

УДК 54-116:615.074:615.326

ИЗМЕНЕНИЕ СВОЙСТВ ГУМИНОВЫХ ВЕЩЕСТВ ПОД ВОЗДЕЙСТВИЕМ УФ-СВЕТА

¹Савченко И.А., ¹Корнеева И.Н., ²Плаксин Г.В., ¹Лукша Е.А., ¹Гончаров Д.С.¹ГБОУ ВПО «Омская государственная медицинская академия» Минздрава России, Омск, e-mail: irina0458@yandex.ru;²Институт проблем переработки углеводородов СО РАН, Омск

Предложена методика получения гуминовых веществ (ГВ) из щелочного гидролизата озерного сапропеля, одной из стадий которой является облучение гидролизата УФ-светом. Показано, что фотохимическое воздействие на гуминовые вещества приводит к изменению их состава и структуры. Основываясь на данных сравнительного анализа результатов физико-химических методов исследования, можно предположить, что при облучении УФ-светом происходит активация гуминовых веществ. Данные ИК-спектроскопии показывают увеличение содержания карбонильных, карбоксильных групп и уменьшение алифатических фрагментов в активированных гуминовых веществах (ГВА). Кондуктометрическим титрованием по методу Боэма также установлено увеличение содержания кислородсодержащих функциональных групп кислотного характера. Результаты, полученные методами флуориметрии и энергодисперсионной рентгеновской спектроскопии, указывают на повышение степени гумификации ГВА. Исследование морфологии поверхности, проведенное методом сканирующей электронной спектроскопии, показало изменение структуры поверхности ГВ из глобулярной в слоистую.

Ключевые слова: гуминовые вещества, активированные гуминовые вещества, фотохимическая активация, физико-химические методы исследования, сапропель

CHANGING THE PROPERTIES OF HUMIC SUBSTANCES UNDER IRRADIATION WITH UV-LIGHT

¹Savchenko I.A., ¹Korneeva I.N., ²Plaksin G.V., ¹Luksha E.A., ¹Goncharov D.S.¹Omsk State Medical Academy Russian Ministry of Health, Omsk, e-mail: irina0458@yandex.ru;²Institute of Hydrocarbons Processing, the Siberian Branch of Russian Academy of Sciences, Omsk

The technique of obtaining humic substances (HS) from an alkaline hydrolyzate of lake sapropel by effect of irradiation with UV-light was offered. We have demonstrated that photochemical influence on humic substances to results in the changes of their composition and structure. Based on the comparative analysis of physicochemical methods of research it can be suggested that at irradiation by UV-light there is an activation of humic substances. The IR spectroscopy data show an increase of the carbonyl groups, the carboxyl groups and a decrease of the aliphatic fragments in activated humic substances (HSA). Also an increase in the content of oxygen-containing functional groups of acidic nature was established by conductometric titration of Boehm's method. The results obtained by methods of fluorimetry and energy dispersive X-ray spectroscopy indicate the increasing degree of humification of HSA. The study of morphology of the surface carried out by scanning electron microscopy showed transforming of structure of the surface of HS from the globular to the layered.

Keywords: humic substances, activation humic substances, photochemical activation, physicochemical methods of analysis, sapropel

Большой интерес исследователей к гуминовым веществам (ГВ), проявляемый в последние десятилетия, определяется их важными биологическими функциями и широкой распространённостью в природе. На их основе созданы разнообразные препараты для сельского хозяйства, медицины и ветеринарии [4].

Одним из источников гуминовых веществ (ГВ) являются сапропель. Гуминовые вещества сапропеля представляют собой темно-окрашенную полидисперсную фракцию, выделенную в результате щелочного гидролиза и осажденную при pH < 2. Известно, что биологическая активность ГВ связана с качественным и количественным составом функциональных групп, молекулярной структурой и молекулярно-массовым распределением макромолекул. При этом все вышеперечисленные характеристики определяются как источником,

так и способами получения исследуемых соединений [3].

Возможность усиления биологического действия ГВ путем их физико-химической или химической обработки является перспективным направлением для создания новых лекарственных средств природного происхождения [2]. Поэтому разработка способа активации ГВ является актуальной задачей.

Целью данной работы явилось сравнительное исследование физико-химических свойств гуминовых веществ, полученных из озерного сапропеля по методике Н.Н. Бамбалова, с образцом ГВ, подвергнутых фотохимическому воздействию.

Материалы и методы исследования

Объектами исследования явились гуминовые вещества, выделенные из сапропеля оз. Горчаково Тюкалинского района Омской области, по нижеприведенным методикам.

Получение ГВ. Извлечение гуминовых веществ проводили по методу Н.Н. Бамбалова [1], включающему щелочной гидролиз сапропеля, отделение фильтрованием негидролиземого остатка и осаждение гуминовых веществ хлороводородной кислотой до pH 1–2. Выделенный осадок гуминовых веществ отфильтровывали, промывали водой, очищенной до отрицательной реакции на хлориды, и сушили до воздушно-сухого состояния.

Получение ГВА. Выделение гуминовых веществ проводили по той же методике, но на стадии щелочного гидролиза раствор сапропеля облучали в течение 2 часов в боксе «TAU ULTRAVIOL» при длине волны 253,7 нм.

ИК-спектры образцов записывали на Фурье-спектрометре Инфралюм ФТ-801 в таблетках KBr в соотношении 1:100, в интервале значений частот от 500 до 4000 см^{-1} .

Спектры флуоресценции записывали на флуориметре AvaSpec-2048 фирмы Avantes для растворов ГВ и ГВА с концентрацией 20 мг/л, полученных растворением в 0,05 М растворе гидрокарбоната натрия, в интервале длин волн от 460 до 720 нм [8].

Исследование количества функциональных групп проводили по методу Бозма [7] с кондуктометрической индикацией конечной точки титрования на лабораторном анализаторе «Мультитест КСЛ» при температуре $20 \pm 2^\circ\text{C}$. Карбоксильные группы определяли титрованием раствором гидрокарбоната натрия, сумму карбоксильных и лактонных групп – раствором карбоната натрия, сумму всех функциональных групп кислотного характера (гидроксильных, карбоксильных и лактонных) – раствором гидроксида натрия.

Исследование морфологии поверхности образцов проводили¹ с использованием сканирующего

электронного микроскопа JEOL JSM-6610LV, оснащённого энергодисперсионным анализатором INCAx-Act «Oxford Instruments». Диспергированный образец помещали на предметный столик микроскопа и вакуумировали до остаточного давления 10^{-5} мм рт. ст.

Параметры текстуры ГВ и ГВА^{1*}. Изотермы адсорбции (БЭТ) сняты на адсорбционной установке Sorptomatic-1900 «Carlo Erba» (адсорбция азота, температура 77 К).

Статистическую обработку полученных результатов проводили с помощью компьютерной программы Statistica 6.0 for Windows для доверительной вероятности 0,95.

Результаты исследования и их обсуждение

Для изучения влияния УФ-излучения на состав и количество функциональных групп использовали данные ИК-спектроскопии. Фрагменты ИК-спектров ГВ и ГВА представлены на рис. 1.

Сравнение ИК-спектров исследуемых образцов свидетельствует о близости состава ГВ и ГВА по функциональным группам. Однако в образцах, подвергнутых фотохимической деструкции, происходит снижение интенсивности полос поглощения при 2919 и 2851 см^{-1} , соответствующих валентным колебаниям алифатической С–Н-связи. Наибольшие изменения в ИК-спектре ГВА наблюдаются в области 1100–900 см^{-1} , где происходит уменьшение поглощения, соответствующего валентным колебаниям С–О-связей первичных и вторичных спиртовых групп и С–О–С-связей, в том числе в полисахаридных фрагментах.

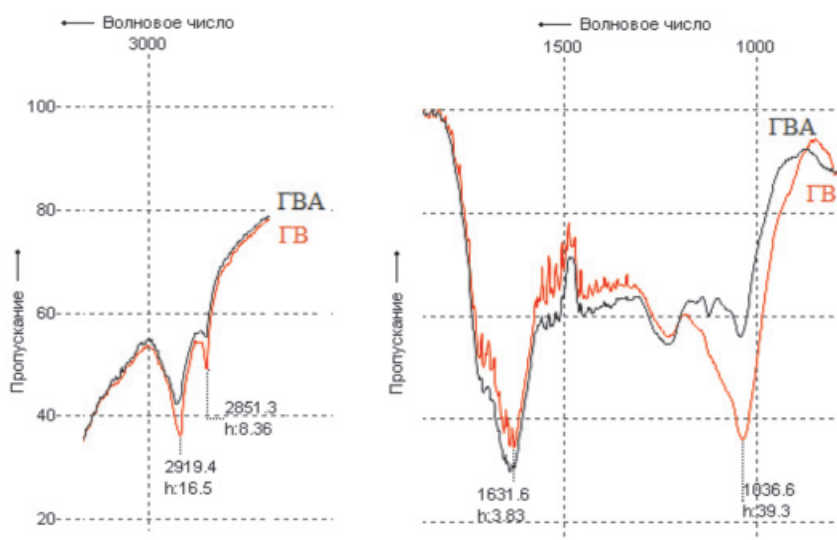


Рис. 1. Фрагменты ИК-спектров ГВА и ГВ

На рис. 1 также видно, что для ГВА незначительно уменьшается поглощение в области 1750–1550 см^{-1} , соответствующей

валентным колебаниям карбонильной группы в составе хинонов и непредельных сопряженных кетонов, и увеличивается

поглощение при 1645–1600 см⁻¹, характерное для валентных колебаний связи –C = C–, сопряженной с C = O или COOH группами.

В целом общий вид ИК-спектров ГВА и ГВ не противоречит данным, представленным в работе [6]. ИК-спектроскопия исследуемых образцов показала, что ГВ и ГВА имеют близкое химическое строение, но в активированных гуминовых веществах снижено количество алифатических фрагментов и увеличилось содержание карбонильных (хиноидных) и карбоксильных групп. Снижение количества алифатических фрагментов возможно за счет разрушения низкомолекулярных фракций гуминовых соединений и периферийной части

макромолекул под воздействием облучения УФ-светом. По всей видимости, увеличение содержания карбонильных и карбоксильных групп связано с окислением и фотодеструкцией макромолекул ГВ.

На рис. 2 представлены спектры флуоресценции исследуемых образцов, из которых видно, что интенсивность флуоресценции ГВА увеличилась практически в 2 раза, что, вероятно, показывает увеличение степени гумификации и не противоречит данным, полученным в работе [8]. Широкая эмиссионная полоса в интервале 500–540 нм (плато) является результатом наложения спектров нескольких флуорофоров в составе образцов.

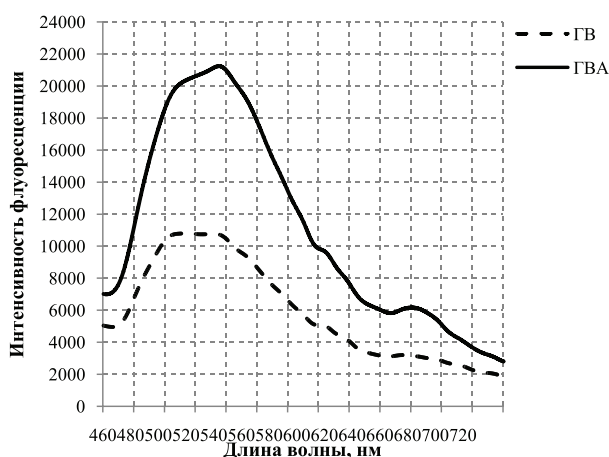


Рис. 2. Спектры флуоресценции ГВ и ГВА

Данные флуоресцентного анализа образцов показали, что концентрация фотосенсибилизирующих хромофоров выше в ГВА по сравнению с ГВ и может свидетельствовать о меньшей молекулярной массе их молекул. Полученные результаты согласуются с данными, приведенными в работе [5].

Количество функциональных групп кислотного характера определяли по модифицированному методу Бозма. Результаты кондуктометрического титрования представлены в табл. 1.

Согласно полученным результатам (табл. 1) содержание функциональных групп кислотного характера (карбоксильных, лактонных и гидроксильных) в активированных гуминовых веществах увеличилось в 1,1–1,5 раза. Следовательно, в ходе получения ГВА при облучении УФ-светом происходит деструкция экранирующих периферических комплексов полисахаридов и аминокислот, изменение пространственного расположения молекул, высвобождение функциональных групп, в связи с чем увеличивается их доступность для химического взаимодействия.

Таблица 1

Содержание функциональных групп, полученное по методу Бозма (N = 30, M ± m)

Объект исследования	Функциональные группы		
	карбоксильные, мг-экв/г	лактонные, мг-экв/г	гидроксильные, мг-экв/г
ГВ	2,69 ± 0,06	1,33 ± 0,03	3,42 ± 0,08
ГВА	2,82 ± 0,07	1,91 ± 0,05	3,81 ± 0,09

Оценка фотохимического воздействия на морфологию поверхности гуминовых веществ проводилась методом скани-

рующей электронной микроскопии. На рис. 3 представлены микрофотографии ГВ и ГВА.

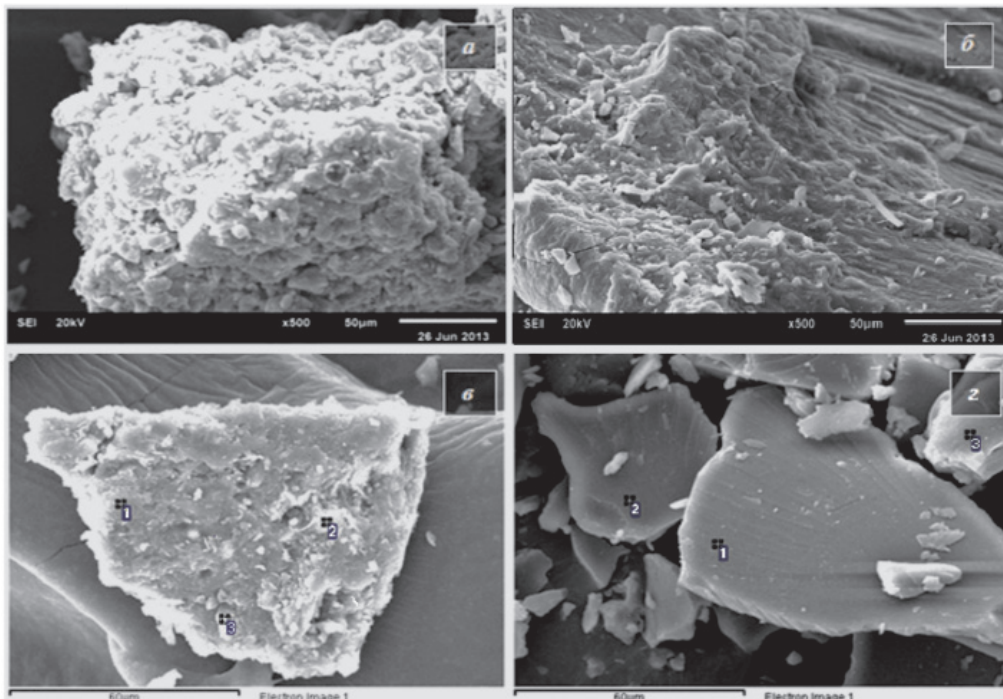


Рис. 3. Микрофотографии поверхности ГВ (а, $\times 500$; в, $\times 1000$) и ГВА (б, $\times 500$; г, $\times 1000$)

Как видно из рис. 3, а, в, гуминовые вещества имеют глобулярную структуру, где крупные ассоциаты образованы более мелкими нерегулярными частицами.

ГВА, представленные на рис. 3, б, г, имеют слоистую структуру, образованную параллельно расположенными слоями. Возможно, воздействие УФ-света на гуминовые вещества приводит к «распрямлению» макромолекул с последующим уплотнением структуры и формированием много-

слойных агрегатов с практически гладкой поверхностью. Таким образом, полученные результаты показали изменение конформации макромолекул ГВА и их поверхности за счет фотохимической деструкции.

Результаты элементного анализа, проведенного методом энергодисперсионной рентгеновской спектроскопии (EDS), представлены в табл. 2, а на рис. 3, в, г указаны по три точки поверхности, в которых определялся элементный состав исследуемых объектов.

Таблица 2

Содержание химических элементов в ГВ и ГВА по данным EDS (в % масс.)

Объект исследования	Химические элементы									
	C	O	Na	Mg	Al	Si	S	Cl	K	Fe
ГВ-1	55,29	18,55	1,53	0,49	2,58	7,02	6,32	3,59	0,69	3,93
ГВ-2	47,04	16,52	3,08	–	9,65	13,58	2,85	6,19	0,37	0,72
ГВ-3	50,63	10,63	14,09	–	0,54	1,65	1,05	20,83	–	0,39
ГВА-1	65,63	27,64	–	–	–	0,54	5,13	1,06	–	–
ГВА-2	67,73	25,89	–	–	–	–	5,73	0,66	–	–
ГВА-3	67,33	27,56	–	–	–	–	4,45	0,66	–	–

Анализ результатов табл. 2 показал, что в химический состав поверхности гуминовых веществ, кроме основных элементов (углерода, кислорода и серы), входят кремний, железо и алюминий – в виде оксидов, а также натрия, магния, калия, хлор – в виде солей [4]. Химический состав поверхности активированных гуминовых веществ отличается от состава неактивированных гуминовых веществ и представлен, кроме основных элементов, небольшим количеством кремния и хлора. Среднее соотноше-

ние O/C для ГВА составляет 0,40, для ГВ – 0,52, т.е. в 1,3 раза ниже. Это может быть обусловлено разрывом органоминеральных, полипептидных и координационных связей, и, как следствие, «вымыванием» катионов, частичным окислением молекул и высвобождением кислородсодержащих функциональных групп в процессе облучения УФ-светом.

В ходе исследования адсорбционными методами были изучены характеристики текстуры ГВ и ГВА, представленные в табл. 3.

Таблица 3
Характеристики параметров
текстуры ГВ и ГВА

Объект исследования	$S_{уд}$, м ² /г	$V_{\Sigmaпор}$, см ³ /г
ГВ	4,88	0,0128
ГВА	2,77	0,0284

Приведенные в табл. 3 результаты показали, что как ГВ, так и ГВА, можно отнести к непористым объектам. Можно предположить, что уменьшение удельной поверхности ГВА по сравнению с ГВ происходит вследствие перехода структуры из глобулярной (ГВ) в слоистую (ГВА) в результате фотохимического воздействия.

Заключение

В результате проведенных исследований было установлено, что воздействие ультрафиолетового облучения на ГВ в процессе их выделения из сапропеля приводит к активации гуминовых веществ, что сопровождается изменением их состава и структуры.

Методом ИК-спектроскопии установлено уменьшение количества алифатических фрагментов и увеличение содержания карбонильных (хиноидных) и карбоксильных групп, возможно, за счет разрушения низкомолекулярных фракций гуминовых соединений и периферийной части макромолекул, связанного с окислением и фотодеструкцией ГВ.

Показано увеличение содержания функциональных групп кислотного характера (определенное по Бозму) в активированных гуминовых веществах, что, вероятно, обусловлено деструкцией экранирующих периферических комплексов полисахаридов и аминокислот, изменением пространственного расположения молекул, высвобождением функциональных групп.

Флуоресцентный анализ исследуемых образцов свидетельствует об уменьшении молекулярной массы макромолекул ГВ в результате обработки щелочного гидролизата сапропеля УФ-светом и возможном увеличении степени гумификации. Также повышение степени гумификации ГВА подтверждается изменением химического состава, определенного методом энергодисперсионной рентгеновской спектроскопии.

Воздействие УФ-света на гуминовые вещества приводит к изменению морфологии поверхности, сопровождающемуся уплотнением упаковки макромолекул ГВ и образованием слоистой структуры.

Таким образом, при воздействии ультрафиолетового излучения на щелочной раствор сапропеля происходит активация гуминовых веществ. Принимая во внимание перспективность использования гуминовых веществ в качестве источников для разработки новых лекарственных препара-

тов, было бы целесообразно провести сравнительное изучение фармакологической активности полученных объектов.

Список литературы

1. Бамбалов Н.Н., Беленькая Т.Я. Фракционно-групповой состав органического вещества целинных и мелиорированных торфяных почв // Почвоведение. – 1998. – № 12. – С. 1431–1437.
2. Беркович А.М., Бузлама В.С., Водолазский Ю.В. Олипифат – адаптоген, стресс-корректор нового поколения на основе модифицированных гуминовых кислот // Актуальные проблемы создания новых лекарственных препаратов природного происхождения: V Международный съезд. Санкт-Петербург – Петродворец, 5-7 июля 2001 г. Материалы Съезда. – СПб., 2001.
3. Наумова Г.В., Стригуцкий В.П., Жмакова Н.А., Овчинникова Т.Ф. Связь молекулярной структуры гуминовых кислот и их биологической активности // Химия твердого топлива. – 2001. – № 2. – С. 3–13.
4. Орлов Д.С. Гуминовые вещества в биосфере. – М.: Наука, 1993. – 237 с.
5. Рижар К., Гийо Ж., Агуер Ж.-П. и др. Роль фракционирования при изучении фотохимических свойств гумусовых веществ // Рос. хим. ж. – 2008. – т. LII. – № 1. – С. 107–113.
6. Савченко И.А., Корнеева И.Н., Лукша Е.А. Спектроскопическое исследование гуминовых веществ сапропеля Омского Прииртышья // Омский научный вестник. Серия: Ресурсы земли. Человек. – 2012. – № 2 (114) – С. 56–60.
7. Савченко И.А., Корнеева И.Н., Плаксин Г.В., Лукша Е.А., Гончаров Д.С. Новый подход к решению проблемы стандартизации гуминовых кислот // Современные проблемы науки и образования. – 2013. – № 3; URL: www.science-education.ru/109-9305.
8. Milori D.M. B.P., Martin-Neto L., Bayer C., Mieleniczuk J., Bagnato V. S. Humification Degree of Soil Humic Acids Determined by Fluorescence Spectroscopy // Soil Science. – 2002. – Vol. 167. – № 1. – P. 739–749.

References

1. Bambalov N.N., Belenkaja T.Ja. Frakcionno-grupповой sostav organicheskogo veshhestva celinnykh i meliorirovannykh torfjanых pochv. *Pochvovedenie*, 1998, no. 12, pp. 1431–1437.
2. Berkovich A.M., Buzlama V.S., Vodolazskij Ju.V. Olipifat – adaptogen, stress-korrektor novogo pokolenija na osnove modifitsirovannykh guminovykh kislot. *V Mezhdunarodnyj svezd «Aktualnye problemy sozdaniya novykh lekarstvennykh preparatov prirodного proiskhozhdenija»* (Actual problems of creation of new drugs of natural origin: V International Congress). St. Petersburg – Peterhof, 5–7 July 2001, pp. 195–198.
3. Naumova G.V., Striguckij V.P., Zhmakova N.A., Ovchinnikova T.F. Svjaz molekularnoj struktury guminovykh kislot i ikh biologicheskoy aktivnosti. *Khimija tvjordogo topliva*, 2001, no. 2, pp. 3–13.
4. Orlov D. S. *Guminovye veshchestva v Biosfere*. Moskva: «Nauka», 1993.
5. Rishar K., Gijo Zh., Aguer Zh.-P. etc. Rol' frakcionirovaniya pri izuchenii fotokhimicheskikh svojstv gumusovykh veshhestv. *Ros. khim. zh.*, 2008, Vol. LII, no. 1, pp. 107–113.
6. Savchenko I.A., Korneeva I.N., Luksha E.A. Spektroskopicheskoe issledovanie guminovykh veshhestv sapropelja Omskogo Priirtysh'ja. *Omskij nauchnyj vestnik. Serija: Resursy zemli. Chelovek*, 2012, no. 2 (114), pp. 56–60.
7. Savchenko I.A., Korneeva I.N., Plaksin G.V., Luksha E.A., Goncharov D.S. Novyj podkhod k resheniju problemy standartizacii guminovykh kislot. *Sovremennye problemy nauki i obrazovanija*, 2013, no. 3; available at: www.science-education.ru/109-9305.
8. Milori D.M. B.P., Martin-Neto L., Bayer C., Mieleniczuk J., Bagnato V.S. Humification Degree of Soil Humic Acids Determined by Fluorescence Spectroscopy. *Soil Science*, 2002, Vol. 167, no. 1, pp. 739–749.

Рецензенты:

Гришин А.В., д.фарм.н., профессор, академик РАЕН, заведующий кафедрой фармации, ГБОУ ВПО «Омская государственная медицинская академия» Минздрава России, г. Омск;
Пеньевская Н.А., д.м.н., профессор, заведующая кафедрой фармацевтической технологии с курсом биотехнологии, ГБОУ ВПО «Омская государственная медицинская академия» Минздрава России, г. Омск.

Работа поступила в редакцию 22.11.2013.