

ВОЗМОЖНОСТЬ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА БОЭМА ДЛЯ СТАНДАРТИЗАЦИИ ГУМИНОВЫХ ВЕЩЕСТВ САПРОПЕЛЯ

Савченко И.А.¹, Корнеева И.Н.¹, Лукша Е.А.¹

¹ГБОУ ВПО «Омский государственный медицинский университет» Минздрава России, Омск, Россия (644099, Омск, ул. Ленина, 12), e-mail: irina0458@yandex.ru

Разработана методика количественного определения гуминовых веществ, выделенных из сапропеля озера Горчаково Тюкалинского района Омской области и подвергнутых фотохимической активации на стадии выделения. Разработанная методика может в дальнейшем использоваться при стандартизации гуминовых соединений. Количественное определение гуминовых веществ активированных (ГВА) проводили методом Боэма с кондуктометрической индикацией конечной точки титрования. Методика количественного определения активированных гуминовых веществ основана на зависимости показателя удельной электропроводности растворов исследуемых соединений от количества карбоксильных функциональных групп. Валидация методики количественного определения ГВА по таким параметрам, как линейность, правильность и прецизионность, показала возможность включения данного метода в нормативную документацию, регламентирующую качество гуминовых веществ активированных, как источника для получения лекарственных средств.

Ключевые слова: гуминовые вещества активированные, метод Боэма, кондуктометрическое титрование, сапропель.

THE POSSIBILITY OF USING BOEHM'S METHOD FOR STANDARDIZATION OF HUMIC SUBSTANCES SAPROPEL

Savchenko I.A.¹, Korneeva I.N.¹, Luksha E.A.¹

¹Omsk State Medical University Russian Ministry of Health, Omsk, Russia (644099, Omsk, Lenin str., 12). e-mail: irina0458@yandex.ru

The method which uses for the quantitative determination of humic substances extracted from the lake sapropel Gorchakov Tyukalinsk Omsk region and subjected to photochemical activation stage separation was developed. The method can be further used in the standardization of humic compounds. Quantitative determination of activated humic substances (HSA) was carried out by Boehm's method with conductometric indication of the endpoint. Methods of quantitative determination of activated humic substances based on the dependence of the conductivity of solutions of the test compounds on the number of carboxyl functional groups. Validation of methods for the quantitative determination of HSA parameters such as linearity, accuracy and precision, the possibility of incorporating this method into the normative documentation which regulates the quality of activated humic substances as a source of medications.

Keywords: activated humic substances, Boehm's method, conductometric titration, sapropel.

Создание отечественных препаратов на основе сырья природного происхождения является актуальной задачей фармации. Особое значение в этом плане имеет изучение сапропеля как возобновляемого ресурса с высоким лечебно-профилактическим потенциалом. Сапропель распространён в качестве донных отложений в пресноводных водоёмах различных регионов России. Основными биологически активными соединениями представленного образования являются гуминовые вещества. При этом строение и свойства гуминовых веществ находятся в полной зависимости от места происхождения. Следует отметить, что технологические факторы в свою очередь способствуют их изменчивости в плане структуры, полноты извлечения, биодоступности и биологической активности [3,4].

В настоящее время доказано, что гуминовые кислоты являются гетерогенными и полидисперсными соединениями, для которых не установлено точное значение молекулярной массы, в связи с чем невозможно провести количественное определение гуминовых соединений как индивидуальных веществ [4,9]. Согласно данным литературы, биологическая активность гуминовых веществ во многом определяется количеством функциональных групп кислотного характера [1,4].

В связи с чем **целью данной работы** явилась разработка и валидация методики количественного определения гуминовых веществ активированных методом Боэма для включения метода в нормативную документацию, регламентирующую качество выделенных соединений.

Материалы и методы исследования. Объектами исследования явились гуминовые вещества, выделенные из сапропеля озера Горчаково Тюкалинского района Омской области и подвергнутые фотохимической активации на стадии выделения – гуминовые вещества активированные (ГВА). Извлечение ГВА проводили по методике, приведенной в работе [6].

Количественное определение функциональных групп в молекулах гуминовых веществ проводили по методике Боэма с кондуктометрической фиксацией конечной точки титрования на лабораторном анализаторе «Мультитест КСЛ» (НПП Семико, Россия) при температуре $20 \pm 2^\circ\text{C}$, представленной в работе [5].

Методика количественного определения ГВА: 0,25 г гуминовых веществ активированных помещали в мерную колбу на 500 мл, растворяли в 100 мл 0,01 М раствора натрия гидрокарбоната и доводили объем раствора тем же растворителем до метки. Полученный раствор встряхивали на продольном встряхивателе в течение 30 мин и фильтровали через плотный бумажный фильтр для тонких осадков. Затем 25 мл фильтрата при постоянной температуре раствора $25 \pm 1^\circ\text{C}$ титровали 0,01 М раствором кислоты хлористоводородной и определяли показатель удельной электропроводности в конечной точке титрования.

Массовую концентрацию гуминовых веществ активированных определяли, используя градуировочный график зависимости выходного сигнала удельной электропроводности (мСм/м), рассчитанного при титровании карбоксильных функциональных групп методом Боэма, от массы навески гуминовых веществ. Количественное содержание гуминовых веществ активированных в процентах (X) в пересчете на абсолютно сухое сырье рассчитывали по формуле:

$$X = \frac{a \times 500 \times 100 \times 100}{a_1 \times (100 - W) \times 25} \quad (1), \text{ где}$$

a – масса гуминовых веществ активированных в граммах, найденная по калибровочному графику;

a_1 – масса навески гуминовых веществ активированных в граммах, взятая для испытания;

W – потеря в массе при высушивании гуминовых веществ активированных в процентах.

Построение калибровочного графика. 1,0 г гуминовых веществ активированных – стандартного образца, высушенных до постоянной массы, помещали в мерную колбу на 500 мл, растворяли в 100 мл 0,01 М раствора натрия гидрокарбоната и доводили объем раствора тем же растворителем до метки. Из этого раствора готовили серию разбавленных растворов, содержащих гуминовых веществ соответственно 0,0025; 0,005; 0,0075; 0,01; 0,0125 г в 25 мл раствора. Полученные растворы встряхивали на продольном встряхивателе в течение 30 мин и фильтровали через плотный бумажный фильтр для тонких осадков, затем при постоянной температуре раствора $25 \pm 1^\circ\text{C}$ титровали 0,01 М раствором кислоты хлористоводородной и определяли показатель удельной электропроводности в конечной точке титрования.

Статистическую обработку полученных результатов проводили с помощью компьютерной программы Statistica 6.0 for Windows для доверительной вероятности 0,95.

Результаты и их обсуждение

Ранее проведенные исследования показали возможность применения метода Бозма для количественного определения содержания карбоксильных, лактонных и гидроксильных групп в гуминовых веществах. Для включения предложенного метода в нормативную документацию, характеризующую качество гуминовых веществ активированных, оптимальная концентрация растворов, необходимая для проведения испытаний, рекомендуется в линейном диапазоне от 0,01 до 0,05% [5,7].

Нами разработана методика количественного определения активированных гуминовых веществ, основанная на зависимости показателя удельной электропроводности растворов исследуемых соединений от количества карбоксильных функциональных групп. Карбоксильные группы титруются самостоятельно, а не суммарно с другими функциональными группами кислотного характера, поэтому именно по ним проводилась разработка методики количественного определения ГВА.

Следует отметить, что для количественного определения функциональных групп в молекулах гуминовых веществ предлагаемый метод является наиболее приемлемым, так как характеризуется высокой экспрессностью, простотой, доступностью измерительных приборов и достаточной точностью. Однако актуальной остается проблема измерения единиц концентрации. Для включения данного метода в нормативную документацию,

регламентирующую качество гуминовых веществ, необходимо использовать единицы измерения концентрации гуминовых соединений, принятые в фармацевтическом анализе.

При разработке методики в качестве рабочего стандартного образца (РСО) использовали высокоочищенные гуминовые вещества активированные, отвечающие требованиям технических условий [8].

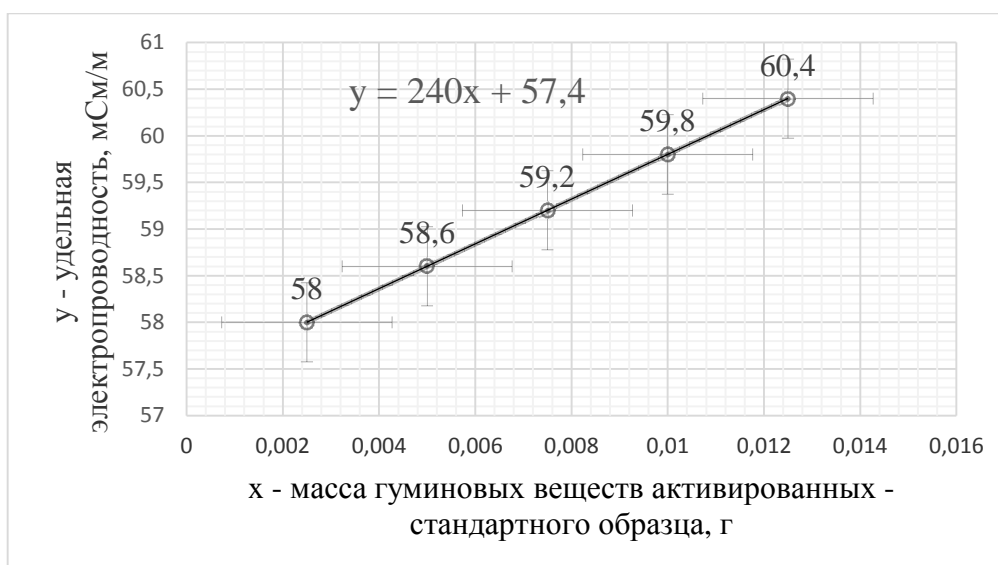
При определении карбоксильных функциональных групп методом Боэма были последовательно зарегистрированы сигналы удельной электропроводности растворов РСО гуминовых веществ активированных в порядке возрастания их концентрации в конечной точке титрования. Для исключения случайных результатов и усреднения данных выполняли три последовательных измерения для каждого из градуировочных растворов. В табл. 1 приведены усреднённые значения удельной электропроводности данных образцов.

Таблица 1

Показатели удельной электропроводности РСО гуминовых веществ активированных в конечной точке титрования при определении карбоксильных групп

№ п/п	Удельная электропроводность, мСм/м	Концентрация раствора ГВА - стандартного образца, %
1	58,0	0,01
2	58,6	0,02
3	59,2	0,03
4	59,8	0,04
5	60,4	0,05

На основании полученных результатов был построен градуировочный график зависимости удельной электропроводности растворов РСО гуминовых веществ активированных в конечной точке титрования от взятой навески гуминовых соединений (рисунок).



*Градуировочный график зависимости показателя удельной электропроводности растворов
PCO ГВА от массы навески*

Количественное содержание исследуемых ГВА в процентах рассчитывали по формуле (1), используя построенный градуировочный график зависимости выходного сигнала удельной электропроводности (мСм/м) от массовой концентрации PCO гуминовых веществ активированных.

Важнейшим критерием оценки аналитической методики служит доказательство ее валидности, включающей взаимосвязанную систему характеристик – специфичность, линейность, прецизионность (воспроизводимость) и точность.

Специфичность методики определяется химической реакцией, лежащей в основе метода. В данном случае на взаимодействии карбоксильных групп в структуре гуминовых веществ с натрия гидрокарбонатом.

Для обоснования линейной зависимости предлагаемой методики строили градуировочный график зависимости показателя удельной электропроводности растворов PCO ГВА от массы навески, рассчитывали уравнение регрессии и коэффициент корреляции. Данные для расчетов представлены в таблице 1, графическая зависимость отражена на графике (рисунок 1). По оси абсцисс – содержание гуминовых веществ активированных, г; по оси ординат – удельная электропроводность растворов ГВА. В результате установлено, что график имеет линейный характер и описывается уравнением $y=240 \cdot x + 57,4$ при навеске гуминовых веществ активированных от 0,01 до 0,05 г. Коэффициент корреляции (r) равен 0,999, что свидетельствует о линейной связи значения удельной электропроводности растворов гуминовых веществ активированных от массы взятой навески. Это позволяет использовать данную методику для количественного определения гуминовых веществ активированных в диапазоне концентраций 0,01-0,05%.

Статистическая обработка результатов количественного определения гуминовых веществ активированных представлена в табл. 2.

Таблица 2

Метрологическая характеристика методики количественного определения гуминовых веществ активированных

n	X_{cp}	S^2	S	S_r	$t(0,95)$	$X_{cp} \pm \Delta x$
10	97,78	2,37	0,648	$1,57 \times 10^{-2}$	2,26	$97,78 \pm 1,1$

Результаты анализа образцов показали, что содержание гуминовых веществ активированных в исследуемой субстанции составляет $97,78 \pm 1,1\%$.

Для установления прецизионности (воспроизводимости) проводили 7 параллельных определений, затем вычисляли величину стандартного отклонения (SD) и относительного стандартного отклонения (RSD) (табл. 3).

Таблица 3

Результаты анализа прецизионности методики количественного определения исследуемых гуминовых веществ активированных

№ п/п	Найденное содержание гуминовых веществ активированных, %	Метрологические характеристики
1	97,3	$X_{cp}=97,6 \%$ $SD=5,143 \times 10^{-1}$ $RSD=5,30 \times 10^{-3} \%$
2	98,4	
3	96,5	
4	99,2	
5	98,6	
6	96,9	
7	96,3	

В разработанной методике величина относительного стандартного отклонения менее 5%, что характеризует надежность анализа в выбранных условиях [2].

Точность аналитической методики количественного определения подтверждалась на всем диапазоне применения. Оценка проводилась путем сравнения полученного результата с ожидаемым значением. Для определения точности методики проанализировали 9 образцов на 3 уровнях концентраций в пределах аналитической области. В результате получены 9 значений открываемости (R), для которых вычисляли величину стандартного отклонения (SD) и относительного стандартного отклонения (RSD) (табл. 4).

Таблица 4

Результаты определения точности методики количественного определения гуминовых веществ активированных

№ п/п	Уровень	Навеска ГВА, г	Найденное содержание ГВА, %	Расчетное содержание ГВА, %	Открываемость (R), %	Метрологические характеристики
1	1	0,0996	39,15	39,80	98,37	$R_{cp}=99,63\%$ $SD=0,279$ $RSD=2,80 \times 10^{-3} \%$
2	1	0,1011	39,95	40,40	98,88	
3	1	0,1029	41,08	41,21	99,69	
4	2	0,1502	59,91	60,10	99,69	

5	2	0,1508	60,24	60,30	99,90
6	2	0,1511	60,46	60,4	100,1
7	3	0,2455	98,5	98,6	99,90
8	3	0,2491	98,6	98,6	100
9	3	02498	98,7	98,6	100,1

Анализ результатов определения точности методики показал, что теоретические и экспериментальные значения количественного содержания гуминовых веществ активированных практически полностью совпадают. Величина относительного стандартного отклонения (RSD) не превышает 5%, а открываемость R составляет в среднем 99,63%, что характеризует точность методики как удовлетворительную [2]. В связи с чем в проект фармакопейной статьи предприятия, регламентирующий качество активированных гуминовых веществ, заложен показатель количественного содержания ГВА не менее 95%.

Заключение. Таким образом, установлено, что предлагаемая методика количественного определения гуминовых веществ активированных является специфичной, воспроизводимой, точной и линейной в диапазоне концентраций 0,01-0,05%, что позволяет рекомендовать разработанную методику для контроля качества гуминовых веществ активированных, как источника для получения лекарственных средств.

Список литературы

1. Бузлама А.В., Чернов Ю.Н. Анализ фармакологических свойств, механизмов действия и перспектив применения гуминовых веществ в медицине // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2010. – Т. 73. – № 9. – С. 43-48.
2. ГОСТ Р ИСО 5725-2002 «Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений» В 6 ч. – Введ. 23.04.02. – М.: Госстандарт России; Изд-во стандартов, 2002.
3. Зыкова М.В. К вопросу об исследованиях биологической активности гуминовых кислот // Материалы VIII Всероссийской с международным участием научной школы «Болота и биосфера». – Томск: ТГПУ. – 2012. – С. 47-56.
4. Орлов Д.С. Свойства и функции гуминовых веществ // Гуминовые вещества в биосфере. – М., 1993. – С. 16-27.
5. Савченко И.А., Корнеева И.Н., Плаксин Г.В., Лукша Е.А., Гончаров Д.С. Новый подход к решению проблемы стандартизации гуминовых кислот // Современные проблемы науки и образования. – 2013. – № 3; URL: www.science-education.ru/109-9305.

6. Савченко И.А., Корнеева И.Н., Плаксин Г.В., Лукша Е.А., Гончаров Д.С. Изменение свойств гуминовых веществ под воздействием УФ-света // *Фундаментальные исследования*. – 2013. – №10. Ч. 12. – С. 2705-2709.
7. Савченко И.А., Корнеева И.Н., Гончаров Д.С., Лукша Е.А. Изучение структурных особенностей гуминовых веществ // *Современные проблемы науки и образования*. – 2014. – № 2; URL: www.science-education.ru/116-12575.
8. Савченко И.А. Химико-фармацевтическое исследование гуминовых веществ сапропеля озера Горчаково: Автореф. дис. канд. фарм. наук: – Улан-Удэ, 2015. – 22 с.
9. Milori D. M. B. P., Martin-Neto L., Bayer C., Mielniczuk J., Bagnato V. S. Humification Degree of Soil Humic Acids Determined by Fluorescence Spectroscopy // *Soil Science*. – Vol. 167. – No. 1. – 2002. – pp. 739–749.

Рецензенты:

Степанова И.П., д.б.н., профессор, заведующий кафедрой химии ГБОУ ВПО «Омский государственный медицинский университет» Минздрава России, г. Омск;

Кривцова Л.А., д.м.н., профессор, заведующий кафедрой педиатрии ПДО ГБОУ ВПО «Омский государственный медицинский университет» Минздрава России, г. Омск.