

УДК 631.41:631.417

## АНТИОКСИДАНТНАЯ АКТИВНОСТЬ ВЫСОКОМОЛЕКУЛЯРНЫХ СОЕДИНЕНИЙ ГУМИНОВОЙ ПРИРОДЫ

© *М.В. Зыкова<sup>1\*</sup>, Л.А. Логвинова<sup>1</sup>, С.В. Кривошеков<sup>1,2</sup>, О.А. Воронова<sup>2</sup>, Т.В. Ласукова<sup>3,4</sup>, К.А. Братишко<sup>1</sup>, Г.А. Жолобова<sup>1</sup>, О.А. Голубина<sup>1</sup>, И.А. Передерина<sup>1</sup>, Л.А. Дрыгунова<sup>1</sup>, Е.Н. Тверякова<sup>1</sup>, М.В. Белоусов<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>*Сибирский государственный медицинский университет Минздрава России, Московский тракт, 2, Томск, 634050 (Россия), e-mail: gmv2@rambler.ru*

<sup>2</sup>*Национальный исследовательский Томский политехнический университет, пр. Ленина, 30, Томск, 634050 (Россия)*

<sup>3</sup>*Томский государственный педагогический университет, ул. Киевская, 60А, Томск, 634061, (Россия)*

<sup>4</sup>*Научно-исследовательский институт кардиологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр РАН, ул. Киевская, 111А, Томск, 634061 (Россия)*

Проведено исследование антиоксидантной (АО) активности гуминовых кислот (ГК) торфа в зависимости от их этиологии и способа получения, методами колориметрии со стабильным радикалом дифенилпикрилгидразилом (ДФПГ), катодной вольтамперометрии, ЭПР-спектроскопии. Гуминовые кислоты получали двумя экстрагентами (натрий гидроксидом и натрий пирофосфатом) из девяти репрезентативных видов торфа Томской области, различных по ботаническому составу, степени разложения и зольности. Установлено, что все 18 образцов ГК проявляют АО активность в различной степени. Наиболее высокая активность отмечена для ГК, полученных пирофосфатной экстракцией, по сравнению со щелочной, в пределах одного вида торфа, что свидетельствует о влиянии способа получения на АО активность. Методами катодной вольтамперометрии и колориметрии с ДФПГ установлено, что механизм АО активности ГК обусловлен наличием легкоподвижных атомов водорода фенольных гидроксидов, нейтрализующих свободные радикалы, а также способностью хиноидных группировок в структуре ГК инициировать процесс электровосстановления кислорода. Еще одним механизмом АО активности ГК по результатам ЭПР-спектроскопии является их способность выступать в качестве ловушек свободных радикалов – для всех ГК характерен g-фактор спектроскопического расщепления, как у свободного радикала семихинонного типа. Установлено, что большей АО активностью обладают ГК, полученные натрий пирофосфатом из двух низинных (травяного и травяно-мохового) и верхового фускум торфа, что объясняется разными химическими параметрами структуры ГК, зависящими от содержания фенольных групп.

*Ключевые слова:* антиоксиданты, свободные радикалы, гуминовые кислоты, торф, колориметрия, дифенилпикрилгидразил, спектроскопия, вольтамперометрия.

*Работа выполнена при финансовой поддержке ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России (гос. задание №056-00093-18-00 от 26/12/2017).*

### Введение

*Зыкова Мария Владимировна* – заведующая кафедрой химии, младший научный сотрудник лаборатории инновационных фармацевтических технологий ЦНИЛ СибГМУ, кандидат фармацевтических наук, доцент, e-mail: gmv2@rambler.ru

*Логвинова Людмила Анатольевна* – аспирант кафедры фармацевтического анализа, e-mail: ludmila\_logvinova@mail.ru

*Окончание на С. 240*

Существование живых организмов ассоциировано с поглощением и утилизацией молекулярного кислорода в дыхательной цепи митохондрий [1, 2], который является ингерентным звеном метаболических превращений веществ. В ходе последовательного присоединения к его молекулярной триплетной форме одного электрона образуется пул интермедиатов – супероксид-анион-

\* Автор, с которым следует вести переписку.

радикал, гидропероксид, пероксид водорода и гидроксильный радикал – объединенных общим понятием – активные формы кислорода (АФК). С одной стороны, они являются триггерами многих физиологических процессов, таких как передача внутриклеточного сигнала, образование биологически активных веществ, энергетическое и пластическое обеспечение клеток, защитная функция в борьбе с бактериальными частицами. С другой стороны, в условиях экспоненциального роста их концентрации, мишенями их действия на клеточном уровне становятся такие эссенциальные вещества, как липиды и углеводные компоненты плазмалеммы и цитоплазматических мембран, белки, нуклеиновые кислоты цитозоля и кариоплазмы. Итогом такого воздействия является химическая модификация и разрушение биомолекул, а нарушение «тонкого» баланса между синтезом и утилизацией АФК приводит к состоянию, характеризующемуся как «окислительный стресс» [1, 2]. Для фармакологической коррекции причин и последствий окислительного стресса широко применяются природные и синтетические антиоксиданты (АО) как прямого (направленного), так и косвенного (опосредованного) действия.

На сегодняшний день отсутствует единая классификация АО. По растворимости они распределены на 2 группы: липофильные и гидрофильные. По другой систематизации, основанной на конкретных мишенях действия, АО составляют группы веществ, воздействующих на АФК, нерадикальные инициаторы свободно-радикального окисления (СРО) и т.д. Для облегченного скрининга веществ, обладающих АО активностью, универсальной является классификация, основанная на их химическом строении, согласно которой все АО делят на 5 основных категорий: доноры протона, полиены, катализаторы, ловушки радикалов и комплексообразователи [3, 4]. Первую группу АО – доноров протонов составляют вещества, имеющие легкоподвижный атом водорода и нейтрализующие свободные радикалы по реакции:  $AH + X\bullet \rightarrow A\bullet$ , где  $AH$  – это АО с подвижным атомом водорода, а  $X\bullet$  – это радикальный инициатор или промежуточный радикальный продукт СРО. Механизм их АО действия заключается в восстановлении образовавшихся в ходе ПОЛ перокси- ( $ROO^*$ ) и алкокси-радикалов ( $RO^*$ ). Второй группой АО являются полиены, содержащие в структуре несколько кратных связей, при их поступлении в среду они становятся субстратами окисления АФК, тем самым предотвращая повреждение биомолекул. Третья группа АО – комплексообразователи, механизм действия которых заключается в связывании катионов металлов, провоцирующих образование АФК и альтерацию биомолекул. Четвертая группа АО – катализаторы (или «имитаторы ферментов») повышают активность эндогенных АО

*Кривошеков Сергей Владимирович* – младший научный сотрудник лаборатории инновационных фармацевтических технологий ЦНИЛ СибГМУ, инженер кафедры технологии органических веществ и полимерных материалов НИ ТПУ, e-mail: ksv\_tsu@mail.ru

*Воронова Олеся Александровна* – доцент кафедры физической и аналитической химии, кандидат химических наук, e-mail: oaa@tpu.ru

*Ласукова Татьяна Викторовна* – профессор кафедры медико-биологических дисциплин ТГПУ, старший научный сотрудник лаборатории экспериментальной кардиологии НИИ Кардиологии, доктор биологических наук, профессор, e-mail: tlasukova@mail.ru

*Братишко Кристина Александровна* – студент, e-mail: kr-1295@mail.ru

*Жолобова Галина Александровна* – доцент кафедры химии, кандидат химических наук, доцент, e-mail: zholobovagalina@mail.ru

*Голубина Ольга Александровна* – доцент кафедры химии, кандидат химических наук, e-mail: mtgolubin@yandex.ru

*Передерина Ирина Александровна* – доцент кафедры химии, кандидат химических наук, доцент, e-mail: perederina.irina@yandex.ru

*Дрыгунова Лариса Александровна* – доцент кафедры фармацевтического анализа, доцент кафедры химии, кандидат химических наук, e-mail: l\_drygunova@mail.ru

*Тверякова Елена Никитична* – доцент кафедры химии, кандидат химических наук, доцент, e-mail: e.tveryakova@mail.ru

*Белоусов Михаил Валерьевич* – заведующий кафедрой фармацевтического анализа, доктор фармацевтических наук, e-mail: mvb63@mail.ru

систем (глутатионпероксидазы и супероксиддисмутаза, катализирующих диспропорционирование супероксид-анион-радикала и превращение органических гидропероксидов и перекиси водорода в инертные гидрокси-соединения), для проявления каталитической активности им необходимо облигатное присутствие в системе глутатиона или витамина С. Пятая группа АО – ловушки радикалов, их мишенью являются энергетические станции клетки (митохондрии), они способны избирательно накапливаться в матриксе митохондрий, эффективно восстанавливаются ферментами дыхательной цепи, таким образом, препятствуя утечке электронов с внутренней мембраны данной органеллы в цитозоль, где последние участвуют в инициации присоединения электрона к кислороду [3, 4].

Существует большое количество методов исследования АО активности [5], различающихся типом источника окисления и окисляемого соединения, а также способом измерения окисленного соединения: спектроскопические и фотометрические (электронный парамагнитный резонанс, колориметрия и др.), электрохимические (вольтамперометрия с применением различных электродов), флуориметрические, хемилюминисцентные, во-

люмометрические и специфические биологические тесты (оценка активности антиоксидантных ферментов и малонового диальдегида). В основе большинства методов лежит модельная реакция окисления исследуемого вещества, протекающая по свободнорадикальному механизму, с последующей детекцией влияния исследуемого вещества на ее протекание. Кинетика реакции контролируется либо измерением объема поглощения кислорода, либо измерением характеристик реакционной смеси по поглощению электромагнитного излучения, флуоресценции, люминисценции и т.д. В некоторых методах создают условия для генерирования свободных радикалов с постоянной скоростью (добавлением инициаторов), либо с химической генерацией радикалов (как контролируемого химического процесса) [5]. При этом АО прямого действия способны обнаруживать свою активность как в условиях *in vivo*, так и в условиях *in vitro* (в отличие от АО опосредованного действия, для определения которых подходят только биологические системы). С целью наиболее корректной интерпретации результатов рекомендуется [5] использовать параллельно сразу несколько методов оценки АО веществ в эксперименте.

Поиск новых веществ, обладающих АО активностью, является актуальным направлением доклинических и клинических исследований, поскольку благодаря им в организме сохраняется целостность и активность молекулярных ансамблей липидов и протеинов, ферментативная активность белков, наследственный аппарат, а их цитопротекторное действие обуславливает проявление многих фармакологических эффектов: кардио- и гепатопротекторного действия, адаптогенной, антисклеротической, противодиабетической, противораковой активности, также АО влияют на нейродегенеративные процессы и процессы старения. Поэтому оценка АО действия любой активной фармацевтической субстанции, как одного из ведущих механизмов в реализации многих видов биологической активности, должна являться неотъемлемой частью каждого фармакологического исследования.

Наиболее перспективными источниками АО считают растительные объекты [5]. К числу таких перспективных лекарственных кандидатов растительного происхождения с АО активностью относятся высокомолекулярные соединения каустобиолитов, в частности, гуминовые кислоты (ГК) торфа. Гуминовые кислоты – это природные высокомолекулярные амфифильные амфотерные органические азотсодержащие рандомизованные редокс-гетерополимеры арилгликопротеидной природы, характеризующиеся коллоидными свойствами и отсутствием строгого постоянства химического состава и разной молекулярной массой, это полифункциональные полиамфолиты, представляющие собой кислотно-основной комплекс с выраженными восстановительными свойствами [6]. При получении гуминовых препаратов весьма важным фактором является этиологическая характеристика сырьевого источника ГК и способа их экстракции, поскольку в литературе имеются достаточно многочисленные примеры того, что ГК как биологически активные соединения, при их специфической обработке, в каждом конкретном случае, могут быть источниками новых разнообразных биологически активных веществ [7]. Так, известно [8, 9], что высокие значения рН экстрагентов (особенно в присутствии кислорода воздуха), использование различных окислителей (концентрированных кислот, перекиси водорода), а также продолжительный гидролиз при высокой температуре способствуют как искусственной гумификации оставшихся растительных тканей торфов, так и окислительно-гидролитической деструкции извлекаемых ГК, что приводит к существенному искажению их молекулярной структуры, поскольку наряду с процессами деструкции еще протекает процесс сшивки молекул. В результате получают препараты, имеющие большую молекулярную массу, чем исходные ГК, несмотря на то, что при гидролизе отщепляется периферическая часть молекул, возрастает содержание углерода, а количество водорода и азота убывает, изменяется содержание функциональных групп. Поэтому с целью более корректной интерпретации результатов исследования и возможностью проводить мероприятия по стандартизации препаратов ГК необходимо использовать методы экстракции, позволяющие получать ГК максимально нативной структуры, близкой к их естественной этиологии, и не приводящих к химической модификации молекулы. К тому же процессы разрушения нативной структуры ГК в совокупности с искусственной гумификацией приводят к образованию новых веществ неясного строения, среди которых обнаружены полициклические ароматические углеводороды, некоторые из которых являются сильнейшими канцерогенами (3,4-бензфлуорантен, 10,11-бензфлуорантен, 3,4-бензпирен, 1,12-бензантрацен и др.), что делает такие ГК не пригодными для получения медицинских и ветеринарных препаратов [10].

Таким образом, целью настоящего исследования является изучение АО активности высокомолекулярных соединений гуминовой природы (ГК торфа) физико-химическими методами в зависимости от их этиологии и способа получения, с последующей постановкой гипотезы о возможной классификационной категории АО действия ГК торфа.

### Экспериментальная часть

Экстракцию ГК из торфа проводили двумя экстрагентами: натрий гидроксидом (далее – ГКц) и натрий пирофосфатом (далее – ГКл) способом, описанным ранее [10]. Всего в исследовании задействовано 18 образцов ГК, полученных из 9 репрезентативных видов торфа с крупных торфяных месторождений Томской области – олиготрофного болота Бакчарского болотного массива юго-восточных отрогов Васюганского болота в междуречье Икса и Бакчар (образцы 1–4, 6, 7, 9) и эвтрофных болот Клюквенное и Таган (образцы 5 и 8 соответственно). Количественное содержание ГК в торфе определяли гравиметрическим методом. Этиологическая характеристика объектов исследования представлена в таблице 1.

Антиоксидантную активность ГК оценивали физико-химическими методами анализа: колориметрией со стабильным радикалом дифенилпикрилгидразилом (ДФПГ), катодной вольтамперометрией, спектроскопией электронного парамагнитного резонанса (ЭПР). Колориметрическую оценку антирадикальной активности (АРА) ГК во времени проводили на спектрофотометре Unicо 2800 ( $\lambda=520$  нм) по реакции взаимодействия со свободным стабильным радикалом ДФПГ. Уменьшение величины оптической плотности указывает на радикал-связывающую активность ГК, которую можно оценить по интенсивности взаимодействия ДФПГ с веществом и представить в (%), что и является характеристикой АРА [11–13]. В качестве препарата сравнения использовали дигидрохверцетин. Результаты представлены в виде кинетических кривых гибели радикалов ДФПГ в реакциях с ГК и дигидрохверцетином. Электрохимическую оценку АО активности ГК проводили методом катодной вольтамперометрии по методике, описанной в работе [14] на анализаторе «АОА» (Томск) с использованием ртутного пленочного электрода. В качестве препаратов сравнения использовали дигидрохверцетин и аскорбиновую кислоту. Регистрацию ЭПР-спектров осуществляли на Bruker EMX EPR спектрометре X-частотного диапазона (Германия) при 20–25 °С в атмосфере воздуха. Высокочастотная модуляция магнитного поля составляла 100 кГц с амплитудой в 1 Гаусс, микроволновая мощность – 2.03 мВт. Количество парамагнитных центров (ПМЦ) и ширина синглетной линии сигнала ЭПР ( $\Delta H$ ) рассчитывались автоматически, при этом количество ПМЦ представляет собой интенсивность сигнала  $I_{\text{абс}}$ ,  $10^{16}$  спин/г.

Содержание кислых функциональных групп в ГК определяли методами обратного титрования: баритовым (сумма фенольных и карбоксильных групп) и кальций-ацетатным (содержание карбоксильных групп) согласно методикам, описанным в [15] в токе азота [16] с использованием цифровой бюретки TopBuretteH 5000 per rotation (Аналитик-Лаб, Москва). Содержание фенольных гидроксиллов находили по разности между суммарным содержанием кислых функциональных групп и содержанием карбоксильных групп.

Статистическая обработка данных производилась с помощью пакетов программы STATISTICA 6.0. Для выявления межгрупповых различий использовали непараметрический U-критерий Манна-Уитни. Результаты представлены в виде среднего арифметического ( $M$ )  $\pm$  стандартная ошибка среднего. Рассчитывали коэффициенты ранговой корреляции Спирмена. Статистически значимыми считались различия при  $p < 0,05$ .

Таблица 1. Общая характеристика различных видов торфа Томской области

Вид торфа, шифр образцов ГК	Степень разложения, %	Зольность, %	Содержание ГК на органическую массу, %
Верховой сфагново-мочажинный, ГК-1	5–10	2.8	ГКц-1 = 6.5 ГКл-1 = 3.1
Верховой сосново-пушицевый, ГК-2	30–35	7.2	ГКц-2 = 31.4 ГКл-2 = 13.2
Верховой магелланикум, ГК-3	10–15	2.7	ГКц-3 = 16.9 ГКл-3 = 4.2
Верховой фускум торф, ГК-4	5–10	2.6	ГКц-4 = 13.3 ГКл-4 = 3.9
Низинный древесный, ГК-5	25–30	8.9	ГКц-5 = 38.2 ГКл-5 = 26.0
Низинный травяно-моховый, ГК-6	35–40	4.5	ГКц-6 = 21.5 ГКл-6 = 6.8
Низинный травяной, ГК-7	40–45	16.3	ГКц-7 = 37.3 ГКл-7 = 17.4
Низинный древесный, ГК-8	30–35	6.4	ГКц-8 = 38.6 ГКл-8 = 17.9
Переходный осоковый, ГК-9	40–45	5.2	ГКц-9 = 27.3 ГКл-9 = 8.0

### Обсуждение результатов

Гуминовые кислоты, экстрагированные из торфа, представляют собой аморфный порошок темно-коричневого цвета без запаха. Выход ГК при щелочной экстракции в среднем в 1.5–3 раза больше, чем при пирофосфатной. Наибольший выход ГК характерен для низинных видов торфа древесно-травяной и травяной групп, полученных щелочной экстракцией:  $GK_{щ-8} = 38.6\%$ ;  $GK_{щ-5} = 38.2\%$  и  $GK_{щ-7} = 37.3\%$ , а наименьший — для верховых видов торфа моховой группы, полученных пирофосфатной экстракцией:  $GK_{п-3} = 4.2\%$ ;  $GK_{п-4} = 3.9\%$  и  $GK_{п-1} = 3.1\%$ . Низинные виды торфа отличаются более высоким выходом ГК, поскольку основным источником их синтеза в торфяной залежи служит лигнин древесины [17], содержание которого в верховых видах торфа незначительно. Отличие в выходе ГК в зависимости от вида экстрагента обусловлено также тем, что среди всех известных экстрагентов ГК, натрий гидроксид обладает наибольшей извлекающей способностью [9, 18]. Децимолярные растворы натрия пирофосфата являются более мягким экстрагентом и за счет своих комплексообразующих свойств разрушают комплексы ковалентного и ионного типов [6, 9, 18, 19]. При пирофосфатной экстракции происходит внутрисферное замещение лигандов в металл-гуминовых комплексах, поэтому вся специфичность действия натрия пирофосфата сводится к необратимой обменной реакции с образованием нерастворимых осадков с кальцием и другими многовалентными катионами на ионы натрия. Это позволяет исключить возможность обратной реакции и перевести всю массу нерастворимых гуматов двух- и поливалентных металлов в растворимые гуматы натрия. Поскольку пирофосфаты кальция, железа и алюминия труднорастворимы в воде, то параллельно протекает процесс декальцинирования, что способствует более полной экстракции именно свободных (истинных) ГК [6, 9, 19]. Такие ГК, судя по результатам ЯМР-спектроскопии [9], являются более химически зрелыми, так как в ароматической части спектра доминирует пик при 130 м.д., что наряду с низкой интенсивностью сигналов в фенольной области рассматривается как признак химической зрелости ГК.

Колориметрия свободных радикалов, основанная на реакции с метанольным раствором стабильного хромоген-радикала 1,1-дифенил-2-пикрилгидразила (ДФПГ) уже давно используется в качестве удобного способа для анализа АРА разных биологических материалов (аминокислот, витаминов, растительных экстрактов и др.) [11–13]. Основными достоинствами данного метода являются высокая производительность, простота выполняемых операций, доступность необходимого оборудования, высокая чувствительность и селективность по отношению к антирадикальным АО [12, 13]. Сущность метода заключается во взаимодействии ДФПГ с антирадикальными АО по последовательно-параллельному механизму. На первой (лимитирующей) стадии реакции молекула АО отдает радикалу ДФПГ самый подвижный атом водорода с образованием радикала АО:  $ДФПГ\cdot + AH \rightarrow ДФПГ-NH + A\cdot$ . На второй стадии реакции образовавшийся радикал АО атакует новую молекулу ДФПГ в *para*-положение фенольного радикала с образованием неокрашенного продукта (пурпурно-синяя окраска исчезает):  $A\cdot + ДФПГ\cdot \rightarrow A-ДФПГ$ . Данный метод позволяет в общем виде выявить способность АО связывать свободные радикалы в модельной системе и удалять активные радикалы из реакционной смеси.

Полученные результаты представлены как кинетические кривые (рис. 1), которые показывают зависимость радикалосвязывающей активности ГК от времени (процент интенсивности взаимодействия ДФПГ с ГК, его остаточное содержание в %). Все исследуемые ГК (в конечной концентрации 0.1 мг/мл) обладают выраженной АРА, причем их радикал-связывающая активность (как процент гибели радикала ДФПГ) приближается к препарату сравнения (дигидрохверцетину). Более того, для всех ГК время взаимодействия ДФПГ с 50% вещества ( $\tau_{1/2}$ ) составило 2 мин, также как и для дигидрохверцетина. Исключение составили три образца:  $GK_{щ-1} = 4$  мин,  $GK_{щ-9} = 3$  мин и  $GK_{щ-8} = 3$  мин.

Можно отметить, что более высокая радикалосвязывающая активность отмечена для ГК, полученных пирофосфатной экстракцией, по сравнению со щелочной, в пределах одного вида торфа. В частности, данная тенденция отмечена для шести из девяти образцов торфа:  $GK_{п-2} = 92.2\%$  и  $GK_{щ-2} = 91.1\%$ ;  $GK_{п-4} = 93.6\%$  и  $GK_{щ-4} = 92.8\%$ ;  $GK_{п-5} = 92\%$  и  $GK_{щ-5} = 91\%$ ;  $GK_{п-6} = 94.6\%$  и  $GK_{щ-6} = 93.1\%$ ;  $GK_{п-7} = 94.8\%$  и  $GK_{щ-7} = 94.6\%$ ;  $GK_{п-9} = 92.1\%$  и  $GK_{щ-9} = 79.2\%$ , что может свидетельствовать о влиянии способа получения на АО активность ГК. Наибольшая АРА отмечена для ГК (как  $GK_{щ}$ , так и  $GK_{п}$ ), полученных из двух низинных травяного (ГК-7) и травяно-мохового (ГК-6), и одного верхового фускум (ГК-4) видов торфа. Полученные результаты позволяют предположить, что по своему АО механизму ГК являются донорами протона, благодаря наличию большого количества фенольных гидроксиллов [12, 13, 20], судя по результатам титрования (табл. 2) и ИК-спектроскопии (результаты представлены в [21]). В первую очередь потому что ДФПГ способен легко вступать в реакцию дегидрирования только с соединениями, имеющими подвижные атомы водорода – типа фенолов, тиолов, аминов, оставаясь при этом устойчивым к действию молекулярного кислорода [13].

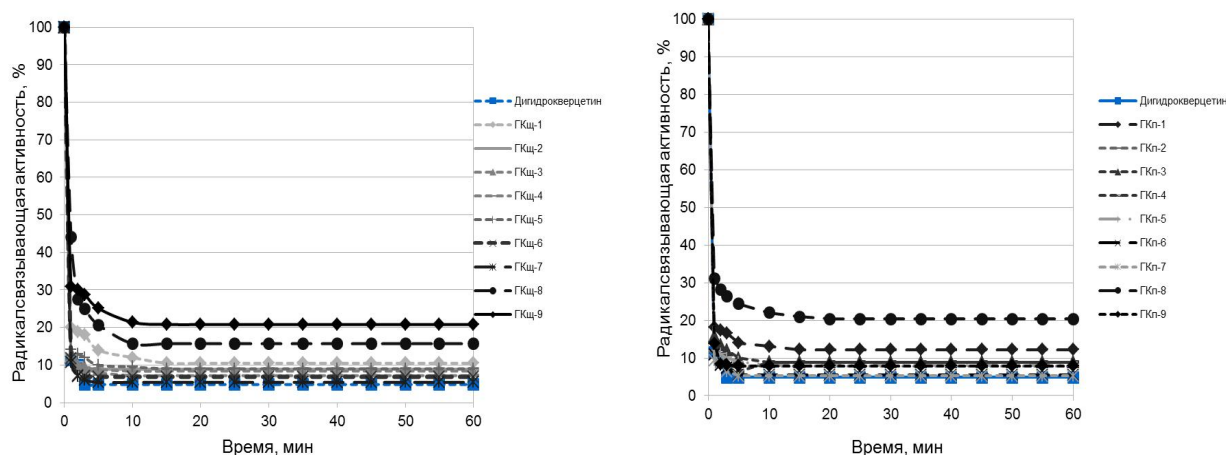


Рис. 1. Кинетическая кривая гибели радикалов ДФПГ в реакциях со щелочными и пирофосфатными ГК

Таблица 2. Содержание кислых функциональных групп (данные титрования), результаты оценки каталитической активности и параметров спектров ЭПР исследуемых гуминовых кислот торфа

Тип, вид торфа	Шифр образцов ГК	Кислые группы, ммоль/г			К, мкмоль/л мин	Параметры спектров ЭПР	
		-COOH	-ОН <sub>фенол</sub>	Σ		ΔН, мТл	ПМЦ (×10 <sup>16</sup> спин/г)
Верховой сфагново-мочажинный	ГКц-1	2.48	2.72	5.20	0.24	0.44	5.47
	ГКл-1	2.37	3.35	5.72	0.23	0.42	5.05
Верховой сосново-пушицевый	ГКц-2	2.84	2.92	5.76	0.37	0.43	6.6
	ГКл-2	2.65	4.11	6.76	0.58	0.39	7.06
Верховой магелланикум	ГКц-3	2.44	2.24	5.67	0.56	0.40	7.57
	ГКл-3	2.75	3.30	6.05	0.35	0.38	5.55
Верховой фускум	ГКц-4	2.60	3.54	6.14	0.61	0.42	7.8
	ГКл-4	2.46	3.61	6.07	0.79	0.38	8.69
Низинный древесный	ГКц-5	2.76	3.10	5.86	0.4	0.49	5.91
	ГКл-5	2.80	3.15	5.95	0.53	0.41	6.78
Низинный травяно-моховый	ГКц-6	2.78	3.10	5.88	0.58	0.45	7.93
	ГКл-6	2.63	3.52	6.16	0.69	0.43	14.4
Низинный травяной	ГКц-7	2.62	4.10	6.72	0.7	0.50	9.6
	ГКл-7	2.68	4.84	7.52	0.91	0.45	16.3
Низинный древесный	ГКц-8	2.57	3.12	5.69	0.3	0.54	5.42
	ГКл-8	2.99	3.53	6.52	0.31	0.43	5.74
Переходный осоковый	ГКц-9	2.59	3.12	5.70	0.22	0.41	4.49
	ГКл-9	3.08	3.10	6.18	0.41	0.40	6.9
Препараты сравнения	Аскорбиновая кислота				1.15	–	–
	Дигидрокверцетин				0.78	–	–

Примечание: К (мкмоль/л мин) — каталитическая активность ГК по данным катодной вольтамперометрии; ΔН (мТл) — ширина синглетной линии; ПМЦ (×10<sup>16</sup> спин/г) — концентрация парамагнитных центров.

Вольтамперометрический способ определения АО посредством регистрации тока катодного электровосстановления кислорода (ЭВ O<sub>2</sub>) является одним из самых эффективных и высокочувствительных [14]. Это связано с тем, что основным критерием эффективности АО является их способность поглощать кислород в растворе за счет прерывания радикально-цепных окислительных процессов посредством реагирования с пероксидными радикалами или кислородом в них. Результаты определения каталитической активности ГК в процессе ЭВ O<sub>2</sub> (табл. 2, рис. 2) имеют схожую картину с предыдущим исследованием. Отмечено, что в пределах одного и того же вида торфа ГКл в сравнении с ГКц сильнее инициируют процесс ЭВ O<sub>2</sub>, что отмечено для семи из девяти видов торфа, кроме образцов ГК-1 и ГК-3. Наибольшая АО активность отмечена для ГК, полученных щелочной и пирофосфатной экстракцией из двух низинных травяного (ГК-7) и травяно-мохового (ГК-6), и одного верхнего фускум (ГК-4) видов торфа. При этом можно отме-

туть, что для ГКл из низинного травяного и верхового фускум торфа отмечена каталитическая активность, превосходящая значения препарата сравнения – дигидрокверцетина (0.78 мкмоль/л мин):  $GKл-7 = 0.91$  и  $GKл-4 = 0.79$  мкмоль/л мин, и достаточно близка с АО активностью аскорбиновой кислоты (1.15 мкмоль/л мин), что всего на 20% ниже, чем  $GKл-7=0.91$ . В целом можно отметить, что все исследованные образцы ГК торфа обладают АО активностью, механизм которой, скорее всего, связан со способностью хиноидных группировок инициировать процесс ЭВ  $O_2$  [14]. В литературе [22] особенности поведения ГК в процессе ЭВ  $O_2$  связывают с параметрами молекулярной структуры, зависящими от типа и вида торфа. Так, авторы [22] отмечают, что именно карбоксильные группы и фенольные гидроксилы способны к ионизации, создавая на поверхности макромолекул ГК отрицательный заряд. Анализ полученных данных вольтамперометрии и обратного титрования (табл. 2) показывает, что более высокое содержание фенольных ОН-групп в структуре ГК дает лучшие значения их АО активности со значительными коэффициентами линейной корреляции  $r = 0.60$  ( $p < 0.01$ ). Однако не обнаружено корреляции между содержанием карбоксильных групп и АО активностью ( $p < 0.05$ ,  $r = 0.11$ ). Таким образом, содержание карбоксильных групп не играет важной роли в проявлении АО активности торфяными ГК, несмотря на то, что в литературе имеются противоположные сведения [22, 23].

Еще одним методом оценки антирадикальной активности является количественное определение ПМЦ методом ЭПР-спектроскопии. Данный метод позволяет достаточно точно фиксировать количество свободных радикалов, в частности, ГК содержат в матрице стабильные радикалы семихинонного типа, которые являются ловушками свободных короткоживущих и стабильных радикалов [24]. Анализ спектров ЭПР исследуемых образцов ГК (рис. 3) показал, что все спектры поглощения представляют собой относительно симметричную синглетную линию с g-фактором их спектроскопического расщепления  $2.0035 \pm 0.0002$ , близким к g-фактору свободного радикала семихинонного типа (2.0023) [24, 25] и указывающим на существование сильно делокализованной молекулярной орбитали [26], что является характерной особенностью ГК.

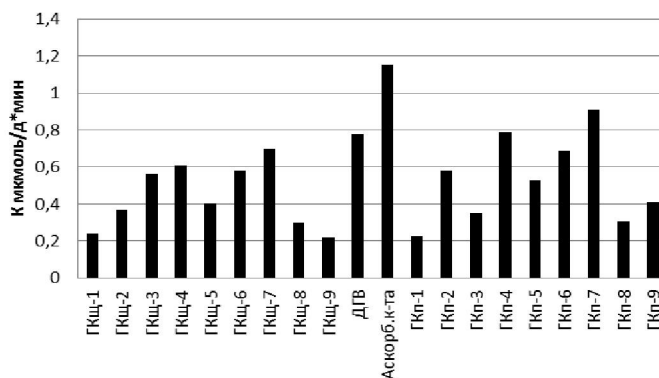


Рис. 2. Каталитическая активность ГК (ДГВ – дигидрокверцетин; Аскорб. к-та – аскорбиновая кислота)

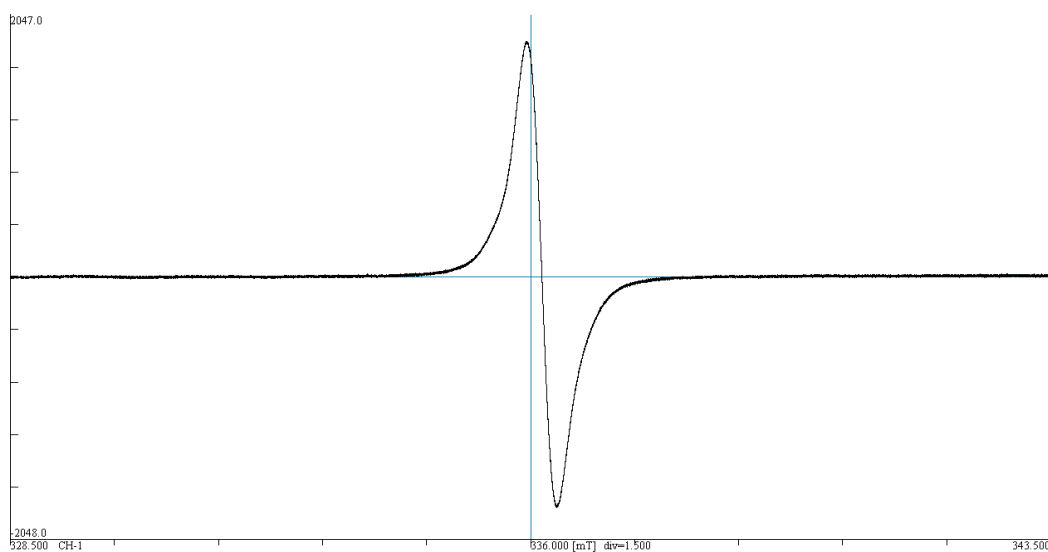


Рис. 3. Типичный ЭПР спектр ГК торфа

Ширина синглетной линии ( $\Delta H$ ) сигнала ЭПР всех образцов составила  $0.38 \pm 0.54$  мТл (табл. 2). Концентрация ПМЦ регистрировалась в широком интервале  $(4.49-16.3) \cdot 10^{16}$  спин/г. Для четырех щелочных образцов ГК низинных видов торфа ГК $_{иц}$ -6, ГК $_{иц}$ -7, ГК $_{иц}$ -5, ГК $_{иц}$ -8 характерно довольно высокое значение ширины сигнала  $\Delta H = 0.43 \pm 0.54$  мТл, что может быть обусловлено особенностями строения систем полисопряжения молекул ГК низинных типов торфа [27]. Для образцов ГК, полученных пирофосфатной экстракцией из верховых видов торфа ГК $_{н}$ -4, ГК $_{н}$ -3 и ГК $_{н}$ -2, наоборот, обнаружены достаточно низкие значения (менее 0.4 мТл), что характерно для верховых торфов ( $3.5 \pm 0.2$ ) [27]. Остальные образцы ГК имеют средние значения и мало друг от друга отличаются.

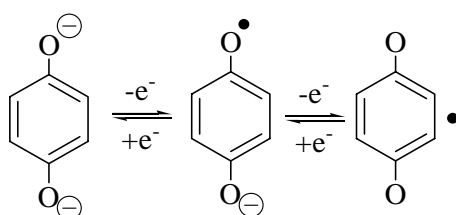
Результаты количественного определения ПМЦ (табл. 2) подтверждают определенную в предыдущих экспериментах АОА ГК – в пределах одного образца торфа ГК $_{н}$ , в сравнении с ГК $_{иц}$ , проявляют большую АРА, судя по содержанию ПМЦ, что отмечено для семи из девяти объектов, кроме образцов ГК-1 и ГК-3. Наибольшая АО активность отмечена для ГК, полученных щелочной и пирофосфатной экстракцией из двух низинных травяного (ГК-7) и травяно-мохового (ГК-6) видов торфа: ГК $_{н}$ -7 =  $16.3 \cdot 10^{16}$  спин/г и ГК $_{н}$ -4 =  $14.4 \cdot 10^{16}$ . В целом можно отметить, что все исследованные образцы ГК торфа обладают АРА, механизм которой, скорее всего, связан со способностью ГК выступать ловушками свободных радикалов [24].

Таким образом, высокая АО активность исследуемых ГК показана тремя различными физико-химическими методами анализа. При этом отмечается аналогичная тенденция распределения активности среди исследованных образцов, что доказано методом корреляционного анализа Спирмена. Коэффициенты ранговой корреляции Спирмена составили: для значений каталитической активности и содержания ПМЦ 0.971 ( $p = 0.000$ ); для значений радикалсвязывающей активности и содержания ПМЦ – 0.955 ( $p = 0.000$ ).

### Заключение

Использование различных экстрагентов (натрий гидроксида и натрий пирофосфата) для выделения ГК из торфа позволяет извлекать количество ГК из одного и того же вида торфа с разницей в 1.5–3 раза, которые также отличаются биологической активностью. Проведено исследование АО активности 18 образцов ГК из 9 разных видов торфа Томской области, в зависимости от их этиологии и способа получения, физико-химическими методами анализа (колориметрия со стабильным радикалом ДФПГ, катодная вольтамперометрия, ЭПР-спектроскопия). Показано, что все ГК высокоэффективны в процессе восстановления радикала ДФПГ, имеют однотипные вольтамперограммы и являются редокс-активными соединениями – увеличивают катодный ток ЭВ  $O_2$  и сдвигают потенциал полуволны тока ЭВ  $O_2$  в отрицательную область, что свидетельствует о проявлении ими каталитической активности, а также все исследуемые образцы ГК, судя по характеру синглетной линии в ЭПР спектрах, имеют одинаковую природу магнитных центров. Отмечено также, что все исследуемые ГК (как ГК $_{иц}$ , так и ГК $_{н}$ ) проявили высокую АО активность во всех сериях эксперимента (по результатам трех методов). При этом среди трех методов отмечена аналогичная тенденция в распределении активности среди исследованных образцов ГК, что доказано методом корреляционного анализа.

Установлено, что большей АО активностью обладают ГК, полученные пирофосфатной экстракцией, по сравнению с ГК, полученными щелочной экстракцией в пределах одного вида торфа. Данное обстоятельство объясняется разными химическими параметрами структуры ГК, зависящими, в первую очередь, от способа их получения. Согласно ранее проведенным нами исследованиям [21], ГК $_{н}$  отличаются от ГК $_{иц}$  большим вкладом ароматических структур в формирование их молекул, а также большим содержанием кислородсодержащих групп. В зависимости от этиологии торфа также было отмечено, что ГК низинных видов торфа являются более ароматичными структурами и наиболее богаты фенольными, спиртовыми и простыми эфирными группами, углеводными остатками. Наибольшей АО активностью обладают ГК $_{н}$  из двух низинных (травяного и травяно-мохового) и верхового фускум видов торфа, что обусловлено, в первую очередь, содержанием фенольных групп, которые играют немаловажную роль в окислительно-восстановительной емкости ГК и окисляющиеся до феноксидных радикалов. Также в переносе электрона молекулой ГК большая роль отводится хиноидным фрагментам, которые способны образовывать свободные радикалы семихинонного типа:





Также ГК способны образовывать гидроксильные радикалы (НО•) исходя из того, что они являются активными редокс-веществами с электроноакцепторной способностью и при этом имеют высокую корреляцию с ароматичностью ГК [28], значит, основными восстанавливаемыми фрагментами в ГК являются хиноны, образующие при восстановлении гидрохиноны [28].

На основании полученных результатов можно предположить возможные механизмы проявления АО активности ГК, обусловленной наличием легкоподвижных атомов водорода фенольных гидроксилы, нейтрализующих свободные радикалы, а также способностью хиноидных группировок в структуре ГК инициировать процесс электровосстановления кислорода. Еще одним механизмом АО активности ГК является их способность выступать в роли ловушек свободных радикалов, судя по результатам ЭПР-спектроскопии, показывающим, что все спектры поглощения представляют собой относительно симметричную синглетную линию с  $g$ -фактором их спектроскопического расщепления как у свободного радикала семихинонного типа, и указывающим на существование в структуре ГК сильно делокализованной молекулярной орбитали.

Таким образом, установлено, что ГКл обладают большей АО активностью в сравнении с ГКц, ввиду большего вклада ароматических структур и кислородсодержащих групп в формирование их молекул. При этом ГК низинных видов торфа (травяного и травяно-мохового) являются наиболее активными ввиду большей ароматичности и обогащенности фенольными группами. Методами фотоколориметрии с ДФПГ и катодной вольтамперометрии установлено, что по механизму АО активности ГК являются донорами протона. Методом ЭПР-спектроскопии установлена этиология парамагнетизма ГК аналогичная свободному радикалу семихинонного типа, в структуре всех ГК отмечена высокая концентрация ПМЦ, из чего следует, что вторым возможным механизмом АО активности ГК является их способность выступать в роли ловушек свободных радикалов.

### **Выводы**

1. Все исследуемые образцы ГК проявили в эксперименте АО действие.
2. Гуминовые кислоты, полученные натрий пиродифосфатом, обладают большей АО активностью в сравнении ГК, полученными натрий гидроксидом, ввиду большего вклада ароматических структур и кислородсодержащих групп в формирование их молекул, что подтверждается результатами корреляционного анализа.
3. Гуминовые кислоты низинных видов торфа (травяного и травяно-мохового) являются наиболее активными ввиду большей ароматичности и обогащенности фенольными гидроксилами.
4. Методами фотоколориметрии с ДФПГ и катодной вольтамперометрии установлено, что по механизму АО активности ГК являются донорами протона.
5. Методом ЭПР-спектроскопии установлена этиология парамагнетизма ГК аналогичная свободному радикалу семихинонного типа, в структуре всех ГК отмечена высокая концентрация ПМЦ, из чего следует, что вторым возможным механизмом АО активности ГК является их способность выступать ловушками свободных радикалов.

### **Список литературы**

1. Зайцев В.Г., Островский О.В., Зкраевский В.И. Связь между химическим строением и мишенью действия как основа классификации антиоксидантов прямого действия // Экспериментальная и клиническая фармакология. 2003. Т. 66. №4. С. 66–70.
2. Сейфулла Р.Д., Рожкова Е.А., Ким Е.К. Антиоксиданты // Экспериментальная и клиническая фармакология. 2009. Т. 72. №3. С. 60–64.
3. Halliwell V. The antioxidant paradox // The Lancet. 2000. Vol. 355, N9210. Pp. 1179–1180. DOI: 10.1016/s0140-6736(00)02075-4.
4. Cadenas E. Basic mechanisms of antioxidant activity // BioFactors. 1997. Vol. 6. Pp. 391–397.
5. Хасанов В.В., Рыжова Г.Л., Мальцева Е.В. Методы исследования антиоксидантов // Химия растительного сырья. 2004. №3. С. 63–75.
6. Бамбалов Н.Н., Смирнова В.В., Немкевич А.С. Причины слабой растворимости гуминовых кислот верхового торфа в воде // Природопользование. 2011. Вып. 20. С. 91–94.
7. Филон В.А., Беркович А.М. Гуминовые вещества: краткий очерк химизма и возможностей медико-биологического использования // Итоги и перспективы применения гуминовых препаратов в продуктивном животноводстве, коневодстве и птицеводстве: сб. докл. конф. М., 2006. С. 6–12.

8. Марьганова В.В., Смычник Т.П., Бамбалов Н.Н. Особенности химического состава и молекулярной структуры продуктов окислительной деструкции гуминовых кислот // *Химия твердого топлива*. 1998. №5. С. 21–28.
9. Марьганова В.В., Бамбалов Н.Н., Парамон С.В. Воздействие вида экстрагента на структуру извлекаемых из торфа гуминовых кислот // *Химия твердого топлива*. 2003. №1. С. 3–10.
10. Патент 2610446 (РФ). Средство на основе гуминовых кислот из торфа болот Томской области для повышения продукции оксида азота макрофагами *in vitro* и способ его получения / М.В. Зыкова, М.Г. Данилец, С.В. Кривошеков, Е.С. Трофимова, А.А. Лигачева, Е.Ю. Шерстобоев, М.В. Белоусов, М.С. Юсубов. 13.02.2017.
11. Nishizawa M., Kohno M., Nishimura A.M. Non-reductive scavenging of 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) by peroxyradical: a useful method for quantitative analysis of peroxyradical // *Chemical and Pharmaceutical bulletin*. 2005. Vol. 53. №6. Pp. 714–716. DOI: org/10.1248/cpb.53.714.
12. Волков В.А., Дорофеева Н.А., Пахомов П.М. Кинетический метод анализа антирадикальной активности экстрактов растений // *Химико-фармацевтический журнал*. 2009. Т. 43. №6. С. 27–31.
13. Филиппенко Т.А., Белая Н.И., Николаевский Ф.Н. Фенольные соединения растительных экстрактов и их активность в реакции с дифенилпикрилгидразилом // *Химико-фармацевтический журнал*. 2004. Т. 38. №8. С. 34–36.
14. Avramchik O.A., Korotkova E.I., Plotnikov E.V., Lukina A.N., Karbainov Y.A. Antioxidant and electrochemical properties of calcium and lithium ascorbates // *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2005. Vol. 37. Pp. 1149–1154. DOI: 10.1016/j.jpba.2004.11.016.
15. Данченко Н.Н., Перминова И.В., Гармаш А.В., Кудрявцев А.В. Определение карбоксильной кислотности гумусовых кислот титриметрическими методами // *Вестник Московского университета. Серия 2. Химия*. 1998. Т. 39. №2. С. 127–131.
16. Tarhan I., Ayyildiz H.F., Arslan F., Tas A., Sherazi S.T.H., Kara H. Chemical and Spectroscopic Characterization of Humic Acid Isolated from Ilgin Lignite, Turkey // *International Journal of Scientific and Technological Research*, 2015. Vol. 1. N1. Pp. 176–183.
17. Лиштван И.И., Бамбалов Н.Н., Тишкович А.В., Стригуцкий В.П., Шныриков В.Г. Гуминовые вещества торфа и их практическое использование // *Химия твердого топлива*. 1990. №6. С. 14–21.
18. Chen J.C., LeVoeuf E.J., Choia S., Gua B. Spectroscopic Characterization of Structural and Functional Properties of Natural Organic Matter Fractions // *Chemosphere*. 2002. Vol. 48. Pp. 59–68.
19. Бакина Л.Г., Орлова Н.Е. Особенности извлечения гумусовых кислот из почв растворами пирофосфата натрия различной щелочности // *Почвоведение*. 2012. №4. С. 445–452.
20. Khlebnikov A.I., Schepetkin I.A., Domina N.G., Kirpotina L.N., Quinn M.T. Improved quantitative structure-activity relationship models to predict antioxidant activity of flavonoids in chemical, enzymatic, and cellular systems // *Bio-orgMedChem*. 2007. Vol. 15. Pp. 1749–1770. DOI: 10.1016/j.bmc.2006.11.037.
21. 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 // *Бюллетень сибирской медицины*. 2017. Т. 16. №1. С. 36–49.
22. Маслов С.Г., Кусмауль С.А., Воронова О.А., Короткова Е.И. Изменение антиоксидантной активности гуминовых и фульвокислот в процессе хранения // *Химия растительного сырья*. 2013. №4. С. 193–199. DOI: 10.14258/jcprm.1304193.
23. Schepetkin I.A., Xie G., Jutila M.A., Quinn M.T. Complement-fixing Activity of Fulvic Acid from Shilajit and Other Natural Sources // *Phytother. Res.* 2009. Vol. 23. Pp. 373–384. DOI: 10.1002/ptr.2635.
24. Witwicki M., Jaszewski A.R., Jezierska Ju., Jerzykiewicz M., Jezierski A. The pH-induced shift in the g-tensor components of semiquinone-type radicals in humic acids – DFT and EPR studies // *Chemical Physics Letters*. 2008. Vol. 462. Pp. 300–306. doi.org/10.1016/j.cplett.2008.07.086.
25. Gonzalez Perez M., Martin-Neto L., Colnago L.A. Characterization of humic acids extracted from sewage sludge-amended oxisols by electron paramagnetic resonance // *Soil & Tillage Research*. 2006. Vol. 91. N1-2. Pp. 95–100. DOI: 10.1016/j.still.2005.11.007.
26. Лодыгин Е.Д., Безносиков В.А., Чуков С.Н. Парамагнитные свойства гумусовых кислот подзолистых и болотно-подзолистых почв // *Почвоведение*. 2007. №7. С. 807–810.
27. Марьганова В.В., Бамбалов Н.Н., Стригуцкий В.П., Пармон С.В. Изменения состава гуминовых веществ в зависимости от глубины залегания торфа // *Химия твердого топлива*. 2013. Т. 47. №3. С. 153–154.
28. Aeschbacher M., Sander M., Schwarzenbach R.P. Novel Electrochemical Approach to Assess the Redox Properties of Humic Substances // *Environ. Sci. Technol.* 2010. Vol. 44, N1. Pp. 87–93. doi: 10.1021/es902627p.

*Поступило в редакцию 3 апреля 2018 г.*

*После переработки 17 мая 2018 г.*

**Для цитирования:** Зыкова М.В., Логвинова Л.А., Кривошеков С.В., Воронова О.А., Ласукова Т.В., Братишко К.А., Жолобова Г.А., Голубина О.А., Передерина И.А., Дрыгунова Л.А., Тверякова Е.Н., Белоусов М.В. Антиоксидантная активность высокомолекулярных соединений гуминовой природы // *Химия растительного сырья*. 2018. №3. С. 239–250. DOI: 10.14258/jcprm.2018033925.

Zykova M.V.<sup>1\*</sup>, Logvinova L.A.<sup>1</sup>, Krivoshchekov S.V.<sup>1,2</sup>, Voronova O.A.<sup>2</sup>, Lasukova T.V.<sup>3,4</sup>, Bratishko K.A.<sup>1</sup>, Zholobova G.A.<sup>1</sup>, Golubina O.A.<sup>1</sup>, Perederina I.A.<sup>1</sup>, Drygunova L.A.<sup>1</sup>, Tveryakova E.N.<sup>1</sup>, Belousov M.V.<sup>1</sup> ANTIOXIDANT ACTIVITY OF MACROMOLECULAR COMPOUNDS OF HUMIC ETIOLOGY

<sup>1</sup>Siberian State Medical University, Moskovskiy trakt, 2, Tomsk, 634050 (Russia), e-mail: gmv2@rambler.ru

<sup>2</sup>National Research Tomsk Polytechnic University, Lenina av., 30, Tomsk, 634050 (Russia)

<sup>3</sup>Tomsk State Pedagogical University, Kiyevskaya st., 60A, Tomsk, 634061 (Russia)

<sup>4</sup>Research Institute of Cardiology, Kiyevskaya st., 111A, Tomsk, 634061 (Russia)

Dependence of antioxidant activity of the humic macromolecular compounds from their etiology and production method was learned by means of physical-chemical analysis methods – colorimetry with diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) as a stable radical, cathodic voltammetry, electron paramagnetic resonance spectroscopy. 18 native humic acids (HAs) were isolated by extraction from nine typical species of peats of the Tomsk region, that differ from each other by botanical composition, degree of decomposition and ash content. Two extragents were used: sodium hydroxide and sodium pyrophosphate. Although all 18 HAs samples exhibit antioxidant activity. At the same time there is a similar trend in the distribution of antioxidant activity, which is proved by Spearman's correlation analysis. A higher activity was noted for pyrophosphate HAs. Using methods of cathodic voltammetry and colorimetry with DPPH it was found that HAs show antioxidant activity by its mechanism, being a proton donor due to the presence of a large number of phenolic hydroxyls. EPR spectroscopy established that the HAs are traps of free radicals.

**Keywords:** antioxidants, free radicals, humic acids, peat, colorimetry, diphenylpicrylhydrazyl, spectroscopy, voltammetry.

## References

1. Zaytsev V.G., Ostrovskiy O.V., Zakrayevskiy V.I. *Ekspperimental'naya i klinicheskaya farmakologiya*, 2003, vol. 66, no. 4, pp. 66–70. (in Russ.).
2. Seyfulla R.D., Rozhkova Ye.A., Kim Ye.K. *Ekspperimental'naya i klinicheskaya farmakologiya*, 2009, vol. 72, no. 3, pp. 60–64. (in Russ.).
3. Halliwell B. *The Lancet*, 2000, vol. 355, no. 9210, pp. 1179–1180. doi: 10.1016/s0140-6736(00)02075-4.
4. Cadenas E. *BioFactors*, 1997, vol. 6, pp. 391–397.
5. Khasanov V.V., Ryzhova G.L., Mal'tseva Ye.V. *Khimiya rastitel'nogo syr'ya*, 2004, no. 3, pp. 63–75. (in Russ.).
6. Bambalov N.N., Smirnova V.V., Nemkevich A.S. *Prirodopol'zovaniye*, 2011, issue 20, pp. 91–94. (in Russ.).
7. Filov V.A., Berkovich A.M. *Itogi i perspektivy primeneniya guminovykh preparatov v produktivnom zhivotnovodstve, konevodstve i ptitsevodstve: sbornik dokladov nauchnoy konferentsii*. [Results and prospects for the use of humic drugs in productive livestock breeding, horse breeding and poultry farming: a collection of reports of a scientific conference]. Moscow, 2006, pp. 6–12. (in Russ.).
8. Maryanova V.V., Smychnik T.P., Bambalov N.N. *Khimiya tvordogo topliva*, 1998, no. 5, pp. 21–28. (in Russ.).
9. Maryanova V.V., Bambalov N.N., Paramon S.V. *Khimiya tvordogo topliva*, 2003, no. 1, pp. 3–10. (in Russ.).
10. Patent 2610446 (RU). 13.02.2017 (in Russ.).
11. Nishizawa M., Kohno M., Nishimura A.M. *Chemical and Pharmaceutical bulletin*, 2005, vol. 53, no. 6, pp. 714–716. DOI: org/10.1248/cpb.53.714.
12. Volkov V.A., Dorofeyeva N.A., Pakhomov P.M. *Khimiko-farmatsevticheskiy zhurnal*, 2009, vol. 43, no. 6, pp. 27–31. (in Russ.).
13. Filippenko T.A., Belaya N.I., Nikolayevskiy F.N. *Khimiko-farmatsevticheskiy zhurnal*, 2004, vol. 38, no. 8, pp. 34–36. (in Russ.).
14. Avramchik O.A., Korotkova E.I., Plotnikov E.V., Lukina A.N., Karbainov Y.A. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2005, vol. 37, pp. 1149–1154. doi: 10.1016/j.jpba.2004.11.016
15. Danchenko N.N., Perminova I.V., Garmash A.V., Kudryavtsev A.V. *Vestnik Moskovskogo universiteta. Seriya 2. Khimiya*, 1998, vol. 39, no. 2, pp. 127–131. (in Russ.).
16. Tarhan I., Ayyildiz H.F., Arslan F., Tas A., Sherazi S.T.H., Kara H. *International Journal of Scientific and Technological Research*, 2015, vol. 1, no. 1, pp. 176–183.
17. Lishtvan I.I., Bambalov N.N., Tishkovich A.V., Strigutskiy V.P., Shnyrikov V.G. *Khimiya tverdogo topliva*, 1990, no. 6, pp. 14–21. (in Russ.).
18. Chen J.C., LeBoeuf E.J., Choia S., Gua B. *Chemosphere*, 2002, vol. 48, pp. 59–68.
19. Bakina L.G., Orlova N.Ye. *Pochvovedeniye*, 2012, no. 4, pp. 445–452. (in Russ.).
20. Khlebnikov A.I., Schepetkin I.A., Domina N.G., Kirpotina L.N., Quinn M.T. *BioorgMedChem*, 2007, vol. 15, pp. 1749–1770. DOI: 10.1016/j.bmc.2006.11.037.
21. Zykova M.V., Trofimova Ye.S., Krivoshchekov S.V., Ligachova A.A., Danilets M.G., Logvinova L.A., Zholobova G.A., Prishchepova O.F., Yusubov M.S., Belousov M.V. *Bulleten' sibirskoy meditsiny*, 2017, vol. 16, no. 1, pp. 36–49. (in Russ.).
22. Maslov S.G., Kusmaul' S.A., Voronova O.A., Korotkova Ye.I. *Khimiya rastitel'nogo syr'ya*, 2013, no. 4, pp. 193–199. DOI: 10.14258/jcprm.1304193. (in Russ.).
23. Schepetkin I.A., Xie G., Jutila M.A., Quinn M.T. *Phytother. Res.*, 2009, vol. 23, pp. 373–384. DOI: 10.1002/ptr.2635.
24. Witwicki M., Jaszewski A.R., Jezierska Ju., Jerzykiewicz M., Jezierski A. *Chemical Physics Letters*, 2008, vol. 462, pp. 300–306. DOI: org/10.1016/j.cplett.2008.07.086.

\* Corresponding author.

25. Gonzalez Perez M., Martin-Neto L., Colnago L.A. *Soil & Tillage Research*, 2006, vol. 91, no. 1-2, pp. 95–100. DOI: 10.1016/j.still.2005.11.007.
26. Lodygin Ye.D., Beznosikov V.A., Chukov S.N. *Pochvovedeniye*, 2007, no. 7, pp. 807–810. (in Russ.).
27. Maryganova V.V., Bambalov N.N., Strigutskiy V.P., Parmon S.V. *Khimiya tverdogo topliva*, 2013, vol. 47, no. 3, pp. 153–154. (in Russ.).
28. Aeschbacher M., Sander M., Schwarzenbach R.P. *Environ. Sci. Technol.*, 2010, vol. 44, no. 1, pp. 87–93. DOI: 10.1021/es902627p.

*Received April 3, 2018*

*Revised May 17, 2018*

**For citing:** Zykova M.V., Logvinova L.A., Krivoshchekov S.V., Voronova O.A., Lasukova T.V., Bratishko K.A., Zholobova G.A., Golubina O.A., Perederina I.A., Drygunova L.A., Tveryakova E.N., Belousov M.V. *Khimiya Rastitel'nogo Syr'ya*, 2018, no. 3, pp. 239–250. (in Russ.). DOI: 10.14258/jcprm.2018033925.