

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«СИБИРСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ»
(ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России)

На правах рукописи



ЛОГВИНОВА ЛЮДМИЛА АНАТОЛЬЕВНА

**ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ И КАРДИОТРОПНЫЕ СВОЙСТВА
ГУМИНОВЫХ КИСЛОТ НИЗИННОГО ДРЕВЕСНО-ТРАВЯНОГО
ТОРФА**

14.04.02 - фармацевтическая химия, фармакогнозия

Д и с с е р т а ц и я
на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук

Научный руководитель:
доктор фармацевтических наук, доцент
М.В. Зыкова
Научный консультант:
доктор биологических наук, доцент
Т.В. Ласукова

Томск - 2019

ОГЛАВЛЕНИЕ

	Стр
ВВЕДЕНИЕ	4
ГЛАВА 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	13
1.1 Характеристика торфа как сырьевого источника биологически активных веществ.....	13
1.2 Специфические биологически активные вещества торфа.....	18
1.3 Биологическая активность гуминовых веществ.....	25
1.4 Анализ современного состояния терапии сердечно-сосудистых заболеваний.....	36
Заключение по обзору литературы.....	44
ГЛАВА 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	46
2.1 Объекты исследования.....	46
2.2 Методы исследования.....	48
2.2.1 Отбор торфа и пробоподготовка	48
2.2.2 Фармакогностическое исследование торфа.....	49
2.2.3 Гравиметрическое определение гуминовых кислот в торфе.....	51
2.2.4 Выделение гуминовых кислот из торфа.....	52
2.2.5 Методы химического исследования гуминовых кислот.....	54
2.2.6 Методы исследования кардиотропной активности гуминовых кислот.....	62
2.2.7 Методы исследования актопротекторной активности гуминовых кислот.....	67
2.2.8 Физико-химические методы исследования антиоксидантной активности гуминовых кислот	68
2.3 Математические методы обработки результатов.....	73
ГЛАВА 3 ХАРАКТЕРИСТИКА ТОРФА И ИССЛЕДОВАНИЕ ГУМИНОВЫХ КИСЛОТ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИМИ МЕТОДАМИ АНАЛИЗА	74
3.1 Сравнительное фармакогностическое исследование двух низинных древесно-травяных видов торфа. Выделение гуминовых кислот.....	75
3.2 Сравнительное исследование физико-химических параметров структуры гуминовых кислот, выделенных из двух низинных древесно-травяных видов торфа.....	78
Выводы к главе 3.....	109
ГЛАВА 4 ИССЛЕДОВАНИЕ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКОЙ	

	АКТИВНОСТИ ПЕРСПЕКТИВНОГО ОБЪЕКТА ГУМИНОВЫХ КИСЛОТ НИЗИННОГО ДРЕВЕСНО-ТРАВЯНОГО ВИДА ТОРФА БОЛОТА «ТАГАН»	113
4.1	Исследование влияния перспективного объекта гуминовых кислот на скорость коронарной перфузии и сократительную активность изолированного сердца крыс в динамике концентраций	118
4.2	Исследование кардиопротекторного и инотропного действия перспективного объекта гуминовых кислот при ишемии и реперфузии изолированного сердца.....	121
4.3	Исследование возможных механизмов кардиотропного действия гуминовых кислот.....	126
4.3.1	Исследование роли эндотелиальной NO-синтазы в реализации кардиопротекторного действия гуминовых кислот.....	126
4.3.2	Исследование антиоксидантной активности гуминовых кислот	130
4.4	Исследование актопротекторной активности перспективного объекта гуминовых кислот.....	142
	Выводы к главе 4.....	148
ГЛАВА 5	РАЗРАБОТКА ПОДХОДОВ К СТАНДАРТИЗАЦИИ ГУМИНОВЫХ КИСЛОТ (БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ ГУМИНОВОЙ ПРИРОДЫ) И ИХ СЫРЬЕВОГО ИСТОЧНИКА (ТОРФА)	151
5.1	Разработка проекта нормативной документации для сырьевого источника (торфа).....	152
5.2	Разработка подходов к контролю качества гуминовых кислот (биологически активных веществ гуминовой природы).....	159
	Выводы к главе 5.....	176
	ЗАКЛЮЧЕНИЕ	177
	СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ	179
	СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	182
Приложение 1	Проект нормативной документации «Торф низинный древесно-травяной».....	213
Приложение 2	Проект нормативной документации «Гуминовые кислоты низинного древесно-травяного торфа».....	225
Приложение 3	Акты внедрения результатов диссертационной работы в учебный процесс	240

ВВЕДЕНИЕ

АКТУАЛЬНОСТЬ И СТЕПЕНЬ РАЗРАБОТАННОСТИ ТЕМЫ ИССЛЕДОВАНИЯ. Комплексной терапии синтетическими лекарственными средствами не смотря на высокую эффективность присущ ряд существенных недостатков. Во-первых, узкая направленность терапевтического воздействия, что вынуждает лечащего врача к одновременному назначению большого количества лекарственных препаратов, а также малая терапевтическая широта. Во-вторых, побочные эффекты, их пропорциональный рост с увеличением числа одновременно назначенных лекарственных препаратов и продолжительности приема. В-третьих, ограничение в применении для таких возрастных групп, как дети и пожилые люди. Комплексная терапия лекарственными средствами растительного происхождения, напротив, имеет диаметрально противоположные черты. Она характеризуется отсутствием острой/хронической токсичности и способности к кумуляции, сохранением терапевтического эффекта после отмены курсовой терапии, а также разносторонним комплексным воздействием, направленным на восстановление и коррекцию нарушенного гомеостаза.

К одному из видов биологически активных веществ (БАВ) естественного генеза, обладающих вышеупомянутыми положительными свойствами, относятся гуминовые вещества и их преобладающая по количественному содержанию фракция – гуминовые кислоты. Гуминовые вещества, являясь основной формой кумулированного органического углерода на планете, выполняют важные биосферные функции. Более того, гуминовые вещества нашли самое широкое применение в сельском хозяйстве, животноводстве, медицине и признаны актуальным направлением «Green Chemistry» как максимально безопасные для здоровья человека и окружающей среды [113].

Гуминовые вещества находятся во многих природных объектах таких, как: почва, торф, сапрпель, уголь, мумиё, меланоиды и др. Но наиболее перспективным сырьевым источником получения гуминовых веществ, как БАВ,

является торф [58]. Торф открывает генетическую ветвь твердых горючих ископаемых, отличается большим видовым разнообразием, ботаническим составом и относится к возобновляемым природным ресурсам. Гуминовые вещества ввиду сложности молекулярной организации характеризуются амфифильностью, и, как следствие, возможностью влиять на многие клетки и их субклеточные компоненты, органы и системы органов, проявляя при этом ряд положительных биологических эффектов. В литературе известно о модулирующем воздействии гуминовых кислот на нейроны, гепатоциты, клетки красной и белой крови, клетки эпидермиса, поджелудочной железы, антигенпрезентирующие клетки.

Ранее группой ученых СибГМУ (М.В. Белоусов, М.В. Зыкова и др.) [34] были проведены фармакологические исследования нативных гуминовых кислот торфа при их внутрибрюшинном введении в заведомо летальных дозах с целью определения органов-мишеней. В итоге было сделано заключение, что смерть животных наступала от острой сердечной недостаточности, возникшей в результате ишемической дистрофии миокарда. Проявление подобных механизмов кардиоактивного действия характерно для миотропных препаратов - средств, влияющих на ионные каналы (блокаторы кальциевых каналов, активаторы калиевых каналов), донаторы NO [91]. В результате чего была выдвинута гипотеза о наличии прямых кардиотропных (кардиоваскулярных) эффектов при введении гуминовых кислот торфа в терапевтических дозах, что и послужило отправной точкой для продолжения исследования фармакологической активности гуминовых кислот торфа в данном направлении.

Сердечно-сосудистые заболевания имеют неуклонную и негативную тенденцию к росту и омоложению, не смотря на большое количество используемых лекарственных средств и высокотехнологических видов помощи. Поиск новых лекарственных субстанций для доступной превентивной терапии и эффективного патогенетического лечения ишемической болезни сердца является стратегической задачей мирового здравоохранения. Исследование кардиопротективных свойств гуминовых веществ торфа и механизмов их реализации, учитывая значительный сырьевой потенциал торфа и высокую биологическую активность выделенных из

него гуминовых кислот, является актуальной и перспективной задачей отечественного здравоохранения. Решение данной задачи позволит разработать на основе гуминовых кислот торфа новые эффективные и обладающие экспортным потенциалом отечественные препараты для профилактики и лечения кардиопатологий.

ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ: В результате комплексного исследования физико-химических и кардиотропных свойств гуминовых кислот низинного древесно-травяного торфа предложить перспективное биологически активное вещество гуминовой природы и установить параметры его стандартизации.

ЗАДАЧИ ИССЛЕДОВАНИЯ:

1. Провести сравнительное фармакогностическое исследование двух низинных древесно-травяных видов торфа с различных болот Томской области.

2. Провести сравнительное исследование физико-химических параметров структуры гуминовых кислот, выделенных из двух низинных древесно-травяных видов торфа с различных болот Томской области для выбора перспективного объекта исследования биологической активности.

3. Провести исследование кардиотропной, антиоксидантной и актопротекторной активности перспективного объекта гуминовых кислот торфа (биологически активного вещества гуминовой природы).

4. Предложить параметры стандартизации гуминовых кислот (биологически активного вещества гуминовой природы) и их сырьевого источника (низинного древесно-травяного торфа), подготовить проекты нормативной документации.

НАУЧНАЯ НОВИЗНА ИССЛЕДОВАНИЯ. Впервые охарактеризованы общие и индивидуальные особенности строения молекул гуминовых кислот, выделенных из одного вида торфа (низинного древесно-травяного), но с разных торфяных месторождений Томской области: проведено сравнительное исследование физико-химических параметров структуры методами спектрального (электронной, флуоресцентной, ИК, ^{13}C -ЯМР спектроскопии), титриметрического, элементного (C, H, N, O, S) анализа, эксклюзионной ВЭЖХ.

Впервые проведено исследование кардиопротекторных свойств гуминовых кислот, выделенных из низинного древесно-травяного вида торфа болота «Таган» Томской области методом ретроградной перфузии изолированного миокарда крыс по методу Лангендорфа по открытому контуру и изучение возможных механизмов кардиопротекции. В частности, методами физико-химического анализа (катодной вольтамперометрии, колориметрии с дифенилпикрилгидразилом и феррозином, спектроскопии электронного парамагнитного резонанса) установлены высокие антиоксидантные свойства гуминовых кислот. В тесте с введением неизбирательного ингибитора NO-синтазы L-NAME установлена способность гуминовых кислот влиять на NO-систему внутриклеточной передачи сигнала. Впервые установлено отличительное кардиопротекторное свойство гуминовых кислот торфа – восстанавливать сократительную функцию миокарда в реперфузионный период.

Впервые проведено исследование актопротекторных свойств гуминовых кислот, выделенных из низинного древесно-травяного вида торфа болота «Таган» Томской области на модели хронического пятидневного предъявления животным теста принудительного плавания до полного утомления. Установлены высокие показатели работоспособности и резистентности к физической нагрузке.

На основании проведенного исследования фармакологической активности (в экспериментах *in vitro* и *in vivo*) впервые обоснован перспективный образец гуминовых кислот, выделенный из низинного древесно-травяного вида торфа болота «Таган» Томской области, как эффективный кардиопротектор для повышения работоспособности и физической выносливости.

ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ И ПРАКТИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ РАБОТЫ.

Результаты, полученные в ходе сравнительного физико-химического анализа структуры и свойств различных гуминовых кислот, позволили выявить общие и индивидуальные особенности строения молекул гуминовых кислот, выделенных из одного типа и вида торфа (на примере низинного древесно-травяного), но с разных торфяных меторождений Томской области («Клюквенное» и «Таган»).

На основании результатов физико-химического анализа гуминовых кислот обоснованы методы контроля качества для определения параметров стандартизации биологически активного вещества гуминовой природы (гуминовых кислот) и их сырьевого источника (торфа). На основании разработанных методик и подходов к стандартизации гуминовых кислот и торфа предложены два проекта нормативной документации: «Торф низинный древесно-травяной» и «Гуминовые кислоты низинного древесно-травяного торфа».

Перспективный объект (биологически активное вещество гуминовой природы) – гуминовые кислоты низинного древесно-травяного торфа болота «Таган» предложен для разработки малотоксичных лекарственных средств растительного происхождения, способных оказывать кардиопротекторное, антиоксидантное и актопротекторное действия для вспомогательной терапии ишемической болезни сердца, повышения физической работоспособности и выносливости человека, а также для использования у лиц, специализирующихся в различных видах спорта или занятых тяжелым физическим трудом.

Диссертационное исследование выполнено при финансовой поддержке гранта РФФИ 18-43-700014 р_а «Фармакологическое исследование специфических органических веществ торфов Томской области» и государственного задания «Кардиоваскулярные эффекты, индуцированные природными высокомолекулярными соединениями гуминовой природы, и возможные механизмы их реализации» (Рег. № АААА-А17-117032210074-6).

Результаты диссертационной работы используются: в учебном процессе кафедры медико-биологических дисциплин ФГБОУ ВО ТГПУ (акт внедрения от 30.08.2019), кафедр химии (акт внедрения от 29.08.2019), фармацевтического анализа (акт внедрения от 30.08.2019) ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России.

МЕТОДОЛОГИЯ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ. В соответствии с поставленной целью и задачами исследования были выбраны современные методы физико-химического анализа параметров структуры и свойств гуминовых кислот и их сырьевого источника – торфа, а также методы исследования биологической активности. В работе использовали действующие ГОСТы и общие фармакопейные

статьи согласно ГФ XIV издания. Методы физико-химического анализа параметров строения гуминовых кислот: электронная (УФ и В), флуоресцентная, ИК, ^{13}C -ЯМР спектроскопия, элементный (С, Н, N, О, S) и титриметрический анализ, эксклюзионная ВЭЖХ. Методы исследования антиоксидантной активности: катодная вольтамперометрия, колориметрия с дифенилпикрилгидразилом и феррозином, спектроскопия электронного парамагнитного резонанса. Методы исследования биологической активности: кардиотропной – ретроградная перфузия по методу Лангендорфа по открытому контуру, актопротекторной – нагрузочный тест (принудительное плавание). Биохимические методы исследования: определение уровня креатинфосфокиназы, активности эндотелиальной NO-синтазы (e-NOS).

Статистическую обработку данных проводили стандартными методами с помощью программы STATISTICA 8.0. Результаты обрабатывали, используя непараметрический U-критерий Манна-Уитни и представляли в виде среднего арифметического (M) \pm стандартная ошибка среднего (статистически значимые различия – при $p < 0,05$). Данные эксперимента по установлению актопротекторной активности представлены в виде квартилей (Q_1 – 25 %; Q_3 – 75 %) и медианы (Me). Анализ множественных сравнений проводили непараметрическими тестами Краскала-Уолиса и Фридмана. Достоверность различий между группами устанавливали с помощью непараметрического критерия Манна-Уитни, используемого для двух независимых выборок и критерия Вилкоксона, используемого для проверки различий между зависимыми выборками ($p < 0,05$). Для оценки характера распределений между группами применяли критерий « χ -квадрат».

ПОЛОЖЕНИЯ, ВЫНОСИМЫЕ НА ЗАЩИТУ:

1. Результаты сравнительного фармакогностического исследования двух низинных древесно-травяных видов торфа с различных болот Томской области, характеристика физико-химических параметров структуры, выделенных из них гуминовых кислот, и обоснование выбора перспективного объекта исследования биологической активности.

2. Результаты исследования кардиотропной, антиоксидантной и актопротекторной активностей перспективного объекта – гуминовых кислот низинного древесно-травяного торфа болота «Таган» и оценка возможных механизмов их реализации.

3. Параметры стандартизации гуминовых кислот и торфа, проекты нормативной документации на сырьевой источник (торф) и перспективное биологически активное вещество гуминовой природы (гуминовые кислоты).

ЛИЧНЫЙ ВКЛАД АВТОРА. Автором самостоятельно проведен анализ литературы, отбор образцов торфа на болотах Томской области, анализ фармакогностических и технологических параметров торфа, выделение гуминовых кислот, исследование гуминовых кислот спектральными методами (электронной, флуоресцентной, ИК спектроскопии) и титриметрического анализа, исследование антиоксидантной активности гуминовых кислот колориметрическими методами. Исследование ботанического состава торфа, исследование гуминовых кислот методами эксклюзионной ВЭЖХ, элементного (С, Н, N, O, S) состава, антиоксидантной активности методами спектроскопии электронного парамагнитного резонанса и катодной вольтамперометрии, кардиотропной и актопротекторной активности проведены при непосредственном личном участии автора. Исследование гуминовых кислот методом ^{13}C -ЯМР спектроскопии выполнено в научно-исследовательской лаборатории природных гуминовых систем кафедры медицинской химии и тонкого органического синтеза ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова» Правительства РФ, за что автор выражает глубокую благодарность заведующему лабораторией, доктору химических наук, профессору И.В. Перминовой и старшему научному сотруднику, кандидату химических наук А.И. Константинову. Исследование гуминовых кислот методом синхронной флуоресцентной спектроскопии выполнено в Department of Microbiology and Immunology, Montana State University (Bozeman, 59718, USA), за что автор выражает глубокую благодарность профессору И.А. Щепёткину (PhD, MD). Исследование актопротекторной активности гуминовых кислот выполнено в экспериментальной

лаборатории биомедицинских технологий Филиала ТНИИ курортологии и физиотерапии ФГБУ СибФНКЦ ФМБА России, за что автор выражает глубокую благодарность научному сотруднику, кандидату биологических наук А.А. Гостюхиной. Исследование кардиопротекторной активности гуминовых кислот выполнено в лаборатории экспериментальной кардиологии НИИ кардиологии Томского НИМЦ, за что автор выражает глубокую благодарность доктору биологических наук, профессору Ласуковой Т.В.

Автором самостоятельно проведена математическая обработка данных, разработка проектов нормативной документации, написание и оформление рукописи диссертации и автореферата. Анализ и интерпретация результатов исследования проведена при непосредственном личном участии автора, научного руководителя и научного консультанта. Подготовка печатных работ по теме диссертации проходила при непосредственном личном участии автора.

СООТВЕТСТВИЕ ДИССЕРТАЦИИ ПАСПОРТУ НАУЧНОЙ СПЕЦИАЛЬНОСТИ. Диссертация соответствует пункту 2 – «Формулирование и развитие принципов стандартизации и установление нормативов качества, обеспечивающих терапевтическую активность и безопасность лекарственных средств», пункту 6 – «Изучение химического состава лекарственного растительного сырья, установление строения, идентификация природных соединений, разработка методов выделения, стандартизации и контроля качества лекарственного растительного сырья и лекарственных форм на его основе» паспорта специальности 14.04.02 – фармацевтическая химия, фармакогнозия.

СВЯЗЬ ЗАДАЧ ИССЛЕДОВАНИЯ С ПРОБЛЕМНЫМ ПЛАНОМ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИХ НАУК. Диссертационная работа выполнена в соответствии с планом НИР ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Минздрава России «Изыскание и изучение новых лекарственных средств. Вопросы фармации» (№ гос. регистрации темы 01.02.00.101708) и комплексной программы «Инновационные технологии новых фармацевтических продуктов на основе природных биологически активных

комплексов» (регистрационный номер: АААА-А16-116021010208-2 от 10.02.2016 г).

СТЕПЕНЬ ДОСТОВЕРНОСТИ И АПРОБАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ. Результаты диссертационной работы и основные положения представлены и обсуждены на 7 научных конференциях: Fourth International Conference of CIS IHSS on Humic Innovative Technologies «From Molecular Analysis of Humic Substances - to Nature-like Technologies» (НИТ-2017) (Moscow, 2017); XXIV и XXV Российских национальных конгрессах «Человек и лекарство» (Москва, 2017, 2018 гг); XXI Международной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Наука и образование» (Томск, 2017 г); Международной научной конференции «Современное состояние черноземов» (Ростов-на-Дону, 2018 г); VII Всероссийской научной конференции с международным участием, посвященной 90-летию со дня рождения профессора Д.С. Орлова и III Международной научной школы «Методы оценки биологической активности гуминовых продуктов» (Москва, 2018 г); Международной научно-практической конференции, посвященной памяти А.Ф. Гаммерман «Гаммермановские чтения» (Санкт-Петербург, 2019 г).

ПУБЛИКАЦИИ. По материалам диссертационной работы опубликовано 15 печатных работы, в т.ч. 6 статей в журналах, рекомендуемых ВАК при Министерстве образования и науки РФ для публикации результатов кандидатских и докторских диссертаций.

ОБЪЕМ И СТРУКТУРА ДИССЕРТАЦИИ. Диссертационная работа изложена на 243 страницах компьютерного текста, содержит: введение, обзор литературы (глава 1), материалы и методы исследования (глава 2); экспериментальные главы (глава 3-5), заключение, приложения; содержит 35 таблиц, 28 рисунков. Список литературы включает 280 биографических источника, из которых 163 отечественных и 117 зарубежных.

ГЛАВА 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 ХАРАКТЕРИСТИКА ТОРФА КАК СЫРЬЕВОГО ИСТОЧНИКА БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ

Торф – это отложение органического происхождения, состоящее из растений, включая как низшие споровые, так и высшие покрытосеменные в различной жизненной форме, подвергшихся неполному биохимическому разложению в обводненной среде при недостаточном доступе кислорода [143]. Формирование торфяных залежей происходит из болотной флоры, которая претерпевает распад под действием биотических и абиотических факторов. К первым относят: почвенный микромир (бактерии, грибы, простейшие, членистоногие), энзимы, выделяемые микроорганизмами в процессе жизнедеятельности, а также их постмортальные превращения, ко вторым – неорганический состав грунта (терригенные минералы), избыточная влажность, недостаток кислорода, растворенного в воде [143].

Уникальные свойства торфа – способность к возобновлению, огромные территории, занятые его естественными средами образования – болотными экосистемами, а также их непрерывное «наступление» на новые территории [59], огромное видовое разнообразие, широчайший спектр биологически активных веществ и их разное количественное содержание, различие технических характеристик (влажность, пористость, ботанический состав), объясняет применение торфа в топливной, металлургической, текстильной промышленности, сельском хозяйстве, животноводстве и медицине [6, 98, 114, 148].

Начало применения торфа в медицинских целях датируется временами военных действий – Первой мировой войны, Великой отечественной войны. Военные медики применяли его в качестве перевязочного материала ввиду высоких влагоемких, сорбционных свойств и бактерицидной активности. В настоящее

время колоссальное количество торфа добывается для нужд бальнеологии, физиотерапии [15, 157], косметологии [277] и др. Особенность физико-химической структуры (пористость, высокая теплоемкость и малая теплопроводность, наличие веществ с ионообменными функциональными группами), одновременное присутствие биологически активных соединений органического и минерального происхождения с разным спектром активности (антибактериальной, противовоспалительной, анальгезирующей, регенеративной и т.д.) определило применение торфа и препаратов на его основе в качестве средств этиотропной, симптоматической и профилактической терапии различных нозологий, на любом этапе патологического процесса [157]. Торф, а также препараты, содержащие в качестве активного начала БАВ из него (Гумивит, Гепсил, Олипифат, Гумизоль, ФИБС и др.) наносят наружно в виде аппликаций, а для достижения генерализованного эффекта вводят посредством электрофореза, фонофореза при заболеваниях опорно-двигательного аппарата (ревматоидный артрит, полиартрит, остеоартроз, остеохондроз и т.д.) [151], воспалительных процессах кожных покровов и слизистых оболочек бактериальной, вирусной, грибковой природы (опоясывающий лишай, экзема, кандидозы и др.), термических ожогах, долго незаживающих ранах [7, 15, 253]. Биологически активные составляющие торфа стимулируют иммунную систему (местный иммунитет, гуморальный) и повышают общую резистентность организма, обладают нервно-трофическим действием.

Торф представляет собой конгломерат органических и неорганических соединений. Неорганические составляющие представлены ионами макро- (Ca, Mg, K, P, S) и микро- (Al, Fe, Cu) элементов, которые находятся в виде оксидов, солей, комплексных соединений. Появляются минеральные компоненты в результате водной миграции (с паводковыми и грунтовыми водами), эолового привноса и биологической аккумуляции [10, 143]. Органическая составляющая торфа образуется в результате накопления в неизменном виде части органических веществ растений-торфообразователей, почвенной биоты. Другая часть органических компонентов растительной и животной материи претерпевает

синтетико-деструктивные реакции, в результате чего появляются новые БАВ, не имеющие аналогов в живых организмах – гуминовые вещества [143].

В составе органической составляющей торфа может быть 300 и более индивидуальных веществ, выделить которые в индивидуальном виде, даже прибегая к высокоселективным хроматографическим методам, не всегда представляется возможным. Разделение органической составляющей торфа на отдельные фракции основано на различной растворимости ее компонентов. В связи с этим выделяют следующие основные группы веществ: 1) вещества, экстрагируемые органическими растворителями: битумы, воски, высшие одноатомные спирты и высшие жирные карбоновые кислоты ((ВЖК), а также их эфиры), углеводороды, смолы, фенолы, флавоноиды, кетоны, жирорастворимые витамины, пигменты и др.; 2) водорастворимые легко- и трудногидролизуемые вещества, экстрагируемые холодной и горячей водой, а также водными растворами кислот: моно- и олигосахариды, целлюлоза, гемицеллюлоза, дубильные вещества, пектиновые вещества, аминокислоты, водорастворимые витамины и др.; 3) специфические вещества торфа – гуминовые вещества, извлекаемые щелочными растворами (растворами гидроксидов и солей щелочных металлов, аммиака); 4) нерастворимые вещества – лигнин, субберин, кутин [143, 180].

При обработке сухого торфа неполярными растворителями (бензином, гексаном, бензолом, толуолом, хлороформом, их смесями и др.) образуется олеофильная система, состоящая из восков, углеводов, смоляных кислот, высокомолекулярных спиртов и ВЖК, сложных эфиров, масел и асфальтенов [44, 74, 131, 143, 180], фосфолипидов [63, 131]. Образование олеофильной системы (битумной части торфа) происходит в основном в процессе преобразования смол, восков, входящих в состав спор, кутикулы и др. органов и частей растений, аэробных бактерий и низших грибов [125]. Выделение битумов проводят не только экстракцией липофильными растворителями, но и механическим воздействием (используя мельницы-активаторы), ферментативным методом (с помощью целлюлозолитического фермента – целловиридина), а также их комбинацией [52].

Алканы преимущественно имеют нормальное строение углеродного скелета и содержат 16, 25-31 атомов углерода [190, 195]. Преобладает среди парафинов цетан – $C_{16}H_{34}$, что обусловлено его генезисом из пальмитиновой кислоты, которая в составе растений пребывает в большом количестве [77, 209].

Среди углеводов изопренового строения обнаружены пристан, фитан [21, 77], углеводов стероидной структуры и их кислородсодержащих производных – сквален, α -амирин, тараксерон, тараксерол, β -ситостерол, β -ситостанол [21, 24, 65, 123]. В составе ароматических углеводов, их кислородсодержащих производных в липидной фракции торфа присутствуют конденсированные би- и триядерные углеводороды – нафталины, азулены, фенантрены [77, 122].

При исследовании битумной фракции торфа посредством газовой хромато-масс-спектрометрии обнаружены дитерпеновые трициклические кислоты смолы торфа – абиетиновая и дегидроабиетиновая [21].

Среди неспецифических ВЖК обнаружены: олеановая, урсоловая, пальмитолеиновая кислоты. Трикозановая кислота встречается крайне редко и в небольшом количестве, что обусловлено нечетным числом атомов углерода – нехарактерная черта для ВЖК природного происхождения. Среди других ВЖК обнаружены олеиновая и пальмитиновая (преимущественно) [123].

В торфе аккумулируются пигменты как растительного (феофетин *a* и *b*, феофорбид *a*, сфагнорубин красный, мембранохром, каротины и каротиноиды), так и бактериального генезиса (бактериофитин *a*) [24, 143].

Жирорастворимые витамины представлены различными изомерами токоферолов – $\alpha, \beta, \gamma, \delta$ -токоферолы, провитаминами А (каротиноидами) [77, 143]. Кетоны (в основном тараксерон, фриделин), образующие липофильную фракцию, в своей структуре содержат 21-32 углеродных атома [77, 115]. В составе продуктов смоляной части торфа обнаружены одноатомные и многоатомные фенолы (крезолы, этилфенолы, диметилфенолы, пирокатехин и др.) [48, 137, 143, 147]. По мнению автора [147], с увеличением степени разложения торфа количество свободных и связанных фенолов сокращается. С одной стороны, это обусловлено их вымыванием из клеточных структур, последующим поступлением в близлежащее

водное пространство, а с другой – повышенной реакционной способностью и, как следствие, участием в синтезе высокомолекулярных компонентов торфа – гуминовых кислот, фульвокислот и др. [143].

Имея прямую генетическую связь с растительной материей, торф сохраняет основной структурный, энергетический компонент их клеток – сахара. Сахара выделяют путем обработки данного каустобиолита горячей водой или водными растворами кислот (серной, хлороводородной). При анализе компонентного состава углеводной фракции различными методами хроматографии установлено присутствие простых редуцирующих гекса- и пентаальдоз: глюкозы, галактозы, ксилозы, рамнозы, арабинозы. Идентифицированы такие олиго- и полисахариды как: сахароза, мальтоза, лактоза, раффиноза, генцианоза, целлюлоза, гемицеллюлоза, пектиновые вещества, уроновые кислоты [44, 118, 143, 148]. Определение рН водных экстрактов показало, что для верховых торфов водородный показатель равен 2,7-5,6, низинных – 3,8-7,3 водородных единиц [60]. Это обусловлено большим разнообразием присутствующих карбоновых кислот: молочной, гликолевой, яблочной, леулиновой, фумаровой, гидроксibenзойной, ванилиновой, ферруловой, сиреневой, коричной, салициловой, щавелевой, янтарной, изомерами фталевой кислоты, [77, 143].

Среди гидрофильных веществ также встречаются витамины С, В₁, В₂, РР [143], ферменты – гидролазы, оксидоредуктазы, трансферазы, синтетазы [67, 142]. В гидролизатах торфа обнаружены 15 протеиногенных аминокислот, среди которых присутствуют и незаменимые: лизин, валин, метионин, фенилаланин, триптофан и лейцин [143].

Негидролизуемый неизвлекаемый растворителями остаток торфа представлен, главным образом, лигнином, в меньшей степени – утратившими способность к растворению гуминовыми веществами, субберинном, кутином. По химической структуре лигнин – высокомолекулярное соединение, образующееся в результате полимеризации кониферилового спирта и углеводных фрагментов. Мономерное звено лигнина – фенилпропановый фрагмент в различной степени замещенный метоксильными группами (гваяцилпропановый и

сирингилпропановый фрагмент содержат 1 и 2 простые эфирные метокси- группы, соответственно), карбоксильными и фенольными группами. Лигнин отличается отсутствием азота в структуре [143, 151].

При действии на торф растворами натрия или калий гидроксидов, аммиака, натрия гидрокарбоната, натрия пиродифосфата в супернатант переходит группа гуминовых веществ (ГВ). Гуминовые вещества – это наиболее представительная в количественном отношении фракция органического вещества торфа [143], обладающая высокой плеiotропной биологической активностью, низкой токсичностью [58], практически полным отсутствием побочных эффектов (даже на фоне длительного применения), привыкания, аккумулятивных свойств и т.д. Благодаря совокупности этих свойств ГВ можно рассматривать как перспективный объект для получения растительных лекарственных средств и БАДов.

1.2 СПЕЦИФИЧЕСКИЕ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫЕ ВЕЩЕСТВА ТОРФА

Гуминовые вещества образуют специфическую группу биологически активных соединений торфа и представляют собой биодеструктивно устойчивую полидисперсную высокомолекулярную систему, которая формируется в результате постепенного разложения представителей царства растений и животных. Процесс превращения растительных и животных тканей, с одной стороны, контролируется и направляется микроскопическими обитателями биосферы (бактериями, простейшими), а с другой, абиотическими факторами (температурой, влажностью, аэрацией и т.д.) [108].

Синтез из основной компоненты автотрофных организмов – органических веществ, наличие в структуре ароматических фрагментов и, как следствие, высокая устойчивость к биохимической деструкции определяет планетарное распространение ГВ. Помимо торфа они обнаружены также и в таких природных объектах, как: почва (особенно много в черноземах) [108], озерные и речные

отложения (сапропели), угли разной степени метаморфизма и петрографического состава [125], мумиё [253], воздух, водоросли, моллюски, березовый гриб [120].

Химический состав растительных остатков, который может сильно варьировать от территории к территории, ограничивает типы возможных синтетико-деструктивных реакций, лежащих в основе образования ГВ, а внешние факторы (температура, кислотность среды, интенсивность аэрации, в совокупности влияющие на активность почвенного микромира) определяют глубину процесса гумификации (т.е. степени преобразования растительных веществ). Поэтому фундаментальные характеристики ГВ – это нестехиометричность состава, нерегулярность строения, гетерогенность и полидисперсность [112]. Гуминовые вещества – многокомпонентная смесь, разделение которой на составляющие компоненты основано на различной растворимости. В составе ГВ выделяют: 1) гумин – вещество, нерастворимое ни в кислотах, ни в щелочах, ни в органических растворителях; 2) гуминовые кислоты (ГК) – соединения, не растворимые в минеральных кислотах ($\text{pH} < 2$), но растворимые в щелочных растворах; 3) фульвокислоты (ФК) – вещества, растворимые при всем диапазоне pH ; 4) гиматомелановые кислоты – вещества, получаемые из свежесаженного геля ГК путем обработки спиртом либо ацетоном [108, 112, 120, 149].

У истоков изучения ГВ стояла немецкая школа химиков, представитель которой Franz Carl Achard в 1786 г. впервые выделил их из торфа посредством щелочной экстракции. Разработанная им схема с некоторыми изменениями и дополнениями применяется и в настоящее время отечественными и зарубежными исследователями: почвоведрами, агрономами, химиками, геохимиками [108, 112]. Изучение ГВ исследователями разных научных направлений связано с реализацией ими важнейших биосферных функций (протекторной, трофической, аккумулятивной и др.), способностью оказывать физиологическое воздействие на представителей разных трофических уровней (в т.ч. и человека). Проявление данных эффектов гуминовыми веществами связано с наиболее подвижной и реакционноспособной фракцией, которую образуют гуминовые кислоты (ГК) [108, 112].

Несмотря на более чем двухсотлетнюю историю изучения ГК (с середины XX в. исследования осуществляются с помощью высокочувствительных и высокоточных методов классической химии) вопросы их образования, строения, а так же механизмы действия, до сих пор остаются нерешенными ввиду нестехиометричности их состава [112]. Нестехиометричность, гетерогенность, полидисперсность ГК связана с несколькими причинами: 1) характеристикой сырьевого источника – ботанический состав, зольность, влажность, степень разложения; 2) условиями гумификации; 3) процессом извлечения – концентрацией и видом используемого экстрагента, временем, режимом и кратностью экстракции, режимом сушки [108]. Если синтез полимера (нуклеиновых кислот, протеинов) *in vivo* можно проследить, так как он находится под контролем генетического аппарата, отвечает текущим функциональным потребностям клетки, то образование природного полимера – ГК регулируется, главным образом, кинетикой процесса, и протекает с отбором наиболее устойчивых молекул (время жизни которых в окружающей среде может насчитывать сотни, тысячи лет) [108, 143]. Несмотря на влияние такого большого числа факторов на структуру ГК, приводящих к получению разных данных об элементном, структурно-групповом и молекулярно-массовом составе, есть несколько основных признаков, руководствуясь которыми природные вещества можно причислить к данной группе органических соединений: 1) содержание углерода в диапазоне 46-61%, 2) наличие гетероциклического азота и большого числа функциональных групп, 3) специфический вид ИК- и ЭПР-спектров, 4) полидисперсность [135, 143].

Стохастичность строения приводит к тому, что трудно разработать формулу ГК, учитывающую точное последовательное соединение атомов, расположение атомных группировок, молекулярную массу (Мм). Имеется большое число гипотетических блок-схем и формул ГК.

В 1959 г. В. Мистерски и В. Логинов разработали одну из первых блок-схем (Рисунок 1.2.1). В предложенном ими варианте ГК, выделенных из почвы, содержится «ядро», состоящее из ароматических шестичленных колец (в т.ч. кислород- и азотсодержащих гетероциклических), хинонов, гидроксильных,

карбоксо- и карбонильных групп. По их мнению, «ядро» экранировано периферическими алифатическими фрагментами, полипептидными и полисахаридными цепями. Способность функциональных групп в частице ГК вступать в реакции комплексообразования, ионного обмена, определяет наличие минеральных компонентов – кремнезема, ионов Fe, Al, Ca и фосфат-анионов [108, 112].

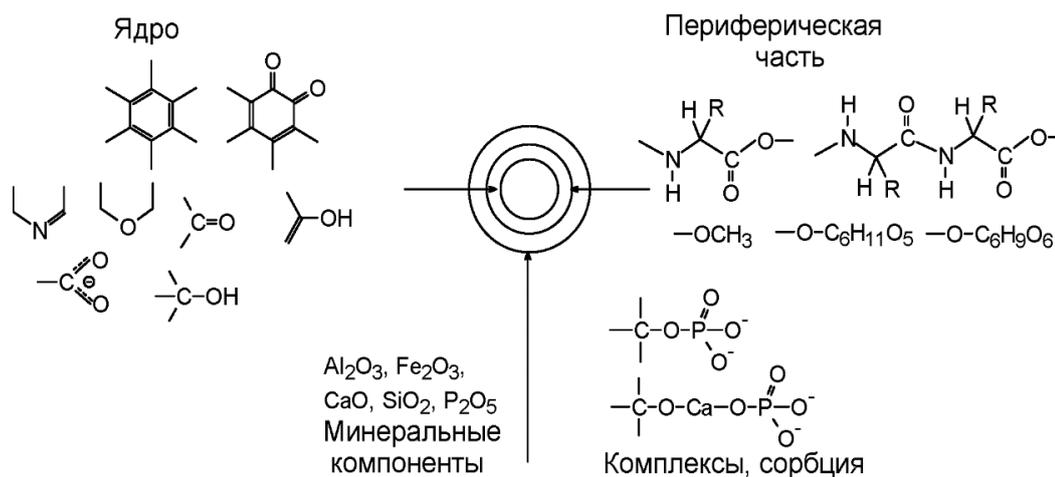


Рисунок 1.2.1 – Блок-схема гуминовых кислот по В. Мистерски и В. Логинову

И.Д. Комиссаров и Л.Ф. Логинов, исходя из экспериментальных данных, предложили структурную формулу ГК (Рисунок 1.2.2), по которой 60 % углерода сосредоточено в ароматических кольцах (с учетом эмпирической брутто-формулы ГК – C₄₄H₃₄N₂O₁₈). Ароматические фрагменты сочленены углерод-углеродными связями, за счет которых образуется развитая цепь сопряжения (возможно сочленение ароматических колец и посредством эфирных мостиков). Макромолекулы ГК могут отличаться размерами, числом ароматических колец в «ядре», кратных связей в «мостиковых цепочках». Структурные фрагменты стабилизируются меж- и внутримолекулярными связями [108].

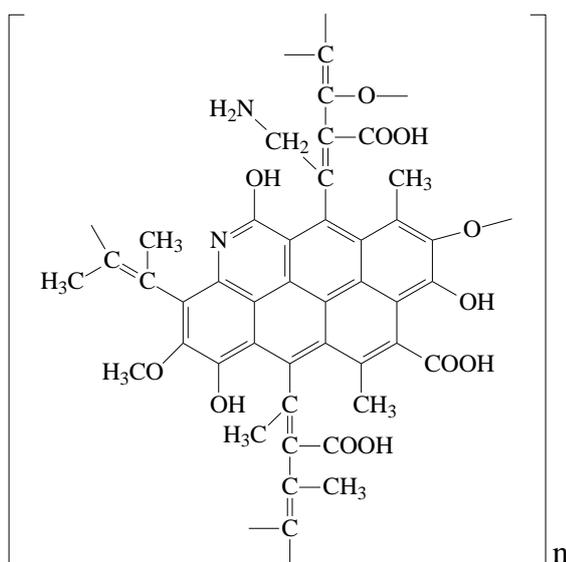


Рисунок 1.2.2 – Формула гуминовых кислот по И.Д. Комиссарову и Л.Ф. Логинову

С.С. Драгунов предложил формулу (Рисунок 1.2.3), согласно которой ароматические ядра имеют линейное расположение и, как правило, являются четырех замещенными. В качестве заместителей в ароматическом ядре выступают хиноны, фенольные и имино- группы [108].

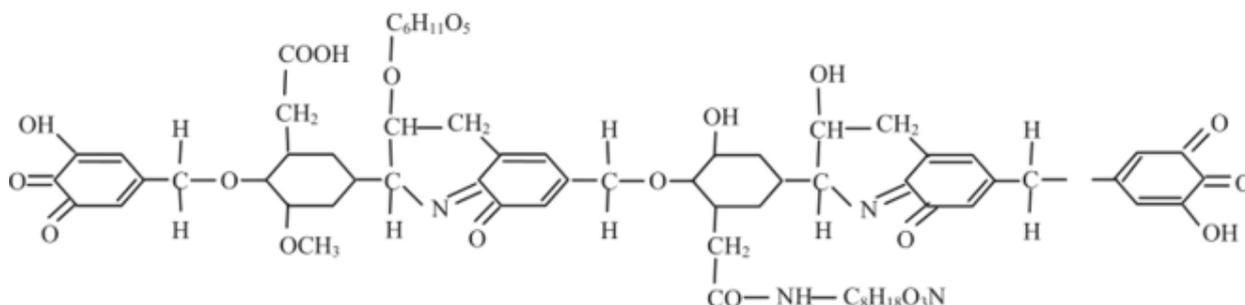


Рисунок 1.2.3 – Формула гуминовых кислот по С.С. Драгунову

На сегодняшний день взгляды исследователей о химической структуре ГК разнятся. Одни исследователи придерживаются точки зрения, что ГК представляют собой макромолекулы. В частности, отечественный ученый А.А. Миронов, опираясь на более ранние работы И.Д. Комиссарова, предложил 3D-графическую модель ГК (Рисунок 1.2.4). По его мнению, мономерные звенья соединены между собой посредством возникновения Ван-дер-Ваальсовых сил в алифатических звеньях. Такие компактные фрагменты, или вторичные структуры ГК при большом

увеличении напоминают молекулярные слои графита, за сходство с которыми и были названы «book asymmetric carbon structure», т.е. «книжные асимметричные углеродные структуры» [94].

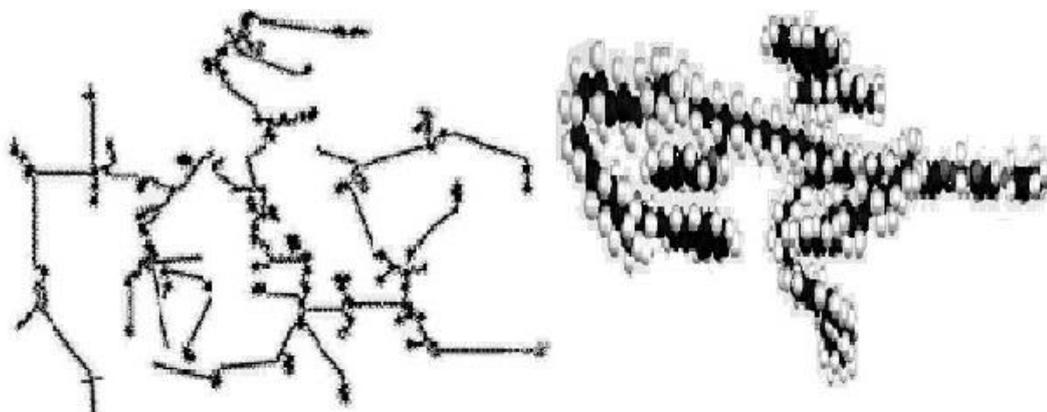


Рисунок 1.2.4 – Графическая модель макромолекулы и графическая модель «упаковки» части макромолекулы гуминовой кислоты до «BACS» по А.А. Миронову

R.A. Alvarez-Puebla (Рисунок 1.2.5) также придерживается позиции о надмолекулярной организации ГК – мономерные фрагменты с течением времени накапливаются, подвергаются конденсационным и окислительным процессам, превращаются в гетерогенные полимеры с высокими значениями Мм. Конформация ГК может быть линейной либо разветвленной [167].

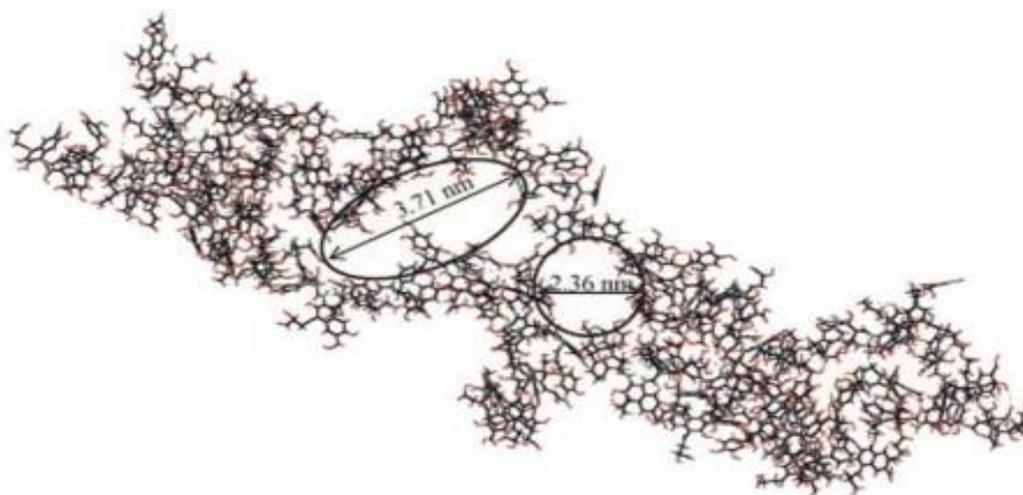


Рисунок 1.2.5 – Схема строения структурной ячейки гуминовой кислоты по R.A. Alvarez-Puebla

Другие специалисты придерживаются теории, разработанной А. Piccolo – ГК в нейтральной и щелочных средах представляют собой супрамолекулярные мицеллоподобные агрегаты, состоящие из гетеромолекул с $M_m < 1000$ Да. Гетеромолекулы в агрегате удерживаются вместе посредством слабых межмолекулярных сил и водородными связями. Это заключение сделано при анализе большого объема экспериментальных данных – прибавление к раствору ГК органических кислот (муравьиной, уксусной) приводит к трансформации на более мелкие ассоциаты. Супрамолекулярная теория нашла подтверждение методом масс-спектрометрии [238-240].

Применяя 3D-моделирование, Dialo M.S. пришел к выводу, что ГК являются многокомпонентной полидисперсной смесью и, тем самым, поставил под сомнение существующие и активно развивающиеся макро- и супрамолекулярные теории строения данных природных образований [164].

По мнению И.В. Перминовой формула, разработанная Д.С. Орловым, наиболее приближена к действительности и может объяснить химическое поведение ГК в окружающей среде (в т.ч. и протекторную функцию) [112].

По Д.С. Орлову ГК – супрамолекулярная система, состоящая из элементарных структурных двучленных ячеек переменного состава. Лабильная, гидролизуемая периферия ячеек – это полисахаридные и полипептидные цепи. Неподверженное гидролитическим изменениям «ядро» – слабо конденсированные бензоидные фрагменты, которые в совокупности с углерод-углеродными мостиками, образуют развитую непрерывную цепь π -сопряжения, азот и кислород-содержащие гетероциклы. Как «ядро», так и «периферия» имеют большую совокупность разнородных функциональных групп: карбоксильных, гидроксильных (в том числе и фенольных), хиноидных, метоксильных, амино- и амидных групп. Количественное и качественное соотношение элементов по формуле Д.С. Орлова соответствует материальному балансу при проведении глубокой окислительной деструкции [143].

1.3 БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ГУМИНОВЫХ ВЕЩЕСТВ

Более чем 3000 тыс. лет назад природные объекты, аккумулирующие в своем составе ГК (торф, сапрпель, леонардит и др.) начали применяться с saniрующей целью нетрадиционными видами медицины – аюрведой [253], бальнеологией. Также параллельно началось их применение в ветеринарной практике, сельском хозяйстве [143]. Не потеряло своего значения лечение данными нативными веществами и в век доказательной медицины. В настоящий период времени ГК используются в качестве противомикробных, противогрибковых, противовирусных и регенераторных средств, цитопротекторов, иммуномодуляторов, антиоксидантов, детоксикантов и мн. др. [15, 50, 124, 207, 253, 273, 274].

Проявление столь высокой биологической активности гуминовыми кислотами является следствием сложности их химической организации.

Антиоксидантные свойства. Способность снижать интенсивность процессов пероксидации в кардиомиоцитах, нейронах, нефроцитах, гепатоцитах и др. клетках и тканях связана с антиоксидантными (АО) свойствами ГК [2, 15, 54, 173, 189, 236]. Механизм их АО действия объясним, во-первых, присутствием в структуре фрагментов одно- и многоатомных фенолов (типа пирокатехина, гидрохинона), способных выступать донорами протонов. Во-вторых, ГК являются ловушками электронов (активные формы кислорода (АФК) взаимодействуют с пространственно затрудненными фенолами в структуре ГК, образуя устойчивые феноксильные радикалы, не способные к рекомбинации. В итоге происходит обрыв цепи, нарушение синтеза дополнительных количеств АФК) [173]. В-третьих, ГК оказывают сочетанное влияние на ферментативные компоненты эндогенной АО защиты – индуцируют как их активность, так и трансляционный процесс на рибосомах [227], хелатируют катионы Fe и другие переходные металлы, нарушают лавинообразный синтез АФК [263].

Антиоксидантные свойства ГК положены в основу терапии злокачественных новообразований (уменьшают количество aberrаций хромосом) [192, 255],

например, опухоли щитовидной железы. Апоптоз раковых клеток может быть связан также со способностью ГК индуцировать цитокиновую активность моноцитов – увеличивается синтез ФНО- α , различных типов интерферонов– α , β (ИФН) [275].

Снижение гуминовыми кислотами гибели гепатоцитов при приеме ксенобиотиков (мединала, гексенала, клозапина) ассоциировано с их антиоксидантной активностью (АОА), положительным влиянием на синтез гемопротеинов – отдельных изоформ цитохрома P₄₅₀ (в частности, СУРПА – принимает участие в метаболической стадии трансформации психотропных ЛС). Биохимическим показателем снижения цитолиза гепатоцитов служит уменьшение уровня внутриклеточного органотропного фермента – АЛАТ. На уровне организма это отражается в снижении длительности медуллового и гексеналового сна, улучшении клинического состояния подопытных животных [57].

Гуминовые кислоты не только снижают цитолиз гепатоцитов, но и способствуют повышению их регенераторного потенциала, что, по мнению авторов [15], связано с повышением активности орнитиндекарбоксилазы. Последнее приводит к накоплению ключевого полиамина – спермидина. Спермидин, являясь трехкислотным основанием, легко связывается с полианионами – РНК, ДНК, способствуя репликации ДНК, стимуляции транскрипции и трансляции. Данная последовательность изменений индуцирует синтез белковых молекул.

Терапия ГК, начавшаяся в ранние сроки после острого отравления соволом (полихлорированный дифенил), способствует сохранению физиологической организации печеночных долек, депо внутриклеточного гликогена. Это достигается благодаря восстановлению до нормы активности эндогенной системы АО защиты [19].

При моделировании очаговой церебральной ишемии обнаружены нейропротективные свойства ГК, ассоциированные с повышением активности супероксиддисмутазы (СОД) и ядерного респираторного фактора-1 (NRF-1), снижением уровня малонового диальдегида (МДА). На гистологических срезах упомянутые биохимические показатели проявляются в значительном снижении

отека, вакуолизации, дегенерации, сокращения разрушения других клеточных компартментов [227].

На модели ишемии-реперфузии почек лабораторных грызунов, вызванной наложением лигатуры с последующим ее ослаблением, обнаружена ренопротективная активность ГК как следствие их АО свойств. Подтверждают это результаты биохимических и гистологических исследований – снижается уровень ишемически-измененного альбумина, индекс окислительного стресса, уменьшается дилатация и повреждение нефроцитов, капсулы Боумена, гиалиновых слепков и трубчатых структур, повышается антиоксидантный статус [226, 248].

По мнению А.В. Бузлама [14], ионофорная активность ГК может повышать устойчивость клеточных мембран эритроцитов к изменению осмотического давления жидкости и, как следствие, замедлять процессы гемолиза.

В основу защитного действия ГК при ишемических атаках миокарда также положена их АОА, приводящая к уменьшению уровня уже присутствующих в тканях АФК, а также нарушению их синтеза в реакциях Фентона, Хабера-Вейса за счет хелатирующей активности в отношении ионов Fe^{2+} [71, 263]. Вазодилатирующее свойство ГК при ишемии приводит к уменьшению энергоемких показателей работы – давления, развиваемого левым желудочком, конечного диастолического давления [71].

В физиологических условиях при проведении натошак глюкозоагрузочного теста ГК продемонстрировали способность снижать концентрацию глюкозы [13]. На моделях аллоксанового и стрептозотоцинового сахарного диабета (СД) ГК сохраняли гипогликемическую активность, а также снижали некротическую гибель клеток поджелудочной железы. По предположению авторов [13], при аллоксановой интоксикации уменьшение зоны некроза связано с антирадикальной активностью ГК, а при введении диабетогенных доз стрептозоцина – повышением уровня $НАД^+$ и $НАДФ$. Также антидиабетическая активность ГК может являться следствием индукции экспрессии PPAR γ -рецепторов [234].

Иммуотропная активность. Противовоспалительное, регенераторное, антиканцерогенное, противоаллергическое и другие терапевтические эффекты ГК –

следствие их влияния на клеточные и гуморальные компоненты иммунной системы. Гуминовые кислоты, стимулируя лимфоидный росток клеток кроветворных органов, увеличивают титр фагоцитов, макрофагов, моноцитов, нейтрофилов [92] и их синтетическую активность – в плазме возрастает уровень мурамидазы (лизозима), интерлейкинов (ИЛ) (в частности ИЛ-1, ИЛ-6, ИЛ-10, ФНО- α , ИНФ и др.) [15, 61].

Одним из механизмов ингибирования гуминовыми кислотами перерождения доброкачественных опухолей в злокачественные является активация противоопухолевого иммунитета на фоне увеличения концентрации ФНО- α , ИНФ, что доказано в работах [205, 267]. Причем ГК могут проявлять как самостоятельную противоопухолевую активность [267], так и в присутствии другого природного иммуномодулятора – глюкана [205].

В работе [169] отмечено, что ГК в зависимости от их концентрации оказывают бимодальное действие на высвобождение ФНО- α . При применении ГК и препаратов на их основе (TRP – Tolpa Peat Preparation) в низких дозах (10-80 мкг/мл) увеличивается синтез данного цитокина (провоспалительная активность), в то время как высокие концентрации (более 100 мкг/мл) уменьшают его титр (противовоспалительное действие) [193].

Лекарственный препарат Tolpa Peat Preparation (TRP), выпускаемый польско-американской компанией, является иммуномодулирующим средством. Препарат TRP используется для восстановления пониженной активности иммунной системы после антибиотикотерапии, проводимой ампициллином, амикацином, доксициклином, рифампицином [170].

Гуминовые кислоты леонардита, усиливая пролиферацию мононуклеарных лимфоцитов периферической крови человека под действием ИЛ-2, проявляют противомикробную активность [226].

Регенеративная активность. Способность препятствовать воздействию альтерирующего фактора и ускорять пластический обмен в пораженной ткани или органе обуславливает применение ГК в качестве средств регенерационной терапии.

В опыте по нанесению суспензионной мази ГК на ожоговую поверхность наблюдалось сокращение времени заживления, отсутствие клинических проявлений воспалительного процесса (краевой гиперемии, серозно-гнойного экссудата). Эффект от применения мази сопоставим с эталонным препаратом – маслом облепиховым. Причем данные визуальных наблюдений были подтверждены биохимическими – снижалась скорость оседания эритроцитов, лейкоцитоз. Совокупность данных изменений, по мнению авторов, отразилась и на поведении животных в тесте «открытое поле» – понижался груминг (сокращалось число гигиенических процедур, свидетельствующее о повышении резистентности к воздействию стрессора), повышалась поведенческая активность (количество горизонтальных стоек) [82, 161].

С другой стороны, регенераторный потенциал ГК может быть связан с влиянием на процесс ангиогенеза, что освещено в работах [169, 170]. При пероральном введении животным препарата ГК (ТРР) на модели экспериментально созданного инфаркта миокарда индуцированная неоваскуляризация снижает ишемическое повреждение кардиомиоцитов [169]. Данный препарат (в твердой лекарственной форме (таблетки), содержащий 2,5 мг ГК) также используется в гериатрической практике для терапии пациентов с ишемической болезнью сердца, выступая в роли ангио- и кардиопротектора [265]. Препарат ТРР ингибирует образование ИЛ-1, что способствует его применению в качестве этиотропного средства лечения ревматоидного артрита [169, 256], так как одной из причин возникновения данной нозологии, усугубления ее течения является аномально высокий ангиогенез на фоне спонтанного синтеза лейкоцитами провоспалительного ИЛ-1.

Противовоспалительная активность. Установлено, что мазь ГК на липофильной основе способна оказывать как местное, так и резорбтивное противовоспалительное действие. В опыте по созданию термического ожога кожных покровов наблюдалось снижение активности гипоталамо-гипофизарной системы (ГК предотвращали гипертрофию селезенки, надпочечников и инволюцию тимуса) и, как следствие, ускорение заживления язв [161]. Гуминовые кислоты при

совместном применении с противовоспалительными средствами синтетического происхождения (аспирином) не только способны проявлять синергизм, но и нивелировать их побочные эффекты – ульцерогенез, что доказано коллективом авторов на модели отека лапы крыс [223].

Одним из механизмов противовоспалительной активности ГК служит снижение синтеза медиаторов воспаления (метаболитов арахидоновой кислоты) за счет ингибирования их образования по лейкотриеновому пути (ГК ингибируют синтез ключевого фермента – 5-липоксигеназы) [161].

Противовоспалительная активность ГК, выделенных из леонардита, была обнаружена в работе [218] и, по мнению авторского коллектива, заключается в следующем: ГК снижают выработку активированными (в результате обработки форбол-12-миристан-13-ацетатом) и находящимися в состоянии покоя нейтрофилами компонентов системы комплемента (в данном опыте β -глобулина С3), это приводит к нарушению лиганд-рецепторного связывания (роль лиганда выполняет – С3, рецептора – ICAM₁). Итогом служит нарушение экстравазации и миграции нейтрофилов в очаг воспаления. В другой работе по данной тематике [226] обнаруженная противовоспалительная активность реализовывалась следующим образом: ГК снижали выработку активированными фитогемагглютинином мононуклеарами спектра провоспалительных цитокинов – ФНО- α , ИЛ-1 β , ИЛ-6, ИЛ-10.

Противовоспалительная активность ГК бурого угля была обнаружена в эксперименте с введением гаптена – динитрофторбензола, вызывающего развитие контактной гиперчувствительности замедленного типа. Снижение воспалительного процесса (связано со снижением синтеза С3) сопоставимо с глюкокортикоидным препаратом – преднизолоном [179]. В ходе другого эксперимента, заключающегося в введении грызунам кислого полисахарида каррагинана, наблюдали развитие отека конечности. Площадь отека (припухлость) снижалась при применении ГК (эффект превосходил аналогичный при приеме неизбирательного НПВС – индометацина) [226].

Адаптогенное действие. Применение ГК на фоне воздействия стрессорных факторов физической, химической, биологической природы сопровождается мобилизацией резервных ресурсов организма. В результате повышается устойчивость к повреждающему действию стрессоров. Адаптогенное действие ГК реализуется на уровнях субклеточной и клеточной организации – уменьшается количество аномальных фигур митоза, увеличивается уровень нуклеиновых кислот, возрастает доля клеток, пребывающих в фазе роста [120]. Адаптогенный эффект натриевых/калиевых солей ГК (действующее вещество препаратов Лигфол, Гумивал), заключающийся в предотвращении гипертрофии надпочечников, снижении массы тела, появлении ulcerogenно измененных участков желудочной стенки, проявился при моделировании ряда экстремальных условий – иммобилизации, гипоксической гиперкапнии, отравлении окисленной олеиновой кислотой и 5,6-дигидроксиурацилом (в виде моногидрата). Антигипоксанта́ный эффект ГК благотворно сказывается на клиническом состоянии лабораторных животных при таких патологических ситуациях, как: гипоксическая гиперкапния, гемолитическая анемия, аноксемия. Одним из механизмов повышения резистентности к сочетанному воздействию иммобилизации и атропиновой нагрузки явилось снижение частоты дыхательных движений. По мнению авторов [92], адаптогенное действие ГК является следствием их влияние на протекание свободно-радикальных реакций, активации конституционального иммунитета (главным образом, клеточного звена).

Гуминовые кислоты снижают антенатальную и постнатальную гибель крысиного потомства, гипотрофию плода за счет влияния на адаптивные процессы на уровне плаценты. Под их влиянием повышается экспрессия VEGF (ростовой фактор эндотелия сосудов), усиливается процесс неоваскуляризации, перестройка артерий плацентарного ложа, что в итоге приводит к усилению местного кровотока, нормализации обмена веществ. Гиперемия, по мнению авторов, может быть ассоциирована также и с изменением под действием ГК реологических свойств крови (проведен иммунохимический анализ с кроличьими поликлональными антителами к фактору Виллебранда). Причиной увеличения текучести крови

является снижение экспрессии эндотелиальными клетками фактора Виллебранда, снижение активации тромбоцитов [81].

В экспериментальной работе [128] зафиксировано позитивное адаптогенное влияние ГК как на организм матери, так и плода (эксперимент был проведен на самках крыс и охватывал гестационный и постнатальный периоды (до наступления половозрелости потомства)). Повышение резистентности организма – это результат полиорганный воздействия. Во-первых, влияние ГК на селезенку сводилось к возрастанию активности эритроидного и лимфоидного ростков кроветворения, увеличению объема белой и красной пульпы (основное назначение которой начальные этапы дифференцировки лимфоцитов с превращением их в плазматические клетки). Во-вторых, влиянием на тимус – ускорялся процесс дифференцировки лимфоцитов, происходила гипертрофия коркового вещества (у беременных самок). В-третьих, увеличивалась активность спонгоцитов коркового и мозгового слоев надпочечников. По мнению автора работы [128], все морфологические и структурные изменения происходили вследствие увеличения объема кровеносного русла этих органов (следствие ангиогенной активности ГК).

В Индии выпускается гуминовый препарат Siotone, содержащий экстракты *Shilajit* (мумиё), *Withania Somnifera* (витания снотворной), *Ocimum Sanctum* (базилика священного), *Asparagus racemosus* (спаржи кистевидной), *Tribulus terrestris* (якорцев стелящихся). Препарат Siotone обладает адаптогенным эффектом, сопоставимым с женьшенем. Установлено, что применение Siotone на фоне теста «поведение отчаяния» по Porsolt уменьшает площадь изъязвленных поверхностей в желудке, уровень гормона стресса кортикостерона, увеличивает плазменную концентрацию аскорбиновой кислоты [176].

Детоксикационные свойства. Макропористая структура, присутствие функциональных групп, различающихся кислотно-основными и окислительно-восстановительными свойствами, способствуют участию ГК в реакциях протолитического и донорно-акцепторного типа, обмена лигандами, Ван-дер-Ваальсовых, гидрофильно-гидрофобных взаимодействиях [233]. Практическое приложение этих свойств – применение ГК в качестве адсорбентов. Так как между

ГК (адсорбентами) и адсорбатами (веществами, поглощаемыми поверхностью адсорбента) возможно протекание химических реакций, это порождает преимущество ГК перед другими адсорбентами (например, активированным углем, который концентрирует соединения на своей поверхности посредством слабых физических сил) – поглощаемые вещества связываются более прочно, необратимо [15].

Адсорбирующие материалы на основе ГК способны нивелировать повреждающее действие таких высоко опасных поллютантов (проникающих в организм, главным образом, алиментарным путем – с питьевой водой, пищевыми продуктами растительного и животного происхождения), как: ионы кадмия [222, 264], меди, свинца и др. тяжелых металлов. Например, в экспериментах с ГК подтверждена их высокая детоксикационная активность по отношению к ионам свинца (нивелировались дегенеративные изменения клеток щитовидной железы у домашней птицы).

Гуминовые кислоты в доклинических испытаниях снижали летальность при введении дыхательного аналептика стрихнина, фенилгидразина и тетрахлорметана, служащих причиной токсической анемии и гепатита, соответственно [15].

Коллективом авторов [57] обнаружены дезинтоксикационные свойства ГК (проявлялись уменьшением продолжительности наркотического сна, снижением падежа животных, улучшением показателей биохимических исследований – сокращение уровня АЛАТ) в отношении ЛВ из группы нейролептиков (клозапина), снотворных (барбитуратов – гексенала, мексидина).

Гуминовые кислоты проявляют протекторные свойства не только при интоксикациях переходными металлами, органическими токсикантами экзогенного и эндогенного происхождения, но и в отношении пагубного действия радиации. Введение ГК грызунам в самые короткие сроки (5-10 мин) после однократного облучения волнами радиоволнового диапазона, способствовало повышению процента выживаемости и увеличению продолжительности их жизни [200].

Благодаря макроколлоидным свойствам ГК образуют механический слой на поверхности слизистой оболочки желудка и кишечника, обеспечивают защиту

низлежащих слоев от различных воздействий, удерживают воду, тем самым проявляя гастропротективную активность. Гуминовые кислоты имеют преимущество в лечении ЯБЖ и ДПК перед группой противовоспалительных средств (последние, обладая неизбирательностью в отношении индуцибельной изоформы фермента ЦОГ-2, провоцируют обострения гастритов, язв) [15].

Антибактериальная, противовирусная активность. Еще до открытия микроорганизмов А. Левенгуком, их причастности к развитию многих заболеваний Л. Пастером, было замечено, что добавление измельченного торфа в корм домашних животных, помогает бороться с желудочно-кишечными заболеваниями [143]. А внесение сырья (торфа, главным образом), содержащего ГК, в почву перед посевом сельскохозяйственных культур или их обработка в вегетационный период, препятствует заселению патогенной микрофлорой [143].

В настоящее время благодаря антибактериальным свойствам, ГК более экстенсивно, чем ранее, используются в сельском хозяйстве, животноводстве, а со второй половины XX в. в медицине. По мнению многих исследователей, наиболее вероятным механизмом бактерицидной/бактериостатической активности ГК является нарушение метаболизма протеинов и углеводов на микроорганизменном уровне, образование межклеточных связей между ГК и высокомолекулярными соединениями микробной клетки [15].

Гуминовые кислоты могут иметь большое преимущество перед антибиотиками при лечении инфекционных заболеваний желудочно-кишечного тракта. Во-первых, обладая прямыми бактерицидными свойствами (за счет связывания ионов тяжелых металлов, столь необходимых для функционирования микроорганизмов), природные соединения не вызывают развитие резистентности бактерий, а более того, способствуют размножению собственной аборигенной микрофлоры, вступающей в антагонистические отношения с патогенной. Во-вторых, способствуют исчезновению некоторых клинических проявлений энтероинфекций (диареи, нарушений водно-электролитного баланса, болевых ощущений), что может быть связано также с их макроколлоидными свойствами [15, 170, 211].

В экспериментальных условиях было доказано, что добавление в питательную среду (нативную бычью сыворотку) ГК приводит к замедлению роста биомассы, состоящей из *St. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *N. gonorrhoeae*, *C. albicans* [211].

В эксперименте, проведенном на клетках линии *Vero*, подвергшихся заражению вирусом простого герпеса 1 типа (HSV-1), установлена противовирусная активность ГК. Также была замечена закономерность, что противовирусная активность находится в прямой зависимости от количества карбоксильных групп в молекулах ГК [171].

В ходе эксперимента, проведенного *in vitro* с использованием разных видов ДНК- и РНК-содержащих вирусов и разных концентраций ГК, полученных из мумие, была установлена их противовирусная активность. Причем ингибирующая активность возрастала с увеличением концентрации ГК. Гуминовые кислоты характеризовались избирательной ингибирующей активностью. Они были эффективны в отношении HSV-1 и HSV-2, цитомегаловируса и респираторного синциального вируса, но не эффективны к ротавирусу и вирусу везикулярного стоматита [214].

Гуминовые кислоты в составе препарата Оксигумат в эксперименте *in vitro* с клеточными линиями М2, проявили способность предотвращать проникновение в них вируса иммунодефицита человека ВИЧ-1, последующую репликацию вирионов. По мнению авторов [216], механизм действия ГК ассоциирован со способностью связываться с петлей V3 в составе рецепторного гликопротеина на поверхности вирусной частицы. В исследовании по введению этого же препарата (Оксигумата) ВИЧ-инфицированным больным наблюдалось усиление пролиферации лимфоцитов под действием усиленной секреции ИЛ-2 [217].

Установлено, что ГК за счет электростатического взаимодействия с гликопротеиновыми комплексами на поверхности ВИЧ, препятствуют его адгезии и последующей пенетрации в клетку-хозяина (в частности, CD4⁺-лимфоциты), поэтому могут рассматриваться как дендримероподобные микробициды для профилактики топических ВИЧ-инфекций [46]. По мнению автора [46], ГК имеют

преимущества перед широко применяемыми полианионными сульфатированными полимерами типа сульфата целлюлозы, каррагина. Прерогатива ГК состоит в том, что, являясь карбоксилированными отрицательно заряженными частицами, они обладают меньшей поверхностной активностью и не нарушают целостность эпителия слизистых оболочек в отличие от сульфатированных молекул. Более того, ГК характеризуются широким спектром противомикробной активности и эффективны при смешанных инфекциях.

1.4 АНАЛИЗ СОВРЕМЕННОГО СОСТОЯНИЯ ТЕРАПИИ СЕРДЕЧНО-СОСУДИСТЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

Вклад сердечно-сосудистых патологий (особенно ишемической болезни сердца (ИБС)) в заболеваемость, инвалидность и смертность, без преувеличения, самый высокий, а ущерб для экономики весьма ощутим. Поэтому первостепенной задачей здравоохранения является снижение действия факторов риска (гиподинамии, вредных алиментарных привычек, стрессовых ситуаций и мн. др.), своевременная диагностика и терапия. Современная стратегия ведения пациентов с ИБС (особенно на ранних этапах лечения) заключается в назначении препаратов с антиангинальным эффектом (для поддержания баланса между потребностью миокарда в кислороде и его доставкой). К ним относятся препараты следующих фармакологических групп: антитромбоцитарные, гиполипидемические, ингибиторы ангиотензинпревращающего фермента, β -адреноблокаторы, а в качестве средств ургентной терапии – периферические вазодилататоры [127].

Но, очевидно развитие порочного круга при применении антиангинальных средств: после ликвидации ими транзиторной ишемии следует период реперфузии миокарда, в продолжение которого восстановленный приток кислорода лавинообразно ускоряет окисление недоокисленных токсичных промежуточных

метаболитов энергетической цепи. Поэтому повышенный интерес представляет иная тактика лечения ИБС – миокардиальная цитопротекция [23, 95, 127].

Поиск веществ с кардиопротективными свойствами насчитывает не один десяток лет и вполне удачно реализуется, свидетельством чему является большой круг синтезированных молекул с цитопротективными свойствами, а также молекул, выделенных из объектов природного происхождения. С позиции места приложения фармакологического эффекта все кардиопротекторы ранжированы на:

I. Внутримитохондриальные цитопротекторы:

1.1 Тормозящие окисление жирных кислот (ЖК):

- подавляющие β -окисление ЖК (триметазидин, ранолазин);
- подавляющие транспорт ЖК в митохондрии (милдронат).

1.2 Прямые стимуляторы окисления глюкозы (мексикор).

1.3 Стимуляторы цитохромной цепи (коэзим Q₁₀).

II. Регуляторы транспорта субстратов энергетического обмена в цикл трикарбоновых кислот (сукцинаты, глюкозо-инсулиновая смесь, фосфокреатин).

III. Стимуляторы анаэробного гликолиза (титриазолин) – мало доказательной информации об эффективности и биодоступности.

IV. Антиоксиданты (эмоксипин, митохондриальные цитопротекторы, вещества, обладающие АО свойствами) [95, 96].

Важнейшими требованиями из предъявляемых к кардиопротекторам, являются: 1) возможность корректировать «патологический» метаболизм (снижение интенсивности кислородзависимого процесса β -окисления ЖК); 2) наличие АО свойств и, как следствие, возможность ингибировать повреждение атерогенных фракций липопротеинов, снижение кумуляции токсичных вторичных и третичных продуктов обмена - МДА, шиффовых оснований [130].

Наиболее часто назначаемыми практикующими врачами кардиопротекторы представлены в Таблице 1.4.1.

Таблица 1.4.1 - Анализ рынка современных лекарственных средств адъювантной терапии сердечно-сосудистых заболеваний

Название, группа	Назначение	Нежелательные лекарственные реакции
Синтетические		
Мельдоний (метаболическое средство)	<ul style="list-style-type: none"> - Артериальная гипертензия (в комбинации с другими ЛП) [26] - Хроническая сердечная недостаточность (ХСН) (уменьшает уровень атерогенных ЛПНП), в том числе на фоне сахарного диабета 2 типа (СД 2) (увеличивает чувствительность инсулиновых рецепторов, активность и экспрессию PPAR-рецепторов в печени и сердце [84] - Периоперационный период у лиц с коморбидной патологией [90] - Биодоступность – 78% - $T_{1/2} = 3-6$ ч - $C_{max} = 1-2$ ч - Метаболизм – почечный - Экскреция – через почки 	Общая слабость, артериальная гипотензия, головная боль, дискомфорт в эпигастральной области, диспепсия, тахикардия, кожный зуд
Триметазидин (антигипоксантное средство)	<ul style="list-style-type: none"> - Лечение инфаркта миокарда (ИМ) (в комбинации с тромболитическими средствами, снижает накопление внутриклеточного Ca^{2+} и Na^+, продуктов ПОЛ, ликвидирует внутриклеточный ацидоз, уменьшает риск возникновения ИМ в утренние часы) [84] - Лечение стабильной стенокардии (снижает частоту ангинозных приступов, потребность в нитроглицерине и диуретиках) - Предоперационный период (при аорто-коронарном шунтировании добавляют в кардиоплегический раствор) [250] - ИБС на фоне СД 2, артериальная гипертензия, артериальная почечная недостаточность [270] - ИБС на фоне атеросклероза (снижает образование пенных клеток в аорте, ингибирует пролиферацию гладкомышечных клеток, восстанавливает активность СОД, снижает уровень МДА [271] - $C_{max} = 14$ ч - Экскреция – почками в неизменном виде <p>Печеночный клиренс прямо коррелирует с клиренсом креатинина и снижается с возрастом</p>	Боль в животе, диарея, диспепсия, тошнота, головокружение, головная боль, экстрапирамидные расстройства, кожная сыпь, крапивница, ортостатическая гипотензия
Карнитин (антигипоксанты, антиоксиданты; витамины и витаминоподобные средства)	<ul style="list-style-type: none"> - Комплексное лечение вегето-сосудистой дистонии гипотензивного типа у подростков и детей - Алкогольная интоксикация печени (в комплексе с пантенолом) - Профилактика ожирения (в комплексе с 	Аллергические реакции, мышечная слабость у пациентов с уреимией, при быстром внутривенном введении боль по ходу вены,

	<p>лицетином и аллицином)</p> <ul style="list-style-type: none"> - Сахарный диабет (снижает уровень МДА, церулоплазмينا, активность каталазы, трансаминаз, ацилКоА; повышает активность СОД, eNOS, Na⁺-K⁺-АТФ-азы, активность сигнального пути MAPK, чувствительность тканей к инсулину) - Энцефалопатия, в том числе печеночная (снижает уровень аммиака) - Тяжелые поражения ЦНС, в том числе бактериальной и вирусной природы, сепсис - Мигрень (снижает уровень лактата) - ИБС, аритмия, токсическое повреждение миокарда - ХСН (повышает ударный объем крови, фракцию выброса левого желудочка, сердечный выброс), снижает уровень предсердного натрийуретического пептида, ЛПНП, ЛПОНП 	<p>проходящая при снижении скорости введения</p>
<p>Ранолазин (антиангинальные средства)</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Стабильная сердечная недостаточность (в комбинации с др. ЛС) [225] - ИБС на фоне СД 2 типа (снижает уровень гликозилированного гемоглобина) [268] - Аритмия, профилактика фибрилляции предсердий [232] - Биодоступность – 35-50% - Связь с белками – 62% - Метаболизируется в печени путем O-деметилирования и N-деалкилирования - T_{1/2} = 4-6 ч - C_{max} = 2-5 ч - Экскреция – через почки, кишечник 	<p>Головокружение, головная боль, запор, тошнота, рвота, нейродегенеративные и зрительные расстройства, кожный зуд, мышечные спазмы</p>
<p>Тиотриазолин (антиоксиданты, антигипоксанты, гепатопротекторы)</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Токсические поражения печени (лекарственного, вирусного и алкогольного генеза) - Хронический алкогольный и вирусный гепатит - Жировая дистрофия и цирроз - Жискуляторная, острая и хроническая недостаточность мозгового кровообращения, вегето-сосудистая дистония, черепно-мозговые травмы - Эпилепсия - Биодоступность – 35% - T_{max} = 0,1 ч (при внутривенном введении), T_{max} = 8 ч (перорально) - C_{max} = 1,5 ч - Экскреция – почками 	<p>Тошнота, рвота, головокружение, тахикардия, одышка</p>
<p>Мексидол (антигипоксанты, антиоксиданты)</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Диабетическая энцефалопатия - Вегето-сосудистая дистония - ХСН на фоне СД 2 типа (нормализует гипокинезию сердечной мышцы) - Стабильная стенокардия - Острый ИМ (в комбинированной терапии с 	<p>Аллергические реакции</p>

	<p>базисными ЛС)</p> <ul style="list-style-type: none"> - Артериальная гипертензия - ХСН - Ликвидация терапевтического шока (в комбинации с ЛП, восстанавливающими объемом циркулирующей крови) [16] - $T_{1/2} = 2-2,5$ ч - $C_{max} = 2-5$ ч - Экскреция – через почки 	
Фосфокреатин (метаболик)	<ul style="list-style-type: none"> - Ликвидация травматического шока (в комбинации с ЛП, восстанавливающими объемом циркулирующей крови) - Периоперационный период при кардиохирургических операциях - Профилактика острого ИМ (в комплексной терапии с тромболитиками) [235] - Кардиocereбральный синдром при остром ИМ, энцефалопатии - ХСН - Лечение заболеваний почек (пурпура Геноха-Шенлейна) - Вирусный миокардит - Неонатальная асфиксия 	
Цитохром С (антиоксиданты и антигипоксанты)	<ul style="list-style-type: none"> - Лечение тифо-паразитарных и др. гнойно-воспалительных процессов (осложненных форм пневмонии) (увеличивает синтез IgA, IgM, нормализует лейкоцитарную формулу, температуру тела, увеличивает уровень гемоглобина, увеличивает аппетит) [17, 191]. Быстро и полностью всасывается при любых путях введения. Хорошо проникает в клетки и ткани 	Аллергические реакции (гиперемия кожи, кожный зуд), изменение состава периферической крови
Кудесан (Убидекаренон) (антигипоксанты, антиоксиданты)	<ul style="list-style-type: none"> - ИБС, в т.ч. ИМ (острый, подострый восстановительная терапия) (повышает уровень простаглицлина, снижает – тромбоксана) - Сердечная недостаточность - Повышение физической работоспособности, адаптации к повышенным нагрузкам у спортсменов (переносит H^+, являясь компонентом дыхательной цепи) - Лечение рака молочной железы - Глаукома, воспаление сетчатки - Мигрень - СД 	Тошнота, диарея
Растительные		
Боярышник (применяется в виде настойки, настоя, экстракта, таблеток) (сердечные)	<ul style="list-style-type: none"> - Артериальная гипертензия (компоненты ингибируют активность ацетилхолинэстеразы, обладают антиоксидантной активностью (АОА) [237] - Терапия злокачественных образований (рака молочной железы и яичников [237]) 	Брадикардия, артериальная гипотензия (при длительном приеме в больших дозах), аллергические реакции

<p>гликозиды и негликозидные кардиотонические средства)</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Фиброз печени (снижает уровень коллагена I типа, ингибирует активность фактора транскрипции NF-κB и регулируемые им проапоптотические гены - Bcl-Xs, DR4, Fas, FasL) - Тахиаритмия - Хроническая сердечная недостаточность (I-II стадии) - Атеросклероз - Стенокардия (в т.ч. вазоспастическая) - Нейроциркуляторная дистония - Астеноневротические состояния - Постинфарктный кардиосклероз - Дигиталисная интоксикация - Бессонница - Тиреотоксикоз - Пневмония, ОРВИ (в составе комбинированной терапии) <p>Содержит флавоноиды – гиперозид, идеин, эпикатехин, изокверцетин; хлорогеновую кислоту</p>	<p>(крапивница, зуд)</p>
<p>Кардиоактив таурин (метаболик, аминокислоты)</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Дистрофические поражения сетчатой оболочки глаза, в т.ч. наследственные тапеторетинальные дегенерации, - Дистрофия роговицы - Катаракта (старческая, диабетическая, травматическая, лучевая) - Травмы роговицы (в качестве стимулятора репаративных процессов) - Сердечно-сосудистая недостаточность различной этиологии (в составе комплексной терапии) (нормализует функции клеточных мембран, энергетические и обменные процессы, электролитный состав цитоплазмы (способствует накоплению K^+ и Ca^{2+}), - Интоксикация сердечными гликозидами (способствует накоплению K^+ и Ca^{2+}) - СД 1 и 2 типов (нормализует липидный обмен) 	<p>Аллергические реакции</p>
<p>КардиоАктив Омега (эссенциальные эйкозапентаеновая кислота и докозагексаеновая кислота) (гиполипидемические)</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Эндогенная гипертриглицеридемия - Вторичная профилактика после ИМ (в составе комплексной терапии) 	<p>Гипергликемия, подагра, головокружение, дисгевзия, артериальная гипотензия, диспепсические расстройства, желудочно-кишечные кровотечения, нарушение функции печени (в т.ч. увеличение активности АСТ и АЛТ), аллергия</p>

Атероклефит, этанольный экстракт (гиполипидемические)	- Слабовыраженная гиперлипидемия (перераспределяет холестерин (ХС) из ЛПНП в ЛПВП, снижает ПОЛ, уменьшает перекисную модификацию липопротеидов, нормализует сосудистую проницаемость)	Аллергические реакции (кожный зуд, сыпь), тошнота, головная боль, ощущение горечи во рту При превышении рекомендуемых доз возможно появление симптомов алкогольной интоксикации
Капилар (БАД, источник полифенолов)	- Сердечно-сосудистые заболевания, (в т.ч. ИБС) (проявляет за счет дигидрохверцетина АО, противоотечный, противовоспалительный эффект, снижает уровень ХС, вязкость крови) - Артериальная гипертензия	
Дигидрохверцетин (антигипоксанты, антиоксиданты/витамины и витаминоподобные средства)	- Бронхолегочные заболевания (в т.ч. острая пневмония, хронический обструктивный бронхит, бронхиальная астма (инфекционная форма) - ИБС (нестабильная стенокардия) (улучшает коронарный кровоток, сократимость миокарда, нормализует возбудимость и проводимость, нормализует уровень ХС, ТАГов) - Суправентрикулярная аритмия (комбинированная терапия) - Септический эндокардит	Аллергические реакции
Кардиоика (гомеопатическое средство): <i>Arnica montana</i> C50, <i>Crataegus</i> C50, <i>Strychnos ignatii</i> C50	- Астения - Аритмия - Повышенная возбудимость	
Примечания ИМ - инфаркт миокарда СД - сахарный диабет ИБС - ишемическая болезнь сердца ХСН - хроническая сердечная недостаточность АОА - антиоксидантная активность ХС - холестерин		

Таким образом, на сегодняшний день такой сегмент фармацевтического рынка, как ЛС, предназначенные для лечения и профилактики ССЗ, является ввиду высокого уровня заболеваемости одним из самых динамически развивающихся. Особое место среди ЛС, предназначенных для терапии данной группы нозологий, занимают кардиопротекторы растительного и синтетического генеза.

Патогенетически применение кардиопротекторов обосновано, так как они способны корректировать метаболические пути в поврежденном миокарде. Механизм действия большинства *синтетических кардиопротекторов* связан, с одной стороны, с нарушением транспорта ВЖК в митохондриальный комплекс, с другой - с антиоксидантными свойствами. Основным препятствием их широкого практического применения являются нежелательные лекарственные реакции, такие как аллергия (крапивница, кожная сыпь, зуд), диспепсические расстройства (ощущение боли, дискомфорта в эпигастральной области, тошнота, рвота), гипотензия, тахикардия и др. Это обстоятельство значительно снижает качество жизни и комплаентность пациентов, вынуждает клиницистов вносить существенные изменения в тактику лечения. Терапевтический эффект многих *растительных кардиопротекторов* реализуется за счёт антиоксидантного действия, а также влияния на липидный спектр крови.

Ввиду накопленного огромного пласта знаний об этиологии, патогенезе ССЗ, эндогенных системах, нивелирующих повреждение сердечной мышцы, предъявлен ряд требований к *высокоэффективному кардиопротективному средству*. Важно, чтобы биологически активная молекула на клеточном уровне не только действовала метаболически или выступала в качестве восстановителя в реакциях перекисного окисления компонентов клеточных мембран и цитозоля, но и влияла на NO-эргическую систему. Последнее требование продиктовано тем, что молекула NO в последние десятилетия признана одним из основных регуляторов активности сердечно-сосудистой системы, влияющих как на ритм (проводимость, возбудимость, сократимость), так и на процесс ангиогенеза - основного фактора репарации. Также, ввиду того, что при патологии сердца значительно снижается толерантность к непродолжительным и неинтенсивным физическим нагрузкам, важно, чтобы на уровне организма кардиопротекторы повышали качество жизни. Поэтому сегодня активно ведётся поиск различных БАВ, имеющих синергизм вышеописанных механизмов действия.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ ПО ОБЗОРУ ЛИТЕРАТУРЫ

Частичная деструкция представителей флоры и фауны (в меньшей степени), протекающая под действием и при участии биотических и абиотических факторов окружающей среды приводит к формированию торфяных залежей. Торф – сложная система, состоящая из неорганической и органической части. Неорганические компоненты (оксиды, соли макро- и микроэлементов) появляются, главным образом, в результате водной и воздушной миграции, из растительных тканей. Органическая часть – доминирующая составляющая торфа. Она образуется в результате накопления части БАВ самих растений, а также синтетико-деструктивных реакций, в которые также вступают органические вещества растительных сообществ, почвенного микромира. При обработке торфа различными растворителями получают битумную часть, фракцию гидрофильных веществ, гуминовые вещества; лигнин. Все отрасли народного хозяйства – сельское хозяйство, тяжелая и легкая промышленность, медицина применяют торф и продукты его переработки, что связано с присутствием широкого спектра БАВ. Гуминовые кислоты – группа термодинамически устойчивых природных темноокрашенных высокомолекулярных азот содержащих соединений переменного состава, замещенных различными функциональными группами, способных к диссоциации в области от 2 до 14 водородных единиц. Благодаря полифункциональному строению ГК могут участвовать в протолитических, окислительно-восстановительных реакциях, реакциях донорно-акцепторного типа, а также взаимодействиях за счет обмена лигандов и обладают очень широким спектром биологической активности. Гуминовые кислоты и препараты на их основе применяются в качестве антиоксидантов, детоксикантов, гепато-, нейро-протекторов, антибактериальных средств и т.д.

Исследование биологической активности данных природных молекул для целей их последующего применения в области медицины ассоциировано не только с реализуемыми политерапевтическими эффектами, но и с благоприятным

фармакотерапевтическим профилем безопасности – при имперфективном использовании гуминовые кислоты не оказывают отрицательного воздействия на интегральные показатели общего клинического состояния, не обладают органотропной токсичностью, не проявляют эмбриотоксических и тератогенных эффектов в широком диапазоне доз.

К одной из весьма перспективных ниш применения ГК может быть причислена кардиология. Гуминовые кислоты по сравнению с другими кардиопротекторами растительного и синтетического происхождения (флавоноидами и витаминами, проявляющими высокую восстановительную активность, а также мельдонием и тиоридазином, благоприятно влияющими на метаболизм поврежденного миокарда) имеют незыблемое преимущество – способность модулировать синтез ключевого эндогенного цитопротектора с высокой биологической активностью – короткоживущего оксида азота (II), регулирующего сердечный ритм и субэдокардиальный кровоток. Более того, ГК способны восстанавливать сократительную функцию миокарда в реперфузионный период, чего лишены некоторые ЛП, входящие в стандарты лечения ИБС (органические нитраты, блокаторы кальциевых каналов (например, верапамил)).

ГЛАВА 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 ОБЪЕКТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В качестве объектов исследования выбраны два образца торфяных гуминовых кислот (ГК). Оба образца ГК выделяли из торфов, отобранных на торфяных месторождениях Томской области. Первый образец торфа был отобран на торфяном месторождении «Клюквенное», второй – на торфяном месторождении «Таган». Оба месторождения расположены в юго-восточной части Томской области на правом берегу р. Оби и относятся, согласно болотному районированию, к Кеть-Чулымской болотной провинции [11].

Торфяное месторождение «Клюквенное» расположено на территории водораздела в междуречье рек Оби и Томи, имеет площадь порядка 1 тыс. га, является крупным осоково-гипновым болотом, относится к низинному типу. Его северо-восточная часть сформировалась на месте водоема. Большая же часть болота «Клюквенное» образовалась в результате заболачивания леса. Именно в этой части торфяного месторождения и производился отбор образца торфа. Мощность торфяной залежи в этой части месторождения изменяется от 100 до 425 см. Торфяная залежь этой части болота сложена преимущественно древесно-травяным и древесно-осоковым видами торфа. Согласно данным литературы [116], к доминирующим растениям-торфообразователям, относятся: в I ярусе (из хвойных) – сосна, ель, (из широколиственных пород) – береза, в IV ярусе – различные виды осок (двудомная, дернистая), хвощ, вахта и др. Моховой ярус формируют *Sp. magellanicum* с примесью *Sp. apiculatum*. В настоящее время болото переживает процессы постпирогенной трансформации, т.к. значительная его часть была подвергнута пожару.

Торфяное месторождение «Таган» расположено на левом берегу р. Томи в 11 км от г. Томска (56°21' с.ш., 084°48' в.д.). Территория болота составляет порядка

4068 тыс. га, максимальная глубина - 9,3 м, торфяная залежь сложена песками (в меньшей степени супесями, суглинками). Торфяное месторождение подразделяется на две части – одна из них сохранена в естественном состоянии, вторая является осушенной (вдоль болота проведены осушительные борозды глубиной 0,5 м, расстояния между бороздами - 2-4 м) [12]. Отбор образца торфа производился с естественного участка. Торфяная залежь на этом участке сложена преимущественно древесно-травяным торфом [30]. Исследование химико-фармакологических свойств ГК данного вида торфа с естественного участка болота в литературе ранее не описано, в работе [51] приводятся результаты исследования физико-химических параметров структуры ГК торфа с осушенного участка болота.

Обоснование выбора объектов исследования

Гуминовые вещества, доминирующей (до 90 %) фракцией которых являются ГК, признаны на сегодняшний день как доступный и недорогой сырьевой источник биологически активных веществ, согласно современным приоритетным направлениям «Green Chemistry» [114].

Торф, как сырьевой источник, согласно многолетним (с 1961 г.) исследованиям его химических и биологических свойств [36], является наиболее эффективным, экологичным и безопасным видом сырья для получения гуминовых препаратов.

Благодаря более чем полувековому исследованию химико-биологических свойств торфа доказано, что гуминовые препараты, полученные на его основе (в сравнении с другими источниками, такими, как: сапрпели, угли, грязи) характеризуются наибольшей экологичностью, безопасностью, и что, особо ценно, эффективностью. С экологической точки зрения использование торфа в качестве сырьевого источника биологически активных соединений также является актуальным, т.к. наблюдается прогрессивное заболачивание лесов (болота занимают ежегодно в тайге от 8 до 45 тыс. га) [99].

Основные мировые запасы торфа сосредоточены на территории Российской Федерации (более 160 млрд. тонн). По данному показателю Томская область в

масштабах страны занимает второе место (32,8 млрд. тонн или 20 % ресурсов РФ) [144, 204].

В мире сегодня из торфяного сырья получают огромное разнообразие продукции для различных отраслей народного хозяйства (медицины, фармации, сельского хозяйства, охраны окружающей среды, легкой промышленности, строительства, энергетики и др.), используется при этом лишь не более 1 % от всего добываемого в мире торфа [6]. Специалисты прогнозируют, что при данных запасах торфа в Томской области объем его переработки может достигнуть 20 млн тонн/год. При этом при таком уровне добычи в течение 50 лет будет израсходовано порядка 3 % от существующих запасов [3].

Как отмечено выше, сырьевым источником ГК является древесно-травяной вид торфа. Согласно имеющимся в настоящее время расчетным оценкам распространенности видов торфа Западной Сибири встречаемость древесно-травяного вида торфа для района исследований (Кеть-Чулымской торфяно-болотной провинции) составляет 0,8 %, для Кеть-Тымской торфяно-болотной провинции его распространенность достигает 8,3 %. Таким образом, древесно-травяной вид торфа является типичным и широко распространенным для территории Томской области в частности, и Западной Сибири в целом [3].

2.2 МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.2.1 Отбор торфа и пробоподготовка

Отбор двух образцов торфа проводили торфяным буром ТБГ-1 (Рисунок 2.2.1) из середины однородных по ботаническому составу горизонтов двух месторождений. В каждой скважине отбирали только один раз, масса единичной пробы торфа составила не менее 600 г, количество скважин - порядка 50 (не менее), средняя масса одного образца торфа составила около 30 кг (не менее).

Заготавливали исследуемые образцы торфа во время летних полевых экспедиций (выезды организованы совместно с Институтом мониторинга климатических и экологических систем СО РАН (г. Томск)).

Среднюю пробу торфа, используемую для экстракции ГК, отбирали методом квартования и подвергали воздушно-теневого способу сушки. Далее торф диспергировали в электоромельнице, просеивали через сито с диаметром отверстий 3 мм.



Рисунок 2.2.1 – Торфяной пробоотборочный бур ТБГ-1

2.2.2 Фармакогностическое исследование торфа

Определение степени разложения торфа. Методом микроскопии (ГОСТ 28245-89 [33]) в тонком разжиженном слое, помещенном на предметное стекло, определяли степень разложения сырья (торфа). За данный показатель принимают процентное содержание бесструктурной части, образованной гуминовыми веществами и мелкими частицами негумифицированных остатков растений-торфообразователей. В основе метода определения степени разложения положено определение относительной площади остатков растений-торфообразователей, которую занимает бесструктурная масса торфа. Площадь, занимаемую всей пробой торфа, принимают за 100 %.

Определение влажности торфа. Влажность торфа ($W, \%$) определяли по ОФС 1.5.3.0007.15 [35]. Для этого пробы торфа ($n = 3$) при температуре 105-110°C

высушивали в лабораторном сушильном шкафу до достижения постоянной массы. Потерю массы при высушивании (в %) вычисляли по формуле

$$W = \frac{m - m_1}{m} \times 100, \quad (1)$$

где m – масса торфа до высушивания, г;

m_1 – масса торфа после высушивания, г.

Определение общей золы. Общую золу (A , %) в сырье определяли по ОФС 1.2.2.2.0013.15 [35]. Метод основан на озолении пробы сырья в муфельной печи и прокаливании образовавшегося остатка при температуре 550-650°C. Содержание золы (в процентах) находили по формуле

$$A = \frac{m_1}{m_2} \times 100, \quad (2)$$

где m_1 – масса золы сырья, г;

m_2 – масса абсолютно сухой неозолённой пробы сырья, г.

Определение золы, не растворимой в хлороводородной кислоте. Содержание золы, не растворимой в хлороводородной кислоте 10 %-ной (X , %), в сырье определяли по ОФС 1.5.3.0005.15 [35]. Метод основан на обработке остатка после определения «Золы общей» 10%-ной хлороводородной кислотой и прокаливании в муфельной печи при температуре 550-650°C. Содержание золы, не растворимой в хлороводородной кислоте (в процентах), находили по формуле

$$X = \frac{m_1 - m}{m_2} \times 100, \quad (3)$$

где m_1 – масса золы сырья, г;

m – масса золы пустого фильтра, г (если золы более 0,002 г);

m_2 – масса пробы сырья, г.

Определение ботанического состава торфа. В растительном волокне пробы микроскопическим методом по ГОСТ 28245-89 [33] определяли ботанический состав. Торф освобождали от гумуса и определяли процентные количественные соотношения остатков растений, образующих торф. Затем, используя «ключ», определяли тип и вид торфа (согласно ботанического состава).

2.2.3 Гравиметрическое определение гуминовых кислот в торфе

Определение количественного содержания ГК проводили в средней пробе торфа согласно методики, представленной в литературе [51]. Для этого торф предварительно высушивали, диспергировали и просеивали через сито с диаметром ячеек, равных 3 мм. Параллельно из одной и той же пробы проводили четыре определения.

Из средней пробы образца торфа были отобраны 2 навески точной массы ($m_{навески} = 3,0-4,0$ г). Одновременно в другой навеске образца анализировали следующие показатели - влажность ($W, \%$), зольность ($A, \%$). Значения $W, \%$ и $A, \%$ вносят вклад в погрешность количественного определения ГК, поэтому необходимы для пересчета результатов на органическую массу (OM) торфа.

Органическую массу навески ($OM_{навески}$) вычисляли в граммах, по формуле

$$OM_{навески} = m_{навески} \times \left(1 - \frac{W, \%}{100} \right) \times \left(1 - \frac{A, \%}{100} \right), \quad (4)$$

где $m_{навески}$ – масса навески пробы торфа, г;

$W, \%$ – влажность пробы торфа (формула 1);

$A, \%$ – зольность пробы торфа (формула 2).

В коническую колбу Эрленмейера объемом 1000 мл помещали навеску торфа и добавляли экстрагент - 0,1 моль/л натрий гидроксида (соотношение сырья и экстрагента составило 1 : 150). После оставляли настаиваться при комнатной температуре и периодическом перемешивании на 16-20 ч. По истечении указанного отрезка времени экстракт (раствор натрий гумата) подвергали декантированию. После к остатку торфа вновь добавляли порцию свежего экстрагента в заданном объеме, настаивали 16-20 ч и декантировали. Кратность экстракции составила 3. После третьей экстракции к остатку торфа добавляли воду очищенную до достижения нейтральной реакции среды, далее раствор отфильтровывали, промывали на фильтре водой 2 раза. Фильтрат присоединяли к раствору натрий гумата, перемешивали и измеряли объем полученного экстракта ($V_{извлечения}$).

К отобранной в объеме 1 л аликвоте натрий гумата ($V_{аликвоты}$) добавляли при интенсивном перемешивании 20 мл 10 %-ной HCl (рН среды по лакмусу 1-2).

Гуминовые кислоты при сдвиге рН в кислую сторону образовывали тёмно-коричневый хлопьевидный осадок. По истечении 2 ч (время отстаивания), после уплотнения осадка ГК, его отфильтровывали под вакуумом через абсолютно сухой (предварительно взвешенный) обеззоленный фильтр. Гуминовые кислоты на фильтре сначала дважды промывали раствором HCl (концентрация 0,5 %), а после этого водой холодной до достижения нейтральной реакции среды. Гуминовые кислоты на фильтре помещали в тигель, высушивали при температурном режиме 80°C до постоянной массы. После содержимое тигля озоляли при 550-650°C в продолжении 2 ч в муфельной печи. Расчет процентного содержания гуминовых кислот (ГК) в органической массе торфа, производили по формуле

$$ГК = \frac{ОМ_{ГК} \times V_{извлечения}}{ОМ_{навески} \times V_{аликвоты}} \times 100 \% \quad (5)$$

где $ОМ_{ГК}$ – органическая масса ГК (г), рассчитанная аналогичным способом как $ОМ_{навески}$ (формула 4);

$V_{извлечения}$ – общий объем раствора натрий гумата, мл;

$V_{аликвоты}$ – взятый для осаждения ГК объем аликвоты раствора натрий гумата (1000 мл).

2.2.4 Выделение гуминовых кислот из торфа

Извлечение ГК из торфа проводили по методике, представленной в литературе [51, 110] по схеме на Рисунке 2.2.2. Данная методика является не деструктивной и позволяет извлекать из торфа аутентичные ГК (с сохраненной нативной структурой) [51, 110].

Из двух древесно-травяных видов торфа с двух разных торфяных месторождений («Клюквенное» и «Таган») экстракцией 0,1 моль/л раствором натрий гидроксида (рН раствора 13) были выделены 2 образца ГК.



Рисунок 2.2.2 - Общая схема выделения гуминовых кислот из торфа [51]

Заготовленные виды торфа высушивали до достижения воздушно-сухого состояния при комнатной температуре, диспергировали в роторно-ножевой мельнице, просеивали через сито с диаметром отверстий 3 мм. Добавляли экстрагент (массовое соотношение 1:100) и перемешивали в реакторе марки Р-100 (Россия), температурный режим - 25°C, время экстракции - 8 ч. Затем путем фильтрации (нутч-фильтр) жидкую фазу (раствор натрий гумата) отделяли от твердой фазы (остаток торфа). Для осаждения ГК в жидкую фазу (раствор натрий гумата) добавляли раствор 10%-ной HCl до рН 1-2, и затем осажденные ГК

отделяли центрифугированием. Осадок ГК промывали от остатка минеральной кислоты холодной водой очищенной до pH 7 и высушивали при комнатной температуре.

2.2.5 Методы химического исследования гуминовых кислот

Электронная спектроскопия. Для исследования оптических свойств ГК в УФ- и В- области готовили 0,001 %-ные водные растворы исследуемых ГК из двух древесно-травяных видов торфа разных торфяных месторождений («Клюквенное» и «Таган»). Регистрацию электронных спектров поглощения проводили на спектрофотометре ПЭ-5400 УФ (Экросхим, Россия) в диапазоне длин волн 190-800 нм (кварцевая кювета толщиной 1 см) и в полученных спектрах определяли максимумы поглощения. Устанавливали коэффициенты экстинкции ($E_{0,001\% \text{ c}}$) при длинах волн 465 нм (A_{465}) и 650 нм (A_{650}), характеризующие оптическую плотность для слоя 1 см 0,001 % растворов ГК при данных длинах волн [106]. Рассчитывали коэффициент цветности по Е. Вельте ($Q_{4/6}$) [105], представляющий собой отношение оптических плотностей при длинах волн 465 и 650 нм как A_{465} / A_{650} .

Флуоресцентная спектроскопия. Для исследования флуоресцентных свойств ГК готовили 0,0004%-ые растворы исследуемых ГК из двух древесно-травяных видов торфа с разных торфяных месторождений («Клюквенное» и «Таган») в фосфатном буфере (pH = 6,86). Измерение флуоресценции проводили на спектрофлуориметре Cary Eclipse (Agilent, США), с шагом 1 нм ($\lambda = \lambda_{\text{em}} - \lambda_{\text{ex}} = 20$ нм) при $\lambda_{\text{возб}} = 270, 310$ и 355 нм, соответственно длинам волн возбуждения основных флуорофоров ГК [153, 154, 160, 203]. Устанавливали λ_{max} при $\lambda_{\text{возб}} = 270, 310$ и 355 нм как положения максимумов флуоресценции. Рассчитывали характеристичный для торфяных ГК [51] дескриптор строения - «синий сдвиг» (гипсохромный сдвиг) максимума флуоресценции [152, 153]. Данный параметр представлен двумя показателями: $\Delta 1 = \lambda_{\text{max}270} - \lambda_{\text{max}310}$ (сдвиг положения максимума флуоресценции при $\lambda_{\text{возб}} = 310$ относительно максимума флуоресценции

при $\lambda_{\text{возб}} = 270$) и $\Delta\lambda = \lambda_{\text{max}}355 - \lambda_{\text{max}}310$ (сдвиг положения максимума флуоресценции при $\lambda_{\text{возб}} = 355$ относительно максимума флуоресценции при $\lambda_{\text{возб}} = 310$).

Для улучшения пикового разрешения по сравнению с традиционным методом эмиссионной флуоресценции использовали синхронную флуоресценцию [259]. Регистрацию спектров синхронной флуоресценции проводили с использованием люминесцентного спектрометра LS50B (Perkin Elmer, Norwalk, CT, США). Образцы растворяли в NaHCO_3 (25 мМ, рН 8,5). Ширина щели для длин волн излучения и возбуждения составляла 10 нм. Синхронные спектры флуоресценции регистрировали в диапазоне от 250 до 600 нм при скорости сканирования 240 нм / мин. Разница длин волн возбуждения-излучения ($\Delta\lambda$) составляла 20 нм [259]. Флуоресцентную спектроскопию использовали также для определения индекса гумификации (НІХ) согласно [196, 230]. Индекс гумификации (НІХ) вычисляли по формуле

$$HIX = \frac{\sum I_{435 \rightarrow 480}}{\sum I_{300 \rightarrow 345}}, \quad (6)$$

где I - интенсивность флуоресцентного излучения при возбуждении на 254 нм ($\lambda_{\text{ex}} 254$ нм) [230].

Поскольку интенсивность флуоресценции может быть ослаблена самим раствором за счет эффекта внутренней фильтрации, то эффекты внутренней и вторичной фильтрации флуоресценции были скорректированы для получения точного измерения интенсивности излучения флуоресценции. Для расчета значений НІХ, скорректированных с учетом эффектов внутреннего фильтра, была проведена линейная экстраполяция на графиках зависимости НІХ от коэффициента пропускания при 254 нм для 7 различных концентраций каждой фракции. Скорректированные значения НІХ соответствуют бесконечному разбавлению (100 % коэффициента пропускания).

Инфракрасная спектроскопия. Для исследования ИК-спектральных свойств навески обоих образцов ГК из двух древесно-травяных видов торфа с разных торфяных месторождений («Клюквенное» и «Таган») отвечивали с

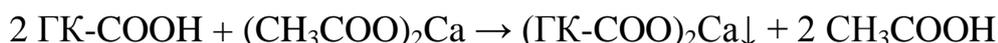
точностью до 0,0010 г. Инфракрасные (ИК) спектры ГК регистрировали в таблетках с KBr (соотношение 1 : 100) на ИК - Фурье - спектрометре ФСМ 2201 (Инфраспек, Россия) в интервале значений волновых чисел 500-4000 см⁻¹ и в полученных ИК-спектрах устанавливали максимумы поглощения. Рассчитывали значения ОППП-величин как отношения оптических плотностей полос поглощения (ОППП) кислородсодержащих функциональных групп (ν_{OH} 3400 см⁻¹, $\nu_{\text{C=O}}$ 1720 см⁻¹, $\nu_{\text{C-O}}$, $\nu_{\text{C-O-C}}$ 1225 см⁻¹, $\nu_{\text{C-O}}$ 1035 см⁻¹) к оптическим плотностям полос поглощения ароматических ($\nu_{\text{C=C}}$ 1610 см⁻¹) и алифатических ($\nu_{\text{Aliphatic}}$ 2920 см⁻¹) фрагментов. На основании вычисленных значений ОППП-величин проводили относительную количественную оценку [51, 70, 162, 278] параметров молекулярной структуры молекул ГК по данным ИК-спектроскопии.

Титриметрический анализ. Количественное определение кислотных функциональных групп в исследуемых ГК из двух древесно-травяных видов торфа с разных торфяных месторождений («Клюквенное» и «Таган») проводили титриметрическими методами в токе азота [185] согласно описанным в литературе методикам [102, 112, 206, 239] с использованием цифровой бюретки (TopBuretteH 5000 per rotation, Аналитик-Лаб, Россия). Сумму фенольных и карбоксильных групп устанавливали баритовым методом обратного титрования, содержание карбоксильных групп – кальций-ацетатным методом заместительного титрования. Количественное содержание фенольных групп вычисляли по разности.

Баритовый метод описывается реакциями [51]:

- 1) $2 \text{ГК-ОН} + 2 \text{ГК-СООН} + 2 \text{Ва(ОН)}_2 \text{ (изб)} \rightarrow (\text{ГК-О})_2\text{Ва} + (\text{ГК-СОО})_2\text{Ва}\downarrow + 4\text{Н}_2\text{О}$
- 2) $\text{Ва(ОН)}_2 + 2 \text{НCl} \rightarrow \text{ВаCl}_2 + 2 \text{Н}_2\text{О}$

Кальций-ацетатный метод описывается реакцией [51]:



Количественное определение суммы фенольных и карбоксильных групп.

В стеклянный сосуд (объемом 100 мл) с крышкой с отверстием для газа помещали точную навеску ГК (0,1-0,2 г), приливали 50 мл 0,05 моль/л раствора Ва(ОН)₂, герметично закрывали в атмосфере азота, перемешивали в течение 18 ч на встряхивателе и настаивали 24 ч. Затем отфильтровывали раствор и водой

промывали осадок на фильтре, объем фильтрата доводили до 50 мл. Отбирали аликвоту фильтрата (объемом 25 мл), добавляли ее в 25 мл 0,1 моль/л раствора HCl с целью нейтрализации свободного Ba(OH)₂. Избыток водород хлорида оттитровывали раствором Ba(OH)₂ в присутствии индикатора фенолфталеина. Количественное содержание суммы фенольных и карбоксильных групп (E_1) выражали как число ммоль Ba(OH)₂, прореагировавших с 1 г ГК (ммоль/г ГК), вычисленного по формуле

$$E_1 = \frac{50 \times C\left(\frac{1}{2}Ba(OH)_2\right) \times K_1 - 2(25 \times C(HCl) \times K_2 - C\left(\frac{1}{2}Ba(OH)_2\right) \times K_1 \times V_1)}{m_{ГК}}, \quad (7)$$

где $m_{ГК}$ – масса точной навески образца ГК, г;

V_1 – объем пошедшего на титрование раствора Ba(OH)₂, мл;

$C(\frac{1}{2}Ba(OH)_2)$ – молярная концентрация эквивалента барий гидроксида;

K_1 – поправочный коэффициент к раствору барий гидроксида;

$C(HCl)$ – молярная концентрация водород хлорида;

K_2 – поправочный коэффициент к раствору водород хлорида.

Количественное определение карбоксильных групп. В стеклянный сосуд (объемом 100 мл) с крышкой с отверстием для газа помещали точную навеску ГК (0,1-0,2 г), приливали 50 мл 0,1 моль/л водного раствора (CH₃COO)₂Ca, герметично закрывали в атмосфере азота, перемешивали в течение 18 ч на встряхивателе и настаивали 24 ч. Затем отфильтровывали раствор и водой промывали осадок на фильтре, объем фильтрата доводили до 50 мл. Отбирали аликвоту фильтрата (объемом 25 мл), выделившуюся CH₃COOH титровали 0,02 моль/л раствором NaOH в присутствии индикатора фенолфталеина. Параллельно проводили контрольный опыт: 25 мл 0,1 моль/л водного раствора (CH₃COO)₂Ca титровали 0,02 моль/л раствором NaOH в присутствии индикатора фенолфталеина. Количественное содержание карбоксильных групп (E_2) выражали как число ммоль NaOH, прореагировавших с 1 г ГК (ммоль/г ГК), вычисленного по формуле

$$E_2 = \frac{2(C(NaOH)) \times K_1 \times (V_1 - V_{к.о.})}{m_{ГК}}, \quad (8)$$

где $m_{ГК}$ – масса точной навески образца ГК, г;

V_1 – объём пошедшего на титрование раствора NaOH, мл;

$V_{к.о.}$ – объём пошедшего на титрование контрольного опыта раствора NaOH, мл;

$C(NaOH)$ – молярная концентрация раствора натрий гидроксида;

K_1 – поправочный коэффициент к раствору натрий гидроксида.

Количественное определение фенольных гидроксиллов (E_3), выраженное как ммоль/г ГК, вычисляли по разности

$$E_3 = E_1 - E_2, \quad (9)$$

где E_1 – количественное содержание суммы фенольных и карбоксильных групп, ммоль/г ГК (формула 7);

E_2 – количественное содержание карбоксильных групп, ммоль/г ГК (формула 8).

Элементный (C, H, N, O, S) анализ. Анализ элементного (C, H, N, O, S) состава исследуемых ГК из двух древесно-травяных видов торфа с разных торфяных месторождений («Клюквенное» и «Таган») проводили методом сжигания на элементном анализаторе CHNS Flash 2000 (Thermo Fisher Scientific, Великобритания), содержание кислорода определяли по разности. Массовые доли элементов ($\%_{\text{mass}}$) находили по градуировочным зависимостям, которые строили с использованием Sulphanilamide Reference standard material. По общепринятым методам (Д.С. Орлова [105] и Е.М. Заславского [49]) рассчитывали атомные доли элементов ($\%_{\text{atom}}$) и атомные отношения. С использованием модифицированной формулы Ван-Кревелена [25, 105] рассчитывали значения исправленного H/C ($H/C_{\text{испр}}$), данный показатель учитывает замещение атомов водорода на атомы кислорода в молекуле ГК, включая долю оксо-групп (K) в общем содержании атомов кислорода, принимаемую как 0,25 (по данным [25]). Поскольку доля атомов азота незначительна, то эффектом замещения атомов водорода на атомы азота можно пренебречь. Показатель $H/C_{\text{испр}}$ вычисляют по формуле

$$H/C_{\text{испр}} = H/C + 2 (O/C) \times K, \quad (10)$$

где H/C – атомное отношение элементов, рассчитанное по данным элементного анализа как $H \%_{\text{atom}} / C \%_{\text{atom}}$;

O/C – атомное отношение элементов, рассчитанное по данным элементного анализа как $O \%_{atom} / C \%_{atom}$;

K – доля оксо-групп в общем содержании атомов кислорода, принимаемая как 0,25.

Среднюю степень окисления атома углерода (ω) в молекулах ГК рассчитывали по данным элементного анализа по методу Ю.А. Жданова. [105, 231], по формуле

$$\omega = \frac{(2 O \%_{atom} + 3 N \%_{atom}) - H \%_{atom}}{C \%_{atom}}, \quad (11)$$

где $O \%_{atom}$ – атомная доля кислорода;

$N \%_{atom}$ – атомная доля азота;

$H \%_{atom}$ – атомная доля водорода;

$C \%_{atom}$ – атомная доля углерода.

Спектроскопия ядерного магнитного резонанса на ядрах ^{13}C (^{13}C -ЯМР).

С целью получения количественной структурной информации о строении ГК, использовали жидкофазный вариант спектроскопии ЯМР ^{13}C [29, 75, 140, 141, 188, 244], что имеет существенное преимущество перед методом ^{13}C -ЯМР-спектроскопии твердофазных образцов в отношении большей информативности в определении атомов углерода в ароматических фрагментах ГК [112, 244]. Использование спектроскопии ^{13}C -ЯМР в растворе в исследовании ГК позволяет получить данные о распределении углерода непосредственно по фрагментам структуры их молекул.

Пробоподготовка исследуемых образцов ГК из двух древесно-травяных видов торфа с разных торфяных месторождений («Клюквенное» и «Таган») для ЯМР исследования: точную навеску ГК (0,05 г) растворяли в 0,6 мл 0,3 М раствора $\text{NaOD} / \text{D}_2\text{O}$ (Aldrich изотопная чистота 99+атомных %) в УЗ ванне в течение 30 мин, центрифугировали (10000 об./мин) в течение 5 мин, раствор ГК отделяли от осадка и переносили в ампулу для ЯМР-спектроскопии (диаметр 5 мм). Регистрацию ^{13}C -ЯМР спектров проводили на ЯМР Фурье-спектрометре AVANCE 400 (400 МГц, Bruker, Германия), записывали их интеграл. Рабочая частота – 100 МГц, режим – INVGATE, импульсная последовательность – CPMG,

первый импульс последовательности – 90° , время регистрации сигнала спада свободной индукции – 0,2 с, время релаксационной задержки – 7,8 с, продолжительность записи одного ^{13}C -ЯМР спектра порядка 12 ч.

С целью улучшения соотношения «сигнал-шум» регистрируемые сигналы спада свободной индукции подвергали умножению на спадающую экспоненту с параметром уширения спектральной линии (lb) 100 Гц. Затем, для перевода сигнала с разверткой по времени в спектр с разверткой по частоте (измеряемой в миллионных долях (м.д.) от несущей частоты спектрометра), регистрируемые сигналы подвергали Фурье преобразованию (100 МГц для ядер ^{13}C). Для обработки спектров использовали программное обеспечение «MestReC», для интегрирования спектров по интервалам – программное обеспечение «GelTreat» (Кудрявцев А.В.).

Описание распределения атомов углерода по молекулярным фрагментам структуры ГК проводили интегрированием соответствующих спектральных областей, используя данные литературы [29, 75, 112, 140, 181, 188, 201, 229, 244, 257]. ЯМР ^{13}C -спектр интегрировали и вычисляли дескрипторы строения: степень ароматичности ($\Sigma C_{Ar}/\Sigma C_{Al}$) [140, 201] и сумму карбогидратов (углеводных фрагментов) (ΣC_{Carb}) [138]. Показатель степени ароматичности вычисляли по формуле

$$\Sigma C_{Ar} / \Sigma C_{Al} = \frac{\Sigma C_{Aromatic} (108-165 \text{ м.д.})}{\Sigma C_{Aliphatic} (5-108 \text{ м.д.})}, \quad (12)$$

где $\Sigma C_{Aromatic}$ – суммарное содержание углерода ароматических фрагментов (спектральная область 108-165 м.д.);

$\Sigma C_{Aliphatic}$ – сумма углерода алифатических фрагментов (спектральная область 5-108 м.д.).

Показатель суммы карбогидратов (ΣC_{Carb}) вычисляли по формуле

$$\Sigma C_{Carbr} = \Sigma CHnO (48-90 \text{ м.д.}) + \Sigma OCO (90-108 \text{ м.д.}), \quad (13)$$

где $\Sigma CHnO$ – суммарное содержание углерода алифатических алкокси фрагментов (спектральная область 48-90 м.д.);

ΣOCO – суммарное содержание углерода алифатических простых эфиров (спектральная область 90-108 м.д.).

Высокоэффективная эксклюзионная хроматография. Исследование молекулярно-массового распределения (ММР) исследуемых ГК из двух древесно-травяных видов торфа с разных торфяных месторождений («Клюквенное» и «Таган») осуществляли методом высокоэффективной эксклюзионной хроматографии. Хроматографическая система Dionex Ultimate 3000 («Thermo», США) включала: насос (LPG-3400SD), автосемплер (WPS-3000SL), термостат (TCC-3000SD), диодно-матричный детектор (DAD-3000). Неподвижная фаза: хроматографическая колонка для эксклюзионной ВЭЖХ Ultrahydrogel 250, 250 Å, 7,8 x 300 мм (Waters, США). Подвижная фаза: 0,1 М трис-НСl буферный раствор с рН = 8,86; скорость потока элюента - 0,5 мл/мин. Объем вводимой пробы ГК 10 мкл, температура термостата колонки 30°C, детектирование - при 220 нм (спектрофотометрическое). Колонку уравнивали подвижной фазой в течение 30 мин до достижения стабильной базовой линии. Калибровочную зависимость строили с использованием стандартных растворов (1 мг / мл) натриевой соли полистиролсульфата (PSS Polymer Standards Service GmbH, Германия) [138, 219] с молекулярными массами 1100, 1830, 4230, 10600, 29100, 75600, 148000, 261000 и 466000 Да (Рисунок 2.2.3).

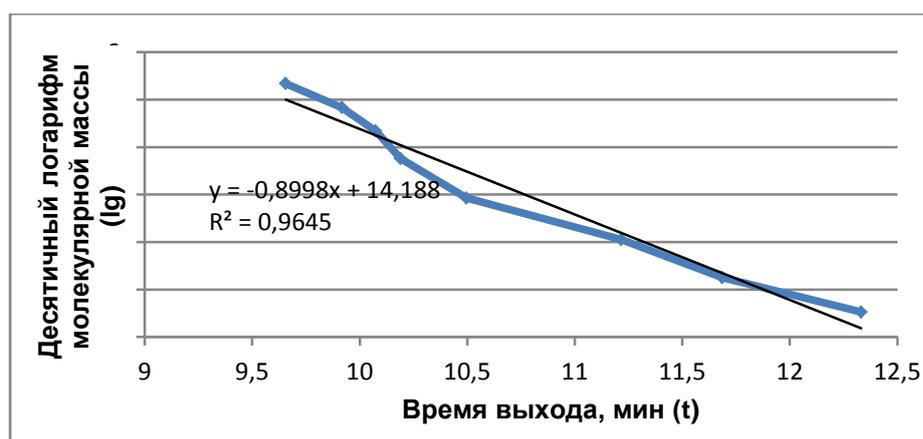


Рисунок 2.2.3 – Калибровочная зависимость колонки Ultrahydrogel 250 по стандартам PSS

Для приготовления экспериментальных растворов точную навеску ГК (10 мг) помещали в центрифужную пробирку (объемом 15 мл), добавляли 10 мл

подвижной фазы, перемешивали в течение 2 ч на мультиротаторе Multi Bio RS-24, после чего раствор центрифугировали в течение 10 мин при 15000 об / мин, аликвоту супернатанта переносили в виалу автосемплера.

При расчете ММР параметров хроматографические пики разбивали на 70 фрагментов, которые интегрировали по отдельности, хроматограммы обрабатывали с использованием программного обеспечения Chromeleon 6.8.

Вычисляли параметры молекулярной массы по формулам

$$M_w = \frac{\sum M_i^2 \times H_i}{\sum M_i \times H_i}, \quad (14)$$

где M_w – среднемассовая молекулярная масса образца ГК;

M_i – молекулярная масса i -ого фрагмента образца ГК;

H_i – высота пика i -ого фрагмента образца ГК.

$$M_n = \frac{\sum M_i \times H_i}{\sum H_i}, \quad (15)$$

где M_n – среднечисленная молекулярная масса.

$$M_p = \sqrt{M_w \times M_n}, \quad (16)$$

где M_p – медиана.

$$p = \frac{M_w}{M_n}, \quad (17)$$

где p – полидисперсность.

Результаты интерпретировали согласно литературным данным [56, 88, 97, 138, 219].

2.2.6 Методы исследования кардиотропной активности гуминовых кислот

Эксперименты проведены на 98 аутбредных крысах-самцах Wistar массой 250-300 г, которые в условиях вивария содержались в соответствии с положениями Европейской конвенции о защите позвоночных животных. С целью причинения меньшего количества повреждений, боли, страданий, тревоги животных наркотизировали медицинским эфиром. Эксперимент был осуществлен с применением модели изолированного перфузируемого по методу Лангендорфа миокарда крысы. На выбранной модели оценивали эффекты образца гуминовых кислот торфяного месторождения «Таган»: инотропные, хронотропные, кардиопротективные. С этой целью перед началом эксперимента ГК растворяли в изоосмотическом растворе Кребса-Хензеляйта. Данная методика активно реализуется на практике, так как она проста в техническом исполнении (в сравнении, например, с методикой Нилли), позволяет оценить сократительную активность желудочков, биохимические процессы в сердечной мышце, на протекание которых не оказывают влияние регуляторные системы целого организма (вегетативная нервная система, эндокринная и т.д.). В данном исследовании поступление кислорода и субстратов метаболизма к клеткам миокарда, а также отток от них продуктов катаболизма был полностью прекращен (модель тотальной ишемии). Непосредственно перед проведением болезненных манипуляций крыс наркотизировали медицинским эфиром. После чего с грудной клетки снимали кожный покров, вскрывали ее, совершая разрезы ножницами (поперек и вдоль грудины). Захваченные анатомическим пинцетом магистральные сосуды отсекали выше места захвата. Извлеченное сердце тотчас же для прекращения спонтанных сокращений помещали в раствор Кребса-Хензеляйта (температура раствора + 4°C), а затем – в термостабилизированную увлажненную камеру. Для того, чтобы обеспечить поступление в миокард изотонического раствора, насыщенного карбогеном (смесь 95 % O₂ и 5 % CO₂), восходящую часть дуги аорты канюлировали. Электролитный состав использованного для перфузии

раствора Кребса-Хензеляйта (ммоль/л) был следующим: NaCl – 120; KCl – 4,8; CaCl₂ – 2,0; MgSO₄ – 1,2; KH₂PO₄ – 1,2; NaHCO₃ – 20; глюкоза – 10, температура раствора – (+37 ±) 0,5°C, перфузионное давление – 52 мм рт. ст., pH = 7,5. Раствор Кребса-Хензеляйта и все реактивы были приготовлены на деионизованной воде (установка «Simplicity», Франция). С целью определения показателей физиологической активности миокарда в полость левого желудочка вводили катетер с баллончиком, заполненным водой очищенной (объем жидкости был достаточным для создания конечного диастолического давления 10-15 мм рт. ст.). С помощью датчика давления SS13L (Biopac System Inc., США), сопряженного с баллончиком, регистрировали показатели насосной функции миокарда (изоволюметрический режим). Изменения давления левого желудочка регистрировали аппаратом для электрофизиологических исследований MP35 (Biopac System Inc., США). Математическую обработку показателей, полученных в результате серии экспериментов, осуществляли посредством программного обеспечения INSTBSL-W (Biopac System Inc. (США)). В Таблице 2.2.1. представлено распределение животных и проводимые процедуры.

Осуществляли регистрацию показателей сократимости изолированного миокарда на 20 мин адаптации к условиям перфузии, на 10-й мин перфузии оксигенированным раствором Кребса-Хензеляйта с растворенным в нем образцом ГК (образец ГК, L-NAME) в концентрации, указанной в Таблице 2.2.1, а также на 5-й, 15-й и 30-й мин восстановления кровотока (реперфузии).

В качестве параметров, определяющих сократимость изолированного миокарда, выступали: 1) частота сердечных сокращений (ЧСС, (уд/мин)) – число сокращений миокарда в единицу времени (например, в 1 мин); 2) давление, развиваемое левым желудочком (ДРЛЖ, мм рт. ст.) – величина, численно равная разнице давления, создающегося в желудочке во время систолы и диастолы [266] и определяющая силу сокращений данного мышечного органа [243]; 3) конечное диастолическое давление (КДД, мм рт. ст.) – оказываемое на стенку сердца к концу диастолы давление крови, находящейся в камере сердца. С помощью данного показателя можно определить степень расслабления и контрактуры миокарда. Так

как контрактура (т.н. «незавершенная диастола») зависит от уровня ионов Ca^{2+} в миоплазме, то КДД можно принять за косвенный показатель концентрации данного иона в саркоплазме [69].

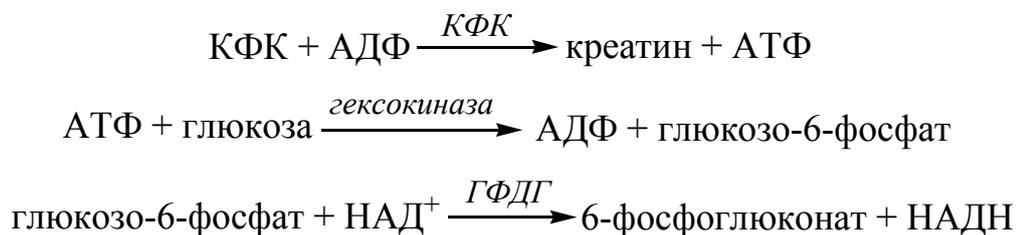
Коронарный проток измеряли путем подсчета количества перфузата, протекающего через сердце за 1 мин в пересчете на 1 г сырой массы ткани сердца. Определяли уровень креатинфосфокиназы (КФК) в перфузионном растворе, оттекающем от миокарда на протяжении всего периода реперфузии, как показатель его необратимого повреждения.

Таблица 2.2.1. – Распределение животных по сериям экспериментов

Название серий экспериментов	Количество животных
I. Исследование влияния ГК на скорость коронарной перфузии и сократительную активность изолированного сердца крыс в динамике концентраций	
нормоксический контроль: адаптация (20 мин) + нормоксическая перфузия без препарата (20 мин)	10
адаптация (20 мин) + перфузия с образцом ГК в конечной концентрации 0,001 мг/мл (10 мин) + перфузия без препарата	10
адаптация (20 мин) + перфузия с образцом ГК в конечной концентрации 0,01 мг/мл (10 мин) + перфузия без препарата	10
адаптация (20 мин) + перфузия с образцом ГК в конечной концентрации 0,1 мг/мл (10 мин) + перфузия без препарата	10
II. Исследование кардиопротекторного и инотропного действия ГК при ишемии и реперфузии изолированного сердца	
контроль на ишемию-реперфузию: адаптация (20 мин) + нормоксическая перфузия (10 мин) + ишемия (45 мин) + реперфузия (30 мин)	14
адаптация (20 мин) + перфузия с образцом ГК в конечной концентрации 0,1 мг/мл (10 мин) + ишемия (45 мин) + реперфузия (30 мин)	14
III. Исследование роли эндотелиальной NO-синтазы в реализации кардиопротекторного действия ГК	
адаптация (20 мин) + перфузия с L-NAME в конечной концентрации 100×10^{-3} мМ (10 мин) + ишемия (45 мин) + реперфузия (30 мин)	14
адаптация (20 мин) + перфузия смесью образца ГК (0,1 мг/мл) + L-NAME (100×10^{-3} мМ) в течение 10 мин + ишемия (45 мин) + реперфузия (30 мин)	14

Активность КФК определяли спектрофотометрически (спектрофотометр Smart Spec Plus (Bio-Rad, США)) при длине волны 340 нм с использованием набора реагентов для биохимии («Analiticon Biotechnologies AG» (Германия)). При добавлении анализируемого раствора, содержащего КФК, к инкубационной смеси (буферно-ферментный раствор гексокиназы, глюкозы, НАД, натрий азида),

наблюдается увеличение поглощения света, пропорциональное активности исследуемого энзима (КФК). При сливании растворов происходят следующие химические превращения:



Анализируемый фермент (КФК) служит катализатором при образовании макроэрга АТФ из креатинфосфата и АДФ (1 стадия). Синтезированный АТФ фосфорилирует глюкозу (ферментативная реакция, фермент – гексокиназа) (2 стадия). При наличии в реакционной среде глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (ГФДГ) образовавшийся на 2 стадии глюкозо-6-фосфат подвергается дегидрированию с выделением НАДН, концентрация которого прямо пропорциональна активности КФК (наблюдается повышение оптической плотности раствора).

Реакционную смесь общим объемом 1 мл помещали в термостатируемую кювету, прогревая 2 мин при 30°C. После добавляли 0,1 мл перфузата, инкубировали при заданной температуре. Измеряли оптическую плотность на 3-й, 5-й мин от начала инкубации. Активность КФК вычисляли по формуле

$$\text{КФК} = \frac{(A_{\text{нач}} - A_{\text{конеч}}) * V * 10000}{6,22 * P * 2} \left(\frac{\text{мкмоль НАДН}}{\text{мин} * \text{л}} \right), \quad (18)$$

где $A_{\text{нач}}$ – оптическая плотность смеси на 3-й мин инкубации;

$A_{\text{конеч}}$ – оптическая плотность смеси на 5-й мин инкубации;

V – общий объем (мл);

P – объем анализируемой пробы (мл);

6,22 – коэффициент молярной экстинкции НАДН при λ_{340} нм;

1000 – коэффициент пересчета на 1 л перфузата.

Конечный результат выражали в единицах активности энзима в пересчете на 1 г сырой массы сердца.

2.2.7 Методы исследования актопротекторной активности гуминовых кислот

Исследование выполнено на 40 половозрелых аутбредных крысах-самцах Wistar массой 220-250 г. Животные содержались в стандартных условиях по 5-6 особей в клетке при естественном световом режиме и на стандартном рационе, со свободным доступом к воде, пище. Эксперименты осуществляли осенью (сентябрь-октябрь). Введение раствора тестируемого вещества/физиологического раствора, предъявление физической нагрузки осуществляли в первой половине дня (9:00-11:00 ч). Все болезненные манипуляции выполняли в соответствии с правилами и рекомендациями гуманного обращения с экспериментальными животными [32]. Животные, задействованные в исследовании, были рандомизированно распределены в 4 группы (n = 10):

1) Интактная группа – крысы, находившиеся в естественных условиях освещения и не подвергшиеся никаким воздействиям;

2) Контрольная группа (группа № 1) – крысы, находившиеся в естественных условиях освещения и подвергшиеся физической нагрузке;

3) Контрольная группа (группа № 2) – крысы, находившиеся в естественных условиях освещения, подвергшиеся физической нагрузке и получившие 0,9 % раствор NaCl внутрижелудочно (0,5 мл на 100 г массы крысы) за 30 мин до плавательного теста;

4) Опытная группа – крысы, находившиеся в естественных условиях освещения, подвергшиеся физической нагрузке и получившие 1 % раствор ГК внутрижелудочно (0,5 мл на 100 г массы крысы) за 30 мин до плавательного теста.

Кинезогидродинамической моделью физической нагрузки послужил модифицированный тест принудительное плавание до полного утомления [28, 111]. Показателем полного утомления животных выступили 3 безуспешные попытки подняться на поверхность воды, либо отказ от таких попыток и опускание на дно. Для каждой особи тестируемой группы с помощью секундомера фиксировали

продолжительность плавания (в с). Плавание групп проводили параллельно в течение 5 дней подряд.

Выведение животных из эксперимента по окончании тестирования осуществили декапитированием с применением ингаляционного CO₂-наркоза. У декапитированных животных производили забор биоматериала (крови) для получения сыворотки, в которой определяли содержание молочной кислоты (лактата), как показателя интенсивности протекания гликолитических процессов при физической (в частности, двигательной) активности [178, 251]. Определение концентрации лактата проводили косвенным колориметрическим методом, по концентрации хинонимина, образующегося в ходе биохимических реакций (реагенты «Ольвекс диагностикум» (Россия)):



Оптическая плотность опытной и калибровочной проб измеряли против контрольной пробы при $\lambda = 500$ нм (анализатор «BiochemSA» (High Technology, США)).

2.2.8 Физико-химические методы исследования антиоксидантной активности гуминовых кислот

Колориметрия с дифенилпикрилгидразилом. Антирадикальную активность (АРА) образца ГК осуществляли методом колориметрии со стабильным хромоген-радикалом 2,2-дифенил-1-пикрилгидразилом (ДФПГ) на спектрофотометре ПЭ-5400 УФ (Экротхим, Россия). Радикал 1,1-дифенил-2-пикрилгидразил (ДФПГ) – стабильный азотсодержащий радикал, метанольные растворы которого окрашены в пурпурно-синюю окраску и имеют максимум поглощения при $\lambda = 520$ нм. При добавлении к раствору веществ, содержащих в

структуре подвижные атомы водорода (например, фенольные, амино-, тиольные группы), ДФПГ превращается в восстановленную форму, лишенную окраски. В результате окислительно-восстановительной реакции изменяется оптическая плотность раствора, что можно зафиксировать спектрофотометрически. Ввиду аппаратной доступности, высокой чувствительности, избирательности по отношению к антирадикальным антиоксидантам (АО) метод колориметрии с ДФПГ широко используется на практике для оценки радикал-связывающей активности как индивидуальных химических веществ, так и сложных композиций [1, 27, 150].

Константа скорости реакции, протекающей между большинством природных АО и ДФПГ в протопфильных растворителях (метанол, этанол и др.), принимает значения, меньшие, чем $1 \text{ л/моль} \cdot \text{с}$ [27], поэтому реакцию непосредственно осуществляли в кюветах, уже помещенных в отделение прибора путем добавления раствора ДФПГ к образцу ГК (комнатная температура). В состав анализируемой пробы входили 0,1 мл 0,001%-ного раствора ДФПГ (растворитель – метанол) и 0,9 мл перспективного образца ГК в конечных концентрациях 10; 25; 50; 75; 100; 125; 150 мкг / мл. В качестве раствора сравнения выступала смесь, содержащая 0,9 мл испытуемого метанольного раствора образца ГК и 0,1 мл метилового спирта. Контрольная проба включала 0,9 мл метанола и 0,1 мл 0,001%-ного метанольного раствора ДФПГ (метанол - раствор сравнения).

В присутствии АО происходит восстановление ДФПГ и исчезает его пурпурно-синяя окраска. Данное изменение контролируется уменьшением оптической плотности в течение 30 мин. Ее определение выполняли на 1 мин, 2 мин, 3 мин, 5 мин, 10 мин, 15 мин, 20 мин и 30 мин реакции. Снижение оптической плотности анализируемого раствора указывало на радикал-связывающую активность образца ГК, которую оценивали по интенсивности взаимодействия ДФПГ с образцом ГК и выражали в %, что явилось показателем АРА [1, 27].

Результаты представляли в виде кинетической кривой гибели радикалов ДФПГ в реакции с образцом ГК и дигидрокверцетином. Процент радикал-

связывающей активности ($АРА$, %) - процент гибели радикалов ДФПГ вычисляли по формуле

$$АРА = \frac{A_1 - A_2}{A_1} \times 100 \% \quad (19)$$

где A_1 – оптическая плотность контрольной пробы ДФПГ относительно чистого растворителя (метанола);

A_2 – оптическая плотность образца ГК относительно раствора сравнения испытуемого раствора образца ГК.

Из полученных данных также вычисляли величину IC_{50} , показывающую концентрацию вещества, при которой достигается уровень ингибирования в 50 % (мкг/мл) и $\tau_{1/2}$ – время (мин), за которое радикал ДФПГ прореагирует с ГК на 50 %.

Катодная вольтамперометрия. Методом катодной вольтамперометрии (прямой способ определения антиоксидантной активности (АОА)) на анализаторе «АОА» (г. Томск, Россия) определяли АОА образца ГК по методике, описанной в литературе [172]. К преимуществам данного метода относятся: высокая чувствительность, экспрессность, невысокая стоимость задействованного оборудования (например, электрохимическая ячейка может представлять собой лабораторный стаканчик либо стаканчик из кварцевого стекла) и реактивов (например, роль фонового раствора выполняет фосфатный буферный раствор), возможность анализа окрашенных гетерогенных жидкостей. Более того, по изменению тока и сдвигам вольтамперометрических кривых, можно определить механизм антиоксидантной активности аналита (ферментативный, протонизация) и реагент, с которым вступает в реакцию АО – либо триплетный кислород, либо его активные формы [43].

В электрохимическую ячейку (стеклянный стаканчик), содержащий 10 мл фонового электролита (фосфатный буферный раствор, рН = 6,86) добавляли аликвоту раствора образца ГК (0,1 мл, концентрация ГК составила $1 \cdot 10^{-6}$ г / мл). Трехэлектродная электрохимическая ячейка состояла из индикаторного ртутно-пленочного электрода, электрода сравнения и вспомогательного электрода (в качестве последних использовали хлор-серебряные электроды). Электроды

помещали в фоновый раствор и подключали к анализатору «АОА». Использовали постоянный токовый режим катодной вольтамперометрии (скорость развертки потенциала $W = 30$ мВ/с, диапазон потенциалов от 0,0 до - 0,7 В). Раствор перемешивали при помощи вибрации хлор-серебряного индикаторного электрода в продолжении 20 с, затем 10 с осуществляли успокоение раствора. После снимали первую волну катодного восстановления кислорода (ЭВ O_2), растворенного в фоновом электролите, в указанном рабочем диапазоне потенциалов (при отсутствии посторонних пиков на вольтамперограмме ЭВ O_2 фоновый раствор считался чистым). Затем в ячейку дозатором вносили раствор образца ГК и записывали поляризационную кривую ЭВ O_2 не менее 3 раз с интервалом 180 с, каждый раз оценивая значение предельного тока ЭВ O_2 . Для оценки АОА образца ГК строили зависимость относительно изменения предельного тока ЭВ O_2 от времени взаимодействия образца ГК с АФК. Степень уменьшения тока ЭВ O_2 характеризует АОА образца ГК. По тангенсу угла наклона касательной к линейной части графика рассчитывали коэффициент антиоксидантной активности (K , мкмоль/л*мин).

$$K = \frac{Co_2}{t} \times \left(1 - \frac{I_i}{I_o} \right), \quad (20)$$

где Co_2 – концентрация кислорода в исходном в растворе фонового электролита без образца ГК, мкмоль/л;

I_i – текущее значение предельного тока ЭВ O_2 , мкА;

I_o – значение предельного тока ЭВ O_2 в отсутствии образца ГК в растворе, мкА;

t – время протекания реакции между образцом и АФК, мин.

Спектроскопия электронного парамагнитного резонанса. Регистрацию спектра ЭПР образца ГК проводили на спектрометре X-частотного диапазона Bruker EMX EPR (Германия) при комнатной температуре. Навеску ГК диспергировали в ступке, помещали в ампулу кварцевого стекла (внутренний диаметр 5 мм). Подготовленную ампулу с исследуемым образцом ГК и ампулу со стандартом ($CuCl_2 \cdot 2H_2O$, спиновая концентрация $20,0 \cdot 10^{16}$ спинов) помещали в микроволновый резонатор. Условия регистрации: частота СВЧ – 100 кГц;

амплитуда – 1 гаусс; микроволновая мощность – 2,03 мВт. Автоматически были вычислены: 1) ширина синглетной линии сигнала ЭПР (ΔH , мТл); 2) интенсивность сигнала $I_{\text{абс}} \times 10^{16}$ спин/грамм как количество парамагнитных центров (ПМЦ).

Колориметрия с феррозином. Колориметрическую оценку железосвязывающей (хелатирующей) активности ГК проводили на спектрофотометре Unicо 2800 при $\lambda = 562$ нм по реакции взаимодействия ГК с комплексом феррозин- Fe^{2+} , согласно методике, изложенной в литературе [265]. Анализируемые пробы содержали водные растворы ГК или ЭДТА точной концентрации (конечные концентрации в кювете 12,5; 25; 50; 75; 100; 150 мкг/мл), раствор железо сульфата (FeSO_4 , 400 мкМ), феррозин (2,4 мМ). В кювету на 1 мл помещали испытуемый раствор определенного объема, разбавляли его добавлением раствора NaCl (0,15 М) для получения заданной конечной концентрации, добавляли раствор FeSO_4 (в конечной концентрации 20 мкМ) и перемешивали. Добавляли феррозин (в конечной концентрации 120 мкМ) и выдерживали экспозицию 10 мин, спектрофотометрировали при $\lambda = 562$ нм. В результате хелатирования комплекса феррозин- Fe^{2+} фиолетовая окраска снижалась. Уменьшение величины оптической плотности указывало на железосвязывающую активность ГК, которую оценивали по интенсивности взаимодействия комплекса феррозин- Fe^{2+} с ГК и представляли в (%), что и явилось характеристикой хелатирующей активности ГК.

Результаты представляли в виде кинетических взаимодействий комплекса феррозин- Fe^{2+} с ГК и ЭДТА. Процент железосвязывающей активности (хелатирующей активности, %) вычисляли по формуле

$$\frac{A_1 - A_2}{A_1} \times 100 \% \quad (21)$$

где A_1 – оптическая плотность контрольной пробы относительно чистого растворителя;

A_2 – оптическая плотность испытуемой пробы относительно раствора сравнения испытуемого раствора.

Из полученных данных также вычисляли величину IC_{50} , показывающую концентрацию вещества, при которой достигается уровень ингибирования в 50 % (мкг / мл).

2.3 Математические методы обработки результатов

Статистическую обработку данных проводили стандартными методами с помощью программного пакета STATISTICA 8.0. Результаты экспериментов обрабатывали, применяя непараметрический U-критерий Манна-Уитни и представляли в виде среднего арифметического (M) \pm стандартная ошибка среднего (статистически значимые различия при $p < 0,05$).

Данные эксперимента по установлению актопротекторной активности представлены в виде квартилей ($Q_1 - 25\%$; $Q_3 - 75\%$) и медианы (M_e). Анализ множественных сравнений проводили непараметрическими тестами Краскала-Уолиса и Фридмана. Достоверность различий между группами устанавливали с помощью непараметрического критерия Манна-Уитни, используемого для двух независимых выборок, а также критерия Вилкоксона, используемого для проверки различий между зависимыми выборками ($p < 0,05$). Для оценки характера распределений между группами применяли критерий « χ -квадрат».

ГЛАВА 3 ХАРАКТЕРИСТИКА ТОРФА И ИССЛЕДОВАНИЕ ГУМИНОВЫХ КИСЛОТ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИМИ МЕТОДАМИ АНАЛИЗА

В ходе биологического эксперимента, ранее проведенного группой ученых СибГМУ [64] (объектом исследования был образец ГК низинного древесно-травяного торфа месторождения «Клюквенное»), было установлено его влияние на сердечно-сосудистую систему. В продолжение начатого коллегами исследования было бы логично использовать этот же образец торфа. Но, на сегодняшний день такой возможности нет, т.к. торфяное болото «Клюквенное» подверглось пожару и стало экологически не пригодным для заготовки торфяного сырья для медицинских целей. В связи с этим, был проведен поиск образца низинного древесно-травяного торфа со схожими свойствами и ботаническим составом на имеющихся в Томской области торфяных месторождениях. Наиболее подходящим объектом стало торфяное болото «Таган» Томской области [12, 30]. В связи с чем, данная глава работы посвящена сравнительному изучению двух образцов низинного древесно-травяного вида торфа с целью обоснования перспективности использования образца торфа с естественного участка болота «Таган» как сырьевого источника для дальнейшего фармакологического исследования. Ранее [34] было проведено химико-фармакологическое исследование ГК низинного древесно-травяного торфа с болота «Клюквенное», где выделение ГК проводили по методике, предложенной Н.Н. Бамбаловым [7]. Поскольку в многочисленных работах [51, 76, 104, 112, 114, 141, 259] было доказано, что состав и свойства ГК очень сильно зависят не только от сырьевого источника (торф, уголь, сапрпель и др.), но и от способа экстракции (концентрации и видов используемых реагентов, температурного и временного режима, технологических операций и пр.), то важно строго соблюдать протокол выделения ГК из сырья. В связи с чем, потребовалось изучение физико-химических параметров данных ГК (из низинного древесно-травяного торфа с болота «Клюквенное») в соответствии с предложенной в Главе 2 Схемой выделения ГК (Рисунок 2.2.2) и методами исследования структуры.

3.1 СРАВНИТЕЛЬНОЕ ФАРМАКОГНОСТИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ДВУХ НИЗИННЫХ ДРЕВЕСНО-ТРАВЯНЫХ ВИДОВ ТОРФА. ВЫДЕЛЕНИЕ ГУМИНОВЫХ КИСЛОТ

Результаты фармакогностического исследования (степени разложения, общей золы и золы, не растворимой в 10 %-ной хлороводородной кислоте, а также ботанического состава двух образцов торфа) представлены в Таблице 3.1.1.

Микроскопический анализ растительного волокна торфа [33] позволил заключить о высокой степени схожести ботанического состава двух древесно-травяных видов торфа с разных торфяных месторождений («Клюквенное» и «Таган»). Так, в образце торфа с болота «Клюквенное», соотношение травяных и древесных растительных остатков составляет 7 : 3, как и в образце торфа с болота «Таган». На долю остатков осоки в образце торфа с болота «Клюквенное» приходится 30 %, вахты – 25 %, хвощевидных – 10 %, мохообразных – 5 %. Для образца торфа с болота «Таган» характерен идентичный компонентный состав: осоки – 50 %, вахты – 15 %, хвощевидных – 5 %, мохообразных и папоротниковых – следовые количества.

Два исследуемых образца низинного древесно-травяного торфа также незначительно отличаются между собой по степени разложения (R, %) - процентным содержанием в торфе бесструктурной массы, состоящей из ГВ и мелких частиц неразложившихся растительных остатков. Для обоих образцов торфа характерна средняя степень разложения – в пределах 25-45 %. По зольности (A, %) два исследуемых образца низинного древесно-травяного торфа характеризуются как низкозольные торфа и имеют значительное отличие между собой (на 2,5 %). Содержание золы, не растворимой в 10 %-ной хлороводородной кислоте (X, %), показывает относительное количество оксида кремния в образцах сырья и характеризует его загрязненность минеральными примесями (земля, песок). Образец торфа с болота «Таган» является менее загрязненным.

Таблица 3.1.1 – Результаты фармакогностического исследования образцов торфа

Место отбора торфа (глубина отбора, см)	¹ R, %	² A, %	³ X, %	Ботанический состав (частей растительных остатков)	Тип, вид торфа
болото «Клюквенное» (10-50)	25-30	8,92± 0,11	3,98± 0,10	<i>Carex lasiocarpa</i> Ehrh. (10); <i>Carex cespitosa</i> L. (5); <i>Carex omskiana</i> Meinsh. (15); <i>Menyanthes trifoliata</i> L. (25); <i>Equisetum fluviatile</i> L. (10); <i>Sphagnum centrale</i> С.Е.О. Jensen (5); древесина кустарников (30)	низинный, древесно-травяной
болото «Таган» (50-100)	30-35	6,40± 0,12	2,98± 0,08	<i>Carex lasiocarpa</i> Ehrh. (50); <i>Menyanthes trifoliata</i> L. (15); <i>Equisetum</i> sp. (5); <i>Hypnaceae</i> (<i>Bryum</i> , <i>Meesia</i>) (+); <i>Polypodiophyta</i> (+); древесина кустарников (30)	низинный, древесно-травяной
Примечания					
1 R, % – степень разложения торфа (процентное содержание в торфе бесструктурной массы)					
2 A, % – содержание общей золы в торфе					
3 X, % – содержание в торфе золы, не растворимой в 10 %-ной хлороводородной кислоте					

Характеристические параметры торфа (R, %, A, % и X, %) являются важными показателями для использования его в качестве сырьевого источника БАВ, в частности ГК, поскольку известно [3], что наиболее ценными для получения гуминовых препаратов являются низинные виды торфа с более высокой степенью разложения и с низкой зольностью (6 % и ниже), т.к. обычно характеризуются высоким содержанием ГК.

Таким образом, по результатам фармакогностического исследования двух древесно-травяных видов торфа с разных торфяных месторождений («Клюквенное» и «Таган») можно заключить, что они являются очень близкими по своему происхождению. Наиболее предпочтительным для целей выделения ГК является образец торфа с месторождения «Таган», т.к. отличается более высокой степенью разложения (на 5 %), меньшей зольностью (на 2,5 %) и меньшей загрязненностью минеральными примесями (на 1 %).

Выделение гуминовых кислот. Выделение образцов ГК из торфа осуществляли 0,1 моль/л раствором NaOH, который характеризуется высокой извлекающей способностью в отношении ГК, т.к. при диссоциации данного

экстрагента увеличивается концентрация гидроксид-ионов и возрастает ионизация карбоксильных групп ГК [56, 259], достигая полноты диссоциации при $pH \approx 10$ [5].

Извлеченные из торфа образцы ГК представляют собой беззольный ($A_{ГК} = 0\%$) аморфный темно-коричневый порошок без запаха. Результаты гравиметрического анализа представлены в Таблице 3.1.2, из которой видно, что исследуемые образцы ГК низинного древесно-травяного торфа практически не отличаются по содержанию в них ГК при извлечении их 0,1 моль/л раствором NaOH. Разница составила порядка 0,5 %.

Таблица 3.1.2 – Содержание гуминовых кислот в образцах низинных древесно-травяных видов торфа

Торфяное месторождение	Шифр образца	ГК, %	Зольность образцов ГК ($A_{ГК}$, %)
«Клюквенное»	ГК-1	38,20±0,31	0
«Таган»	ГК-2	38,77±0,32	0
Примечание ГК, % - процентное содержание гуминовых кислот в торфе при выделении раствором натрий гидроксида (в пересчете на органическую массу торфа)			

В целом, для данных образцов можно отметить достаточно высокий количественный выход ГК в сравнении с литературными данными, что связано с тем, что основой синтеза ГК в торфах низинного типа выступает лигнин, уровень которого в верховых торфах незначителен [37, 55, 105].

Таким образом, практически одинаковое количественное содержание ГК в двух древесно-травяных видах торфа разных торфяных месторождений («Клюквенное» и «Таган») может указывать на идентичность в их параметрах строения и свойств, обусловленных происхождением.

3.2 СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ ПАРАМЕТРОВ СТРУКТУРЫ ГУМИНОВЫХ КИСЛОТ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ ДВУХ НИЗИННЫХ ДРЕВЕСНО-ТРАВЯНЫХ ВИДОВ ТОРФА

Исследование гуминовых кислот методом электронной спектроскопии.

Гуминовые кислоты независимо от видовой и групповой принадлежности торфа, а также других каустобиолоитов, используемых в качестве сырьевого источника их получения, имеют темную окраску, что свидетельствует об их способности взаимодействовать с электромагнитным излучением в В- и УФ- области. Поглощение света данного оптического диапазона (УФ-область – 200-400 нм и В-область – 400-800 нм) обусловлена присутствием хромофорных систем, к основным из которых, по свидетельству литературных источников [31, 76, 78, 105, 107, 121, 242, 259], относятся полисопряженные С=C-связи.

Характерная черта ГК – двучленное строение. Периферическая часть, состоящая из полипептидных и полиозных (полисахаридных) цепей, в состав которых входят насыщенные мономерные фрагменты – аминокислоты и углеводы, не имеет окраски. Поэтому полисопряженные С=C-связи сосредоточены в т.н. «ядре» ГК и представлены алициклическими полиненасыщенными и циклическими (карбоциклическими и гетероциклическими) фрагментами. Помимо хромофоров, представленными С=C-связями, абсорбцию света обуславливают кратные связи при гетероатомах азота, кислорода, фосфора, серы, входящими в состав функциональных групп типа С=О, С=N, N=N, N=O, S=O, P=O [78].

Электронные спектры двух исследуемых образцов ГК из древесно-травяных видов торфа разных торфяных месторождений («Клюквенное» и «Таган») представлены на Рисунке 3.2.1, из которого видно, что они имеют одинаковые профили полос поглощения, указывающие на общность их химического строения [149]. Электронные спектры двух исследуемых ГК в видимой (400-800 нм) области спектра чётко выраженных максимумов поглощения не имеют. Профили спектров имеют вид пологих кривых, имеющих сплошное поглощение, по мере увеличения

длины волны оптическая плотность постепенно уменьшается. В УФ области спектра (200-400 нм) наблюдается резко возрастающее в коротковолновую сторону поглощение света. Отмечается, что в области 255-275 нм у обоих образцов ГК наблюдается плечо, характерное для карбонильных, карбоксильных, фенольных групп, полиеновых цепей [76, 259, 261]. Повышение интенсивности поглощения в области 255-275 нм соответствует $\pi \rightarrow \pi^*$ - и $n \rightarrow \pi^*$ -переходам, характерным для ароматических карбонильных соединений, карбоновых кислот, их функциональных и гетерофункциональных производных, ката- и периконденсированных ароматических систем (типа пиренов, периленов, аценов, фенов и др).

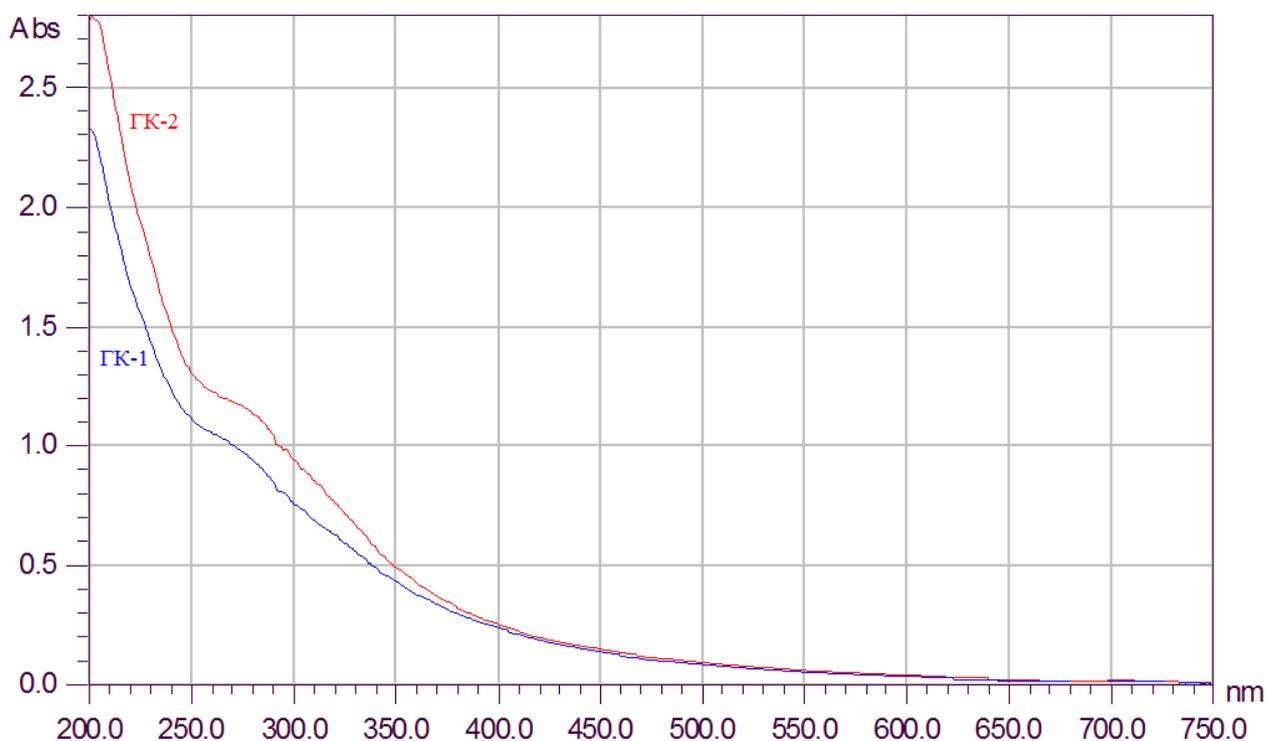


Рисунок 3.2.1 – Электронные спектры гуминовых кислот, выделенных из двух древесно-травяных видов торфа разных торфяных месторождений (ГК-1 – «Клюквенное» и ГК-2 – «Таган»)

При этом несмотря на монотонность профилей спектров, поглощение света гуминовыми кислотами в видимой и ультрафиолетовой областях имеет определенную специфичность в зависимости от происхождения ГК [51]. К таким особенностям помимо наклона кривой светопоглощения относительно оси абсцисс относятся величины оптических плотностей при определенных длинах волн и

рассчитанные на их основании коэффициенты экстинкции и цветности [4, 78, 80, 149], зависящие от числа и расположения электронов в поглощающих молекулах и ионах.

При сравнении коэффициентов экстинкции можно получить информацию о соотношении алифатической и ароматической частей в молекуле ГК, а, следовательно, и оценить степень их ароматичности. Так, по мнению авторов [31, 76, 78, 79, 105, 107, 183], поглощение света гуминовыми кислотами связано с органическим углеродом в составе конденсированных ароматических структур, в то время как, абсорбция света углеродом в составе радикалов такого вида как: $-\text{CH}=\text{CH}-\text{COOH}$, $-\text{CH}=\text{CH}-\text{CO}-$, равна нулю.

По мнению авторов [129], величина оптической плотности прямо коррелирует не только со степенью ароматичности ГК, но и с количеством функциональных групп, содержащих кратные связи (особо весомый вклад оказывают хиноидные фрагменты).

По мнению Д.С. Орлова [105, 107], одним из показателей, опираясь на который, вещество можно причислить к ГК, является коэффициент экстинкции, определенный при длине волны 465 нм – $(E_{465\text{nm},1\text{cm}}^{0.001\% \text{ГК}}, E_{465})$. Коэффициент экстинкции является некой относительной величиной, вычисленной по отношению к условной единице молярной массы (Мм) вещества (ГК). На основании допущения, что величина E_{465} зависит от значения Мм, авторы работ [4, 105, 107] заметили, что более высокое значение данного показателя характерно для менее высокомолекулярных ГК.

Судя по данным электронной спектроскопии (Таблица 3.2.1) оба исследуемые образца ГК имеют характерные для ГК природных каустобиолитов значения E_{465} – величин (0,01-0,2) [105, 107] и незначительно отличаются друг от друга. Немногоим более высокое (на 6 %) значение E_{465} –величины имеет образец ГК-2, выделенный из торфа с болота «Таган» (0,1284), по сравнению с ГК-1 из образца торфа с болота «Клюквенное» (0,1202). Полученные результаты указывают на существование в

структуре ГК-2 наиболее разветвленной и протяженной системы полисопряжения, включая различные функциональные группы [4, 56, 105, 107, 129].

Таблица 3.2.1 – Оптические свойства гуминовых кислот

Тип, вид торфа	Шифр образца	$E_{465nm,1cm}^{0.001\%ГК}$	$E_{650nm,1cm}^{0.001\%ГК}$	$Q_{E_{465}/E_{650}}$
низинный, древесно-травяной («Клюквенное»)	ГК-1	0,1202±0,0021	0,0411±0,0005	2,9246±0,0420
низинный, древесно-травяной («Таган»)	ГК-2	0,1284±0,0023	0,0398±0,0005	3,2261±0,0498

Коэффициент цветности ($Q_{E_{465}/E_{650}}$, $Q_{4/6}$) по Е. Вельте [105] (A_{465} / A_{650}) также является важным показателем оптических свойств ГК. Коэффициент цветности показывает степень уменьшения оптической плотности при длинах волн, лежащих в интервале 465-650 нм [159] и зависит, главным образом, от химической структуры ГК. Поглощение света макромолекулами ГК при 465 нм, по мнению авторов [4, 31, 56, 105, 107], связано с алифатической составляющей, а при 650 нм – с ароматической, поэтому $Q_{4/6}$ отражает соотношение ароматической (ядерной) и алифатической (периферической) части, и может служить мерой ароматичности молекул ГК. По литературным данным более высокие значения коэффициента Е. Вельте ($Q_{4/6}$) характерны для ГК, имеющих менее сложное строение [4], меньшее относительное количество конденсированных ароматических структур [56, 76, 159, 181, 182, 261, 262, 278], меньшую молекулярную массу и количество углерода, более высокое содержание кислородсодержащих групп, массовые доли кислорода [181, 183, 261, 278] и азота [79]. В работах [31, 183] представлены сведения о прямой корреляционной зависимости между значениями $Q_{4/6}$ и содержанием хромофорных групп (карбокисильных, карбонильных, ароматических) и биологической активностью.

Более низкие значения $Q_{4/6}$ —величин свидетельствует о доминировании ароматической части молекулы и может свидетельствовать об их высокой термодинамической устойчивости и гумифицированности, т.е. степени

превращения растительных остатков, послуживших материальной основой их образования [31].

Анализ данных оптических свойств двух исследуемых образцов ГК (Таблица 3.2.1) показал, что самые высокие значения $Q_{4/6}$ -величин также отмечены для образца ГК-2, выделенного из торфа с болота «Таган» (3,2261), по сравнению с ГК-1 из образца торфа с болота «Клюквенное» (2,9242). Отмеченная разница значений (на 10 %) может указывать на более низкую степень конденсированности ароматических структур в макромолекуле ГК-2 и более сложное молекулярное строение молекулы ГК-1.

Одной из характеристик ковалентной связи является поляризуемость, под которой подразумевают изменение полярности под влиянием внешнего воздействия, в качестве которого может выступать электромагнитное излучение в УФ- и В- областях. Поглощение кванта света приводит к переходу валентных электронов на более высокие по энергии орбитали и обуславливает оптическую плотность молекул органических веществ. Чем больше в молекуле π -связей, например, $C=C$, $C=O$, тем с большей легкостью происходит смещение электронов и, соответственно, больше величина оптической плотности. На основании чего авторы работ [78-80] одну из важнейших характеристик электронного спектра – оптическую плотность связали с понятием поляризуемости и реакционной способности двух типов кратных связей. Исходя из данной гипотезы, можно предположить, что молекула образца ГК-2 является более легко поляризуемой и реакционно способной, чем ГК-1, т.к. для ГК-2 характерны более высокие значения оптической плотности.

Таким образом, результаты исследования образцов ГК из двух древесно-травяных видов торфа разных торфяных месторождений («Клюквенное» и «Таган») методом электронной спектроскопии, показывают наличие в структуре обеих молекул ГК алифатических и ароматических фрагментов, содержащих разнообразные функциональные группы. Подобные профили полос поглощения обеих молекул ГК характеризуют идентичность их строения. Незначительные различия спектральных свойств обеих образцов ГК позволяют охарактеризовать их

некоторые отличия (опираясь на данные литературы). В частности, образец ГК-2 (выделенный из торфа с болота «Таган») отличается от образца ГК-1 (выделенного из торфа с болота «Клюквенное») наличием в его молекуле более разветвленной и протяженной системы полисопряжения, которая содержит разнообразные кратные связи (в большей степени $C=C$ и $C=O$), меньшей степенью поликонденсации ароматических фрагментов в его структуре. Отмечено, что образец ГК-2 является легко поляризуемым соединением в большей степени, чем ГК-1. Для образца ГК-1 отмечено более сложное строение макромолекулы, более высокое содержание объёмной циклической части, где преобладают поликонденсированные ароматические структуры.

Исследование гуминовых кислот методом флуоресцентной спектроскопии. Наличие в молекулах ГК большого количества ароматических структур и ненасыщенных алифатических цепей с различными функциональными группами определяет одно из их фундаментальных свойств – способность флуоресцировать [152, 153, 206] аналогично некоторым другим веществам животного и растительного происхождения, имеющих систему сопряженных связей (пигментам, полифенольным соединениям, полимерам типа нуклеиновых кислот и белкам), а флуоресцентные спектры оценивают как «отпечатки пальцев» ГК различного генеза [133, 162, 166, 168, 199, 211, 212, 276].

Гуминовые кислоты, выделенные из различного вида сырья, а также полученные синтетически посредством химической и механической модификации природных ГК, характеризуются схожим профилем (положение максимума, ширина пика, химический сдвиг) спектров флуоресценции. Поэтому флуоресцентный анализ наряду с другими спектральными методами может дать информацию об их структуре и происхождении [121, 152, 158, 184, 202, 241, 253, 259] и использоваться для решения такой аналитической задачи, как установление строения.

В зависимости от длины волны электромагнитного излучения, воздействующего на ГК, варьирует положение максимума флуоресценции (свечения) в синей области. При возбуждении светом с $\lambda = 270$ нм, максимум

находится в диапазоне 430-510 нм, а при $\lambda=310$ нм – наблюдается сдвиг в область коротких волн [152, 153, 184, 206, 241, 253]. Такое смещение (сдвиг) спектров испускания, происходящее при увеличении длины волны возбуждающего света, называется гипсохромным сдвигом («синим сдвигом») [152, 153].

По данным литературы [166, 184, 202, 241, 253] в молекулах ГК к структурам, которым присуще свойство флуорофоров, относятся: фенольные группы, фрагменты бензо- α -пирона и хинона; продукты поликонденсации (имины, лигнин) и биодеструкции непредельных жирных кислот [184, 253], пигментов растений (хлорофилл, каротиноиды) [166, 184], мономеры белков – аминокислоты ароматического характера (триптофан, тирозин) [166, 184].

Анализ флуоресцентных спектров ГК является одной из первых ступеней в исследовании их структуры, т.к. особенности и характер полос флуоресценции позволяют получить информацию о генезе, составе и структурных особенностях различных ГК [121, 152, 184, 241, 253]. К примеру известно, что химический сдвиг торфяных ГК, лигнина, вод природных источников на 20-30 нм превышает таковой для ГК, выделенных из углей, почв, стандартных гуминовых препаратов Международного гуминового общества (IHSS) [152, 184].

Синхронные спектры флуоресценции двух исследуемых образцов ГК из древесно-травяных видов торфа с разных торфяных месторождений («Клюквенное» и «Таган») представлены на Рисунке 3.2.3. Оба спектра имеют подобные профили полос флуоресценции и положения их максимумов совпадают. Это указывает на общность их химического строения. Согласно литературным данным [121, 153, 158, 182, 184, 253, 259] представленные спектры флуоресценции обоих образцов ГК являются типичными для ГК природного происхождения, представляют собой широкую полосу в диапазоне 300-600 нм с тремя пиками в видимой области (450 нм, 475 нм и 510-520 нм) с максимальным центрированием при 475 нм и наличием небольшого плеча при 400 нм.

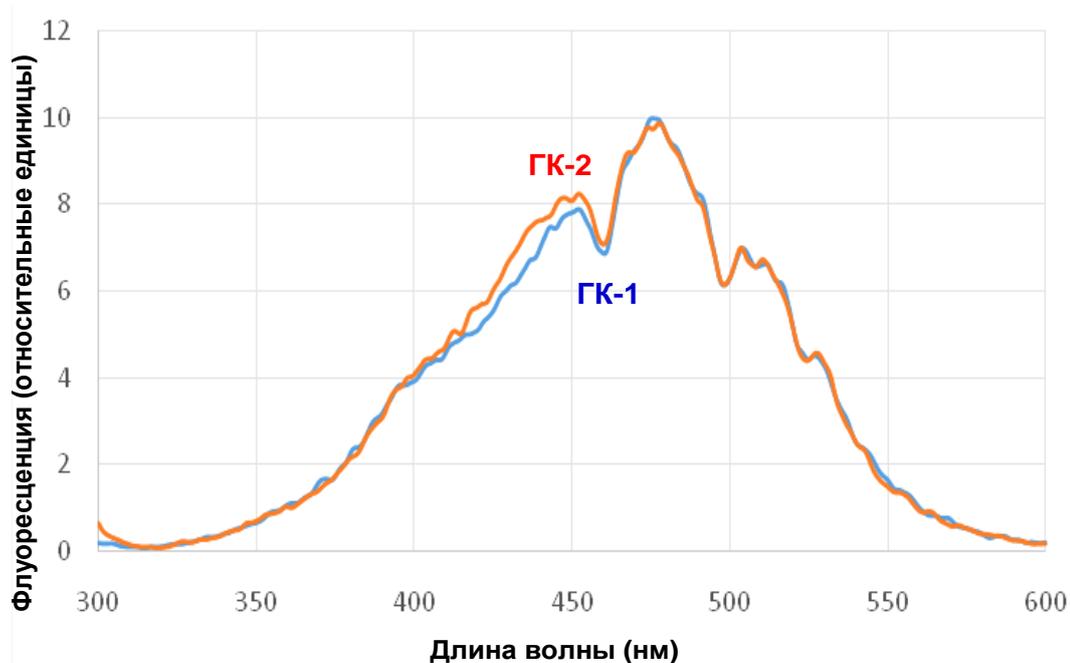


Рисунок 3.2.3 – Флуоресцентные спектры гуминовых кислот, выделенных из двух древесно-травяных видов торфа с разных торфяных месторождений (ГК-1 – «Клюквенное» и ГК-2 – «Таган»), при $\lambda_{\text{возб}} = 270$ нм

По литературным данным спектр флуоресценции ГК обычно имеет 3 максимума, расположенных при разных длинах волн, что свидетельствует о наличии в структуре флуорофоров нескольких типов. Первый пик на 360-400 нм (в данном случае – плечо на 400 нм) обуславливают сопряженные карбонильные и фенольные группы, мономеры полипептидов типа триптофана, фенилаланина и тирозина [153, 184, 202, 253, 259]. Второй пик возбуждения на 410-450 нм (в данном случае на 450 нм) относится к компонентам с более протяженной цепью сопряжения по сравнению с вышеуказанными структурами. К таковым относятся: конденсированные системы, состоящие из двух, трех карбоциклических и гетероциклических ароматических колец – дифенил, фенантрен, хинолин, кумарин, хромон, ксантин, гетерофункциональные производные ароматических кислот (гидроксикислоты – коричная кислота), продукты трансформации лигнина [184, 253, 259]. Третий пик возбуждения на 460-530 нм (в данном случае на 475 нм) - это характерный максимум для природных ГК, характерной особенностью которого является наибольшая интенсивность флуоресценции, как и отмечается на

Рисунке 3.2.3. Он относится к флуорофорным фрагментам типа поликонденсированных ароматических и алифатических ненасыщенных систем с длинной цепью сопряжения, образующихся во время процесса гумификации ГК [105, 121, 152, 153, 158, 184, 202, 203, 206, 241, 253, 259]. Различные соотношения интенсивностей описанных пиков возбуждения могут характеризовать относительный вклад флуорофоров каждого типа в общую флуоресценцию ГК, что указывает на относительный вклад каких-либо фрагментов строения во всю структуру молекулы ГК. Более того, в литературе [241] отмечается, что если в спектрах возбуждения флуоресценции зафиксировано излучение свыше 488 нм (в данном случае на 510-520 нм), то это свидетельствует о возможном присутствии в структуре ГК поликонденсированного ароматического фрагмента, представленного пятью и более кольцами (типа индено[1,2,3-с,d]пирена).

Абиогенные и биогенные факторы, воздействуя на растительные остатки, определяют степень их трансформации или т.н. «химическую зрелость» ГК, которая может быть определена с помощью таких параметров, как: степень ароматичности, разветвленность цепи полисопряжения. В свою очередь эти параметры определяются на основании флуоресцентного анализа. Сильная интенсивность флуоресценции третьего пика (460-530 нм) обычно свидетельствует о высокой степени ароматичности и большей «химической зрелости» ГК [166, 184, 202, 253]. В данном случае в обоих образцах ГК данные параметры сопоставимы.

При исследовании флуоресценции ГК в литературе [121, 153, 158, 184, 202, 253, 259] обычно в качестве параметров флуоресценции выбирают λ_{\max} , нм (длину волны максимума флуоресценции) и Δ , нм (величину гипсохромного или т.н. «синего» сдвига максимума флуоресценции) [153]. При этом положение λ_{\max} , нм чаще зависит от $\lambda_{\text{возб}}$, что указывает на наличие в составе ГК нескольких флуорофорных групп.

Параметры флуоресценции молекулярной структуры двух исследуемых образцов ГК представлены в Таблице 3.2.2. Анализ данных показывает, что λ_{\max} при $\lambda_{\text{возб}} = 270$ нм и $\lambda_{\text{возб}} = 355$ нм для обоих исследуемых ГК находится в пределах 463-468 нм, при этом для образца ГК-2 из низинного древесно-травяного торфа с

болота «Таган» эти значения одинаковые (468 нм). Согласно литературным данным [121, 152, 153, 158, 184, 202, 203, 206, 241, 253, 259] такие длины волн максимумов флуоресценции характерны для ГК природного происхождения, в частности – λ_{\max} в области 430-510 нм при $\lambda_{\text{возб}} = 270$ нм и 355 нм.

Таблица 3.2.2 – Флуоресцентные свойства гуминовых кислот из двух низинных древесно-травяных видов торфа

Место отбора торфа	Шифр образца	Положения максимума флуоресценции (λ_{\max} , нм)			Гипсохромный сдвиг («Синий сдвиг»)		³ НІХ
		$\lambda_{\text{возб}} = 270$	$\lambda_{\text{возб}} = 310$	$\lambda_{\text{возб}} = 355$	¹ $\Delta 1$, нм	² $\Delta 2$, нм	
Болото «Клюквенное»	ГК-1	473,5±0,8	430,5±0,1	477,5±0,5	43,0±0,5	47,0±0,5	0,81
Болото «Таган»	ГК-2	478,5±0,8	430,0±0,1	478,0±0,5	48,0±0,5	48,5±0,5	1,01
Примечания							
1 $\Delta 1$, нм – сдвиг положения $\lambda_{\max}(310)$ относительно $\lambda_{\max}(270)$, $\Delta 1 = \lambda_{\max}(270) - \lambda_{\max}(310)$							
2 $\Delta 2$, нм – сдвиг положения $\lambda_{\max}(310)$ относительно $\lambda_{\max}(355)$, $\Delta 2 = \lambda_{\max}(355) - \lambda_{\max}(310)$							
3 НІХ – индекс гумификации							

При возбуждении растворов двух исследуемых ГК при $\lambda_{\text{возб}} = 310$ нм происходит коротковолновый «синий сдвиг» для образцов ГК до 430 нм. Такое спектральное поведение («синий сдвиг») характерно для ГК природного происхождения и ранее уже отмечалось в литературе [152, 153]. Оно зависит от возбуждения на длине волны 310 нм дополнительных флуорофоров и хромофоров в структуре ГК [152, 153], т.к. наиболее крупные фрагменты структуры ГК показывают более длинноволновой спектр испускания, а мономеры и структурные фрагменты меньших размеров – флуоресцируют в коротковолновой области спектра [153].

С увеличением $\lambda_{\text{возб}}$ до 355 нм происходит увеличение длины волны максимума спектра испускания (обратное смещение λ_{\max} в длинноволновую область), причем для образца ГК-1 ее значение превышает $\lambda_{\text{возб}} = 270$ нм на 4 нм. Данная тенденция в спектральном поведении ГК, как то, что флуорофоры с близкими по ширине и положению полосами испускания отличаются полосами поглощения, объясняется гетерогенностью состава их флуорофоров. Именно такое свойство природных ГК считается их индивидуальным диагностическим признаком, не характерным для других природных люминофоров [153, 203], даже

растворенные в воде полифенольные соединения лигнина и танина не обладают схожими флуоресцентными свойствами [153], для них λ_{max} не зависит от выбора $\lambda_{\text{возб}}$. Коротковолновый сдвиг флуоресценции также может быть связан с увеличением соотношения в молекулярной структуре гидрохинон-групп к хинон-группам [246].

Можно отметить, что для обоих исследуемых образцов ГК наблюдается ярко выраженный коротковолновый сдвиг, величина которого составляет 43-48,5 нм, что не противоречит литературным данным [152, 153, 246], согласно которым гипсохромный сдвиг («синий сдвиг») спектров испускания ГК природного происхождения составляет порядка 20-40 нм и более.

Наибольшее значение «синего сдвига» (48-48,5 нм) отмечено для образца ГК-2 (выделенного из торфа с болота «Таган»), что может свидетельствовать, согласно литературным данным [152, 184, 206, 253, 259], об относительно невысокой степени полимеризации некоторых флуорофорных фрагментов его структуры и относительно небольшой протяженности цепи сопряжения функциональных групп с π -системой ароматических структур, а также о наличии в структуре ГК-2 простых структурных компонентов с высокой молекулярной гетерогенностью и содержащих электронодонорные функциональные группы, такие как гидрокси- и алкокси-группы. Для образца ГК-1 (выделенного из торфа с болота «Клюквенное») отмечено меньшее (43-47 нм) смещение положения $\lambda_{\text{возб}} = 310$ нм к более коротковолновым значениям, что характеризует исследуемые образцы как идентичные.

Также по данным флуоресцентной спектроскопии был определен индекс гумификации по Т. Ohno (НІХ) [230] для исследуемых образцов ГК (Таблица 3.2.2). Оба образца ГК имеют близкие значения (ГК-1 = 0,81 и ГК-2 = 1,01), что согласно литературным данным [182, 196, 230] указывает на высокую степень сложности строения обоих образцов ГК и доказывает их поликонденсированную ароматическую природу. Более высокое значение НІХ для молекулы образца ГК-2 (выделенного из торфа с болота «Таган») может свидетельствовать, согласно [224, 258], о большем содержании в его молекуле структур типа хинона и гидрохинона,

которые являются предшественниками свободных радикалов семихинонного типа, количество которых увеличивается по мере увеличения гумификации, что отражается в увеличении индекса гумификации (НИХ). Данное предположение может указывать на более высокую антирадикальную активность образца ГК-2 в сравнении с ГК-1.

Таким образом, результаты исследования двух образцов ГК из древесно-травяных видов торфа с разных торфяных месторождений («Клюквенное» и «Таган») методом флуоресцентной спектроскопии показали высокую степень их подобия судя по одинаковой форме полос флуоресценции и совпадению положений их максимумов, а также близких значений величин гипсохромного («синего») сдвига. Так, флуоресцентные спектры обоих исследуемых ГК состоят из ультрафиолетовой и видимой полос. При этом УФ-полоса имеет одинаковые максимумы свечения при 400 нм (плечо) – флуоресценция фрагментов аминокислот, белков и полифенолов, а видимая полоса флуоресцентных спектров исследуемых ГК имеет максимумы свечения при 450, 475 и 510-520 нм – это индивидуальная область свечения ГК природного происхождения, обусловленная, в основном, конденсированными ароматическими фрагментами, включающими различные функциональные группы. Спектральное поведение исследуемых образцов ГК, связанное со смещением положения λ_{\max} от длинноволновых к более коротковолновым значениям («синий сдвиг») не характерно для каких-либо других природных соединений, кроме ГК. Отличия двух образцов ГК по данным флуоресцентной спектроскопии связаны с различной степенью гумификации их молекул, согласно которой, образец ГК-2 (выделенный из торфа с болота «Таган») отличается более высоким содержанием в его молекуле структур типа хинона, гидрохинона и семихинона, отвечающих за антирадикальную активность ГК.

Исследование гуминовых кислот методом инфракрасной спектроскопии. Положение полос поглощения в ИК-спектре зависит от молекулярной массы связанных атомов, кратности связи, а ее интенсивность – от количества одинаковых фрагментов. Поэтому колебательно-вращательные спектры, полученные при взаимодействии молекулы вещества со светом, значения волнового числа для

которого составляет $4000\text{--}400\text{ см}^{-1}$, применимы для детализации строения соединения и, в частности, гуминовых кислот [40, 76, 261, 278]. Более того, ГК различного происхождения (торфяного, угольного, сапропелевого) характеризуются схожими абрисами ИК-спектров, что может быть использовано при отнесении вещества к данному классу соединений [40, 45, 47, 56, 76, 99, 103, 134, 145, 149, 163, 181, 241, 253, 259, 278].

Инфракрасные (ИК) спектры двух исследуемых образцов ГК из древесно-травяных видов торфа с разных торфяных месторождений «Клюквенное» (Рисунок 3.2.3) и «Таган» (Рисунок 3.2.4) имеют идентичные профили полос поглощения, положения их максимумов совпадают. Это указывает на подобие их химического строения и не противоречит литературным данным [40, 45, 47, 56, 76, 103, 129, 134, 145, 149, 163, 181, 278] о типичных для ГК торфа профилях ИК спектров.

Широкая интенсивная полоса поглощения с максимумом при $3500\text{--}3300\text{ см}^{-1}$ в ИК-спектрах обоих образцов ГК представлена переменными валентными колебаниями гидроксильных групп (ν_{OH}) алифатического и ароматического ряда, связанных преимущественно водородными связями [45, 47, 56, 99, 103, 129, 134, 145, 149, 163, 183, 206, 241, 261, 278]. Это также подтверждает уменьшение волновых чисел до 3400 см^{-1} (3404 см^{-1} для ГК-1 и 3403 см^{-1} для ГК-2) за счет понижения частоты колебаний при образовании водородных связей, т.к. для свободных несвязанных О-Н групп характерна интенсивность при $3650\text{--}3585\text{ см}^{-1}$.

На длинноволновом крыле главной полосы в районе 3200 см^{-1} имеется поглощение средней интенсивности в виде уступа (перегиба), отвечающее колебаниям связи N-H (ν_{NH}) в структуре амидов и аминов, связанных водородными связями [31, 47, 253].

Полосы поглощения средней интенсивности при 2918 см^{-1} и 2849 см^{-1} в ИК-спектрах обоих образцов ГК обусловлены переменными валентными колебаниями метильных ($-\text{CH}_3$) и метиленовых ($-\text{CH}_2-$) групп боковых углеводородных цепей в молекулах ГК, не исключая алифатических фрагментов, связанных с ароматическими структурами [45, 99, 103, 129, 134, 145, 149, 163, 164, 183, 201,

206, 253, 261, 278]. При этом можно отметить, что наблюдаемые полосы поглощения вызваны в большей степени метиленовыми группировками, об этом свидетельствует очень точное совпадение волновых чисел со стандартными значениями (2926 и $2853 \pm 10 \text{ см}^{-1}$) [201].

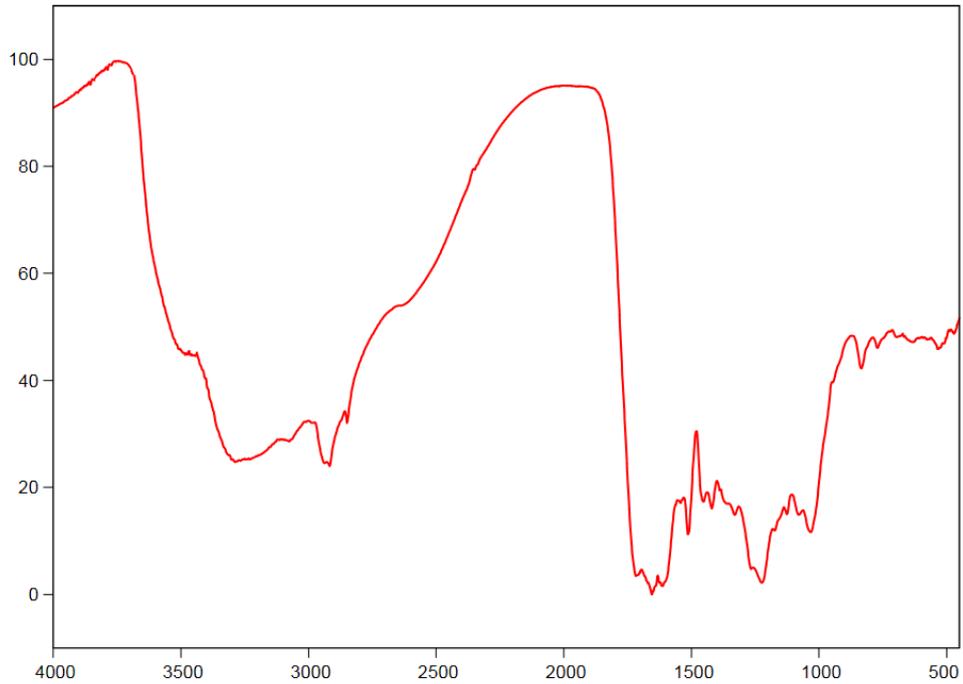


Рисунок 3.2.3 – ИК-спектр образца гуминовых кислот (ГК-1), выделенного из торфа с болота «Клюквенное»

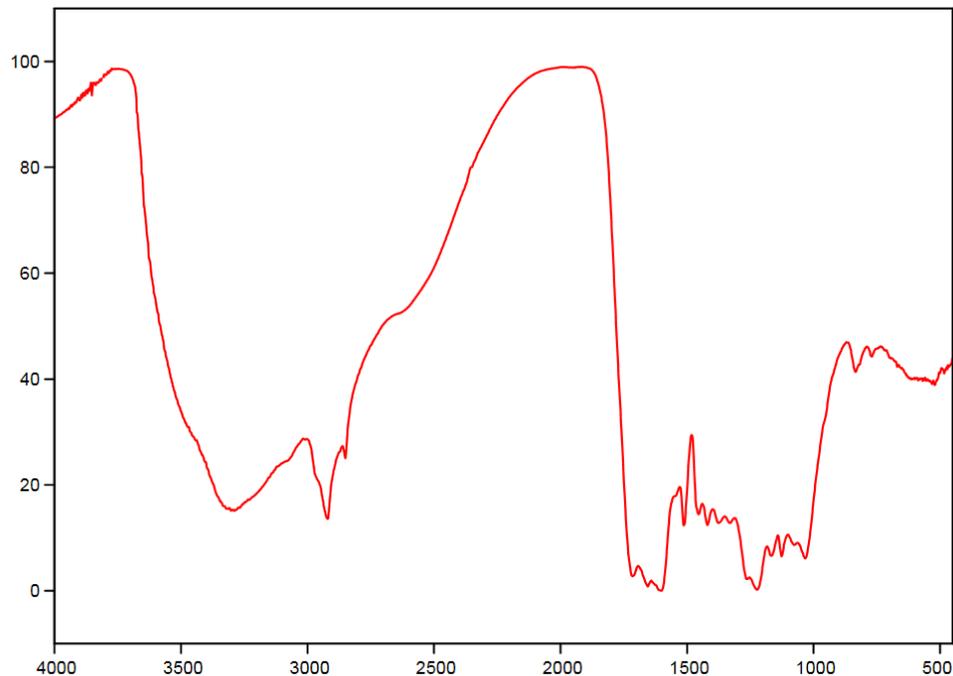


Рисунок 3.2.4 – ИК-спектр образца гуминовых кислот (ГК-2), выделенного из торфа с болота «Таган»

На преобладание метиленовых групп указывает и характер полос в области 1480-1380 см^{-1} (1418 см^{-1}) обоих образцов ГК [106, 129, 134, 145, 163, 201, 253]. При этом обнаруживаемые метиленовые группы не могут быть в составе длинных парафиновых цепей, поскольку такие цепи с $-(\text{CH}_2)_{n \geq 4}$ – должны давать сильную полосу поглощения при 720-770 см^{-1} за счет маятниковых деформационных колебаний $-\text{CH}_2-$ групп [99, 134, 241]. Достаточно низкая интенсивность полос поглощения в данной области (720-770 см^{-1}) у исследуемых образцов ГК и наличие максимума в области 910 см^{-1} (полизамещенные алифатические цепи, пиранозные циклы) [99, 109, 241, 253], а также внеплоскостные колебания связи $=\text{C}-\text{H}$ в алкенах (при 990 см^{-1}) [182], согласуются с литературными данными [47, 56, 99, 109, 126, 129, 183, 206, 241, 253, 278] о невысокой роли алканов в формировании структуры ГК при том, что алифатические фрагменты структуры ГК представлены в основном аминокислотными и углеводными остатками. Поглощение в области 1385 см^{-1} обусловлено деформационными колебаниями групп $-\text{CH}_3$, связанных с ароматическими фрагментами [163, 278].

В ИК-спектрах обоих образцов ГК отмечено поглощение слабой интенсивности при 2600-2615 см^{-1} широкой полосы димеров карбоновых кислот [31, 103, 134, 145, 163, 164], очень характерной для валентных колебаний гидроксильных групп (ν_{OH}), которые принимают участие в образовании сильных водородных связей в димерных формах за счет водородных связей между $-\text{COOH}$ или $-\text{COO}^-$ группами с водой [104]. Максимум поглощения валентных колебаний карбонильных групп ($\nu_{\text{C=O}}$) в области 1716 см^{-1} обнаруживается в ИК-спектрах обоих образцов ГК. Эта полоса может быть представлена кетонами, альдегидами, карбоновыми кислотами и их функциональными производными [31, 56, 129, 134, 163, 206, 241, 253, 278]. Скорее всего, данный максимум поглощения обусловлен в большей степени колебаниями оксо-группы в недиссоциированных $-\text{COOH}$ группах, на это также указывает усиление интенсивности валентных симметричных колебаний $-\text{COO}^-$ ионов в области 1418 см^{-1} [47, 99, 103, 181, 183, 201, 261].

Сильная полоса в области 1615 см^{-1} в ИК-спектрах обоих образцов ГК обусловлена плоскостными валентными колебаниями сопряженных углерод-углеродных (ароматические, $\nu_{\text{C}=\text{C}}$) и углерод-кислородных связей (карбонилы, связанные водородными связями, карбоксилат-ионы, $\nu_{\text{C}=\text{O}}$), в ароматическом скелете и хинонах [56, 99, 103, 129, 134, 145, 163, 183, 201, 241, 253, 261, 278]. В литературе позиционируется [31, 45, 76, 99, 149, 241], что именно колебания ароматических ($\nu_{\text{C}=\text{C}}$) связей ответственны за данную полосу, максимум которой приходится обычно на 1610 см^{-1} , исходя из чего можно отметить очень высокое совпадение волновых чисел экспериментальных данных (ГК-1 и ГК-2) со стандартными значениями. Данное предположение подтверждается также тем, что полоса поглощения колебаний оксо-группы в хинонах, связанных водородной связью и/или в карбоксильных группах, связанных с ароматическим кольцом, находится в области 1660 см^{-1} [31, 45, 106, 149, 163, 201]. Полоса поглощения в области $1500\text{-}1513\text{ см}^{-1}$ ($\nu_{\text{C}-\text{C}}$) указывает на наличие неконденсированных моноароматических структур [56, 134, 145, 163, 261]. В данной области могут также наблюдаться колебания связей полипептидов в составе ГК [47, 106, 163, 183, 201, 253, 278], связанных с атомами азота и кислорода (N-H, N-C=O). Полосы поглощения средней интенсивности при $1480\text{-}1380\text{ см}^{-1}$ связаны с плоскостными деформационными колебаниями связи C-N метиленовых и метильных групп.

В ИК-спектрах обоих образцов ГК имеются колебания в области $1260\text{-}1225\text{ см}^{-1}$, присущие валентным ($\nu_{\text{C}-\text{O}}$) и деформационным колебаниям ($\delta_{\text{O}-\text{H}}$) связей недиссоциированных карбоновых кислот и их функциональных производных (в основном сложных эфиров) [31, 56, 103, 129, 134, 145, 184, 201, 206, 241, 253, 261, 278]. Поглощение излучения в области $1175\text{-}1000\text{ см}^{-1}$ характерно для валентных колебаний гидроксильных групп ($\nu_{\text{C}-\text{O}}$) спиртов и углеводов [47, 56, 99, 103, 129, 134, 145, 163, 183, 206, 241, 253, 261, 278]. В интервале значений $1075\text{-}1000\text{ см}^{-1}$ ($\nu_{\text{C}-\text{O}}$) поглощают излучение первичные спирты, при $1125\text{-}1100\text{ см}^{-1}$ ($\nu_{\text{C}-\text{O}}$) – вторичные спирты и при $1175\text{-}1150\text{ см}^{-1}$ ($\nu_{\text{C}-\text{O}}$) – третичные спирты. Поглощения в области $1175\text{-}1000\text{ см}^{-1}$ обусловлены также валентными колебаниями ($\nu_{\text{C}-\text{O}-\text{C}}$) гликозидных связей углеводов, лактонов, циклических и алифатических простых эфиров [47, 56,

78, 99, 126, 129, 134, 145, 163, 201, 206, 241, 253, 278], присутствие С-О связей полисахаридных фрагментов в ИК-спектрах исследуемых образцов ГК подтверждается также колебаниями в области 830 см^{-1} .

В области волновых чисел $800\text{-}600 \text{ см}^{-1}$ ИК-спектров обоих образцов ГК наблюдаются слабые полосы поглощения, связанные, скорее всего, с внеплоскостными деформационными колебаниями связи С-Н ($\delta_{\text{C-H}}$) в ароматических кольцах, имеющих два и более незамещенных атомов водорода [99, 145, 163], в том числе, обусловленные присутствием конденсированных многоядерных ароматических углеводородов ($755\text{-}760 \text{ см}^{-1}$) [141, 163].

При исследовании характера поглощения тепловой энергии в ИК-области гуминовыми кислотами в литературе [45, 97, 129, 149, 278] в качестве диагностических параметров используют спектральные коэффициенты, характеризующие интенсивность полос поглощения. В частности, для количественной оценки интенсивности полос поглощения и содержания функциональных групп в молекулах ГК, используют метод отношений оптических плотностей полос поглощения (ОПП) [278], который позволяет получить информацию об относительных пропорциях ароматических и алифатических фрагментов молекулы, структурной организации кислородсодержащих функциональных групп, наличии углеводных компонентов.

Относительная количественная оценка содержания функциональных групп для двух исследуемых образцов ГК из древесно-травяных видов торфа с разных торфяных месторождений («Клюквенное» и «Таган») представлена на основании отношений ОПП кислородсодержащих функциональных групп – гидроксильных ($\nu_{\text{OH}} 3400 \text{ см}^{-1}$), карбонильных ($\nu_{\text{C=O}} 1720 \text{ см}^{-1}$), сложноэфирных ($\nu_{\text{C-O, C-O-C}} 1225 \text{ см}^{-1}$) и простых эфирных ($\nu_{\text{C-O}} 1035 \text{ см}^{-1}$) групп к ОПП ароматических ($\nu_{\text{C=C}} 1610 \text{ см}^{-1}$) и алифатических ($\nu_{\text{Aliphatic}} 2920 \text{ см}^{-1}$) фрагментов структуры ГК (Таблица 3.2.3).

Сравнивая между собой отношения ОПП-величин в молекулах исследуемых образцов ГК-1 и ГК-2, можно отметить их высокую идентичность в распределении ИК-спектральных коэффициентов. Отличия незначительны и связаны в основном с тем, что для образца ГК-2 (выделенного из торфа с болота «Таган») характерно

немного более высокое содержание ароматических фрагментов ($A_{C=C 1610}/A_{Aliphatic 2920}$) и фенольных групп ($A_{OH 3400}/A_{C=C 1610}$), а также более низкое содержание карбонильных ($A_{C=O 1720}/A_{Aliphatic 2920}$), сложноэфирных ($A_{C-O 1225}/A_{Aliphatic 2920}$) и простых эфирных ($A_{C-O 1035}/A_{C=C 1610}$ и $A_{C-O 1035}/A_{Aliphatic 2920}$) групп, углеводных фрагментов ($A_{C-O 1035}/A_{C=O 1720}$).

Таблица 3.2.3 – Отношения оптических плотностей полос поглощения при определенных волновых числах по данным ИК-спектроскопии гуминовых кислот

Спектральные коэффициенты	Место отбора торфа, шифр образца	
	Болото «Клюквенное», ГК-1	Болото «Таган», ГК-2
$A_{OH 3400}/A_{C=C 1610}$	0,70	0,75
$A_{C=O 1720}/A_{C=C 1610}$	0,96	0,98
$A_{C-O 1225}/A_{C=C 1610}$	0,98	1,00
$A_{C-O 1035}/A_{C=C 1610}$	0,96	0,90
$A_{C=C 1610}/A_{Aliphatic 2920}$	1,40	1,60
$A_{OH 3400}/A_{Aliphatic 2920}$	0,98	0,97
$A_{C=O 1720}/A_{Aliphatic 2920}$	1,30	1,21
$A_{C-O 1225}/A_{Aliphatic 2920}$	1,35	1,25
$A_{C-O 1035}/A_{Aliphatic 2920}$	1,20	1,07
$A_{C-O 1035}/A_{C=O 1720}$	0,90	0,85

Примечание – отношения оптических плотностей полос поглощения рассчитаны исходя из средних значений ($n = 3$)

Таким образом, результаты исследования двух образцов ГК из древесно-травяных видов торфа с разных торфяных месторождений («Клюквенное» и «Таган») методом ИК-спектроскопии свидетельствуют о наличии общего принципа строения этих веществ, т.к. они имеют одинаковые профили полос поглощения и положения их максимумов совпадают. Максимальная интенсивность полос поглощения в их ИК-спектрах отмечена для гидроксильных (спирты, фенолы, углеводы), карбонильных (хиноны и гидроксихиноны), карбоксильных групп и их функциональных производных (сложных эфиров, лактонов, амидов), простых эфирных и гликозидных групп, алифатических и ароматических фрагментов. Образец ГК-2 (выделенный из торфа с болота «Таган»), по сравнению с образцом

ГК-1 (выделенным из торфа с болота «Клюквенное»), имеет более высокие значения отношений ОППП-величин, показывающих содержание ароматических фрагментов и фенольных групп, а также меньшие значения отношений ОППП-величин, характеризующих содержание простых эфиров и углеводов.

Исследование содержания кислотных функциональных групп в молекулах гуминовых кислот методами титриметрии. Количественное содержание кислотных функциональных групп для ГК является важной диагностической характеристикой, оно влияет на физико-химические свойства [40, 62, 149], реакционную способность [40] и биологическую активность [40, 62, 129].

Результаты количественного определения кислотных функциональных групп в двух исследуемых образцах ГК из древесно-травяных видов торфа с разных торфяных месторождений («Клюквенное» и «Таган») представлены в Таблице 3.2.4. Отмечено, что исследуемые образцы ГК незначительно отличаются друг от друга по содержанию кислотных функциональных групп. Так, для образца ГК-1 (выделенного из торфа с болота «Клюквенное») характерно чуть более высокое содержание карбоксильных групп, а для образца ГК-2 (выделенного из торфа с болота «Таган»), наоборот, чуть более высокое содержание фенольных групп.

Таблица 3.2.4 – Содержание кислотных функциональных групп в молекулах гуминовых кислот

Место отбора торфа	Шифр образца	Кислотные функциональные группы, ммоль/г		
		Карбоксильные (COOH)	Фенольные (Ar-OH)	Сумма
Болото «Клюквенное»	ГК-1	2,85±0,01	3,15±0,02	6,00±0,03
Болото «Таган»	ГК-2	2,61±0,01	3,20±0,02	5,81±0,03

Таким образом, результаты титриметрического анализа двух исследуемых образцов ГК позволили сделать вывод об отсутствии между ними существенных различий в содержании кислотных функциональных групп.

Исследование элементного (C, H, N, O, S) состава гуминовых кислот. Благодаря данным по элементному составу ГК можно оценить распределение основных конституционных элементов их молекулярной структуры и наряду с этим

дать характеристику образцов ГК, обусловленную особенностями их элементного состава как дифференциального дескриптора строения. Результаты элементного (C, H, N, O, S) состава, выраженные как массовые ($\%_{\text{mass}}$) и атомные доли элементов в процентах ($\%_{\text{atom}}$), представлены в Таблице 3.2.5 и показывают высокую степень подобия полученных результатов. Значения показателей атомных отношений элементов и средней степени окисления атома углерода (по Жданову Ю.А.) представлены в Таблице 3.2.6.

Таблица 3.2.5 – Элементный (C, H, N, O, S) состав гуминовых кислот

Место отбора торфа	Шифр образца	Массовые доли элементов, % ($\%_{\text{mass}}$)				
		Атомные доли элементов, % ($\%_{\text{atom}}$)				
		C	H	N	O	S
Болото «Клюквенное»	ГК-1	<u>55,43±0,50</u>	<u>5,80±0,04</u>	<u>3,75±0,02</u>	<u>33,79±0,41</u>	0
		36,19±0,44	45,13±0,34	2,12±0,02	16,56±0,18	
Болото «Таган»	ГК-2	<u>55,35±0,50</u>	<u>5,86±0,05</u>	<u>4,20±0,03</u>	<u>34,30±0,44</u>	0
		35,88±0,42	45,21±0,33	2,33±0,02	16,65±0,24	

Примечание – массовые и атомные доли элементов рассчитаны на беззольную навеску

Так, содержание углерода в двух исследуемых образцах ГК из древесно-травяных видов торфа с разных торфяных месторождений («Клюквенное» и «Таган») составило в среднем 55,39 $\%_{\text{mass}}$ (36,04 $\%_{\text{atom}}$) и находится в диапазоне значений 46 - 62 $\%_{\text{mass}}$ (согласно критериям Д.С. Орлова) [105], что типично для ГК торфа [186]. Показатели содержания водорода также имеют весьма близкие значения для двух образцов ГК (Таблица 3.2.5).

При исследовании ГК содержание углерода и водорода обычно характеризуют показателем их атомного отношения Н/С, т.к. абсолютные значения содержания элементов ($\%_{\text{mass}}$ и $\%_{\text{atom}}$) не позволяют в полной мере получить представление о роли отдельных конституционных элементов молекулярного строения ГК [105]. Известно [272], что показатель атомного отношения Н/С четко характеризует класс углеводов. Так, согласно классификации Ван-Кревелена [272], значение Н/С порядка 0,3 свидетельствует о том, что молекула имеет ароматическую поликонденсированную природу. Показатель Н/С, равный 0,7 характерен для моноциклических ароматических углеводов, а Н/С = 0,7 – 1,5 –

для ароматических углеводородов, связанных с алифатическими цепями, содержащими до 10 атомов углерода. Если значения Н/С составляют 1,5-1,7 – это алициклические углеводороды, а $H/C = 2$ – парафины.

Анализируя данные атомного отношения Н/С двух образцов ГК (Таблица 3.2.6), можно заключить о высоком содержании в их молекулах ароматических фрагментов. Это весьма характерно для ГК низинных видов торфа, поскольку они содержат много лигнина, обогащенного ароматическими фрагментами структуры [249], что не противоречит литературным данным [97, 99, 106, 129, 134, 262].

Таблица 3.2.6 – Атомные отношения элементов и средняя степень окисления атома углерода по Ю.А. Жданову в молекулах гуминовых кислот

Место отбора торфа	Шифр образца	Атомные отношения				ω
		H/C	H/C <i>испр</i>	O/C	C/N	
Болото «Клюквенное»	ГК-1	1,25	1,48	0,46	17,07	-0,16
Болото «Таган»	ГК-2	1,26	1,49	0,46	15,40	-0,14
Примечание – атомные отношения элементов и средняя степень окисления углерода (ω) рассчитаны исходя из средних значений ($n = 3$)						

Показатель атомного отношения Н/С исправленное ($H/C_{испр}$) является более информативным показателем строения молекул ГК, т.к. учитывает значительное замещение атомов водорода в их молекуле на атомы кислорода, а также позволяет оценить долю углерода алифатических и ароматических фрагментов [25, 97, 105]. Результаты пересчета значений отношения Н/С на $H/C_{испр}$ показали (Таблица 3.2.6) высокую степень идентичности обоих образцов. Это также свидетельствует о высоком содержании ароматических фрагментов в молекулах данных ГК, и, согласно представленной выше классификации Ван-Кревелена [272], исследуемые образцы ГК представляют собой ароматические углеводороды, связанные с алифатическими радикалами, содержащими в цепи до 10 атомов углерода.

Значения содержания кислорода также имеют весьма близкие значения для двух образцов ГК (Таблица 3.2.5). По данным литературы [97, 99, 105, 106, 140, 206, 278], содержание кислорода в молекулах ГК обычно связывают с содержанием

кислородсодержащих функциональных групп [206, 278]. Показатель атомного отношения O/C также более полно характеризует распределение кислорода в структуре ГК. Данный показатель для обоих образцов исследуемых ГК оказался одинаковым (0,46). Условно данный параметр показывает высокое содержание кислорода в образцах ГК (на 1 атом кислорода приходится 2 атома углерода).

Средняя степень окисления атома углерода (ω) молекул исследуемых образцов ГК (по Ю.А. Жданову) представлена в Таблице 3.2.6 и характеризует их как соединения с восстановительными (антиоксидантными) свойствами, при этом образец ГК-2 имеет более высокую среднюю степень окисления углерода (- 0,14), чем образец ГК-1 (- 0,16). Показатель (ω) не зависит от размера молекул и сложности строения ГК, он дает общую характеристику электронного окружения атома углерода молекул ГК, и представляет собой определенный дифференциальный дескриптор строения. Согласно Д.С. Орлову [105], для ГК торфа, характерна отрицательная средняя степень окисления углерода, которая колеблется в диапазоне значений от - 0,6 до - 0,3 [105, 106]. Если значения показателя средней степени окисления атома углерода (ω) составляют менее - 0,61, то в молекулах ГК атомы водорода преобладают над атомами кислорода.

Содержание азота (Таблица 3.2.5) в исследуемых образцах ГК достаточно высокое (более 3 %) [3], порядка 3,98 %_{mass} (2,23 %_{atom}) и соответствует диапазону значений 3-6 %_{mass} (согласно критериям Д.С. Орлова) [105]. Значение атомного отношения C/N также является более информативным показателем и обычно характеризует содержание азота белковых и пептидных фрагментов [181], степень гумифицированности ГК и содержание алифатических фрагментов [99].

Для двух исследуемых образцов ГК показатели атомного отношения C/N (Таблица 3.2.6) составили 17,07 (ГК-1) и 15,40 (ГК-2), что говорит о высоком содержании в них азота, поскольку согласно данным литературы [106], величина показателя C/N в интервале значений 11 - 14 показывает очень высокое содержание азота в молекулах ГК. В ряду исследуемых ГК более высокое (на 9 %) содержание азота характерно для образца ГК-2 (выделенного из торфа с болота «Таган»).

В исследуемых образцах ГК не выявлено содержание серы, что не противоречит литературным данным [3] о пониженной сернистости западносибирских торфов.

Таким образом, по результатам исследования элементного (C, H, N, O, S) состава двух древесно-травяных видов торфа с разных торфяных месторождений («Клюквенное» и «Таган») можно заключить, что они являются очень близкими по содержанию основных конституционных структурных элементов. Отличия заключаются в том, что образец ГК-2, выделенный из торфа с месторождения «Таган», имеет более высокие значения показателей, характеризующие его восстанавливающие свойства и содержание азота.

Исследование гуминовых кислот методом ^{13}C ЯМР спектроскопии. Метод спектроскопии ядерного магнитного резонанса на ядрах ^{13}C (^{13}C -ЯМР) дает важную информацию о структурной организации многих молекулярных фрагментов ГК [29, 88, 97, 112, 138, 140, 183, 188, 206, 229, 244, 260]. В частности, регистрация ^{13}C -ЯМР спектров водно-щелочных растворов ГК в режиме устранения ядерного эффекта Оверхаузера и при достаточных временах релаксационной задержки дает возможность получать количественную информацию о распределении углерода по структурным группам в молекулах ГК [29, 112, 140, 188, 244]. Ограничением метода ^{13}C -ЯМР является то, что он дает информацию только об атоме углерода и его окружении, что не позволяет напрямую судить о взаимном расположении структурных фрагментов и молекулярной массе ГК [140].

В структуре ГК выделяют несколько типов атомов углерода, характеристика химических сдвигов которых, а также соответствующие им названия спектральных пиков (Таблица 3.2.8) приведена на основании обобщенных данных различных авторов [29, 112, 140, 183, 188, 201, 229, 244, 257]. ^{13}C -ЯМР спектры двух исследуемых образцов ГК из древесно-травяных видов торфа с разных торфяных месторождений («Клюквенное» и «Таган»), представленные на Рисунке 3.2.6, имеют сложный однотипный вид. Количественная оценка распределения спектральной интенсивности в спектрах ^{13}C -ЯМР представлена в Таблице 3.2.9.

Таблица 3.2.8 – Распределение атомов углерода по различным фрагментам структуры молекул гуминовых кислот

Диапазон химического сдвига, м.д.	Названия спектральных областей	Максимальные пики, м.д.	
		ГК-1	ГК-2
5-48 5-25 15-48 25-48 29-33 35-50 41-42	углерод алифатических CH_n -групп алкильных фрагментов, не связанный с гетероатомами (C-C): -концевые CH_3 -группы алкильных цепей; - группы $-\text{CH}_2$ - алкильных цепей; - группы $>\text{CH}$ - алкильных цепей; - углерод $-\text{CH}_2$ - групп; - углерод $-\text{CH}_2$ - групп разветвленных алкильных цепей; - группы $-\text{CH}_2$ - в α -положении к COOH -группе	8; 13; 21; 24; 27; 37; 40; 45; 48	10; 13; 17; 21; 27; 32; 35; 41; 47
48-90 48-58 51-56 58-64 57-65 60-62 64-90	углерод, связанный простой связью с гетероатомами - алифатических алкокси (R-O-) C-O-групп (в основном, углеводных фрагментов) и аминогрупп N-alkyl (в основном аминокислот): - углерод метокси-групп: $\text{CH}_3\text{-OR}$; - углерод метокси- и этокси- групп: $\text{CH}_3\text{-OR}$; $\text{C}_2\text{H}_5\text{-OR}$; - первичные атомы углерода: $-\text{CH}_2\text{-OR}$; $-\text{CH}_2\text{-N-(H}_2/\text{R}_2)$; - углерод $-\text{CH}_2\text{-OH}$ групп; - углерод аминокислот; - вторичные атомы углерода: $>\text{CH-OR}$; $>\text{CH-N-(H}_2/\text{R}_2)$	51; 53; 55; 58; 60; 68; 80; 85	51; 57; 61; 69; 71; 84
90-108	углерод алифатических (O-C-O)-групп, связанный простыми связями с двумя гетероатомами (кислородом или азотом), представленный в основном ацетальным углеродом полисахаридов: O-C-O; O-C-N	96; 100; 103; 105	96; 100
108-145 108-120 120-140	углерод незамещенных и замещенных атомами углерода ароматических фрагментов: C_{Ar} (C=C, C=C-C): - незамещенный углерод ароматических колец; - алкил-замещенный углерод ароматических колец	111; 120; 125; 130; 139	110; 114; 121; 124; 126; 129; 137; 143
145-165	углерод замещенных атомами кислорода и азота ароматических фрагментов: $\text{C}_{\text{Ar}}\text{-O/N}$ (C=C-O/N)	148; 153; 156	148; 153; 159
165-187	углерод карбоксильных, сложноэфирных и амидных групп: $\text{O=C-(OH/O/NH}_2)$	169; 177	169; 178; 180; 183
187-220	углерод альдегидных, кетонных и хинонных групп: $\text{O=C-(H}_2/\text{R}_2)$	191; 195; 199; 204; 205; 207; 211; 214; 219	193; 196; 199; 201; 207; 208; 210; 214; 219
Примечания ГК-1 – образец гуминовых кислот, выделенный из торфа с болота «Клюквенное» ГК-2 – образец гуминовых кислот, выделенный из торфа с болота «Таган»			

Анализ ^{13}C -ЯМР спектров позволил выявить некоторые особенности и различия в строении двух образцов ГК. Так, на спектрах образца ГК-1

(выделенного из торфа с болота «Клюквенное»), не выявлено значительного возрастания площади пиков ароматической области (108-165 м.д.) в сравнении с образцом ГК-2 (выделенным из торфа с болота «Таган») и, наоборот, просматривается значительное (порядка 25 %) уменьшение содержания незамещенного алифатического углерода (5-48 м.д.) у образца ГК-1 в сравнении с образцом ГК-2. В спектрах обоих образцов ГК присутствуют характерные сигналы незамещенных (108-120 м.д.) и замещенных (120-140 м.д.) ароматических атомов углерода и полиметиленовых цепей (31-32 м.д.) [88, 183, 229] в основном липидной и пептидной природы [257].

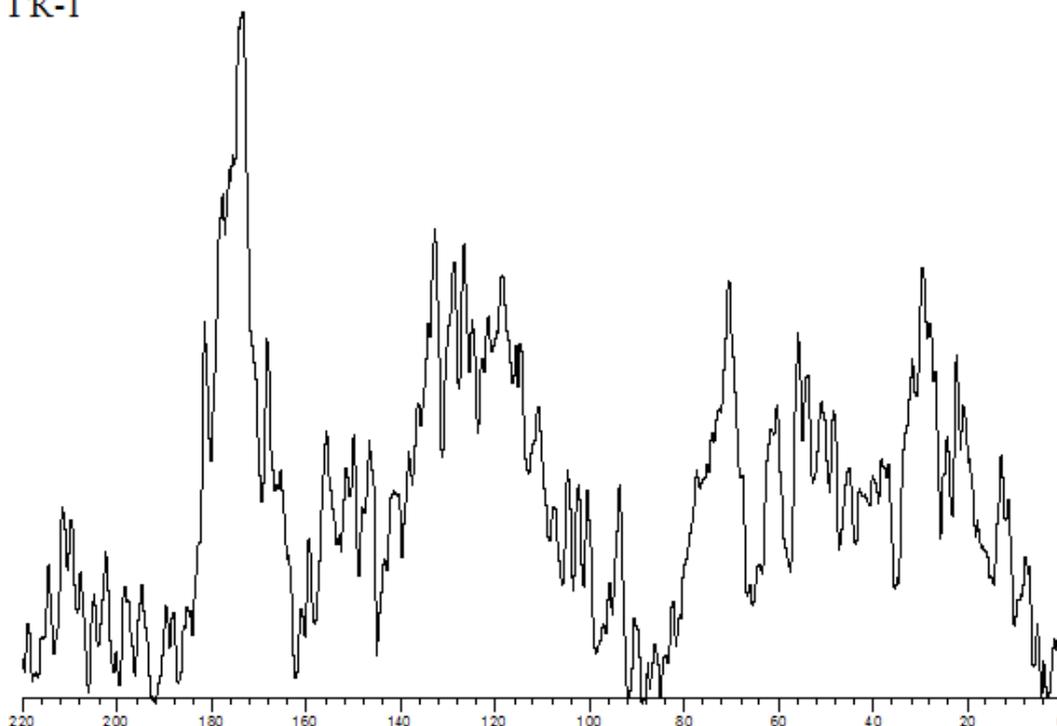
Характерные сигналы аминокислот (60-61 м.д.) также присутствуют в спектрах обоих образцов ГК [201]. Сигналы в области углерода углеводных фрагментов (48-90 м.д.) также более выражены для образца ГК-1, разница с образцом ГК-2 составляет порядка 16-19 %. Отмечено, что образец ГК-1 имеет более высокую интенсивность сигнала в области 55-58 м.д., характеризующую наличие метокси-групп замещенных фенолов типа гваяцильных и сиренгильных фрагментов лигнина [183, 201, 229].

Аналогичная ситуация с большей интенсивностью сигналов прослеживается в области 70-74 м.д. и 105-106 м.д., характерных для углерода целлюлозных и гемицеллюлозных фрагментов лигнина [201, 229]. Выявленные особенности в строении двух образцов ГК позволяют предположить наличие большей доли алифатических периферийных фрагментов в молекуле образца ГК-1 при практически одинаковом количестве ароматических структур в молекулах обоих образцов ГК. Вероятно, это связано с большим содержанием углеводных компонентов (полисахаридных) в структуре молекул ГК-1 (более чем на 30 % ($\sum C_{Carb}$)) в сравнении с образцом ГК-2 [140].

На всех спектрах в области 165-187 м.д. четко выделяются резонансы углерода карбоксильных, сложноэфирных и амидных групп, который в ГК, в основном, представлен карбоксильными группами [140, 229, 257], но ярко выраженных отличий между двумя образцами ГК не просматривается. И, наоборот,

в отношении содержания углерода кетонных и хиноидных групп (187-220) отмечено более чем в 2 раза его высокое содержание для образца ГК-2.

ГК-1



ГК-2

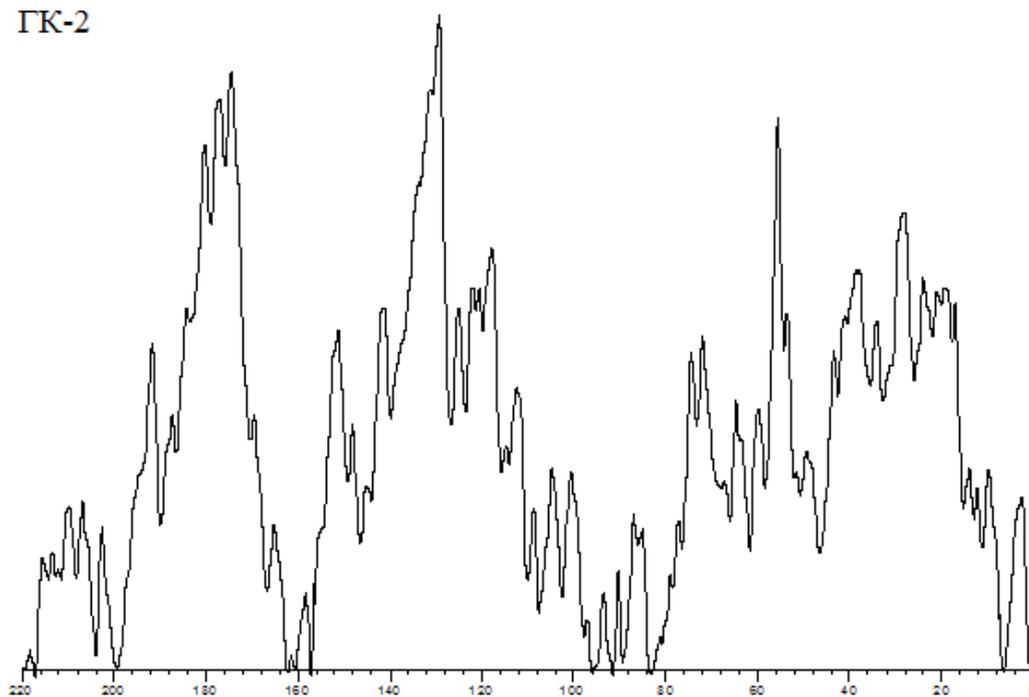


Рисунок 3.2.6 – ^{13}C -ЯМР-спектры гуминовых кислот, выделенных из двух древесно-травяных видов торфа с разных торфяных месторождений (ГК-1 – «Клюквенное» и ГК-2 – «Таган»), интенсивность сигнала нормирована на максимальный сигнал каждого спектра

Замещенный ароматический углерод (145-165 м.д.) представляет углерод фенольных фрагментов и простых ароматических эфиров [140, 183, 229, 257]. Образцы ГК существенно (порядка 30 %) отличаются друг от друга по данному показателю. Учитывая практически одинаковое количество углерода ароматических фрагментов (108-145 м.д.) в обоих образцах ГК при одновременном более высоком содержании в образце ГК-1 алкоксидных групп (48-90 м.д.), можно предположить, что в образце ГК-1 замещенный ароматический углерод представлен, скорее всего, алкил-ариловыми группировками лигниновой природы [88, 229, 257]. А в образце ГК-2 – фенольными фрагментами, судя по более высокому содержанию в их структуре углерода кетонных и хиноидных групп.

Таблица 3.2.9 – Распределение углерода по фрагментам структуры молекул гуминовых кислот (% от $C_{\text{общ}}$) по данным спектроскопии ^{13}C ЯМР

Спектральные области, м.д.	Тип, вид торфа, шифр образца	
	низинный, древесно-травяной («Клюквенное»), ГК-1	низинный, древесно-травяной («Таган»), ГК-2
5-48 (CH _n , C-C)	19,9	24,9
48-90 (R-O, C-O, N-alkyl)	20,5	17,2
90-108 (O-C-O; O-C-N)	6,6	3,3
108-145 (C _{Ar} (C=C, C=C-C))	25,3	25,0
145-165 (C _{Ar} -O/N (C=C-O/N))	7,4	5,4
165-187 (O=C-(OH/O/NH ₂))	16,0	15,6
187-220 (O=C-(H ₂ /R ₂))	4,2	8,6
Дескрипторы строения		
$^1\Sigma C_{\text{Carb}}$	27,1	20,5
$^2\Sigma C_{\text{Ar}}/\Sigma C_{\text{Al}}$	0,67	0,67
Примечания		
1 Сумма карбогидратов (48-108 м.д.)		
2 Степень ароматичности		
3 Интегральные значения распределение протонов по областям химического сдвига рассчитаны исходя из средних значений (n = 5)		

Степень ароматичности обоих образцов ГК ($\Sigma C_{\text{Ar}}/\Sigma C_{\text{Al}}$) одинаковая и представляет собой отношение суммы ароматического углерода к сумме углерода алкильных фрагментов. Это показывает гидрофобно-гидрофильный баланс в структуре молекул данных образцов ГК. Данный показатель не превышает единицы (доля ароматических фрагментов в структуре составляет порядка 33 %) и

указывает на достаточно высокое содержание в данных молекулах ГК гидрофильных структур и невысокую их гидрофобность [140, 183].

Таким образом, результаты исследования ГК из двух древесно-травяных видов торфа с разных торфяных месторождений («Клюквенное» и «Таган») методом ^{13}C ЯМР спектроскопии позволили заключить о наличии в структуре ГК незамещенных и замещенных алифатических и ароматических фрагментов, карбоксильных групп, простых эфирных и сложно эфирных групп, карбонильных и хиноидных групп, спиртовых и фенольных групп, амидных и аминокрупп. Степень ароматичности обоих образцов ГК одинаковая, доля ароматических фрагментов в структуре составляет порядка 33 % и свидетельствует о высоком содержании гидрофильных структур и невысокой гидрофобности данных молекул ГК. По содержанию карбоксильных групп оба образца ГК не отличаются, что ранее уже отмечалось по результатам титриметрического анализа (Таблица 3.2.4).

Установлены также особенности и различия спектрального поведения двух данных образцов ГК. В частности, образец ГК-2 (выделенный из торфа с болота «Таган») отличается от ГК-1 (выделенного из торфа с болота «Клюквенное») большим содержанием (более чем в 2 раза) углерода кетонных и хиноидных групп. Отмечено, что в образце ГК-1 замещенный ароматический углерод представлен, вероятнее всего, алкил-ариловыми группировками, в частности CH_3O -группами лигниновой природы, а в образце ГК-2 – фенольными фрагментами. В молекуле образца ГК-1 установлено наличие большей доли алифатических периферийных фрагментов при практически одинаковом количестве ароматических структур в молекулах обоих образцов ГК. Это связано с большим содержанием углеводных (полисахаридных) компонентов (больше на 30 %) в структуре молекул ГК-1 в сравнении с образцом ГК-2.

Таким образом, методом спектроскопии ^{13}C ЯМР установлено, что образец ГК-1 в большей степени отражает лигнинопроизводный характер его молекулы, судя по более высокой интенсивности сигналов в области 48-90 м.д. и 145-165 м.д. Образец ГК-2 содержит более высокое количество фенольных и хиноидных групп, судя по более высокой интенсивности сигналов в области 187-220 м.д. и более

низкой интенсивности сигналов в области 56 м.д., 48-90 м.д. и 90-108 м.д., что дает возможность определить образец ГК-2 (выделенный из торфа с болота «Таган») как наиболее перспективный для получения БАВ гуминовой природы с целью разработки на его основе растительных лекарственных средств.

Исследование гуминовых кислот методом высокоэффективной эксклюзионной хроматографии. Для молекул ГК характерны три области молекулярных масс (M_m) [56, 97]: с высокой M_m (≥ 50 кДа), средней M_m (4-50 кДа) и низкой M_m (< 4 кДа).

Хроматограммы двух исследуемых образцов ГК из древесно-травяных видов торфа с разных торфяных месторождений («Клюквенное» и «Таган») идентичны и представлены на Рисунке 3.2.5. Хроматограммы имеют мономодальное распределение, которое показывает значительную компенсацию неэксклюзионных эффектов [138, 219]. Рассчитаны основные показатели молекулярно-массового распределения (ММР) для двух исследуемых образцов ГК: пиковое значение молекулярных масс (M_p) - медиана, средневесовая (M_w) и среднечисленная (M_n) молекулярные массы, а также полидисперсность (p) как отношение M_w/M_n .

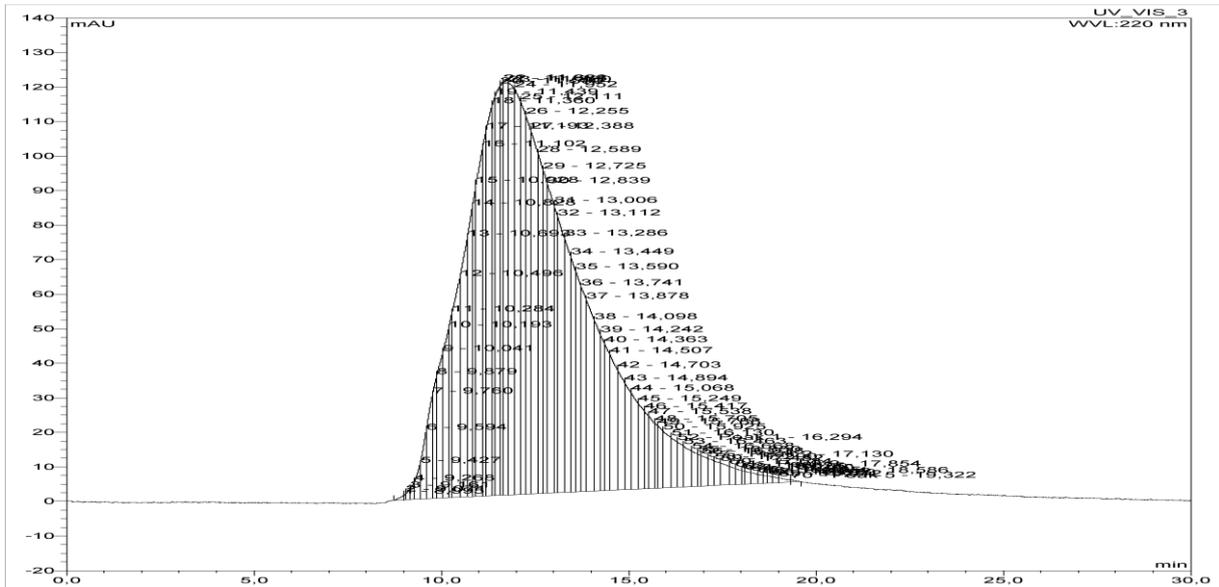
Можно отметить, что значения ММР (Таблица 3.2.7) двух исследуемых ГК сосредоточены в группе с высокой молекулярной массой и неоднородны.

Значения средневесовой молекулярной массы (M_w) находятся в пределах 121,4-261,5 кДа. Это характерно для ГК природного происхождения [219, 254], при этом отмечается, что для образца ГК-2 (выделенного из торфа с болота «Таган») характерно более чем в 2 раза низкое значение средневесовой молекулярной массы.

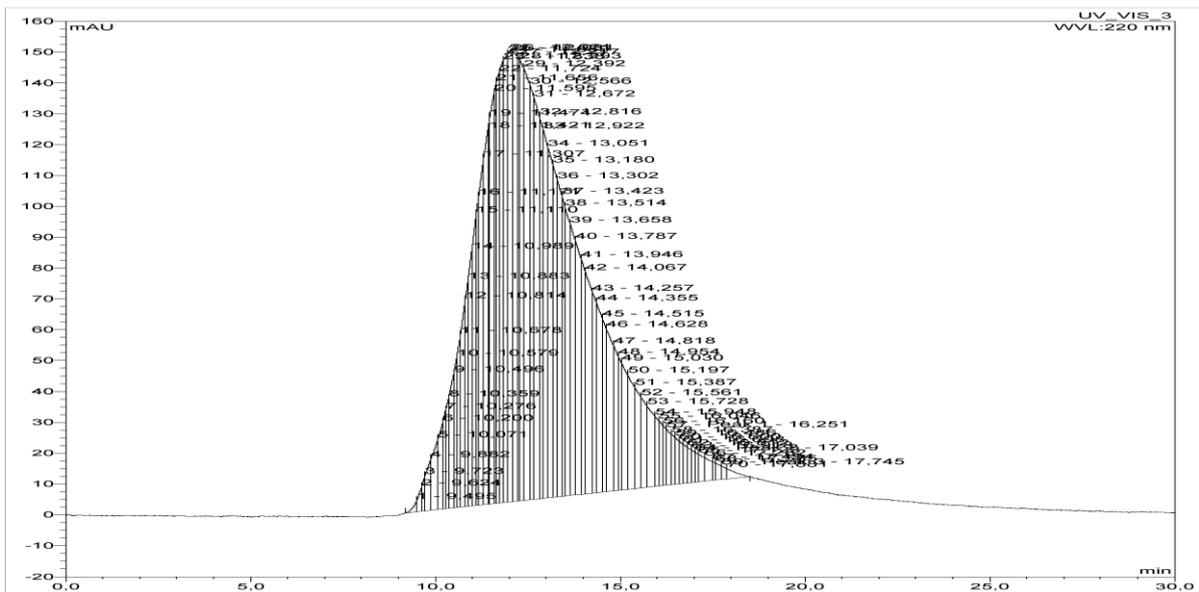
Для образца ГК-2 (выделенного из торфа с болота «Таган») также характерны меньшие значения остальных показателей ММР (M_p и M_n , p).

Показатель полидисперсности (p) показывает соотношение количества молекул различной молекулярной массы в одном образце ГК, таким образом он характеризует степень неоднородности состава молекул ГК. Полученные результаты свидетельствуют о полидисперсном характере обоих изучаемых ГК [56]. При этом можно отметить, что образец ГК-2 (выделенный из торфа с болота

«Таган») является веществом с более однородным молекулярным составом, в сравнении с образцом ГК-1 (выделенным из торфа с болота «Клюквенное»).



ГК-1



ГК-2

Рисунок 3.2.5 – Хроматограммы ВЭЖХ гуминовых кислот, выделенных из двух древесно-травяных видов торфа с разных торфяных месторождений (ГК-1 – «Клюквенное» и ГК-2 – «Таган»)

К настоящему моменту времени накоплен огромный пласт информации, содержащий сведения о факторах, влияющих на величину молекулярных масс ГК, методиках их определения и т.д., но нет единого мнения о взаимосвязи Мм и физико-химических параметров данных молекул. Существует мнение, что, более

высокомолекулярным ГК присуще более низкие значения коэффициента экстинкции при $\lambda = 465$ нм (E_{465}) [4, 105, 107], коэффициента Е. Вельте ($Q_{4/6}$) [181, 183, 261, 278], а также менее выраженный «синий сдвиг» максимума флуоресценции [202, 206]. В других исследованиях, описанных в статьях [183, 186], выявлена взаимосвязь между ММР и такими структурными параметрами, как: алифатические фрагменты (найденные методами ^{13}C -ЯМР-спектроскопии и элементного анализа), карбоксильные группы. В работе [183] говорится, что ГК, имеющие более высокие значения Мм, содержат меньшее количество карбоксильных групп, но более высокие значения атомного отношения Н/С. Данную зависимость авторы связывают с высоким содержанием структур алифатического типа вследствие уменьшения содержания полисахаридов и лигнина. Другие авторы придерживаются мнения, что образцы ГК с меньшей Мм содержат больше фенольных фрагментов [183]. В результате проведенного исследования также обнаружена взаимосвязь между выше обозначенными параметрами.

Таблица 3.2.7 – Молекулярно-массовое распределение в молекулах гуминовых кислот

Место отбора торфа	Шифр образца	Параметры ММР			
		1M_n , Да	2M_w , Да	3M_p , Да	4p
Болото «Клюквенное»	ГК-1	21164,8	261519,4	74397,6	12,4
Болото «Таган»	ГК-2	11844,2	121393,4	37918,4	10,3
Примечания					
1 M_n , Да – среднечисленная молекулярная масса					
2 M_w , Да – средневесовая молекулярная масса					
3 M_p , Да – пиковое значение молекулярных масс (медиана)					
4 p – полидисперсность (отношение M_w/M_n)					

Таким образом, результаты ММР позволили заключить, что оба исследуемых образца ГК, выделенные из древесно-травяных видов торфа с разных торфяных месторождений («Клюквенное» и «Таган»), являются полидисперсными биополимерами с высокой молекулярной массой (121,4-261,5 кДа).

ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 3

1. По результатам фармакогностического исследования, два образца торфа с разных торфяных месторождений Томской области («Клюквенное» и «Таган») относятся к древесно-травяному виду и являются очень близкими по своему происхождению. Наиболее предпочтительным для целей выделения ГК является образец торфа с месторождения «Таган», т.к. отличается более высокой степенью разложения, меньшей зольностью и меньшей загрязненностью минеральными примесями.

2. Практически одинаковое количественное содержание ГК в двух древесно-травяных видах торфа с разных торфяных месторождений Томской области («Клюквенное» и «Таган») может указывать на их идентичность, обусловленную ботаническим происхождением.

3. Результаты исследования ГК из двух древесно-травяных видов торфа с разных торфяных месторождений Томской области («Клюквенное» и «Таган») различными методами физико-химического анализа свидетельствуют о наличии общего принципа их строения, судя по однотипным профилям полос в электронных, флуоресцентных и ИК спектрах, значениям химических сдвигов в ^{13}C -ЯМР спектрах.

4. Для двух образцов ГК из древесно-травяных видов торфа с разных торфяных месторождений Томской области («Клюквенное» и «Таган») установлены общие закономерности строения и свойств: ароматическая часть молекулы содержит алкильные заместители нормального и разветвленного строения (длиной до 10 атомов углерода), система полисопряжения представлена фрагментами структуры, содержащими $\text{C}=\text{C}$ -связи ароматического и алифатического ряда, а также включающая различные азот- и кислородсодержащие функциональные группы, не характерное для иных природных соединений специфическое спектральное свойство по данным флуоресцентной спектроскопии – гипсохромный сдвиг («синий сдвиг»), амфифильный характер с преобладанием

гидрофильных структур и одинаковая степень ароматичности с долей ароматических фрагментов в структуре порядка 33 %, отрицательная средняя степень окисления атома углерода и восстановительные свойства, высокая полидисперсность и высокие молекулярные массы в диапазоне значений (121,4-261,5 кДа).

5. Установлены специфические (дифференциальные) параметры структуры обоих образцов ГК, позволяющие проводить оценку их качества: спектральные коэффициенты по данным электронной спектроскопии – экстинкции и цветности; положения максимумов флуоресценции и значения гипсохромного сдвига спектров испускания; спектральные коэффициенты по данным ИК спектроскопии – значения ОППП-величин; количественное содержание кислотных функциональных групп по данным титриметрического анализа; массовые и атомные доли элементов ($\%_{\text{mass}}$; $\%_{\text{atom}}$), атомные отношения элементов и средняя степень окисления атома углерода; интегральные соотношения спектральных областей атомов углерода различных фрагментов структуры по данным ^{13}C -ЯМР-спектроскопии; показатели ММР по данным эксклюзионной ВЭЖХ.

6. По данным электронной спектроскопии образец ГК-2 (выделенный из торфа с болота «Таган») отличается от образца ГК-1 (выделенного из торфа с болота «Клюквенное») наличием в строении более разветвленной и протяженной системы полисопряжения, которая содержит разнообразные кратные связи (в большей степени $\text{C}=\text{C}$ и $\text{C}=\text{O}$), и меньшей степенью поликонденсации ароматических фрагментов в его структуре. Для образца ГК-1 отмечено более сложное строение макромолекулы, более высокое содержание объёмной циклической части молекулы, где преобладают поликонденсированные ароматические структуры. Образец ГК-2 является более легко поляризуемым и реакционноспособным соединением, чем ГК-1.

7. По данным флуоресцентной спектроскопии, титриметрического и элементного анализа различия между двумя образцами ГК из древесно-травяных видов торфа с разных торфяных месторождений Томской области («Клюквенное» и «Таган») заключаются в том, что для образца ГК-2 (выделенного из торфа с болота

«Таган») характерны: более высокий индекс гумификации, следовательно, более высокое содержание в его молекуле структур типа хинона, гидрохинона и семихинона, отвечающих за антирадикальную активность, также более высокое содержание азота и более высокие значения величин, характеризующих восстанавливающие свойства.

8. По данным ИК спектроскопии образец ГК-2 (выделенный из торфа с болота «Таган») отличается от образца ГК-1 (выделенного из торфа с болота «Клюквенное») более высокими значениями ОППП-величин, характеризующих содержание фенольных групп и ароматических фрагментов, а также меньшими значениями отношений ОППП-величин, характеризующих содержание простых эфиров и углеводов.

9. По данным ^{13}C ЯМР спектроскопии образец ГК-2 (выделенный из торфа с болота «Таган») отличается от образца ГК-1 (выделенного из торфа с болота «Клюквенное») большим содержанием (более чем в 2 раза) в его молекулярной структуре углерода кетонных и хиноидных групп. В образце ГК-1 замещенный ароматический углерод представлен в большей степени алкил-арилловыми группировками ($\text{C}_6\text{H}_5\text{O}$ -группами лигниновой природы), а в образце ГК-2 – фенольными фрагментами. В молекуле образца ГК-1 установлено также более высокое (на 30 %) содержание углеводных (полисахаридных) компонентов в сравнении с образцом ГК-2, что в большей степени отражает лигнинопроизводный характер образца ГК-1.

10. По данным эксклюзионной ВЭЖХ образец ГК-2 (выделенный из торфа с болота «Таган») отличается от образца ГК-1 (выделенного из торфа с болота «Клюквенное») более чем в 2 раза низким значением средневесовой молекулярной массы и является веществом с более однородным молекулярным составом.

11. По результатам физико-химического анализа параметров строения и свойств отмечено, что образец ГК-2 (выделенный из торфа с болота «Таган») является наиболее перспективным для получения биологически активных веществ гуминовой природы с целью разработки на его основе растительных лекарственных средств, поскольку содержит более высокое количество азота, а

также фенольных и хиноидных групп, меньшее количество CH_3O -групп лигниновой природы и углеводных (полисахаридных) компонентов, характеризуется более высоким индексом гумификации, меньшей степенью конденсированности ароматических структур и более высокими восстанавливающими свойствами, является менее полидисперсным, а также более легко поляризуемым и реакционно способным соединением.

ГЛАВА 4 ИССЛЕДОВАНИЕ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ПЕРСПЕКТИВНОГО ОБЪЕКТА ГУМИНОВЫХ КИСЛОТ НИЗИННОГО ДРЕВЕСНО-ТРАВЯНОГО ВИДА ТОРФА БОЛОТА «ТАГАН»

По результатам физико-химического анализа, представленным в Главе 3, установлен наиболее перспективный для целей получения биологически активных веществ гуминовой природы образец ГК-2 (выделенный из торфа болота «Таган»). По этой причине дальнейшее исследование фармакологической активности было проведено с данным образцом ГК-2.

Ранее коллективом ученых СибГМУ (М.В. Зыкова, М.В. Белоусов и др.) [58, 66] были изучены фармакологические и токсические свойства ГК низинного древесно-травяного торфа болота «Клюквенное» Томской области. В серии экспериментов, проведенных для оценки острой токсичности ГК, были определены такие параметры, как: частично смертельная, средне смертельная, абсолютно смертельная дозы ГК при внутрибрюшинном и внутривенном путях введения на двух видах животных (крысы / мыши), а также установлены органы-мишени. Показано, что независимо от способа введения (парентеральный / энтеральный), вида лабораторных животных (крысы/ мыши) картина острого отравления была аналогичной. При визуальном наблюдении было замечено сокращение частоты и силы движений, атаксия, выраженный цианоз (мордочки, ушей, семенников). Данные изменения могли быть ассоциированы с кумуляцией в крови восстановленного гемоглобина, нарушением гемодинамики (венозного оттока). Макроанализ внутренних органов свидетельствовал об их гиперемии. С привлечением микроскопического метода обнаружили стаз форменных элементов крови, а также на гистологическом препарате тканей головного мозга - выраженный отек (периваскулярный и перицеллюлярный), на препарате легкого – геморрагический отек, тканей надпочечников – нарушение трофики. Этиологическим фактором, вызвавшим полиорганную альтерацию, явилась острая сердечная недостаточность [64].

Согласно литературным данным [91] подобная картина отравления обычно наблюдается при применении препаратов миотропного действия в токсических дозах – антагонистов кальция, активаторов калиевых каналов, органических нитратов и нитратоподобных соединений. В связи с чем, на основании сходства симптомов отравления, была выдвинута гипотеза о наличии прямых кардиоваскулярных эффектов при введении ГК в терапевтических дозах. Исходя из этого, дальнейшее изучение биологической активности перспективного образца ГК-2 было основано на данной гипотезе.

Поиск новых эффективных и относительно безопасных природных молекул с кардиотропным механизмом действия является весьма актуальной задачей современной медицины и фармации, так как сердечно-сосудистая система, осуществляя транспортную функцию, обеспечивает непрерывное протекание физиологических и биохимических процессов во всех клетках, обуславливает функционирование организма как единого целого. К тканям и органам по сосудистому руслу доставляются кислород и вещества, необходимые для пластического обмена, а к экскреторным органам – продукты метаболизма. Помимо питательных веществ, благодаря непрерывной гемодинамике транспортируются регуляторные молекулы (гормоны, пептиды, антитела, цитокины и др.). Поэтому кроме транспортной функции, на сердечно-сосудистую систему возложены защитная и регуляторная. Сердечная мышца чутко реагирует на нарушение гомеостаза: при физических нагрузках увеличивает приток артериальной крови к интенсивно работающим органам, уменьшает давление при чрезмерной активации барорецепторов дуги аорты, и, наоборот, способствует его росту при кровопотерях, ликвидирует увеличенный объем интерстициальной жидкости и т.д. [41].

Регуляция активности самого миокарда осуществляется рядом экстра- и интракардиальных механизмов, оказывающих на него прессорные и депрессорные эффекты. Парасимпатический отдел нервной системы посредством ацетилхолина активирует M_2 -холинорецепторы, благодаря чему снижается сила сердечных сокращений (отрицательный инотропный эффект), частота сердечных сокращений (отрицательный хронотропный эффект), замедляется распространение импульса по

проводящей системе (отрицательный дромотропный эффект), т.е. парасимпатический отдел вегетативной нервной системы воздействует депрессорно. Симпатический отдел, наоборот, возбуждая β_1 -адренорецепторы, оказывает прессорное влияние – положительный хронотропный, дромотропный, инотропный эффекты. Циркулирующие в крови БАВ (катехоламины, ангиотензин II, тромбоксан A_2 , вазопрессин) вызывают вазоконстрикторное действие на сосудистый бассейн, активируют миокард. Вазодилататоры, к числу которых относятся брадикинин, АДФ, простаглицлин, гистамин, вызывают уменьшение интенсивности работы миокарда [91].

Впервые во второй половине XX в. в статьях R.F. Furchgott, L.J. Ignarro (цитируется в [86]) было сообщено о влиянии эндотелия сосудов на функциональное состояние сердечно-сосудистой системы. Они заметили, что в опыте, проведенном на изолированном сегменте аорты, действие ацетилхолина сопровождалось расслаблением сосуда (причем вазорелаксация проявлялась только в том случае, если сосуд был плохо очищен от внутреннего эндотелиального слоя клеток). Ученые предположили, что эндотелий обладает самостоятельной паракринной активностью, секретитрует компонент, диффузия которого в более глубокие слои, образованные гладкомышечными клетками, вызывает их гиперполяризацию и расслабление. Они назвали его эндотелиальный фактор расслабления (endothelium-derived relaxing factor (EDRF)). С привлечением метода ЭПР-спектроскопии советский биофизик А.Ф. Ванин [86] установил, что EDRF есть ни что иное, как свободнорадикальная частица – оксид азота (NO). Также А.Ф. Ванин обнаружил, что способностью генерировать NO наделены не только многоклеточные сложно организованные организмы, но и одноклеточные, например, клетки дрожжевых культур.

Обнаружение ферментов (NO-синтаз), катализирующих образование NO в разных клетках (нейронах, клетках иммунной системы – макрофагах, фагоцитах), привлекло к изучению его физиологических эффектов ученых многих направлений: гематологов, онкологов, неврологов, иммунологов, кардиологов. Было установлено, что NO выступает в качестве ингибитора процесса активации

тромбоцитов, оказывает действие на реологические свойства крови, бимодально влияет на секрецию медиаторов ЦНС, опосредует цитотоксичность фагоцитирующих клеток в отношении инфекционных агентов, препятствует канцерогенезу. Кардиологи признали за NO роль кардиопротекторной молекулы ввиду того, что помимо релаксации сосудов, он блокирует их ремоделирование и стимулирует процесс ангиогенеза. Вклад в кардиопротекцию NO также вносят его АО свойства (при условии пребывания в тканях в физиологических концентрациях), обусловленные связыванием ионов Fe^{2+} и, как следствие, замедлением экспоненциального роста числа вновь образованных свободно-радикальных частиц [86, 91].

При непродолжительном нарушении баланса между прессорными и депрессорными механизмами регуляции активности сердечно-сосудистой системы (превалирует секреция основных эфферторов симпато-адреналовой системы и системы ренин-ангиотензин-превращающего фермента - катехоламинов (адреналина и норадреналина), ангитензина II, соответственно) подключаются компенсаторные механизмы: при понижении сердечного выброса повышается ударный объем крови либо частота сердечных сокращений, перераспределяется регионарный кровоток в сторону сердца и скелетной мускулатуры. При пролонгированной гиперактивации симпатического отдела вегетативной нервной системы, гуморальном дисбалансе (повышении уровня вазоконстрикторов, нарушение их инактивации в гепато-билиарной системе), глубокой гипопродукции эндотелеоцитами газового трансмиттера NO происходит срыв компенсаторных механизмов, что приводит к необратимым повреждениям сердца. На уровне кардиомиоцитов при этом наблюдается оксидативный стресс, по причине которого, во-первых, нарушается структурно-функциональная организация биомембран, с последующей экскрецией в цитоплазму и межтканевую жидкость ферментов. Во-вторых, в митохондриальной мембране появляются поры, по которым вода беспрепятственно проникает в их внутреннее пространство, приводя к набуханию и нарушению процесса окислительного фосфорилирования. Деструкция основных «энергетических станций» (митохондрий) - это причина дефицита макроэргов

(АТФ). Поэтому превентивную терапию сердечно-сосудистых заболеваний ассоциируют с применением кардиопротекторов, основными требованиями к которым являются: способность влиять на метаболические пути в пораженном миокарде, способность активировать NO-эргическую систему передачи внутриклеточного сигнала, способность проявлять АОА [95].

В связи с этим, в данном разделе диссертации представлены результаты исследования кардиотропной активности перспективного образца ГК-2 из низинного древесно-травяного торфа болота «Таган» Томской области, а также оценка его антиоксидантных свойств и активности относительно эндотелиальной NO-синтазы, как возможных механизмов кардиопротекции.

Большинство типовых патологических процессов, лежащих в основе развития многих заболеваний (в т.ч. и сердечной недостаточности, инфаркта миокарда), сопровождаются гипоксией тканей, нарушением толерантности даже к непродолжительным физическим нагрузкам. Поэтому одним из этапов поиска веществ кардиотропного действия является определение наличия у биоактивных молекул актопротекторного эффекта. В современной фармакологии под актопротекторами подразумевают гетерогенную по химической природе группу веществ, повышающих резистентность организма к острому кислородному голоданию, высокой температуре окружающей среды, а также способных стимулировать работоспособность [84]. В связи с этим было проведено исследование актопротекторного действия образца ГК-2 в экспериментах *in vivo* по разработанной в Томском НИИ Курортологии (ФГБУ СибФНКЦ ФМБА России) методике [111].

С целью установления у фармакологически активных веществ свойства актопротектора на доклиническом этапе исследования используют предъявление лабораторным животным (наиболее часто в качестве тест-систем применяют аутбредных крыс) разнообразных видов механических нагрузок (бег на третбане с различным углом наклона и скоростью «движущейся дорожки», плавание с металлическим грузом или без него, подъем по «бесконечному» канату и др.). Особо значимое место среди этих методов отводится тесту принудительного

плавания (или «вынужденное плавание», «forced swim test») в различных модификациях [117]. Предварительное введение (в большинстве методик за 30 мин до предъявления механической нагрузки) тестируемого вещества позволяет исследовать его влияние на выносливость организма, работоспособность и процессы восстановления после предварительной аэробно-анаэробной нагрузки (аэробная модель нагрузки воспроизводится при использовании груза до 5 % от массы тела животного, анаэробная – более 7 %) [117, 146].

4.1 ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ ПЕРСПЕКТИВНОГО ОБЪЕКТА ГУМИНОВЫХ КИСЛОТ НА СКОРОСТЬ КОРОНАРНОЙ ПЕРФУЗИИ И СОКРАТИТЕЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ ИЗОЛИРОВАННОГО СЕРДЦА КРЫС В ДИНАМИКЕ КОНЦЕНТРАЦИЙ

Исследование влияния перспективного образца ГК, выделенного из низинного древесно-травяного вида торфа (образец ГК-2), на скорость коронарной перфузии и сократительную активность изолированного миокарда проведено на аутбредных крысах Wistar.

При введении образца ГК-2 в изотонический раствор Кребса-Хензеляйта, которым осуществляли перфузию миокарда, наблюдалось дозозависимое увеличение коронарного протока (Таблица 4.1.1). В наибольшей степени данный показатель возрастал при применении образца ГК-2 в концентрации 0,1 мг/мл. Отмеченный эффект имел кратковременный характер, так как после 10 мин перфузии без образца ГК-2 (т.н. период «отмывки») коронарный проток был неотличим от соответствующих контрольных величин (Таблица 4.1.1).

В условиях эксперимента миокард был выведен из-под влияния регуляторных систем организма (парасимпатического и симпатического отделов нервной системы, системы РААС), что свидетельствует о прямом вазоактивном эффекте образца ГК-2.

Таблица 4.1.1 – Влияние перспективного образца гуминовых кислот (ГК-2) на коронарный проток

Скорость коронарного протока, мл/мин (n = 10)				
Время	Контроль	Концентрация гуминовых кислот, мг/мл		
		0,1	0,01	0,001
20-я мин адаптации	13,2±0,39	13,2±0,44	13,1±0,45	13,2±0,41
10-я мин перфузии исследуемым образцом ГК-2	11,7±0,26	² 15,7±0,67	¹ 14,4±0,56	12,1±0,62
10-я мин перфузии без исследуемого образца ГК-2	10,9±0,23	11,7±0,3	11,5±0,41	10,5±0,46
Примечания				
1 Достоверно относительно аналогичных значений в контроле p < 0,05				
2 Достоверно относительно аналогичных значений в контроле p < 0,01				

В реализованной методике перфузии сердца по Лангендорфу введение в полость левого желудочка латексного баллончика, сопряженного с датчиком давления, позволило определить показатели, характеризующие сократительную активность миокарда: силу сердечных сокращений, частоту сердечных сокращений (ЧСС, уд/мин), конечное диастолическое давление (КДД, мм рт. ст.).

По сравнению с группой контроля перфузия раствором Кребса-Хензеляйта, содержащим образец ГК-2, привела к изменению данных показателей. В наибольшей степени вариация в сторону снижения силы сердечных сокращений, ЧСС и КДД наблюдалась при использовании образца ГК-2 в концентрации, равной 0,1 мг/мл (Таблица 4.1.2, Таблица 4.1.3, Таблица 4.1.4).

Можно отметить, что показатель ЧСС (Таблица 4.1.3) в группе, перфузию которой осуществляли раствором Кребса-Хензеляйта с образцом ГК-2 в концентрации 0,1 мг/мл, в отличие от других величин (силы сердечных сокращений, КДД) оказался более «стойким», так как сохранялся в период «отмывки» (10-мин перфузии без образца).

Таблица 4.1.2 – Влияние перспективного образца гуминовых кислот (ГК-2) на силу сердечных сокращений

Давление, развиваемое левым желудочком, мм рт. ст. (n = 10)				
Время	Контроль	Концентрация гуминовых кислот, мг/мл		
		0,1	0,01	0,001
20-я мин адаптации	73,7±3,5	67,9±3,2	70±3,4	71±3,2
10-я мин перфузии исследуемым образцом ГК-2	73,6±1,24	² 52±4,5	¹ 61,3±4,3	69,3±4,5
10-я мин перфузии без исследуемого образца ГК-2	75,1±0,9	² 60,8±2,9	¹ 65,8±2,8	70,8±2,7
Примечания				
1 Достоверно относительно аналогичных значений в контроле p < 0,05				
2 Достоверно относительно аналогичных значений в контроле p < 0,01				

Таблица 4.1.3 – Хронотропный эффект перспективного образца гуминовых кислот (ГК-2)

Частота сердечных сокращений, уд/мин (n = 10)				
Время	Контроль	Концентрация гуминовых кислот, мг/мл		
		0,001	0,01	0,1
20-я мин адаптации	197,3±2,3	200±5	198±5,1	198±5,1
10-я мин перфузии исследуемым образцом ГК-2	208,3±3,45	² 174,8±9,1	185,1±9,7	195,1±8,4
10-я мин перфузии без исследуемого образца ГК-2	214,6±2,2	² 175,3±9	¹ 190,3±9,1	201,5±8,7
Примечания				
1 Достоверно относительно аналогичных значений в контроле p < 0,05				
2 Достоверно относительно аналогичных значений в контроле p < 0,01				

Таблица 4.1.4 – Влияние перспективного образца гуминовых кислот (ГК-2) на конечное диастолическое давление

Конечное диастолическое давление, мм рт. ст. (n = 10)				
Время	Контроль	Концентрация гуминовых кислот, мг/мл		
		0,1	0,01	0,001
20-я мин адаптации	15,7±0,3	15,2±0,49	15,1±0,5	15,2±0,5
10-я мин перфузии исследуемым образцом ГК-2	13,5±0,22	¹ 12,5±0,5	¹ 12,9±0,5	13,2±0,2
10-я мин перфузии без исследуемого образца ГК-2	13±0,25	¹ 10±0,6	¹ 12,1±0,6	13,1±0,35
Примечания				
1 Достоверно относительно аналогичных значений в контроле p < 0,05				
2 Достоверно относительно аналогичных значений в контроле p < 0,01				

Таким образом, на основании полученных экспериментальных данных установлено, что перспективный образец ГК-2, выделенный из низинного древесно-травяного вида торфа, оказал прямые кардиоваскулярные эффекты *in vitro* за счет регуляции тонуса венечных сосудов (в нормоксических условиях). Принимаемые значения величин – скорость коронарного протока, ЧСС, сила сердечных сокращений, КДД зависели от дозы образца ГК-2 в перфузионном растворе. Образец ГК-2 в концентрации 0,1 мг/мл в наибольшей степени изменял функциональное состояние миокарда.

4.2 ИССЛЕДОВАНИЕ КАРДИОПРОТЕКТОРНОГО И ИНОТРОПНОГО ДЕЙСТВИЯ ПЕРСПЕКТИВНОГО ОБЪЕКТА ГУМИНОВЫХ КИСЛОТ ПРИ ИШЕМИИ И РЕПЕРФУЗИИ ИЗОЛИРОВАННОГО СЕРДЦА

В условии нормоксии при перфузии интактных сердец аутбредных крыс Wistar изотоническим раствором Кребса-Хензелята с растворенным в нем перспективным образцом ГК-2 в концентрации 0,001 мг/кг, 0,01 мг/кг и 0,1 мг/кг

было установлено, что образец ГК-2 влиял на такие показатели, как: коронарный проток, ДРЛЖ, КДД, ЧСС, т.е. проявлял прямые вазоактивные эффекты. Использование образца ГК-2 в концентрации 0,1 мг/мл в наибольшей степени изменяло данные величины. Поэтому следующим этапом исследования явилась оценка влияния образца ГК-2 в концентрации 0,1 мг/мл на показатели насосной функции сердца в условиях ишемии-реперфузии.

Для того чтобы оценить воздействие образца ГК-2 на работу сердца в патологических условиях (условиях временно нарушенной органной циркуляции) необходимо предварительно оценить влияние образца ГК-2 в наиболее эффективной концентрации (0,1 мг/мл) на показатели сократимости миокарда (Таблица 4.2.1). В сравнении с группой контроля образец ГК-2 продемонстрировал отрицательный инотропный (снижение силы сердечных сокращений) и хронотропный (снижение ЧСС) эффекты. Так как произошло уменьшение силы сердечных сокращений (снижение показателя ДРЛЖ), то это прямо повлияло на значение КДД (оно также уменьшилось).

Перфузия, осуществляемая после 45-минутной тотальной ишемии, сопровождалась выраженным снижением инотропной функции левого желудочка. Выраженное снижение сократительной активности миокарда связано с особенностью энергообеспечения миокарда в условиях гипоксии. Во-первых, в цитозоле кардиомиоцитов нет существенных запасов энергетических субстратов – углеводов (глюкозы, гликогена), высших жирных кислот (ВЖК), что снижает надежность его энергоснабжения. Во-вторых, 85 % молекул АТФ вырабатывается при непосредственном участии кислорода (β -окисление ВЖК, аэробный гликолиз), и лишь 15 % - в процессе аэробного гликолиза. В-третьих, экстракция триплетного кислорода из притекающей к миокарду крови очень эффективна и достигает 70-75 %, в то время как в среднем в организме эта величина составляет не более 30 %, поэтому увеличение снабжение кислородом миокарда за счет более полной диссоциации оксигемоглобина практически невозможна, а может компенсироваться только непрерывным током оксигенированной крови. Применение образца ГК-2 в период, предшествующий тотальной ишемии, привело к более эффективному

восстановлению инотропной функции сердца по сравнению с группой контроля (Таблица 4.2.1). Очевидно, это связано с влиянием образца ГК-2 на тонус коронарных сосудов (вазодилатирующий эффект) [124].

Таблица 4.2.1 – Влияние перспективного образца гуминовых кислот (ГК-2) в концентрации 0,1 мг/мл на давление, развиваемое левым желудочком, частоту сердечных сокращений, конечное диастолическое давление

Время	¹ ДРЛЖ (мм рт. ст.) (n = 14)		² ЧСС (уд/мин) (n = 14)		³ КДД (мм рт. ст.) (n = 14)	
	Контроль	Образец ГК-2	Контроль	Образец ГК-2	Контроль	Образец ГК-2
20-я мин адаптации	91,3±5,8	93±3,2	196,1±10,3	187,8±3	15,6±0,3	15,3±0,3
10-я мин перфузии	96,9±3,9	⁵ 70,8±4,3	179,6±8,5	⁴ 158,2±3,8	13,6±0,22	⁴ 12,4±0,45
Реперфузия, мин						
5 мин	⁷ 6,4±1	^{4,7} 15,6±4,8	⁷ 87,5±11,2	⁷ 61,9±7,5	⁷ 79,2±7,1	^{4,7} 65,8±1,4
15 мин	⁷ 8,3±1,8	^{4,7} 20±4,1	⁶ 152,6±13,5	^{5,6} 78,9±13,3	⁷ 75,8±5,4	^{4,7} 60,1±7,1
30 мин	⁷ 21,2±3	^{4,7} 31,1±3,4	⁶ 156,3±16,7	^{5,6} 87,3±11,1	⁷ 64±8,2	⁷ 59,8±4,5
Примечания						
1 ДРЛЖ (давление, развиваемое левым желудочком)						
2 ЧСС (частота сердечных сокращений)						
3 КДД (конечное диастолическое давление)						
4 Достоверно относительно аналогичных значений в контроле p < 0,05						
5 Достоверно относительно аналогичных значений в контроле p < 0,01						
6 Достоверно относительно исходных значений в группе p < 0,01						
7 Достоверно относительно исходных значений в группе p < 0,001						

Период восстановления кровотока характеризуется развитием такого явления, как постишемическая (или реперфузионная) контрактура. Её развитию способствуют метаболические и структурные изменения. Дефицит кислорода в сочетании с нарушением функционирования ионных насосов из-за низкого энергообеспечения нарушает трансмембранную асимметрию ионов, в первую очередь Ca²⁺, Na⁺, K⁺. Увеличение внутриклеточной концентрации ионов Ca²⁺ способствует реализации «липидной триады»: ещё в большей степени активируются процессы свободно радикального окисления, повышается активность липаз, фосфолипаз, аккумулируются свободные длинноцепочечные ВЖК. «Липидная триада» – источник веществ с детергентной активностью (ВЖК,

лизофосфолипидов). Эти соединения составляют основу повреждения лизосомальных мембран и способствуют высвобождению из них протеолитических ферментов [89]. Протеолитические ферменты проявляют оптимум активности в кислом диапазоне рН, имеющем место быть в данной ситуации еще и от того, что увеличивается накопление и снижается элиминация кислых продуктов гликолиза, гидролиза, липолиза. Это обстоятельство потенцирует потерю целостности, полупроницаемости других мембранных органоидов, нарушает функционирование трансмембранных катионных насосов. Угнетение Na^+/K^+ насоса приводит к увеличению внутриклеточного уровня ионов Na^+ , препятствует удалению ионов Ca^{2+} . Повышение уровня ионов Ca^{2+} в клетке происходит еще и от нарушения активности Ca^{2+} -насоса саркоплазматического ретикулума, который в физиологических условиях выполняет функцию его внутриклеточного депо. Это обстоятельство, с одной стороны, замыкает «порочный круг», так как активизирует совокупность процессов «липидной триады», а с другой, повышение уровня ионов Ca^{2+} носит самостоятельное повреждающее действие, т.н. «кальциевая триада», суммирующаяся из контрактуры миофибрилл, нарушении функционирования митохондрий и активации миофибриллярных протеаз, митохондриальных фосфолипаз [89].

Снижение показателя КДД на фоне применения образца ГК-2 показывает уменьшение постишемической (реперфузионной) контрактуры. Также в условиях эксперимента образец ГК-2 проявил отрицательный хронотропный эффект (снизилась частота сердечных сокращений) в сравнении с контрольной группой (Таблица 4.2.1).

Параллельно с оценкой влияния образца ГК-2 на показатели сократимости миокарда было проведено исследование его кардиопротективной активности. Для этого в перфузате, оттекающем от сердца, в период, предшествующей ишемии и в период реперфузии, определяли активность креатинфосфосфкиназы (КФК).

Креатинфосфокиназа – фермент, катализирующий синтез из АТФ и креатина креатинфосфата (последний обеспечивает организм энергией, главным образом, при повышенных физических нагрузках). Фермент обладает органотропностью, в

больших количествах присутствует в клетках миокарда, скелетной мускулатуры, головного мозга. Появление данного фермента в интерстициальной жидкости свидетельствует о нарушении целостности клеток. Кардиопротекторный эффект образца ГК-2 выразился в достоверном снижении реперфузионного выброса КФК с $51,1 \pm 3,4$ мкмоль НАДН/мин*л в контрольной группе до $42,3 \pm 3,2$ НАДН/мин*л в опытной группе ($p < 0,05$). Возможно, в основу кардиопротекторного действия данных веществ положены их антиоксидантные свойства, связанные с присутствием в структуре фенольных гидроксидов, хиноидных группировок [2].

По результатам проведенного исследования можно заключить, что применение ГК в период, предшествующей гипоксии-реоксигенации, способствует повышению устойчивости миокарда к данным патологическим условиям. Это подтверждается восстановлением его сократимости, снижением некротической гибели кардиомиоцитов.

Таким образом, на модели изолированного миокарда, лишенного внешнего нейрогуморального воздействия (влияния *n. vagus* и *n. sympathici*, циркулирующих в крови БАВ – биогенных аминов (адреналина, норадреналина, гистамина, серотонина), простаглицина, ангиотензина II и др.), установили способность образца ГК-2 непосредственно воздействовать на сердечную мышцу. Прямые кардиоваскулярные эффекты перспективного образца ГК-2, выделенного из низинного древесно-травяного вида торфа, проявились в снижении силы и частоты сердечных сокращений, увеличении скорости коронарного протока, снижении реперфузионного выброса креатинфосфокиназы. Отличительным свойством исследуемого перспективного образца ГК-2 от известных кардиотропных средств явилась способность восстанавливать сократительную функцию сердечной мышцы в период реперфузии. Известно, что применение некоторых лекарственных препаратов (блокаторов Na^+ -каналов, блокаторов Ca^{2+} -каналов L-типа, активаторов K^+ -каналов), непосредственно влияющих на активность ионных каналов рабочего и проводящего миокарда, приводит к гиперполяризации клеточной мембраны, увеличению продолжительности рефрактерного периода, замедлению скорости

проведения возбуждения (вплоть до атриовентрикулярной блокады), что в совокупности провоцирует нарушение сердечного ритма.

4.3 ИССЛЕДОВАНИЕ ВОЗМОЖНЫХ МЕХАНИЗМОВ КАРДИОТРОПНОГО ДЕЙСТВИЯ ГУМИНОВЫХ КИСЛОТ

4.3.1 Исследование роли эндотелиальной NO-синтазы в реализации кардиопротекторного действия гуминовых кислот

Эндотелий сосудов – монослой эпителиальных клеток, выстилающих внутренний просвет кровеносных и лимфатических сосудов. Ранее считалось, что назначение эндотелиального слоя сведено к выполнению исключительно барьерной функции [53]. Позже было установлено, что эндотелий – одна из самых крупных паракринных и аутокринных желёз организма (общая масса эндотелия взрослого человека достигает 1,5-2 кг), которая продуцирует БАВ (эндотелин, тромбоксан A_2 , фактор активации тромбоцитов, фактор Виллебранда, АДФ, NO), ответственные за регуляцию активности сердечно-сосудистой системы ввиду влияния на реологические свойства крови, тонус, рост и ремоделирование сосудов. К самому важному вазоактивному веществу, продуцентом которого являются эндотелециты, относится свободный метастабильный радикал NO. Предшественник NO - аминокислота L-аргинин, а точнее азот её гуанидинового фрагмента [280]. Гуанидиновая группировка подвергается пятиэлектронному окислению кислородом при участии протеида NO-синтазы (NOS), коферментом в котором выступают тетрагидробиоптерин, НАДФН, ФМН, а кофактором – гемовое железо (Fe^{2+}). Благодаря достижениям геномики удалось расшифровать последовательность аминокислотных остатков трех изоформ NOS – нейрональной (nNOS), индуцибельной (iNOS) и эндотелиальной (eNOS). Последняя локализована, главным образом, в цитозоле эндотелиальных клеток. Регуляция eNOS может

осуществляться как на уровне транскрипции и трансляции гена, так и на уровне активности самого фермента. На активность данного фермента влияет концентрация внутриклеточных ионов Ca^{2+} (наряду с pNOS является Ca^{2+} -зависимой). Воздействие эндогенных стимулов химической (ацетилхолин, брадикинин, Ca^{2+} -ионофоры, тромбин, АТФ, серотонин) или физической (напряжение сдвига) природы, вызывающих повышение уровня ионов Ca^{2+} в цитозоле, что за считанные секунды увеличивают синтез NO. Молекула NO ввиду малого размера и небольшого значения Мм, отсутствия заряда, диффузно проникает в клетки гладкомышечного слоя сосудов, где оказывает влияние на активность гуанилатциклазы (ГЦ). Активация ГЦ сопровождается повышением уровня цГМФ, что приводит к снижению уровня внутриклеточных ионов Ca^{2+} (реципрокные отношения) и, как следствие, снижению сократимости клетки. Помимо эндогенных стимулов, активностью eNOS можно управлять с помощью синтетических экзобиотиков, например, L-NAME (N-нитро-L-аргинин метиловый эфир) – неселективного ингибитора NOS [280].

В литературе имеются данные об индукции активности iNOS при воздействии ГК [20, 208].

Поэтому следующей задачей было изучение возможного механизма кардиопротекторного действия образца ГК-2 в концентрации 0,1 мг/мл на модели ишемии и реперфузии изолированного сердца.

Профилактическое применение образца ГК-2 способствовало восстановлению инотропной функции миокарда в период реперфузии (Таблица 4.3.1). Очевидно, это может быть связано со способностью образца ГК-2 уменьшать постишемическую контрактуру. Известно, что пусковым триггером постишемической контрактуры миокарда выступает повышенный уровень ионов Ca^{2+} в цитоплазме клеток (его накопление происходит на фоне инактивации работы $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обменника, нарушения целостности субклеточных органелл, в частности, эндоплазматического ретикулула). Повышенный уровень внутриклеточного Ca^{2+} способствует активному взаимодействию актиновых и миозиновых нитей, нарушению эффективного диастолического расслабления (расслабление –

энергозависимый процесс). Рост внутриклеточного уровня ионов Ca^{2+} приводит к снижению уровня ионов Mg^{2+} (физиологические антагонисты) и провоцирует расстройство процессов окислительного фосфорилирования и дефицит макроэргов. Исходом данных изменений являются «контрактурный» некроз кардиомиоцитов и нарушение насосной функции сердца [86].

Таблица 4.3.1 – Влияние блокатора NO-синтазы L-NAME и перспективного образца гуминовых кислот (ГК-2) на показатели сократимости изолированного сердца крыс

Давление, развиваемое левым желудочком, мм рт. ст.					Конечное диастолическое давление, мм рт. ст.			
Экспозиция	Конт-роль, n=14	Образец ГК-2, 0,1 мг/кг	L-NAME, 100 мкМ/л	Образец ГК-2 + L-NAME	Конт-роль, n=14	Образец ГК-2	L-NAME	Образец ГК-2 + L-NAME
Перфузия, мин								
20 мин	91±5,8	93±3,2	92±2,2	90,9±6,1	15,6±0,3	15,3±0,3	15,7±0,6	14±0,3
10 мин	90,9±4	¹ 70,8±4	87±5,2	90,8±6,9	13,6±0,2	¹ 12,4±0,5	14,7±0,8	13,4±0,9
Реперфузия, мин								
5 мин	⁵ 10,3±2,7	^{1,5} 37,4±11	⁵ 10,2±3	⁵ 12,2±4,4	⁵ 79,2±7,1	⁵ 65,8±1,4	⁵ 79±3,6	⁵ 77±3,6
15 мин	⁵ 18,5±2,4	^{1,5} 45,3±9	⁵ 16,5±2,4	⁵ 19,5±3,8	⁵ 75,8±5,4	^{1,5} 60±7,1	76±6,6	⁵ 74±6,3
30 мин	⁵ 25,7±3	^{1,5} 37,7±4,2	⁵ 20,7±3	⁵ 28,4±3,5	⁵ 64±8,2	⁵ 59,8±4,5	⁵ 65,9±5	⁵ 62,9±8
Примечания								
1 Достоверно относительно аналогичных значений в контроле $p < 0,05$								
2 Достоверно относительно аналогичных значений в контроле $p < 0,01$								
3 Достоверно относительно исходных значений в группе $p < 0,05$								

В эксперименте помимо регистрации параметров (ДРЛЖ и КДД) проводили оценку цитопротективной активности образца ГК-2. Манифестация в крови (в условиях *in vivo*) или в перфузате (*in vitro*), оттекающим от сердца, внутриклеточно локализованных ферментов свидетельствует о гибели клеток и выходе их содержимого в интерстициальную жидкость. Было установлено, что образец ГК-2 снижал некротическую гибель миоцитов, так как ослаблял реперфузионный выброс КФК. В контрольной группе уровень данного фермента составил 51,1±3,4 НАДН/мин*л, а в контроле – 42,3±3,2 НАДН/мин*л ($p < 0,05$).

Изменение показателей ДРЛЖ и КДД в реперфузионный период, полученные при перфузии раствором, содержащим 100 мкМ/л L-NAME, аналогичны группе контроля (Таблица 4.3.1). Также установлено, что на фоне введения в раствор

неселективного ингибитора NOS L-NAME образец ГК-2 не реализовал кардиопротекторного эффекта, так как уровень КФК не отличался от контроля $49,7 \pm 4,1$ НАДН/мин*л ($p < 0,05$).

Таким образом, установлено, что применение образца ГК-2 в период, предшествующий ишемии-реперфузии, способствовало повышению устойчивости миокарда к данным патологическим условиям. Это подтверждалось восстановлением его сократимости, снижением некротической гибели кардиомиоцитов. Одним из механизмов реализации цитопротекции явилась активация гуминовыми кислотами NO-сигнального пути.

В литературе имеются сведения, что защита клеток, в частности, гепатоцитов, нейронов головного мозга от апоптической либо некротической гибели под влиянием ГК связана с их высокой АО и антирадикальной активностью. Так, на модели острого токсического гепатита, индуцированного внутрибрюшинным введением четыреххлористого углерода [22], гистотоксической и гипоксической форм гипоксии, возникающих в результате введения натрий нитропрусида либо размещением грызунов в барокамере с постепенным снижением парциального давления кислорода во вдыхаемом воздухе [22], ГК снижали концентрацию биомаркеров повреждения – малонового диальдегида (образуется в результате окисления остатков полиненасыщенных жирных кислот в составе фосфолипидов клеточных мембран), трансфераз – АЛАТ, АСАТ (мигрирует из цитозольного содержимого в результате увеличения проницаемости клеточных мембран и нарушения их целостности), мембраносвязанного гликопротеина ГГТ (γ -глутамилтранспептидаз) (в результате модификации липидного бислоя нарушается «заякорение» ГГТ в мембране). Снижение концентрации данных БАВ свидетельствует в пользу замедления процессов цитолиза, происходящего вследствие связывания ГК трихлорметильного радикала, инактивации промежуточных неполных продуктов восстановления кислорода. Также ГК способствуют нормализации энергопластических процессов в митохондриях гепатоцитов и нейронов вследствие препятствия разобщения окислительного фосфорилирования [22].

4.3.2 Исследование антиоксидантной активности гуминовых кислот

В физиологических условиях неполное восстановление триплетного кислорода приводит к образованию промежуточных продуктов - активных форм кислорода (АФК), например, ONOO^\bullet , $\text{O}_2^{\bullet-}$, $\text{HO}_2^{\bullet-}$, HO^\bullet , H_2O_2 , которые ответственны за выполнения ряда важных функций: респираторный взрыв и активацию иммуноглобулинов, направленную на санацию организма; обновление фосфолипидов, обеспечивающих нормальную регуляцию проницаемости клеточных мембран, межклеточную кооперацию; синтез и инактивацию гормонов, вторичных мессенджеров (половых и тиреоидных гормонов, лейкотриенов и простагландинов, окиси азота), регулирующих формирование вторичных гендерных признаков, рост, энергетический обмен, сосудистые реакции, реологические свойства крови и др. Превышение количества АФК над возможностью эндогенной антиоксидантной системы нейтрализовать их, а также одновременное воздействие неблагоприятных факторов окружающей среды: УФ-радиация, поллютанты, лекарственные вещества, способствуют развитию окислительного стресса. При генерации АФК нарушаются физико-химические свойства мембран, инактивируются поверхностные и интегральные белки, нарушаются биоэнергетические процессы [130]. Превентивное применение БАВ с антиоксидантной активностью может снизить вероятность возникновения окислительного стресса, являющегося каузальным фактором развития ряда сердечно-сосудистых патологий (хронической сердечной недостаточности, инфаркта миокарда), канцерогенеза, сахарного диабета, возрастных дегенеративных заболеваний (болезнь Альцгеймера, деменция). Поэтому молекулы с высокой восстановительной активностью, преимущественно природного происхождения, имеют первостепенное значение для современной мировой фармацевтической промышленности [130].

В основе ряда биологических эффектов, проявляемых гуминовыми кислотами (иммуномодулирующих, гепато- и кардиопротекторных,

ренопротективных, антиканцерогенных и др.), лежат их антиоксидантные свойства [50, 236]. Биологически активные добавки, в составе которых присутствуют ГК, нашли применение в качестве средств этиотропной терапии неопластических заболеваний (рака щитовидной железы, бронхогенной карциномы), ишемии головного мозга, ишемических кардиомиопатий, ревматоидного артрита, остеоартрита у гериатрических больных [50].

Способность ГК ингибировать ПОЛ связана с: 1) восстановительными свойствами в отношении многих АФК, 2) связыванием в устойчивые комплексы донорно-акцепторного типа ионов переходных металлов (например, ионов железа), генерирующих дополнительные количества АФК по реакции Хабера-Вейса:

$$\text{O}_2^{\bullet-} + \text{H}_2\text{O}_2 \xrightarrow{\text{Fe}^{3+}} \text{HO}^\bullet + \text{HO}^- + \text{O}_2,$$
 ионов Ca^{2+} , активирующего активность многих деструктивных ферментов – ФЛА₂, протеаз, нуклеаз) [19].

Исследование АОА перспективного образца ГК-2, полученного из низинного древесно-травяного вида торфа, проводили различными методами: катодной вольтамперометрии, колориметрии со стабильным радикалом дифенилпикрилгидразилом (ДФПГ), спектроскопии электронного парамагнитного резонанса (ЭПР) и железосвязывающей активности (колориметрическим методом с феррозином).

1. Исследование антирадикальной активности колориметрическим методом с дифенилпикрилгидразилом (ДФПГ). Метод основан на последовательном двухэтапном взаимодействии радикала ДФПГ (ДФПГ[•]) с молекулой АО. На первой (скорость определяющей) стадии реакции происходит перенос наиболее подвижного водородного атома кислородсодержащих групп молекулы АО (ГК-Н) на радикал ДФПГ[•]. В итоге образуется новая радикальная частица (ГК[•]) и восстановленная молекулярная форма ДФПГ-Н, по реакции: ДФПГ[•]+ГК-Н→ДФПГ-Н+ГК[•]. На второй стадии процесса протекает рекомбинация – вновь образованный радикал ГК[•] (*para*-фенильный радикал) взаимодействует с новой свободнорадикальной частицей (ДФПГ[•]). Итогом взаимодействия служит

неокрашенный продукт (ГК-ДФПГ), раствор при этом лишается пурпурно-синей окраски [27]: $\text{ГК}\cdot + \text{ДФПГ}\cdot \rightarrow \text{ГК-ДФПГ}$.

Результаты проведенного исследования АРА образца ГК-2 представлены величинами: 1) радикалсвязывающей (антирадикальной) активностью, показывающей процент ингибирования (гибели) стабильного радикала ДФПГ \cdot при взаимодействии с образцом ГК (АРА, %); 2) временем [мин], за которое ДФПГ \cdot прореагирует с ГК на 50 % ($\tau_{1/2}$); 3) величиной IC_{50} , показывающей концентрацию вещества при которой достигается уровень ингибирования 50 % (мкг/мл).

Отмечено, что исследуемый образец ГК-2, выделенный из низинного древесно-травяного вида торфа болота «Таган» (в концентрациях 10; 25; 50; 75; 100; 125 и 150 мкг/мл) эффективно восстанавливал свободнорадикальные частицы ДФПГ \cdot (Рисунок 4.3.1), что свидетельствует о наличии у ГК-2 высокой антирадикальной активности. Величина IC_{50} для исследуемого перспективного образца ГК-2 составила 28 мкг/мл (Рисунок 4.3.2).

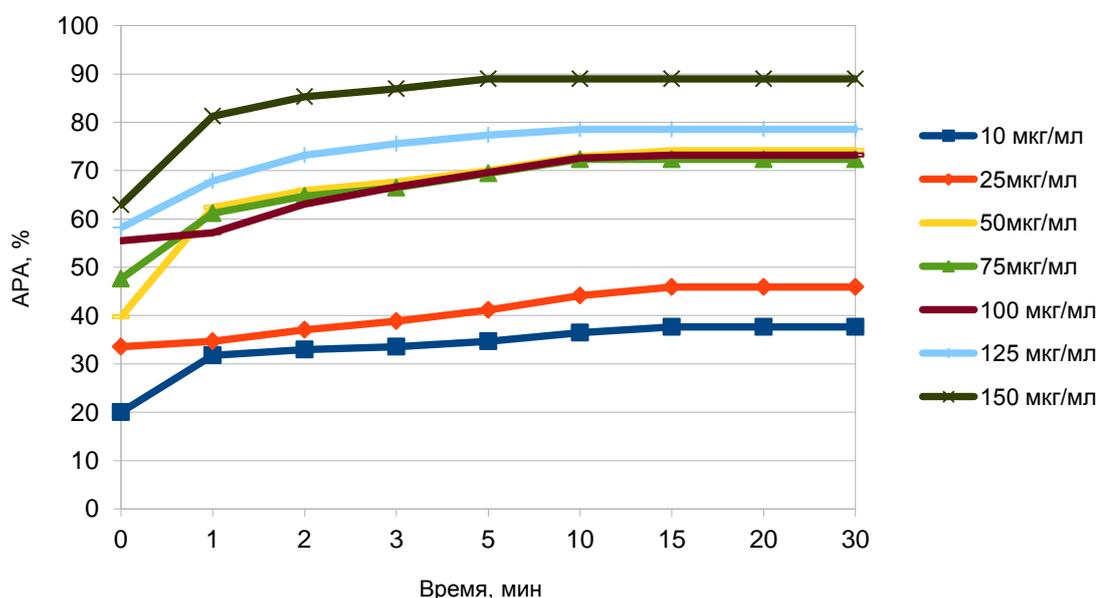


Рисунок 4.3.1 – Кинетическая кривая реакции ДФПГ (АРА, %) с перспективным образцом ГК-2 в концентрациях 10; 25; 50; 75; 100; 125 и 150 мкг/мл

При этом можно отметить, что АРА = 73,21 % образца ГК-2 в концентрации 100 мкг/мл сопоставима с АРА = 95,21 % флавоноида дигидрокверцетина

(100 мкг/мл) [236]. Время реакции ($\tau_{1/2}$), за которое ДФПГ^{*} прореагировал с ГК-2 и дигидрохверцетином на 50 %, составило порядка 2 мин (значения представлены для веществ в концентрации 100 мкг/мл) в сравнении с литературными данными [236].

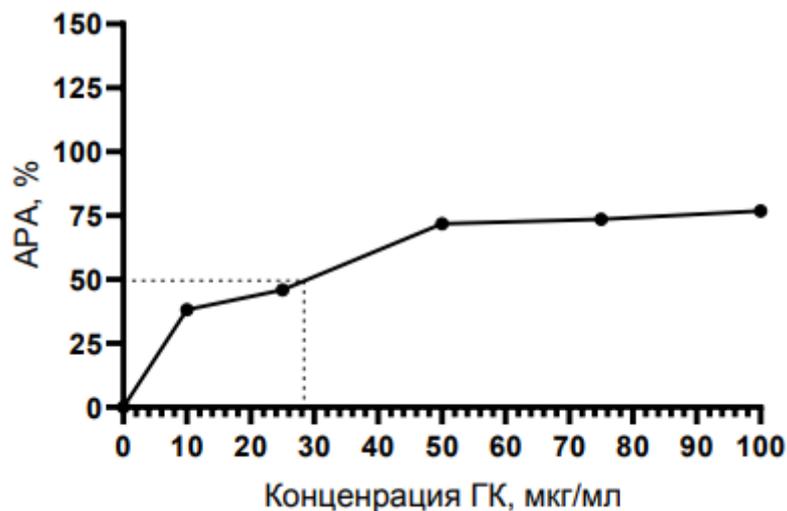
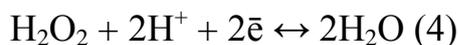
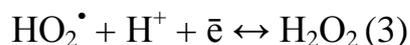
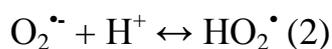


Рисунок 4.3.2 – Уровень ингибирования (IC_{50} , мкг/мл) в реакции перспективного образца ГК-2 с ДФПГ^{*}

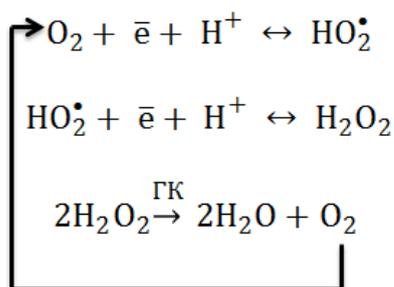
Предполагаемым механизмом АРА ГК-2 может являться их способность выступать в роли доноров протона благодаря наличию большого количества фенольных групп, что ранее уже отмечалось в Главе 3. В литературе [27, 150] также отмечается, что ГК способны переводить радикалы в менее «агрессивные» молекулярные формы за счет наличия в их структуре большого количества фенольных, amino- и меркапто- групп, так как используемый в модельных реакциях радикал ДФПГ^{*} легко вступает во взаимодействие только с веществами, имеющими подвижные водородные атомы, оставаясь при этом устойчивым к действию молекулярного кислорода.

2. Исследование антиоксидантной (каталитической) активности методом катодной вольтамперометрии. Взаимодействие между АО и свободными радикалами протекает по донорно-акцепторному механизму. Антиоксиданты, имея один или несколько непрочных связанных электронов (доноры), отдают его/их свободнорадикальной частице (акцептору), тем самым, нейтрализуя ее либо

переводя в более устойчивое состояние [130]. Поэтому для исследования АОА химических соединений целесообразно применять электрохимические методы, в частности, катодную вольтамперометрию. В основу метода катодной вольтамперометрии положена модельная реакция электровосстановления кислорода (ЭВ O_2), подобная той, которая происходит в биологических системах (в экспериментальных условиях реакции 1-3 протекают на границе раздела фаз - поверхности ртутно-пленочного электрода и рассматриваются как первая волна ЭВ O_2 , в результате которой изменяется величина катодного тока) [43].



На вольтамперограммах наблюдалось усиление катодного тока ЭВ O_2 и сдвиг волны потенциала в область отрицательных значений (при введении образца ГК-2 в фоновый раствор) по сравнению с фоновым раствором, что свидетельствовало о наличии АОА у образца ГК-2. Механизм АО может быть связан с восстановлением гуминовыми кислотами реакционноспособных АФК до воды с последующей дисмутацией молекулы водород пероксида и частичной регенерацией молекулярного кислорода [54, 85]:



Показателем АОА исследуемого образца ГК-2 служит коэффициент каталитической активности – K [мкмоль/л*мин], который характеризует его восстанавливающую способность [172].

Результаты определения каталитической активности образца ГК-2 в процессе ЭВ O_2 представлены в Таблице 4.3.3.

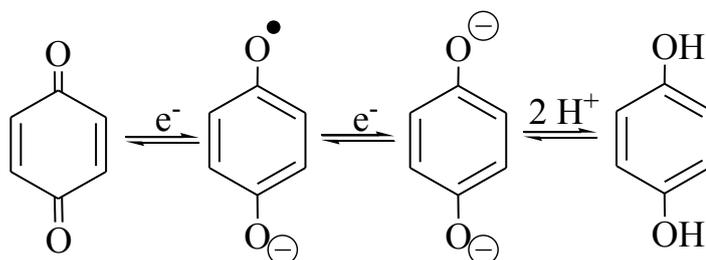
При этом можно отметить, что значение каталитической активности для перспективного образца ГК-2 составило $0,53 \text{ мкмоль/л*мин}$, что сопоставимо со значением природного флавоноида – дигидрокверцетина ($0,78 \text{ мкмоль/л*мин}$) [236].

Таблица 4.3.3 – Антиоксидантная активность перспективного образца гуминовых кислот (ГК-2) по данным катодной вольтамперометрии

Объект исследования	Каталитическая активность, мкмоль/л*мин
Образец ГК-2	$0,53 \pm 0,04$
Дигидрокверцетин (по данным литературы [236])	$0,78 \pm 0,08$

В литературе [54] особенности поведения молекул ГК в процессе ЭВ O_2 связывают с параметрами молекулярной структуры. Так, в некоторых работах [54, 85, 189] отмечается, что карбоксильные и фенольные группы в большей степени создают на поверхности молекул ГК отрицательный заряд. При этом фенольные фрагменты, отдавая протон, превращают радикалы в молекулярный продукт, а сами трансформируются в устойчивый за счет p, π -сопряжения с кольцом феноксильный радикал, не способный принимать участие в продолжение цепной реакции окисления [154, 245].

В ряде научных работ [54, 85, 174, 186, 221] отмечается, что именно хиноидные структуры определяют протекание окислительно-восстановительных реакций и ответственны за смещение равновесия в системе хинон-семихион-гидрохинон. При одноэлектронном восстановлении хиноидные фрагменты образуют свободные радикалы и превращаются в семихионные радикалы, способные превращаться в двухатомные фенолы (гидрохиноны) в кислой среде [85, 221]:



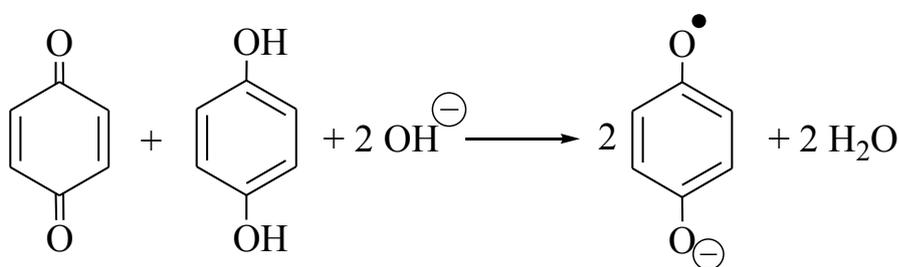
Гидрохиноны уменьшают восстановление кислорода до водород пероксида, затем образовавшийся H_2O_2 реагирует с семихинонами [247]. Окисленные хиноидные и восстановленные гидрохиноидные структуры образуют устойчивые диамагнитные комплексы и переходят в парамагнитное состояние при изменении окислительно-восстановительных условий среды. Они также могут принимать пару электронов и сохранять парамагнетизм, либо переходить в исходное состояние в присутствии кислорода [54]. Поэтому, общая АОА ГК определяется как количеством функциональных групп, так и их электронными и стерическими эффектами [245, 228].

Таким образом, перспективный образец ГК-2 является редокс-активным соединением, способным проявлять каталитическую активность по отношению к процессу электровосстановления кислорода, что также обусловлено высоким содержанием фенольных групп в его молекуле (Глава 3). Возможный механизм АОА ГК-2 может быть связан со способностью хиноидных группировок участвовать в процессе ЭВ O_2 благодаря фенольным фрагментам.

3. Исследование антирадикальной активности методом спектроскопии электронного парамагнитного резонанса. Электронный парамагнитный резонанс (ЭПР) – спектроскопический метод анализа, основанный на поглощении системами с ненулевым электронным спиновым магнитным моментом (парамагнетиками) электромагнитного излучения радиоволнового диапазона. К таким системам относятся атомы и молекулы, содержащие нечетное количество электронов, частицы, имеющие один либо несколько неспаренных электронов (свободные радикалы). Свободными радикалами со сверхтонкой структурой являются органические свободные радикалы, содержащие один единственный неспаренный электрон, т.к. неспаренный электрон способен взаимодействовать с магнитными ядрами в составе радикала с любой спиновой плотностью. Гуминовые кислоты относятся именно к такому типу органических радикалов. При нормальных условиях ГК являются весьма стабильными радикалами, что связано с пространственным экранированием атомов, несущих наибольшую спиновую плотность, и с делокализацией свободного электрона по всей макромолекуле. Об

этом свидетельствует их интенсивная окраска – от темно-коричневого до чёрного цвета [259].

Несмотря на то, что ЭПР-спектроскопия относится к одному из самых высокочувствительных методов анализа, среди ученых нет единого мнения о природе парамагнетизма ГК. Большинство авторов [83, 139, 156] придерживаются взгляда, что в структуре ГК имеются радикалы типа семихинона, катехин-резорциновых сополимеров и радикалов, аналогичных хингидронным. Образование семихиннонного типа органических радикалов обусловлено взаимодействием *para*-хинона и гидрохинона в среде, содержащей избыток гидроксид-ионов, по реакции [139]:



Другие авторы [37, 56] связывают парамагнитные свойства ГК с присутствием неспаренных π -электронов дефектных высокоэнергетических систем полисопряжения (структуры с избыточным запасом потенциальной энергии образуются при формировании твердой фазы, при доминировании эффекта синергического взаимодействия ароматических фрагментов и водородных связей функциональных групп). Авторы статьи [109] обнаружили в ГК, выделенных из бурого угля, содержание ПМЦ различной природы – свободные радикалы арильного, алкоксильного, семихинонного типа, делокализованные π -электроны ароматических конденсированных структур. Также отмечено [101], что в ГК торфяного происхождения, как правило, регистрируемый тип сигнала ЭПР имеет параметры, типичные для синтетических соединений с т.н. «плоскостной» полисопряженной системой (аналогичной полинафталину, полиантрацену, полигидрохинону и др.). Наряду с графитоподобными структурами формируются также замкнутые углеродные системы полисопряжения типа фуллереноподобных структур [101].

Несмотря на столь разрозненные точки зрения на природу парамагнетизма гуминовых кислот, ученые причисляют его к фундаментальному свойству их молекулярной структуры [101, 138].

Форма ЭПР-спектра исследуемого образца ГК-2 низинного древесно-травяного торфа с болота «Таган» (Рисунок 4.3.1) представляет собой относительно симметричный одиночный узкий синглетный сигнал ЭПР шириной (ΔH) 5,0 Гс (0,50 мТл) (Таблица 4.3.4), характерный для систем полисопряжения молекул ГК низинных видов торфа [37, 56, 101, 129, 131, 134, 138], с фактором спектроскопического расщепления (g-фактором) равным $2,0035 \pm 0,0002$. Установленное опытным путем численное значение данной величины является близким к g-фактору свободного электрона (2,0023), в частности, свободного радикала семихинноного типа. Данный факт свидетельствует о существовании в образце ГК-2 сильно делокализованной молекулярной орбитали, что является характерной особенностью ГК различного происхождения (2,0033-2,0040) [76, 138], поскольку молекула ГК построена из т.н. «легких» видов атомов – Н, С, N, О. Отсутствие асимметрии синглета сигнала ЭПР также указывает на отсутствие зольности в образце ГК-2 [139].

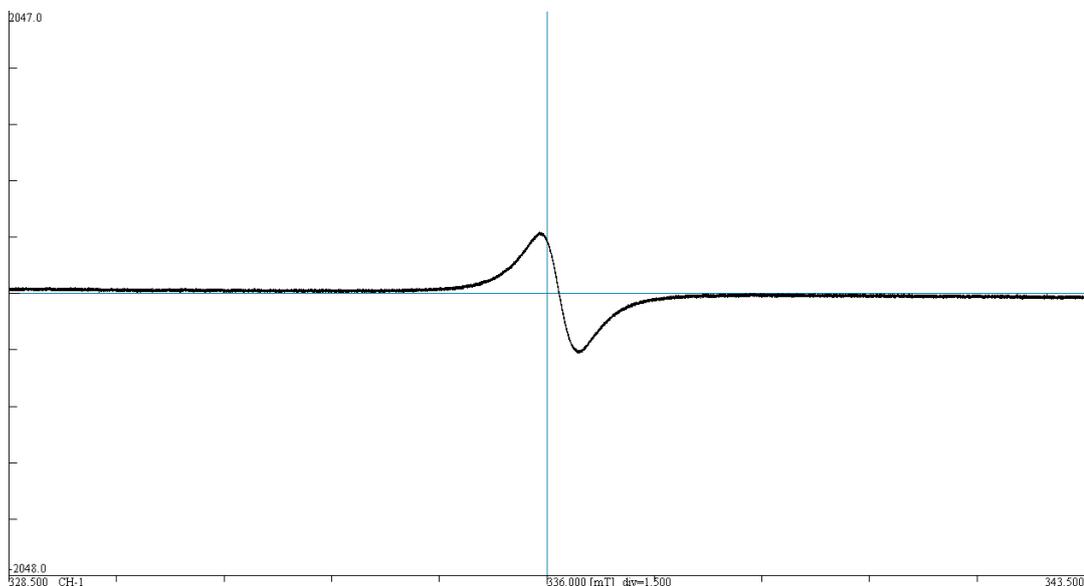


Рисунок 4.3.1 – ЭПР-спектр образца ГК-2 низинного древесно-травяного торфа с болота «Таган»

Количественное определение парамагнитных центров (ПМЦ) методом ЭПР-спектроскопии – один из самых информативных методов характеристики антирадикальной активности (АРА) ГК [76, 156, 259, 276], т.к. позволяет точно фиксировать количество свободных радикалов, содержащихся в молекулярной структуре ГК, являющихся «ловушками» свободных короткоживущих и стабильных радикалов [76, 259, 276].

Концентрация ПМЦ (Таблица 4.3.4), определяемая интенсивностью сигнала, для исследуемого образца ГК-2 равна $5,81 \cdot 10^{16}$ спин/грамм, что соответствует средним значениям ПМЦ для ГК, выделяемых из торфа раствором натрий гидроксида ($4-10 \cdot 10^{16}$ спин/грамм) [236].

Таблица 4.3.4 – Параметры парамагнетизма образца гуминовых кислот (ГК-2) низинного древесно-травяного вида торфа с болота «Таган»

Объект исследования	Параметры ЭПР-спектроскопии	
	¹ ΔН, мТл	² ПМЦ (x 10 ¹⁶ спин/г)
Образец ГК-2	0,50	5,81
ГК торфа (средние значения по данным литературы) [225]	0,4-0,54	4-10
Примечания 1 ΔН, мТл - ширина синглетной линии 2 ПМЦ (x10 ¹⁶ спин/г) - концентрация парамагнитных центров		

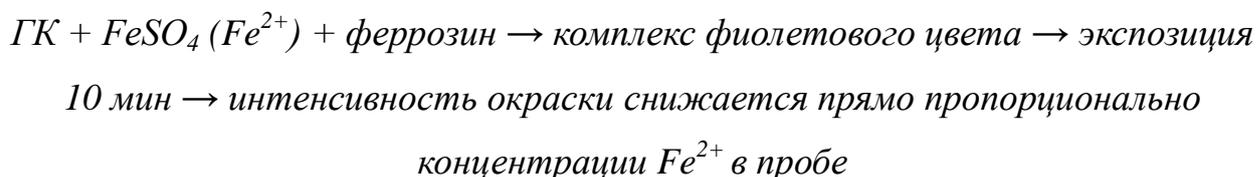
Таким образом, методом спектроскопии ЭПР для исследуемого образца ГК-2 низинного древесно-травяного вида торфа с болота «Таган», установлена высокая антирадикальная активность (АРА). Возможным механизмом АРА может являться способность ГК выступать в роли «ловушек» радикалов, судя по идентичности фактора спектроскопического расщепления ГК-2 и g-фактора свободного радикала семихинонного типа.

4. Исследование железосвязывающей активности колориметрическим методом с феррозином. Железо, безусловно, относится к важным микроэлементам в биологических системах, поскольку входит в состав гемоглобина, миоглобина, цитохромов и других ферментов. Уникальными свойствами ионов железа является способность изменять свою степень окисления и, как следствие, влиять на

протекание окислительно-восстановительных реакций, выступать лигандом в различных клеточных процессах. Клетки поддерживают концентрацию свободного железа до минимально необходимого уровня, предотвращая тем самым реализацию им токсических эффектов. Но при некоторых паталогиях баланс железа *in vivo* нарушается. Это приводит к функциональной перегрузке клеток данным микроэлементом и, как следствие, развитию окислительного стресса, иницирующего ПОЛ, денатурацию белков. Самостоятельно организм не способен эффективно утилизировать избыток ионной формы железа, поэтому, способность лекарственных средств или биологически активных субстанций связывать его чрезмерное количество, является их важным свойством [252].

Избыток железа депонируется в виде Fe^{3+} в составе ферритина, и, если депо железа в организме не будет эффективно сокращаться, его повышенная концентрация сохраняется в течение длительного периода, поэтому эффективность хелатирующих препаратов определяется, в частности, процессом высвобождения восстановленного железа из ферритина. Ввиду чего, одним из наиболее информативных и высокочувствительных тестов для исследования хелатирующей способности лекарственных средств и БАВ, является тест с феррозином [252].

Феррозин образует комплекс фиолетового цвета с ионом Fe^{2+} , комплексообразование прерывается в присутствии хелатирующего агента, в данном случае ГК, в результате чего фиолетовая окраска комплекса уменьшается. Суть протекающей реакции можно описать следующим образом:



Результаты исследования (Таблица 4.3.5 и Рисунок 4.3.2.) в сравнении с положительным контролем (этилендиаминтетрауксусной кислотой (ЭДТА)) показали, что образец ГК-2 способен ингибировать образование комплекса феррозин- Fe^{2+} на уровне, сопоставимом с эталоном сравнения (ЭДТА). Это доказывает у него наличие хелатирующих свойств в широком диапазоне доз.

Таблица 4.3.5 – Железосвязывающая активность образца гуминовых кислот (ГК-2) низинного древесно-травяного вида торфа с болота «Таган», по данным колориметрии с феррозином

Объект исследования	Ингибирующая активность (Ing, %) в концентрациях (мкг/мл)						IC ₅₀
	12,5	25	50	75	100	150	
Образец ГК-2	7,33±0,8	22,87±0,63	39,00±1,78	55,60±0,30	60,83±0,52	66,98±0,70	66,0
Препарат сравнения – ЭДТА	29,06±0,37	54,87±0,22	99,77±0,22	100	100	100	22,5

Примечание
IC₅₀ - концентрация вещества при которой достигается уровень ингибирования в 50 % (мкг/мл)

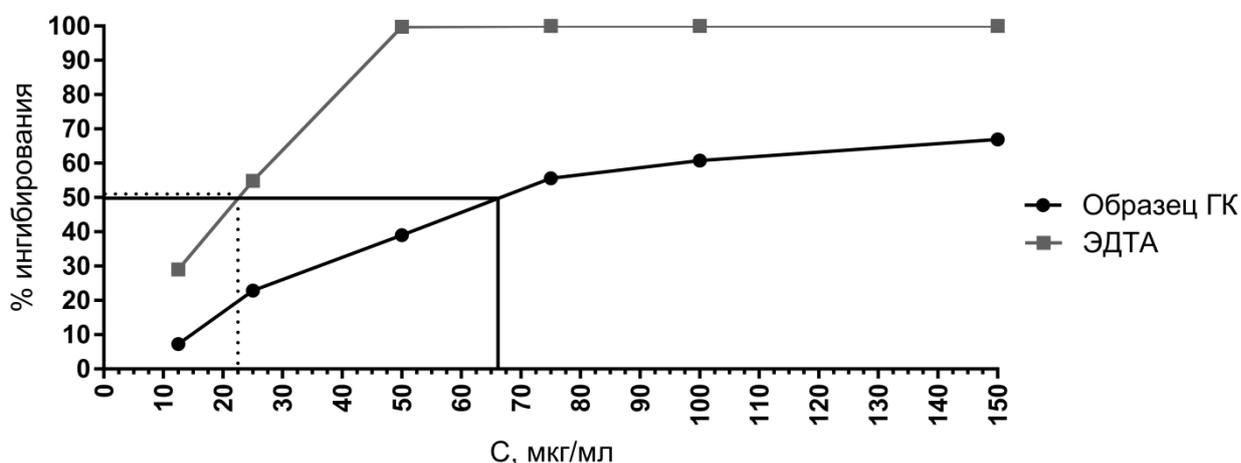


Рисунок 4.3.2 – Кинетические кривые реакции ингибирования гуминовыми кислотами (ГК-2) образования комплекса феррозин-Fe²⁺

Таким образом, исследование АОА образца ГК-2 из низинного древесно-травяного вида торфа с помощью четырех физико-химических методов анализа (катодной вольтамперометрии, ЭПР-спектроскопии, колориметрии с ДФПГ и феррозином) позволило выявить у него высокие АО свойства. В основу одного из механизмов антиоксидантного действия образца ГК-2 по данным вольтамперометрического анализа может быть положена способность хиноидных и фенольных фрагментов участвовать в процессе восстановления молекулярного кислорода. Данные колориметрии со стабильным радикалом ДФПГ связывают АРА

ГК со способностью выступать их в качестве донора протонов (за счет легко диссоциирующих фенольных групп), феррозин-тест показал наличие хелатирующих свойств относительно ионов Fe^{2+} . По данным ЭПР-спектроскопии к предполагаемому механизму АРА ГК относится их способность выполнять роль своеобразных «ловушек» радикальных частиц, т.к. характеристика параметров спектра ЭПР (величина g-фактора, интенсивность сигнала, ширина синглетной линии) подобна свободному радикалу семихинонного типа.

4.4 ИССЛЕДОВАНИЕ АКТОПРОТЕКТОРНОЙ АКТИВНОСТИ ПЕРСПЕКТИВНОГО ОБЪЕКТА ГУМИНОВЫХ КИСЛОТ

По свидетельству многих эпидемиологических и клинических исследований краеугольная причина развития широкого круга заболеваний неинфекционной природы кроется в интенсивной и длительной стресс-реакции, вызванной воздействием различных по своей природе факторов окружающей среды. По определению основоположника биологической концепции стресса канадского патолога Г. Селье: «Стресс есть неспецифический ответ организма на любое изменение условий, требующее приспособления» [72]. То есть, воздействие механических, физических, химических, биологических и социальных стрессоров приводит к аналогичным сдвигам в гомеостазе. Неотъемлемый атрибут стрессорного воздействия – это гуморально-гормональные изменения в симпатoadреналовой и гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системах (т.н. «триада Селье»), проявляющиеся, во-первых, гипертрофией коркового слоя надпочечников и инволюцией тимико-лимфатического аппарата. Во-вторых, появлением геморрагических изъязвлений в слизистой ЖКТ и, в-третьих, нарушением всех видов обмена веществ, изменением количества клеточных компонентов периферической крови (вплоть до развития нейтрофильного лейкоцитоза, лимфоцитопении и эозинофилии) [72, 89].

Реакция организма на стресс складывается из трех последовательных стадий: ранней (или реакции тревоги, продолжающейся от 6 до 48 ч), стадии резистентности (наступает через 48 ч после действия стрессора) и стадии истощения. Любая стадия стресса провоцирует цепные реакции, вектор направленности которых берет начало в коре головного мозга и завершается субклеточными и молекулярными образованиями исполнительных органов.

Две первые стадии стресса характеризуются усиленной доставкой и доступностью энергетических субстратов, кислорода тканям головного мозга, миокарда, скелетным мышцам; гиперсекрецией пучковой зоной и мозговым слоем надпочечников кортизола, кортизона, адреналина и норадреналина. Данные морфологические изменения направлены на мобилизацию защитных сил, выравнивание нарушенного баланса внутренней среды. В результате повышается способность организма противостоять другим раздражителям (стресс в данном случае называется эустресс). Но при длительном и интенсивном воздействии раздражителей, превышающих функциональные возможности нейро-эндокринной системы, стресс переходит в третью завершающуюся стадию истощения и называется дистресс. Дистресс на клеточном уровне сопровождается интенсификацией процессов ПОЛ по причине аномально высоких концентраций катехоламинов, структурно-функциональной модификацией клеточных и субклеточных мембран, вследствие чего наблюдается ферментемия, нарушение процесса энергообеспечения ввиду порообразования в митохондриальной мембране [72, 89].

Патогенетическую цепь многих заболеваний, в том числе и сердечно-сосудистой системы, инициирует такая стресс-реакция, как гипоксия (гемическая, гистотоксическая, циркуляторная и др.). Гипоксические состояния организма сопровождаются резким снижением физической активности и, как следствие, качества жизни. Для повышения устойчивости к физическим нагрузкам в клинической практике широкое применение нашли препараты, относящиеся к группе адаптогенов (актопротекторов) [89].

Поэтому следующий этап комплексного исследования образца ГК-2 заключался в оценке его возможного влияния на мобилизацию трофотропных и эрготропных реакций у лабораторных животных. С целью оценки влияния образца ГК-2 на физическую работоспособность и выносливость использовали тест принудительного плавания с металлическим грузом до полного утомления [117]. Исследование было проведено на 40 аутбредных крысах-самцах, разделенных на 4 группы по 10 особей в каждой: 1 группа – интактная (воздействиям в виде плавания и введения препарата не подвергалась); 2 группа – контрольная группа № 1 (подверглась только плаванию); 3 группа – контрольная группа № 2 (подверглась плаванию и внутрижелудочному введению физиологического раствора) и 4 группа – опытная группа (подверглась плаванию и внутрижелудочному введению раствора ГК-2).

Результаты исследования показали, что применение раствора ГК-2 и предъявление крысам нагрузки (плавательный тест) на протяжении пяти дней эксперимента способствовало повышению их работоспособности (Таблица 4.4.1).

Определение степени изменения выносливости, рассчитанное по формуле Буза (Глава 2), показало ее повышение на 24-39 % к последнему дню тестирования. У животных контрольной группы № 2, получавших внутрижелудочно физиологический раствор, работоспособность уже в первый день эксперимента была более чем в 1,5 раза выше, чем в этот же день у крыс контрольной группы № 1. В последующие дни эксперимента исследуемый показатель (работоспособность) оставался стабильным, что подтверждает концепцию Ф.З. Меерсона о формировании перекрестной адаптации. То есть, возникновение устойчивости к воздействию одного стресс-фактора (в данном случае для контрольной группы № 1 и контрольной группы № 2 общим стрессором была физическая нагрузка) приводит к повышению резистентности к другому фактору (для контрольной группы № 2 – это введение физиологического раствора). В опытной группе от первого до третьего дня эксперимента наблюдалось увеличение времени плавания на 31 с (данный показатель выше по сравнению с контрольной группой № 1 приблизительно в 2 раза), а на 4 и 5 день эксперимента

работоспособность стабилизировалась и время плавания составило 97 с (по сравнению с контрольной группой № 1 выше на 106 %).

В конце эксперимента крысы были выведены одномоментным декапитированием. У умерщвлённых CO₂-наркозом животных собирали кровь для получения сыворотки, в которой определяли уровень лактата (Таблица 4.4.2).

Таблица 4.4.1 – Влияние образца гуминовых кислот (ГК-2) низинного древесно-травяного вида торфа с болота «Таган», на динамику работоспособности крыс в плавательном тесте

Группа животных	Интактная (n = 10)	Контрольная группа № 1 (n = 10)	Контрольная группа № 2 (n = 10)	Опытная группа (n = 10)
Дни плавания	Продолжительность плавания (с), ¹ Me (² Q ₁ ; ³ Q ₃)			
1	Не плавали	38 (34;49)	64 (55;84) p=0,038	70 (57;95) p=0,005
2		46 (45;57) ⁴ p ₀ =0,01	61 (80;68)	76 (57;195) p=0,005
3		53 (44;67) ⁴ p ₀ =0,007	65 (62;76)	101 (66;114) ⁴ p ₀ =0,02, p ₁ =0,05
4		52 (37;58) ⁴ p ₀ =0,007	69 (57;87)	97 (77;133) ⁴ p ₀ =0,007, p ₁ =0,05
5		47 (40;68) ⁴ p ₀ =0,04	63 (41;71)	97 (61;113) ⁴ p ₀ =0,03, ⁵ p ₁ =0,04
Примечания 1 Me – медиана; 2 Q ₁ – квартиль, 25 % 3 Q ₃ – квартиль, 75 % 4 p ₀ – уровень статистической значимости к первому предъявлению плавательного теста внутри соответствующей группы 5 p ₁ – уровень статистической значимости к соответствующей контрольной группы				

В качестве непосредственного источника энергии для осуществления процессов жизнедеятельности выступают молекулы АТФ. Химическая энергия, выделившаяся в результате гидролиза макроэргических связей, преобразуется в механическую работу сокращения мышечных волокон. Запасы внутриклеточного АТФ незначительны и могут быть полностью исчерпаны за 4 одиночных сокращения максимальной силы. Последующие сократительные акты осуществляются благодаря быстрому ресинтезу АТФ. В зависимости от того, какой

процесс выступает «донором» энергии для новообразования АТФ, выделяют 2 основных пути его синтеза - анаэробный (креатинфосфокиназный, лактатный (или гликолитический), миокиназный) и аэробный. Преобладание того или иного пути ресинтеза АТФ зависит от интенсивности и длительности выполняемой работы. Гликолитический механизм имеет максимальную мощность (наибольшая скорость образования АТФ), поэтому обеспечивает мышцы энергией в первые секунды работы, но незначительную метаболическую емкость (количество синтезируемого АТФ не превышает 2-3 молекул, запасы субстратов (гликогена и глюкозы) незначительные), поэтому работа, обеспечиваемая лактатным путем, непродолжительна. Тем не менее, гликолиз играет первостепенную роль при интенсивных мышечных сокращениях в условиях неадекватно низкой оксигенации [9].

Гликолитический путь ресинтеза АТФ сопровождается накоплением лактата в клетке, увеличением градиента концентрации, что облегчает его диффузию из внутриклеточного пространства в кровь. Подвергаясь диссоциации в водной среде (плазме), а также, вступая в кислотно-основное взаимодействие с бикарбонатной буферной системой крови, наблюдается сдвиг рН в область более низких значений (за счет уменьшения концентрации гидрокарбонат-ионов и увеличения уровня «нереспираторного» CO_2). При истощении щелочных резервов концентрация молочной кислоты достигает своего критического уровня (т.н. «лактатный порог») и развивается гиперлактацидимия (лактоацидоз). В зависимости от причин, вызвавших развитие данного патологического состояния, выделяют 2 типа лактоацидоза. Тип А инициируется вследствие нарушений поступления и утилизации кислорода клетками и диагностируется при заболеваниях респираторной системы, патологий сердца и сосудов (сердечной недостаточности, острой левожелудочковой недостаточности, синдроме Рейно), инсулиннезависимом СД 1 типа, анемиях. Основным этиологическим фактором, провоцирующим развитие лактоацидоза типа Б, является нарушение утилизации лактата, что имеет место быть при эпилепсии, судорожном синдроме, воздействии цианидов, салицилатов, метилового и этилового спиртов, приеме бигуанидинов.

Известно, что наибольшее количество лактата образуется в эритроцитах, клетках головного мозга, мышечных волокнах [9]. Опасность повышения уровня лактата в этих органах, а впоследствии системного ацидоза, кроется в усиленном катаболизме пуриновых мононуклеотидов до солей мочевой кислоты (уратов). Повышение содержания уратов, в свою очередь, активирует ксантиноксидазу – одного из поставщиков АФК (супероксидных радикалов и водорода пероксида), инициирующих окисление ненасыщенных остатков ВЖК в составе фосфолипидов мембранных органоидов.

Применение образца ГК-2 до начала физических нагрузок (плавание с грузом, составляющем 10 % от массы тела - модель анаэробной нагрузки) приводило к поддержанию уровня лактата в крови (Таблица 4.4.2) на уровне референтных значений (значение концентрации молочной кислоты близки к значениям интактной группы – 3,5 и 3,7 ммоль/л, соответственно).

Таблица 4.4.2 – Влияние образца гуминовых кислот (ГК-2) низинного древесно-травяного вида торфа с болота «Таган», на уровень лактата в сыворотке крови

Группа животных	Интактная (n = 10)	Контрольная группа № 1 (n = 10)	Контрольная группа № 2 (n = 10)	Опытная группа (n = 10)
Уровень лактата (ммоль/л) ¹ Me (² Q ₁ ; ³ Q ₃)	3,7 (2,4;4,1)	4,5 (4,4;5,1) P _и =0,02	3,1 (2,8;3,7) P _{к1} =0,007	3,5 (3,3;3,8) P _{к1} =0,004
Примечания 1 Me – медиана; 2 Q ₁ – квартиль, 25 % 3 Q ₃ – квартиль, 75 % 4 P _и – уровень статистической значимости по отношению к интактной группе 5 P _{к1} – уровень статистической значимости по отношению к контрольной группе № 1				

Известно, что при физических нагрузках происходит активация симпатической нервной системы с повышением в крови уровня катехоламинов, интенсификации их синтеза в хромафинных клетках коры надпочечников. Взаимодействие эпинефрина и норэпинефрина с α_1 -адренорецепторами сосудов активирует аденилатциклазную систему передачи внутриклеточного сигнала. В

итоге наблюдается констрикция сосудов, затруднение доставки кислорода и питательных веществ клеткам, изменение обмена веществ - ориентация образования макроэргов по анаэробному пути, развитие метаболического ацидоза [9]. Как было установлено, ГК были способны повышать синтез основного вазодилататора – NO, что привело к снижению повышенного тонуса сосудов, увеличило доставку кислорода клеткам, привело к переключению выработки АТФ по энергетически выгодному аэробному пути.

Таким образом, в эксперименте *in vivo* продемонстрировано, что хроническое пятидневное введение образца ГК-2, выделенного из низинного древесно-травяного вида торфа с болота «Таган» Томской области и предъявление животным плавательного теста до состояния полного утомления, сопровождалось повышением их работоспособности и резистентности к физической нагрузке, не изменяло содержание лактата в сыворотке крови. Исходя из чего, данный образец ГК торфа (ГК-2) может быть рекомендован как эффективное кардиопротекторное средство сопутствующее этиотропной терапии ишемической болезни сердца для повышения физической работоспособности и выносливости человека, а также для использования у лиц, специализирующихся в различных видах спорта или занятых тяжелым физическим трудом, в том числе в экстремальных условиях.

ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 4

1. Перфузия изолированных крысиных сердец по методу Лангендорфа образцом гуминовых кислот (ГК-2), выделенным из низинного древесно-травяного вида торфа с болота «Таган», позволило выявить у него прямые кардиоваскулярные эффекты. В условиях нормоксии перфузия сердец данным веществом привела к изменению таких показателей работы миокарда, как: коронарный проток, ДРЛЖ, КДД и ЧСС. Образец ГК-2 увеличил коронарный проток, оказал отрицательный хронотропный и инотропный эффекты (снизились ЧСС и ДРЛЖ, соответственно).

2. Превентивное применение образца ГК-2 перед моделированием тотальной ишемии способствовало восстановлению инотропной функции сердечной мышцы и ослаблению постишемической контрактуры (снизился показатель КДД). Очевидно, это связано с цитопротективной активностью образца ГК-2, что можно объяснить снижением уровня фермента креатинфосфокиназы в перфузате.

3. Цитопротекторное действие образца ГК-2 является следствием его высоких антиоксидантных свойств, доказанных с помощью четырех физико-химических методов анализа (катодной вольтамперометрии, ЭПР-спектроскопии, колориметрии с ДФПГ и феррозином). По данным вольтамперометрии АОА образца ГК-2 может быть ассоциирована участием хиноидных и фенольных фрагментов структуры в процессе восстановления молекулы триплетного кислорода. Методом колориметрии с ДФПГ доказана АРА исследуемого образца ГК-2 за счет восстановительных свойств фенольных групп, а в тесте с феррозином доказана железосвязывающая активность. По данным ЭПР-спектроскопии предполагаемым механизмом АРА ГК является их способность выполнять роль «ловушек» радикальных частиц, на основании сходства ЭПР-параметров образца ГК-2 и свободного радикала семихинонного типа.

4. Кардиопротекторное действие образца ГК-2 также может быть следствием влияния на NO-сигнальный путь передачи сигнала, вследствие чего улучшается коронарный проток, снижается ЧСС, КДД и ДРЛЖ, поскольку в эксперименте с применением неселективного ингибитора активности фермента NOS L-NAME кардиопротекция образца ГК-2 исчезала.

5. Образец ГК-2, введенный перед предъявлением грызунам физической нагрузки (в виде плавательного теста), пролонгировал момент наступления утомления, не вызывал повышение уровня лактата в крови, что свидетельствует о его актопротекторной активности.

6. В исследованиях *in vitro* и *in vivo* доказано, что образец ГК-2 (выделенный из низинного древесно-травяного вида торфа с болота «Таган») представляет собой перспективное биологически активное вещество для разработки растительных лекарственных средств, способных оказывать кардиопротекторное,

антиоксидантное и актопротекторное действие для целей вспомогательной терапии ишемической болезни сердца, для повышения физической работоспособности и выносливости человека, а также для использования у лиц, специализирующихся в различных видах спорта или занятых тяжелым физическим трудом, в том числе в экстремальных условиях. Полученные результаты послужили основанием для разработки нормативной документации для образца ГК-2 и его сырьевого источника - низинного древесно-травяного вида торфа.

ГЛАВА 5 РАЗРАБОТКА ПОДХОДОВ К СТАНДАРТИЗАЦИИ ГУМИНОВЫХ КИСЛОТ (БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНОГО ВЕЩЕСТВА ГУМИНОВОЙ ПРИРОДЫ) И ИХ СЫРЬЕВОГО ИСТОЧНИКА (ТОРФА)

В соответствии с результатами Главы 3, наиболее перспективным в отношении исследования фармакологической активности, является образец ГК-2, выделенный из низинного древесно-травяного вида торфа болота «Таган» Томской области. Высокая биологическая активность образца ГК-2 также была доказана в экспериментах *in vitro* и *in vivo* (Глава 4). Таким образом, образец ГК-2 является перспективным БАВ для разработки лекарственных средств растительного происхождения, способных оказывать кардиопротекторное, антиоксидантное и актопротекторное действия при сердечно-сосудистых заболеваниях, состояниях, сопровождающихся снижением общей работоспособности и физической выносливости. Результаты целого комплекса проведенных физико-химических исследований, фармакогностического анализа, а также данные по биологической активности легли в основу двух проектов нормативной документации (на низинный древесно-травяной вид торфа и выделенных из него ГК-2).

В литературе [34, 155] ранее уже были предприняты попытки разработки критериев подлинности и качества ГК на примере низинного древесно-травяного торфа месторождения «Клюквенное» Томской области, которые также были предложены как универсальные для любых ГК низинных древесно-травяных видов торфа. Главным недостатком разработанных критериев [34, 155] является отсутствие подробного описания прободготовки. Наличие строгого протокола выделения ГК из сырьевого источника является самым важным условием при разработке подходов к контролю качества ГК. В работе М.В. Зыковой [51] на большом объеме экспериментального материала методами математической статистики было доказано, что способ выделения ГК из торфа оказывает более значительное влияние на различные физико-химические параметры молекулярной структуры, чем происхождение торфа (его тип, вид, ботанический состав и фармакогностические

параметры). В связи с чем, в данной главе предполагается разработка актуализированных согласно современным требованиям и новым знаниям о структуре и свойствах ГК, критериев контроля качества ГК низинного древесно-травяного вида торфа (на примере торфа с болота «Таган» Томской области).

5.1 РАЗРАБОТКА ПРОЕКТА НОРМАТИВНОЙ ДОКУМЕНТАЦИИ ДЛЯ СЫРЬЕВОГО ИСТОЧНИКА (ТОРФА)

Торф не относится ни к одной из морфологических групп официального лекарственного растительного сырья, включенного в ГФ XIV, но служит основным источником такой группы ценных биологически активных веществ, как гуминовые кислоты (ГК).

Низинный древесно-травяной торф является источником ГК, обладающих высокой кардиотропной, антиоксидантной и актопротекторной активностью. Для изготовления препаратов на его основе необходимо осуществлять процедуры входного контроля, т.е. регламентировать показатели подлинности и качества. К таким показателям относятся: ботанический состав, степень разложения растительных остатков растений-торфообразователей, общая зола, а также зола, не растворимая в хлороводородной кислоте, микробиологическая чистота, уровень радионуклеотидов, тяжелых металлов и мышьяка, содержание ГК, извлекаемых раствором натрия гидроксида. На основании вышеописанных показателей был предложен проект нормативной документации «Торф низинный древесно-травяной» в соответствии с требованиями, предъявляемыми ГФ XIV издания (Приложение 1).

Заготовка и сушка торфа. Заготовку торфа производят в период с июня по сентябрь на торфяных месторождениях из середины однородного горизонта из скважины глубиной 50-100 см. Сушку заготовленного сырья производят воздушно-тенивым способом.

Описание. Цельное сырье. Измененные в результате частичной деструкции остатки растений-торфообразователей (сосудистых, моховидных), характеризующиеся устойчивым прелым запахом, образующие неоднородную массу тёмно-серо-коричневого цвета. При отжиме свежезаготовленного сырья наблюдается выделение темной мутной жидкости и потеря упругости. При растирании сырья оно заметно пачкает пальцы. При визуальном осмотре заметны тонкие удлиненные корешки, кусочки древесины, коры. Фрагменты стеблей древесных растений-торфообразователей (длина < 2 см, толщина < 6 мм) цилиндрические, неровные на изломе, покрыты шероховатой коркой. При внимательном рассмотрении под лупой различимы остатки мхов.

Измельченное сырье. Аморфная масса коричневого цвета, имеющая запах прелой растительности, проходящая сквозь сито с размером пор 7 мм. Рассмотрение измельченного сырья под лупой (10^{\times}) или стереомикроскопом (16^{\times}) позволяет увидеть остатки листьев (желтого / бурого цвета) и обрывки стеблей, длина которых не превышает 0,5 см.

Микроскопия. Во влажном сырье при помощи «ключа» по ГОСТ 28245-89 [33] определяют остатки неразложившихся растений.

Видовую принадлежность растительных остатков торфа устанавливают по специализированному атласу растительных остатков в торфах [73].

Среднюю пробу образца помещают на сито (диаметр пор не более 0,10-0,25 мм) и промывают водой до тех пор, пока сбегаящая жидкость под ситом не станет полностью прозрачной. Далее промытое таким образом волокно небольшими порциями при помощи пинцета размещают тонким равномерным слоем на предметном стекле. Количество параллельных измерений не менее 5.

Если растительное волокно торфа имеет бурую окраску, то его предварительно обесцвечивают 5 % раствором H_2SO_4 , при исследовании сфагновых мхов часть промытой пробы предварительно окрашивают раствором метилового синего, при исследовании древесных и травянистых остатков – растительное волокно дополнительно просветляют 10 % раствором NaOH. Определение видовой принадлежности растительных остатков, обнаруженных в поле зрения микроскопа,

осуществляют при увеличении 200-400^x. Визуально осуществляют определение процентного содержания в образце торфа остатков растений. Если содержание растительных остатков не превышает 5 %, то их отмечают как единичные и обозначают как «+». Доля не установленных остатков растений не должна составлять 10 % и более.

Тип торфа. Низинный тип: наибольший процент растительных остатков представлен растениями низинных болот, растительные остатки верховых болот составляют не более 5 %.

Вид торфа. Древесно-травяной вид: наибольший процент растительных остатков волокна торфа составляют остатки осоки (50 %), вахты (15 %) и древесины кустарничков вересковых (30 %), характерна небольшая примесь хвоща (5 %) и других травянистых растений (порядка 5 %).

Ботанический состав:

1. *Carex lasiocarpa* Ehrh. – 50 % (Рисунок 5.1.1). В давленном препарате видны прозенхимные, тонкостенные, плотно прилегающие друг к другу клетки. Заметны одноклеточные волоски конусовидной формы. В проводящем пучке видны сосуды ксилемы.

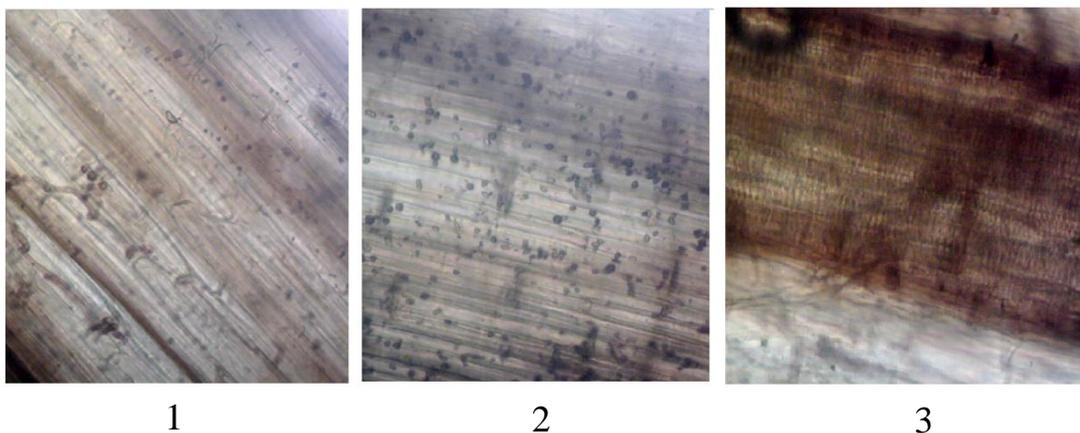


Рисунок 5.1.1 – Микроскопия корешков *Carex lasiocarpa* Ehrh.: 1 – прямоугольные тонкостенные клетки (200^x), 2 – фрагмент покровной ткани с конусовидными волосками (200^x), 3 – сосуды ксилемы (200^x)

2. *Menyanthes trifoliata* L. – 15 % (Рисунок 5.1.2). В давленном препарате заметны прозенхимные толстостенные неправильной формы с закругленными краями клетки покровной ткани (перидермы). Клетки по краю формируют полу волнистую линию.

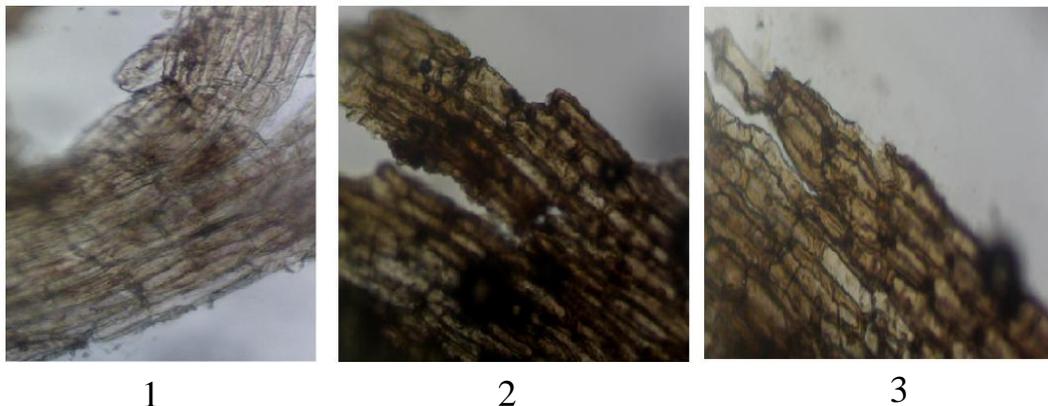


Рисунок 5.1.2 – Микроскопия *Menyanthes trifoliata* L.: 1 – клетки фрагмента корневища (200^x), 2 – фрагмент корневища (200^x), 3 – фрагмент перидермы (200^x)

3. Кустарнички – 30 % (Рисунок 5.1.3). Корневища и побеги кустарничков, главным образом, представлены семейством водяниковые (*Empetraceae*) и вересковые (*Ericaceae*): клюква болотная, багульник болотный, водяника черная. На давленном препарате видна пробковая часть, состоящая, в основном, из удлиненных четырехгранных толстостенных клеток, расположенных рядами.

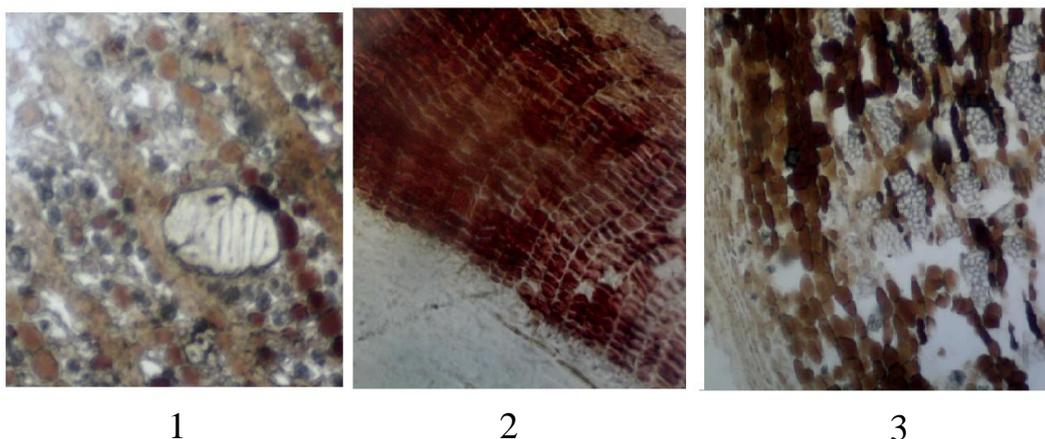


Рисунок 5.1.3 – Микроскопия покровной ткани кустарничков (400^x, 200^x, 200^x)

4. *Equisetum* sp. – 5 % (Рисунок 5.1.4). Корневища хвощей выступают основой формирования торфа. В давленном препарате видны: многослойная перидерма,

клетки которой плотно прилегают друг к другу, клетки механической ткани утолщены по углам (уголковая колленхима), паренхимные клетки округлые. Проводящие пучки закрытого типа, располагаются в центральном цилиндре, отделенном от коры слоем эндодермы. Сосуды ксилемы имеют малый диаметр, располагаются одиночно. В пучках паренхима практически отсутствует.

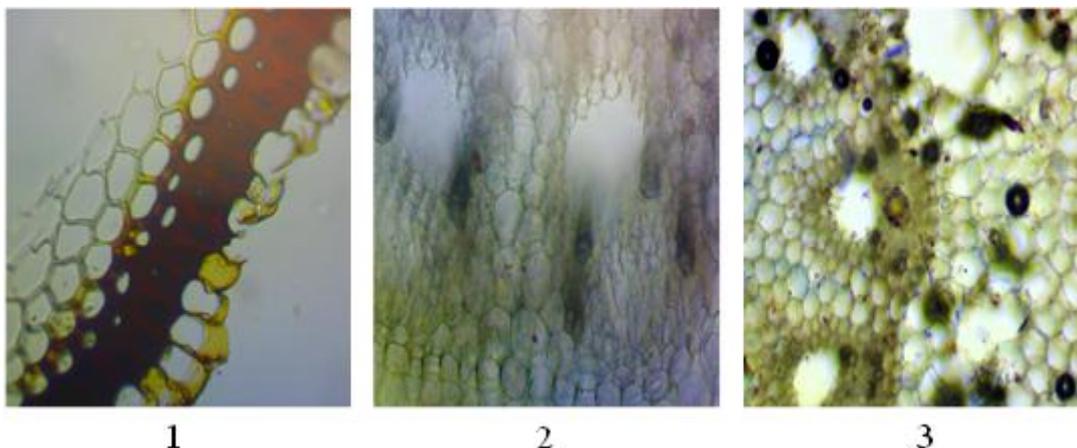


Рисунок 5.1.4 – Микроскопия *Equisetum sp.*: 1 – строение коровой части корневища (200^x), 2 – строение проводящего пучка (200^x), 3 – строение центрального цилиндра (200^x)

5. *Нурпасае* (*Bryum*, *Meesia*) – менее 5 % (Рисунок 5.1.5). На давленном препарате видны очень крупные угловатые водоносные (гиалиновые) клетки, выпуклые с обеих сторон. В их клеточной стенке заметны двойные или тройные поры. Хлорофиллоносные клетки в очертании эллиптические, окруженные со всех сторон водоносными клетками.

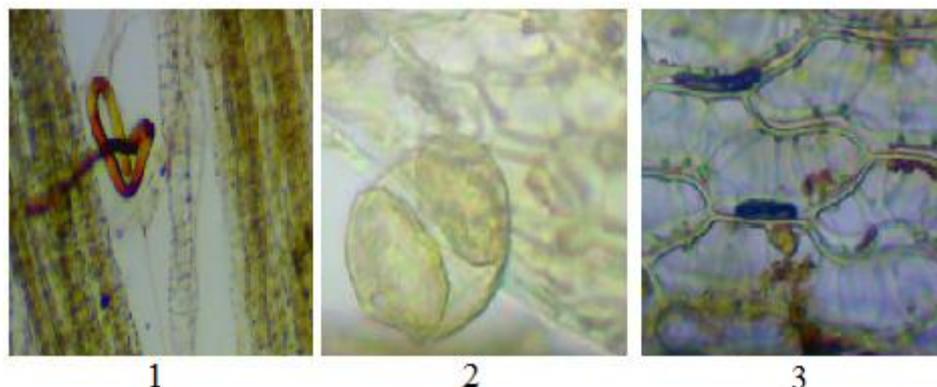


Рисунок 5.1.5 – Микроскопия *Нурпасае* (*Bryum*, *Meesia*): 1 – ризоиды (200^x), 2 – спора (400^x), 3 – гиалиновые клетки (200^x)

6. *Polypodiophyta* – менее 5 % (Рисунок 5.1.6). На давленном препарате видна основная ткань, состоящая из клеток изодиаметрической формы, между которыми имеются небольшие межклеточные пространства. В межклетниках встречаются одноклеточные шаровидные железистые образования с желтовато-зеленым клеточным содержимым (клетки Шахта).

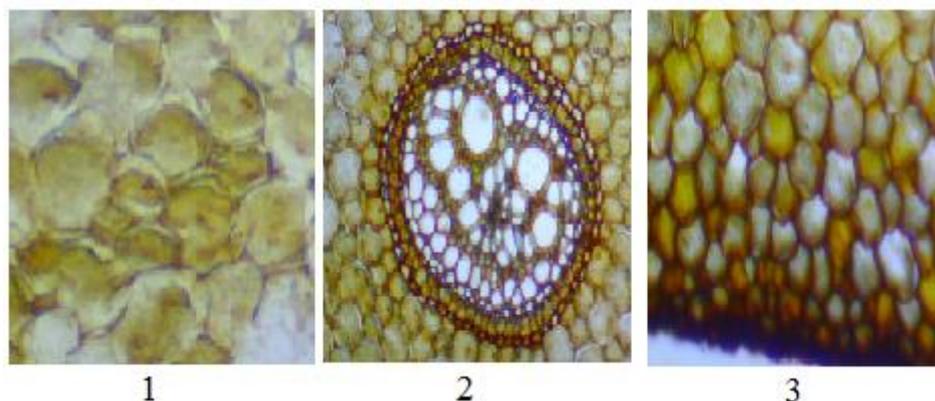


Рисунок 5.1.6 – Микроскопия *Polypodiophyta*: 1 – клетки паренхимы (400^x), 2 – центроксилемный проводящий пучок (100^x), 3 – клетки покровной ткани (200^x)

Проводящая система представлена амфикрибральными (центроксилемными) пучками, которые отделены от паренхимных клеток одним слоем плотно расположенных клеток эндодермы, имеющих коричневое содержимое. Ксилема представлена крупными трахеидами, между которыми располагаются паренхимные клетки.

Испытания:

Степень разложения растительных остатков (торфа). Степень разложения торфа (R, %) - процент потерявших структуру остатков органов и фрагментов растений. Степень разложения устанавливают в цельном сыром сырье микроскопическим методом (увеличение микроскопа 56-140^x), руководствуясь ГОСТ 28245-89 [33].

Суть микроскопического метода заключается в определении относительной площади, занятой бесструктурной массой торфа. За 100 % принимают площадь, которую занимает вся проба торфа. При этом к растительным остаткам относятся растительные ткани, сохранившие клеточную структуру.

Степень разложения низинного древесно-травяного торфа составляет 30-35 %.

Общая зола торфа. Торф – природное образование с содержанием общей золы не более 50 % ($A < 50\%$). Определение золы проводят на основании ОФС 1.2.2.2.0013.15 [35] путем озоления навесок торфа, помещенных в тигли, в муфельной печи при температуре 550-650°C. В результате определяют отношение массы зольного остатка к массе абсолютно сухой неозоленной навески торфа (выражают в %). Показатель золы общей для низинного древесно-травяного торфа составляет $6,40 \pm 0,12\%$ (Таблица 5.1.1).

Определение золы, не растворимой в хлороводородной кислоте. Содержание золы, не растворимой в 10 %-ной хлороводородной кислоте, показывает относительное количество оксида кремния в образцах сырья и характеризует его загрязненность минеральными примесями. Определение золы, не растворимой в хлороводородной кислоте, проводят на основании ОФС 1.5.3.0005.15 [35] путем обработки остатка после определения «Золы общей» 10 %-ной хлороводородной кислотой и прокаливании в муфельной печи при температуре 550-650°C.

Определяют отношение массы золы, не растворимой в хлороводородной кислоте, к массе общей золы торфа, выраженной в процентах.

Зола, не растворимая в хлороводородной кислоте, низинного древесно-травяного торфа составляет $2,98 \pm 0,08\%$ (Таблица 5.1.1).

Микробиологическая чистота. В соответствии с ГФ XIV издания, ОФС.1.2.4.0002.15 «Микробиологическая чистота» [35], категория 4А (общее число аэробных микроорганизмов $< 10^7$ КОЕ/1 г; общее число дрожжевых и плесневых грибов $< 10^5$ КОЕ/1 г; *E. coli* $< 10^2$ КОЕ/1 г).

Содержание радионуклидов. В соответствии с ГФ XIV [35], ОФС.1.5.3.0001.15 «Определение содержания радионуклидов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах» ($Cs-137 < 400$ Бк/кг; $Sr-90 < 200$ Бк/кг).

Содержание тяжелых металлов и мышьяка. В соответствии с ГФ XIV [35], ОФС.1.5.3.0009.15 «Определение содержания тяжелых металлов и мышьяка в

лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах» [35] (свинец < 6,0 мг/кг; кадмий < 1,0 мг/кг; мышьяк < 0,5 мг/кг; ртуть < 0,1 мг/кг).

Количественное определение гуминовых кислот, экстрагируемых из торфа 0,1 моль/л раствором натрий гидроксида. Определение содержания ГК в торфе проводят в соответствии с методикой (Глава 2.2.4). Содержание ГК, выделенных раствором NaOH из исследуемого образца торфа, составляет $38,77 \pm 0,32$ % (Таблица 5.1.1).

Таблица 5.1.1 – Числовые показатели низинного древесно-травяного торфа

Номер повторности	Общая зола торфа, %	Зола, не растворимая в хлороводородной кислоте, %	Количественное содержание ГК, % (гравиметрический анализ)
1	6,23	3,10	39,24
2	6,51	2,89	38,42
3	6,47	2,95	38,66
Среднее значение	$6,40 \pm 0,12$	$2,98 \pm 0,08$	$38,77 \pm 0,32$

5.2 РАЗРАБОТКА ПОДХОДОВ К КОНТРОЛЮ КАЧЕСТВА ГУМИНОВЫХ КИСЛОТ (БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНОГО ВЕЩЕСТВА ГУМИНОВОЙ ПРИРОДЫ)

Показатели контроля качества ГК разрабатывали для перспективного образца ГК-2, выделенного раствором натрий гидроксида из низинного древесно-травяного торфа с болота «Таган» Томской области. Отнесение вещества к классу гуминовых кислот осуществляли на основании физико-химических констант, установленных в ходе проведенного физико-химического анализа (Глава 3). По результатам исследования были установлены основные дифференциальные и интегральные параметры структуры молекул ГК, которые необходимо использовать для их идентификации (определение подлинности и качества).

Стандартизацию по показателю «Биологическая активность» проводили альтернативным путем, устанавливая радикалсвязывающую активность методом колориметрии со стабильным радикаломДФПГ.

На основании совокупности примененных подходов к контролю качества ГК предложен проект нормативной документации «Гуминовые кислоты низинного древесно-травяного торфа» в соответствии с требованиями, предъявляемыми ГФ XIV издания (Приложение 2).

Пробоподготовка. Выделение ГК проводят согласно методике, изложенной в Главе 2.2.5.

Идентификация гуминовых кислот:

Электронная спектроскопия. Одним из интегральных параметров структуры вещества, позволяющего отнести его к классу ГК, относится профиль полосы поглощения, т.к. на данный параметр не оказывают влияние происхождение ГК (тип, вид, ботанический состав, фармакогностические параметры торфа) и способ выделения [51]. К дифференциальным параметрам, определяющим подлинность и качество ГК, относятся спектральные коэффициенты (экстинкции и цветности) [51].

Определения проводят согласно методике, описанной в Главе 2.2.5.

Электронно-абсорбционный спектр ГК-2 должен соответствовать представленному на Рисунке 5.2.1.

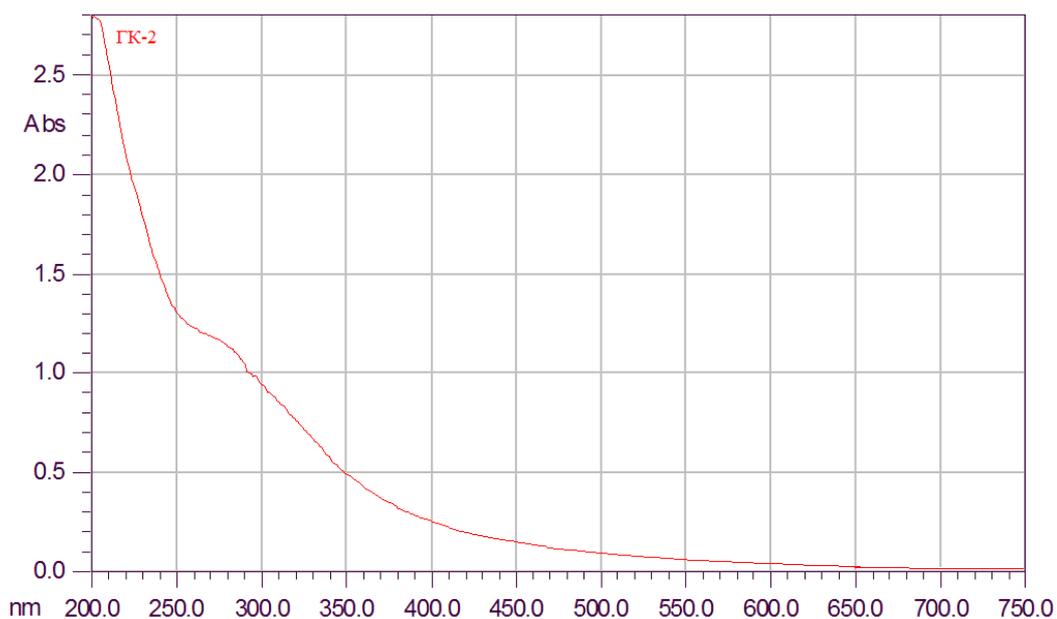


Рисунок 5.2.1 – Электронный спектр образца ГК-2 низинного древесно-травяного вида торфа (болото «Таган»)

Для данного спектра в видимой области (400-800 нм) нет четко выраженных максимумов поглощения, а в УФ-области (200-400 нм) наблюдается резко возрастающее в коротковолновую сторону поглощение света. В области 255-275 нм наблюдается плечо, характерное для карбонильных, карбоксильных, фенольных групп, полиеновых цепей.

Спектральные коэффициенты (коэффициенты экстинкции при длинах волн 465 (E_{465} —величина) и 650 нм (E_{650} —величина), коэффициент цветности ($Q_{E_{465}/E_{650}}$, $Q_{4/6}$) по Е. Вельте) не должны отличаться от значений, представленных в Таблице 5.2.1. На значения спектральных коэффициентов оказывает влияние число и расположение электронов в молекулах и ионах ГК, которые способны поглощать электромагнитное излучение данного волнового диапазона. Т.е. данные показатели являются специфичными для каждого отдельного образца ГК.

Таблица 5.2.1 – Оптические свойства образца ГК-2 низинного древесно-травяного вида торфа (болото «Таган»)

$E_{465nm,1cm}^{0.001\%ГК}$	$E_{650nm,1cm}^{0.001\%ГК}$	$Q_{E_{465}/E_{650}}$
0,1284±0,0023	0,0398±0,0005	3,2261±0,0498

Флуоресцентная спектроскопия. Флуоресцирующая способность – фундаментальное свойство молекул ГК [121, 152, 158, 160]. Поэтому спектры флуоресценции ГК различного происхождения можно расценивать как их «отпечатки пальцев», а профиль спектра как интегральный параметр, т.к. на него не оказывают влияние происхождение ГК (тип, вид, ботанический состав, фармакогностические параметры торфа) и способ выделения [51]. В качестве параметров флуоресцентных свойств ГК, являющихся показателями их подлинности и качества при разработке нормативной документации выступают: λ_{max} , нм (длина волны максимума флуоресценции), величины гипсохромного («синего») сдвига максимума флуоресценции ($\Delta 1$ и $\Delta 2$, нм) при $\lambda_{возб}$ 270, 310 и

355 нм [51]. Флуоресцентные свойства, проявляемые ГК, больше не характерны для каких-либо других природных молекул.

Определения проводят согласно методике, описанной в Главе 2.2.5.

Синхронный спектр флуоресценции ГК-2 при длине волны возбуждения, равной 270 нм, должен соответствовать представленному на Рисунке 5.2.2, где: первый пик (плечо) находится в области 400 ± 2 нм (сопряженные карбонильные и фенольные группы, мономеры полипептидов), второй пик находится в области 450 ± 2 нм (область ароматических и гетероциклических структур), третий пик расположен в длинноволновой области 475 ± 2 нм (характерный максимум для ГК природного происхождения – область, обусловленная процессом деградации растительных биополимеров), четвертый пик находится в области 510-520 нм (область поликонденсированных ароматических фрагментов, представленных пятью и более кольцами).

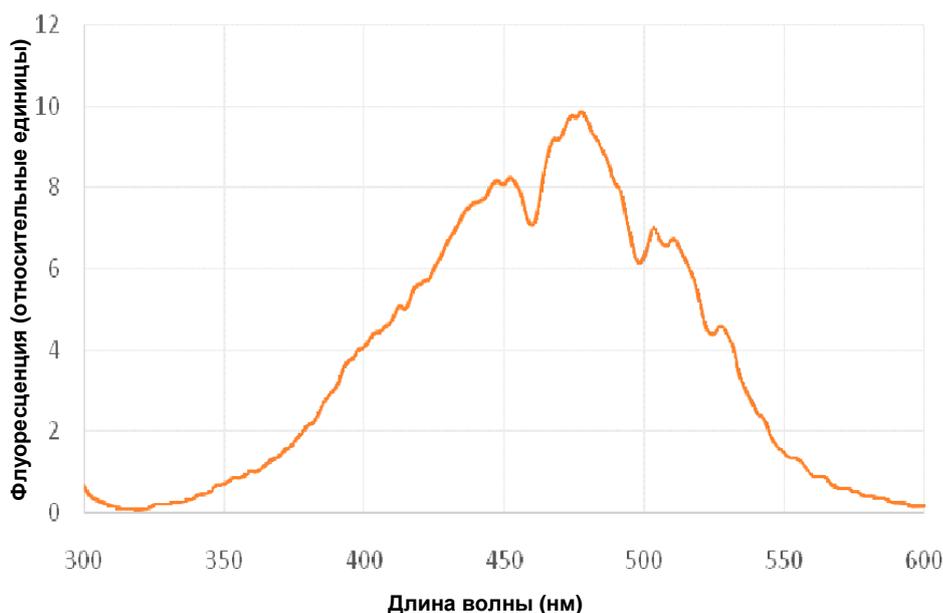


Рисунок 5.2.2 – Синхронный спектр флуоресценции образца ГК-2 низинного древесно-травяного вида торфа (болото «Таган»), при $\lambda_{\text{возб}} = 270$ нм

Таблица 5.2.2 – Флуоресцентные свойства образца ГК-2 низинного древесно-травяного вида торфа (болото «Таган»)

Положение максимума флуоресценции (λ_{max} , нм)			«Синий сдвиг»	
$\lambda_{\text{возб}} = 270$	$\lambda_{\text{возб}} = 310$	$\lambda_{\text{возб}} = 355$	$\Delta 1$, нм	$\Delta 2$, нм
478,5±0,8	430,0±0,1	478,0±0,5	48,0±0,5	48,5±0,5

Инфракрасная спектроскопия. Профиль ИК-спектра, также как электронного и флуоресцентного спектров, можно рассматривать в качестве интегрального параметра молекулярной структуры при отнесении природных веществ к классу ГК, поскольку на него не влияют этиология ГК (тип, вид торфа, ботанический состав, фармакогностические параметры торфа) и способ выделения ГК из торфа [51]. Значения отношений ОППП-величин представляют собой дифференциальные параметры молекулярной структуры исследуемых ГК по данным ИК-спектроскопии, являющиеся показателями их подлинности и качества при разработке нормативной документации [51].

Определения проводят согласно методике, описанной в Главе 2.2.5.

ИК-спектр ГК должен соответствовать представленному на Рисунке 5.2.3 спектру, где содержатся характерные полосы поглощения при волновых числах: 3500-3300 см^{-1} (валентные колебания гидроксильных групп (ν_{OH})); 3250-3200 см^{-1} (валентные колебания N-H (ν_{NH}) в структуре амида, аминов, связанных водородными связями); 2920 см^{-1} , 2860 см^{-1} , 1460-1440 см^{-1} , 700-900 см^{-1} (валентные колебания $-\text{CH}_3$ и $-\text{CH}_2$ групп алифатических цепей); 2600-2500 см^{-1} (колебания карбоновых кислот); 1725-1700 см^{-1} (валентные колебания карбонильных групп ($\nu_{\text{C=O}}$) карбоновых кислот и их функциональных производными, кетонов); 1625-1610 см^{-1} (плоскостные колебания сопряженных углерод-углеродных связей ($\nu_{\text{C=C}}$ в ароматическом скелете); 1510-1500 см^{-1} (неконденсированные ароматические соединения, связанные с атомами азота и кислорода); 1250-1225 см^{-1} (валентные ($\nu_{\text{C-O}}$) и деформационные колебания ($\delta_{\text{O-H}}$) связей); 1050-1150 см^{-1} (валентные колебания спиртовых и углеводных гидроксильных групп (ν_{OH})).

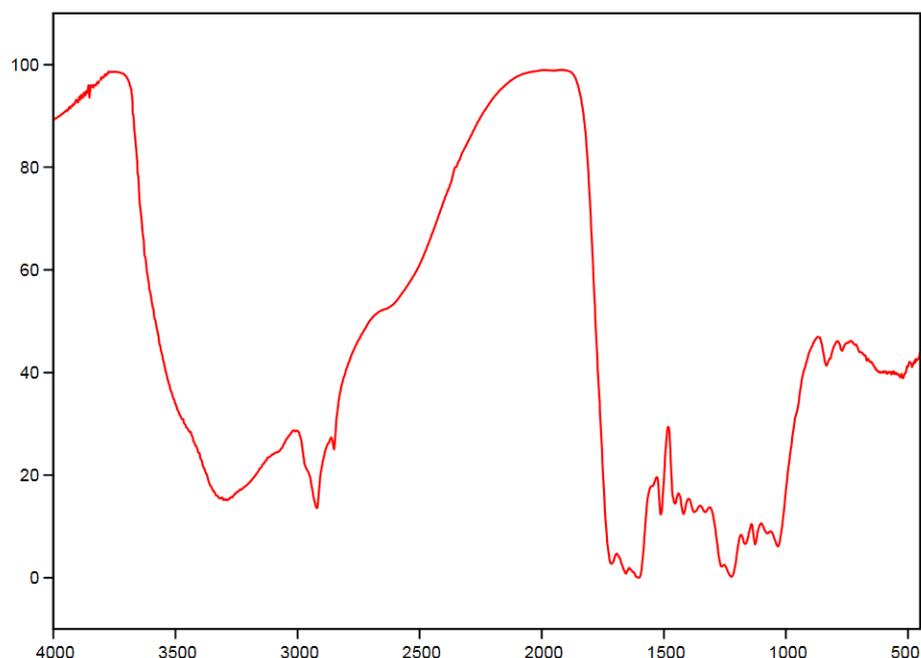


Рисунок 5.2.3 – ИК-спектр образца ГК-2 низинного древесно-травяного вида торфа (болото «Таган»)

Спектральные коэффициенты (ОППП-величины) должны соответствовать числовым значениям, представленным в Таблице 5.2.3. Происхождение полос поглощения в ИК-диапазоне связано с колебаниями отдельных атомов или групп атомов в молекуле ГК, а также вращением их относительно σ -связей, и характеризуют многие детали молекулярной структуры ГК. В связи с чем, они являются индивидуальными дескрипторами строения ГК и принимаются при разработке нормативной документации как показатели их подлинности и качества [51].

Таблица 5.2.3 – Отношение оптических плотностей полос поглощения при определенных волновых числах по данным ИК-спектроскопии образца ГК-2 низинного древесно-травяного вида торфа (болото «Таган»)

A_{3400}/A_{1610}	A_{3400}/A_{1610}	A_{1225}/A_{1610}	A_{1035}/A_{1610}	A_{1610}/A_{2920}	A_{3400}/A_{2920}	A_{1720}/A_{2920}	A_{1225}/A_{2920}	A_{1035}/A_{2920}	A_{1035}/A_{1720}
0,75	0,98	1,00	0,90	1,60	0,97	1,21	1,25	1,07	0,85

Элементный анализ. К дифференциальным параметрам молекулярной структуры, которые могут выступать в качестве показателей подлинности и качества ГК при разработке нормативной документации, по данным элементного (С, Н, N, O, S)-анализа относятся: массовые доли элементов в процентах (%_{mass}), атомные доли элементов в процентах (%_{atom}), значения атомных отношений элементов и средней степени окисления атома углерода [51].

Определения проводят согласно методике, изложенной в Главе 2.2.5.

Показатели элементного анализа должны соответствовать числовым значениям, представленным в Таблице 5.2.4. Параметры С, Н, N, O-элементного анализа ГК по данным литературы [51], являются индивидуальными дескрипторами их строения и принимаются при разработке нормативной документации как показатели подлинности и качества.

Таблица 5.2.4 – Элементный состав образца ГК-2 низинного древесно-травяного вида торфа (болото «Таган»)

Массовые доли элементов, % (% _{mass}) Атомные доли элементов, % (% _{atom})				Атомные отношения			ω
С	Н	N	O	H/C	O/C	C/N	
55,35±0,50	5,86±0,05	4,20±0,03	34,30±0,44	1,26	0,46	15,4	-0,14
35,88±0,42	45,21±0,33	2,33±0,02	16,65±0,24				
Примечание – массовые и атомные доли элементов рассчитаны на беззольную навеску							

¹³C ЯМР-спектроскопия. Как уже отмечалось ранее (Глава 3) регистрация спектров ¹³C-ЯМР ГК, приготовленных как водно-щелочные растворы, используя режим устранения ядерного эффекта Оверхаузера и при достаточных временах релаксационной задержки, предоставляет возможность получать информацию о количественном распределении углерода по структурным фрагментам макромолекул ГК. Поэтому данный метод является надежным показателем подлинности и качества при разработке нормативной документации.

Определения проводят согласно методике, описанной в Главе 2.2.5.

Спектр ¹³C-ЯМР исследуемого образца ГК-2 должен соответствовать представленному на Рисунке 5.2.4, и содержащий характерные пики: в области

атомов углерода незамещенного (5-48 м.д.) и замещенного (48-105 м.д.) алифатического углерода, атомов углерода ароматических фрагментов (108-165 м.д.), карбоксильных групп (165-187 м.д.)

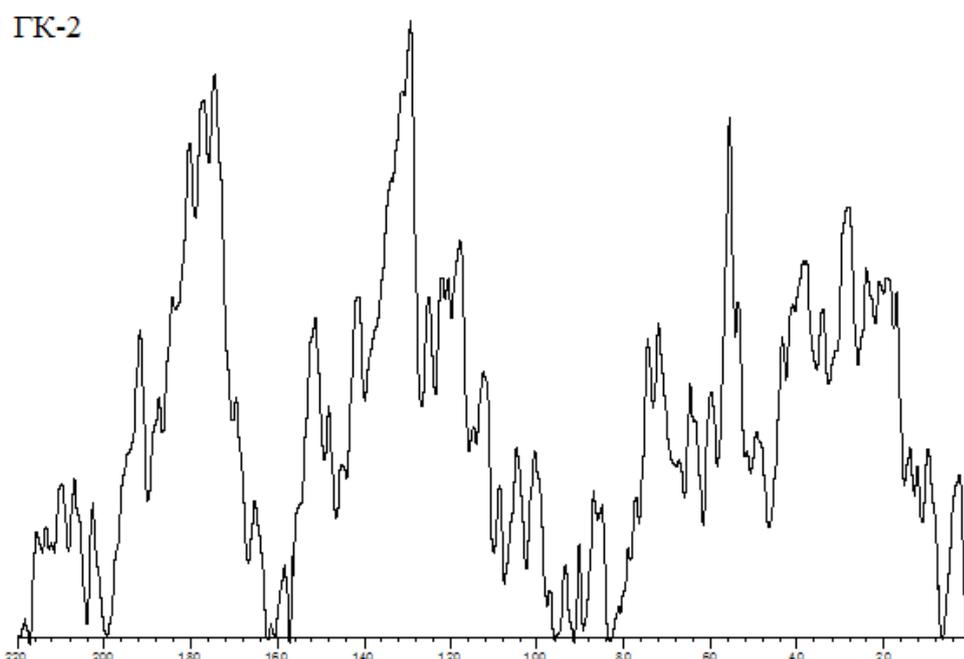


Рисунок 5.2.4 – ^{13}C -ЯМР спектр образца ГК-2 низинного древесно-травяного вида торфа (болото «Таган»)

Распределение углерода (% от $\text{C}_{\text{общ}}$) по фрагментам структуры в молекуле ГК должно соответствовать числовым значениям, представленным в Таблице 5.2.5.

Таблица 5.2.5 – Распределение углерода (% от $\text{C}_{\text{общ}}$) по фрагментам структуры молекул образца ГК-2 низинного древесно-травяного вида торфа (болото «Таган») по данным спектроскопии ^{13}C ЯМР

Спектральные области, м.д.	% от $\text{C}_{\text{общ}}$
5-48 (CH_n , C-C)	24,9
48-90 (R-O, C-O, N-alkyl)	17,2
90-108 (O-C-O; O-C-N)	3,3
108-145 (C_{Ar} (C=C, C=C-C))	25,0
145-165 (C_{Ar} -O/N (C=C-O/N))	5,4
165-187 (O=C-(OH/O/NH ₂))	15,6
187-220 (O=C-(H ₂ /R ₂))	8,6

ВЭЖХ-анализ. Показатели ММР, полученные методом эксклюзионной ВЭЖХ, по данным литературы [51], являются индивидуальными дескрипторами строения ГК и принимаются при разработке нормативной документации как показатели их подлинности и качества.

Определения проводят согласно методике, описанной в Главе 2.2.5.

Основные показатели ММР должны соответствовать числовым значениям, представленным в Таблице 5.2.5.

Таблица 5.2.6 – Молекулярно-массовое распределение образца ГК-2 низинного древесно-травяного вида торфа (болото «Таган»)

Параметры ММР			
Среднечисленная Мм, Да (M_n)	Средневесовая Мм, Да (M_w)	Медиана, Да (M_p)	Полидисперсность (p)
11844,2	121393,4	37918,4	10,3

Количественное определение гуминовых кислот спектрофотометрическим методом. Растворы ГК представляют собой темно-окрашенные коллоидные системы и интенсивно взаимодействуют с ИК- и В- лучами. В связи с этим, методы абсорбционной спектроскопии нашли широкое применение в анализе данных соединений, т.к. характеризуются высокой чувствительностью, информативностью и простотой в техническом исполнении.

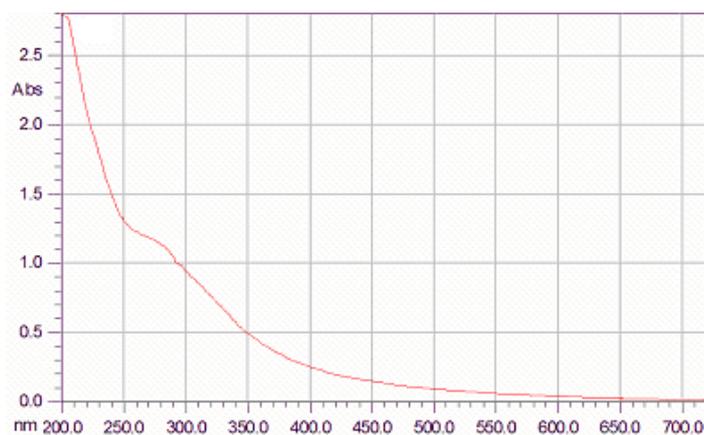
Согласно литературным данным [4, 105, 149], наиболее информативной для количественного анализа ГК, как высокомолекулярных соединений, является $\lambda = 465$ нм (на данной длине волны получается наиболее точный количественный анализ ГК) [149]. Так, например, в работе [149] проводилось исследование количественного содержания ГК торфа различными методами: калибровочного графика, сравнения, добавок и дифференциальным методом. Установлено, что метод калибровочного графика при длине волны 465 нм оказался наиболее предпочтительным, показал хорошую сходимость результатов определения, воспроизводимых во времени и является также менее трудоемким.

Таким образом, для определения концентрации ГК в растворах (гуминовых препаратах) использовали метод калибровочного графика. В качестве стандарта для калибровки использовали ГК, выделенные из низинного древесно-травяного вида торфа как стандартный образец предприятия (СОП).

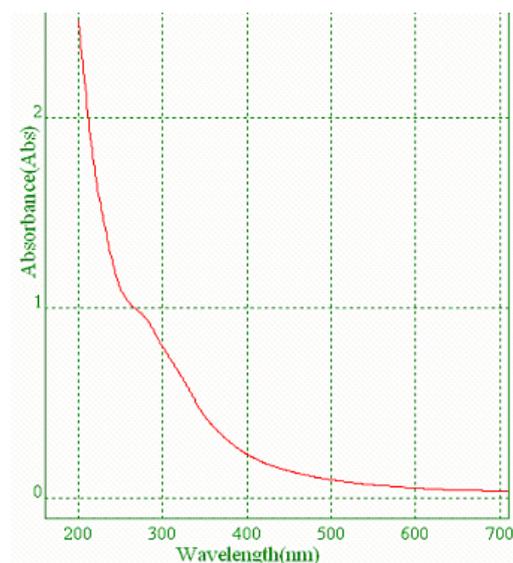
Валидацию методики осуществляли согласно ОФС.1.1.0012.15 «Валидация аналитических методик» [35] с учетом специфики объекта исследования – гуминовые кислоты, в соответствии с литературными данными [4, 51, 105, 149].

Специфичность. Установить и количественно определить в препаратах вещества, которыми теоретически можно фальсифицировать окрашенные в природный темный цвет гуминовые кислоты с использованием только метода электронной спектроскопии, невозможно ввиду особой сложности объекта исследования. Поэтому, специфичность спектрофотометрической методики в данном конкретном случае заключается в подобии электронных спектров, записанных для образца ГК-2 на разных спектрофотометрах (Рисунок 5.2.5). В работе [51] экспериментально установлено, что профиль полосы поглощения для ГК является их интегральным параметром структуры при отнесении природных веществ к классу ГК, поскольку на него не влияют происхождение ГК (тип, вид, ботанический состав, фармакогностические параметры торфа) и способ выделения.

Судя по отсутствию четко выраженных максимумов поглощения в электронных спектрах (Рисунок 5.2.5) ввиду особой сложности объекта исследования (ГК), можно предположить о невысокой селективности методики, но при этом в литературе [4, 51, 105, 149] на большом объеме экспериментальных данных было доказано, что длина волны 465 нм является наиболее приемлемой моделью для исследования суммы ГК без выделения индивидуальных компонентов. Также можно отметить (Рисунок 5.2.5), что длина волны 465 нм является оптимальной и характеризуется величиной оптической плотности, достаточной для количественного определения ГК (согласно закону Бугера-Ламберта-Бера).



Электронный спектр образца ГК-2, записанный на спектрофотометре ПЭ-5400 УФ (Экротхим, Россия)



Электронный спектр образца ГК-2, записанный на спектрофотометре Unico 2800 (США)

Рисунок 5.2.5 – Электронные спектры образца ГК-2 низинного древесно-травяного вида торфа (болото «Таган»), записанные на разных спектрофотометрах

Таким образом, с определенной степенью достоверности можно сделать заключение, что предлагаемая спектрофотометрическая методика количественного определения ГК валидна по показателю специфичность.

Диапазон применения и линейность. Аналитическую область методики и ее линейность определяли на восьми уровнях концентраций стандартных растворов ГК. В качестве стандарта для калибровки использовали ГК, выделенные из низинного древесно-травяного вида торфа как стандартный образец предприятия (СОП). Испытуемые растворы готовили разной концентрации путем разведения рабочего раствора ГК водой очищенной. Приготовление рабочего раствора ГК: навеску (точная масса 0,0625 г) помещали в мерную колбу (объемом 250 мл), добавляли до метки 0,1 моль/л раствор NaOH, настаивали и перемешивали до полного растворения ГК. Испытуемые концентрации калибровочных растворов были следующие: 0,005, 0,01; 0,02; 0,025; 0,04; 0,05; 0,075; 0,1 мг/мл (готовили в трех повторностях). Оптическую плотность испытуемых растворов измеряли на длине волны 465 нм. Для каждого измерения использовали растворы-сравнения, приготовленные аналогично (в

качестве рабочего раствора использовали 0,1 моль/л раствор NaOH). Данные представлены в Таблице 5.2.7.

Таблица 5.2.7 – Оптическая плотность калибровочных растворов образца ГК-2 низинного древесно-травяного вида торфа (болото «Таган») при длине волны 465 нм

№ п/п	Концентрация ГК, мг/мл	Оптическая плотность
1	0,005	0,0745±0,0016
2	0,010	0,1278±0,0012
3	0,020	0,2371±0,0015
4	0,025	0,3087±0,0015
5	0,040	0,5242±0,0016
6	0,050	0,6052±0,0013
7	0,075	0,9108±0,0020
8	0,100	1,1404±0,0015

На основании полученных данных строили калибровочный график (Рисунок 5.2.6).

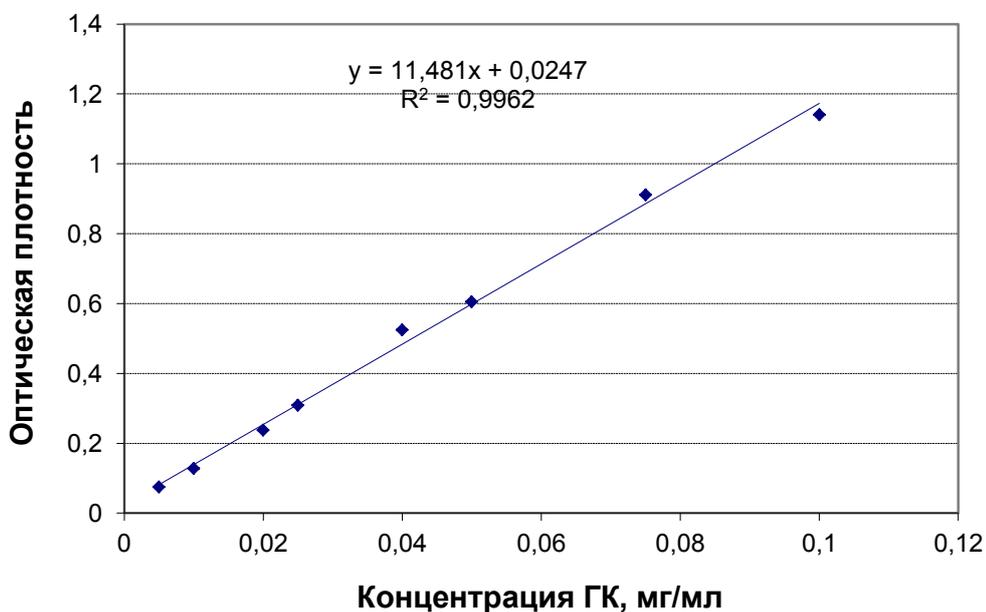


Рисунок 5.2.6 – Калибровочный график для расчета содержания образца ГК-2 низинного древесно-травяного вида торфа (болото «Таган») в растворе в диапазоне от 0,005 до 0,1 мг/мл (образец ГК-2)

Таким образом, область, в пределах которой соблюдается линейная зависимость (аналитическая область), охватывает интервал содержаний ГК низинного древесно-травяного торфа от 5 до 100 %, более высокие концентрации использовать нецелесообразно, т.к. это приведет к нарушению закона Бугера-Ламберта-Бера ввиду высоких значений оптической плотности окрашенных в природный темный цвет гуминовых кислот. Получено уравнение: $Abs=11,481x + 0,0247$ ($R^2=0,9962$), следовательно, линейность зависимости оптической плотности от концентрации ГК низинного древесно-травяного торфа в исследуемом диапазоне значений удовлетворительна.

Правильность. Правильность спектрофотометрической методики устанавливали посредством определения количественного содержания гуминовых кислот низинного древесно-травяного торфа в модельных растворах для четырёх уровней концентраций: 0,010; 0,025; 0,050 и 0,100 мг/мл (содержание 10, 25, 50 и 100 %, соответственно). Правильность оценивали путем расчета относительного стандартного отклонения (δ , %) результатов (Таблица 5.2.8.).

Таблица 5.2.8 – Оценка правильности спектрофотометрической методики количественного определения образца ГК-2 низинного древесно-травяного вида торфа (болото «Таган»)

Содержание ГК в растворе, мг/мл		δ , %	$\bar{\delta}$, %
теоретическое	установленное		
0,010	0,010	4,67	4,51
	0,010	4,92	
	0,010	3,93	
0,025	0,026	4,88	4,27
	0,026	3,98	
	0,024	3,95	
0,050	0,051	3,07	3,01
	0,052	3,91	
	0,049	2,06	
0,100	0,103	2,94	3,07
	0,098	2,08	
	0,104	4,19	

Таким образом, предлагаемая методика является правильной, так как в диапазоне содержаний 10-100 % относительная ошибка не более 5 %, а вблизи предела количественного определения - 4,51 %.

Прецизионность. Определение прецизионности проводили в условиях повторяемости и воспроизводимости. При оценке параметров повторяемости и воспроизводимости верхнему уровню соответствовала навеска 25 мг (25 %), среднему уровню – 50 мг (50 %) и нижнему уровню – 100 мг (100 %).

Проверку повторяемости (Таблица 5.2.9) осуществляли в трехуровневом эксперименте по 6 параллельным определениям выбранных концентраций.

Проверку воспроизводимости (Таблица 5.2.10) проводили в совместном эксперименте в двух различных лабораториях СибГМУ: в Научной лаборатории кафедры химии (спектрофотометр ПЭ-5400 УФ, Экросхим, Россия) и в Лаборатории контроля качества Центра внедрения технологий ЦНИЛ (спектрофотометр Unicо 2800, США). Испытания проводились разными операторами на разных спектрофотометрах по 6 образцам для трёх уровней концентрации.

Таблица 5.2.9 – Оценка повторяемости спектрофотометрической методики количественного определения образца ГК-2 низинного древесно-травяного вида торфа (болото «Таган»)

$X_{\text{ист}}, \%$	$X_{\text{ср}}, \%$	S_x	ΔX	$\sigma_r, \%$
25	25,90	0,117	0,32	1,10
50	50,80	0,204	0,56	0,98
100	100,90	0,157	0,43	0,38

Таким образом, анализ полученных данных по оценке повторяемости свидетельствует о статистической однородности выборок, отражая прецизионность спектрофотометрической методики в условиях повторяемости в диапазоне содержаний в растворе гуминовых кислот из низинного древесно-травяного торфа в диапазоне концентраций 25-100 % ($n = 6, p = 0,95$).

Для разработанной спектрофотометрической методики анализа сходимость в условиях повторяемости (σ_r , %) составила 0,38-1,10 %.

С целью проверки гипотезы об однородности двух выборок использовали двухсторонний F-критерий. Табличное значение $F(0,025, 5, 5) = 7,15$ сравнивали с расчетным ($F_{\text{расч.}} = S_{\text{max}}^2 / S_{\text{min}}^2$). При выполнении неравенства $F_{\text{расч.}} < F(0,025, 5, 5)$ принимали ноль-гипотезу по выборке $n = 12$ определяли RSD %, σ_R (относительное отклонение) (Таблица 5.2.10).

Таблица 5.2.10 – Оценка воспроизводимости спектрофотометрической методики количественного определения образца ГК-2 низинного древесно-травяного вида торфа (болото «Таган»)

X _{ист} %	X _{ср, i} %		F	S _x	σ_R , %
	Лаборатория 1	Лаборатория 2			
25	25,90	24,60	2,03	0,17	2,40
50	50,80	49,40	1,54	0,22	1,57
100	100,9	99,60	2,53	0,28	0,96

Значения параметров воспроизводимости, приведенные в Таблице 5.2.10, указывают на удовлетворительную сходимость результатов методики (условия межлабораторной прецизионности). Поэтому предлагаемая методика валидна по показателю воспроизводимости в исследуемом диапазоне содержания гуминовых кислот низинного древесно-травяного торфа.

Разработанная методика количественного определения гуминовых кислот низинного древесно-травяного торфа на основе спектрофотометрического метода валидирована по показателям: специфичность, линейность, правильность, прецизионность в условиях повторяемости и воспроизводимости. Таким образом, методика определения количественного содержания гуминовых кислот низинного древесно-травяного торфа может быть включена в нормативную документацию на биологически активное вещество – гуминовые кислоты. По разработанной и

валидированной методике было проанализировано 3 партии гуминовых кислот, выделенных из низинного древесно-травяного торфа.

Стандартизации гуминовых кислот по биологической активности. В качестве альтернативного метода, не требующего проведения тестов на лабораторных животных, для биологической стандартизации ГК использовали определение радикалосвязывающей активности методом колориметрии с метанольным раствором стабильного радикала ДФПГ (1,1-дифенил-2-пикрилгидразил). К достоинству данной методики, по данным литературы [27], можно отнести доступность задействованного оборудования и реактивов, чувствительность, а так же селективность.

Определения проводят согласно методике (Глава 2.2.8).

Показатели радикалосвязывающей активности ГК должны соответствовать значениям Таблицы 5.2.11. Для характеристики радикалосвязывающей активности ГК используют 2 параметра: 1) процент гибели ДФПГ в реакции с ГК, 2) время [мин], за которое свободный радикал ДФПГ прореагирует с ГК на 50 % ($\tau_{1/2}$).

Таблица 5.2.11 – Показатели радикалосвязывающей активности образца ГК-2 низинного древесно-травяного вида торфа (болото «Таган»)

ДФПГ, % ингибирования	Время реакции ДФПГ ($\tau_{1/2}$), мин
73,21	2

Микробиологическая чистота. В соответствии с ГФ XIV, ОФС.1.2.4.0002.15 «Микробиологическая чистота», категория 3.2 (общее число аэробных микроорганизмов $< 10^4$ КОЕ/1 г; общее число дрожжевых и плесневых грибов $< 10^2$ КОЕ/1 г; энтеробактерий, устойчивых к желчи $< 10^2$ КОЕ/1 г; отсутствие: *E. coli* (в 1 г); рода *Salmonella* (в 25 г); *P. aeruginosa* (в 1 г); *St. aureus* (в 1 г).

Содержание радионуклидов. В соответствии с ГФ XIV, ОФС.1.5.3.0001.15 «Определение содержания радионуклидов в лекарственном растительном сырье и

лекарственных растительных препаратах» (Cs-137 не более 400 Бк/кг; Sr-90 не более 200 Бк/кг).

Содержание тяжелых металлов и мышьяка. В соответствии с ГФ XIV, ОФС.1.5.3.0009.15 «Определение содержания тяжелых металлов и мышьяка в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах» (свинец < 6,0 мг/кг; кадмий < 1,0 мг/кг; ртуть < 0,1 мг/кг; мышьяк < 0,5 мг/кг).

Таким образом, сравнивая результаты проведенного исследования по разработке подходов к контролю качества гуминовых кислот низинного древесно-травяного торфа с болота «Таган» с ранее полученными данными для образца низинного древесно-травяного торфа с болота «Клюквенное» [34, 135], можно выделить следующие основные отличия: подробное описание процесса прободготовки вещества (гуминовых кислот); использование спектральных коэффициентов (ОППП-величин) по данным ИК-спектроскопии (отношения оптических плотностей полос поглощения при определенных волновых числах); использование данных флуоресцентной спектроскопии как фундаментального свойства ГК, включая значения максимумов флуоресцентии $\lambda_{\text{возб}}$ (270, 310 и 355 нм) и величин гипсохромного («синего») сдвига ($\Delta 1$, нм, $\Delta 2$, нм); использование данных элементного (C, H, N, O, S)-анализа конституционного состава молекул ГК, включающих значения массовых долей элементов в процентах (%_{mass}), атомных долей элементов в процентах (%_{atom}), значения атомных отношений элементов и средней степени окисления атома углерода; использование данных ¹³C-ЯМР-спектроскопии, включая количественную информацию (% от C_{общ}) о распределении углерода по структурным группам в молекуле ГК; использование данных молекулярно-массового распределения по результатам эксклюзионной ВЭЖХ. Предложенные подходы к контролю качества гуминовых кислот содержат валидированную спектрофотометрическую методику количественного определения ГК в растворах (по показателям специфичность, линейность, правильность и прецизионность в условиях повторяемости и воспроизводимости), а также альтернативный метод стандартизации ГК по биологической активности с использованием определения антирадикальной активности методом колориметрии

со стабильным хромоген-радикалом ДФПГ (1,1-дифенил-2-пикрилгидразил) в метиловом спирте.

На основании вышеописанных отличий можно заключить, что по результатам исследования предложены новые и актуальные согласно современным требованиям и знаниям о структуре и свойствах ГК, критерии контроля качества ГК низинного древесно-травяного вида торфа (на примере торфа с болота «Таган» Томской области).

ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 5

1. Разработаны подходы к контролю качества перспективного образца ГК-2 и его сырьевого источника (низинного древесно-травяного вида торфа).

2. Для сырьевого источника ГК (низинного древесно-травяного вида торфа) показатели микроскопического исследования, числовые показатели, количественное содержание ГК в сырье (торфе) предложены в качестве показателей подлинности и качества.

3. Для перспективного образца ГК-2 предложены показатели подлинности и качества: идентификация и числовые показатели по данным электронно-абсорбционной, флуоресцентной, ИК и ^{13}C -ЯМР спектроскопии, элементного (C, H, N, O, S)-анализа, эксклюзионной ВЭЖХ, валидированная методика количественного содержания ГК в растворах методом спектрофотометрии, биологическая стандартизация – определение антирадикальной активности (колориметрия со свободным радикалом 1,1-дифенил-2-пикрилгидразилом).

4. Предложены два проекта нормативной документации: «Торф низинный древесно-травяной» и «Гуминовые кислоты низинного древесно-травяного торфа» на основании разработанных методик и подходов к стандартизации ГК и их сырьевого источника (торфа).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Два образца древесно-травяных видов торфа с разных торфяных месторождений Томской области («Клюквенное» и «Таган») по результатам фармакогностического исследования являются очень близкими по своему происхождению. Наиболее предпочтительным для целей выделения гуминовых кислот является образец торфа с месторождения «Таган», т.к. отличается более высокой степенью разложения, меньшей зольностью и меньшей загрязненностью минеральными примесями.

2. Для двух образцов гуминовых кислот из древесно-травяных видов торфа с разных торфяных месторождений Томской области («Клюквенное» и «Таган») выявлен ряд общих и индивидуальных элементов структуры и свойств. Специфическими (дифференциальными) параметрами структуры, позволяющими проводить оценку их качества являются: спектральные коэффициенты по данным электронной спектроскопии, положения максимумов флуоресценции и величины гипсохромного сдвига спектров флуоресценции, значения отношений ОППП-величин по данным ИК-спектроскопии, содержание кислотных функциональных групп, массовые и атомные доли элементов в процентах, значения атомных отношений элементов и средней степени окисления атома углерода, интегральные соотношения спектральных областей атомов углерода различных фрагментов структуры по данным ^{13}C -ЯМР-спектроскопии, показатели молекулярно-массового распределения по данным эксклюзионной ВЭЖХ.

3. По результатам физико-химического анализа параметров строения и свойств в качестве перспективного обоснован образец ГК-2 (выделенный из торфа с болота «Таган») поскольку содержит более высокое количество азота, фенольных и хиноидных групп, меньшее количество $\text{СН}_3\text{O}$ -групп лигниновой природы и углеводных (полисахаридных) компонентов, характеризуется более высоким индексом гумификации, меньшей степенью конденсированности ароматических структур и более высокими восстанавливающими свойствами, является менее

полидисперсным, а также более легко поляризуемым и реакционно способным соединением.

4. Выявлены прямые кардиоваскулярные эффекты перспективного образца ГК-2 при перфузии изолированных крысиных сердец по методу Лангендорфа, его превентивное применение перед моделированием тотальной ишемии способствует восстановлению инотропной функции сердечной мышцы, ослаблению постишемической контрактуры, повышению сократимости. Кардиопротекторные эффекты связаны с цитопротективной активностью, объясняемой снижением уровня креатинфосфокиназы в перфузате. Цитопротекторное действие является следствием высоких антиоксидантных свойств, доказанных с помощью четырех физико-химических методов анализа, а также влиянием на NO-сигнальный путь передачи сигнала. Хроническое пятидневное применение перспективного образца ГК-2 перед предъявлением животным физической нагрузки (в виде плавательного теста), пролонгировало момент наступления утомления, не вызывая повышения уровня лактата в крови, что свидетельствует об актопротекторной активности.

5. По результатам разработанных методик для стандартизации гуминовых кислот и их сырьевого источника (торфа) предложены два проекта нормативной документации: «Торф древесно-травяной низинный» и «Гуминовые кислоты низинного древесно-травяного торфа».

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

- АЛАТ – аланинаминотрансфераза;
- АО – антиоксидантные;
- АОА – антиоксидантная активность;
- АРА – радикалосвязывающей активности;
- АТФ – аденозинтрифосфат;
- АФК – активные формы кислорода;
- ВЖК – высшие жирные карбоновые кислоты;
- ВИЧ – вирус иммунодефицита человека;
- ГВ – гуминовые вещества;
- ГК – гексокиназа;
- ГК – гуминовые кислоты;
- ГФДГ – глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа;
- ДПК – двенадцатиперстная кишка;
- ДРЛЖ – давление, развиваемое левым желудочком;
- ДФПГ – дифенилпикрилгидразил;
- ЖК – жирные кислоты;
- ИБС – ишемическая болезнь сердца;
- ИЛ – интерлейкины;
- ИМ – инфаркт миокарда;
- ИНФ – интерфероны;
- КДД – конечное диастолическое давление;
- КФК – креатинфосфокиназа;
- ЛП – лекарственные препараты;

ЛПВП – липопротеины высокой плотности;
ЛПНП – липопротеины низкой плотности;
ЛПОНП – липопротеины очень низкой плотности;
ЛС – лекарственные средства;
МДА – малоновый диальдегид;
Мм – молекулярная масса
ММР – молекулярно-массовое распределение;
НАД⁺ – никотинамиддинуклеотид;
НАДФ – никотинамиддинуклеотид фосфат;
НПВС – нестероидные противовоспалительные средства;
ОМ – органическая масса;
ОППП – оптическая плотность полосы поглощения;
ПМЦ – парамагнитный центр;
ПОЛ – перекисное окисление липидов;
РА – ревматоидный артрит;
СД – сахарный диабет;
СОД – супероксиддесмутаза;
СОП – стандартный образец предприятия;
ССЗ – сердечно-сосудистые заболевания;
ТАГ – триацилглицериды;
ФК – фульвокислоты;
ФЛА₂ – фосфолипаза А₂;
ФНО- α – фактор некроза опухоли α ;
ХС – холестерин;
ХСН – хроническая сердечная недостаточность;

ЧСС – частота сердечных сокращений;

ЭВ O₂ – электровосстановление кислорода;

ЭДТА – этиленаминтетрауксусная кислота;

ЭПР – электронный парамагнитный резонанс;

ЯБЖ – язвенная болезнь желудка;

ЯМР – ядерный магнитный резонанс;

«BACS» – книжные ассиметричные углеродные структуры;

DR4 – молекула главного комплекса гистосовместимости II типа;

EDRF – эндотелиальный фактор расслабления;

Fas – мембранный белок I типа;

FasL – мембранный белок I типа;

НХ – индекс гумификации;

ИHSS – Международное гуминовое общество;

Ig – иммуноглобулины;

МАРК – Mitogen-activated Protein kinase (митогенактивируемая протеинкиназа);

NF-κB – nuclear factor kappa-light-chain-enhance of activated B cells (ядерный фактор «каппа-би», транскрипционный фактор контроля экспрессии генов, иммунного ответа, апоптоза и клеточного цикла);

NRF-1 – ядерный респираторный фактор 1;

PPAR-R – Peroxisome Proliferator Activated Receptors (рецепторы, активируемые пероксисомами);

ТРР – Torpa Peat Preparation (польский препарат на основе гуминовых кислот торфа).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Анализ антиоксидантных свойств экстрактов растений / И.В. Лагута, О.Н. Ставинская, О.И. Дзюба, Р.В. Иванников // Доп. НАН Украины. - 2015. - № 5. - С. 130-137.
2. Антиоксидантная активность высокомолекулярных соединений гуминовой природы / М.В. Зыкова, Л.А. Логвинова, С.В. Кривошеков и др. // Химия растительного сырья. - 2018. - № 3. - С. 239-250.
3. Архипов, В.С. Состав и свойства типичных видов торфа центральной части Западной Сибири / В.С. Архипов, С.Г. Маслов // Химия растительного сырья. - 1998. - № 4. - С. 9-16.
4. Бажина, Н.Л. Специфика поглощения света в видимой и ультрафиолетовой области спектра гуминовыми кислотами почв западной части территории Тувы / Н.Л. Бажина, Е.Э. Ондар, Ю.М. Дерябина // Вестник ОГУ. - 2014. - № 6. - С. 189-194.
5. Бакина, Л.Г. Особенности извлечения гумусовых кислот из почв растворами пирофосфата натрия различной щелочности / Л.Г. Бакина, Н.Е. Орлова // Почвоведение. - 2012. - № 4. - С. 445-452.
6. Бамбалов, Н.Н. Использование торфа в качестве органического сырья для химической переработки / Н.Н. Бамбалов // Химия твердого топлива. - 2012. - № 5. - С. 6-12.
7. 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.
8. Беркович, А.М. Гуминовые вещества: краткий очерк химизма и возможностей медико-биологического использования / А.М. Беркович // Итоги и перспективы применения гуминовых препаратов в продуктивном животноводстве, коневодстве и птицеводстве: сборник докладов конференции / Московская Государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии им К.И. Скрябина. - Москва, 2006. - С. 14-21.

9. Биохимия мышечной деятельности / Н.И. Волков, Э.Н. Несен, А.А. Осипенко, С.Н. Корсун. - Москва: Олимпийская литература, 2000. - 494 с.
10. Бойкова, О.И. Химические и биологические свойства торфов Тульской области / О.И. Бойкова, Е.М. Волкова // Известия Тульского государственного университета. Естественные науки. - 2013. - № 3. - С. 253-264.
11. Болотные системы Западной Сибири и их природное значение / О.Л. Лисс, Л.И. Абрамова, Н.А. Аветов и др. – Тула: Гриф и К⁰, 2001. - 584 с.
12. Болотные стационары Томского государственного педагогического университета / Л.И. Инишева, В.Ю. Виноградов, О.А. Голубина и др. - Томск: ТГПУ, 2010. - 118 с.
13. Бузлама, А.В. Изучение гипогликемических и антидиабетических свойств гуматов различного происхождения в эксперименте / А.В. Бузлама, Ю.Н. Чернов, А.И. Сливкин // Вестник Воронежского государственного университета. - 2010. - № 1. - С. 140-145.
14. Бузлама, А.В. Изучение мембранотропной активности солей гуминовых кислот леонардита / А.В. Бузлама // Сборник статей Всероссийской науч. - практич. конф. с международн. участием «От фундаментальных исследований - к инновационным медицинским технологиям». - Санкт-Петербург, 2010. - С. 15-16.
15. 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.
16. Буренина, Л.В. Оценка эффективности 3-гидроксиэтилпиридина малата в коррекции сердечно-сосудистых нарушений, вызванных ишемическим поражением головного мозга на фоне экспериментального сахарного диабета / Л.В. Буренина, С.В. Гарина, О.Н. Солдатова // Самарский научный вестник. - 2015. - № 2 (11). - С. 32-38.

17. Ващенко, В.И. Цитохром С как лекарственное средство: прошлое, настоящее, будущее / В.И. Ващенко, К.П. Хансон, П.Д. Шабанов // Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии. - 2005. - Т. 4, № 1. - С. 27-37.
18. Влияние влажности торфа на выход и групповой состав битумов / А.С. Орлов, И.Н. Зубов, О.Н. Ярыгина и др. // Успехи современного естествознания. - 2018. - № 1. - С. 120-124.
19. Влияние гуминовых веществ пелоидов на процессы свободнорадикального окисления / Н.П. Аввакумова, А.В. Жданова, М.Н. Глубокова, Ю.В. Жернов // Известия Самарского научного центра Российской академии наук. - 2011. - Т. 13, № 1. - С. 1960-1963.
20. Влияние гуминовых кислот торфа различных способов экстракции на функциональную активность макрофагов *in vitro* / Е.С. Трофимова, М.В. Зыкова, А.А. Лигачева и др. // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. - 2016. - Т. 162, № 12. - С. 708-713.
21. Влияние источника и условий торфонакопления на индивидуальный состав битуминозных компонентов торфа на примере низинных болот Западной Сибири / О.В. Серебренникова, Е.Б. Стрельникова, Ю.И. Прейс, М.А. Дучко // Известия Томского политехнического университета. Химия и химические технологии. - 2014. - Т. 325, № 3. - С. 80-91.
22. Влияние нативных гуминовых кислот низинного торфа Томской области на окислительное фосфорилирование в митохондриях в условиях гипоксии / М.В. Белоусов, Р.Р. Ахмеджанов, М.В. Зыкова и др. // Химико-фармацевтический журнал. - 2015. - Т. 49, № 4. - С. 39-43.
23. Влияние применения кардиоцитопротекторов при кардиохирургических вмешательствах на развитие миокардиальной дисфункции в послеоперационном периоде / А.В. Богуш, А.Ю. Сморкалов, Ю.Д. Бричкин, Е.В. Сандалкин // Мед. альм. - 2015. - № 3 (38). - С. 120-124.

24. Влияние условий формирования болотных экосистем на химический состав органических соединений торфа / Н.Г. Аверина, Н.В. Козел, В.А. Ракович и др. // Природопользование. - 2018. - № 1. - С. 162-175.
25. Водяницкий, Ю.Н. Методы расчета ароматичности гумусовых кислот / Ю.Н. Водяницкий // Почвоведение. - 2001. - № 3. - С. 289-294.
26. Возможности применения милдроната в комплексном лечении хронической сердечной недостаточности у больных в раннем постинфарктном периоде / М.Е. Стаценко, Г.В. Старкова, О.А. Говоруха и др. // Российский кардиологический журнал - 2005. - № 6 (56). - С. 62-66.
27. Волков, В.А. Кинетический метод анализа антирадикальной активности экстрактов растений / В.А. Волков, Н.А. Дорофеева, П.М. Пахомов // Химико-фармацевтический журнал. - 2009. - Т. 43, № 6. - С. 27-31.
28. Волчегорский, В.А. Экспериментальное моделирование и лабораторная оценка адаптивных реакций организма / В.А. Волчегорский. - Челябинск: ЧГПУ, 2000. - 167 с.
29. Выбор условий регистрации количественных ^{13}C -ЯМР-спектров гумусовых кислот / Д.В. Ковалевский, А.Б. Пермин, И.В. Перминова, В.С. Петросян // Вестн. Моск. ун-та. - 2000. - Т. 41, № 1. - С. 39-42.
30. Голубина, О.А. Химическая характеристика углеводородного сырья месторождения «Таган» / О.А. Голоубина // Вестник ВГУ, Серия: химия, биология, фармация. - 2015, № 3. - С. 11-18.
31. Горбов, С.Н. Свойства гуминовых кислот почв урбанизированных территорий (на примере г. Ростов-на-Дону) / С.Н. Горбов, О.С. Безуглов // Научный журнал Российского НИИ проблем мелиорации. - 2013. - Т. 2, № 10. - С. 89-103.
32. ГОСТ Р-53434-2009 Принципы надлежащей лабораторной практики. – Введ. 01.03.2010. - Москва: Стандартинформ, 2010. - 11 с.
33. ГОСТ 28245-89 Торф. Методы определения ботанического состава и степени разложения. - Введ. 01.07.1990. - Москва: Стандартинформ, 2006. - 7 с.

34. Гостищева, М.В. Химико-фармакологическое исследование нативных гуминовых кислот торфов Томской области: дисс. ... канд. фарм. наук / М.В. Зыкова. - Пермь, 2008. - 189 с.
35. Государственная фармакопея Российской Федерации XIV издания, Том I. Введение. Общие положения. Методы анализа ЛС. Реактивы [Электронный ресурс] / С.В. Емашанова, О.Г. Потанина, Е.В. Буданова, В.В. Чистяков // Федеральная электронная медицинская библиотека. – 2018. – Режим доступа [resource.rucml.ru / feml / pharmacopia / 14_1/HTML/121/index](http://resource.rucml.ru/feml/pharmacopia/14_1/HTML/121/index)
36. Грехова, И.В. Гуминовый препарат из низинного торфа / И.В. Грехова // Сборник статей VI Всероссийской научной конференции с международным участием «Гуминовые вещества в биосфере». - Сыктывкар, 2014. - С. 121-124.
37. Гуминовые вещества торфа и их практическое использование / И.И. Лиштван, Н.Н. Бамбалов, А.В. Тишкович и др. // Химия твёрдого топлива. - 1990. - № 6. - С. 14-20.
38. Гуминовые кислоты окисленных бурых углей некоторых месторождений России и Монголии / Н.В. Лукьянов, А.М. Сыроежко, В.А. Ицкович, Н.В. Славошевская // Известия Санкт-Петербургского государственного технологического института (Технического университета). - 2013. - № 22 (48). - С. 53-55.
39. Гуминовые кислоты торфа и препараты на их основе / И.И. Лиштван, Ф.Н. Капуцкий, Ю.Г. Янута и др. // Природопользование. - 2004. - № 10. - С. 114-119.
40. Гуминовые кислоты. Спектральный анализ и структура фракций / И.И. Лиштван, Ф.Н. Капуцкий, Ю.Г. Янута и др. // Вестник БГУ. - 2012. - № 1. - С. 18-23.
41. Дегтярев, В.П. Кровообращение / В.П. Дегтярев, А.Ю. Шишелова // Краткий курс нормальной физиологии: уч. пособие. - Москва: ИКАР, 2001. - Глава 8. - С. 132-165.
42. Долгова, В.В. Клиническая лабораторная диагностика: национальное руководство: в 2 т. / В.В. Долгова, В.В. Меньшикова. - Москва: ГЭОТАР-Медиа, 2012. - 928 с.

43. Драчева, Л.С. Применение вольтамперометрического метода при изучении биоантиоксидантов / Л.В. Драчева, Е.И. Короткова, Е. Дорожко // Пищевая промышленность. - 2008. - № 4. - С. 28-29.
44. Егошина, О.С. Определение группового состава органической массы торфа на основе генетической классификации с учетом детальной разведки / О.С. Егошина, Б.М. Александров // Известия высших учебных заведений. Горный журнал. - 2018. - № 1. - С. 15-21.
45. Жеребцов, С.И. Влияние алкилирования бурого угля и торфа на состав и свойства выделяемых из них гуминовых кислот / С.И. Жеребцов, З.Р. Исмагилов // Химия твердого топлива. - 2012. - № 6. - С. 8-22.
46. Жернов, Ю.В. Первый отечественный кандидатный микробицид на основе гуминовых веществ для топической профилактики ВИЧ-инфекции: дис. ... д-ра мед. наук / Ю.В. Жернов. - Москва, 2018. - 348 с.
47. Жилиякова, Т.П. Влияние химических свойств торфов на состав щелочного экстракта / Т.П. Жилиякова, Л.В. Касимова // Химия растительного сырья. - 2003. - № 3. - С. 35-39.
48. Забелкин, С.А. Исследование процесса термохимической переработки торфа и свойств продуктов, полученных при разных температурах пиролиза / С.А. Забелкин, А.А. Макаров, И.Г. Земсков. Вестник Казанского технологического университета. - 2013. - Т. 16, № 21. - С. 115-118.
49. Заславский, Е.М. Методические подходы к изучению гуминовых веществ в морских осадках / Е.М. Заславский // Методы исследования органического вещества в океане. - Москва: Наука, 1980. - С. 176-186.
50. Зыкова, М.В. Высокомолекулярные соединения гуминовой природы – перспективные биологически активные соединения / М.В. Зыкова, Л.А. Логвинова, М.В. Белоусов // Традиционная медицина. - 2018. - № 2 (53). - С. 27-38.
51. Зыкова, М.В. Методология комплексного исследования высокомолекулярных соединений гуминовой природы: дисс. ... д-ра фарм. наук / М.В. Зыкова. - Томск, 2018. - 384 с.

52. Иванов, А.А. Механохимическая обработка верхового торфа / А.А. Иванов, Н.В. Юдина, О.И. Ломовский // Химия растительного сырья. - 2004. - № 2. - С. 55-60.
53. Иванов, А.Н. Барьерная функция эндотелия, механизмы ее регуляции и нарушения / А.Н. Иванов, Д.М. Пучиньян, И.А. Норкин // Успехи физиологических наук. - 2015. - № 2. - С. 72-95.
54. Изменение антиоксидантной активности гуминовых и фульвокислот в процессе хранения / С.Г. Маслов, С.А. Кусмауль, О.А. Воронова, Е.И. Короткова // Химия растительного сырья. - 2013. - № 4. - С. 193-199.
55. Изменение химического состава гуминовых кислот в процессе торфообразования и диагенеза торфа / Е.С. Лукошко, Л.В. Пигулевская, А.В. Хоружик, Н.С. Янковская // Химия твёрдого топлива. - 1980. - № 1. - С. 54-59.
56. Изменения состава гуминовых веществ в зависимости от глубины залегания торфа / В.В. Марыганова, Н.Н. Бамбалов, В.П. Стригуцкий, С.В. Пармон // Химия твердого топлива. - 2013. - № 3. - С. 19-30.
57. Изучение антиоксидантных свойств солей гуминовых кислот в экспериментальных условиях / А.В. Бузлама, Ю.Н. Чернов, Ю.М. Дронова, М.А. Астанина // Научные ведомости. Серия медицина. Фармация. - 2011. - № 1 (111). - С. 214-221.
58. Изучение химико-токсикологических свойств гуминовых кислот низинного торфа Томской области / М.В. Гостищева, М.В. Белоусов, Р.Р. Исмадова и др. // Башкирский химический журнал. - 2008. - Т. 15, № 2. - С. 67-71.
59. Инишева, Л.И. К вопросу о химической классификации торфов для сельскохозяйственного использования / Л.И. Инишева, Л. Шайдак // Сибирский вестник сельскохозяйственной науки. - 2015. - № 2 (243). - С. 5-12.
60. Инишева, Л.И. Скорость минерализации органического вещества торфов / Л.И. Инишева, Т.В. Дементьева // Почвоведение. - 2000. - № 2. - С. 196-203.

61. Исмадова, Р.Р. Экспериментальное изучение гумата натрия из торфа для применения при аллергодерматозах / Р.Р. Исмадова, А.У. Зиганшин, С.Е. Дмитрук // Современные наукоемкие технологии. - 2007. - № 3. - С. 28-30.
62. Использование гуминовых кислот твердых горючих ископаемых / Г.С. Головин, Е.Б. Лесникова, Н.И. Артемова, В.П. Лукичева // Химия твердого топлива. - 2004. - № 6. - С. 43-49.
63. Использование отдельных фракций липидов сапропеля для коррекции желчевыделительной функции печени крыс при токсико-химическом гепатите / С.В. Низкодубова, Т.В. Ласукова, Ю.Б. Дорофеева, Н.П. Шестакова // Бюллетень сибирской медицины. - 2014. - Т. 13, № 6. - С. 160-164.
64. Исследование кардиотоксических свойств нативных гуминовых кислот торфа / М.В. Белоусов, Р.Р. Ахмеджанов, М.В. Зыкова и др. // Бюллетень сибирской медицины. - 2014. - Т. 13, № 1. - С. 14-19.
65. Исследование состава терпеноидов надземных органов спиреи иволистной (*Spiraea salicifolia* L.) методом хромато-масс-спектрометрии / В.М. Миревич, Г.М. Федосеева, И.М. Кривошеев и др. // Вестник Бурятского государственного университета. - 2012. - № 3. - С. 104-108.
66. Исследование химических и токсических свойств гуминовых кислот низинного древесно-травяного торфа Томской области / М.В. Гостищева, М.В. Белоусов, Р.Р. Ахмеджанов и др. // Бюллетень Сибирской медицины. - 2009. - Т. 4, № 2. - С. 27-33.
67. Казеев, К.Ш. Исследование биохимических свойств почв / К.Ш. Казеев, С.И. Колесников, В.Ф. Вальков // Биологическая диагностика и индукция почв: методология и методы исследований / К.Ш. Казеев, С.И. Колесников, В.Ф. Вальков. - Ростов-на-Дону: РГУ, 2003. - Гл. 6. - С. 147-173.
68. Камышников, В.С. Справочник по клинико-биохимической лабораторной диагностике: в 2 т. / В.С. Камышников. - Минск: Беларусь, 2000. - Т. 2. - 463 с.

69. Капелько, В.И. Кальциевая регуляция сокращения и расслабления сердечной мышцы / В.И. Капелько, М.С. Горина // Регуляция сократительной функции и метаболизма миокарда. - Москва: Наука, 1987. - С. 79-112.
70. Караванова, И.В. Оптические свойства почвы / И.В. Караванова. - Москва: Наука, 2003. - 185 с.
71. Кардиоваскулярные эффекты высокомолекулярных соединений гуминовой природы / М.В. Зыкова, М.В. Белоусов, Т.В. Ласукова и др. // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. - 2017. - Т. 163, № 2. - С. 167-170.
72. Кассиль, Г.Н. Внутренняя среда организма / Г.Н. Кассиль. - 2-е доп. и перераб. изд. - Москва: Наука, 1983 г. - 227 с.
73. Кац, Н.Я. Атлас растительных остатков в торфах / Н.Я. Кац, С.В. Кац, Е.И. Скобеева. Москва: «Недра», 1977. – 376 с.
74. Кашинская, Т.Я. Влияние технологий добычи на качество торфа как битуминозного сырья / Т.Я. Кашинская // Природопользование. - 2015. - № 27. – С 198-205.
75. Ковалевский, Д.В. Исследование структуры гумусовых кислот методами спектроскопии ЯМР ^1H и ^{13}C : дисс. ... канд. хим. наук / Д.В. Ковалевский. - Москва, 1998. - 140 с.
76. Комиссаров, И.Д. Гуминовые препараты / И.Д. Комиссаров. - Тюмень, 1964. - 267 с.
77. Коржов, Ю.В. Состав гексан-хлороформного экстракта верховых торфов южной тайги Западной Сибири / Ю.В. Коржов, Н.Г. Корнаторова // Химия растительного сырья. - 2013. - № 3. - С. 213-220.
78. Кудеярова, А.Ю. Использование электронной спектроскопии для выявления структурных различий гумусовых кислот целинной и пахотной серой лесной почвы / А.Ю. Кудеярова // Почвоведение. - 2008. - № 9. - С. 1079-1091.

79. Кудеярова, А.Ю. Об информативности электронных спектров гумусовых веществ / А.Ю. Кудеярова // Почвоведение. - 2001. - № 11. - С. 1323-1331.
80. Кудеярова, А.Ю. Приложение фундаментальных положений химии к пониманию механизмов образования и трансформации гумусовых веществ / А.Ю. Кудеярова // Почвоведение. - 2007. - № 9. - С. 1048-1063.
81. Кузнецов, Р.А. Основные механизмы профилактики и коррекции плацентарной недостаточности гуминовыми соединениями в эксперименте / Р.А. Кузнецов, Л.П. Перетятко // Вестник новых медицинских технологий. - 2007. - № 3. - С. 19-23.
82. Кулешов, С.М. Влияние «Биоэффекта ДВ-1» на заживление экспериментальных и случайных ран у животных / С.М. Кулешов // Научный журнал КубГАУ. - 2007. - № 26. - С. 1-8.
83. Лодыгин, Е.Д. Парамагнитные свойства гумусовых кислот подзолистых и болотно-подзолистых почв / Е.Д. Лодыгин, В.А. Безносиков, С.Н. Чуков // Почвоведение. - 2007. - № 7. - С. 807-810.
84. Маколкин, В.И. Роль миокардиальной цитопротекции в оптимизации лечения ишемической болезни сердца / В.И. Маколкин, К.К. Осадчий // Consilium medicum. - 2004. - Т. 6, № 5. - С. 304-307.
85. Мальцева, Е.В. Электровосстановление кислорода в присутствии гуминовых кислот / Е.В. Мальцева, Н.В. Юдина, О.И. Ломовский // Журнал физической химии. - 2011. - Т. 85, № 7. - С. 1363-1367.
86. Маршалов, Д.В. Реперфузионный синдром: понятие, определение, классификация / Д.В. Маршалов, А.П. Петренко, И.А. Глушач // Патология кровообращения и кардиохирургия. - 2008. - № 3. - С. 67-72.
87. Марыганова, В.В. Влияние вида экстрагента на структурные особенности гуминовых кислот торфяно-болотной почвы / В.В. Марыганова, Н.Н. Бамбалов, Т.Я. Беленькая // Природопользование. - 1997. - № 3. - С. 11-13.
88. Марыганова, В.В. Особенности химического состава и структуры гуминовых кислот, выделенных последовательной экстракцией торфа

пирофосфатом и гидроксидом натрия / В.В. Марыганова, Н.Н. Бамбалов, Л.Ю. Тычинская // Химия твердого топлива. – 2006. - № 3. - С. 3-11.

89. Меерсон, Ф.З. Адаптация к стрессорным ситуациям и физическим нагрузкам / Ф.З. Меерсон, М.Г. Пшенникова. - Москва: Наука, 1988. - 256 с.

90. Мельдоний: эффективные точки применения / А.Л. Верткин, Н.О. Ховасова, В.В. Пшеничникова и др. // Кардиоваскулярная терапия и профилактика. - 2013. - № 12 (2). - С. 94-97.

91. Метелица, В.И. Аритмогенное действие лекарственных средств / Экспериментальная и клиническая фармакология. - 2005. - Т. 68, № 2. - С. 68-77.

92. Механизм действия препаратов гуминовых веществ / В.С. Бузлама, В.Н. Долгополов, А.В. Сафонов, С.В. Бузлама // Сборник докладов конференции «Итоги и перспективы применения гуминовых препаратов в продуктивном животноводстве, коневодстве и птицеводстве». - Москва, 2006. - С. 24-35.

93. Милановский, Е.Ю. Гумусовые вещества почв как природные гидрофобно-гидрофильные соединения / Е.Ю. Милановский. - Москва: ГЕОС, 2009. - 186 с.

94. Миронов, А.А. Вторичная структура макромолекулы гуминовых кислот / А.А. Миронов // Сборник статей VI Всероссийской научной конференции с международным участием «Гуминовые вещества в биосфере». - Сыктывкар, 2014. - С. 66-69.

95. Михин, В.П. Цитопротекция в кардиологии: достигнутые успехи и перспективы. Часть 1 / В.П. Михин // Архив внутренней медицины. - 2014. - № 1 (15). - С. 44-49.

96. Михин, В.П. Цитопротекция в кардиологии: достигнутые успехи и перспективы. Часть 2 / В.П. Михин // Архив внутренней медицины. - 2014. - № 2 (16). - С. 33-41.

97. Мотузова, Г.В. Сравнительная характеристика гуминовых кислот пахотных почв таёжной, степной и полупустынной зон / Г.В. Мотузова, Х.М. Дерхам, А.А. Степанов // Почвоведение. - 2012. - № 11. - С. 1171-1180.
98. Наумова, Л.Б. Обменные катионы и их влияние на гидрофильность торфа / Л.Б. Наумова, Н.П. Горленко, А.И. Казарин // Химия растительного сырья. - 2003. - № 3. - С. 51-56.
99. Нестерова, О.В. Характеристика гуминовых кислот буроземов юга Сихотэ-Алиня по данным элементного анализа и ИК-спектроскопии (на примере Уссурийского заповедника) / О.В. Нестерова, В.А. Семаль // Вестник КрасГАУ. - 2009. - № 10. - С. 29-35.
100. Носкова, Л.П. Групповой состав кислот низкокалорийного угля / Л.П. Носкова // Фундаментальные исследования. - 2015. - № 9 (3). - С. 497-501.
101. О структуре систем полисопряжения в торфах / В.М. Дударчик, С.Г. Прохоров, Т.П. Смычник и др. // Доклады НАН Беларуси. - 2003. - Т. 47, № 3. - С. 78-80.
102. Определение карбоксильной кислотности гумусовых кислот титриметрическими методами / Н.Н. Данченко, И.В. Перминова, А.В. Гармаш, А.В. Кудрявцев // Вестник Московского университета. - 1998. - Т. 39, № 2. - С. 127-131.
103. Определение состава препаратов гуминовых кислот различной чистоты методами спектроскопии / Д.В. Ненахов, В.В. Котов, К.Е. Стекольников и др. // Сорбционные и хроматографические процессы. - 2009. - Т. 9, № 5. - С. 665-670.
104. Орлов, Д.С. Гуминовые вещества в биосфере / Д.С. Орлов // Соровский образовательный журнал. - 1997. - № 2. - С. 53-63.
105. Орлов, Д.С. Гумусовые кислоты почв и общая теория гумификации / Д.С. Орлов. - Москва: МГУ, 1990. - 325 с.
106. Орлов, Д.С. Некоторые особенности гуминовых кислот сапротелей / Д.С. Орлов, Е.В. Кречетова // Агрохимия. - 1995. - № 2. - С. 63-72.
107. Орлов, Д.С. Сравнительная характеристика гуминовых препаратов опытно-промышленных производств / Д.С. Орлов, Г.В. Наумова,

- Я.М. Аммосова и др. // Гуминовые вещества в биосфере / под ред. Д.С. Орлова. - Москва: Наука, 1993. - С. 207-221.
108. Орлов, Д.С. Химия почв / Д.С. Орлов. - Москва: МГУ, 1992. - 259 с.
109. Оценка качества бурых углей месторождения Улаан-овоо Монголии спектроскопическими методами / Р. Эрдэнэчимэг, Л.Н. Новикова, Б. Пурэвсүрэн и др. // Химия твердого топлива. - 2009. - № 2. - С. 7-11.
110. Пат. 2610446 Российская Федерация, МПК А61К35/10. Средство на основе гуминовых кислот из торфа болот Томской области для повышения продукции оксида азота макрофагами *in vitro* и способ его получения / М.В. Зыкова, М.Г. Данилец, С.В. Кривошеков и др. № 2015131867; заявл. 30.07.15, опубл. 13.02.17, Бюл. № 4.
111. Пат. 2617206 Российская Федерация, МПК G 09В 23/28 Способ моделирования физического переутомления у крыс в условиях десинхроноза / А.А. Гостюхина, К.В. Зайцев, Т.А. Замощина и др. № 2015133700; заявл. 11.08.2015; опубл. 21.04.2017. Бюл. № 12. – 8 с.
112. Перминова, И.В. Анализ, классификация и прогноз свойств гумусовых кислот: дис. ... д-ра хим. наук / И.В. Перминова. - Москва, 2000. - 359 с.
113. Перминова, И.В. Гуминовые вещества – вызов химикам XXI века / И.В. Перминова // Химия и жизнь. - 2008. - № 1. - С. 50-56.
114. Перминова, И.В. Гуминовые вещества в контексте зеленой химии / И.В. Перминова, Д.М. Жилин // Зеленая химия в России. Сборник статей / под ред. В.В. Лунина, П. Тундо, Е.С. Локтевой. - Москва: МГУ, 2004. - С. 146-162.
115. Платонов, В.В. Особенности химического состава органической массы торфов и биологическая активность препаратов на их основе / В.В. Платонов, М.Н. Горохова // Вестник новых медицинских технологий. Электронный журнал. - 2016. - Т. 10, № 2. - С. 21-49.
116. Платонов Г.М. Болота северной части междуречья Оби и Томи // Заболоченные леса и болота Сибири. М.: Изд-во Академии Наук СССР, 1963.- С. 65-87.

117. Поведенческая активность крыс в «открытом поле» после световой или темновой деприваций и физического переутомления / А.А. Гостюхина, Т.А. Замощина, М.В. Светлик и др. // Бюллетень сибирской медицины. - 2016. - Т. 15, № 3. - С. 16-23.
118. Полисахариды из торфов и мхов / Т.Л. Зайцева, Ю.Ю. Навоша, Л.С. Шеремет и др. // Химия растительного сырья. -1999. - № 4. - С. 97-100.
119. Полуянова, И.Е. Биологическая активность гуминовых веществ, получаемых из торфа, и возможности их использования в лечебной практике / И.Е. Полуянова // Международные обзоры: клиническая практика и здоровье. - 2017. - № 4 (27). - С. 114-122.
120. Попов, А.И. Гуминовые вещества: свойства, строение, образование / А.И. Попов. - Санкт-Петербург: Изд-во С.-Петербур. ун-та, 2004. - 248 с.
121. Применение методов оптической спектроскопии для исследования гуминовых веществ мерзлых толщ / Л.Т. Ширшова, Д.А. Гиличинский, Н.В. Остроумова, А.М. Ермолаев // Криосфера земли. - 2013. - Т. 27, № 4. - С. 94-104.
122. Раковский, В.Е. Химический состав торфообразователей / В.Е. Раковский, Л.В. Пигулевская // Химия и генезис торфа / под ред. А.В. Лазарева. - Москва: Недра, 1978. - Гл. 2. - С. 29-54.
123. Распределение n-алканов, стероидов и тритерпеноидов в торфе и растениях болота Тёмное / М.А. Дучко, Е.В. Гулая, О.В. Серебrenикова и др. // Известия Томского политехнического университета. - 2013. - Т. 323, № 1. - С. 40-44.
124. Роль NO-синтазы в реализации кардиопротективного эффекта соединений гуминовой природы на модели ишемии и реперфузии изолированного сердца крыс / Т.В. Ласукова, М.В. Зыкова, М.В. Белоусов и др. // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. - 2018. - Т. 166, № 11. - С. 537-540.

125. Русьянова, Н.Д. Происхождение твердых горючих ископаемых и их характеристика / Н.Д. Русьянова // Углекислотная химия / Н.Д. Русьянова. - Москва: Наука, 2003. - С. 17-67.
126. Савельева, А.В. Механохимическая модификация торфяных гуминовых кислот / А.В. Савельева, Н.В. Юдина // Химия твердого топлива. - 2014. - № 5. - С. 56-59.
127. Садовникова, И.И. Кардиопротекторы. Недооценённые возможности / И.И. Садовникова // Российский медицинский журнал. - 2009. - Т. 17, № 18. - С. 1132-1134.
128. Сарыева, О.В. Морфология тимуса, селезенки, надпочечников и особенности физического развития крыс под влиянием гуминовых соединений: автореф. дисс. ... канд. мед. наук / О.В. Сарыева. - Москва, 2006. - 23 с.
129. 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.
130. Сейфулла, Р.Д. Антиоксиданты / Р.Д. Сейфулла, Е.А. Рожкова, Е.К. Ким // Экспериментальная и клиническая фармакология. - 2009. - Т. 72, № 3. - С. 60-64.
131. Сизова, Н.В. Исследование антиоксидантной активности липидов торфов и сапропелей Западной Сибири / Н.В. Сизова, Е.Б. Стрельникова, И.В. Русских // Химия растительного сырья. - 2017. - № 4. - С. 181-186.
132. Смирнова, Ю.В. Механизм действия и функции гуминовых препаратов / Ю.В. Смирнова, В.С. Виноградова // Агрохимический вестник. - 2004. - № 1. - С. 22-23.
133. Сорбционные свойства торфа и гуминовых кислот по отношению к благородным металлам / В.И. Радомская, Л.М. Павлова, Л.П. Носкова и др. // Химия растительного сырья. - 2014. - № 3. - С. 279-288.

134. Спектральные исследования фракций гуминовых кислот / И.И. Лиштван, Ф.Н. Капуцкий, Ю.Г. Янута и др. // Химия твердого топлива. - 2006. - № 4. - С. 3-11.
135. Стандартизация гуминовых кислот низинного древесно-травяного вида торфа Томской области / М.В. Зыкова, М.В. Белоусов, А.М. Гурьев и др. // Химико-фармацевтический журнал. - 2013. - Т. 47, № 12. - С. 53-56.
136. Степанов, А.А. Применение ^1H -ЯМР спектроскопии для характеристики гуминовых веществ / А.А. Степанов, Л.В. Жаркова, Е.А. Степанова // Почвоведение. - 1997. - № 2. - С. 173-177.
137. Страмковская, К.К. Исследование фенолов смолы термического разложения торфа / К.К. Страмковская, Л.Ф. Карпова, Г.И. Кравцова // Известия Томского ордена трудового красного знамени политехнического института имени С.М. Кирова. - 1970. - Т.163. - С. 65-68.
138. Стригуцкий, В.П. Особенности ЭПР-спектроскопии природных высокомолекулярных соединений / В.П. Стригуцкий // Химия твердого топлива. - 1981. - № 5. - С. 21-27.
139. 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.
140. 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.
141. Строение гуминовых кислот, извлекаемых в ходе последовательной щелочной экстракции из чернозема / В.А. Холодов, А.И. Константинов, Е.Ю. Беляева и др. // Почвоведение. - 2009. - № 10. - С. 1177-1183.
142. Тах, И.П. Ферментативная активность различных типов почв лесостепного пояса в условиях Западного Кавказа / И.П. Тах, А.Х. Агиров // Новые технологии. - 2009. - № 4. - С. 63-67.

143. Томсон, А.Э. Торф и продукты его переработки / А.Э. Томсон, Г.В. Наумова. - Минск: Беларус. Навука, 2009. - 328 с.
144. Торфяные ресурсы Томской области и их использование / Л.И. Инишева, В.С. Архипов, С.Г. Маслов, Л.С. Михантьева. - Новосибирск, 1995. - 88 с.
145. Трансформация систем полисопряжения гуминовых кислот в процессе метаморфизма каустобиолитов / И.И. Лиштван, В.П. Стригуцкий, Ю.Г. Янута и др. // Химия твердого топлива. - 2012. - № 3. - С. 14-19.
146. Фармакологическая коррекция утомления / Ю.Г. Бобков, В.М. Виноградов, В.Ф. Катков и др. Москва: Медицина, 1984 г. - 209 с.
147. Фенольные соединения сфагнового торфа / Г.В. Наумова, А.Э. Томсон, Н.А. Жмакова // Химия твердого топлива. - 2013. - № 1. - С. 24-27.
148. Физика и химия торфа / И.И. Лиштван, Е.Т. Базин, Н.И. Гамаюнов, А.А. Терентьев. - Москва: Недра, 1989. - 304 с.
149. Физико-химические свойства гуминовых веществ торфа и бурого угля / Л.Г. Сивакова, Н.П. Лесникова, Н.М. Ким, Г.М. Ротова // Химия твердого топлива. - 2011. - № 1. - С. 3-8.
150. Филиппенко, Т.А. Фенольные соединения растительных экстрактов и их активность в реакции с дифенилпикрилгидразилом / Т.А. Филиппенко, Н.И. Белая, Ф.Н. Николаевский // Химико-фармацевтический журнал. - 2004. - Т. 38, № 8. - С. 34-36.
151. Филов, В.А. Гуминовые вещества: краткий очерк химизма и возможностей медико-биологического использования / В.А. Филов, А.М. Беркович // Сборник докладов конференции «Итоги и перспективы применения гуминовых препаратов в продуктивном животноводстве, коневодстве и птицеводстве». - Москва, 2006. - С. 6-12.
152. Флуоресценция водных растворов промышленных гуминовых препаратов / О.Ю. Гостева, А.А. Изосимов, С.В. Пацаева и др. // Журнал прикладной спектроскопии. - 2011. - Т. 78, № 6. - С. 943-950.

153. Флуоресценция растворенного органического вещества природной воды / О.М. Горшкова, С.В. Пацаева, Е.В. Федосеева и др. // Вода: химия и экология. - 2009. - № 11. - С. 31-39.
154. Хилько, С.Л. Антиоксидантные свойства гуминовых кислот из бурого угля / С.Л. Хилько, И.В. Ефимова, О.В. Смирнова // Химия твердого топлива. - 2011. - № 6. - С. 3-8.
155. Химический состав липидов типичных растений-торфообразователей олиготрофных болот лесной зоны Западной Сибири / О.В. Серебренникова, Е.В. Гулая, Е.Б. Стрельникова и др. // Химия растительного сырья. - 2014. - №. 1. - С. 257-262.
156. Чуков, С.Н. Структурно-функциональные параметры органического вещества почв в условиях антропогенного воздействия / С.Н. Чуков. - Санкт-Петербург: Изд-во Спб. Ун-та, 2001. - 216 с.
157. Шевцова, С.П. К вопросу о бальнеологических факторах Хасанского района Приморского края / С.П. Шевцова // Известия Дальневосточного федерального университета. Экономика и управление. - 1998. - С. 98-99.
158. Ширшова, Л.Т. Исследование гуминовых веществ почвы методом флуоресцентной спектроскопии / Л.Т. Ширшова, Т.Э. Хомутова, А.М. Ермолаев // Агрохимия. - 2004. - № 4. - С. 78-85.
159. Шпынова, Н.В. Спектральные характеристики гуминовых кислот органогенных отложений Обь-Иртышского междуречья / Н.В. Шпынова, М.П. Сартаков // Вестник Югорского государственного университета. - 2010. - Т. 19, № 4. - С. 88-91.
160. Шубина, Д.М. Спектральные свойства водных растворов промышленных гуминовых препаратов / Д.М. Шубина, О.С. Якименко, С.В. Пацаева // Вода: химия и экология. - 2010. - № 2. - С. 22-26.
161. Экспериментальное доклиническое исследование регенераторной активности субстанции растительных полифенолов / А.В. Бузлама, А.И. Сливкин, Ю.Н. Чернов, И.В. Фролова // Вестник Воронежского

государственного университета. Серия: химия, биология, фармация. - 2009. - № 1. - С. 101-106.

162. 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.

163. Яркова, Т.А. Среднестатистическая структурная модель гуминовых кислот торфяного происхождения / Т.А. Яркова, А.М. Гюльмалиев // Химия твердого топлива. - 2012. - № 5. - С. 3-5.

164. 3-D structural modeling of humic acids through experimental characterization, computer assisted structure elucidation and atomistic simulations. 1. Chelsea soil humic acid / M.S. Dialo, A. Simson, P. Gassman et al. // Environ Sci Technol. - 2003. Vol. 37. - P. 11-21.

165. A comparison of the developmental characteristics of *Neisseria gonorrhoeae* and *Staphylococcus aureus* cultures on nutrient media of different compositions / T.V. Skliar, A.V. Krysenko, V.G. Gavriliuk, A.I. Vinnikov // Mikrobiol. - 1998. - Vol. 60. - P. 25-30.

166. Alberts, J.J. Total luminiscence spectra of IHSS standard and reference fulvic acids, humic acids and natural organic matter: comparison of aquatic and terrestrial source terms / J.J. Alberts, M. Takacs // Organic Geochemistry. - 2004. - Vol. 35, N 3. - P. 243-256.

167. Alvarez-Puebla, R.A. Characterization of the porous structure of different humic fractions / R.A. Alvarez-Puebla, P.J.G. Goulet, J.J. Garrido // Colloids Surf A: Physicochem Eng Asp. - 2005. - Vol. 256, N 2-3. - P. 129-135.

168. Analytical chemistry of freshwater humic substances / S. McDonald, A.G. Bishop, P.D. Prenzler, K. Robards // Anal Chimica Acta. - 2004. - Vol. 527. - P. 105-124.

169. Angiogenesis and cardioprotection after TNF α -inducer Tolpa Peat Preparation treatment in rat's hearts after experimental myocardial infarction in vivo / T.F. Krzeminski, J.K. Nożynski, J. Grzyb et al. // Vascular Pharmacology. - 2005. - Vol. 43, N 3. - P. 164-170.

170. Angiomodulatory properties of some antibiotics and Tolpa peat preparation / D.M. Radomska-Lesniewska, E. Skopinska-Pozewska, Ja. Jozwiak et al. // *Central European Journal of Immunology*. - 2016. - Vol. 41, N 1. - P. 19-24.
171. Anti-HSV-1 activity of synthetic humic acid-like polymers derived from p-diphenolic starting compounds / R. Klöcking, B. Helbig, G. Schotz et al. // *Antivir. Chem. Chemother.* - 2002. - Vol. 13. - P. 241-249.
172. Antioxidant and electrochemical properties of calcium and lithium ascorbates / O.A. Avramchik, E.I. Korotkova, E.V. Plotnikov et al. // *J. Pharm. Biomed. Anal.* - 2005. - Vol. 37, N 5. - P. 1149-1154.
173. Antioxidant properties of humic substances / M. Aeschbacher, C. Graf, R.P. Schwarzenbach, M. Sander // *Environmental Science and Technology*. - 2012. - Vol. 46, N 9. - P. 4916-4925.
174. Antioxidant properties of humic substances isolated from peloids / N.P. Avvakumova, A.Y. Gerchikov, V.R. Khairullina, A.V. Zhdanova // *Pharm Chem J.* - 2011. - Vol. 45. - P. 192-193.
175. Antioxidants by means of a combined optothermal window and a DPPH* free radical colorimetry / M. Buijnsters, D. Bicanic, M. Mihai Chirtoc et al. // *Analytical Sciences (Japan). Special Issue*. - 2001. - Vol. 17. - P. 544-546.
176. Bhattacharya, S.K. Adaptogenic activity of Siotone, a polyherbal formulation of Ayurvedic rasayanas / S.K. Bhattacharya, A. Bhattacharya, A. Chakrabarti / *Indian J Exp Biol.* - 2000. - Vol. 38, N 2. - P. 119-128.
177. Bimodal effect of humic acids on the LPS-induced TNF- α release from differentiated U937 cells / R. Junec, R. Morrow, J.I. Schoenherr et al. // *Phytomedicine*. - 2009. - Vol. 16, N 5. - P. 470-476.
178. Brancaccio, P. Biochemical markers of muscular damage / P. Brancaccio, G. Lippi, N. Mffulli // *Clin. Chem. Lab. Med.* - 2010. - Vol. 48, N 6. - P. 757-767.
179. Brown coal derived humate inhibits contact hypersensitivity; an efficacy, toxicity and teratogenicity study in rats / C.E.J. van Rensburg, J.R. Snyman, T. Mokoele, A.D. Cromarty // *Inflammation*. - Vol. 30, N 5. - P. 148-152.

180. Chadzopulu, A. The therapeutic effects of mud / A. Chadzopulu, J. Adraniotis, E. Theodosopoulo // *Prog Health Sci.* - 2011. - Vol. 1, N 2. - P. 132-136.
181. Characterization and acid-base properties of fulvic and humic acids isolated from two horizons of an ombrotrophic peat bog / D. Gondar, R. Lopez, S. Fiol et al. // *Geoderma.* - 2005. - Vol. 126. - P. 367-374.
182. Characterization and biological activities of humic substances from mumie / I.A. Schepetkin, A.I. Khlebnikov, S.Yo Ah et al. // *J Agric Food Chem.* - 2003. - Vol. 51, N 18. - P. 5245-5254.
183. Characterization of humic acids fractionated by ultrafiltration / L. Lu, Zh. Zhao, W. Huang et al. // *Organic Geochemistry.* - 2004. - N 35. - P. 1025-1027.
184. Characterization, differentiation, and classification of humic substances by fluorescence spectroscopy / N. Senesi, T.M. Miano, M.R. Provenzano, G. Brunetti // *Soil Science.* - 1991. - Vol. 152. - P. 259-271.
185. Chemical and spectroscopic characterization of humic acid isolated from Ilgin Lignite, Turkey / I. Tarhan, H.F. Ayyildiz, F. Arslan et al. // *International Journal of Scientific and Technological Research.* - 2015. - Vol. 1, N 1. - P. 176-183.
186. Chemical structure of humic acids isolated from various soil types and lignite / G. Barancikova, M. Klucakova, M. Madaras et al. // *Humic Substances in the Environment.* - 2003. - Vol. 3, N 1-2. - P. 3-8.
187. Coenzyme Q₁₀ suppresses apoptosis of mouse pancreatic β -cell line MIN6 / K. Sumi, T. Okura, Y. Fujioka et al. // *Diabetology and Metabolic Syndrome.* - 2018. - Vol. 18, N 1.
188. Comparative analysis of partial structures of a peat humic and fulvic acid using one- and two-dimensional nuclear magnetic resonance spectroscopy / N. Hertkorn, A. Permin, I. Perminova et al. // *J. Environ. Qual.* - 2002. - Vol. 31, N 2. - P. 375-387.
189. Complement-fixing activity of fulvic acid from shilajit and other natural sources / I.A. Schepetkin, G. Xie, M.A. Jutila, M.T. Quinn // *Phyther. Res.* - 2009. - Vol. 23. - P. 373-384.

190. Cryptic abundance of long-chain iso and anteiso alkanes in the Dajiuhu peat Geochemistry. - 2014. - Vol. 66. - P. 137-139.
191. Cytochrome C in patients undergoing coronary artery bypass grafting: a post hoc analysis of a randomized trial / L.W. Andersen, X. Liu, S. Montissol et al. // *J Crit Care*. - 2017. - Vol. 42. - P. 248-254.
192. de Melo, B.A. Humic acids: structural properties and multiple functionalities for novel technological developments / B.A. de Melo, F.L. Motta, M.H. Santana // *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. - 2016. - Vol. 62. - P. 967-972.
193. Development and disappearance of tolerance to induction of interferon and tumor necrosis factor response in athletes treated with natural immunostimulant / A.D. Inglot, K.A. Sobiech, J. Zielinska-Jencylik et al. // *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. - 1999. - Vol. 47. - P. 237-244.
194. Dietary flavonoid hyperoside induces apoptosis of activated human LX-2 hepatic stellate cell by suppressing canonical NF- κ B signaling / L. Wang, Z. Yue, M. Guo et al. // *Biomed Res Int*. - 2016.
195. Different source of n-alkanes and n-alkan-2-ones in a 6000 cal. yr BP Sphagnum-rich temperate peat bog (Roñanzas, N Spain) / V. López-Días, C.G. Blanco, A. Bechtel et al. // *Organic Geochemistry*. - 2013. - Vol. 57. - P. 7-10.
196. Differentiating with fluorescence spectroscopy the sources of dissolved organic matter in soils subjected to drying / A. Zsolnay, E. Baigar, M. Jimenez et al. // *Chemosphere*. - 1999. - Vol. 38. - P. 45-50.
197. Dolidovich, E.F. Peat and sapropels in medicine and balneology. Solid combustible deposits in Belarus / E.F. Dolidovich, F.A. Puntus // *Environmental protection*. - 1992. - Vol. 1. - P. 102-109.
198. Doring, H.J. *The Isolated Perfused Heart. According to Langendorff* // Ed. by Dr. Christian Doring. Biomesstechnik-Verlag. - 1988.
199. Duarte, R. Synchronous scan and excitation-emission matrix fluorescence spectroscopy of water-soluble organic compounds in atmospheric aerosols / R. Duarte, C.A. Pio, A.C. Duarte // *J. Atmos. Chem*. - 2004. - Vol. 48. - P. 157-171.

200. Effect of sodium humate on animals irradiated with lethal doses / G.G. Pukhova, N.A. Druzhina, L.M. Stepchenko, E.E. Chebotarev // *Radiobiologia*. - 1987. - Vol. 27, N 5. - P. 650-653.
201. Elemental analysis, FTIR and ¹³C-NMR of humic acids from sewage sludge composting/ S. Amir, M. Hafidi, G. Merlina et al. // *Agronomie*. - 2004. - Vol. 24 (1). - P. 13-18.
202. Fasurova, N. Characterization of soil humic substances by ultraviolet-visible and synchronous fluorescence spectroscopy / N. Fasurova, L. Pospisilova // *Journal of Central European Agriculture*. - 2010. - Vol. 11, N 3. - P. 351-358.
203. Fluorescence fingerprint of fulvic and humic acids from varied origins as viewed by single-scan and excitation/emission matrix techniques / M.M.D. Sierra, M. Giovanela, E. Parlanti, E.J. Soriano-Sierra // *Chemosphere*. - 2005. - Vol. 58, N 6. - P. 715-733.
204. General review of West-Siberian mires / V.D. Markov, L.A. Ospennikova, Ye.I. Skobeyeva et al. // *Global peat resources*. - 1996. Vol. 2. - P. 203-207.
205. Glucan and humic acid: synergistic effects on the immune system / V. Vetvicka, R. Baigorri, A.M. Zamarreno et al. // *J Med Food*. - 2010. - Vol. 13, N 4. - P. 863-869.
206. Graber, E.R. Atmospheric HULIS: How humic-like are they? A comprehensive and critical review / E.R. Graber, Y. Rudich // *Atmospheric Chemistry and Physics*. - 2006. - Vol. 6. - P. 729-753.
207. Humate induced activation of human granulocytes / U.N. Riede, G. Zeck-Kapp, N. Freudenberg et al. // *Virchows Arch B cell Pathol Incl Mol Pathol*. - 1991. - Vol. 60. - P. 27-34.
208. Humic acid in drinking well water induces inflammation through reactive oxygen species generation and activation of nuclear factor- κ B/activator protein-1 signaling pathways: a possible role in atherosclerosis / Y.-C. Hseu, K.J. Senthil Kumara, C.-S. Chenc et al. // *Toxicology and Applied Pharmacology*. - 2014. - Vol. 274, N 2. - P. 249-262.

209. Hydrocarbon composition of the organic matter of peats in the south of Western Siberia / O.V. Serebrennikova, Yu.I. Preis, P.B. Kadychagov, E.V. Gulaya // *Solid Fuel Chemistry*. - 2010. - Vol. 44, N 5. - P. 324-334.
210. Hydroxyl radical formation upon oxidation of reduced humic acids by oxygen in the dark / S.E. Page, M. Sander, W.A. Arnold, K. McNeill // *Environ. Sci. Technol.* - 2012. - Vol. 46, N 3. - P. 1590-1597.
211. Impact of humic acids on the colonic microbiome in healthy volunteers / A. Swidsinski, Y. Dörffel, V. Loening-Baucke et al. // *World J Gastroenterol.* - 2017. - Vol. 23 (5). - P. 885-890.
212. Improved quantitative structure-activity relationship models to predict antioxidant activity of flavonoids in chemical, enzymatic, and cellular systems / A.I. Khlebnikov, I.A. Schepetkin, N.G. Domina et al. // *Bioorg Med Chem.* - 2007. - Vol. 15. - P. 1749-1770.
213. *In vitro* and *in vivo* assessment of humic acid as an aflatoxin binder in broiler chickens / C.J. van Rensburg, C.E.J van Rensburg, J.B.J. van Ryssen et al. // *Poult. Sci.* - 2006. - Vol. 85, N 9. - P. 1576-1583.
214. *In vitro* evaluation of the antiviral properties of Shilajit and investigation of its mechanisms of action / V. Cagno, M. Donalisio, A. Civra et al. // *Journal of Ethnopharmacology.* - 2015. - Vol. 166. - P. 129-134.
215. *In vivo* cytogenetic effects of natural humic acid / F. Bernacchi, I. Ponzanelli, M. Minunni et al. // *Mutagenesis.* - 1996. - Vol. 11, N 5. - P. 467-469.
216. Inhibition of HIV-1 in cell culture by synthetic humate analogues derived from hydroquinone: mechanism of inhibition / J. Schneider, R. Weis, C. Manner et al. // *Virology.* - 1996. - Vol. 218. - P. 389-395.
217. Investigation of the immunostimulatory properties of oxihumate / G.K. Joone, J. Dekker, C. Elizabeth, J. van Rensburg // *Zeitschrift für Naturforschung C.* - 2003. - Vol. 58, N 3-4. - P. 263-267.
218. Joone, G.K. An *in vitro* investigation of the anti-inflammatory properties of potassium humate / G.K. Joone, C.E. Rensburg // *Inflammation.* - 2004. - Vol. 28, N 3. - P. 169-174.

219. Kudryavtsev, A.V. Size exclusion chromatographic descriptors of humic substances / A.V. Kudryavtsev, I.V. Perminova, V.S. Petrosyan // *Analytica Chimica Acta*. - 2000. - Vol. 407, N 1-2. - P. 193-202.
220. Lipoxygenase metabolism of arachidonic acid in ischemic preconditioning and PKC-induced protection in heart / W. Chen, W Glasgow, E. Murphy, C. Steenbergen // *The American journal of physiology*. - 1999. - Vol. 276. - P. 2094-2101.
221. Maurer, F. Reduction and reoxidation of humic acid: influence on spectroscopic properties and proton binding / F. Maurer, I. Christl, R. Kretzschmar // *Environ. Sci. Technol.* - 2010. - Vol. 44, N 15. - P. 5787-5792.
222. Model trial investigating retention in selected tissues using broiler chicken fed cadmium and humic acid / I. Herzig, M. Navratilova, P. Suchy et al. // *Vet Med*. - 2007. - Vol. 52, N 4. - P. 162-168.
223. Molecular complexes of aspirin with humic acid extracted from shilajit and their characterization / Md.K. Anwer, S.P. Agarwal, A. Ali et al. // *J Inclusion Phenom Macro*. - 2010. - Vol. 67, N 1-2. - P. 209-215.
224. Multimethod study of the degree of humification of humic substances extracted from different tropical soil profiles in Brazil's Amazonian region / A.H. Rosa, M.L. Simoes, L.C. de Oliveira et al. // *Geoderma*. - 2005. - Vol. 27. - P. 1-10.
225. Nash, D.N. Ranolazine for chronic stable angina / D.N. Nash, S.D. Nash // *Lancet*. - 2008. - Vol. 372. - P. 1335-1341.
226. Naude, P.J.W. Potassium humate inhibits carrageenan induced paw oedema and a graft-versus-host reaction in rats / P.J.W. Naude, A.D. Cromarty, C.E.J. van Rensburg // *Inflammopharmacol.* - 2010. - Vol. 18, N 1. - P. 33-39.
227. Neuroprotective effect of humic acid on focal cerebral ischemia injury: an experimental study on rats / A. Ozcan, H.M. Sen, I. Sehitoglu et al. // *Inflammation*. - 2015. - Vol. 38, N 1. - P. 32-39.

228. Nurmi, J.T. Electrochemical properties of natural organic matter (NOM), fractions of NOM, and model biogeochemical electron shuttles / J.T. Nurmi, P.G. Tratnyek // *Environmental science & technology*. - 2002. - Vol. 36. - P. 617-624.
229. Off-line TMAH-GC/MS and NMR characterization of humic substances extracted from river sediments of northwestern Sao Paulo under different soil uses / A.M. Tadini, G. Pantano, A.L. Toffoli et al. // *Science of the total environment*. - 2015. - Vol. 506-507. - P. 234-240.
230. Ohno, T. Fluorescence inner-filtering correction for determining the humification index of dissolved organic matter / T. Ohno // *EnvironSciTechnol*. - 2002. - Vol. 36. - P. 742-746.
231. Optical properties of humic acids in selected organic wastes / I. Niemiakowska-Butrym, A. Talarowska, Z. Sokolowska, P. Boguta // *Acta Agrophysica*. - 2012. - Vol. 19, N 4. - P. 773-785.
232. Patel, P.D. Utility of ranolazine in chronic stable angina patients / P.D. Patel, R.R. Arora // *Cardiovasc Health Risk Manag*. - 2008. - Vol. 4, N 4. - P. 819-824.
233. Pena-Mendes, E.M. Humic substances-compounds of still unknown structure: applications in agriculture, industry, environment, and biomedicine / E.M. Pena-Mendes, J. Havel, J. Patoska // *J. Appl. Biomed*. - 2005. - Vol. 3. - P. 13-24.
234. Peroxisome proliferation, adipocyte determination and differentiation of C3H10T1/2 fibroblast cells induced by humic acid: induction of PPAR in diverse cells / Y. Lee, T.S. Huang, M.L. Yang et al. // *J. Cell. Physiol*. - 1999. - Vol. 179. - P. 218-225.
235. Phosphocreatine in cardiac surgery patients: a meta-analysis of randomized controlled trials / F. Mingxing, G. Landoni, A. Zangrillo et al. // *J Cardiothorac Vasc Anesth*. - 2018. - Vol. 32, N 2. - P. 762-770.
236. Physicochemical characterization and antioxidant activity of humic acids isolated from peat of various origins / M.V. Zykova, I.A. Schepetkin, M.V. Belousov et al. // *Molecules*. - 2018. - Vol. 23, N 4. - P. 753-768.

237. Phytochemical compositions of extract from peel of hawthorn fruit, and its antioxidant capacity, cell growth inhibition, and acetylcholinesterase inhibitory activity / P. Wu, F. Li, J. Zhang et al. // *BMC Complement Altern Med.* - 2017. - Vol. 17, N 1. - P. 151-158.
238. Piccolo, A. Differences in high performance size exclusion chromatography between humic substances and macromolecular polymers / A. Piccolo, P. Conte, A. Cozzolino // *Humic Substances: versatile components of plants, soil and water.* - 2000. - Vol. 259. - P. 111-124.
239. Piccolo, A. Chemical characterization of humic substances extracted from organic-waste-amended soils / A. Piccolo, P. Zaccheo, P.G. Genevini // *Bioresource technology.* - 1992. - Vol. 40, N 3. - P. 275-282.
240. Piccolo, A. Electrospray ionization mass spectrometry of terrestrial humic substances and their size fractions / A. Piccolo, M. Spiteller // *Anal. Bioanal. Chem.* - 2003. - Vol. 377. - P. 1047-1059.
241. Pospisilova, L. Spectroscopic characterization of humic acids originated in soil and lignite / L. Pospisilova, N. Fasurova // *Soil and Water Res.* - 2009. - Vol. 4, N 4. - P. 168-175.
242. Prashob, P.K.J. Genesis of structural features of humic acids from the sediments of a high productive coastal zone / P.K.J. Prashob, S.M. Nair // *Geochemical Journal.* - 2014. - Vol. 48. - P. 247-258.
243. Preserved cardiac mitochondrial function and reduced ischaemia/reperfusion injury afforded by chronic continuous hypoxia: role of opioid receptors / L.N. Maslov, N.V. Naryzhnaya, E.S. Prokudina et al. // *Clinical and experimental pharmacology and physiology.* - 2015. - Vol. 42, N 5. - P. 496-501.
244. Preston, C.M. Applications of NMR to soil organic matter analysis: history and prospects / C.M. Preston // *Soil Sci.* - 1996. - Vol. 161. - P. 144-166.
245. Quinone moieties act as electron acceptors in the reduction of humic substances by humics-reducing microorganisms / D.T. Scott, D.M. McKnight, E.L. Blunt-Harris et al. // *Environ. Sci. Technol.* - 1998. - Vol. 32, N 19. - P. 2984-2989.

246. Redox properties of hydroquinone-enriched humic substances / N.S. Shcherbina, I.V. Perminova, A.P. Novikov et al. // Book of the communications presented to the 15th meeting of the International Humic Substances Society. - Tenerife, 2010. - P. 147-150.
247. Redox-cycling and hydrogen peroxide generation by fabricated catecholic films in the absence of enzymes / E. Kim, Y. Liu, C. J. Baker, et al. // Biomacromolecules. - 2011. - Vol. 12, N 4. - P. 880-888.
248. Renoprotective effect of humic acid on renal ischemia-reperfusion injury: an experimental study in rats / A. Akbas, C. Silan, M.T. Gulpinar et al. // Inflammation. - 2015. - Vol. 38. - P. 2042-2048.
249. Rice, J.A. Statistical evaluation of the elemental composition of humic substances / J.A. Rice, P. McCarthy // Org. Geochem. - 1991. - Vol. 17, N 5. - P. 635-648.
250. Role of metabolic manipulator trimetazidine in limiting percutaneous coronary intervention-induced myocardial injury / D.H. Kazmi, A. Kapoor, A. Sinha et al. // Indian Heart J. - 2018. - N 3. - P. 365-371.
251. Role of mitochondrial lactate dehydrogenase and lactate oxidation in the intracellular lactate shuttle / G. A. Brooks, H. Dubouchaud, M. Brown et al. // PNAS. - 1999. - Vol. 96. - P. 1129-1134.
252. Sarkar, R. Reducing power and iron chelating property of Terminalia chebula (Retz.) alleviates iron induced liver toxicity in mice / R. Sarkar, B. Hazra, N. Mandal // BMC Complementary and Alternative Medicine. - 2012. - Vol. 12. - P. 144-154.
253. Schepetkin, I. Medical drugs from humus matter: focus on mumie / I. Schepetkin, A. Khlebnicov, B. Se Kwon // Drug development research. - 2002. - Vol. 57. - P. 140-159.
254. Shin, H.S. Spectroscopic and chemical characterizations of molecular size fractionated humic acid / H.S. Shin, J.-M. Monsallier, G.R. Choppin // Talanta. - 1999. - Vol. 50, N 3. - P. 641-647.

255. Shkarupa, M Radioprotective properties of sodium humate in radiation-induced mutagenesis in cultured lymphocytes of thyroid cancer patients / M. Shkarupa, S.V. Klymenko // *Exp Oncol.* - 2016. - Vol. 38, N 2. - P. 108-111.
256. Skopinska-Rozewska, E. Immunomodulating effects of Tolpa Peat Preparation / E. Skopinska Rozewska // *Reumatologia.* - 1991. - Vol. 24. - P. 161-171.
257. Song, J. Characterization of humic acid-like material isolated from the humin fraction of a topsoil / J. Song, P. Peng, W. Huang // *Soil Science.* - 2005. - Vol. 170, № 8. - P. 599-611.
258. Spectroscopic assessment of soil organic matter in wetlands from the High Andes / A. Segnini, A.R. Quiroz, A. Posadas et al. // *Soil Sci Soc Am J.* - 2010. - Vol. 74. - P. 2246-2253.
259. Spectroscopic characterization of the structural and functional properties of natural organic matter fractions / J.C. Chen, B. Gu, E.J. LeBoeuf et al. // *Chemosphere.* - 2002. - Vol. 48, N 1. - P. 59-68.
260. Structural study of humic acids during composting of activated sludge-green waste: elemental analysis, FTIR and ¹³CNMR / S. Amir, A. Jouraiphy, A. Meddich et al. // *Journal of Hazardous Materials.* - 2010. - Vol. 177, N 1-3. - P. 524-529.
261. Synthesis of humic and fulvic acids and their characterization using optical spectroscopy (ATR-FTIR and UV-Visible) / A.K. Kiprop, M-C. J-Coumon, E. Pourtier et al. // *International Journal of Applied Science and Technology.* - 2013. - Vol. 3, N 8. - P. 28-35.
262. Szajdak, L. Chemical properties of different peat-moorsh soils from the Biebrza River Valley / L. Szajdak, T. Brandyk, J. Szatyłowicz // *Agronomy Research.* - 2007. - Vol. 5, N 2. - P. 165-174.
263. The acute effect of humic acid on iron accumulation in rats / Y.F. Cagin, N. Sahin, A. Polat et al. // *Biol Trace Elem Res.* - 2016. - Vol. 171. - P. 145-155.
264. The effect of sodium humate on cadmium deposition in the chicken organs / I. Herzig, J. Hampl, H. Docekalova et al. // *Vet Med.* - 1994. - Vol. 39. - P. 175-185.

265. The effect of Tolpa Peat Preparation (TPP) on human mononuclear leukocyte-induced angiogenesis / E. Skopinska-Rozewska, I. Polakowski, M. Zukowska et al. // *Herba Pol.* - 1993. - Vol. 34. - P. 41-51.
266. The effect of α_2 -adrenoreceptor antagonists in isolated globally ischemic rat hearts / C.A. Sargent, W.M. Wilde, S. Dzonczyk et al. // *Eur. J. Pharmacol.* - 1994. - Vol. 261. - P. 25-32.
267. The relative abundance of oxygen alkyl-related groups in aliphatic domains is involved in the main pharmacological-pleiotropic effects of humic acids / V. Vetvicka, A. Vashishta, M. Fuentes et al. // *J Med Food.* - 2013. - Vol. 16, N 7. - P. 625-632.
268. Timmis, A.D. Effects of ranolazine on exercise tolerance and HbA1c in patients with chronic angina and diabetes / A.D. Timmis, B.R. Chaitman, M. Grager // *Eur Heart J.* - 2006. - Vol. 27, N 1. - P. 42-48.
269. Treatment of HIV infection with humic acid // Patent: 30.03.1995. - WO/1995/008335. San Francisco, CA (US), 1994. - 53 p.
270. Trimetazidine in the prevention of contrast-induced nephropathy in chronic kidney disease / T.A. Ibrahim, R.H. El-Mawardy, A.S. El-Serafy, E.M. El-Fekky // *Cardiovasc Revasc Med.* - 2017. - Vol. 18, N 5. - P. 315-319.
271. Trimetazidine protects against atherosclerosis by changing energy charge and oxidative stress / S. Zheng, Y. Du, Q. Peng et al. // *Med Sci Monit.* - 2018. - Vol. 24. - P. 8459-8468.
272. van Krevelen, D.W. Graphical-statistical method for investigation of the structure of coal / D.W. van Krevelen // *Fuel.* - 1950. - Vol. 29. - P. 228-269.
273. van Rensburg, C.E. The antiinflammatory properties of humic substances: a mini review / C.E. van Rensburg // *Phytotherapy Research.* - 2015. - Vol. 29. - P. 791-795.
274. van Rensburg, C.E.J. Potassium humate inhibits the production of inflammatory cytokines and complement activation in vitro / C.E.J. van Rensburg, P.J.W. Naude // *Inflammation.* - 2009. - Vol. 32, N 4. - P. 270-276.

275. Visser, S.A. Effects of humic substances on higher animals and man; the possible use of humic compounds in medical treatments / S.A. Visser // International Humic Substances Society meeting. - Sevilla, 1988. - P. 89-135.
276. Witwicki, M. Solvent effect on EPR, molecular and electronic properties of semiquinone radical derived from 3,4-dihydroxybenzoic acid as model for humic acid transient radicals: High-field EPR and DFT studies / M. Witwicki, Ju. Jezierska, A. Ozarowski // Chemical Physics Letters. - 2009. - Vol. 73, N 1-3. - P. 160-166.
277. Wollina, U. Peat: a natural source for dermatocosmetics and dermatotherapeutics / U. Wollina // Journal of Cutaneous and Aesthetic Surgery. - 2009. - Vol. 2, N 1. - P. 17-20.
278. Zaccone, C. Qualitative comparison between raw peat and related humic acids in an ombrotrophic bog profile / C. Zaccone, T.M. Miano, W. Shotyk // Organic Geochemistry. - 2007. - Vol. 38, N 1. - P. 151-160.
279. Zaobornyj, T. Mitochondrial contribution to the molecular mechanism of heart acclimatization to chronic hypoxia: role of nitric oxide / T. Zaobornyj; G.F. Gonzales, L.B. Valdez // Frontiers in bioscience: a journal and virtual library. - 2007. - Vol. 12. - P. 1247-1259.
280. Ziolo, M.T. Nitric oxide signaling and the regulation of myocardial function / M.T. Ziolo, M.J. Kohr, H. Wang // J Mol Cell Cardiol. - 2008. - Vol. 45, N 5. - P. 625-632.

ПРИЛОЖЕНИЕ 1

**ПРОЕКТ НОРМАТИВНОЙ ДОКУМЕНТАЦИИ
«ТОРФ НИЗИННЫЙ ДРЕВЕСНО-ТРАВЯНОЙ»**

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

Регистрационное удостоверение № _____

Дата регистрации « _____ » _____ 20 _____ г

НОРМАТИВНАЯ ДОКУМЕНТАЦИЯ**ПРОЕКТ**_____
(номер)**Торф низинный древесно-травяной**

торговое наименование лекарственного растительного сырья

Torf grass-woody low

международное непатентованное или химическое название

ПРОИЗВОДИТЕЛЬ

ФАСОВЩИК (ПЕРВИЧНАЯ УПАКОВКА)

УПАКОВЩИК

ВЫПУСКАЮЩИЙ КОНТРОЛЬ

СПЕЦИФИКАЦИЯ

Торф низинный древесно-травяной
лекарственное растительное сырье

Показатели	Методы	Нормы
1	2	3
Описание	Визуальный, органолептический	<p><i>Цельное сырье.</i> Измененные в результате частичной деструкции остатки растений-торфообразователей (сосудистых, моховидных), характеризующиеся устойчивым прелым запахом, образующие неоднородную массу темно-серо-коричневого цвета. При отжиме свежезаготовленного сырья наблюдается выделение темной мутной жидкости и потеря упругости. При растирании сырья оно заметно пачкает пальцы. При визуальном осмотре заметны тонкие удлиненные корешки, кусочки древесины, коры. Фрагменты стеблей древесных растений-торфообразователей (длина < 2 см, толщина < 6 мм) цилиндрические, неровные на изломе, покрыты шероховатой коркой. При внимательном рассмотрении под лупой различимы остатки мхов</p> <p><i>Измельченное сырье.</i> Аморфная масса коричневого цвета, имеющая запах прелой растительности, проходящая сквозь сито с размером пор 7 мм. Рассмотрение измельченного сырья под лупой (10^x) или стереомикроскопом (16^x) позволяет увидеть остатки листьев (желтого / бурого цвета) и обрывки стеблей, длина которых не превышает 0,5 см</p>
Подлинность Микроскопия:	ГОСТ 28245-89	<i>Carex lasiocarpa</i> Ehrh. (50); <i>Menyanthes trifoliata</i> L. (15); <i>Equisetum</i> sp. (5); <i>Hypnaceae</i> (<i>Bryum</i> , <i>Meesia</i>) (+); <i>Polypodiophyta</i> (+); древесина кустарников (30)
Числовые показатели: Влажность	ОФС 1.5.3.0007.15	не менее 70 % (цельное сырье) не более 15 % (измельченное сырье)
Степень разложения	ГОСТ 28245-89	не менее 30-35 %
Золы общей Золы, не растворимой в хлороводородной кислоте	ОФС 1.2.2.2.0013.15 ОФС 1.5.3.0005.15	не более 6,40 % не более 2,98 %

Содержание радионуклидов	ГФ XIV, ОФС.1.5.3.0001.15	Cs-137 не более 400 Бк/кг Sr-90 не более 200 Бк/кг
Содержание тяжелых металлов и мышьяка	ГФ XIV, ОФС.1.5.3.0009.15	свинец не более 6,0 мг/кг; кадмий не более 1,0 мг/кг; ртуть не более 0,1 мг/кг; мышьяк не более 0,5 мг/кг
Микробиологическая чистота	ГФ XIV, ОФС.1.2.4.0002.15	категория 4А общее число аэробных микроорганизмов – не более 10^7 КОЕ в 1 г; общее число плесневых и дрожжевых грибов – не более 10^5 КОЕ в 1 г; <i>E. coli</i> – не более 10^2 КОЕ в 1 г
Количественное содержание гуминовых кислот	Гравиметрический (0,1 моль/л раствором натрия гидроксида)	не менее 38,77 %
Упаковка, маркировка и транспортирование	ГФ XIV, ОФС.1.1.0019.15	по 15 кг, мешки полиэтиленовые, на мешки наклеивают этикетки из бумаги этикеточной по ГОСТ 7625-86 или на клеевой основе. На этикетке указывают предприятие-изготовитель, его товарный знак, адрес, название, массу при влажности 70 %, регистрационный номер, условия хранения, номер серии, срок годности
Хранение	ГФ XIV, ОФС.1.1.0011.15	в условиях естественной влажности торфа в защищенном от света месте (цельное сырье), в сухом, защищенном от света месте (измельченное сырье)
Срок годности		не ограничено (цельное, измельченное сырье)

Описание. Цельное сырье. Измененные в результате частичной деструкции остатки растений-торфообразователей (сосудистых, моховидных), характеризующиеся устойчивым прелым запахом, образующие неоднородную массу тёмно-серо-коричневого цвета. При отжиме свежезаготовленного сырья наблюдается выделение темной мутной жидкости и потеря упругости. При растирании сырья оно заметно пачкает пальцы. При визуальном осмотре заметны тонкие удлиненные корешки, кусочки древесины, коры. Фрагменты стеблей древесных растений-торфообразователей (длина < 2 см, толщина < 6 мм) цилиндрические, неровные на изломе, покрыты шероховатой коркой. При внимательном рассмотрении под лупой различимы остатки мхов.

Измельченное сырье. Аморфная масса коричневого цвета, имеющая запах прелой растительности, проходящая сквозь сито с размером пор 7 мм. Рассмотрение измельченного сырья под лупой (10^x) или стереомикроскопом (16^x)

позволяет увидеть остатки листьев (желтого / бурого цвета) и обрывки стеблей, длина которых не превышает 0,5 см.

Микроскопия. Во влажном сырье при помощи «ключа» по ГОСТ 28245-89 определяют остатки неразложившихся растений.

Видовую принадлежность растительных остатков торфа устанавливают по специализированному атласу растительных остатков в торфах.

Среднюю пробу образца помещают на сито (диаметр пор не более 0,10-0,25 мм) и промывают водой до тех пор, пока сбегаящая жидкость под ситом не станет полностью прозрачной. Далее промытое таким образом волокно небольшими порциями при помощи пинцета размещают тонким равномерным слоем на предметном стекле. Количество параллельных измерений не менее 5.

Если растительное волокно торфа имеет бурую окраску, то его предварительно обесцвечивают 5 % раствором H_2SO_4 , при исследовании сфагновых мхов часть промытой пробы предварительно окрашивают раствором метилового синего, при исследовании древесных и травянистых остатков – растительное волокно дополнительно просветляют 10 % раствором NaOH. Определение видовой принадлежности растительных остатков, обнаруженных в поле зрения микроскопа, осуществляют при увеличении 200-400^x. Визуально осуществляют определение процентного содержания в образце торфа остатков растений. Если содержание растительных остатков не превышает 5 %, то их отмечают как единичные и обозначают как «+». Доля не установленных остатков растений не должна составлять 10 % и более.

Тип торфа. Низинный тип: наибольший процент растительных остатков представлен растениями низинных болот, растительные остатки верховых болот составляют не более 5 %.

Вид торфа. Древесно-травяной вид: наибольший процент растительных остатков волокна торфа составляют остатки осоки (50 %), вахты (15 %) и древесины кустарничков вересковых (30 %), характерна небольшая примесь хвоща (5 %) и других травянистых растений (порядка 5 %).

Ботанический состав:

1. *Carex lasiocarpa* Ehrh. – 50 % (Рисунок 5.1.1). В давленном препарате видны прозенхимные, тонкостенные, плотно прилегающие друг к другу клетки. Заметны одноклеточные волоски конусовидной формы. В проводящем пучке видны сосуды ксилемы.

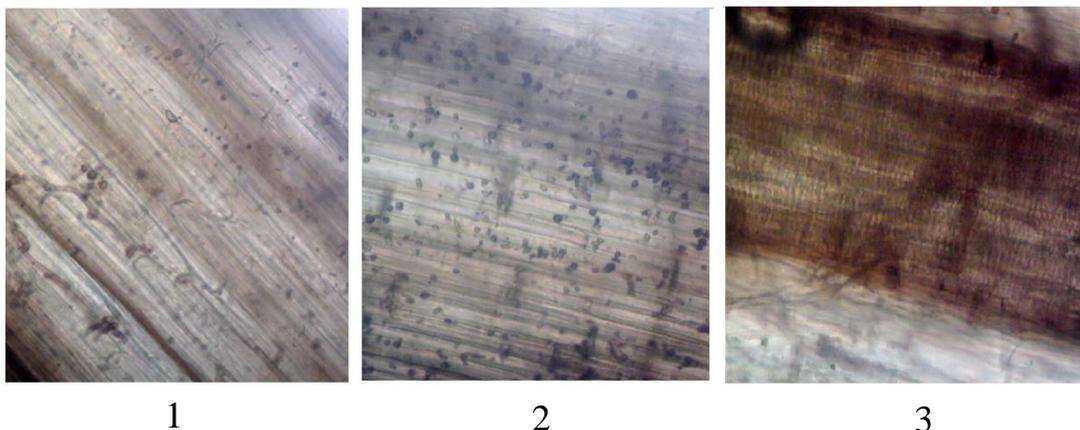


Рисунок 5.1.1 – Микроскопия корешков *Carex lasiocarpa* Ehrh.: 1 – прямоугольные тонкостенные клетки (200^x), 2 – фрагмент покровной ткани с конусовидными волосками (200^x), 3 – сосуды ксилемы (200^x)

2. *Menyanthes trifoliata* L. – 15 % (Рисунок 5.1.2). В давленном препарате корневища заметны прозенхимные толстостенные неправильной формы с закругленными краями клетки покровной ткани (перидермы). Клетки по краю формируют полу волнистую линию.

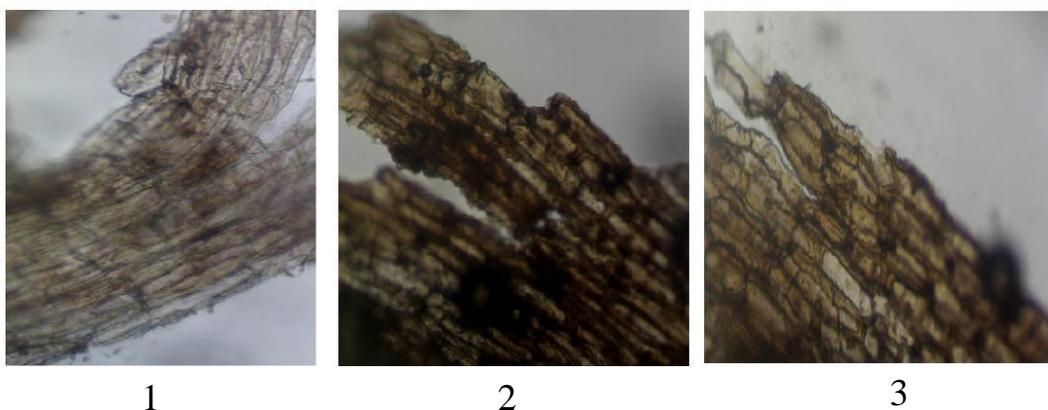


Рисунок 5.1.2 – Микроскопия *Menyanthes trifoliata* L.: 1 – клетки фрагмента корневища (200^x), 2 – фрагмент корневища (200^x), 3 – фрагмент перидермы (200^x)

3. Кустарнички – 30 % (Рисунок 5.1.3). Корневища и побеги кустарничков, главным образом, представлены семейством водяниковые (*Empetraceae*) и вересковые (*Ericaceae*): клюква болотная, багульник болотный, водяника черная. На давленном препарате видна пробковая часть, состоящая, в основном, из удлиненных четырехгранных толстостенных клеток, расположенных рядами.

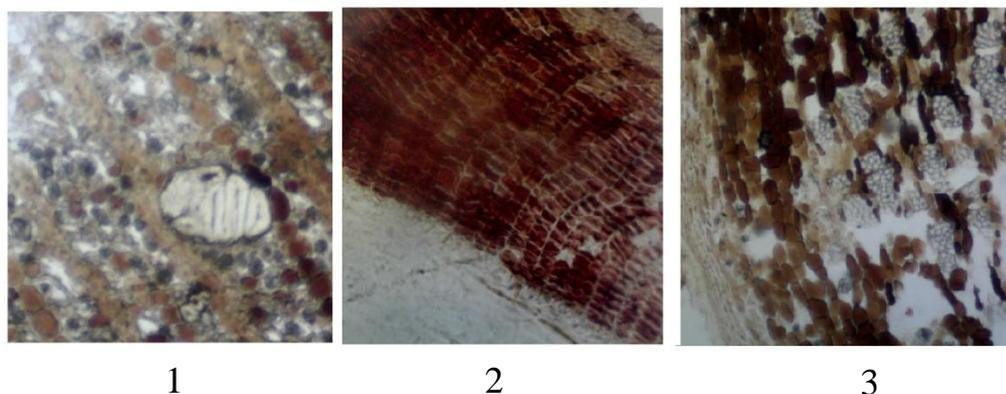


Рисунок 5.1.3 – Микроскопия покровной ткани кустарничков (400^x, 200^x, 200^x)

4. *Equisetum sp.* – 5 % (Рисунок 5.1.4). Корневища хвощей выступают основой формирования торфа. В давленном препарате видны: многослойная перидерма, клетки которой плотно прилегают друг к другу, клетки механической ткани утолщены по углам (угловая колленхима), паренхимные клетки округлые. Проводящие пучки закрытого типа, располагаются в центральном цилиндре, отделенном от коры слоем эндодермы. Сосуды ксилемы имеют малый диаметр, располагаются одиночно. В пучках паренхима практически отсутствует.

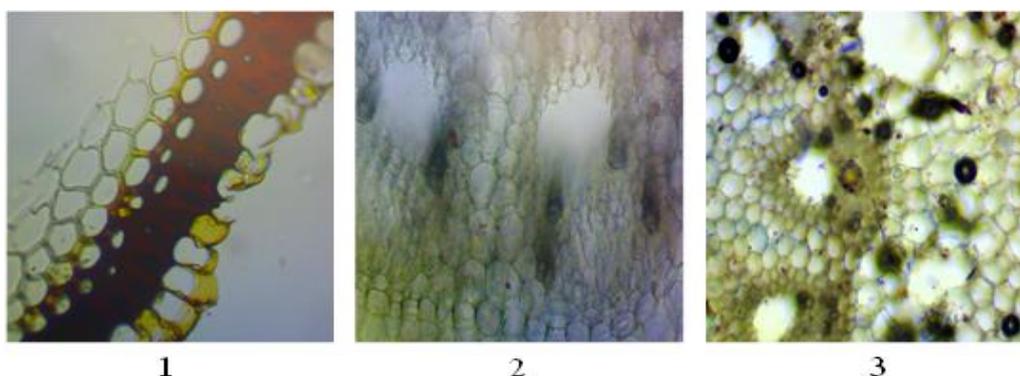


Рисунок 5.1.4 – Микроскопия *Equisetum sp.*: 1 – строение коровой части корневища (200^x), 2 – строение проводящего пучка (200^x), 3 – строение центрального цилиндра (200^x)

5. *Hypnaceae* (Bryum, Meesia) – менее 5 % (Рисунок 5.1.5). На давленном препарате видны очень крупные угловатые водоносные (гиалиновые) клетки, выпуклые с обеих сторон. В их клеточной стенке заметны двойные или тройные поры. Хлорофиллоносные клетки в очертании эллиптические, окруженные со всех сторон водоносными клетками.

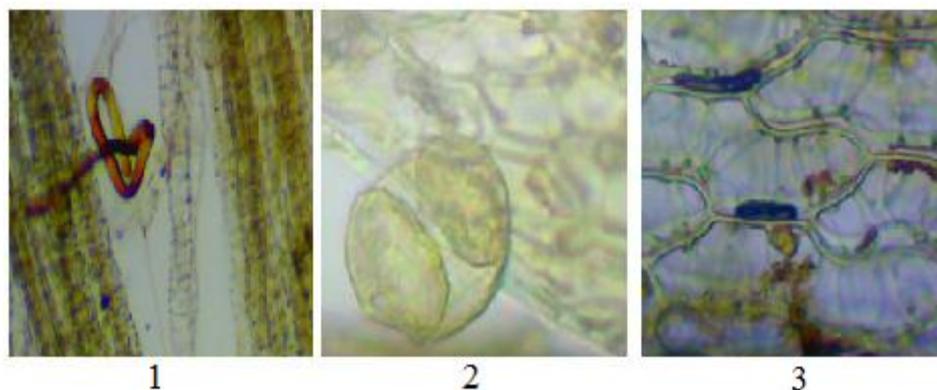


Рисунок 5.1.5 – Микроскопия *Hypnaceae* (Bryum, Meesia): 1 – ризоиды (200^x), 2 – спора (400^x), 3 – гиалиновые клетки (200^x)

6. *Polypodiophyta* – менее 5 % (Рисунок 5.1.6). На давленном препарате видна основная ткань, состоящая из клеток изодиаметрической формы, между которыми имеются небольшие межклеточные пространства. В межклетниках встречаются одноклеточные шаровидные железистые образования с желтовато-зеленым клеточным содержимым (клетки Шахта).

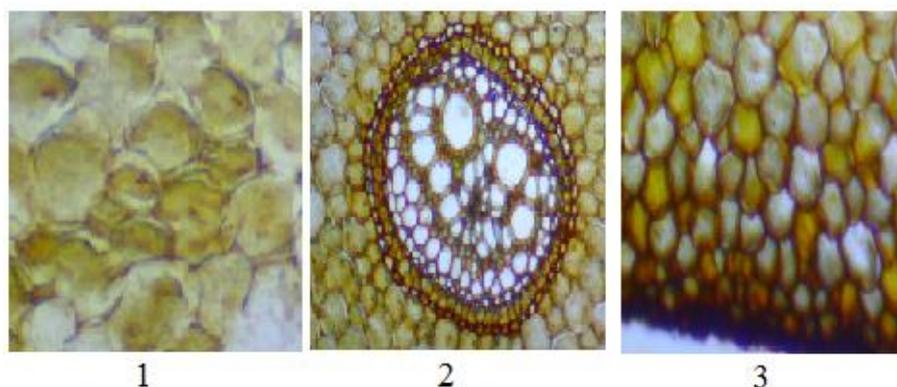


Рисунок 5.1.6 – Микроскопия *Polypodiophyta*: 1 – клетки паренхимы (400^x), 2 – центроксилемный проводящий пучок (100^x), 3 – клетки покровной ткани (200^x)

Проводящая система представлена амфикрибральными (центроксилемными) пучками, которые отделены от паренхимных клеток одним слоем плотно расположенных клеток эндодермы, имеющих коричневое содержимое. Ксилема представлена крупными трахеидами, между которыми располагаются паренхимные клетки.

Числовые показатели:

Влажность. Цельное сырье – не менее 70 %, измельченное сырье – не более 15 %. Определение проводят согласно ОФС 1.5.3.0007.15.

Зола общая. Цельное сырье, измельченное сырье – не более $6,40 \pm 0,12$ %. Определение проводят согласно ОФС 1.2.2.2.0013.15.

Зола, не растворимая в хлороводородной кислоте. Цельное сырье, измельченное сырье – не более $2,98 \pm 0,08$ %. Определение проводят согласно ОФС 1.5.3.0005.15.

Степень разложения растительных остатков. Цельное сырье – не менее 30-35 %. Определение проводят согласно ГОСТ 28245-89.

Содержание тяжелых металлов и мышьяка. В соответствии с ГФ XIV, ОФС.1.5.3.0009.15 «Определение содержания тяжелых металлов и мышьяка в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах» (свинец не более 6,0 мг/кг; кадмий не более 1,0 мг/кг; ртуть не более 0,1 мг/кг; мышьяк не более 0,5 мг/кг).

Содержание радионуклидов. В соответствии с ГФ XIV, ОФС.1.5.3.0001.15 «Определение содержания радионуклидов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах» (Cs-137 не более 400 Бк/кг; Sr-90 не более 200 Бк/кг).

Микробиологическая чистота. В соответствии с ГФ XIV, ОФС.1.2.4.0002.15 «Микробиологическая чистота», категория 4А (общее число аэробных микроорганизмов - не более 10^7 КОЕ в 1 г; общее число плесневых и дрожжевых грибов – не более 10^5 КОЕ в 1 г; *E. coli* – не более 10^2 КОЕ в 1 г).

Количественное определение гуминовых кислот. Торф низинный древесно-травяной применяется для получения гуминовых кислот, обладающих кардиотропной активностью.

Количественное содержание гуминовых кислот, экстрагируемых 0,1 моль/л раствором натрия гидроксида из низинного древесно-травяного торфа должно составлять не менее $38,77 \pm 0,32$ %.

Количественное определение гуминовых кислот, экстрагируемых из торфа 0,1 моль/л раствором натрия гидроксида из низинного древесно-травяного торфа проводят гравиметрическим способом в средней пробе предварительно высушенного на воздухе торфа, измельченного и просеянного через сито с диаметром ячеек 3 мм.

Проводят четыре параллельных определения из одной и той же пробы торфа. Из средней пробы отбирают по две точные навески массой 3-4 г ($m_{\text{навески}}$). Одновременно в другой навеске проводят определение влажности ($W, \%$) и зольности ($A, \%$) анализируемой пробы, значения которых необходимы для пересчета результатов количественного определения гуминовых кислот на органическую массу (ОМ) торфа.

Влажность торфа (в процентах) находят по формуле:

$$W = \frac{m - m_1}{m} \times 100, \quad (1)$$

где m – масса до высушивания, г;

m_1 – масса после высушивания, г.

Содержание золы (в процентах) находят по формуле:

$$A = \frac{m_1}{m_2} \times 100, \quad (2)$$

где m_1 – масса золы, г;

m_2 – масса абсолютно сухой неозолённой пробы сырья, г.

Органическую массу навески ($OM_{\text{навески}}$) вычисляют в граммах, по формуле

$$OM_{навески} = m_{навески} \times \left(1 - \frac{W, \%}{100}\right) \times \left(1 - \frac{A, \%}{100}\right), \quad (3)$$

где $m_{навески}$ – точная масса навески торфа, г;

$W, \%$ – влажность торфа, определенная по формуле (1);

$A, \%$ – зольность торфа, определенная по формуле (2).

Навески переносят в колбы Эрленмейера вместимостью 1000 мл. В колбу к навеске торфа добавляют 0,1 моль/л раствор натрий гидроксида из расчета 150 мл на 1,0 г навески и оставляют настаивать в течение 16-20 часов при комнатной температуре и периодическом перемешивании. После чего раствор гуматов (экстракт) декантируют. Затем к остатку торфа добавляют свежую порцию экстрагента в заданном объеме, настаивают 16-20 часов и декантируют. Экстракцию проводят 3 раза, экстракты объединяют. К остатку торфа добавляют воду до достижения рН раствора 7, далее отфильтровывают, на фильтре промывают водой 2 раза. Фильтрат присоединяют к гуматам, тщательно перемешивают, измеряют объем полученного экстракта ($V_{извлечения}$).

Отбирают аликвоту полученного раствора гуматов объемом 1 л ($V_{аликвоты}$), добавляют небольшими порциями при интенсивном перемешивании 20 мл 10 %-ной HCl (рН = 1-2), ГК выпадают в осадок в виде хлопьев коричневого цвета. После отстаивания в течение 2 ч осадок отфильтровывают при пониженном давлении через абсолютно сухой взвешенный беззольный фильтр, гуминовые кислоты на фильтре дважды промывают 0,5 %-ным раствором HCl, затем несколько раз холодной водой до нейтральной среды. Фильтр с гуминовыми кислотами количественно переносят в тигель и сушат до постоянной массы в сушильном шкафу при $t = 80^\circ\text{C}$. Высушенный фильтр с гуминовыми кислотами озоляют в муфельной печи при температуре $550-650^\circ\text{C}$ в течение 2 ч. Содержание гуминовых кислот в органической массе торфа (ГК), выраженное в процентах, вычисляют по формуле:

$$ГК = \frac{OM_{ГК} \times V_{извлечения}}{OM_{навески} \times V_{аликвоты}} \times 100 \% , \quad (4)$$

где $OM_{ГК}$ – органическая масса ГК, г, вычисленная аналогично $OM_{навески}$, по формуле (3);

$V_{извлечения}$ – общий объем полученного экстракта (раствор натрий гумата), мл;

$V_{аликвоты}$ – объем аликвоты полученного раствора натрий гумата для осаждения ГК, мл.

Упаковка, маркировка и транспортирование. В соответствии с требованиями ГФ XIV, ОФС.1.1.0019.15 «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов» (по 15 кг, в мешках полиэтиленовых). На мешки наклеивают этикетки из бумаги этикеточной по ГОСТ 7625-86 или на клеевой основе. На этикетке указывают предприятие-изготовитель, его товарный знак, адрес, название, массу при влажности 70 %, регистрационный номер, условия хранения, номер серии, срок годности.

Хранение. В соответствии с требованиями ГФ XIV, ОФС.1.1.0011.15 «Хранение лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов». В условиях естественной влажности торфа, в защищенном от света месте.

Срок годности. Цельного сырья естественной влажности не ограничено.

Примечание. Реактивы и растворы, приведенные в настоящей нормативной документации, описаны в соответствующих разделах ГФ XIV.

ПРИЛОЖЕНИЕ 2
ПРОЕКТ НОРМАТИВНОЙ ДОКУМЕНТАЦИИ
«ГУМИНОВЫЕ КИСЛОТЫ НИЗИННОГО ДРЕВЕСНО-ТРАВЯНОГО
ТОРФА»

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

Регистрационное удостоверение № _____

Дата регистрации « _____ » _____ 20 _____ г

НОРМАТИВНАЯ ДОКУМЕНТАЦИЯ**ПРОЕКТ**_____
(номер)**Гуминовые кислоты низинного древесно-травяного торфа**

торговое наименование лекарственного растительного сырья

Acidum huminici grass-woody low torfae

международное непатентованное или химическое название

ПРОИЗВОДИТЕЛЬ

ФАСОВЩИК (ПЕРВИЧНАЯ УПАКОВКА)

УПАКОВЩИК

ВЫПУСКАЮЩИЙ КОНТРОЛЬ

СПЕЦИФИКАЦИЯ

Гуминовые кислоты низинного древесно-травяного торфа

Субстанция-порошок

Показатели	Методы	Нормы
1	2	3
Описание	Визуальный, органолептический	аморфный порошок темно-коричневого цвета, со специфическим запахом
Подлинность	УФ-спектроскопия	УФ-спектр должен соответствовать представленному в НД спектру, спектральные коэффициенты должны соответствовать числовым значениям, представленным в НД
	Флуоресцентная спектроскопия	флуоресцентный спектр при $\lambda_{\text{возб}} = 270$ нм должен соответствовать представленному в НД спектру, положение максимумов флуоресценции $\lambda_{\text{возб}}$ (270, 310 и 355 нм) и величины сдвига ($\Delta 1$, нм, $\Delta 2$, нм) должны соответствовать числовым значениям, представленным в НД
	ИК-спектроскопия	ИК-спектр должен соответствовать представленному в НД спектру, спектральные коэффициенты должны соответствовать числовым значениям, представленным в НД
	Элементный (С, Н, N, O)-анализ	показатели элементного анализа должны соответствовать числовым значениям, представленным в НД
	ВЭЖХ	основные показатели молекулярно-массового распределения должны соответствовать числовым значениям, представленным в НД
Сульфатная зола	ГФ XIV, ОФС.1.2.2.2.0014.15	не более 1,0 %
Потеря в массе при высушивании	ГФ XIV, ОФС.1.2.1.0010.15, способ 1, температура до 60°C	не более 0,5 %
Содержание радионуклидов	ГФ XIV, ОФС.1.5.3.0001.15	Cs-137 не более 400 Бк/кг Sr-90 не более 200 Бк/кг
Содержание тяжелых металлов и мышьяка	ГФ XIV, ОФС.1.5.3.0009.15	свинец не более 6,0 мг/кг; кадмий не более 1,0 мг/кг; ртуть не более 0,1 мг/кг; мышьяк не более 0,5 мг/кг

Микробиологическая чистота	ГФ XIV, ОФС.1.2.4.0002.15	категория 3.2, общее число аэробных микроорганизмов – не более 10^4 КОЕ в 1 г; общее число плесневых и дрожжевых грибов – не более 10^2 КОЕ в 1 г; энтеробактерий, устойчивых к желчи – не более 10^2 КОЕ в 1 г; отсутствие: <i>Escherichia coli</i> (в 1 г); бактерий рода <i>Salmonella</i> (в 25 г); <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (в 1 г); <i>Staphylococcus aureus</i> (в 1 г).
Количественное определение	Спектрофотометрическим методом по калибровочному графику	соответствует НД
Упаковка, маркировка и транспортирование	ГФ XIV, ОФС.1.1.0019.15	упаковывают в банки полимерные для лекарственных средств с винтовой горловиной БП-210 РУ № ФСР 2009/04119, на банки наклеивают этикетку из бумаги этикеточной по ГОСТ 7625-86 или бумаги писчей по ГОСТ 18510-87. На этикетке указывают предприятие-изготовитель, его товарный знак, название, массу в упаковке, номер серии, срок годности. Маркировка транспортной тары в соответствии с ГОСТ 17768-90.
Хранение	ГФ XIV, ОФС.1.1.0011.15	в сухом защищенном от света месте
Срок годности	–	–

Описание. Аморфный порошок темно-коричневого цвета, со специфическим запахом.

Подлинность. Пробоподготовка. Торф высушивают при комнатной температуре до воздушно-сухого состояния, диспергируют с помощью роторно-ножевой мельницы и просеивают через сито (диаметр отверстий 3 мм). Экстрагент добавляют в массовом соотношении 1:100, перемешивают в течение 8 ч в реакторе Р-100 при температуре 25°C. Отделяют жидкую фазу (раствор натрий гумата) от твердой фазы (остатка торфа) путем фильтрации при пониженном давлении. Полученное из торфа извлечение (раствор натрий гумата) обрабатывают 10 %-ной HCl до pH 1-2 для осаждения гуминовых кислот из жидкой фазы. После отделяют осажденные ГК центрифугированием, промывают осадок гуминовых кислот водой

очищенной до рН 7 для освобождения полученных гуминовых кислот от остатка минеральной кислоты и высушивают при комнатной температуре.

УФ-спектроскопия. К точной навеске (0,001 г) гуминовых кислот в мерной колбе на 100 мл добавляют раствор натрия гидроксида (концентрации 0,1 моль/л) до метки и перемешивают до полного растворения гуминовых кислот. Записывают электронный спектр в интервале от 200 до 800 нм (раствор сравнения: 0,1 моль/л раствор натрия гидроксида). Определяют коэффициенты экстинкции ($E_{0,001\% \text{ c}}$), которые характеризуют оптическую плотность растворов ГК при их концентрации 0,01 мг/мл для слоя 1 см, при длинах волн 465 нм (A_{465}) и 650 нм (A_{650}). Вычисляют коэффициент цветности $Q_{4/6}$ по Е. Вельте как отношение оптических плотностей при длинах волн 465 и 650 нм (A_{465} / A_{650}).

УФ-спектр гуминовых кислот должен соответствовать представленному на Рисунке 1 спектру, который не имеет четко выраженных максимумов поглощения в В-области (400-800 нм) спектра, а в УФ-области имеет плечо с максимумом поглощения 275 ± 2 нм.

Спектральные коэффициенты должны соответствовать числовым значениям, представленным в Таблице 1.

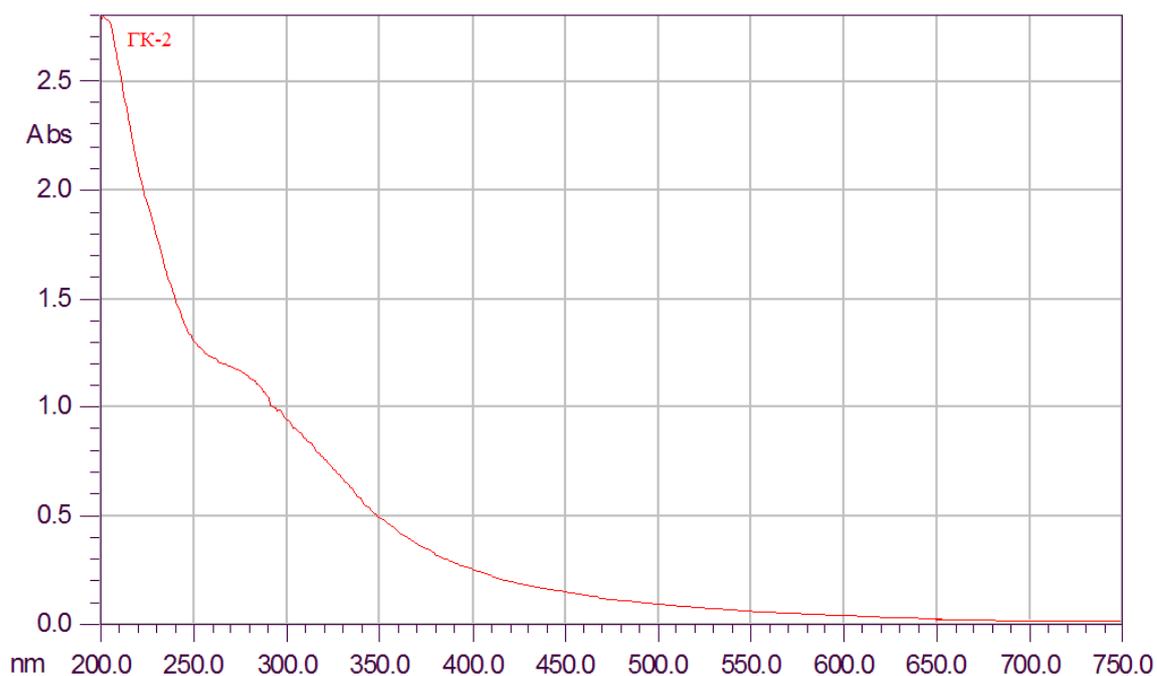


Рисунок 1 – Электронный спектр гуминовых кислот

Таблица 1 – Спектральные коэффициенты гуминовых кислот

$E_{465nm,1cm}^{0.001\%ГК}$	$E_{650nm,1cm}^{0.001\%ГК}$	$Q_{E_{465}/E_{650}}$
0,1284±0,0023	0,0398±0,0005	3,2261±0,498

Флуоресцентная спектроскопия. Готовят 0,0004 %-ные растворы гуминовых кислот в фосфатном буфере с рН = 6,86 методом разведения 0,002 %-ных растворов гуминовых кислот в 5 раз. Измерение флуоресценции проводят в стандартных кварцевых кюветах для флуориметрии, постоянная разность монохроматора ($\Delta\lambda = \lambda_{em} - \lambda_{ex} = 20$ нм), с шагом 1 нм при $\lambda_{возб} = 270, 310$ и 355 нм. Определяют положения максимумов флуоресценции (λ_{max} – длина волны максимума флуоресценции). Вычисляют гипсохромный («синий») сдвиг максимума флуоресценции при возбуждении светом с длиной волны $\lambda_{ex} 310$ нм относительно соответствующих максимумов при возбуждении на $\lambda_{ex} 270$ нм и $\lambda_{ex} 355$ нм, который характеризуется двумя параметрами. Первый ($\Delta 1$) – это сдвиг положения максимума флуоресценции при возбуждении на 310 нм относительно возбуждения на 270 нм ($\Delta 1 = \lambda_{max}(270) - \lambda_{max}(310)$). Второй ($\Delta 2$) – это сдвиг положения максимума флуоресценции при возбуждении на 355 нм относительно возбуждения на 310 нм ($\Delta 2 = \lambda_{max}(355) - \lambda_{max}(310)$).

Регистрацию спектров синхронной флуоресценции проводят в стандартных кварцевых кюветах для флуориметрии, ширина щели – 10 нм. Синхронные спектры флуоресценции регистрируют в диапазоне от 250 до 600 нм при скорости сканирования 240 нм / мин, постоянная разность монохроматора ($\Delta\lambda$) 20 нм.

Флуоресцентный спектр гуминовых кислот при $\lambda_{возб} = 270$ нм должен соответствовать представленному на Рисунке 2 спектру, где: первый пик (плечо) находится в области 400 ± 2 нм, второй пик находится в области 450 ± 2 нм, третий пик находится в длинноволновой области 475 ± 2 нм, четвертый пик находится в области 510-520 нм. Положения максимумов флуоресценции $\lambda_{возб}$ (270, 310 и 355 нм) и величины «синего сдвига» ($\Delta 1$, нм, $\Delta 2$, нм) максимума флуоресценции должны соответствовать числовым значениям, представленным в Таблице 2.

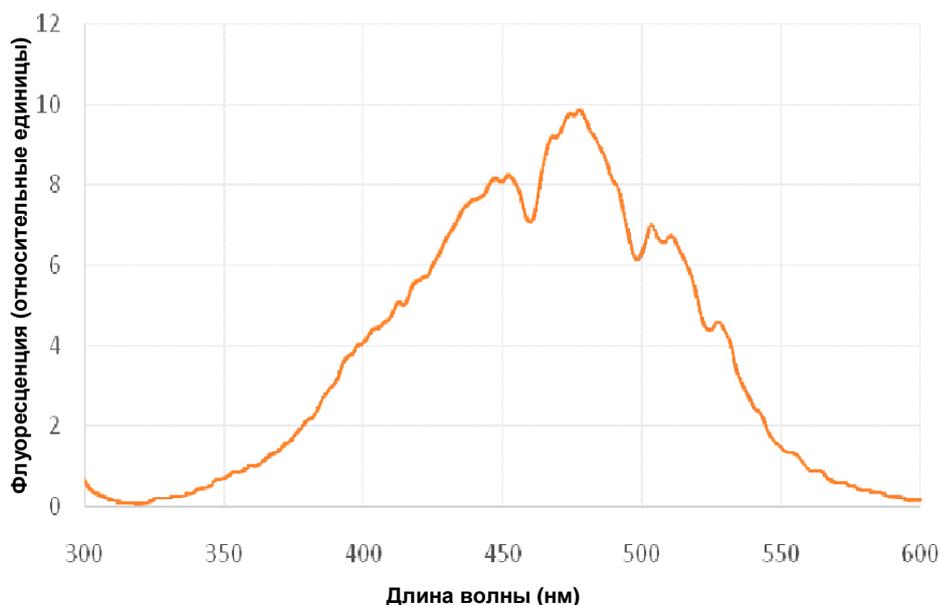


Рисунок 2 – Флуоресцентный спектр гуминовых кислот, при $\lambda_{\text{возб}}=270$ нм

Таблица 2 – Положение максимума флуоресценции и величина «синего сдвига» спектров испускания растворов гуминовых кислот при возбуждении на трех длинах волн ($\lambda_{\text{возб}} = \lambda_{\text{exc}}$)

Положение максимума флуоресценции (λ_{max} , нм)			«Синий сдвиг»	
$\lambda_{\text{возб}} = 270$	$\lambda_{\text{возб}} = 310$	$\lambda_{\text{возб}} = 355$	$\Delta 1$, нм	$\Delta 2$, нм
478,5±0,8	430,0±0,1	478,0±0,5	48,0±0,5	48,5±0,5

Инфракрасная спектроскопия. Точную навеску гуминовых кислот растирают в ступке с калий 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 записывают спектр в интервале значений частоты от 500 до 4000 см⁻¹. Навеску гуминовых кислот берут с точностью до 0,0010 г. В спектрах определяют спектральные коэффициенты на основании отношений оптических плотностей полос поглощения кислородсодержащих функциональных групп (ν_{OH} 3400 см⁻¹, $\nu_{\text{C=O}}$ 1720 см⁻¹, $\nu_{\text{C-O}}$, $\nu_{\text{C-C}}$ 1225 см⁻¹, $\nu_{\text{C-O}}$ 1035 см⁻¹) к оптическим плотностям полос поглощения, соответствующим ароматическим ($\nu_{\text{C=C}}$ 1610 см⁻¹) и алифатическим (ν_{Alif} 2920 см⁻¹) фрагментам структуры.

ИК-спектр гуминовых кислот должен соответствовать представленному на Рисунке 3 спектру, где содержатся характерные полосы поглощения при волновых числах: $3500-3300\text{ см}^{-1}$; $3250-3200\text{ см}^{-1}$; 2920 см^{-1} , 2860 см^{-1} , $1460-1440\text{ см}^{-1}$, $700-900\text{ см}^{-1}$; $2600-2500\text{ см}^{-1}$; $1725-1700\text{ см}^{-1}$; $1625-1610\text{ см}^{-1}$; $1510-1500\text{ см}^{-1}$; $1250-1225\text{ см}^{-1}$; $1050-1150\text{ см}^{-1}$.

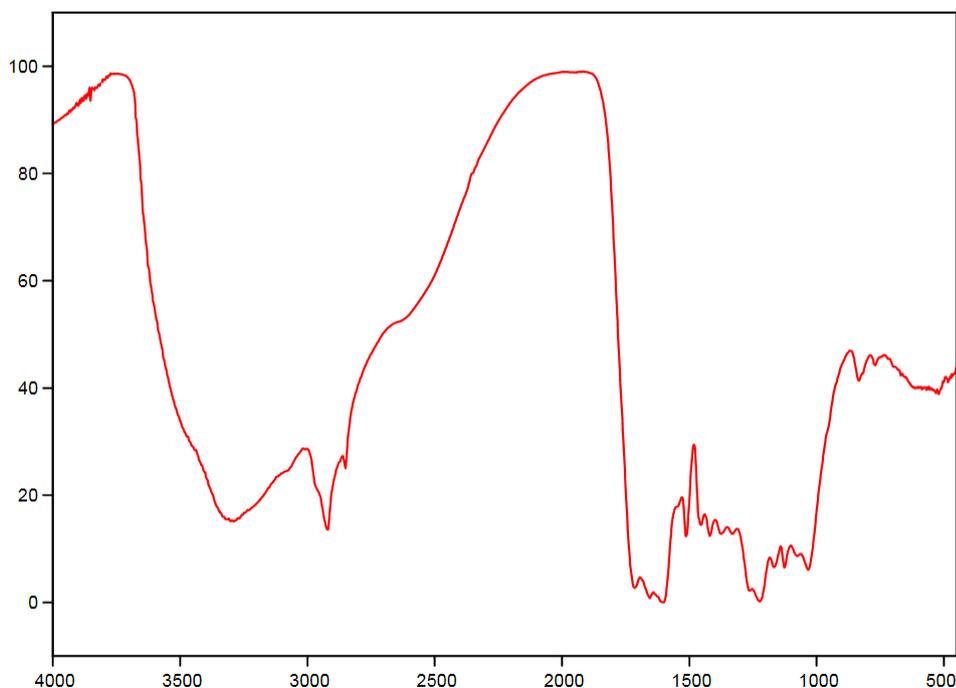


Рисунок 3 – ИК-спектр гуминовых кислот

Таблица 3 – Отношение оптических плотностей полос поглощения при определенных волновых числах по данным ИК-спектроскопии гуминовых кислот

A_{3400}/A_{1610}	A_{3400}/A_{1610}	A_{1225}/A_{1610}	A_{1035}/A_{1610}	A_{1610}/A_{2920}	A_{3400}/A_{2920}	A_{1720}/A_{2920}	A_{1225}/A_{2920}	A_{1035}/A_{2920}	A_{1035}/A_{1720}
0,75	0,98	1,00	0,90	1,60	0,97	1,21	1,25	1,07	0,85

Элементный анализ. Точную навеску гуминовых кислот гомогенизируют, растирая в агатовой ступке, помещают в кварцевую кювету C, H, N, O, S – анализатора и сжигают при 750°C , содержание кислорода определяют по разности. Массовые доли элементов в процентах ($\%_{\text{mass}}$) рассчитывают по градуировочным зависимостям, построенным с использованием Sulphanilamide Reference standard material. Вычисляют атомные доли элементов ($\%_{\text{atom}}$) и атомные отношения по

общепринятым методам. Среднюю степень окисления атома углерода (ω) в молекулах ГК рассчитывают по методу Ю.А. Жданова, по формуле

$$\omega = \frac{(2 O \%_{atom} + 3 N \%_{atom}) - H \%_{atom}}{C \%_{atom}}$$

где $O \%_{atom}$ - атомная доля кислорода;

$N \%_{atom}$ - атомная доля азота;

$H \%_{atom}$ - атомная доля водорода;

$C \%_{atom}$ - атомная доля углерода.

Показатели элементного анализа должны соответствовать числовым значениям, представленным в Таблице 4.

Таблица 4 – Данные элементного анализа гуминовых кислот

Массовые доли элементов, % (% _{mass}) Атомные доли элементов, % (% _{atom})				Атомные отношения			ω
C	H	N	O	H/C	O/C	C/N	
<u>55,35±0,50</u>	<u>5,86±0,05</u>	<u>4,20±0,03</u>	<u>34,30±0,44</u>	1,26	0,46	15,4	-0,14
35,88±0,42	45,21±0,33	2,33±0,02	16,65±0,24				
Примечание – массовые и атомные доли элементов рассчитаны на беззольную навеску							

¹³C ЯМР спектроскопия. Навеску гуминовых кислот (0,05 г) растворяют в 0,6 мл 0,3 М раствора NaOD / D₂O (Aldrich, изотопная чистота 99 + атомных %) в течение 30 мин в ультразвуковой бане, центрифугировании в течение 5 мин (10000 об. / мин) и отделении раствора от осадка. Раствор переносили в ампулу для ЯМР-спектроскопии диаметром 5 мм. Регистрацию ¹³C-ЯМР спектров и запись их интеграла осуществляли на ЯМР Фурье-спектрометре AVANCE 400 (400 мГц) (Bruker, Германия) с рабочей частотой 100 МГц для ядер ¹³C в режиме INVGATE, используя импульсную последовательность CPMG с первым импульсом последовательности 90°, временем регистрации сигнала спада свободной индукции 0,2 с и временем релаксационной задержки 7,8 с. Продолжительность записи одного ¹³C-ЯМР спектра продолжалась порядка 12 ч.

^{13}C -ЯМР спектр ГК должен соответствовать представленному на Рисунке 4 спектру, где содержатся характерные пики: в области атомов углерода незамещенного (5-48 м.д.) и замещенного (48-105 м.д.) алифатического углерода, атомов углерода ароматических фрагментов (108-165 м.д.), карбоксильных групп (165-187 м.д.)

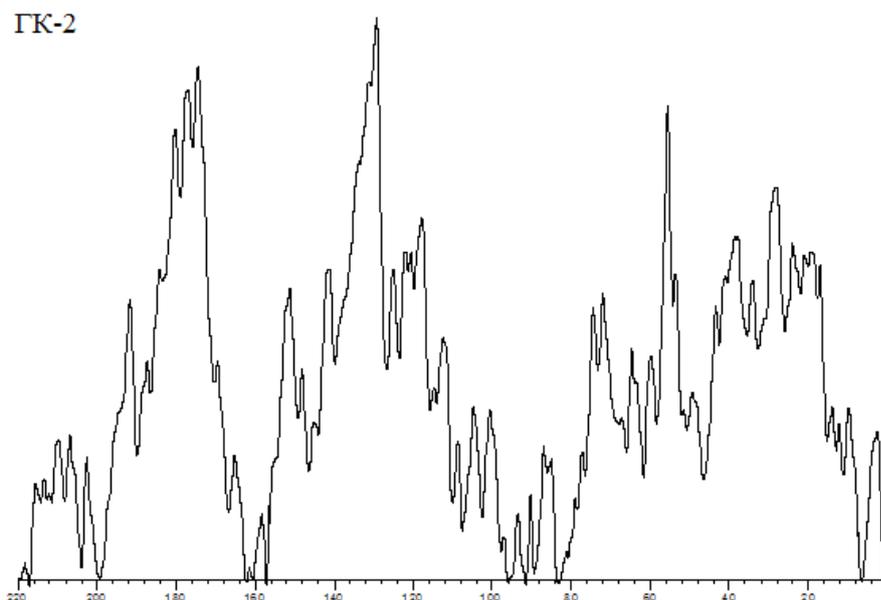


Рисунок 4 – ^{13}C -ЯМР спектр гуминовых кислот

Распределение углерода (% от $\text{C}_{\text{общ}}$) по фрагментам структуры в молекуле ГК должно соответствовать числовым значениям, представленным в Таблице 5.

Таблица 5 – Распределение углерода по фрагментам структуры молекул гуминовых кислот

Спектральные области, м.д.	% от $\text{C}_{\text{общ}}$
5-48 (CH_n , C-C)	24,9
48-90 (R-O, C-O, N-alkyl)	17,2
90-108 (O-C-O; O-C-N)	3,3
108-145 (C_{Ar} (C=C, C=C-C))	25,0
145-165 (C_{Ar} -O/N (C=C-O/N))	5,4
165-187 (O=C-(OH/O/NH ₂))	15,6
187-220 (O=C-(H ₂ /R ₂))	8,6

ВЭЖХ-анализ. Точную навеску гуминовых кислот (0,01 г) переносят в центрифужную пробирку на 15 мл, приливают 10 мл подвижной фазы и перемешивают на мультиротаторе Multi Bio RS-24 в течение 2 ч, после чего раствор

фильтруют через шприцевой фильтр с диаметром пор 0,45 мкм в вialsу автосемплера и хроматографируют. Хроматографическая система Dionex Ultimate 3000 («Thermo», США), включает : насос LPG-3400SD; автосемплер WPS-3000SL; термостат TCC-3000SD; диодно-матричный детектор DAD-3000. Неподвижная фаза: хроматографическая колонка для эксклюзионной хроматографии Ultrahydrogel 250, 250 Å, 7,8 x 300 мм (Waters, США). Подвижная фаза: 0,1 М трис-НСl буферный раствор с рН = 8.86, скорость потока элюента 0,5 мл / мин. Объем вводимой пробы 10 мкл; температура термостата колонки 30°C; детектирование спектрофотометрическое при 220 нм. Колонку уравнивают подвижной фазой до достижения стабильной базовой линии в течение 30 мин. Калибровочную зависимость строят с использованием стандартных растворов (с = 1 мг/мл) натриевой соли полистиролсульфата (PSS Polymer Standards Service GmbH, Германия) с молекулярными массами 1100, 1830, 4230, 10600, 29100, 75600, 148000, 261000 и 466000 Да.

Для расчета параметров молекулярной массы хроматографические пики разбивают на 70 фрагментов, которые интегрируют по отдельности, хроматограммы обрабатывают с использованием программного обеспечения Chromeleon 6.8. Вычисляют параметры молекулярной массы по формулам:

$$M_w = \frac{\sum M_i^2 \times H_i}{\sum M_i \times H_i}, \quad (1)$$

где M_w – среднемассовая молекулярная масса;

M_i – молекулярная масса i -ого фрагмента;

H_i – высота пика i -ого фрагмента.

$$M_n = \frac{\sum M_i \times H_i}{\sum H_i}, \quad (2)$$

где M_n – среднечисленная молекулярная масса.

$$M_p = \sqrt{M_w \times M_n}, \quad (3)$$

где M_p – медиана.

$$p = \frac{M_w}{M_n}, \quad (4)$$

где p – полидисперсность.

Основные показатели молекулярно-массового распределения должны соответствовать числовым значениям, представленным в Таблице 6.

Таблица 6 – Молекулярно-массовое распределение гуминовых кислот

Параметры ММР			
Среднечисленная Мм, Да (M_n)	Средневесовая Мм, Да (M_w)	Медиана, Да (M_p)	Полидисперсность (p)
11844,2	121393,4	37918,4	10,3

Сульфатная зола. В соответствии с ГФ XIV, ОФС.1.2.2.2.0014.15 «Сульфатная зола» (не более 1,0 %).

Потеря в массе при высушивании. В соответствии с ГФ XIV ОФС.1.2.1.0010.15 «Потеря в массе при высушивании», способ 1, температура до 60°C (не более 0,5 %).

Содержание радионуклидов. В соответствии с ГФ XIV, ОФС.1.5.3.0001.15 «Определение содержания радионуклидов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах» (Cs-137 не более 400 Бк/кг; Sr-90 не более 200 Бк/кг).

Содержание тяжелых металлов и мышьяка. В соответствии с ГФ XIV, ОФС.1.5.3.0009.15 «Определение содержания тяжелых металлов и мышьяка в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах» (свинец не более 6,0 мг/кг; кадмий не более 1,0 мг/кг; ртуть не более 0,1 мг/кг; мышьяк не более 0,5 мг/кг).

Микробиологическая чистота. В соответствии с ГФ XIV, ОФС.1.2.4.0002.15 «Микробиологическая чистота», категория 3.2 (общее число аэробных микроорганизмов – не более 10^4 КОЕ в 1 г; общее число плесневых и дрожжевых грибов – не более 10^2 КОЕ в 1 г; энтеробактерий, устойчивых к желчи – не более

10^2 КОЕ в 1 г; отсутствие: *Escherichia coli* (в 1 г); бактерий рода *Salmonella* (в 25 г); *Pseudomonas aeruginosa* (в 1 г); *Staphylococcus aureus* (в 1 г)).

Количественное определение. Спектрофотометрический метод. Измеряют оптическую плотность растворов, содержащих гуминовые кислоты, на длине волны 465 нм, используя растворы-сравнения. Количественное содержание определяют с использованием калибровочного графика (Рисунок 5).

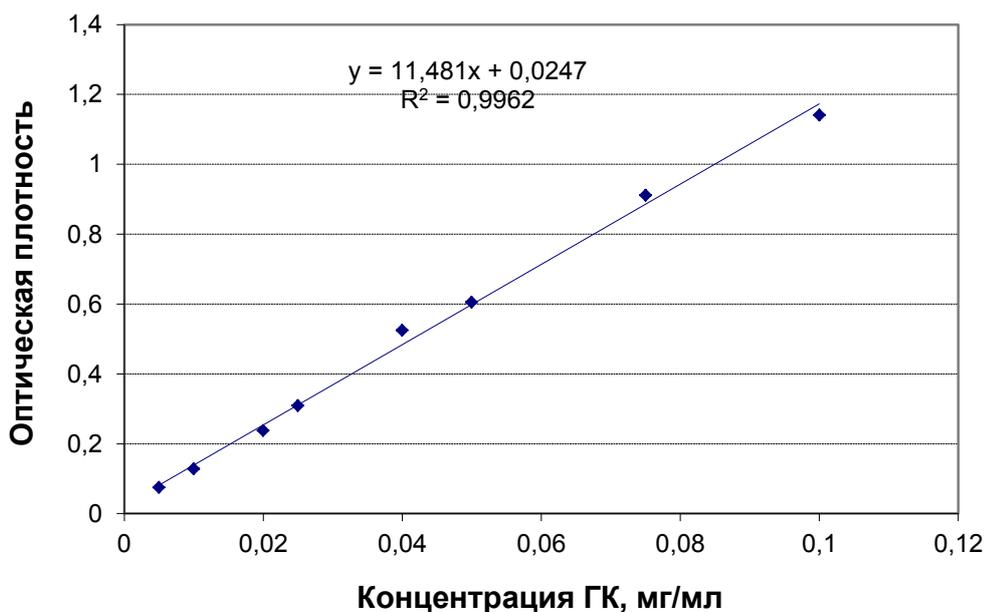


Рисунок 5 – Калибровочный график для расчета содержания гуминовых кислот низинного древесно-травяного торфа в растворе в диапазоне от 0,005 до 0,1 мг/мл

Биологическая активность. Определение радикалосвязывающей активности колориметрическим методом со спиртовым раствором стабильного хромоген-радикала 1,1-дифенил-2-пикрилгидразила (ДФПГ) во времени проводят на спектрофотометре при длине волны $\lambda = 520$ нм. Реакцию проводят непосредственно в кварцевых кюветах толщиной 10 мм, уже находящихся в спектрофотометре, при комнатной температуре путем приливания раствора ДФПГ к раствору гуминовых кислот. Анализируемые пробы должны содержать 0,1 мл 0,001 %-ного метанольного раствора ДФПГ и 0,9 мл испытуемого метанольного раствора гуминовых кислот в конечной концентрации 100 мкг/мл (раствор сравнения: 0,9 мл испытуемого метанольного раствора гуминовых кислот и 0,1 мл

метанола). Контрольная проба должна содержать 0,9 мл метанола и 0,1 мл 0,001 %-ного метанольного раствора ДФПГ (раствор сравнения: метанол). В результате восстановления ДФПГ гуминовыми кислотами снижается пурпурно-синяя окраска ДФПГ, что контролируется изменением оптической плотности в течение 30 мин. Уменьшение величины оптической плотности указывает на радикалосвязывающую активность гуминовых кислот, которую оценивают по интенсивности взаимодействия ДФПГ с гуминовыми кислотами и представляют в (%), что и является характеристикой радикалосвязывающей активности (АРА).

Процент радикалосвязывающей активности (АРА, %) – процент гибели радикалов ДФПГ вычисляют по формуле

$$ARA = \frac{A_1 - A_2}{A_1} \times 100 \% \quad (5)$$

где A_1 – оптическая плотность контрольной пробы ДФПГ относительно чистого растворителя (метанола);

A_2 – оптическая плотность образца ГК относительно раствора сравнения испытуемого раствора образца ГК.

Показатели радикалосвязывающей активности ГК должны соответствовать числовым значениям, представленным в Таблице 7. Радикалосвязывающая активность гуминовых кислот характеризуется двумя параметрами: процентом гибели радикала ДФПГ при взаимодействии его с гуминовыми кислотами, а также временем в [мин] за которое ДФПГ прореагирует с гуминовыми кислотами на 50 % ($\tau_{1/2}$).

Таблица 7 – Показатели радикалосвязывающей активности гуминовых кислот

ДФПГ, % ингибирования	Время реакции ДФПГ ($\tau_{1/2}$), мин
73,21	2

Упаковка, маркировка и транспортирование. В соответствии с требованиями ГФ XIV, ОФС.1.1.0019.15 «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов» (в банки полимерные для лекарственных средств с

винтовой горловиной БП-210 РУ № ФСР 2009/04119). На банки наклеивают этикетку из бумаги этикеточной по ГОСТ 7625-86 или бумаги писчей по ГОСТ 18510-87. На этикетке указывают предприятие-изготовитель, его товарный знак, название, массу в упаковке, номер серии, срок годности. Маркировка транспортной тары в соответствии с ГОСТ 17768-90.

Хранение. В соответствии с требованиями ГФ XIV, ОФС.1.1.0011.15 «Хранение лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов». В сухом защищенном от света месте.

Срок годности. Устанавливается согласно правилам определения срока годности лекарственных средств (в разработке).

Примечание. Реактивы и растворы, приведенные в настоящей нормативной документации, описаны в соответствующих разделах ГФ XIV.

ПРИЛОЖЕНИЕ 3
АКТЫ ВНЕДРЕНИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ ДИССЕРТАЦИОННОЙ РАБОТЫ В
УЧЕБНЫЙ ПРОЦЕСС


УТВЕРЖДАЮ
 Ректор ФГБОУ ВО
 «Томский государственный
 педагогический университет»
 А.Н. Макаренко
 «___» _____ 2019 г.

АКТ О ВНЕДРЕНИИ

в учебный процесс кафедры безопасности жизнедеятельности и медико-биологических дисциплин ФГБОУ ВО «Томский государственный педагогический университет» результатов диссертационной работы **Логвиновой Людмилы Анатольевны** на тему **«Физико-химические и кардиотропные свойства гуминовых кислот низинного древесно-травяного вида торфа»** по специальности **14.04.02 – фармацевтическая химия, фармакогнозия**, представленной на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук.

По результатам научно-исследовательской работы, выполненной Л.А. Логвиновой в ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Минздрава России (научный руководитель – М.В. Зыкова, д-р фарм. наук; научный консультант - Т.В. Ласукова, д-р биол. наук) проведен научно-методический семинар на тему «Физико-химические и кардиотропные свойства гуминовых кислот низинного древесно-травяного вида торфа». На семинаре были рассмотрены вопросы современного состояния научных исследований химических и биологических свойств высокомолекулярных соединений гуминовой природы, заслушаны результаты о влиянии гуминовых кислот на состояние сердечно-сосудистой системы в физиологических и патологических условиях. Также были заслушаны результаты о проявленных актопротекторных свойствах данной группы природных соединений.

Материалы диссертационной работы Л.А. Логвиновой на тему «Физико-химические и кардиотропные свойства гуминовых кислот низинного древесно-травяного вида торфа» включены в учебный процесс кафедры безопасности жизнедеятельности и медико-биологических дисциплин ФГБОУ ВО «Томский государственный педагогический университет» по дисциплине «Безопасность жизнедеятельности» в лекции, посвященные профилактике сердечно-сосудистых заболеваний из раздела «Основы здорового образа жизни». Результаты исследований используются при чтении курса «Физиология человека» и «Возрастная физиология и психофизиология» в разделах «Стресс, адаптация, адаптогены» и «Физиология сердечно-сосудистой системы». Используются новые данные о способности образцов гуминовых кислот низинного древесно-травяного торфа болот Томской области оказывать кардиопротекторное, антиоксидантное и актопротекторное действие, которое в перспективе может быть использовано для профилактики ишемической болезни сердца, повышения физической работоспособности и выносливости человека, а также для использования у лиц, специализирующихся в различных видах спорта или занятых тяжелым физическим трудом.

Председатель:

д-р биол. наук, доцент

Члены комиссии: канд. биол. наук, доцент
 канд. биол. наук, доцент
 канд. мед. наук, доцент

Р.Р. Ахмеджанов

М.Л. Седокова

Т.А. Томова

А.В. Кулемзин



Минздрав России

Федеральное государственное бюджетное
образовательное учреждение высшего образования
«Сибирский государственный медицинский
университет» Министерства здравоохранения
Российской Федерации
(ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России)
Московский тракт, д. 2, г. Томск, 634050
Телефон (3822) 53 04 23;
Факс (3822) 53 33 09
e-mail: office@ssmu.ru
http://www.ssmu.ru
ОКПО 01963539 ОГРН 1027000885251
ИНН 7018013613 КПП 701701001

УТВЕРЖДАЮ

Проректор по учебной работе
д-р мед. наук

А.Г. Мирошниченко



2019

№ _____
На № _____ от _____

АКТ

внедрения в учебный процесс кафедры химии результатов диссертационной работы Логвиновой Л.А. на тему «Физико-химические и кардиотропные свойства гуминовых кислот низинного древесно-травяного торфа», представленной на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук по специальности 14.04.02 – фармацевтическая химия, фармакогнозия

Мы, нижеподписавшиеся, комиссия в составе: председателя - заведующего кафедрой, д-ра фармацевт. наук, доцента Зыковой М.В. и членов: доцента, канд. хим. наук Голубиной О.А., доцента, канд. хим. Жолобовой Г.А. удостоверяем, что результаты диссертационной работы Логвиновой Л.А. внедрены в учебный процесс кафедры химии в раздел «Установление строения органических соединений по их спектральным характеристикам и физико-химическим свойствам» (по дисциплине «Органическая химия», 2 курс фармацевтического факультета), в разделы дисциплины «Физико-химия высокомолекулярных соединений» (2 курс медико-биологического факультета, медицинская биохимия), в разделы дисциплины «Физико-химические методы анализа» (3 курс медико-биологического факультета, медицинская биохимия), в разделы дисциплины «Основы хроматографического анализа / Основы спектрального анализа» (4 курс медико-биологического факультета, медицинская биохимия), в раздел «Окислительный стресс и антиоксидантные буферные системы» (по дисциплине химия, 1 курс лечебного факультета) с 2019 г. Получены новые данные и методики, касающиеся исследования природных высокомолекулярных соединений (на примере гуминовых веществ торфа) современными методами физико-химического анализа (спектрального, хроматографического, титриметрического). Кроме того по результатам проведенной работы обоснованы преимущества ряда методологических подходов в исследовании биологических свойств сложных природных молекул во взаимосвязи с их строением.

Председатель

М.В. Зыкова

Члены комиссии

О.А. Голубина

Г.А. Жолобова

Минздрав России

Федеральное государственное бюджетное
образовательное учреждение высшего образования
«Сибирский государственный медицинский
университет» Министерства здравоохранения
Российской Федерации
(ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России)
Московский тракт, д. 2, г. Томск, 634050
Телефон (3822) 53 04 23;
Факс (3822) 53 33 09
e-mail: office@ssmu.ru
http://www.ssmu.ru
ОКПО 01963539 ОГРН 1027000885251
ИНН 7018013613 КПП 701701001

УТВЕРЖДАЮ

Проректор по учебной работе
д-р мед. наук

А.Г. Мирошниченко

07.09 2019



№ _____
На № _____ от _____

АКТ

внедрения в учебный процесс кафедры фармацевтического анализа результатов диссертационной работы Логвиновой Л.А. на тему “Физико-химические и кардиотропные свойства гуминовых кислот низинного древесно-травяного торфа”, представленной на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук по специальности 14.04.02 – фармацевтическая химия, фармакогнозия

Мы, нижеподписавшиеся, комиссия в составе: председателя - заведующего кафедрой, д-ра фармацевт. наук, доцента Белоусова М.В. и членов: доцента, канд. фармацевт. наук Кадыровой Т.В., доцента, канд. хим. наук Дрыгуновой Л.А. удостоверяем, что результаты диссертационной работы Логвиновой Л.А. внедрены в учебный процесс кафедры фармацевтического анализа в разделе “Физико-химические методы анализа” (по дисциплине аналитическая химия, 2 курс фармацевтического факультета, осенний и весенний семестры) с 2019 г. Получены новые данные, касающиеся исследования дескрипторов строения природных высокомолекулярных соединений гуминовой природы физико-химическими методами анализа, которые представляют собой интерес с точки зрения постановки новых исследовательских методик и формирования тематик научных исследований. Кроме того по результатам проведенной работы обоснованы преимущества методов электронной, ИК, ЯМР спектроскопии, элементного (С,Н,N,O,S) и титриметрического анализа, эксклюзионной ВЭЖХ в исследовании молекулярных ансамблей.

Председатель

М.В. Белоусов

Члены комиссии

Т.В. Кадырова

Л.А. Дрыгунова