

ОСОБЕННОСТИ ХИМИЧЕСКОГО СОСТАВА И БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ САПРОПЕЛЕЙ

В.В. ПЛАТОНОВ, О.С. ПОЛОВЕЦКАЯ

Тульский государственный педагогический университет им. Л.Н.Толстого
Тел. +7 (4872) 35-15-42

Аннотация: В статье представлены результаты изучения вещественного состава и биологической активности сапропеля г. Приморско-Ахтарск (Азовская пойма Краснодарский край). Подробно охарактеризованы технический, ботанический и химический групповой состав исходного сапропеля, качественный и количественный состав фульвокислот, гуминовых и гематомелановых кислот. Выполнено биологическое тестирование сапропелевых препаратов с использованием широкого набора микроорганизмов. Установлена высокая биологическая активность сапропелевых препаратов, которая коррелируется с функциональным составом последних.

Ключевые слова: сапропель, фульвокислоты, гематомелановые кислоты, биологическая активность.

THE FEATURES OF CHEMICAL COMPOSITION AND THE BIOLOGICAL ACTIVITY OF SAPROPELAE

V.V. PLATONOV, O.S. POLOVETSKAYA

Tula State Pedagogical University
Tel.: +7 (4872) 35-15-42

Abstract: The article presents the results of studying of material composition and the biological activity of sapropelis in Primorsko-Akhtarsk (Asov flood plain Krasnodarsk area). The technical, botanical and chemical compound of initial sapropelis, the quantitative and qualificative composition of fulvinic, humic and hematomelaninic acids are characterized. The biological testing of sapropelae preparations with the use of large collection of microorganisms is carried out. It is established the high biological activity of sapropelae preparations which correlates with functional composition of the latters.

Key words: sapropelis, fulvinic acids, hematomelaninic acids, biological activity.

Всемирный Конгресс «Итоги тысячелетия», прошедший в ноябре 2000 г. в Санкт-Петербурге, констатировал: «Население всех стран мира наиболее остро волнует сокращение продолжительности жизни, что является следствием неблагоприятной экологической обстановки, увеличения числа генетических и трудно излечиваемых заболеваний, несбалансированного питания и ряда других факторов...».

Многие из перечисленных проблем могут быть решены широким внедрением в практику сапропелей, торфов и продуктов на их основе. Многоплановые исследования и длительный опыт применения сапропелей, торфов и препаратов на их основе, убедительно доказали положительный эффект их использования в медицине, ветеринарии, рыбоводстве, сельском хозяйстве, животноводстве, технике и других областях [1-5].

Комплексом современных методов, включая химический групповой, элементный, количественный функциональный, рентгено-флуоресцентный анализы, ИК-Фурье, УФ/ВИС, ¹H и ¹³C ЯМР-спектроскопию, ЭПР, хромато-масс-спектрометрию, тонкослойную и жидкостную адсорбционную хроматографию и другие, в составе *органического вещества* (ОВ) сапропелей идентифицированы: *водорастворимые* (ВРВ), *легкогидролизуемые* (ЛГВ) и *трудногидролизуемые* (ТГВ) вещества, *гуминовые* (ГК), *гематомелановые* (ГМК) и *фульвокислоты* (ФК), целлюлоза, лигнин, липиды, каротиноиды, простые и сложные эфиры, карбоновые кислоты (жирные, нафтеновые, ароматические), стерины, спирты, кетоны, производные хлорофилла, ксантофиллы, углеводороды, порфирины, бактериохлорофиллы, широкий набор витаминов, гормонов и т.д. В составе ВРВ, ЛГВ, ТГВ, а также ФК обнаружены и количественно определены аминокислоты, среди которых преобладают аспарагиновая, глутаминовая, L- α -аланин, гистидин, лизин, аргинин. Состав углеводно-уроновой комплекса представлен гексозами (D-глюкоза, D-галактоза, манноза), пентозами (ксилоза, арабиноза) и уроновыми кислотами. Особенностью ГК и ГМК является их обогащенность аминокислотами, полипептидами, пяти- и шестичленными азотсодержащими гетероциклами, пигментами, витаминами, стеринами, каротиноидами, металопорфиринами. Перечисленный спектр соединений отвечает за высокую биологическую активность исходных сапропелей и торфов, а также препаратов на их основе, что определяет области их эффективного применения.

Н. Юдина [6] считает, что биологическую активность *гуминовых препаратов* (ГП) обуславливают содержащиеся в них хиноидные, карбоксильные и фенольные функциональные группы. Хиноны, обладающие высоким окислительно-восстановительным потенциалом, являются биокатализаторами окислительно-восстановительных реакций, протекающих через стадию образования радикалов типа семихинонов. ГП на основе сапропелей, торфов, содержащие в составе макромолекул различные функциональные группы и парамагнитные центры могут играть роль «ловушки» для активных радикалов, что приводит к образованию нейтральной молекулы и менее активных радикалов (ингибирование), либо наоборот, образуется нейтральная молекула и новый более активный радикал, инициирующий радикальный процесс [7].

Г. Наумова [8] утверждает, что основной парамагнетизм ГК обусловлен не семихинонными радикалами, а дефектами π -связей в ароматических структурах полисопряжения. В. Шишков и др. [9] высокую биологическую активность сапропелей, торфов и препаратов на их основе, объясняют присутствием в их ОВ следующих структурных фрагментов: радикалов с преимущественной локализацией неспаренного электрона на гетероатомных периферийных группах; металлоорганических комплексов и высокомолекулярных систем сопряжения алифатического характера, как с открытой цепью, так и циклических.

Лечение целебными гязями – сапропелями – один из древнейших способов избавления от разнообразных недугов. Основную группу болезней, при которых показано гязелечение, составляют болезни воспалительного характера, преимущественно в хронической стадии. Оно наиболее эффективно при использовании на грани перехода подострого процесса в хронический. Сапропелевые лечебные гязи оказывают положительное влияние на нервную, эндокринную, сердечно-сосудистую системы, улучшают состояние опорно-двигательного аппарата, стимулируют метаболические процессы в печени. Их применяют при заболеваниях половых органов и желудочно-кишечного тракта. Высокая адсорбционная способность сапропелей оказывает подсушивающее действие на мокнущие поверхности рваных ран. Наличие в сапропеле антибиотиков и отсутствие патогенных микроорганизмов обеспечивает быстрое прекращение воспалительных процессов и хорошее излечение экзем, дерматитов, ожогов. Подогретыми сапропелевыми аппликациями, за счет усиления фагоцитарной активности лейкоцитов в крови и регенерации тканей, успешно лечатся различные флегмоны, маститы, фурункулезы, хронические гастриты, язвенные болезни желудка и двенадцатиперстной кишки. Взаимодействуя с организмом человека, лечебные сапропелевые гязи создают оптимальный ионный обмен между кожей и сапропелевой аппликацией. Через кожу проникают биологически активные и химические составляющие природной смеси.

Ведущие парфюмерно-косметические фирмы мира объявили сапропелевую лечебную гязь косметикой XXI века. Сапропель питает и отбеливает кожу, разглаживает морщины, лечит акне, сужает поры кожи. Существенный вклад в биологическую активность сапропелей вносят разнообразные витамины, стерины, производные хлорофилла, каротина, гормональные соединения, антибиотики, легкодоступные углеводы, незаменимые аминокислоты (лизин, метионин, цистеин, триптофан). Значительный лечебный эффект заложен в битумных фракциях, содержащих высокомолекулярные спирты, непредельные карбоновые кислоты, стерины. В смолистой части липидов концентрируется большая часть биологически активных веществ обладающих антиоксидантным, мембраностабилизирующим, гепатозащитным, антимикробным, противовоспалительным и репаративным действием при лучевых поражениях кожи. Экстракт липидов восстанавливает кожу, защищает ее от радиационного и ультрафиолетового поражения, обладает высокой сорбционной способностью, очищает от шлаков, оказывает антибактериальное, антигрибковое и противовоспалительное действие, обладает биостимулирующим эффектом на ее клетки и сильным антиоксидантным эффектом, способным «гасить» свободнорадикальные реакции.

ГК стимулируют биологические процессы в организме человека, обладают антимикробным и антисептическим действием. Низкомолекулярная фракция ГК, включающая органоминеральные формы и обладающая высокой подвижностью, проникает через кожу и транспортирует к органам различные физиологически активные вещества. Установлено [10], что ГК сапропелей обладающая кортизоноподобным действием, вызывают непосредственные ферментативные реакции в стенках капилляров и клетках эпителия, адсорбирующей цитохромоксидазу, щелочную фосфатазу и АТФ; тормозят действие гиалуронидазы, входящей в состав соединительной ткани, и таким образом купируют воспалительные процессы у больных полиартритом. Выявлено благоприятное влияние ГК и ФК на нормализацию энергетики и экскреторной функции пораженной печени. ГК сапропелей, обладающая способностью хелатообразования, связывают ионы тяжелых металлов, радионуклидов, токсинов, изолируя и подавляя их действие. Обеспечивая увеличение объемного кожного и мышечного кровотока, ГК уменьшают застойные явления и обеспечивают практическое выздоровление больных нейродермитом. В составе сапропелей обнаружены большие количества бактерий и актиномицетов, обладающих антибактериальными свойствами, как к патогенным, так и к условнопатогенным микроорганизмам. Выявлены антагонисты среди бактерий и актиномицетов по отношению к золотистому и белому стафилококку, тифозной и паратифозной палочке В, к патогенным грибкам человека (*Achovion Schorleini*, *Achovion gypseum* и др.), к микрофлоре гинекологических больных.

Цель исследования – изучение особенностей химического состава сапропеля и установление взаимосвязи с биологической активностью по отношению к различным микроорганизмам.

Материалы и методы исследования. Объект исследования — сапропель г. Приморско-Ахтарск Азовской поймы Краснодарского края. Технический анализ сапропеля: *влажность* (W^d) – 3.90; *зольность* (A^c) – 80.5; содержание органического вещества (масс.% на воздушно-сухой образец) – 11.2; элементный состав (масс.% daf): С 35.1; Н 5.1; N 3.2; O 56.6.

Определен ботанический состав сапропеля, позволивший установить, что степень разложения биологического вещества – 98%; остатки растений и животных – 2%. В непромытом материале преобладают диатомовые водоросли класса пенатые (57%), а также нитчатые желто-зеленые (10%). Промывной материал – остатки животных, беспозвоночных, в т.ч.: дафнии (18%), древесина (8%), осока *Carex* (плоды, корни, реже эпидермис) – 7%, корни злаков, в т.ч.: тростника *Phragmites* (6%), камыша *Scirpis* (4%), листья зеленых мхов (2%), споры и пыльца (1%), горец земноводный, рдест.

Химическим групповым анализом в составе ОБ сапропеля определен выход отдельных групп соединений (масс.% ОМ): ВРВ – 10.8; ЛГВ – 23.5; ТГВ – 15.3; целлюлоза – 4.8; гуминовые вещества – 35.5, в т.ч.: ГК, ГМК и ФК – 5.8, 4.6 и 25.19 соответственно; битумы – 3.2.

Тонкослойной хроматографией (ТСХ) на активированных стандартных пластинках Sululfol 20x20 см был выполнен количественный и качественный анализ ВРВ, ЛГВ и ФК.

Состав ФК (масс.% · 10² от ОМ сапропеля) следующий.

Аминокислоты: L-α-аланин (3.43), лейцин (182.52), фенилаланин (63.22), валин (3.75), глицин (18.93), аспарагин (18.35), аргинин (5.25), лизин (22.83), гистидин (40.72), аспарагиновая кислота (63.32), тирозин (40.93), цистеин (39.23), триптофан (1.85), глутамин (3.00), серин (4.21), изолейцин (36.83), глутаминовая кислота (243.95), треонин (183.85).

Сахара: Д-глюкоза (245.45), Д-галактоза (305.15), L-рамноза (83.63), арабиноза (40.75), лактоза (13.43), мальтоза (60.80), раффиноза (0.45).

Водорастворимые карбоновые кислоты: щавелевая (132.50), адипиновая (2.36), пимелиновая (12.75), винная (0.43), яблочная (6.12), салициловая (43.53), галловая (2.15), феруловая (1.93), ванилиновая (0.35), сиреневая (0.32), о-фталевая (0.36), терефталевая (0.30), бензойная (0.42), малоновая (12.35), метилянтарная (30.52).

Дальнейшему подробному изучению подвергались ГМК, выделенные в аппарате Сокслета кипячением ГК с 97.5%-ным этанолом до полного его обесцвечивания. Выход ГМК – 4.6 масс.% от ОБ сапропеля. Биологическая активность ГМК изучалась в отношении к различным микроорганизмам: кишечная палочка (*Escherichia coli*), стафилококк золотистый (*Staphylococcus aureus*), грибы рода кандиды (*Candida*), дифтерийная палочка (*Corynebacterium diphtheriae*).

Препараты ГМК приготавливались растворением навески в 0.5%-ном растворе гидроксида натрия, с доведением pH среды до 7.6. Ввиду того, что при стерилизации сред pH падает, ее устанавливают на 0.2-0.3 выше заданного конечного значения. Контроль pH осуществлялся на иономере pH 150M со стеклянным электродом; электрод сравнения ЭСКЛ-08М.1. Концентрация препаратов – 2 масс.%. Стерилизация ГМК и питательного агара проводилась в автоклаве ВК75 под давлением 0.5 атм; температура насыщенного пара в камере 112°C, упругость пара 1140.0 мм.рт.ст; продолжительность 30 мин.

Образцы ГМК в различных концентрациях вводились в состав питательных сред для выращивания микроорганизмов различных групп, в т.ч. и высокотребовательных, таких как дифтерийная палочка, для роста которой требуется высокое содержание аммонийного азота, глюкозы, нативного белка, что добывается введением в состав сред крови, сыворотки животных.

Оценка экспериментальных питательных сред с добавленными компонентами осуществлялась с помощью совокупности показателей:

- чувствительность среды (по числу колоний, выросших при минимальной посевной дозе;
- стабильность основных биологических свойств микроорганизмов (размер колоний, морфология клеток);
- эффективность, т.е. количественное увеличение числа клеток в жидкой экспериментальной питательной среде по сравнению с контролем.

Результаты и их обсуждение. Общая характеристика ГМК: средняя молекулярная масса 1357 дальтон; элементный состав (масс.% daf): С 65.2, Н 5.4, N 4.0, O+S 25.4; функциональный состав (мг-экв/г): хиноидные – 8.25, фенольные – 11.36, карбоксильные – 4.85, кетонные группы – 1.15, иодное число – 2.15; отношение Н/С_{ат} – 1.00; молекулярная формула C_{73.48}H_{73.48}N_{3.87}O₅S_{21.49}

В ИК-Фурье спектре ГМК идентифицированы полосы поглощения (п.п.) следующих структурных фрагментов (ν , см⁻¹):

- ароматические, преимущественно неконденсированные циклы (3100-300, дублет 1600-1500, 1235, 1459, серия п.п. в областях 1200-900 и 900-650, 3030-3020, 1175-1125, 1100-1-70); насыщенные циклы и алкильные цепи (2921, 2960, 2854, 1459, 1383, 725); фурановые гетероциклы (3165-3125, 1547, 1495, 1030-1015, 870, 802-740); интенсивные п.п. фенольных групп и спиртовых гидроксильных (3500-3300, 3630, 3615, 1200, 1410-1310), карбоксильных (2600, 1714-1700, 1300), метоксильных (2850-2830), хиноидных (1675, 1645); сложноэфирных и кетонных групп (1740-1735, 1175, 960); циклических ангидридов (1850-1835, 1785-1765), тропонов и трополонов (1653), аминогруппы и пиррольные циклы (широкая п.п. 3200, 3350-3300, 1680); пиридиновых, хинолиновых, изохинолиновых и пиперидиновых (3700-3379, 3480-3450, 1490, 1360-1260, 745), а также тиофеновых гетероциклов (3125-3040, 1520, 1050, 755-680, 840, 685), первичных и вторичных амидов (1665-1617, 1546-1520).

УФ/ВИС-спектр ГМК свидетельствует о присутствии в их составе ненасыщенных карбоновых кислот и их производных (220, 200), нафталиновых колец (210, 212, 220, 270, 240, 310), π -комплексов металлов с фенольными и хиноидными группами (450-445), каротиноидов, дикетонов, ненасыщенных кетонов (455-450, 495-480, 415), сопряженных пиррольных циклов типа порфиринов, хлорофиллов (450, 510, 545), ненасыщенных лактонов и сложных эфиров (200, 230-220, 240).

В ¹H ЯМР-спектре присутствует очень широкая п.п. ароматических протонов (от 8.5 до 6.3 м.д.), что обусловлено наличием в ГМК бензольных и нафталиновых колец, замещенных группами –COOH, –OR, ALR. Широкая п.п. в области (5.0-4.0 м.д.) отвечает за сигналы групп COOCH₂-, –OCH₃, –CH=CH-.

Согласно данным элементного, количественного функционального анализа, криоскопии, ИК-Фурье, УФ/ВИС и ¹H ЯМР-спектроскопии ГМК сапропеля имеют весьма сложный состав, включая неконденсированные ароматические, фурановые, пиррольные, тиофеновые гетероциклы с высоким вкладом алифатических заместителей, циклоалкановых фрагментов, функциональных групп.

Обобщение результатов биотестирования препаратов сапропелевых ГМК позволило установить усиление роста микроорганизмов энтеробактерий, стафилококка и дифтерийной палочки, что объясняется содержанием в их составе фенольных, карбоксильных и хиноидных групп, широкого набора биологически активных соединений, водорастворимых и легкогидролизуемых фракций. ФК сапропеля, обогащенные аминокислотами, сахарами и водорастворимыми карбоновыми кислотами проявляют ингибирующее действие на бактерии рода *Escherichia coli* и *Staphylococcus aureus*.

Результаты изучения биологической активности сапропелевых препаратов могут быть успешно использованы в конструировании питательных сред для диагностики инфекционных заболеваний.

Выводы:

1. Подробно изучен вещественный состав сапропеля г. Приморско-Ахтарск (Краснодарский край). Установлено, что органическое вещество сапропеля характеризуется широким набором биологически активных соединений.

2. Выполнено биологическое тестирование сапропелевых препаратов с использованием микроорганизмов *Escherichia coli*, *Shigella sonnei*, *S. freundi*, грамположительных кокков *Staphylococcus aureus*, грибов рода *Candida*, штамма *Corynebacterium diphtheriae gravis*, растущего в средах с добавлением нативного белка крови.

3. Установлено усиление роста микроорганизмов, что объясняется содержанием в составе сапропелевых препаратов фенольных, карбоксильных и хиноидных групп. Экстракты водорастворимых, легкогидролизуемых и фульвокислот, обогащенные аминокислотами, сахарами, водорастворимыми карбоновыми кислотами, обладают ингибирующим действием на бактерии *Escherichia coli* и *Staphylococcus aureus*.

Литература

1. Ларгина, И.Ф. Методы исследования торфяных и сапропелевых отложений. / И.Ф. Ларгина //Межвузовский сборник научных трудов. Тверской политехнический ин-т. – 1991. – 123с.
2. Бакшеев, В.Н. Сапропель: вчера, сегодня и завтра/ В.Н. Бакшеев – Тюмень. – 1998. – 80с.
3. Орлов, Д.С. Органическое вещество почв Российской Федерации./ Орлов, Д.С. - М.:Наука. – 1996. – С. 15–18.
4. Гонцов, А.А. Свойства различных сапропелей/ Гонцов А.А., Ложеницына В.И.//ХТТ. – 1984. - № 5. – С. 67–74.
5. Сенькевич, Л.П. Характеристика гуминовых кислот разновозрастных озерных сапропелей/ Л.П. Сенькевич, Б.В. Курзо, С.В. Пармон, С.Г. Прохоров //ХТТ. – 1995. - № 1. – С. 3–8.
6. Юдина, Н.В. Оценка биологической активности гуминовых кислот торфа / Н.В. Юдина, Писарева С.И., А.С. Саратиков //ХТТ. – 1996. - № 5. – С.31–34.
7. Юдина, Н.В. Параметры оценки биологической активности органического вещества сапропелей/ Н.В. Юдина, С.И. Писарева, А.С. Саратиков // Химия растительного сырья. – 1998. – № 4. – С.29–32.
8. Наумова, Г.В. Связь молекулярной структуры гуминовых кислот и их биологической активности/ Г.В. Наумова, В.П. Стригуцкий, Н.А. Жмаков, Т.Ф. Овчинникова //ХТТ. – 2001. – № 2. – С.3–13.
9. Шишков, В.Ф. Природа сигналов ЭПР в гуминовых кислот / В.Ф. Шишков, О.П. Рандин, Л.П. Петухов //ХТТ. – 1985. – № 4. – С.38–40.
10. Горбуновская, О.М. Новые методические подходы к анализу вещественного состава сапропелей/ О.М. Горбуновская, В.Б. Курзо, Т.К. Будай //ХТТ. – 2001. – № 2. – С.73–81.