



**ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ,
ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21), (22) Заявка: **2005133311/15, 28.10.2005**

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
28.10.2005

(45) Опубликовано: **27.05.2007 Бюл. № 15**

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: **ЮДИНА Н.В. И ДР. "Оценка биологической активности гуминовых кислот торфов", Химия твердого топлива, 1996, №5, с.31-34. RU 2094042 C1, 27.10.1997. SU 614782 A1, 15.07.1978. RU 2106091 C1, 10.03.1998. DE 4129874 A1, 24.09.1992.**

Адрес для переписки:
634050, г.Томск, а/я 787, Л.И. Инишевой

(72) Автор(ы):

**Инишева Лидия Ивановна (RU),
Гостищева Мария Владимировна (RU),
Тухватулин Равиль Талибулович (RU)**

(73) Патентообладатель(и):

**ГОУ ВПО Томский Государственный
Педагогический Университет (ГОУ ВПО ТГПУ)
(RU)**

(54) СПОСОБ ОПРЕДЕЛЕНИЯ БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ГУМИНОВЫХ КИСЛОТ ТОРФОВ

(57) Реферат:

Изобретение относится к области определения биологической активности гуминовых кислот торфов, которые могут применяться в различных областях техники, в том числе в медицине и ветеринарии. Согласно способу определения щелочную или пирофосфатную вытяжку гуминовых кислот торфов добавляют в исследуемую пробу крови в соотношении 6-10:1, затем проводят фотометрическое определение оптической плотности смеси крови с гуминовыми кислотами торфа при воздействии механическими колебаниями в звуковом диапазоне частот от 20 Гц до 20 кГц и амплитудой от 0,1 до 1,0 мкм, создаваемыми пьезоэлементом, по изменению оптической плотности исследуемой пробы определяют показатели обратимой агрегации эритроцитов, на основании которых рассчитывают индекс агрегации $I = U_d / \tau$ и интегральный коэффициент агрегации $K = U_o \cdot U_d \cdot A / \tau$, и судят о

биологической активности гуминовых кислот по величине рассчитанного индекса агрегации I и интегрального коэффициента агрегации K по сравнению с контролем. Технический результат: способ не предполагает сложных манипуляций в подготовке пробы, одно измерение занимает 7-10 минут, определение проводится в микрообъемах крови, 1 мл крови достаточно для выполнения более 20 измерений, носит информативный характер, что позволяет использовать его в качестве методики тестирования биологической активности гуминовых кислот. 1 ил., 1 табл.





FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY,
PATENTS AND TRADEMARKS

(12) ABSTRACT OF INVENTION(21), (22) Application: **2005133311/15, 28.10.2005**(24) Effective date for property rights: **28.10.2005**(45) Date of publication: **27.05.2007 Bull. 15**

Mail address:

634050, g.Tomsk, a/ja 787, L.I. Inishevoj

(72) Inventor(s):

**Inisheva Lidija Ivanovna (RU),
Gostishcheva Marija Vladimirovna (RU),
Tukhvatulin Ravil' Talibulovich (RU)**

(73) Proprietor(s):

**GOU VPO Tomskij Gosudarstvennyj
Pedagogicheskij Universitet (GOU VPO TGPU)
(RU)**

(54) METHOD FOR DETERMINATION OF BIOLOGICAL ACTIVITY OF PEAT HUMIC ACIDS

(57) Abstract:

FIELD: invention relates to a method for determination of biological activity of peat humic acids that can be used in different branches of technique, medicine and veterinary science.

SUBSTANCE: method involves addition of alkaline of pyrophosphate extract of peat humic acids to blood sample to be analyzed in the ratio = (6-10):1. Then photometric determination of optical density of a mixture of blood with peat humic acids is carried out under effect of mechanical oscillation in the sound range of frequencies from 20 Hz to 20 kHz and the amplitude value from 0.1 to 1.0 mcm generated by piezoelectric element. Based on change of the optical density value of analyzed sample indices of reversible aggregation of erythrocytes are determined that are used for calculation of the aggregation index $I = Ud/\tau$, and biological activity of humic acids are determined by value of the aggregation calculated index I and integral

aggregation index K as compared with control value. Proposed method excludes complex procedures associated with preparing a sample for analysis. One measurement requires 7-10 min, and determination is carried out using blood microvolumes, for example, 1 ml of blood is sufficient for carrying out above 20 measurements. Method shows informative feature that allows its using as a procedure for testing biological activity of humic acids.

EFFECT: improved method for determination of activity.



Изобретение относится к способу определения биологической активности гуминовых кислот торфов, которые могут применяться в различных областях техники, в том числе в медицине и ветеринарии.

В настоящее время не известны способы определения биологической активности гуминовых кислот торфов, которые учитывали бы их влияние на обратимую агрегацию эритроцитов с тем, чтобы в дальнейшем иметь возможность отбирать торфа с наиболее активными гуминовыми кислотами с целью применения их в медицине и ветеринарии.

Известен способ оценки биологической активности гуминовых кислот торфов, взятый за прототип /1/. Выделенные из торфа и высушенные гуминовые кислоты растворяют в диметилсульфоксиде (ДМСО), добавляют кумол в соотношении ДМСО: кумол, 1:9 (общий объем растворителей равен 10 мл), и в полученный раствор вносят инициатор - азобисизобутиронитрил. Смесь окисляется при 60°C. Количество поглощенного кислорода регистрируется вольтамперометрически. Определяют кинетические параметры: C (содержание антиоксидантов) и W (конечная скорость окисления), которые несут информацию об ингибирующих и иницирующих свойствах гуминовых кислот торфов. Содержание антиоксидантов (биологическую активность) в гуминовых кислотах торфов определяют, используя соотношение: $C = W_i \tau / P$, моль/кг, где W_i - скорость иницирования, $6,8 \cdot 10^{-8}$ моль/л·с; τ - период индукции, с; P - концентрация анализируемой пробы, кг/л (чем выше значение C , моль/кг, тем больше антиоксидантов содержится в гуминовых кислотах торфов). Конечная скорость окисления определяется по тангенсу угла наклона кинетической кривой в неингибированном режиме (чем выше показатель W , мм³/мин, тем выше окислительный потенциал гуминовых кислот торфов, тем выше антиоксидантная (биологическая) активность).

Недостатком способа является то, что требуется длительная пробоподготовка: так как гуминовые кислоты торфов нерастворимы в кумоле, их необходимо предварительно растворить в диметилсульфоксиде (ДМСО). Используемые реактивы являются токсичными для человека веществами. Данный метод относится в большей степени к способам определения химических свойств гуминовых кислот и не учитывает влияния на физиологические (биологические) процессы, происходящие в живой клетке, то есть не позволяет достоверно определить биологическую активность гуминовых кислот торфов.

Целью изобретения является устранение вышеописанных недостатков: возможность проведения анализа непосредственно на биологическом материале (на клетке животного происхождения - на клетке крови) и учет влияния гуминовых кислот торфа на физиологические (биологические) процессы, происходящие в живой клетке. А также упрощение способа определения биологической активности гуминовых кислот торфов, уменьшение трудоемкости за счет сокращения количества совершаемых манипуляций, себестоимости метода за счет сокращения затрат на реактивы и времени определения биологической активности. Исключить работу с опасными, токсичными для организма человека химическими реагентами.

Поставленная цель достигается определением биологической активности гуминовых кислот торфов способом, заключающимся в том, что выделенные из торфа гуминовые кислоты определяют механооптическим методом, причем в кровь добавляют раствор гуминовых кислот торфа в соотношении 6-10:1 и в образующейся смеси фотометрическим методом определяют изменение оптической плотности при воздействии механическими колебаниями в звуковом диапазоне частот от 20 Гц до 20 кГц и амплитудой от 0,1 до 1,0 мкм, создаваемыми пьезоэлементом, по которой судят о биологической активности гуминовых кислот.

Новым в заявляемом изобретении является то, что берут смесь крови с гуминовыми кислотами торфа и применяют фотометрическое определение смеси, что позволяет определить характер и степень влияния гуминовых кислот торфа на их биологическую активность (величину, которую определяли). Условие проведения определения биологической активности на животной клетке (клетке крови) очень важно для целей медицины и ветеринарии. Между тем, в способе, взятом за прототип, биологическая

активность отождествляется с ингибирующими и иницирующими свойствами гуминовых кислот, т.е. не их влиянием на биологические процессы, а способностью гуминовых кислот поглощать кислород. Данный метод относится в большей степени к способам изучения химических свойств гуминовых кислот и показывает, что наличие

- 5 функциональных групп и парамагнитных центров свидетельствуют о том, что гуминовые кислоты могут играть роль «ловушки» для активного радикала, в результате происходит образование нейтральной молекулы и радикала менее активного (ингибирование), либо наоборот, образуется нейтральная молекула и новый более активный радикал, который и иницирует радикальный процесс (иницирование). Также заявляемый способ отличается
- 10 более простой схемой определения. Одно измерение, включая подготовку пробы и промывку кюветы, занимает в среднем 7-10 минут, точная навеска гуминовых кислот торфов растворяется в экстрагенте, которым была получена вытяжка из торфа. Дополнительные манипуляций, связанных с нагреванием или добавлением различных химических веществ, не требуется. Анализ проводится в микрообъемах крови, 1 мл крови
- 15 достаточно для выполнения более 20 измерений.

- Количественные соотношения обосновываются тем, что в анализируемой смеси - кровь: раствор гуминовых кислот торфа брать ниже соотношения 6:1 нецелесообразно, так как это может привести к сильному разбавлению крови и кривая измерения будет иметь нечеткий вид, точно так же как в соотношении более чем 10:1, в этом случае сильному
- 20 разбавлению подвергается раствор гуминовых кислот торфа. Воздействий механическими колебаниями с частотой менее 20 Гц не хватает для разрушения агрегатов эритроцитов, более 20 кГц - приводит к разрушению самих эритроцитов и отсутствует возможность контроля агрегационных и дезагрегационных процессов. При амплитуде воздействия менее 0,1 и более 1,0 мкм кривая измерения будет носить не информативный характер, и ее
- 25 расшифровка будет затруднена.

- Пример 1. Контрольный опыт - объектом является экстрагент - 0,1 н. раствор гидроксида натрия, который служит в способе контролем, относительно которого считаются определяемые значения щелочной вытяжки гуминовых кислот торфов. В исследуемую пробу крови, обработанную антикоагулянтом добавляют раствор гуминовых
- 30 кислот торфа в соотношении 8:1, перемешивают и помещают в герметичную камеру и воздействуют механическими колебаниями заданной частоты и амплитудой от 0,1 до 1,0 мкм, создаваемыми пьезоэлементом. Изменение оптической плотности исследуемой пробы крови, связанные с обратимой агрегацией эритроцитов, преобразуются в электрический сигнал фотоэлементом, усиливаются усилителем и регистрируются на бумажную ленту
- 35 самописцем. Степень дезагрегации контролируется в процессе перемешивания с помощью фотометрии и микроскопирования. Определяются показатели обратимой агрегации эритроцитов, характеризующие: U_0 - минимальную механическую прочность агрегатов эритроцитов (В); U_d - максимальную механическую прочность агрегатов эритроцитов (В); τ - полупериод спонтанной агрегации эритроцитов (с) и A - амплитуду фотометрического
- 40 сигнала, характеризующую количество эритроцитов, участвующих в процессе обратимой агрегации эритроцитов (мм). На основании измеренных значений показателей обратимой агрегации эритроцитов расчетным путем определяются индекс агрегации - $I = U_d/\tau$, характеризующий соотношение агрегационных и дезагрегационных процессов и интегральный коэффициент агрегации - $K = U_0 \cdot U_d \cdot A/\tau$. О биологической активности
- 45 гуминовых кислот торфов судят по величине рассчитанных показателей обратимой агрегации эритроцитов (чем больше процент отличия значений K и I гуминовых кислот торфов от значений K и I контроля, тем больше биологическая активность гуминовых кислот торфов) (таблица 1).

- Пример 2. Объектом определения биологической активности являются гуминовые
- 50 кислоты, полученные после обработки низинного древесно-травяного торфа месторождения «Темное» Томской области 0,1 н раствором гидроксида натрия (щелочная вытяжка гуминовых кислот торфа). Концентрация сухих гуминовых кислот в растворе 0,1 н гидроксида натрия составляет 0,001 г/100 мл. Определение проводится как в примере 1.

В сравнении с контролем наблюдается увеличение прочности агрегатов эритроцитов (Ud) в 1,57 раза, уменьшение полупериода спонтанной агрегации эритроцитов (τ) и количества участвующих в агрегации эритроцитов (A), в результате чего коэффициент агрегации (K) и индекс агрегации (I) увеличились в 2,08 и 2,12 раза соответственно.

5 Это говорит о биологической активности гуминовых кислот торфов, способных более чем в 2 раза увеличивать интенсивность агрегации эритроцитов (известный препарат викасол, применяемый в медицине для повышения вязкости крови, вызывает увеличение агрегации эритроцитов в 1,25-1,52 раза (см. таблицу 1 и чертеж).

Пример 3. Объектом определения биологической активности являются гуминовые
10 кислоты как в примере 2. Концентрация сухих гуминовых кислот в растворе 0,1 н гидроксида натрия составляет 0,01 г/100 мл. Определение проводится как в примере 1.

Наблюдается увеличение прочности агрегатов эритроцитов (Ud) в 1,27 раза, уменьшение полупериода спонтанной агрегации эритроцитов (τ) и количества участвующих в агрегации эритроцитов (A), в результате чего коэффициент агрегации (K)
15 и индекс агрегации (I) по сравнению с контролем увеличились в 1,10 1,41 раза соответственно. Это говорит о биологической активности гуминовых кислот торфов, способных в 1,1-1,4 раза увеличивать интенсивность агрегации эритроцитов.

Пример 4. Объектом определения биологической активности являются гуминовые
20 кислоты как в примере 2. Концентрация сухих гуминовых кислот в растворе 0,1 н гидроксида натрия составляет 0,1 г/100 мл. Определение проводится как в примере 1.

В сравнении с контролем наблюдается увеличение прочности агрегатов эритроцитов (Ud) в 1,66 раза, уменьшение полупериода спонтанной агрегации эритроцитов (τ) и количества участвующих в агрегации эритроцитов (A), в результате чего коэффициент агрегации (K) и индекс агрегации (I) увеличились в 2,31 и 2,26 раза соответственно.
25 Это говорит о биологической активности гуминовых кислот торфов, способных более чем в 2 раза увеличивать интенсивность агрегации эритроцитов (известный препарат викасол, применяемый в медицине для повышения вязкости крови, вызывает увеличение агрегации эритроцитов в 1,25-1,52 раза (таблица 1, чертеж). А также о том, что эффект биологической активности растворов 0,001% и 0,1% концентраций на 97-121% (по
30 коэффициенту агрегации) и на 70-85% (по индексу агрегации) выше, чем эффект 0,01% концентрации гуминовых кислот торфа. Таким образом, наблюдается зависимость «доза - эффект» гуминовых кислот торфов.

Остальные примеры по определению биологической активности гуминовых кислот торфов и препаратов сравнения - викасола и трентала в соотношениях 8:1 приведены в
35 таблице 1 на чертеже. В таблице 1 также приведены примеры определения биологической активности гуминовых кислот торфа в соотношениях кровь: раствор гуминовых кислот торфа - 6:1 и 10:1.

Таблица 1						
Показатели обратимой агрегации эритроцитов щелочной и пирофосфатной вытяжек гуминовых кислот низинного древесно-травяного и переходного осокового торфов различных месторождений Томской области (% к контролю)						
показатели объекты	U ₀ , В	U _г , В	A, мм	τ , сек	K	I
Контроль - 0,1 н NaOH, 0,1 н Na ₄ P ₂ O ₇ , вода	100	100	100	100	100	100
ЩЕЛОЧНАЯ ВЫТЯЖКА (соотношение кровь: раствор гуминовых кислот 8:1)						
Гуминовые кислоты низинного древесно-травяного торфа месторождения «Темное»						
0,001%	105,0	157,1	93,9	74,7	208,2	212,2
0,01%	91,9	127,1	85,4	90,0	110,5	141,5
0,1%	108,1	166,1	94,6	73,5	231,5	226,8
Гуминовые кислоты переходного осокового торфа месторождения «Васюганское»						
0,001%	83,5	182,5	104,8	95,0	168,3	193,3
0,01%	72,4	113,5	92,7	115,6	66,1	97,8
0,1%	91,2	167,9	106,7	96,9	168,4	173,3
ПИРОФОСФАТНАЯ ВЫТЯЖКА (соотношение кровь: раствор гуминовых кислот - 8:1)						
Гуминовые кислоты низинного древесно-травяного торфа месторождения «Темное»						
0,001%	84,3	67,9	57,6	100,0	33,1	68,0
0,01%	127,1	101,1	102,7	84,2	157,0	120,0

	0,1%	114,3	90,3	101,4	89,5	117,0	102,0
	Гуминовые кислоты переходного осокового торфа месторождения «Васюганское»						
	0,001%	94,3	81,4	60,3	105,3	43,9	78,0
	0,01%	132,1	123,2	108,1	92,1	191,0	134,0
	0,1%	117,9	97,4	105,9	95,8	127,1	102,0
5	Щелочная вытяжка гуминовых кислот переходного осокового торфа в соотношении кровь: раствор гуминовых кислот - 6:1						
	0,001%	93,5	102,3	99,7	98,1	100,4	104,3
	0,01%	90,6	100,9	97,7	99,4	97,3	101,5
	0,1%	94,3	101,5	100,2	98,6	98,5	102,9
	Щелочная вытяжка гуминовых кислот переходного осокового торфа в соотношении кровь: раствор гуминовых кислот - 10:1						
10	0,001%	107,9	116,7	114,1	102,5	110,0	114,1
	0,01%	106,2	116,5	113,3	105,0	115,5	111,4
	0,1%	108,9	116,1	114,8	103,2	117,2	112,8
	ПРЕПАРАТЫ СРАВНЕНИЯ (% к контролю - вода)						
	Викасол	118,1	165,1	69,3	107,8	125,2	152,2
	Трентал	126,5	91,7	80,1	95,8	96,5	94,6

Таким образом, заявляемое изобретение по сравнению с известными аналогами позволяет получить данные по влиянию гуминовых кислот на биологическую активность. Гуминовые кислоты различных торфов различаются между собой по величине биологической активности. Так, биологическая активность гуминовых кислот щелочной вытяжки низинного древесно-травяного торфа месторождения «Темное» в 1,09-1,45 раз выше биологической активности гуминовых кислот щелочной вытяжки переходного осокового торфа месторождения «Васюганское». А биологическая активность гуминовых кислот пирофосфатной вытяжки наоборот выше у переходного осокового торфа в 1,12-1,14 раз, чем биологическая активность низинного древесно-травяного торфа. Предлагаемое соотношение в смеси кровь: гуминовые кислоты торфа (6-10:1) являются оптимальными и позволяют получить наиболее информативный результат о биологической активности гуминовых кислот торфов (таблица 1).

Предлагаемый способ не предполагает сложных манипуляций в подготовке пробы, одно измерение занимает 7-10 минут, носит информативный характер и может быть использован в качестве методики тестирования биологической активности гуминовых препаратов на уровне установления стандартной для биологических препаратов зависимости «доза-эффект», учитывая весьма существенную полифункциональность гуминовых препаратов. Из чертежа видно, у каждой из вытяжек имеются наиболее активные концентрации по сравнению с другими и достоверные отличия от контроля.

Источники информации

1. Юдина Н.В., Писарева С.И., Саратиков А.С. Оценка биологической активности гуминовых кислот торфов // Химия твердого топлива. - 1996. - №5 - с.31-34.

Формула изобретения

Способ определения биологической активности гуминовых кислот торфов, заключающийся в том, что выделенные из торфа гуминовые кислоты анализируют электрофизическим методом анализа, отличающийся тем, что используют щелочную или пирофосфатную вытяжку гуминовых кислот торфов, которую добавляют в исследуемую пробу крови в соотношении 6-10:1, затем проводят фотометрическое определение оптической плотности смеси крови с гуминовыми кислотами торфа при воздействии механическими колебаниями в звуковом диапазоне частот от 20 Гц до 20 кГц и амплитудой от 0,1 до 1,0 мкм, создаваемыми пьезоэлементом, по изменению оптической плотности исследуемой пробы определяют показатели обратимой агрегации эритроцитов, такие, как U_0 - минимальная механическая прочность агрегатов эритроцитов (В); U_d - максимальная механическая прочность агрегатов эритроцитов (В); τ - полупериод спонтанной агрегации эритроцитов (с); A - амплитуда фотометрического сигнала, характеризующая количество эритроцитов, участвующих в процессе обратимой агрегации эритроцитов (мм), на основании которых рассчитывают индекс агрегации $I = U_d / \tau$ и интегральный коэффициент агрегации $K = U_0 \cdot U_d \cdot A / \tau$ и судят о биологической активности гуминовых кислот по величине

рассчитанного индекса агрегации I и интегрального коэффициента агрегации K по сравнению с контролем.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50