



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **147564** (13) **U**
(51) МПК
G01N 30/90 (2006.01)

НАЦІОНАЛЬНИЙ ОРГАН
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
ДЕРЖАВНЕ ПІДПРИЄМСТВО
"УКРАЇНСЬКИЙ ІНСТИТУТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ"

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

<p>(21) Номер заявки: u 2020 08413</p> <p>(22) Дата подання заявки: 28.12.2020</p> <p>(24) Дата, з якої є чинними права інтелектуальної власності: 20.05.2021</p> <p>(46) Публікація відомостей про державну реєстрацію: 19.05.2021, Бюл.№ 20</p>	<p>(72) Винахідник(и): Пономарьова Людмила Петрівна (UA), Федорончук Наталя Олександрівна (UA), Кадурін Володимир Миколайович (UA), Гончарова Ірина Олегівна (UA)</p> <p>(73) Володілець (володільці): ОДЕСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ І.І. МЕЧНИКОВА, вул. Дворянська, 2, м. Одеса, 65082 (UA)</p>
---	---

(54) СПОСІБ ВИЗНАЧЕННЯ БІОЛОГІЧНОЇ АКТИВНОСТІ ГУМІНОВИХ КИСЛОТ ДОННИХ ВІДКЛАДІВ

(57) Реферат:

Спосіб визначення біологічної активності гумінових кислот донних відкладів полягає у виділенні гумінових кислот з геологічних об'єктів, в отриманні інформації про наявність азотовмісних сполук методом інфрачервоної спектроскопії та встановленні складу амінокислот методом тонкошарової хроматографії. Гумінові кислоти концентрують до 0,025-0,05 % і визначається їх біологічна активність на основі біотестування.

UA 147564 U

Корисна модель належить до використання гумінових кислот, виділених з донних відкладів морів, з метою подальшого визначення їх біологічної активності, та може бути застосована в геології, геохімії та біології.

5 Відомості про хімічну структуру гумінових кислот і кількісне співвідношення в них амінокислот практично відсутні. Відомі гумінові кислоти у вигляді окремих одиничних включень у поверхневих водних пробах. Органічна речовина (ОР) донних відкладів у зонах нафто- і газотворення піддається деструкції, формуючи елементи гумінових кислот, відповідні генетичним особливостям, набуваючи нових властивостей з високою біологічною активністю, що дуже важливо з точки зору майбутнього освоєння біологічних ресурсів морів і океанів.

10 Найбільш близьким аналогом до запропонованої корисної моделі є метод вивчення структури нефракціонованої органічної речовини, а також рідких нафто подібних вуглеводнів і нафт [1, 2].

Теоретичною основою для діагностики генетичних типів досліджуваних об'єктів є класифікація, розроблена для геології і геохімії [1, 2]. ІЧ-спектри поглинання досліджуваної речовини характеризуються розподілом інтенсивності поглинання окремих груп атомів і зв'язків, в залежності від довжини хвилі λ см, $\nu = (1: \lambda)$ см⁻¹, де ν - характеристична частота. Вивчення ІЧ-спектрів проводять в інтервалі довгохвильової і короткохвильової областей спектра 700-2000 см⁻¹ і 2400-3800 см⁻¹, відповідно, з використанням приладу UR-20 (з призмиами з хлористого натрію і фтористого літію). Проби вивчають у вигляді плівок в кюветах з товщиною шару 0,02 мм.

20 Недоліком аналогу є неможливість визначення амінокислотного складу і біологічної активності гумінових кислот.

В основу корисної моделі поставлена задача визначити хімічну структуру, а також аналіз амінокислотного складу гумінових кислот з донних відкладів Чорного та Азовського морів.

25 Поставлена задача вирішується тим, що спосіб визначення біологічної активності гумінових кислот донних відкладів полягає у виділенні гумінових кислот з геологічних об'єктів, в отриманні інформації про наявність азотовмісних сполук методом інфрачервоної спектрометрії та встановленні складу амінокислот методом тонкошарової хроматографії. Гумінові кислоти концентрують до 0,025-0,05 % і визначається їх біологічна активність на основі біотестування.

Здійснюється спосіб наступним чином.

30 Перший етап включає відбір проб донних відкладів та їх підготовку для лабораторних досліджень.

Другий етап включає виділення гумінових кислот з проб донних відкладів, їх концентрацію до 0,025-0,05 % та вивчення їх елементного складу (С, Н, N). Виділення гумінових кислот проводиться шляхом екстракції 0,5 %-им розчином гідроксиду натрію в м'яких умовах температурного режиму до 40° С з періодичною зміною розчинника до знебарвлення розчину над осадам, далі екстракти перекристалізують соляною кислотою в співвідношенні з дистильованою водою (3:10) до нейтрального стану, фільтрують та висушують. Елементний склад ГК визначають із застосуванням аналізаторів.

40 На третьому етапі визначають інфрачервоний спектр (ІЧ-спектр) гумінових кислот з виявленням азотовмісних сполук.

Четвертий етап включає визначення амінокислотного складу гумінових кислот методом тонкошарової хроматографії [3, 4] та подальше виявлення їх біологічної активності.

45 Роботи за запропонованим способом проведені в ГНДЛ-3 ОНУ ім. І.І. Мечникова. Визначена біологічна активність гумінових кислот, виділених з 18 зразків різних типів різновікових донних відкладів Азовського і Чорного метрів (табл. 1).

Таблиця 1

Характеристика досліджених зразків донних відкладів Азово-Чорноморського басейну

Район дослідження	Геологічний вік відкладів; літологічна характеристика	Глибина відбору зразка, м	Елементний склад гумінових кислот % ваг			
			C	H	N	
Чорне море	Голоценовий; алевро-пелітові та пелітові мули	2,0	49,86	5,26	2,21	
		2,0	50,43	4,84	2,29	
		3,5	52,75	5,38	2,50	
		3,5	44,17	4,22	2,48	
		1,5	50,86	4,90	2,38	
Азовське море	Верхньоплейстоценовий (новоевксинський); алевро-пелітові та пелітові мули	4,0	50,88	6,54	5,14	
		4,0	52,03	6,22	6,39	
		3,5	49,04	6,02	4,98	
		4,0	43,65	7,31	5,00	
		3,0	44,26	6,50	5,65	
		3,0	48,00	5,10	2,67	
	Майкопський; алевритисті глини	глини,	435-440	40,20	6,32	1,28
			550-557	40,98	5,05	0,89
			1191-1198	41,49	5,34	1,21
			386-393	50,03	5,26	1,42
		400-407	47,26	4,70	1,46	
Чорне море	Чорноморська водорість (детрит цистозири)	Поверхн. шар води 0,15	37,39	5,20	2,56	
	Торф'яні відклади (гумат натрію)	5,0	33,84	4,60	2,43	

5 Вивчення спектрів поглинання ГК зразків донних відкладів Чорного та Азовського морів (Креслення: зр. 1 - торф'яні відклади, зр. 2 - глинисті відклади Азовського моря, зр. 3, 4 - верхньоплейстоценові мули Азовського моря, зр. 5 - голоценові мули Чорного моря) показало наступне.

10 ІЧ-спектри поглинання гумінових кислот донних відкладів Азовського моря характеризуються добре вираженими смугами поглинання в області $650-1540\text{ см}^{-1}$ азотовмісних сполук (деформаційні і валентні коливання N-H і C-H зв'язків, відповідно); інтенсивними смугами поглинання кисневмісних аліфатичних структур в області $1000-1100\text{ см}^{-1}$; поглинанням $\text{CH}_2 - \text{CH}_3$ - груп ($2930-2860\text{ см}^{-1}$) і слабким поглинанням ароматичних структур (C = C зв'язку - 1600 см^{-1}). Це свідчить про ймовірну участь в утворенні гумінових кислот дериватів білків - амідні групи.

15 Для ІЧ-спектрів гумінових кислот донних відкладів Чорного моря характерна також значна присутність азотовмісних сполук в області $1650-1540\text{ см}^{-1}$, високий вміст кисневих структур - поглинання карбонільних груп в області $1425-1270\text{ см}^{-1}$, а також фенольних груп - $1425-1130\text{ см}^{-1}$, присутні ароматичні структури (поглинання C = C зв'язків в області 1600 см^{-1}), а також заміщені ароматичні структури (зв'язку C-H в області $835, 800$ і 780 см^{-1}) і незначне поглинання CH_2 і CH_3 - груп в короткохвильовій області спектра $2930-2960$ і 2860 см^{-1} .

20 Результати хімічного аналізу (табл. 1) також підтверджують наявність азотовмісних сполук за кількістю вмісту азоту в гумінових кислотах новоевксинських відкладів Азовського моря від 5,0 до 6,0 %, голоценових відкладів Чорного моря - від 2,5 до 3,0 %.

25 При хроматографічному розділенні гумінових кислот з використанням метода тонкошарової хроматографії [3, 4] користувались готовими пластинами з нанесеним сорбентом "СУЛІФОЛ" з товщиною шару (0,1-0,5 мм). Пластини з нанесеною досліджуваною речовиною поміщали в камеру з рухомою фазою - розчинником (бутанол: оцтова кислота: вода) у співвідношенні (4:1: 5) і проявником (анілін і фталева кислота). Прояв займав ~ 18-20 годин, при якому спостерігалось пересування вихідної речовини по потоку розчинника. При цьому відбувався 30 поділ плями на окремі плями по функціям поділу. Після закінчення часу пластину з численними плямами виймали, висушували. Паралельно проводили таким же способом розділення суміші каліброваного розчину з відомими речовинами. У табл. 2 наведено склад і вміст амінокислот у

гумінових кислот, виділених з різних відкладів, а також з чорноморської водорості (детрит цистозири - для порівняння).

Таблиця 2

Склад і вміст амінокислот в гумінових кислотах

Групи амінокислот	Амінокислота	Вміст амінокислот у зразках, мг/100 г						
		Чорне море		Торф'яні відклади	Азовське море			
		Голоценові відклади	Детрит-цистозири		майкопські відклади			
					Зр. 1	Зр. 2	Зр. 3	Зр. 4
Нейтральні	Гліцин	0,397	0,742	0,580	0,040	0,024	0,023	0,178
	Аналін	0,392	0,820	0,580	0,033	0,014	0,020	0,164
	Валін	0,366	0,730	0,510	0,025	0,010	0,011	0,135
	Лейцин	0,432	2,472	0,490	0,046	0,015	0,016	0,173
	Ізолейцин	0,245	0,652	0,280	0,017	0,008	0,011	0,092
	Серин	0,174	0,280	0,120	0,016	0,011	0,007	0,085
	Треонін	0,228	0,320	0,170	0,013	0,007	0,020	0,096
	Пролін	0,330	0,513	0,330	0,024	0,006		0,0218
	Сума	2,564	6,529	3,060	0,214	0,095	0,108	1,140
Основні	Гистидин	0,123	0,447	0,060	0,019	0,009	0,010	0,066
	Лізин	0,289	0,533	0,140	0,018	0,015	0,010	0,134
	Аргінін	0,225	0,373	0,130	0,025	0,015	0,009	0,105
	Сума	0,637	1,353	0,330	0,062	0,039	0,029	0,305
Кислі	Аспарагінова кислота	0,807	1,402	0,920	0,044	0,025	0,011	0,283
	Глутамінова кислота	0,630	1,453	0,810	0,059	0,036	0,022	0,324
	Сума	1,437	2,855	1,730	0,103	0,061	0,033	0,607
Ароматичні	Фенілаланін	0,342	0,746	0,460	0,020	0,009	0,002	0,107
	Тирозін	0,052	0,170	0,110		0,004		0,025
	Сума	0,349	0,916	0,570	0,020	0,013	0,002	0,132
Сірковмісні	Цистин	Сліди	0,040	Сліди	Сліди	Сліди	Сліди	0,005
	Метіонін	0,019	0,043	Сліди	Сліди	0,002	Сліди	0,007
	Сума	0,019	0,083	Сліди	Сліди	0,002	Сліди	0,012
	УСЬОГО	5,051	11,736	5,690	0,399	0,210	0,172	2,196

5 Аналіз амінокислотного складу гумінових кислот дозволяє ідентифікувати 17 амінокислот з систематизацією їх за класами: нейтральні, основні, кислі, ароматичні й сірковмісні. За загальним сумарним вмістом амінокислот у гумінових кислотах, виділених з різних об'єктів, їх можна розташувати в наступний ряд (від max до min): чорноморська водорість - торф - голоценові сучасні донні відклади - новоевксинські відклади - майкопські відклади. За кількістю стійких нейтральних амінокислот порядок зменшення зберігається в тому ж ряду, що і для суми. Нестійкі основні амінокислоти в складі гумінових кислот зменшуються в тому ж ряду. Аналогічна тенденція спостерігається і для новоевксинських відкладів, в яких зазначено вміст основних амінокислот у порівнянних кількостях з іншими об'єктами 0,33 і 0,30 мг / 100 г.

10 Це цілком узгоджується з уявленнями про збереження деяких класів у залежності від умов середовища. У вмісті кислих і ароматичних амінокислот зберігається аналогічна картина розподілу. Сірковмісні амінокислоти - цистин і метіонін присутні у вигляді слідів, не перевищуючи 0,04-0,05 мг / 100 г. Таким чином кількісний розподіл і якісна характеристика амінокислот у складі гумінових кислот може служити показником рівня діагенетичного перетворення органічної речовини з надбанням нових ознак гумінових кислот. У зв'язку зі зростаючою роллю освоєння біологічних ресурсів Світового океану дуже актуальними є питання вивчення біологічної активності компонентів органічної речовини гумусової природи.

25 Відомості про полімерний характер азотовмісних сполук в морській воді, суспензіях і донних відкладах свідчать про те, що в складі продуктів гідролітичного розщеплення утворюються різні амінокислоти. В свою чергу, проведені дослідження гумінових кислот морських донних відкладів на нафтоперспективних площах Чорного моря свідчать про те, що в зонах розвантаження, в

результаті міграції газоподібних і нафтових вуглеводнів від покладу, відбувається, ймовірно, поява нової властивості гумінових кислот, пов'язаної з посиленням ступеню біологічної активності. У зв'язку з цим були проведені додаткові дослідження в лабораторії фізіології по біотестуванню на живих організмах. Була відпрацьована концентрація гумінових кислот для створення необхідних умов виконання аналізів по біотестуванню.

Аналізи проводяться з використанням тестів за характером впливу на живі організми. На підставі проведеного біотестування отримані наступні результати (табл. 3).

Таблица 3

Характер впливу гумінових кислот на живі організми

Проба ГК	Характер впливу	Види тестів
1	антитоксичний	гостра токсичність
2	гіпно-седативний	гексаноловий
3	транквілізуючий	кордизоловий
4	антигіпоксичний	гіпоксія CO ₂
5	ранозагоювальний	на щурах
6	антисудомний	стрихніновий
7	стимулюючий	на мікроорганізмах
8	радіопротекторні властивості	на щурах та мишах, 90 % виживання при опроміненні

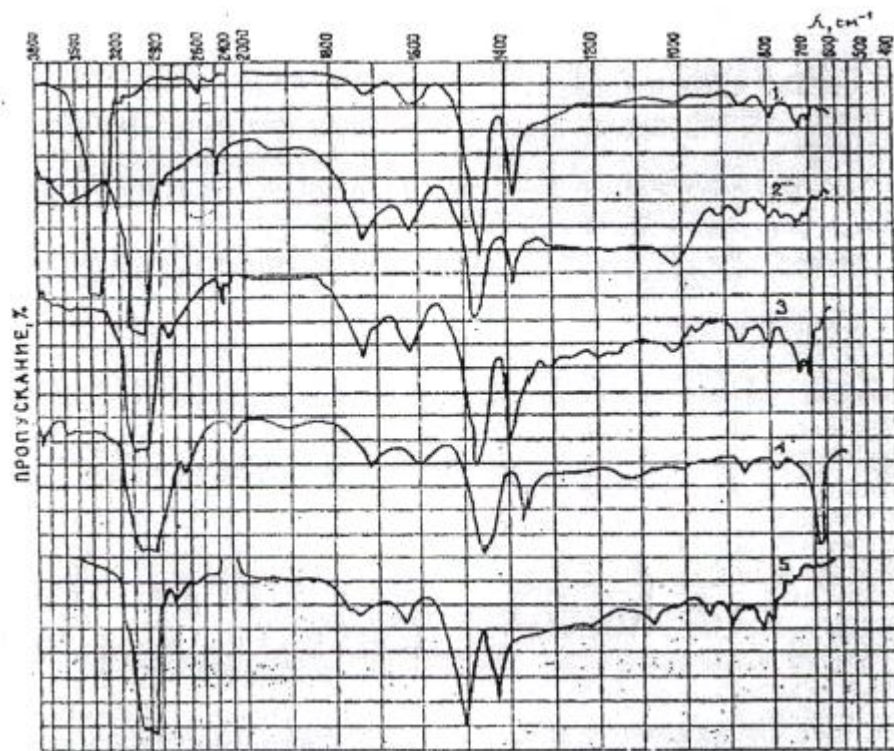
В результаті проведених аналізів отримані результати про нові властивості гумінових кислот, а саме про їх біологічну активність, які можуть бути використані в геохімії, біології та в народному господарстві, як в медицині, так і в сільському господарстві.

Джерела інформації:

1. Глебовская Е.А. Применение инфракрасной спектрометрии в нефтяной геологии. Л.: Недра, 1971.- с. 136.
2. Шакс И.А., Фрайзулина Е.М. Инфракрасные спектры ископаемого вещества. Труды ВНИГРИ, Недра, 1974, - с. 127.
3. Хроматография в тонких слоях. Пер. с нем. под ред. Чмутова, М., 1965.
4. Хроматография, ее теория и применение. Труды Всесоюзного совещания по хроматографии, М., 1960.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

Спосіб визначення біологічної активності гумінових кислот донних відкладів, який полягає у виділенні гумінових кислот з геологічних об'єктів, в отриманні інформації про наявність азотомісних сполук методом інфрачервоної спектрометрії та встановленні складу амінокислот методом тонкошарової хроматографії, який **відрізняється** тим, що гумінові кислоти концентрують до 0,025-0,05 % і визначається їх біологічна активність на основі біотестування.



Комп'ютерна верстка О. Гергіль

ДП "Український інститут інтелектуальної власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601