

УДК 543.2:615.07:615.011/.012:547.992.2-032.35:615.32

DOI: 10.15372/ChUR2023480

EDN: LCAHRZ

Химико-фармакологическое исследование субстанции гуминовых веществ угля для целей применения в пищевой и фармацевтической промышленности

М. В. ЗЫКОВА¹, К. А. БРАТИШКО¹, Л. А. ЛОГВИНОВА¹, В. В. ИВАНОВ¹, Е. Е. БУЙКО¹, М. Г. ДАНИЛЕЦ²,
Е. С. ТРОФИМОВА^{1,2}, А. А. ЛИГАЧЕВА², А. П. ЗИМА¹, Е. С. РАБЦЕВИЧ^{1,3}, А. А. УФАНДЕЕВ¹,
Д. А. МИХАЛЁВ¹, А. В. ПЕРШИНА¹, А. И. КОНСТАНТИНОВ⁴, И. В. ПЕРМИНОВА⁴, М. В. БЕЛОУСОВ¹

¹Сибирский государственный медицинский университет,
Томск (Россия)

E-mail: kr-1295@mail.ru

²НИИФирм им. Е. Д. Гольдберга, Томский НИМЦ,
Томск (Россия)

³Национальный исследовательский Томский государственный университет,
Томск (Россия)

⁴Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова,
Москва (Россия)

(Поступила 09.09.22; после доработки 11.01.23)

Аннотация

Исследованы физико-химические и фармакологические свойства гуминовых веществ Канско-Ачинского угольного бассейна, месторождение Переясловское. Методами УФ-, ИК-, ¹³C ЯМР-спектроскопии, флуориметрии, элементного анализа установлено наличие ароматических полиядерных структур и алифатических фрагментов, замещенных различными по природе функциональными группами (карбоксильные, карбонильные и хиноидные, фенольные, спиртовые, простые и сложноэфирные, amino- и амидные). Методом высокоэффективной жидкостной хроматографии установлено, что гуминовые вещества угля являются высокогидрофильными полидисперсными биополимерами со средними значениями молекулярных масс. По показателю “микробиологическая чистота” (категория ЗБ) содержание микроорганизмов не превышает требуемых показателей Государственной фармакопеи Российской Федерации XIV издания (ГФ XIV). Содержание радионуклидов, токсичных металлов (свинец, кадмий, ртуть, мышьяк) соответствует нормам (согласно ГФ XIV). Установлено наличие 11 эссенциальных элементов. Исследуемые гуминовые вещества относятся к V классу опасности (вещества малоопасные, согласно ГОСТ 32644-2014), не обладают алергизирующими свойствами и цитотоксическим действием в широком диапазоне концентраций. При изучении специфической фармакологической активности на различных экспериментальных моделях установлены антиоксидантные, иммуностропные, цитопротекторные свойства. Отмечена способность ингибировать свободные радикалы, такие как гидроксильные радикалы (HO•) и супероксид анион-радикал (O₂^{•-}), поскольку данные радикалы способны обходить эндогенные системы антиоксидантной защиты организма. Сделано заключение, что исследуемые гуминовые вещества Канско-Ачинского угольного бассейна, месторождение Переясловское, представляют собой безопасные и эффективные биологически активные вещества природного происхождения для использования в качестве перспективной биологически активной субстанции в пищевой и фармацевтической промышленности.

Ключевые слова: гуминовые вещества, бурый уголь, химическая, микробиологическая и фармакологическая безопасность, цитопротекторы, антиоксиданты, иммуномодуляторы

© Зыкова М. В., Братишко К. А., Логвинова Л. А., Иванов В. В., Буйко Е. Е., Данилец М. Г., Трофимова Е. С., Лигачева А. А., Зима А. П., Рабцевич Е. С., Уфандеев А. А., Михалёв Д. А., Першина А. В., Константинов А. И., Перминова И. В., Белоусов М. В., 2023

ВВЕДЕНИЕ

Гуминовые вещества (ГВ) – это природные темноокрашенные органические соединения, относящиеся по своей химической природе к молекулярным ансамблям [1], которым присущи коллоидные свойства, отсутствие строгого постоянства химического состава, широкий разброс в молекулярных массах. На сегодняшний день в литературе описано множество их уникальных биологических свойств, что делает ГВ перспективными объектами исследования с позиций медицины и фармации как потенциально важных биологически активных веществ (БАВ), для поиска и разработки лекарственных средств и пищевых продуктов нового поколения [2].

В структуре ГВ отмечается большое количество различных функциональных групп, которые определяют их окислительно-восстановительные, протолитические и хелатообразующие свойства. Так, например, они являются одними из сильнейших хелатирующих агентов среди природных органических веществ [2]. Подобная химическая структура ГВ позволяет им выступать в качестве буферных систем, способных регулировать протолитический баланс в различных биосредах, а также выполнять роль ингибиторов свободных радикалов [2].

К настоящему времени описан широкий спектр биологической активности ГВ, который реализуется за счет влияния ГВ на системы организма, активируемые окислительно-восстановительными, кислотно-основными и неспецифическим лиганд-рецепторным взаимодействиями.

Однако внеэкспериментальное прогнозирование биологической активности ГВ на сегодняшний день остается невозможным в связи с отсутствием строгого постоянства химического состава [2, 3]. Сложность заключается еще и в том, что биологическая активность зависит от происхождения, способа выделения и специфической обработки. Таким образом, возникает необходимость постоянной биологической и химической стандартизации каждого конкретного образца ГВ, особенно учитывая, что бурый уголь, леонардит, которые являются ценным источником ГВ ввиду высокого содержания последних и соответствия требованиям “зеленой химии”, не относятся ни к одной из морфологических групп официального лекарственного растительного сырья [1].

Внедрение в фармацевтическую и пищевую промышленность новых активных фармацевтических субстанций в соответствии с современ-

ными требованиями невозможно без оценки химической, микробиологической и фармакологической безопасности БАВ. Для этого необходимо выполнение определенного порядка проведения научных исследований на всех уровнях, важнейшим из которых является оценка безопасности на этапе доклинических токсикологических исследований.

Доклинические токсикологические исследования – необходимый этап, направленный на выявление и оценку выраженности токсических эффектов, возникающих при взаимодействии БАВ с организмом лабораторных животных, согласно действующему на территории Российской Федерации законодательству [4]. Токсикологические исследования позволяют получить данные, необходимые для проведения клинических исследований.

Таким образом, цель работы – изучение физико-химических параметров структуры ГВ бурого угля, а также исследование их химической, микробиологической, фармакологической безопасности и специфической биологической активности для обоснования использования в качестве биологически активной субстанции в пищевой и фармацевтической промышленности.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Объектом исследования служила субстанция ГВ бурого угля Канско-Ачинского угольного бассейна, месторождение Переясловское (далее – ГВ угля). Технические характеристики сырьевого источника (угля): влага общая 32.2 мас. %; зола общая 19.9 мас. %; выход летучих веществ на сухое беззолное состояние 52.0 %; массовая доля хлора 0.027 %; массовая доля мышьяка <0.0005 %; сера общая 0.52 %; углерод 61.6 %; водород 4.37 %; азот 1.76 %; кислород 31.6 %. Гуминовые вещества выделяли из бурого угля методом массообменной щелочной экстракции. Для интенсификации процесса экстрагирования бурый уголь диспергировали в механическом измельчителе и просеивали через сито с диаметром отверстий 3 мм. Далее сырье заливали 1 % водным раствором карбоната натрия и выдерживали при комнатной температуре в течение 12 ч, периодически перемешивая. Далее отстаивали в течение 1 сут и фильтровали. Дальнейшее отделение от мелкодисперсных взвешенных частиц проводили в течение 15 мин в центрифуге (при скорости 4000 об/мин). Из жидкого экстракта отгоняли

воду с использованием ротационного испарителя Rotavapor R-300 (BUCHI, Швейцария), остатки влаги удаляли в сушильном шкафу при температуре 60° С. Исследовали ГВ, представляющие собой смесь натриевых солей фульвокислот (ФК) и гуминовых кислот (ГК) в форме сухого аморфного порошка от темно-коричневого до черного цвета, хорошо растворимого в воде, плохо – в спирте и органических растворителях.

Физико-химические параметры ГВ угля устанавливали с привлечением методов: УФ-спектроскопии (спектрофотометр Unico 2800, США); спектрофлуориметрии (спектрофлуориметр Agilent Cary Eclipse, США); колебательной спектроскопии (ИК-Фурье спектрометр ФСМ 2201, Россия); элементного С, Н, N, O-анализа (автоматический CHN-анализатор Carlo Erba Strumentazione 1301, Италия); ¹³C ЯМР-спектроскопии (ЯМР-Фурье спектрометр Bruker AVANCE 400, Германия) и гель-хроматографии (гель-хроматографическая система Abimed (Gilson, США), состоящая из ВЭЖХ-насоса, автосамплера, стеклянной колонки, спектрофотометрического УФ-детектора, платы АЦП для регистрации аналитического сигнала и регистрирующего компьютера; гель-носитель – Toyoparl TSK HW-55S (Toso-Haas, Япония)) [5].

Неорганический элементный состав определяли методом ИСП-МС с помощью квадрупольного масс-спектрометра с индуктивно связанной плазмой Agilent 7500cx (Agilent Technologies, США), содержания тяжелых металлов и мышьяка – согласно ОФС.1.5.3.0009.15, радионуклидов – согласно ОФС.1.5.3.0001.15.

Микробиологическую чистоту (метод репликаций) определяли в соответствии с ОФС.1.2.4.0002.15 [6].

Доклинические исследования выполняли в соответствии с существующими правилами надлежащей лабораторной практики, утвержденными Министерством здравоохранения РФ [7]. Оценку острой и субхронической токсичности веществ для приема внутрь проводили согласно ГОСТ 32644-2014 “Методы испытаний по воздействию химической продукции на организм человека. Острая пероральная токсичность – метод определения класса острой токсичности” [8], ГОСТ 32641-2014 “Методы испытания по воздействию химической продукции на организм человека. Определение токсичности при повторном/многократном пероральном поступлении вещества на грызунах. 28-дневный тест” [9], а также согласно Руководству по проведению

доклинических исследований лекарственных средств [10]. Эксперимент выполнен на 56 крысах (25 самцов, 31 самка) массой 250–300 г линии Wistar первой категории, полученных из Центра коллективного пользования “SPF-виварий” ИЦиГ СО РАН (Новосибирск, сертификат имеется).

Доклинические исследования по установлению способности веществ при введении в организм вызывать состояние повышенной чувствительности (гиперчувствительность, сенсibilизация) проводили согласно [10]. Аллергенные свойства были изучены с помощью метода накожных аппликаций (экспериментальная модель – морские свинки) и гиперчувствительности замедленного типа (вид животных – лабораторные мыши) [10]. Эксперимент выполнен на 20 морских свинок (10 самцов, 10 самок), массой 400–550 г, и 40 инбредных мышках CD-1 (10 самцов, 10 самок), массой 20–25 г, полученных из отдела экспериментальных биологических моделей НИИФиРМ им. Е. Д. Гольдберга Томского НИМЦ (морские свинки) и Центра коллективного пользования “SPF-виварий” ИЦиГ СО РАН (сертификат имеется). Все этапы доклинических исследований с привлечением лабораторных животных были выполнены с соблюдением соответствующих требований [11]. Содержание животных и дизайн экспериментов одобрены, этическая экспертиза проведена, протокол экспериментов на животных соответствовал этическим нормам и принципам биомедицинских исследований и одобрен Этическим комитетом ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России (Томск, протокол № 8199 от 27.03.20 г.).

Об иммуностропных свойствах ГВ угля судили по способности влиять на активность NO-синтазы и аргиназы перитонеальных макрофагов мышей [3].

Общая антиоксидантная активность (АОА) оценивалась по способности ГВ угля снижать концентрацию стабильных свободных радикалов АВТС^{•+} и ДФПГ в модельных системах согласно методикам, описанным ранее [5, 12]. Выражали АОА как IC₅₀ – концентрация ГВ угля, при которой концентрации АВТС^{•+} и ДФПГ снижаются на 50 %. Взаимодействие ГВ угля с O₂^{•-} исследовали прямым методом по измерению концентрации O₂^{•-}, генерируемого ферментативным методом, согласно методике [12]. Специфическую железосвязывающую (хелатирующую) активность определяли по реакции с комплексом феррозин-Fe²⁺, согласно методике [12]. Хелатирующие агенты препятствуют

образованию комплекса феррозин- Fe^{2+} , в результате чего интенсивность фиолетовой окраски раствора уменьшается. Генерацию $\text{HO}\cdot$ осуществляли в реакции Хабера-Вейса в присутствии дезоксирибозы. Под влиянием $\text{HO}\cdot$ происходила деградация дезоксирибозы до малонового диальдегида, который определяли по реакции взаимодействия с тиобарбитуровой кислотой, согласно методике [12]. Для оценки АОА ГВ угля также применяли метод катодной вольтамперометрии с использованием ртутного пленочного электрода по методике, описанной в [5]. Показателем АОА являлся коэффициент каталитической активности (K , $\mu\text{моль}/(\text{л} \cdot \text{мин})$), выражающий степень изменения тока электровосстановления O_2 и характеризующий восстанавливающую способность ГВ угля.

Оценку внутриклеточного распределения ГВ угля, способность связывать/подавлять генерацию внутриклеточных активных форм кислорода, а также оценку уровня последних в культуре клеток, в том числе в присутствии молекул, вызывающих окислительный стресс (пероксид водорода, *трет*-бутилгидропероксид, ионы двухвалентного железа (Fe^{2+})), проводили флуоресцентным методом [13], анализ цитотоксических эффектов – МТТ-тестом [14].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Абрис УФ-спектра ГВ угля (рис. 1) представляет собой кривую, лишенную экстремумов и монотонно убывающую по мере продвижения в длинноволновую область. Спектральные коэффициенты при соответствующих длинах волн A_{465} (0.0501 ± 0.0071) и A_{650} (0.0128 ± 0.0018) соотносятся с показателями, которые были определены для ГВ природных каустобиолитов ($0.01-0.2$) [15]. Значения коэффициента цветности по Е. Вельте (3.9260 ± 0.0014) указывает на наличие в ГВ угля многоядерной ароматической структуры с разветвленной системой полисопряжения [5].

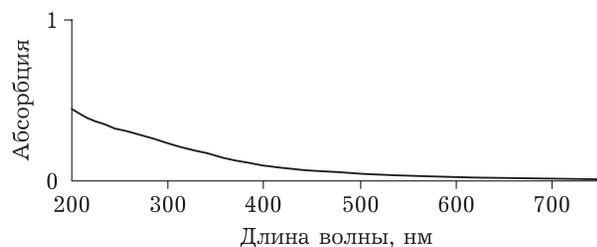


Рис. 1. Электронный спектр гуминовых веществ бурого угля Переясловского месторождения.

Спектры флуоресценции (рис. 2) типичны для природных ГВ угля [16, 17] и представляют собой уширенные полосы в видимой части спектра с максимумами центрирования при 540–550, 610–630 и 705–715 нм при возбуждении на длинах волн 270, 310 и 355 нм соответственно. Различное положение экстремумов в спектре свидетельствует о гетерогенности флуорофорных заместителей в структуре ГВ угля.

ИК-спектр ГВ угля (рис. 3) является типичным для данного класса веществ [18–21] и содержит характерные полосы поглощения при волновых числах: $3500-3300 \text{ см}^{-1}$ (ОН-группы алифатического и ароматического ряда); $3250-3200 \text{ см}^{-1}$ (N–H-группы в структуре амидов и аминов); 3040 см^{-1} (ароматические группы $=\text{C}-\text{H}$ в аренах с несколькими заместителями в кольце); 2920 и 2860 см^{-1} (метильные и метиленовые группы боковых углеводородных цепей соответственно); $2600-2500 \text{ см}^{-1}$ (ОН-группы димеров карбоновых кислот); $1725-1700 \text{ см}^{-1}$ (C=O-группы, в том числе в карбоксильных группах); $1625-1610 \text{ см}^{-1}$ (сопряженные связи $\text{C}=\text{C}$ и $\text{C}=\text{O}$ в ароматическом скелете и хинонах; считается,

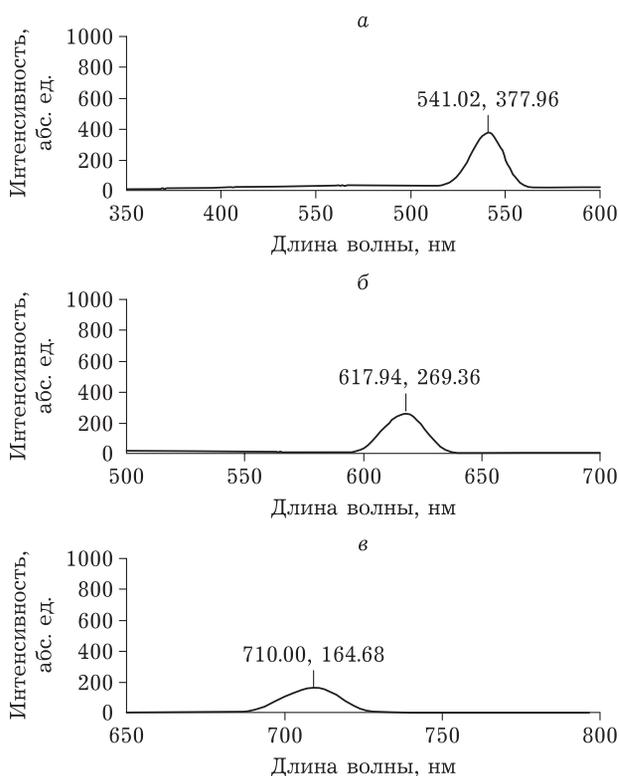


Рис. 2. Флуоресцентные спектры гуминовых веществ бурого угля Переясловского месторождения при длине волны возбуждения 270 (1), 310 (2) и 355 нм (3). Числа на спектрах – это максимумы центрирования интенсивности флуоресценции при возбуждении на различных длинах волн (270, 310 и 355 нм).

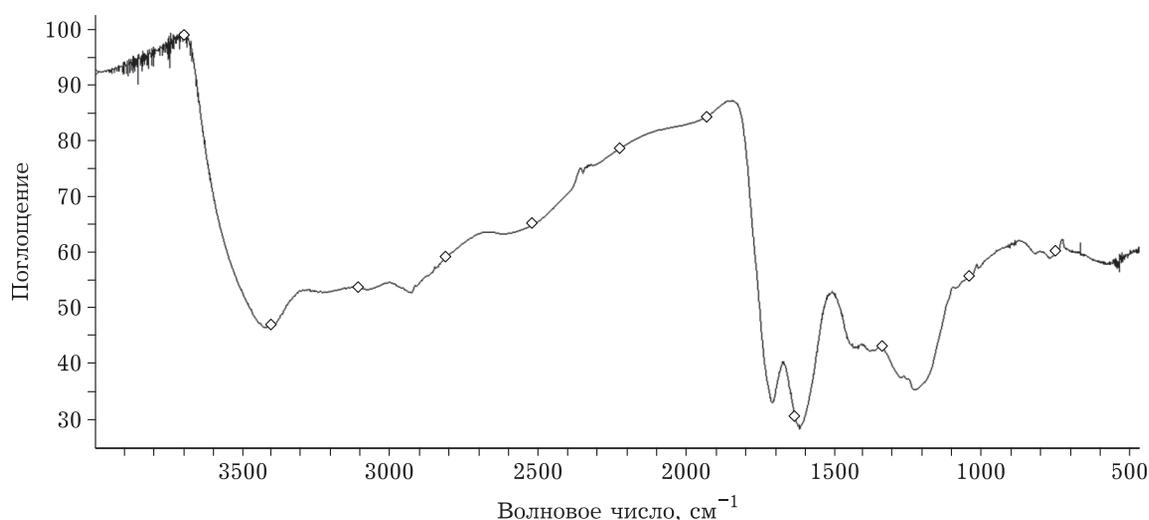


Рис. 3. ИК-спектр гуминовых веществ бурого угля Переясловского месторождения.

что именно колебания ароматических $C=C$ -связей ответственны за данную полосу, максимум которой приходится на 1610 см^{-1} ; в данном случае наблюдается полное совпадение); отсутствует полоса поглощения в области $1510\text{--}1500\text{ см}^{-1}$, что указывает на отсутствие неконденсированных моноароматических структур в строении ГВ угля (данный факт подтверждает ранее сделанные выводы о высокой степени поликонденсации ароматического ядра); $1460\text{--}1440\text{ см}^{-1}$ (связи $C-H$ метиленовых и метильных групп); 1383 см^{-1} (карбоксилат-ион COO^-); $1250\text{--}1225\text{ см}^{-1}$ (связи $C-O$ и $O-H$ карбоновых кислот и их функциональных производных, в основном сложных эфиров); $1050\text{--}1150\text{ см}^{-1}$ (OH -группы спиртов, гликозидные связи углеводов, связи $C-O$ спиртов и лактонов, связи $C-O-C$ циклических и алифатических простых эфиров). Максимальная интенсивность полос поглощения в ИК-спектрах отмечена для гидроксильных (спирты, фенолы), простых эфирных, карбонильных, карбоксильных групп и их функциональных производных (сложные эфиры, лактоны, амиды), алифатических и ароматических фрагментов.

Для количественной оценки интенсивности полос поглощения и содержания функциональных групп в молекулах ГВ использовали метод отношений оптических плотностей полос поглощения (ОППП) кислородсодержащих функциональных групп – гидроксильных (ν_{OH} 3400 см^{-1}), карбонильных ($\nu_{C=O}$ 1720 см^{-1}), сложноэфирных ($\nu_{C-O, C-O-C}$ 1225 см^{-1}) и простых эфирных (ν_{C-O} 1035 см^{-1}) групп к ОППП ароматических ($\nu_{C=C}$ 1610 см^{-1}) и алифатических (ν_{Aliph} 2920 см^{-1}) фрагментов структуры ГВ [18, 21]. Отмечено

(табл. 1), что исследуемый образец ГВ характеризуется высокими значениями отношений ОППП-величин, показывающих содержание ароматических фрагментов, а также карбоксильных, карбонильных, спиртовых и сложноэфирных групп в составе боковых цепей, связанных с ароматическим ядром, и низкими значениями ОППП-величин, характеризующих содержание алифатических и ароматических простых эфиров.

Спектр ЯМР ^{13}C исследуемой субстанции имеет сложный вид широкополосных частично перекрывающихся сигналов (рис. 4), типичных для ГВ [22, 23], где можно выделить области: углерода, не связанного с гетероатомами, алифатических CH_n -групп алкильных фрагментов (5–48 м. д.); углерода, связанного простой связью с гетероатомами, алифатических алкоксигрупп, углеводных фрагментов и аминогрупп аминокислот (48–90 м. д.); углерода алифатических групп, связанного простыми связями с двумя гетероатомами (кислородом или азотом), представленного в основном ацетальным углеродом полисахаридов (90–108 м. д.); углерода незамещенных и замещенных атомами углерода ароматических фрагментов (108–145 м. д.); углерода замещенных атомами кислорода и азота ароматических фрагментов (145–165 м. д.); углерода карбоксильных, сложноэфирных и амидных групп (165–187 м. д.); углерода альдегидных, кетонных и хинонных групп (187–220 м. д.).

Количественная оценка интенсивности ^{13}C ЯМР-спектров приведена в табл. 1, где представлены достаточно высокие значения показателей, соответствующих алифатическим азот-

ТАБЛИЦА 1

Спектральные коэффициенты по данным ИК-спектроскопии и распределение углерода по фрагментам структуры гуминовых веществ угля (% от общего углерода) по данным ^{13}C ЯМР-спектроскопии

Данные ИК-спектроскопии		Данные ^{13}C ЯМР-спектроскопии	
Спектральный коэффициент	Значение ^а	Спектральная область, м. д.	Значение ^б
$A_{\text{OH}} 3400/A_{\text{C=C}} 1610$	0.61	5–48 (CH_n , C–C)	17.5
$A_{\text{C=O}} 1720/A_{\text{C=C}} 1610$	0.86	48–90 (R–O, C–O, N–Alkyl)	11.0
$A_{\text{C-O}} 1225/A_{\text{C=C}} 1610$	0.84	90–108 (O–C–O, O–C–N)	5.0
$A_{\text{C-O}} 1035/A_{\text{C=C}} 1610$	0.48	108–145 (C_{Ar} (C=C, C=C–C))	33.8
$A_{\text{C=C}} 1610/A_{\text{Aliph}} 2920$	1.98	145–165 (C_{Ar} –O/N (C=C–O/N))	9.7
$A_{\text{OH}} 3400/A_{\text{Aliph}} 2920$	1.22	165–187 (O=C–(OH/O/NH ₂))	17.0
$A_{\text{C=O}} 1720/A_{\text{Aliph}} 2920$	1.69	187–220 (O=C–(H ₂ /R ₂))	6.1
$A_{\text{C-O}} 1225/A_{\text{Aliph}} 2920$	1.67	48–108 ($\Sigma \text{C}_{\text{carb}}$) ^в	16.0
$A_{\text{C-O}} 1035/A_{\text{Aliph}} 2920$	0.94	$\Sigma \text{C}_{\text{Ar}}/\Sigma \text{C}_{\text{Al}}$ ^г	1.3

Примечание. Спектральные коэффициенты рассчитаны как отношения оптических плотностей полос поглощения при определенных волновых числах (A_i) по данным ИК-спектроскопии.

^аотношения оптических плотностей полос поглощения рассчитаны исходя из средних значений ($n = 3$).

^бинтегральные значения распределения углерода по областям химического сдвига рассчитаны исходя из средних значений ($n = 5$).

^вСумма карбогидратов.

^гОтношение степени ароматичности к степени алифатичности.

и кислородсодержащим (48–90 м. д.) и карбоксильным (165–185 м.д.) структурам, что согласуется с данными ИК-спектроскопии. Показатель степени ароматичности ($\Sigma \text{C}_{\text{Ar}}/\Sigma \text{C}_{\text{Al}}$) составил 1.3, что указывает на преобладание ароматических фрагментов над алифатическими в структуре изучаемых ГВ угля [23, 24].

Абсолютные значения содержания основных конституционных элементов ГВ угля представлены в табл. 2. Так, например, согласно крите-

риям, приведенным в [15], ГК почв содержат, мас. %: С 46–62, N 3–6, H 3–5, O 32–38. Угольные ГК обычно имеют аналогичные диапазоны значений, но содержат азота в 2–5 раз меньше (1.1 ± 0.2), чем ГК почв и торфа [22]. Для ФК, в отличие от ГК, характерно более низкое содержание углерода (36–44 %) и более высокое содержание кислорода (45–50 %), в их составе также азот (3–4.5 %) и водород (3–5 %). Следует отметить, что исследуемый образец ГВ угля яв-

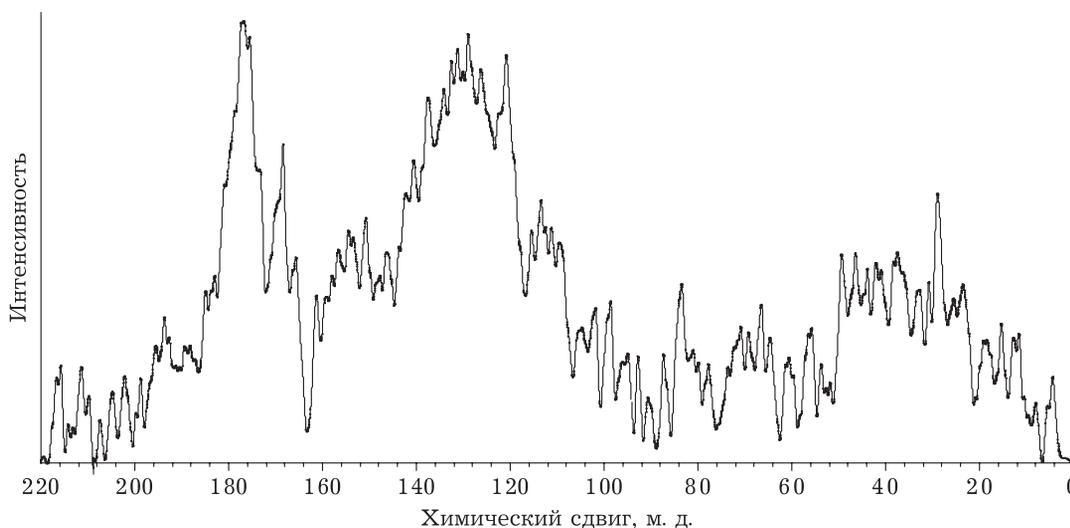


Рис. 4. ^{13}C ЯМР-спектр гуминовых веществ бурого угля Переясловского месторождения (интенсивность сигнала нормирована на максимальный сигнал спектра).

ТАБЛИЦА 2

Элементный (С, Н, N, O) состав и молекулярно-массовое распределение гуминовых веществ угля

Массовая доля элемента, % Атомная доля элемента, %				Атомное отношение			Полнота выхода с колонки, %	Параметр ММР			
С	Н	N	O	H/C	O/C	N/C		M_n , кДа	M_w , кДа	M_p , кДа	P
44.90±0.48	4.51±0.04	1.09±0.01	49.48±0.42	1.20	0.83	0.02	59	3.0	30.2	29.8	10.1
32.90±0.43	39.28±0.30	0.70±0.01	27.15±0.16								

Примечание. ММР – молекулярно-массовое распределение; M_n , кДа – среднечисленная молекулярная масса; M_w , кДа – средневесовая молекулярная масса; M_p , кДа – пиковое значение молекулярных масс (медиана); P – полидисперсность (отношение M_w/M_n).

ляется суммарным нефракционированным препаратом и представляет собой сумму ГК и ФК, поэтому имеет некоторые отличия по содержанию углерода (44.91 мас. %) и кислорода (49.48 мас. %). Наблюдается логичное увеличение в элементном составе доли кислорода и уменьшение доли углерода за счет содержания в образце ФК. Благодаря высчитанным относительным значениям (отношения H/C, однозначно определяющее класс углеводов, и O/C, устанавливающее содержание функциональных групп, содержащих кислород) можно заключить, что ГВ угля представляют собой полициклические ароматические углеводороды, которые имеют боковые алифатические цепи длиной до 10 углеродных атомов и обогащены O-содержащими группами [15, 21, 24].

Результаты исследования образца ГВ угля методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ, табл. 2) позволили рассчитать основные показатели его молекулярно-массового распределения (ММР): пиковое значение молекулярных масс (M_p) – медиану, средневесовую (M_w) и среднечисленную (M_n) молекулярные массы, а также полидисперсность (P) как отношение M_w/M_n . Можно отметить, что значения ММР ГВ угля сосредоточены в диапазоне значений средних молекулярных масс, что характерно для ГВ природного происхождения [25]. Параметр P показывает соотношение количества молекул различной молекулярной массы в образце и характеризует степень неоднородности состава молекулы ГВ. Полученные результаты свидетельствуют о высоком полидисперсном характере изучаемого образца ГВ угля. Достаточно высокий процент (59 %) выхода субстанции ГВ угля с колонки свидетельствует о высокой гидрофильности. Таким образом, результаты ВЭЖХ позволяют охарактеризовать молекулу ГВ угля как высокогидрофильный полидисперсный биополимер со средними значениями молекулярных масс (30.2 кДа) [25].

Следовательно, обобщенные результаты физико-химического анализа структуры изучаемых ГВ свидетельствуют о высоком вкладе ароматических структур в их строение и о высоком содержании карбоксильных групп по данным элементного анализа, ИК- и ^{13}C ЯМР-спектроскопии. Высокая гидрофильность и низкая гидрофобность изучаемых ГВ установлена методами элементного анализа и эксклюзионной ВЭЖХ. Достаточно большой размер молекулы установлен методами электронной и флуоресцентной спектроскопии, ВЭЖХ. Поликонденсированный (немономерный) характер ароматического ядра и высокая степень системы полисопряжения макромолекулы установлены по результатам электронной и флуоресцентной спектроскопии, элементного анализа. По данным флуоресцентной спектроскопии также отмечена невысокая гетерогенность состава флуорофоров.

Микробиологическую чистоту ГВ определяли в соответствии с Государственной фармакопеей Российской Федерации XIV издания, ОФС.1.2.4.0002.15 (метод репликации). Перед проведением основного испытания у изучаемой субстанции исследовали наличие антимикробного действия в отношении аэробных микроорганизмов – *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enteridis*. Наличие роста колоний, которые наблюдали после соответствующего периода инкубации, свидетельствовало об отсутствии собственного антимикробного действия ГВ. По результатам основного испытания на твердых питательных средах (разведения ГВ 1 : 10, 1 : 50, 1 : 100, 1 : 500 и 1 : 1000 соответственно) не наблюдали роста колоний аэробов, дрожжевых и плесневых грибов, т. е. в 1 г ГВ находятся менее 10 микроорганизмов. Полное отсутствие роста на селективной среде (бульон Мосселя, содержащий бычью желчь и бриллиантовый зеленый) бактерий семейства *Enterobac-*

ТАБЛИЦА 3

Результаты определения неорганического элементного состава гуминовых веществ угля

Химический элемент		Содержание, мг/г
Символ	Название	
Fe	Железо	6.816±1.159
Ca	Кальций	3.569±0.607
Mg	Магний	1.943±0.330
K	Калий	0.372±0.078
Mn	Марганец	0.015±0.003
Co	Кобальт	0.012±0.003
Cu	Медь	0.057±0.002
Cr	Хром	0.046±0.002
Zn	Цинк	0.036±0.001
Mo	Молибден	0.027±0.009
Se	Селен	0.001±0.001

teriacae позволило заключить, что в 1 г ГВ содержание энтеробактерий не превышает 10 КОЕ.

Гуминовые вещества ввиду особенности происхождения (трансформация остатков растений) содержат неорганические компоненты. Высокочувствительным методом ИСП-МС обнаружено 11 биогенных химических элементов (табл. 3). Содержание радионуклидов (согласно [26], должно быть Cs-137 не более 400 Бк/кг и Sr-90 не более 200 Бк/кг) в исследуемом образце ГВ не обнаружено. Содержание тяжелых металлов и мышьяка [27] не превышает требуемых значений (свинец 0.0004834 мг/г, что не более 6.0 мг/кг; кадмий 0.0000128 мг/г, что не более 1.0 мг/кг; ртуть 0.0000311 мг/г, что не более 0.1 мг/кг; мышьяк 0.0000242 мг/г, что не более 0.5 мг/кг).

В эксперименте исследования острой токсичности установлено, что однократное приме-

нение *per os* ГВ угля в дозировке 2000 мг/кг не приводило к гибели испытуемых животных как ни в первые сутки, так и ни в последующие 14 сут после введения. Полученная животными доза исследуемой субстанции не повлияла на их состояние (визуальный осмотр) и не вызвала снижение массы тела. Макроскопические исследования внутренних органов также не выявили явных изменений их структуры, ввиду чего ГВ угля можно определить как вещества, относящиеся к V классу токсичности (вещества малотоксичные) [8].

В эксперименте по определению субхронической токсичности внутрижелудочное введение раствора ГВ угля в дозе 1000 мг/кг в течение 28 сут не привело к изменению состояния животных, их кожных покровов, шерсти, массы тела, слизистых, не отразилось на количестве потребляемого корма и воды в сравнении с группой контроля [8]. По результатам изучения аллергенного действия методом накожных аппликаций обнаружено, что ни при десятом, ни при двадцатом нанесении на латеральную поверхность тела морских свинок раствора ГВ угля не возникало изменений дермы. Данное обстоятельство позволяет заключить об отсутствии опасности сенсibilизации препарата перкутанно [10].

По результатам выполненных исследований иммунофармакологической активности (табл. 4) можно заключить, что ГВ угля поляризуют макрофаги по M1 типу, судя по влиянию на баланс NO и аргинина (наиболее эффективная концентрация 10 мкг/мл), и тем самым усиливают Th1 тип иммунного ответа, в результате которого происходит образование цитотоксических T-лимфоцитов, являющихся эффекторны-

ТАБЛИЦА 4

Влияние гуминовых веществ (ГВ) угля на активность NO-синтазы и аргиназы перитонеальных макрофагов интактных мышей линии C57BL/6

Объект	Концентрация, мкг/мл	Концентрация нитритов, мкМ (X±m, n = 5)		Активность аргиназы, у. е. (X±m, n = 5)
		без полимиксина В	с полимиксином В	
Среда	–	2.03±0.03	1.66±0.11	34.5±0.9
ЛПС	1	22.18±2.84 ^a	7.54±0.26 ^a	16.1±0.5 ^a
ГВ угля	10	5.54±0.71 ^{a,б}	5.13±0.13 ^{a,б,г}	16.5±0.6 ^a
ГВ угля	50	5.22±0.64 ^{a,б}	4.79±0.12 ^{a,б,г}	16.9±0.8 ^a

Примечание. ЛПС – липополисахарид, у. е. – единица активности.

^a Различия со средой достоверны ($p < 0.05$).

^б Различия при инкубации с ЛПС-контролем без полимиксина В достоверны ($p < 0.05$).

^в Различия при инкубации с ГВ угля без полимиксина В достоверны ($p < 0.05$).

^г Различия при инкубации с ЛПС в присутствии полимиксина В достоверны ($p < 0.05$).

ми клетками для борьбы с внутриклеточными патогенами, к которым относятся вирусы и внутриклеточные бактерии, а также осуществляют противоопухолевый иммунитет [28]. Необходимо отметить, что макрофаги являются важнейшим звеном в формировании иммунного ответа, поскольку служат клетками, которые взаимодействуют с антигеном, и презентуют его иммунной системе (Th0), и в зависимости от типа антигена начинают вырабатывать соответствующие цитокины, которые вызывают поляризацию Th0 в Th1 или Th2. Таким образом, именно макрофаги отвечают за формирование клеточного или гуморального иммунного ответа. В связи с этим можно заключить, что природные молекулы, активирующие макрофаги по M1 типу, способствуют формированию и усилению Th1 типа иммунного ответа, т. е. обладают иммуностимулирующим действием.

При исследовании общей АОА ГВ угля была показана высокая способность исследуемого образца ингибировать стабильные свободные радикалы ДФПГ ($IC_{50} = 27.4 \pm 0.3$ мкг/мл) и катион-радикал АВТС^{•+} ($IC_{50} = 10.7 \pm 0.5$ мкг/мл) в модельных системах, что сопоставимо с эталонными препаратами – дигидрохверцетином ($IC_{50} = 21.3 \pm 0.5$ мкг/мл) и тролоксом ($IC_{50} = 3.5 \pm 0.1$ мкг/мл) соответственно. Исследуемые ГВ угля также показали высокую активность в отношении свободных радикалов, таких как $O_2^{\cdot-}$ и HO^{\cdot} , где среднеэффективные концентрации ГВ угля составили 20.6 ± 1.9 и 2.5 ± 0.1 мг/мл соответственно. Данная активность образцов сопоставима с препаратами сравнения, а именно аскорбиновой кислотой ($IC_{50} = 13.2 \pm 0.8$ мкг/мл) и маннитолом ($IC_{50} = 0.8 \pm 0.0$ мг/мл). Предполагаемый механизм реализации АОА – способность ГВ угля выступать в роли доноров протона благодаря наличию большого количества фенольных групп.

Также показана способность ГВ угля связывать ионы Fe^{2+} переменной валентности, непосредственного участника реакции Фентона, в результате которой генерируется HO^{\cdot} [29, 30]. Значение IC_{50} для ГВ угля составило 25.9 ± 0.6 мкг/мл, что вдвое ниже значения препарата сравнения ЭДТА ($IC_{50} = 9.5 \pm 0.3$ мкг/мл). Однако необходимо отметить, что ЭДТА является сильнейшим хелатором и способен конкурировать с биополимерами за биометаллы, повышая риск нарушения металло-лигандного баланса в организме. Исследуемые ГВ угля являются более мягкими хелаторами, тем самым

снижая риск нарушения со стороны металло-лигандного баланса.

Изучение каталитической АОА ГВ угля в процессе электровосстановления O_2 показало, что исследуемый образец является редокс-активным соединением, проявляющим каталитическую активность по отношению к указанному процессу. Можно отметить, что значение каталитической активности для ГВ угля составило 0.91 мкмоль/л·мин, что сопоставимо со значением эталонного антиоксиданта аскорбиновой кислоты и превышает значения природного флавоноида – дигидрохверцетина (0.78 мкмоль/л·мин) на 16.6 %.

Исследуемые ГВ угля не обладают выраженными цитотоксическими свойствами в отношении культуры клеток НерG2, жизнеспособность исследуемой культуры клеток снизилась до 50 % (IC_{50}) только при концентрации ГВ угля 5250 мкг/мл. Данные по определению цитотоксичности в опытах *in vitro* согласуются с данными о низкой токсичности ГВ угля, полученными в тестах *in vivo*.

Благодаря уникальной химической структуре и пространственной конфигурации ГВ способны преодолевать клеточную мембрану и накапливаться во внутриклеточном пространстве: обнаружено, что цитозоль и клеточное ядро начинали флуоресцировать в спектральной области, близкой к собственной флуоресценции ГВ при нахождении клеточной линии в среде ГВ угля. В пользу этого свидетельствует и установленная у ГВ угля цитопротекторная активность, связанная с их способностью снижать интенсивность флуоресценции зонда ДХФДА при стимуляции свободнорадикальных процессов после добавления к клеткам линии НерG2 прооксидантов (пероксид водорода, *трет*-бутилгидропероксид, ионы Fe^{2+}).

Определено (табл. 5), что интенсивность флуоресценции клеток после инкубации с 300 мкг/мл субстанции ГВ в течение 24 ч составляла $(1.23 \cdot 10^5) \pm (0.04 \cdot 10^5)$ о. е., что было значительно ниже значений, отмеченных для контрольных клеток $((2.08 \cdot 10^5) \pm (0.13 \cdot 10^5))$ о. е., а интенсивность флуоресценции клеток, подвергшихся воздействию прооксидантов, была выше интенсивности флуоресценции контрольных клеток и составила $(4.85 \cdot 10^5) \pm (0.21 \cdot 10^5)$, $(1.74 \cdot 10^5) \pm (0.07 \cdot 10^5)$ и $(7.16 \cdot 10^5) \pm (0.47 \cdot 10^5)$ о. е. для *трет*-бутилгидропероксида, пероксида водорода и ионов Fe^{2+} соответственно. Предварительная инкубация клеточной культуры с субстанцией ГВ приводила к снижению интенсивности флуоресценции

ТАБЛИЦА 5

Влияние субстанции гуминовых веществ (ГВ) угля на интенсивность флуоресценции зонда 2,7-дихлорфлюоресцеиндиацетата в клетках HerG2 после добавления в инкубационную среду прооксидантов (пероксид водорода, *трет*-бутилгидропероксид, ионы Fe^{2+})

№ группы	Группа	Интенсивность флуоресценции, о. е., $M \pm m$
1	Контроль	$(2.08 \cdot 10^5) \pm (0.13 \cdot 10^5)$
2	Контроль + ГВ	$(1.23 \cdot 10^5) \pm (0.04 \cdot 10^5)$ ($p_{2-1} < 0.01$)
3	<i>Трет</i> -бутилгидропероксид	$(4.85 \cdot 10^5) \pm (0.21 \cdot 10^5)$ ($p_{3-1} < 0.01$)
4	<i>Трет</i> -бутилгидропероксид + ГВ	$(3.55 \cdot 10^5) \pm (0.12 \cdot 10^5)$ ($p_{4-3} < 0.01$)
5	Пероксид водорода	$(3.81 \cdot 10^5) \pm (0.07 \cdot 10^5)$ ($p_{5-1} < 0.01$)
6	Пероксид водорода + ГВ	$(2.4 \cdot 10^5) \pm (0.06 \cdot 10^5)$ ($p_{6-5} < 0.01$)
7	Ионы Fe^{2+}	$(7.16 \cdot 10^5) \pm (0.47 \cdot 10^5)$ ($p_{7-1} < 0.01$)
8	Ионы Fe^{2+} + ГВ	$(5.65 \cdot 10^5) \pm (0.45 \cdot 10^5)$ ($p_{8-7} < 0.01$)

Примечание. о. е. – относительные единицы флуоресценции; p – уровень статистической значимости различий между указанными группами (t -критерий Стьюдента).

клеток после добавления прооксидантов до значений $(3.55 \cdot 10^5) \pm (0.12 \cdot 10^5)$, $(1.22 \cdot 10^5) \pm (0.06 \cdot 10^5)$ и $(5.65 \cdot 10^5) \pm (0.45 \cdot 10^5)$ о. е. для *трет*-бутилгидропероксида, пероксида водорода и ионов Fe^{2+} соответственно. Таким образом, преинкубация клеток HerG2 с субстанцией ГВ снижает уровень внутриклеточных активных форм кислорода после индукции окислительного стресса прооксидантами. Это свидетельствует о высоком цитопротекторном потенциале субстанции ГВ стимулировать/повышать антиоксидантную систему защиты клеток.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, с помощью ряда физико-химических методов анализа у исследуемых ГВ угля установлены основные молекулярные параметры, присущие данному классу природных соединений. Исследуемые ГВ угля соответствуют требованиям ОФС (общая фармакопейная статья) по показателям: микробиологическая чистота, содержание тяжелых металлов и радионуклидов. В серии фармакологических экспериментов определено отсутствие базовой токсичности, установлены высокая антиоксидантная и антирадикальная активность, иммунотропные и цитопротективные свойства.

Вследствие этого ГВ угля Канско-Ачинского угольного бассейна, месторождения Переясловское, представляют собой безопасные и эффективные БАВ природного происхождения для использования в качестве перспективной биологически активной субстанции в пищевой и фармацевтической промышленности.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства здравоохранения РФ (Государственное задание № 056-00071-22-02).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1 Perminova I. V. From green chemistry and nature-like technologies towards ecoadaptive chemistry and technology // Pure Appl. Chem. 2019. Vol. 91, No. 5. P. 851–864.
- 2 Зыкова М. В., Логвинова Л. А., Белоусов М. В. Высокомолекулярные соединения гуминовой природы – перспективные биологически активные соединения // Традиционная медицина. 2018. Т. 53, № 2. С. 27–38.
- 3 Zykova M. V., Veretennikova E. E., Logvinova L. A., Romanenko S. V., Bratishko K. A., Belousov M. V., Brazovskiy K. S., Yusubov M. S., Lyapkov A. A., Danilets M. G., Trofimova E. S., Ligacheva A. A. New artificial network model to estimate biological activity of peat humic acids // Environ Res. 2020. Vol. 191. Art. 109999.
- 4 Федеральный закон от 12 апреля 2010 г. № 61-ФЗ “Об обращении лекарственных средств” [Электронный ресурс]. Режим доступа: <http://ivo.garant.ru/#/document/12174909/paragraph/25019/doclist/N%2061-%D0%A4%D0%97:0/> (дата обращения: 24.06.2023).
- 5 Zykova M. V., Schepetkin I. A., Belousov M. V., Krivoshchekov S. V., Logvinova L. A., Bratishko K. A., Yusubov M. S., Romanenko S. V., Quinn M. T. Physicochemical characterization and antioxidant activity of humic acids isolated from peat of various origins // Molecules. 2018. Vol. 23, No. 4. Art. 753.
- 6 Емашанова С. В., Потанина О. Г., Буданова Е. В., Чистяков В. В. Государственная фармакопея Российской Федерации XIV издания. Т. I. Вводная часть. Методы анализа лекарственных средств. Реактивы [Электронный ресурс]. Режим доступа: <http://pharmacopoeia.regmed.ru/pharmacopoeia/izdanie-14/1/1-3/> (дата обращения: 24.06.2023).
- 7 Приказ Министерства здравоохранения РФ от 1 апреля 2016 г. № 199н “Об утверждении Правил надлежащей лабораторной практики”. М.: Стандартинформ, 2016. 9 с.
- 8 ГОСТ 32644-2014. Методы испытаний по воздействию химической продукции на организм человека. Острая пероральная токсичность – метод определения класса острой токсичности. М.: Стандартинформ, 2014. 26 с.

- 9 ГОСТ 32641-2014. Методы испытания по воздействию химической продукции на организм человека. Определение токсичности при повторном/многократном пероральном поступлении вещества на грызунах. 28-дневный тест. М.: Стандартинформ, 2015. 16 с.
- 10 Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Ч. 1 / под. общей ред. А. Н. Миронова. М.: Гриф и К, 2013. 944 с.
- 11 ГОСТ 33216-2014. Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила содержания и ухода за лабораторными грызунами и кроликами. М.: Стандартинформ. 2016. 9 с.
- 12 Братишко К. А., Зыкова М. В., Иванов В. В., Буйко Е. Е., Дрыгунова Л. А., Перминова И. В., Белоусов М. В. Гуминовые кислоты торфа – перспективные биологически активные вещества с антиоксидантной активностью для разработки протекторных средств // Химия растительного сырья. 2021. № 1. С. 287–298.
- 13 Буйко Е. Е., Зыкова М. В., Иванов В. В., Братишко К. А., Уфандеев А. А., Григорьева И. О., Цупко А. В., Михайлёв Д. А., Перминова И. В., Белоусов М. В. Антиоксидантная активность серебросодержащих бионаноконпозиций на основе гуминовых веществ в культуре клеток // Разработка и регистрация лекарственных средств. 2021. Т. 10, № 4. С. 46–53.
- 14 Löh G., Deters A., Hensel A. *In vitro* investigations of *Cynara scolymus* L. extract on cell physiology of HepG2 liver cells // Brazilian J. Pharm. Sci. 2009. No. 45. P. 201–208.
- 15 Орлов Д. С. Гумусовые кислоты почв и общая теория гумификации. М.: МГУ, 1990. 325 с.
- 16 Гостева О. Ю., Изосимов А. А., Пацаева С. В., Южаков В. И., Якименко О. С. Флуоресценция водных растворов промышленных гуминовых препаратов // Журн. приклад. спектроскопии. 2011. Т. 78, № 6. С. 943–950.
- 17 Senesi N., Miano T. M., Provenzano M. R., Brunetti G. Characterization, differentiation, and classification of humic substances by fluorescence spectroscopy // Soil Science. 1991. Vol. 152. P. 259–271.
- 18 Зыкова М. В., Трофимова Е. С., Кривошеков С. В., Лигачёва А. А., Данилец М. Г., Логвинова Л. А., Жолобова Г. А., Прищепова О. Ф., Юсубов М. С., Белоусов М. В. Спектральные параметры и биологическая активность высокомолекулярных соединений гуминовой природы // Бюлл. сибирской медицины. 2017. Т. 16, № 1. С. 36–49.
- 19 Жеребцов С. И., Исмагилов З. Р. Влияние алкилирования бурого угля и торфа на состав и свойства выделяемых из них гуминовых кислот // Химия твердого топлива. 2012. № 6. С. 8–22.
- 20 Патраков Ю. Ф., Счастливец Е. Л., Мандров Г. А. Изучение буроугольных гуминовых и фульвокислот методом ИК-спектроскопии // Химия твердого топлива. 2010. № 5. С. 9–14.
- 21 Zaccone C., Miano T. M., Shotyk W. Qualitative comparison between raw peat and related humic acids in an ombrotrophic bog profile // Org. Geochem. 2007. Vol. 38, No. 1. P. 151–160.
- 22 Kingery W. L., Simpson A. J., Hayes M. H. B., Locke M., Hicks R. The application of multidimensional NMR to the study of soil humic substances // Soil. Sci. 2000. Vol. 165. P. 483–494.
- 23 Холодов В. А., Константинов А. И., Кудрявцев А. В., Перминова И. В. Строение гуминовых кислот почв зонального ряда по данным спектроскопии ¹³C-ЯМР // Почвоведение. 2011. № 9. С. 1064–1073.
- 24 Van Krevelen D. W. Graphical-statistical method for investigation of the structure of coal // Fuel. 1950. Vol. 29. P. 228–269.
- 25 Kudryavtsev A. V., Perminova I. V., Petrosyan V. S. Size exclusion chromatographic descriptors of humic substances // Anal. Chim. Acta. 2000. Vol. 407, No. 12. P. 193–202.
- 26 ОФС.1.5.3.0001.15. Определение содержания радионуклидов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратов [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://pharmacopeia.ru/ofs-1-5-3-0001-15-opredelenie-soderzhaniya-radionuklidov-v-lekarstvennom-rastitelnom-syre-i-lekarstvennyh-rastitelnyh-preparatov/> (дата обращения: 24.06.2023).
- 27 ОФС.1.2.2.2.0012.15. Тяжелые металлы [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://pharmacopeia.ru/ofs-1-2-2-2-0012-15-tyazhelye-metally/> (дата обращения: 24.06.2023).
- 28 Trofimova E. S., Zykova M. V., Ligacheva A. A., Sherstoboev E. Yu., Zhdanov V. V., Belousov M. V., Yusubov M. S., Krivoshchekov S. V., Danilets M. G., Dygai A. M. Influence of humic acids extracted from peat by different methods on functional activity of macrophages *in vitro* // Bull. Exp. Biol. Med. 2016. Vol. 162, No. 6. P. 741–745.
- 29 Matros A., Peshev D., Peukert M., Mock H. P., Van den Ende W. Sugars as hydroxyl radical scavengers: Proof-of concept by studying the fate of sucralose in *Arabidopsis* // Plant J. 2015. Vol. 82, No. 5. P. 822–839.
- 30 Биленко М. В. Ишемические и реперфузионные повреждения органов. М.: Медицина, 1989. 368 с.