

Семенюк И.В.¹, Карпенко Е.В.¹, Мидяна Г.Г.¹, Яремкевич Е.С.², Лубенец В.И.², Новик В.³

¹ Отделение физико-химии горючих ископаемых Института физико-органической химии и углехимии им. Л. М. Литвиненко НАН Украины, г. Львов, Украина.

² Национальный университет "Львовская политехника", г. Львов, Украина.

³ Частный институт прикладной биотехнологии daRostim, Waldheim, Германия.

СРАВНИТЕЛЬНЫЕ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ, ТЕРМИЧЕСКИЕ И БИОЛОГИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ГУМИНОВЫХ КИСЛОТ ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ РАЗЛИЧНОГО СЫРЬЯ

Проведен сравнительный анализ ГК различного происхождения по общей кислотности, термическому разложению и антиоксидантным свойствам.

A comparative analysis of humic acids of different origin on total acidity, thermal decomposition, and antioxidant properties was carried out.

Ключевые слова: гуминовые кислоты; физико-химические свойства; антиоксидантная активность.

Keywords: humic acids; physico-chemical properties; antioxidant activity.

Введение

Препараты на основе гуминовых веществ занимают значительное место в современных агротехнологиях. Одним из элементов разработки таких технологий является использование гуминовых кислот (ГК), полученных из разного сырья – биогумуса, торфа, чернозема.

Благодаря наличию различных функциональных групп ГК способны адсорбировать и удерживать на себе питательные вещества, макро- и микроэлементы. При попадании в почву, эти вещества не вымываются водой, не связываются почвенными минералами, поэтому находятся в доступном для растений состоянии. ГК положительно влияют также на развитие различных групп почвенных микроорганизмов [1; 2].

Материалы и методы

Объектом исследования были гуминовые кислоты, полученные из биогумуса – продукта ферментации органических отходов технологическими калифорнийскими червями *Eiseniafoetida* (ТУ У 13649334022-99); торфа – из Дрогобычского месторождения; и чернозема – из Тернопольской области. Получение ГК и гуматов проводили путем щелочной экстракции по методике, разработанной в Отделении ФХГИ ИнФОУ им. Л. М. Литвиненко НАН Украины, с использованием раствора калий гидроксида (1 %), который добавляли при перемешивании в течение 30 мин и нагревании до 50°C. Твердый остаток отделяли на центрифуге (ULAB, Германия) при 6000 об/мин, полученный раствор подкисляли 5%-ным раствором соляной кислоты до pH <2. Гуминовые кислоты, выпавшие в осадок, отделяли центрифугированием (6000 об/мин), промывали на бумажном фильтре дистиллированной водой до отрицательной пробы на хлорид-ионы, высушивали при 50°C до постоянной массы. Были получены калиевые экстракты гуминовых кислот из торфа, чернозема, а также из биогумуса. Методами титриметрического анализа (баритовый, кальций-ацетатный) определен количественный состав функциональных групп ГК, которые имеют кислый характер. Термический анализ проводили на дериватографе Q-1500D системы "Паулик - Паулик-Эрдей", соединенном с персональным компьютером в интервале температур 20–1000°C при свободном доступе воздуха в печь, скорость повышения температуры – 5°C/мин. Масса образцов составляла в среднем 80 мг, эталоном служил алюминий оксид. Исследованы антиоксидантные свойства полученных ГК в условиях железо инициированных свободнорадикальных процессов *in vitro* (в гомогенате печени крыс). Определены два параметра оксидативного стресса – перекисного окисления липидов (ПОЛ) и окислительной

модификации белков (ОМБ) [3]. Содержание вторичных продуктов липопероксидации (ТБК-активных продуктов) в образцах определяли по реакции малонового диальдегида (МДА) с тиобарбитуровой кислотой (ТБК) на спектрофотометре «SpecordM-40» ($\lambda=532\text{nm}$). Степень ОМБ определяли по количеству образованных дополнительных карбонильных групп (КГ) в боковых цепях аминокислот по реакции с 2,4-динитрофенилгидразином при 370 нм. Количество белка в пробах определяли по Лоури [4]. Результаты обрабатывали методом вариационной статистики с использованием t-критерия Стьюдента, с достоверностью при $p \leq 0,05$. Для расчетов использовали компьютерную программу Microsoft Excel.

Результаты и их обсуждение

Были получены калиевые экстракты гуминовых кислот из торфа, чернозема, а также из биогумуса, который является возобновляемым, экологически безопасным ресурсом, и поэтому имеет преимущества перед более распространенными источниками ГК. Основной структуры ГК являются конденсированные системы, включающие алициклические и ароматические кольца, боковые цепи, а также функциональные группы при ядре и в боковых цепях. Кислотные свойства ГК обусловлены наличием карбоксильных и гидроксильных групп, которые определяют их реакционную способность. Методом титриметрического анализа получены количественные параметры общей кислотности ГК, характеризующие особенности гуминовых веществ различного происхождения (табл. 1). Одним из важных методов исследования органических веществ является термический анализ, который позволяет определить не только их термическую стойкость, а также получить данные о природе процессов, протекающих при нагревании. С помощью термического анализа изучены изменения ГК из различного сырья в интервале температур 20-1000 °С на воздухе (табл. 2).

Таблица 1. Содержание кислотных групп в образцах ГК различного происхождения

№ образца	Сырье для получения ГК	Количество кислотных групп в ГК, ммоль / г, (% масс.)		
		Карбоксильная	Гидроксильная	Общая
1	Биогумус	5,5 (24,8%)	2,5 (4,3%)	8,0 (29,1%)
2	Торф	1,9 (8,6%)	5,1 (8,7%)	7,0 (17,3%)
3	Чернозем	3,4 (15,3%)	2,3 (3,9%)	5,7 (19,2%)

Таблица 2. Результаты термического анализа образцов ГК из различного сырья

Сырье	Стадия	Температурный интервал, °С	Потеря массы, %	K^*	R % TG/титр
Биогумус	I	20,0 – 117,8	8,6	29,9/59,1 = 0,51	27,4/29,1
	II	117,8 – 381,9	29,9		
	III	381,9 – 514,8	27,4		
	IV	514,8 – 1000	31,7		
Торф	I	20,0 – 151,1	11,1	18,6/47,1 = 0,40	15,1/17,3
	II	151,1 – 336,2	18,6		
	III	336,2 – 420,7	15,1		
	IV	420,7 – 1000,0	32,0		
Чернозем	I	20,0 – 147,1	9,9	13,7/37,9 = 0,36	20,6/19,2
	II	147,1 – 319,2	13,7		
	III	319,2 – 407,6	20,6		
	IV	407,6 – 1000,0	17,3		

Примечание: K^* - коэффициент соотношения алифатической и циклической структур; R - содержание карбоксильных и гидроксильных групп.

По уменьшению массы образцов на третьей стадии термоллиза рассчитано содержание карбоксильных и гидроксильных групп в молекулах ГК, результаты сравнивали с данными титрования (табл. 2).

Также исследованы биологические свойства ГК: показано, что их антиоксидантное действие преимущественно направлено на белковые структуры, о чем свидетельствует достоверное уменьшение образования карбонильных групп в боковых цепях аминокислот – на 9,3-36,5% по сравнению с контролем (рис. 2). Стоит обратить внимание на образец ГК 2 – из торфа (Дрогобычское месторождение), который по двум показателям оксидативного стресса показал лучшие результаты. При воздействии ГК 2 содержание ТБК-активных продуктов уменьшилось на 57,5%, а карбонильных групп протеинов – на 63,5%, что свидетельствует о снижении интенсивности процессов ПОЛ и ОМБ в сравнении с контролем (рис. 1, 2).

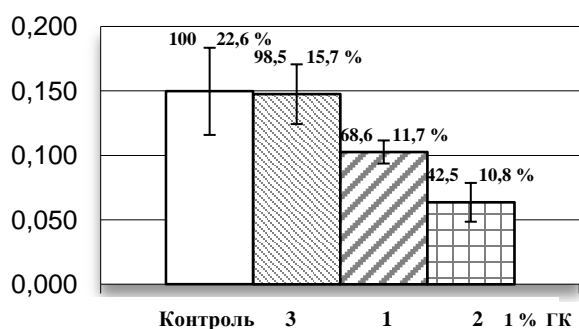


Рисунок 1. Содержание ТБК-активных продуктов в гомогенате печени крысы при действии ГК: 1 – из биогумуса; 2 – из торфа; 3 – из чернозема (мкмоль/мг прот.; n=5)

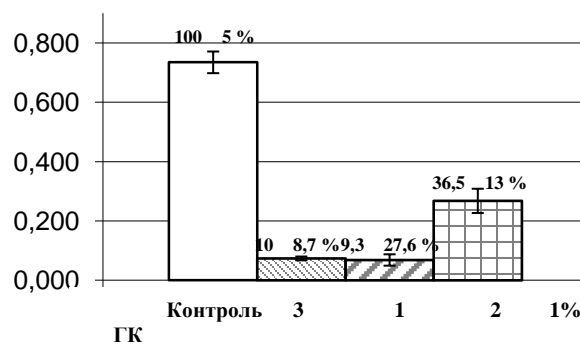


Рисунок 2. Содержание КГП в гомогенате печени крысы при действии ГК: 1 – из биогумуса; 2 – из торфа; 3 – из чернозема (нмоль/мг прот.; n=5)

На основе полученных результатов сделаны выводы:

- общее содержание кислотных групп в молекулах ГК, выделенных из трех видов сырья, количественно соответствует значениям, полученным титриметрическим методом;
- значения коэффициентов К, полученные по данным термогравиметрического анализа, показывающие соотношение алифатической части ГК к циклической, составляют не более 0,51, что свидетельствует об их ароматическом характере;
- установлено, что под действием всех исследуемых ГК наблюдается торможение свободнорадикальных процессов по двум показателям оксидативного стресса - перекисного окисления липидов (ПОЛ) и окислительной модификации белков (ОМБ). Анализ результатов показал перспективность использования ГК для восстановления физиологических функций организма при патологических состояниях в условиях свободно-радикального стресса.

Библиографические ссылки

1. Гороя А.И., Орлов Д.С., Щербенко О.В. Гуминовые вещества. Строение, функции, механизм действия, протекторные свойства, экологическая роль. Киев: Наукова Думка. 1995.
2. Panina O., Zilyakova T. Increase of productivity of farm animals with the help of oxidate, a peat humic preparation // Moorthérapie 2000. Peat Therapy on it's Way into the next Millenium. Bad Kissinger (Gernany). 2000. P. 233–244.
3. Луцак В. І., Багнюкова Т.В., Луцак О.В. Показники оксидативного стресу. Тіобарбітурат-активні продукти і карбонільні групи білків // Укр. біохім.журн. 2004. № 3. С. 136-141.
4. Protein measurement with the Folin phenol reagent / O.H. Lowry [et al.] // J.Biol.Chem. 1951. V. 193. № 1. P. 265–275.