayers K. Detoxification of aquatic and terrestrial sites through binding of pollutants to humic substances.//Sci. Total Environ. 1992. V.117/118. P.357–366.

5. Schnitzer M., Khan S.U. Humic substances in the environment. N.Y., Marcel Decker. 1972. P.12–17.

6. Орлов Д.С. Гумусовые кислоты почв. М.: Изд-во МГУ. 1974. 287 с.

7. Ziechman W. Huminstoffen. Problemen, Methoden, Ergebniss. Weicheim: Chemie. 1980. P. 480.

8. Stevenson F.J. Geochemistry of Soil Humic Substances. In: Humic substances in soil, sediment and water. (Ed. by G.R. Aiken, D.M. McKnight, R.L. Wershaw, P. MacCarthy). N.Y.: John Wiley & Sons. 1985. P.13–52.

9. Перминова И.В. Анализ, классификация и прогноз свойств гумусовых кислот. Дисс. на соиск. уч. ст. д.х.н. – Москва, 2000. – 117 с.

10. Орлов Д.С., Бирюкова О.Н., Суханова Н.И. Органическое вещество почв Российской Федерации. – М.: Наука, 1996. – 256 с.

11. Орлов Д.С., Безуглова О.С. Биогеохимия. – Р-н-Д.: Феникс, 2000. – 42 с.

12. ГОСТ 27593-88(2005). Почвы. Термины и определения. УДК 001.4:502.3:631.6.02:004.354.

13. Орлов Д.С. Химия почв. – М.: МГУ, 1992. – 400 с.

14. Орлов Д.С., Триш Л.А. Практикум по химии гумуса. М.: Изд-во МГУ, 1981. 272 с.

15. Верещагин А.Л., Егорова Е.Ю., Степанова Н.В., Хмелев В.Н., Цыганок С.Н. IX Всероссийская студенческая научная конференция «Проблемы теоретической и экспериментальной химии», посвященная 130-летию периодического закона Д.И. Менделеева // Сборник тезисов секционных докладов. Алтайский государственный технический университет, секция аналитическая химия, 1999. – С.56–58.

16. Чухарева Н.В. Исследование кинетики термически активированных изменений состава и свойств торфяных гуминовых кислот. Дисс. на соиск. уч. ст. д.х.н. – Томск, 2003. – 126 с.

17. Нестерова О.В., Семаль В.А., Трегубова В.Г. Международный форум по нанотехнологиям // Сборник тезисов секционных докладов, стендовых докладов и докладов участников конкурса научных работ молодых ученых. Дальневосточный государственный университет, секция «Химия и химическая технология наноматериалов». – Владивосток, 2008. – С.39.

18. Пуцыкин Ю.Г., Шаповалов А.А. Международный конгресс по IHSS, (Международное гуминовое общество). – Тулуза, 2000. – V.1. – P.195–197.

19. Инишева Л.И., Юдина Н.В. Гуминовые вещества в биосфере: Материалы III-й Всероссийской конференции, 1–3 марта 2005 г., Санкт-Петербургский государственный университет. 2005. – С. 31–32.

20. Потапова И.А., Вишняков В.В., Пурыгин П.П., Симакова С.А., Воробьев Д.В., Ушакова В.Н. Выделение гуминовых кислот из бурых углей и

их применение для рекультивации нефтезагрязненных земель // Известия Самарского научного центра РАН. Специальный выпуск «XIII конгресс Экология и здоровье человека». 2008. – Т.1. – С. 215–218.

21. Методика выполнения измерений массовой доли нефтепродуктов в минеральных, органогенных, органо-минеральных почвах и донных отложениях методом ИК-спектроскопии ПНД Ф 16.1:2.2.22-98.

22. 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.

23. Потапова И.А., Бутова Е.В., Пурыгин П.П. Выделение и исследование токсических и терапевтических свойств солей гуминовых кислот и возможности применения их как пищевой добавки // Башкирский химический журнал. – 2012. Том 19. № 5. «Коршуновские чтения».

24. Ziechmann W. Humic substances and their Medical Effectiveness // 10th International Peat Congress. 1996. Volume 2. Stuttgart. P.546–554.

25. Пивоваров Л.Р. О природе физиологической активности в связи с их строением. Сб. «Гуминовые удобрения. Теория и практика их применения», Киев: Госсельхозиздат УССР. 1962. Гос.изд. с/х лит., с.433–443.

26. Агапов А.И., Воробьев Д.В., Давыдкин Н.Ф., Захарова Н.О., Катунина Е.Е., Куркина О.В., Машенко З.Е., Потапова И.А. ДЭНС-форез раствора лечебной грязи курорта «Сергиевские минеральные воды» – перспективы использования в гериатрии // Межрегиональная научно-практическая конференция по вопросам восстановительной медицины, курортологии и физиотерапии, посвященный 175-летию ФГУ «Санаторий Сергиевские минеральные воды» Серноводск, 2008 г. С.22–23.

27. Воробьев Д.В., Гаршина Е.С., Пурыгин П.П., Потапова И.А., Коваленко Е.Б. Применение АДЭНС в комплексном лечении работников железнодорожного транспорта // Известия Самарского научного центра РАН: материалы XIII Всероссийского конгресса «Экология и здоровье человека». – Т.2. – Самара, 2009. – С.41–42.

28. Воробьев Д.В. «ДЭНС-форез – экспериментальное обоснование и клиническое применение нового способа физиотерапии заболеваний опорно-двигательной системы»; Монография. – Самара: Артель, 2010 -120 с.

29. Гаршина Е.С. ДЭНС-форез раствора лечебной грязи курорта Сергиевские минеральные воды в комплексном лечении остеоартроза коленного сустава. // Автореферат дис. канд. мед. наук. – Самара, 2009 г. 27 с.

30. Жданова А.В. Изучение структурных компонентов и физико-химических свойств гуминовых веществ низкоминерализованных иловых сульфидных грязей как источника антиоксидантных лекарственных средств: диссертация ... кандидата фармацевтических наук: 14.04.02 / Жданова Алина Валитовна; [Место защиты: ГОУВПО «Самарский государственный медицинский университет»]. – Самара, 2011. – 134 с.: ил.

31. Пурыгин П.П., Воробьев Д.В., Вишняков В.В., Потапова И.А., Пряхина К.А., Гаршина Е.С., Якимова Н.А. Исследование воздействий импульсного тока от ЭС ДиаДЭНС-ПКМ на основе гуминовой кислоты. // Вестник СамГУ – Естественнонаучная серия. 2010, № 4(78). С.155–159.

32. Воробьев Д.В., Гаршина Е.С., Зелёва О.В., Потапова И.А., Мащенко З.Е., Радучева Е.А., Бурова Е.В., Исхакова Г.М. ДЭНС-форез – рациональный способ грязелечения остеоартроза коленного сустава. // Вестник СамГУ – Естественнонаучная серия. 2011, №8(89). С.157–162.