

Исследование химических и токсических свойств гуминовых кислот низинного древесно-травяного торфа Томской области

Белоусов М.В.¹, Ахмеджанов Р.Р.², Гостищева М.В.¹, Юсубов М.С.¹,
Матвеев А.В.¹

Research of chemical and toxic properties of humic acids of low-moor woody-grassy type of a peat in Tomsk Region

Belousov M.V., Akhmedzhanov R.R., Gostischeva M.V., Yusubov M.S.,
Matveyenko A.V.

¹ Сибирский государственный медицинский университет, г. Томск

² Томский политехнический университет, г. Томск

© Белоусов М.В., Ахмеджанов Р.Р., Гостищева М.В. и др.

Проведены исследования химического строения гуминовых кислот низинного древесно-травяного торфа Томской области методами элементного анализа и инфракрасной спектроскопии. Показано, что гуминовые кислоты низинного торфа представляют собой соединения с высокой долей алифатических фрагментов, представленных длинными сопряженными цепями, имеют малую степень бензоидности, содержат активные кислород- и азотсодержащие функциональные группы (карбоксильные, гидроксильные, амидные, аминогруппы). Исследована острая токсичность гуминовых кислот торфа. Установлено, что гуминовые кислоты при внутривенном введении являются малотоксичными веществами. При внутривенном введении летальных доз гибель животных наступала от острой сердечной недостаточности, при этом причиной острого нарушения гемодинамики может являться негативное влияние гуминовых кислот на реологические свойства крови.

Ключевые слова: торф, гуминовые кислоты, элементный анализ, инфракрасная спектроскопия, острая токсичность, патоморфология, реологические свойства крови.

In article results of research of a chemical structure of humic acids of low-moor woody-grassy type of peat of Tomsk Region are resulted by methods of the elemental analysis and infra-red spectroscopy. In this work results of toxicological research of humic acids also are described: acute toxicity, pathomorphology and flow properties of blood. It is shown, that humic acids of low-moor woody-grassy type of peat represent connection with a high share aliphatic fragments submitted long connected by circuits, have a small degree benzenoid, contain active oxygen and nitrogen-containing functional groups (carboxylic, hydroxyl, amides, amino groups). It is established, that humic acids at intragastric introduction are nontoxic substances. At intraperitoneal introduction of lethal doses, the destruction of animals comes from acute intimate insufficiency, thus the cause of acute infringement hemodynamics can be negative influence of humic acids on flow properties of blood.

Key words: peat, humic acids, elemental analysis, infra-red spectroscopy, acute toxicity, pathomorphology, flow property of blood.

УДК 615.32:552.577.1(571.16):547.992.2-026.86-028.78

Введение

Гуминовые кислоты (ГК) торфа — сложная смесь высокомолекулярных и полифункциональных соединений алициклической, гидроароматической, ароматической и гетероциклической природы, замещенных разной длины алкильными цепями как нормального, так и изомерного строения, включающих предельные и непре-

дельные связи с различными функциональными группами (карбоксильными, гидроксильными, метоксильными, амидными, аминогруппами) [13]. Гуминовые кислоты торфа представляют собой кислотно-основной комплекс, являются донорами и акцепторами анионов, катионов, протонов и электронов, могут участвовать в различных окислительно-

восстановительных реакциях, ферментативно-субстратных взаимодействиях и детоксикации ксенобиотиков, влияют на осмотическое давление, в образовании комплексных соединений, включая хелатные, с некоторыми биофильными элементами и в других процессах [1, 3, 9, 15, 17, 19].

Перечисленные особенности определяют не только большое разнообразие химических свойств этих кислот, но и широкий спектр их биологической активности. При этом, несмотря на наличие значительного количества общих элементов структуры, биологическая активность ГК, полученных из разных месторождений торфа, может существенно различаться, что объясняется высокой степенью полиморфизма их химической структуры [5, 8]. Это делает практически невозможными попытки теоретического обобщения и внеэкспериментального прогнозирования особенностей их токсических и фармакологических свойств по общим элементам структуры и обуславливает необходимость биологической стандартизации образцов из каждого месторождения.

Цель настоящего исследования — изучение химического строения и токсических свойств гуминовых кислот, полученных из низинного древесно-травяного вида торфа месторождения «Клюквенное» Томского района Томской области.

Материал и методы

Для исследования ГК взят низинный торф древесно-травяного ботанического состава со степенью разложения 25%, зольностью 8,1% с глубины 10—30 см торфяного месторождения «Клюквенное» Томского района Томской области, содержание гуминовых кислот в котором составляет 43,6 мас% на органическое вещество.

Гуминовые кислоты выделяли 0,1 н NaOH по Н.Н. Бамбалову [2]. Элементный состав определяли на С-, Н-, N-анализаторе «Carlo Erba Strumentazione» модель 1106 (Италия). Спектры инфракрасного (ИК) поглощения ГК записывали на ИК-Фурье-спектрометре Nicolet 5700 (Thermo Electron Corp., США) в таблетках с KBr в соотношении 1 : 100 соответственно в интервале значений частоты от 500 до 4 000 см⁻¹.

Исследование острой токсичности проведено на половозрелых белых беспородных мышках-самцах массой 18—22 г и половозрелых белых беспородных

крысах-самцах массой 180—200 г. Острую токсичность оценивали при однократном внутрижелудочном и внутрибрюшинном способах введения. Изучаемый препарат гуминовых кислот торфа вводили мышам и крысам в виде 3%-го водного раствора (рН = 7,4) в максимально возможном объеме для данного вида животных и способа введения. В течение 14 сут после введения препарата вели наблюдение за животными. Фиксировали клиническую картину отравления: гибель, изменения двигательной активности и мышечного тонуса, состояния кожных покровов и слизистых оболочек, наличие судорог, птоз, саливацию, наличие выделений, способность животных сохранять правильное положение тела. Расчет ЛД₅₀ проводили по методу Литчфилда—Уилкоксона [6, 15] с определением параметров частично летальной (ЛД₁₆), среднелетальной (ЛД₅₀), абсолютно летальной (ЛД₁₀₀) и близкой к абсолютно смертельной (ЛД₈₄) доз. Рассчитывали стандартное отклонение величины средней смертельной дозы (SD_{ЛД50}).

Патоморфологические исследования на крысах проведены совместно с сотрудниками кафедры оперативной хирургии и патологической анатомии Сибирского государственного медицинского университета (г. Томск). Для установления причины гибели и выявления органов-мишеней проводили вскрытие погибших животных и выполняли макроскопическое исследование внутренних органов. Для микроскопического исследования были взяты следующие органы: головной мозг, мозжечок, гипофиз, сердце, легкое, печень, почка, желудок, тонкая и толстая кишка, поджелудочная и щитовидная железы, селезенка, тимус, надпочечник, семенник. Кусочки органов фиксировали в формалине и заливали в парафин. Депарафинированные срезы окрашивали гематоксилином и эозином.

Влияние ГК на реологические свойства крови оценивали по воздействию их на показатели обратной агрегации эритроцитов (ОАЭ) крыс при внесении исследуемого препарата в пробу цельной крови *in vitro*. Регистрацию показателей ОАЭ осуществляли фотометрическим вибрационным методом [17]. Принцип метода основан на изменениях оптической плотности пробы, сопровождающих процессы дезагрегации и агрегации эритроцитов под воздействием вибрации. Измеряли скорость спонтанной агрегации эритроцитов, величину полупериода агрегации эритроцитов τ . На основании полученных показателей ОАЭ рассчитывали индекс агрегации.

Статистическую обработку результатов проводили с помощью пакета программ Statistica 6.0 for Windows, при использовании непараметрических критериев Вилкоксона—Манна—Уитни и углового преобразования Фишера. Достоверными считались различия при достигнутом уровне значимости $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Анализируя данные элементного состава (табл. 1), необходимо отметить довольно низкое содержание углерода (47,0 мас%) в исследуемых ГК. Согласно разработанным Д.С. Орловым [11] диагностическим признакам отнесения выделенных из природных объектов веществ к гуминовым кислотам, данные результаты составляют нижний предел содержания в них углерода (46—62 мас%), что весьма характерно для торфяных ГК [5, 10, 11]. Суммарное значение кислорода косвенно характеризует количество кислородсодержащих функциональных групп [7]. Для исследуемых ГК отмечены высокие значения (43,5 мас%), согласно атомному отношению О/С они обладают высокой степенью окисленности молекулы, что может быть связано с большим содержанием в их структуре карбоксильных и гидроксильных групп [8]. Об относительно высоком количестве амидных и аминогрупп могут свидетельствовать данные атомного отношения

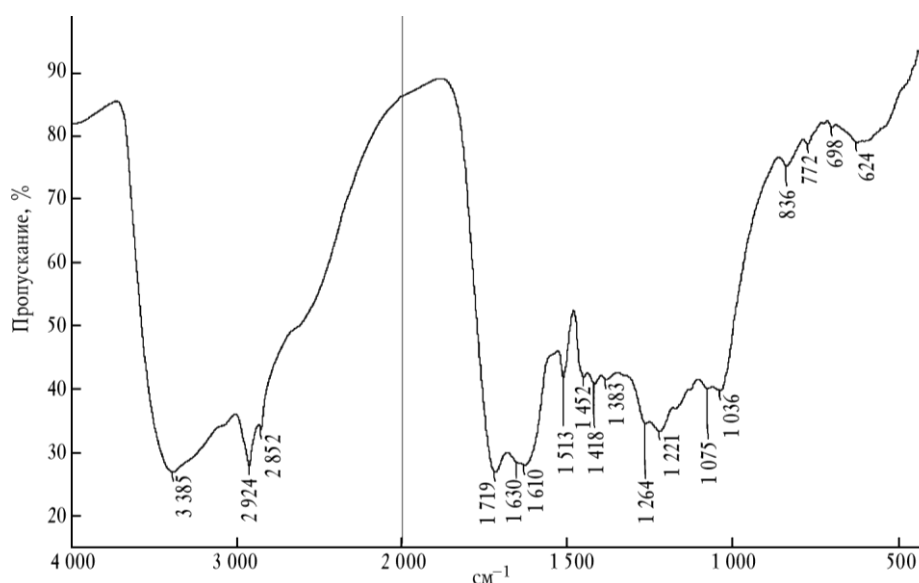
С/Н [4, 8]. Анализируя содержание азота в исследуемых ГК (3,8 мас%), можно отметить, что они удовлетворяют вышеупомянутым требованиям диагностических признаков ГК по Д.С. Орлову [11], согласно которым содержание азота должно быть от 3 до 6 мас%.

Полученные спектры инфракрасного поглощения (рисунок) исследуемых ГК свидетельствуют о том, что для них характерны типичные для ГК торфов полосы поглощения [5, 8, 10—12, 18]. Отмечается широкая интенсивная полоса поглощения с максимумом при $3\,500\text{—}3\,300\text{ см}^{-1}$, которая обусловлена валентными колебаниями гидроксильных групп (ν_{OH}) различного характера, преимущественно связанных водородными связями. На длинноволновом крыле главной полосы около $3\,250\text{—}3\,200\text{ см}^{-1}$ обнаруживается поглощение средней интенсивности, имеющее вид уступа (перегиба) и отвечающее валентным колебаниям N—H (ν_{NH}) в структуре амида и аминов, связанных водородными связями. При значениях $2\,926\text{—}2\,920$ и $2\,852\text{ см}^{-1}$ хорошо видны полосы средней интенсивности, поглощающие за счет валентных колебаний $-\text{CH}_3$ и $-\text{CH}_2$ -групп боковых цепей в молекулах ГК, вызванные преимущественно метиленовыми группировками, на что указывает и полоса асимметричных и симметричных деформационных колебаний в области $1\,480\text{—}1\,380\text{ см}^{-1}$.

Таблица 1

Элементный состав и атомное отношение в гуминовых кислотах торфа

Тип, вид торфа	Элементный состав, мас% на беззольную навеску					Атомное отношение		
	С	Н	N	О	S	Н/С	С/Н	О/С
Низинный древесно-травяной	47,00	5,50	3,80	43,50	0,20	1,40	14,43	0,69



ИК-спектр гуминовых кислот низинного древесно-травяного торфа

На спектрах исследуемых ГК отмечается слабое поглощение при $2\,600\text{--}2\,500\text{ см}^{-1}$, которое характерно для карбоновых кислот. Эта широкая полоса считается очень характерной для валентных колебаний гидроксильных групп, участвующих в образовании сильных водородных связей в димерных формах карбоновых кислот. Отчетливый максимум сильной интенсивности обнаруживается в интервале от $1\,725$ до $1\,650\text{ см}^{-1}$, что свойственно для валентных колебаний карбонильной группы ($\nu_{\text{C=O}}$), которая может быть представлена кетонами, альдегидами, карбоновыми кислотами и их функциональными производными [10—12, 18]. Интенсивная полоса поглощения в области $1\,650\text{--}1\,600\text{ см}^{-1}$ обусловлена плоскостными колебаниями сопряженных углерод-углеродных (ароматические, $\nu_{\text{C=C}}$) и углерод-кислородных связей (карбонилы, связанные водородными связями, карбоксилат-ионы, $\nu_{\text{C=O}}$), в ароматическом скелете и хинонах. Некоторые авторы считают, что именно ароматические $\nu_{\text{C=C}}$ ответственны за данную полосу, максимум которой приходится на $1\,610\text{ см}^{-1}$ [11, 12]. В исследуемых ГК максимум наблюдается также при $1\,630\text{ см}^{-1}$, что может быть обусловлено наложением полосы амидной группы (δ_{NH_2} , амид II). Полоса поглощения около $1\,513\text{ см}^{-1}$ ($\nu_{\text{C=C}}$) указывает на наличие неконденсированных ароматических соединений в составе ГК, связанных с атомами азота и кислорода.

Поглощения в области $1\,264\text{--}1\,225\text{ см}^{-1}$ определяются в основном валентными ($\nu_{\text{C-O}}$) и деформационными колебаниями ($\delta_{\text{O-H}}$) связей. За поглощения

излучения в коротковолновой части спектра в области $1\,150\text{--}1\,000\text{ см}^{-1}$ ответственны валентные колебания спиртовых и углеводных гидроксильных групп (ν_{OH}). В интервале около $1\,050\text{ см}^{-1}$ ($\nu_{\text{C-O}}$) поглощают излучение первичные спирты, при $1\,100\text{ см}^{-1}$ ($\nu_{\text{C-O}}$) — вторичные и при $1\,150\text{ см}^{-1}$ ($\nu_{\text{C-O}}$) — третичные спирты. Поглощение в данной области может быть также обусловлено валентными колебаниями ($\nu_{\text{C-O-C}}$) гликозидных связей углеводов, C—O—C-связями циклических и алифатических простых эфиров. В области волновых чисел от $1\,000$ до 600 см^{-1} наблюдаются слабые полосы поглощения, возможно обусловленные внеплоскостными деформационными колебаниями ($\delta_{\text{C-H}}$) в ароматических кольцах, имеющих два и более незамещенных атомов водорода.

Таким образом, максимальная интенсивность полос поглощения в спектрах ГК низинного древесно-травяного торфа отмечена для гидроксильных, карбонильных (карбоксильных) групп, алифатических и ароматических фрагментов.

При внутрижелудочном введении мышам ГК в виде 3%-го водного раствора в диапазоне доз $3\,750\text{--}7\,500\text{ мг/кг}$ массы тела наблюдалась дозозависимая гибель животных (табл. 2). Средняя летальная доза (LD_{50}) исследуемого препарата гуминовых кислот составила $4\,658,40\text{ мг/кг}$ массы тела. Таким образом, исследуемый препарат ГК при введении мышам в желудок следует отнести к III классу опасности — вещества умеренно опасные. При этом величина LD_{50} данного препарата приближается к IV классу опасности —

вещества малоопасные ($LD_{50} > 5\,000$ мг/кг массы тела).

7 500

0

Таблица 5

Параметры острой токсичности гуминовых кислот при внутрибрюшинном введении крысам

Доза, мг/кг массы тела	Показатель гибели, %	Показатель острой токсичности, мг/кг массы тела
200	0	$LD_{16} = 232,24$
400	40	$LD_{50} = 480,12$
559	60	$LD_{84} = 750,43$
780	75	$LD_{100} = 867,32$
1 055	100	$SD_{LD50} = 48,63$

Параметры острой токсичности гуминовых кислот при внутрижелудочном введении мышам

Доза, мг/кг массы тела	Показатель гибели, %	Показатель острой токсичности, мг/кг массы тела
2 800	0	$LD_{16} = 3\,399,50$
3 750	13	$LD_{50} = 4\,658,40$
4 400	40	$LD_{84} = 5\,917,30$
		$LD_{100} = 6\,546,70$
		$SD_{LD50} = 445,08$

При внутрибрюшинном введении мышам ГК проявляют более выраженные токсические свойства — дозозависимая гибель животных наблюдалась в диапазоне доз 238,7—974,1 мг/кг массы тела (табл. 3). Средняя летальная доза исследуемого препарата гуминовых кислот при внутрибрюшинном введении составила 532,89 мг/кг массы тела.

Таблица 3

Параметры острой токсичности гуминовых кислот при внутрибрюшинном введении мышам

Доза, мг/кг массы тела	Показатель гибели, %	Показатель острой токсичности, мг/кг массы тела
200	0	$LD_{16} = 238,73$
400	40	$LD_{50} = 532,89$
559	60	$LD_{84} = 827,05$
		$LD_{100} = 974,14$
		$SD_{LD50} = 78,62$

При внутрижелудочном введении исследуемого препарата крысам в аналогичном диапазоне доз не наблюдалось гибели животных (табл. 4) и картины острого отравления в течение 2 нед наблюдения, что может быть связано с более медленным всасыванием гуминовых кислот в желудочно-кишечном тракте. Таким образом, исследуемый препарат ГК при внутрижелудочном введении крысам соответствует IV классу опасности — вещества малоопасные. При внутрибрюшинном введении крысам величина LD_{50} исследованного препарата составила 480,12 мг/кг массы тела (табл. 5).

Таблица 4

Показатели выживаемости крыс при внутрижелудочном введении ГК

Доза, мг/кг массы тела	Показатель гибели, %
2 800	0
3 750	0
4 400	0
5 000	0

Для предварительной оценки возможных кумулятивных свойств ГК при внутрибрюшинном введении было выполнено дробное инъецирование препарата. Гуминовые кислоты торфа внутрибрюшинно вводили каждые 6 ч мышам и крысам в дозах, составляющих приблизительно 1/10 LD_{50} (50 мг/кг массы тела) при данном способе введения. В данных условиях эксперимента картина острого отравления и гибель животных отмечалась уже с 4—5-й инъекции, что указывает на выраженную кумуляцию ГК в организме.

Необходимо отметить, что при введении летальных доз препарата ГК и у мышей, и у крыс наблюдалась сходная картина острого отравления: резкое снижение двигательной активности, ослабление мышечного тонуса, нарушение координации движений, выраженный цианоз (конечностей, семенников, ушей и мордочки). Для установления причин летальности и выявления возможных органов-мишеней, поражаемых при остром токсическом воздействии, было выполнено патоморфологическое исследование трупов крыс, погибших при внутрибрюшинном введении заведомо летальных доз препарата ГК. При макроскопическом исследовании трупов животных отмечалось выраженное полнокровие всех внутренних органов, другой патологии не обнаружено. При микроскопическом исследовании также обнаружено выраженное полнокровие внутренних органов со стазом форменных элементов. Наблюдались умеренно выраженный периваскулярный и перичеллюлярный отек головного мозга, геморрагический отек легких, острая коронарная и острая почечная недостаточность. Обнаруживались дистрофические изменения коры надпочечников. Смерть животных наступала от острой сердечной недостаточности, возникшей в результате ишемической дистрофии миокарда. Острые нарушения сердечной деятельности повлекли за собой застойные явления в

малом круге кровообращения с развитием геморрагического отека легких. Общее острое нарушение гемодинамики явилось шоковым раздражителем для почек и послужило причиной острой почечной недостаточности.

Одним из возможных механизмов подобного кардиотоксического действия ГК может быть их негативное влияние на реологические свойства крови, влекущее острое нарушение гемодинамики. Поэтому было проведено исследование влияния на реологические свойства крови фотометрическим вибрационным методом [17]. Полученные результаты свидетельствуют о том, что ГК *in vitro* вызывают существенное (в 2,26 раза) в сравнении с показателями интактной пробы (без ГК) увеличение показателя индекса ОАЭ (табл. 6).

Таблица 6

Влияние гуминовых кислот торфов и препаратов сравнения (трентала и декстрана) на показатели ОАЭ крови крыс, % от показателей интактной пробы

Объект	Uo, B	Ud, B	A, мм	τ, с	I
ГК	108,1	166,1	94,6	73,5	226,8
Трентал	126,5	91,7	80,1	95,8	94,6
Декстран	144,6	78,0	47,0	133,5	58,5

Это может приводить к значительному увеличению вязкости крови, нарушению кровоснабжения миокарда и обуславливать негативное кардиотропное воздействие препарата ГК в летальных дозах.

Заключение

В результате проведенного элементного анализа и ИК-спектроскопии показано, что исследуемые ГК представляют собой соединения с высокой долей алифатических фрагментов, представленных длинными сопряженными цепями. В составе периферических алифатических структур присутствуют в основном гидролизуемые (пептиды и углеводы) соединения, вклад негидролизуемых соединений (с $-CH_3$ и $-CH_2-$ группами) в состав алифатической части незначителен. Гуминовые кислоты имеют малую степень бензодности и содержат активные кислород- и азотсодержащие функциональные группы (карбокисильные, гидроксильные, амидные, аминоксильные).

Гуминовые кислоты древесно-травяного торфа при внутривенном введении мышам и крысам являются малотоксичными и относятся к III или IV клас-

сам опасности соответственно. Судя по результатам патолого-анатомического исследования, гибель лабораторных животных (крыс) при введении летальных доз ГК наступает от острой сердечной недостаточности, возникающей в результате ишемической дистрофии миокарда. Одним из патофизиологических механизмов острого нарушения гемодинамики может быть негативное влияние ГК на реологические свойства крови.

Литература

1. Авакумова Н.П. Гуминовые пелоидопрепараты: перспективы использования в медицинской практике // Материалы 5-й науч. шк. «Болота и биосфера». Томск: ЦНТИ, 2006. С. 63—72.
2. Бамбалов Н.Н., Беленькая Т.Я. Фракционно-групповой состав органического вещества целинных и мелиорированных торфяных почв // Почвоведение. 1998. № 12. С. 1431—1437.
3. Грибан В.К. К механизму действия препаратов гумусовой природы на организм животных // Органическое вещество торфа. Минск, 1995. С. 120.
4. Кирейчева Л.В., Хохлова О.Б. Элементный состав гуминовых веществ сапропелевых отложений // Вестн. РАСХН. 2000. № 4. С. 59—62.
5. Комиссаров И.Д. Гуминовые препараты. Тюмень, 1974. 267 с.

6. Ларионов Л.Ф. Методы экспериментальной химиотерапии. М.: Медицина, 1991. С. 524—535.
7. Лиштван И.И., Бамбалов Н.Н., Тишкович А.В. и др. Гуминовые вещества торфа и их практическое использование // Химия твердого топлива. 1990. № 6. С. 14—20.
8. Лиштван И.И., Капуцкий Ф.Н., Янута Ю.Г. и др. Спектральные исследования фракций гуминовых кислот // Химия твердого топлива. 2006. № 4. С. 3—11.
9. Лотош Т.Д. Механизм действия гуминовых веществ торфа // Комплексное использование торфа в народном хозяйстве. Минск, 1981. С. 100—101.
10. Лукошко Е.С., Пигулевская Л.В., Хоружик А.В., Янковская Н.С. Изменение химического состава гуминовых кислот в процессе торфообразования и диагенеза торфа // Химия твердого топлива. 1980. № 1. С. 54—59.
11. Орлов Д.С. Гумусовые кислоты почв и общая теория гумификации. М.: МГУ, 1990. 325 с.
12. Орлов Д.С., Осипова Н.Н. Инфракрасные спектры почв и почвенных компонентов. М.: МГУ, 1988. 89 с.
13. Попов А.И. Гуминовые вещества: свойства, строение, образование. СПб.: Изд-во СПб. ун-та, 2004. 248 с.
14. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ / под общ. ред. Р.У. Хабриева. 2-е изд., перераб. и доп. М.: Медицина, 2005. 832 с.
15. Смирнова Ю.В., Виноградова В.С. Механизм действия и функции гуминовых препаратов // Агрехим. вестн. 2004. № 1. С. 22—23.
16. Тухватулин Р.Т., Левтов В.А., Шуваева В.Н., Шадрина Н.Х. Агрегация эритроцитов в крови, помещенной в макро- и микрокуветы // Физиол. журн. 1986. № 6. С. 775—784.
17. Flaig W. Chemische Untersuchungen an Humin Stoffen // Zeitschrift für Chemie. 4 Jahrgang. 1964. Heft 7. S. 253—265.
18. Stevenson F.J. Humic Chemistry: Genesis, Composition, Reactions, second ed. // John Wiley & Sons. New York. 1994. P. 34—41.
19. Ziechmann W. Humic substances and their medical effectiveness // 10th International Peat Congress. 1996. V. 2. Stuttgart. P. 546—554.

Поступила в редакцию 03.06.2009 г.

Утверждена к печати 17.06.2009 г.

Сведения об авторах

М.В. Белоусов — д-р фарм. наук, профессор, зав. кафедрой фармации ФПК и ППС СибГМУ (г. Томск).

Р.Р. Ахмеджанов — д-р биол. наук, профессор кафедры экологии и основ безопасности жизнедеятельности ТПУ (г. Томск).

М.В. Гостищева — канд. фарм. наук, ассистент кафедры химии СибГМУ (г. Томск).

М.С. Юсубов — д-р хим. наук, профессор, зав. кафедрой химии СибГМУ (г. Томск).

А.В. Матвеевко — канд. биол. наук, доцент кафедры фармакологии СибГМУ (г. Томск).

Для корреспонденции

Белоусов Михаил Валерьевич, тел. 8-913-825-1771, e-mail: mvb63@mail.ru