

Министерство Здравоохранения Республики Узбекистан

Ташкентский Фармацевтический институт

На правах рукописи

Рахыметбаева Камила Шаяхметовна

## ИЗУЧЕНИЕ АЛКАЛОИДОВ *PEGANUM HARMALA*

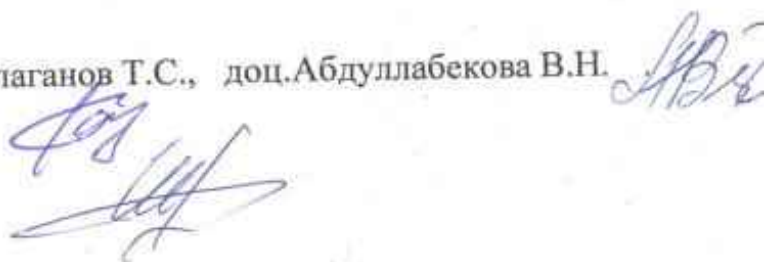
Специальность: 5A720503 - Фармацевтическая химия и Фармакогнозия

Для получения магистерской степени

### ДИССЕРТАЦИЯ

Научный руководитель: к.ф.д.Тулаганов Т.С., доц.Абдуллабекова В.Н.

Оппонент: доц. Ганиев А. К.



Ташкент - 2008

“ТАСДИКЛАЙМАН”

Кафедра мудири

“28” август 2007 й

МАГИСТРЛИК ДИССЕРТАЦИЯСИНИ ЁЗИШ  
БЎЙИЧА ТОПШИРИҚЛАР

Тошкент фармацевтика институти ректорининг 200 й “ ”

-сон буйруғи билан тасдиқланган фармацевтовосека кимшия  
кафедраси буйича

Илмий раҳбар Илмий раҳбарнинг исми-фамилияси, лавозими, илмий даражаси ва илмий унвони  
Илмий раҳбарнинг исми-фамилияси  
магистрлик диссертациясининг номи

мавзудаги магистрлик диссертацияси

Илмий раҳбар к.ф.ғ. Туманова Т.С. да фармацевтовосека кимшия кафедрасига дастлабки химоя учун такдим этилади.  
Илмий раҳбарнинг исми-фамилияси, лавозими, илмий даражаси ва илмий унвони

Илмий раҳбарнинг исми-фамилияси  
томонидан

тугалланган холда 200 8 й “10” июнь да фармацевтовосека кимшия кафедрасига дастлабки химоя учун такдим этилади.

Тадқиқот ишида Илмий раҳбарнинг исми-фамилияси, лавозими, илмий даражаси ва илмий унвони  
Илмий раҳбарнинг исми-фамилияси фойдаланилади  
Фармацевтика соҳаси, тиббиёт соҳаси буйича чоп этилган адабиётлардан, замонавий усул ва услублардан ва х.к.)

Ишда Илмий раҳбарнинг исми-фамилияси, лавозими, илмий даражаси ва илмий унвони  
Илмий раҳбарнинг исми-фамилияси берилиши кўзда тутилади

Ишда куйидаги масалалар баён этилади:

- 1-боб Общая характеристика алкалоидов, их выделения, разделение, методов идентификации и фармакологического действия  
(номи)
- 2-боб Выделение алкалоидов и Веранит хатмало, идентификация выделенных алкалоидов  
(номи)
- 3-боб Бузилабко и цеверисексывование методов анализа алкалоидов Веранит хатмало. Бузилабко метода кимшия кимшия алкалоидов в растительном сырье и цеверисексывание в анализе алкалоидов  
(сана, ой, йил)

Илмий раҳбар к.ф.ғ. Туманова Т.С. да фармацевтовосека кимшия кафедрасига дастлабки химоя учун такдим этилади.  
Илмий раҳбарнинг исми-фамилияси, лавозими, илмий даражаси ва илмий унвони

Магистрант 200 7 й “28” август да топшириқни қабул қилди.

## Оглавление

Введение

### I. Литературный обзор

1.1. Общая характеристика алкалоидов	-6
1.1.1. Распространение алкалоидов в природе	-6
1.1.2. Классификация алкалоидов	-7
1.1.3. Выделение, разделение и методы анализа алкалоидов	-8
1.2. Общая характеристика растения <i>Peganum harmala</i> L.	-10
1.2.1. Алкалоиды <i>Peganum harmala</i> L.	-11
1.3. Фармакологические свойства алкалоидов <i>Peganum harmala</i> L.	-19

### II. Экспериментальная часть

2.1. Выделение и идентификация алкалоидов <i>Peganum harmala</i> L.	
2.1.1. Объекты и методы исследования получения экстракта.	-21
2.1.2. Получение суммы алкалоидов из растения <i>Peganum harmala</i> L. традиционным методом	-23
2.1.3. Получение суммы алкалоидов из растения <i>Peganum harmala</i> методом ионообменной хроматографии	-24
2.2.1. Выделение и разделение суммы алкалоидов из растения, собранного в стадии цветения и начала плодоношения .	-27
2.2.2. Идентификация выделенных алкалоидов	-28
2.2.3. Идентификация дезоксипеганина гидрохлорида	-30
2.2.4. Идентификация пеганола	-32
2.2.5. Идентификация пегамина	-35

2.3. Разработка и усовершенствование методов анализа алкалоидов <i>Peganum harmala</i> L.	
2.3.1. Разработка количественного определения методом титрования	-39
2.3.2. Разработка количественного определения дезоксипеганина гидрохлорид выделенного из растительного сырья методом УФ-спектрофотометрии	-41
2.3.3. Разработка количественного определения дезоксипеганина гидрохлорид выделенного из растительного сырья методом хроматоспектрофотометрии	-45
III. Выводы	-49
IV. Список литературы.	-50

## Введение.

### Актуальность работы.

Лекарственные растения и их препараты издавна используются для лечения и профилактики ряда различных заболеваний.

В настоящее время интерес к растительным лекарственным препаратам значительно возрос. Это связано с содержанием в них различных биологически активных соединений, возможностью длительного применения без риска возникновения побочных явлений, гармоничному сочетанию и взаимодействию БАВ, содержащихся в ЛРС. Совокупность действующих веществ обеспечивает высокую эффективность и широкий спектр их применения.

Флора Узбекистана очень богата лекарственными растениями. Одним из таких растений является Гармала обыкновенная. Гармала обыкновенная – типичный алкалоидонос, первые алкалоиды из неё выделены в середине 19 века. Выделенные алкалоиды относятся к четырём различным типам: хинолиновые, индольные, хинозолиновые и хинозолоновые,  $\beta$ -карболиновые. [1,2]

Фармакологические испытания алкалоидов показали перспективность исследований.[53]

### Цель и задачи исследования.

Целью настоящего исследования является изучение, выделение, идентификация алкалоидов растения *Peganum harmala*. Разработка методик контроля качества дезоксипеганина гидрохлорид с использованием современных физико-химических методов (ТСХ, УФ-спектрофотометрия).

Для достижения поставленной цели необходимо было решить следующие задачи:

- Выделение суммы алкалоидов растения *Peganum harmala*

- Идентификация выделенных оснований непосредственным сравнением их с истинными образцами, физико-химических и спектральных данных.

- Разработка методик количественного определения суммы алкалоидов и дезоксипеганина гидрохлорид.

### **Научная новизна.**

Из надземной части растения *Peganum harmala*, произрастающего в Ташкентской области, выделены и идентифицированы 3 алкалоида, разработаны методы количественного определения УФ-спектрофотометрическим методом, методом титрования, а также хроматоспектрофотометрическим методом

### **Практическая значимость.**

Учитывая популярность этого растения в народной медицине, большую сырьевую базу, было целесообразно исследовать алкалоидный состав этого растения. Разработанные методы анализа могут быть использованы в разработке НТД на лекарственные препараты получаемые из растения *Peganum harmala*.

# I. Литературный обзор

## 1.1. Общая характеристика алкалоидов

Алкалоидами называют азотосодержащие органические соединения гетероциклического строения, обладающие ярко выраженным физиологическим действием на организм человека и животных. Большинство алкалоидов обладают сложным строением. Основные свойства, характерные для этих соединений, обусловили их название: алкалоид -подобный щелочи. [10,11]

Алкалоиды являются продуктами обмена веществ в растениях. Долгое время биологические функции алкалоидов в растительном организме были неясны. Чаще их считали конечными продуктами обмена веществ, или иными экстрактами. [12]

Однако было доказано, что алкалоиды активно вовлекаются в обменные процессы. Возможно, алкалоиды также защищают растения от поедания животными, т.е. являются антифедантами. [3]

Лечебные и ядовитые свойства экстрактов многих растений были известны ещё в глубокой древности. Строение первого алкалоида – конина - было установлено в 1886 г., и после этого развитие химии алкалоидов пошло вперед гигантскими шагами. [10]

### 1.1.1. Распространение алкалоидов в природе

Алкалоидоносные растения составляют примерно около 10% всей мировой флоры. Наиболее богаты по количеству алкалоидоносных родов и видов следующие семейства: Equisetaceae, Lycopodiaceae, Ranunculaceae, Fabaceae, Rutaceae, Cactaceae, Puniaceae, Loganiaceae, Apocynaceae, Boraginaceae, Solanaceae, Rubiaceae.

В ходе эволюции высшие растения выработали так называемую метаболическую экскрецию, делающую возможным накопление вторичных соединений в продуцирующем их организме, но вне метаболически

активных центров – обычно в вакуолях и клеточной стенке. Алкалоиды обнаруженные у животных не всегда синтезируются самим организмом, иногда их происхождение связано с характером пищи. В большинстве случаев алкалоиды находятся в растении в виде солей органических и неорганических кислот. Локализируются преимущественно в определенных органах растений. Содержание алкалоидов в тканях обычно составляет десятые-сотые доли процента и редко достигает до 10-15%. [3,5]

### 1.1.2. Классификация алкалоидов

Большое количество алкалоидов, разнообразие их строения, а также не полная изученность около трети выделенных алкалоидов не дают возможности разработать четкую классификацию алкалоидов.

Большинство ученых за основу классификации алкалоидов берут природу гетероциклов, входящих в их молекулы. Другие отступают от этого принципа и выделяют в отдельные группы алкалоиды некоторых семейств или родов. Например, алкалоиды спорыньи, алкалоиды пасленовых, алкалоиды амариллисовых и т.д.

Кроме того, алкалоиды классифицируются по разработанной академиком А.П.Ореховым системе:

1. Ациклические алкалоиды и алкалоиды с азотом в боковой цепи.
2. Пирролидиновые и пирролизидиновые алкалоиды.
3. Пиридиновые и пипиридиновые алкалоиды.
4. Алкалоиды с конденсированными пирролидиновым и пиперидиновым кольцами.
5. Хинолизидиновые алкалоиды.
6. Хинолиновые алкалоиды.
7. Изохинолиновые алкалоиды.
8. Индольные алкалоиды.
9. Хиназолиновые алкалоиды.
10. Пуриновые алкалоиды.

11. Дитерпеновые алкалоиды

12. Стероидные алкалоиды и гликоалкалоиды. [10]

### 1.1.3. Методы анализа алкалоидов

Для доказательства присутствия алкалоидов в лекарственном растительном сырье используют общие осадочные реакции с йодидами тяжелых металлов, кремневольфрамовой, фосфорновольфрамовой, пикриновой кислотами и другими реактивами, которые дают с алкалоидами осадки. Специфические реакции на отдельные алкалоиды зависят от их химической структуры и функциональных групп в молекуле. [51]

Для проведения качественных реакций готовят извлечения с помощью подкисленной воды фильтруют его, после чего с фильтратом проводят общие осадочные реакции на алкалоиды.

Для количественного определения алкалоидов применяют исчерпывающую экстракцию, гарантирующую их полный переход в вытяжку. При этом стремятся, чтобы при экстракции в вытяжку переходило как можно меньше сопутствующих веществ, усложняющих очистку извлечения.

Методики выделения алкалоидов делятся на две главные группы: экстракция в виде солей и экстракция в виде свободных оснований. [11]

В первом случае растительное сырье обрабатывается подходящим растворителем, к которому прибавляется небольшое количество какой-либо кислоты (уксусной, соляной, винной, лимонной и др.). Экстракция ведется обычно в перколяторах. Ещё более совершенной является непрерывная перколяция. Этим путем удастся получить более концентрированные растворы алкалоида и обойтись с меньшим количеством растворителя. [14]

Соли алкалоидов обычно растворимы в воде и в спиртах (метиловом, этиловом) и нерастворимы в эфире и углеводородах. Поэтому при извлечении алкалоидов в виде солей в качестве растворителя обычно применяется вода или спирт. Но этот способ извлечения алкалоидов имеет большой недостаток, так как из растений наряду с алкалоидами извлекается другие «экстрактивные

вещества» (белки, смолы, дубители и др.), которые затрудняют обработку этих растворов.

Для проведения экстракции алкалоидов в виде свободных оснований необходимо предварительно выделить алкалоиды, находящиеся в виде солей, что достигается обработкой щелочью. Для этого слегка влажный порошок растительного сырья тщательно смешивают с сухим основанием; или смачивают и тщательно растирают с раствором щелочи и только потом подвергают экстракции. Экстракцию ведут путем перколирования. [16]

Экстракты, полученные тем или иным способом, содержат алкалоиды, в виде солей или уже в свободном виде, и поэтому дальнейшая обработка делится на следующие группы:

#### А) Кислые, водные, спиртовые экстракты.

Для выделения алкалоидов из водных, кислых растворов их солей эти растворы подщелачиваются и алкалоиды высасываются или же извлекаются подходящим растворителем, не смешивающимся с водой.

В случае спиртовых кислых растворов необходимо сначала удалить спирт.

В последнее время для выделения алкалоидов из водных или кислых диффузионных соков применяется метод адсорбции. [18]

В качестве адсорбента обычно применяются угли и ионообменные адсорбенты: природные глины или искусственные смолы. [10,11]

Адсорбция алкалоидов осуществляется механическим перемешиванием раствора с адсорбентом или пропусканием раствора через колонки, наполненные ионообменными смолами.

#### Б) Щелочные экстракты.

Растворы свободных алкалоидов, полученные путем щелочной экстракции растения содержат меньше балластных веществ.

Разделение алкалоидной смеси проводят следующими способами:

#### А) Разделение алкалоидов на основании температур кипения.

#### Б) Методы, основанные на различии растворимости.

В) Разделение на основании различия «силы основности»

Г) Разделение на основании различной адсорбционной способности (хроматография) [19]

Д) Разделение путем получения производных.

Для определения количества алкалоидов в полученных очищенных извлечениях обычно используется нейтрализации алкалоидов-оснований. В последние годы стали широко применять физико-химические методы — фотоэлектроколориметрические, спектрофотометрические, поляриметрические, хроматоспектрофотометрические методы, метод ВЭЖХ и т.д. [52]

## 1.2. Общая характеристика растения *Peganum harmala*

На территории СНГ встречается два вида растений, относящихся к роду *Peganum* : *P. harmala* L. — гармала обыкновенная и *P. nigellastrum* Bge. — гармала чернушкообразная. До настоящего времени нет единого мнения о систематическом положении этого рода. Энглер рассматривает его в семействе *Zygophyllaceae*, Тахтаджян выделяет в отдельное семейство *Peganaceae*. [1]

*Peganum harmala* L. - многолетнее травянистое растение из семейства парнолистниковых высотой около 50 см с мощным многоглавым корнем до 2-3 м длины, вертикально уходящим в почву к водоносным слоям. Стебли высотой 30-80 см, разветвленные, голые, зеленые. Листья очередные, короткочерешковые, сидячие, глубоко трех-, пятираздельные, с линейными острыми долями. Цветки желтые или белые, крупные, на цветоножках одиночные или до 3 на концах ветвей. Чашечка, остающаяся при плодах, почти до основания пятираздельная, доли ее линейные, заостренные, цельные или слегка надрезанные. Венчик из 5 эллиптических лепестков, длиной 1,5-2 см. Тычинок 15. Плод - шаровидная, несколько приплюснутая коробочка, диаметром 6-10 мм трехгнездная с перегородками. Семена коричневые или буровато-серые, клиновидные, трехгранные, длиной 3-4 мм, с бугорчатой поверхностью. Цветет в мае-июле, созревает в июле-августе. Имеет сильный специфический запах.

Г. чернушкообразная — также травянистый многолетник, но мельче, чем г. обыкновенная, широко распространенная в Средней Азии и Казахстане. Г. чернушкообразная менее распространена, произрастает в Монголии и Восточной Сибири. [3,50]

Сведения о полезных свойствах и химическом составе г. чернушкообразной ограничены. Растение не поедается скотом, содержит алкалоиды. Г. обыкновенная издавна известна народам Востока и активно применяется в народной медицине. Местные названия — могильник, адраспан, исрик, юзарлик, хазараспанд, испанди, хармал, белобок, бибик, гармань, мариам-сакмела; многие из них переводятся как средство от всех болезней. Гармала упоминается в трудах Авиценны [4], отмечается ее потогонное, противоглистное действие, ванны из травы считаются хорошим средством от ревматизма, чесотки, настои и отвары обладают успокаивающим, противовоспалительным действием, дымом растения окуривают помещение для дезинфекции, из семян добывают красную краску и масло. [6]

### 1.2.1. Алкалоиды *Peganum harmala*

Таблица 1

#### Содержание алкалоидов в Гармале обыкновенной

№ п/п	Орган растения	Место и время сбора	Период вегетации	Сумма алкалоидов	Выделенные алкалоиды
1	2	3	4	5	6
1	<i>Peganum harmala</i> Надземная часть	Узбекистан Сирдаринская обл., Июль 1965 г	Цветение начало плодоношения	1,3	2-10, 12-14, 16,17
2	„	„ 18,апреля ,1967 г.	Бурный рост	1,8	2,6,8,
3	„	„ 14 сентября 1967 г	Конец Вегетации	0,5	2,5,8
4	„	„ 11 апреля 1968 г	Бурный рост	2,17	2,5,6,8, 11,12,15
5	„	„ 5 мая 1968 г	Цветение	1,95	2,5,6,8
6	„	„,25 мая 1968 г	Цветение	1,95	2,5,6,8

		Орда, 22 мая 1976 г			
24	..	Узбекистан, Сырдаринская обл, 12 апреля 1976 г	Бутонизация	1,05	8,12
25	..	.. 15 мая 1977 г	Цветение	1,78	8
26	..	Узбекистан. Бухарская обл. 16 мая 1977 г	Цветение	2,29	8,12
27	..	Таджикистан, Окрестности Ленинобада. 27 мая 1977 г	Цветение Начало плодоношения	1,35	8,12
28	..	Узбекистан Бухарская обл. 2 июня 1977 г	Плодоношение	2,00	8,12
29	..	Кыргызстан. долина р. Талас 1 июня 1977 г	Цветение	1,74	8,12
30	..	Узбекистан Сырдаринская обл 22 апреля 1978 г	Бурный рост	2,50	8,12
31	..	.. 14 мая 1978 г	Начало цветения	1,42	8,12
32	..	Туркмения окрестности Красноводска 18 июля 1978 г	Цветение, Начало плодоношения	1,22	8,12
33	..	Джунгарский Алатау бас, р. Усек 29 июля 1978 г	..	1,64	8,12
34	..	Узбекистан Алтайский хребет с. Шахимардан 3 апреля 1978 г	Бурный рост	2,00	8,12
35	..	Кыргызстан Сулеймантаг 2 мая 1978	..	1,75	8
36	Надземная часть с семенами	Узбекистан Сырдаринская обл сентябрь 1978 г	Конец вегетации	2,61	
37	..	Монголия	Конец	1,40	2,5,6,8

		Заалтайский Гоби август 1979 г	цветения начало плодоношения		
38	..	Кыргыстан ущелье р.Маргунь 25 апреля 1979 г	Бурный рост	1,36	8,12
39	..	Южный Алтай ущелье р. Курчум 1991 г	Начало бутонизации	2,70	3,8
40	<i>Peganum nigellastru m</i> Надземна я часть	Монголия Южногобийский аймак июнь 1975 г	Цветение	1,57	2,6,8
41	..	.. 1976 г	Конец цветения начало плодоношения	0,30	2,5,6,8,12
42	Корни	..	..		4,5

Таблица 2

Алкалоиды гармалы выделенные из растения *Peganum harmala*

№	Алкалоид, состав	T <sub>пл/кв</sub> [D]	Соли и производные
1.	Вазикол C <sub>11</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Масло 203-204	O,N-диацетат 130, хлоргидрат 232-233,
2.	(-)Вазичинон C <sub>11</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	129	нитрат 140 (p), O-ацетат
3.	(+)Вазичинон C <sub>11</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>		133-134 хлоргидрат 234-
4.	Гармалин C <sub>13</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub> O	250- 251	235, нитрат 149 (p),
5.	Гармин C <sub>13</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O	257-258	йодгидрат 232-235, пикрат
6.	Дезоксивазичинон C <sub>11</sub> H <sub>10</sub> N <sub>2</sub> O	110-111	228-229
7.	(-)Пеганин C <sub>11</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O	211-212 -189	Хлоргидрат 205-207, нитрат 130 (p), пикрат 211
8.	(+)Пеганин C <sub>11</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O	198-199	Хлоргидрат 203-204, нитрат 168-169 (p), пикрат
9.	Хинальдин	Масло	193-194 Пикрат 187

10.	Хинолин	Масло	Пикрат 201-202
11.	Дезоксипеганидин $C_{11}H_{12}N_2$	76-79	Нитрат 155-157 Пикрат 176
12.	Дезоксипеганин $C_{11}H_{12}N_2$	92	Хлоргидрат 255-256, перхлорат 251, йодгидрат 270
13.	Дипегин $C_{22}H_{20}N_4O_2$	221-223	
14.	Изопеганидин $C_{14}H_{16}N_2O_2$	169-170	Пикрат 177-178
15.	Пегамин $C_{11}H_{12}N_2O_2$	161	Перхлорат 192-193, О- ацетат 173-174
16.	Пеганидин $C_{14}H_{16}N_2O_2$	189-190	Хлоргидрат 192 (p) Пикрат 181-183
17.	Пеганол $C_{11}H_{12}N_2O$	178-180 (p)	Нитрат 137-138

Известно, что количественный и качественный состав многих алкалоидоносных растений зависит от периода вегетации, места произрастания, органа растения, поэтому детально изучена надземная часть, семена, корни гармалы обыкновенной из разных мест произрастания в различные периоды вегетации. [11] Выделено 17 алкалоидов: вазикол, вазичинон, гармин, дезоксивазичинон, (-)пеганин, (+)пеганин, хинальдин, хинолин, дезоксипеганин, дезоксипеганидин, дипегин, изопеганидин, пегамин, пеганидин, пеганол.

Несмотря на существенные морфологические различия между указанными видами гармалы, качественный состав алкалоидов у них одинаков (см.табл.1). По мере роста растения сумма оснований в надземной части уменьшается, в ней присутствуют пеганин, вазичинон, дезоксивазичинон. Соотношение между ними колеблется и зависит как от места произрастания, так и от стадии вегетации. Молодые корни содержат вдвое больше алкалоидов, чем старые, в семенах и корнях преобладают гармин и гармалин. По мере развития растения снижается количество пеганина и увеличивается содержание вазичинона и дезоксивазичинона, к концу вегетации накапливается гармин. Количество

дезоксипеганина в растении незначительно (0,006—0,06%) и мало меняется по мере роста. [20,48]

Основания, выделенные из гармалы, относятся к двум типам: хиназолину, представителем которого является пеганин, и хиназолону, к которому принадлежит вазицинон. В основаниях типа пеганина (дезоксипеганидин, дезоксипеганин, изопеганидин, пеганидин) в УФ-спектре присутствуют два максимума поглощения при 222—225 и 295—303 нм, для пеганола наблюдается гипсохромный сдвиг. В основаниях типа вазицинона проявляется 5 максимумов поглощения при 220, 267—272, 302—306, 314, 318 нм. Конъюгированная система двойных связей в хиназолинах и хиназолоних дает характерные полосы поглощения в ИК-спектрах в области 1630—1585 и 1505—1460  $\text{см}^{-1}$ . Кроме того, в основаниях типа вазицинона присутствует сильная полоса амидного карбонила (в пегамине-1695  $\text{см}^{-1}$ ), а в алкалоидах дезоксипеганидине, изопеганидине, пеганидине — интенсивная полоса  $\text{C}=\text{O}$ -группы в области 1700—1710  $\text{см}^{-1}$ . Хианзолиновые алкалоиды легко окисляются в хианзолоновые производные при действии  $\text{KMnO}_4$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$  или кислородом воздуха при хранении. Так, из дезоксипеганидина, дезоксипеганина, пеганола получен дезоксивазицинон, а из пеганидина, пеганина — вазицинон. Гидроксильная группа в кольце С легко замещается на хлор в алкалоидах изопеганидине, пеганидине с образованием хлордезоксипроизводных, которые после восстановления  $\text{Zn/H}$  образуют дезоксипеганин и дезоксипеганидин соответственно. [25, 22]

При окислении дезоксипеганина  $\text{KMnO}_4$  в кислой среде или при взаимодействии его с бромсукцинимидом в хлороформе получили пеганол. [18,23]

При восстановлении вазицинона и дезоксивазицинона цинком в кислой среде образуется дезоксипеганин [15,21]. Полярграфическое же восстановление этих алкалоидов дает соответствующие карбиноламини [24,36].

Масс- и ПМР-спектры хиназолиновых и хиназолоновых алкалоидов имеют существенные отличия:

В масс-спектрах оснований пеганина и дезоксипеганина наиболее интенсивными являются пики ионов с  $m/z$  171 и 187 соответственно. Интенсивность  $M^+$  составляет 50—60% в случае, если положение 4 не замещено, и 10-12%-при наличии заместителя при С-4 (дезоксипеганидин, дезоксипеганин, изопеганидин, пеганидин, пеганол). Интенсивность остальных ионов незначительна.[35,37]

В спектрах хиназолоновых алкалоидов наиболее интенсивными являются пики ионов  $M^+$  и  $(M-1)^+$ . В спектре пеганина основным является пик иона с  $m/z$  160. В ПМР-спектрах алкалоидов пеганина и дезоксипеганина присутствует характеристичный сигнал при 4,5 м. д. в виде двухпротонного синглета от С-4 метиленовых протонов. Отметим, что в вазиколе и его производных сигнал бензильной метиленовой группы расщепляется на дублет или квартет. При наличии заместителя у С-4 (дезоксипеганидин, изопеганидин, пеганидин) сигнал С-4-метиленового протона сдвигается в область 5,02—5,14 м. д. и расщепляется соседней группой на триплет. В случае пеганола наблюдается однопротонный синглет при 5,80 м. д. При отсутствии заместителя при С-9 метиленовые протоны резонируют в области 2,70—3,40 в виде мультиплета, если же при С-9 имеется ОН-группа, то сигнал 9-Н проявляется в виде триплета в области 4,70—5,00 м. д.

В ПМР-спектрах вазизинона, дезоксивазицинона, пеганина наиболее характерным является сигнал, сдвинутый в слабое поле примерно на 0,5 м. д. по сравнению с сигналами остальных ароматических протонов под анизотропным влиянием карбонильной группы в периположении.[38,45]

Хиназолиновые и хиназолоновые основания по разному ведут себя при восстановлении  $NaBH_4$  [27]. В вазизиноне и дезоксивазициноне сохраняется С = О-группа, восстанавливается С=N- связь. Дезоксипеганин и пеганол восстанавливаются с разрывом кольца В и образованием производного анилина.

Пеганин же образует как дигидро-, так и тетрагидропроизводные. В УФ-спектрах продуктов восстановления имеется два максимума при 222 и 240 m/z. Полоса поглощения C=O-группы смещается в длинноволновую область (1635—1620 см<sup>-1</sup>) по сравнению с исходными соединениями. [28,46]

В УФ-спектрах тетрагидропроизводных обнаруживаются максимумы поглощения при 237 и 288 нм, совпадающие с таковыми анилина. Отсутствие связи между N-1 и C-2 сглаживает разницу между восстановленными производными хиназолинов и хиназолонов и стимулирует разрыв связи C-2—C-9 под электронным ударом. Удаление цепочки C-9—C-10 приводит к образованию устойчивых ионрадикалов с m/z 146 и 160 соответственно. [43]

Удалением цепочки C-9—C-11 из молекулярных ионов образуются ионы с m/z 131 и 147, причем водород мигрирует к нейтральному или заряженному фрагменту соответственно. Распад продуктов восстановления дезоксиpegанина и пеганина происходит по аминокбензильной связи с образованием аминотропилиевого (m/z 106) и пирролидиниевых ионов (m/z 70 и 86 соответственно). Дигидропроизводные пеганина, дезоксивазицинона и вазицинона при хранении самопроизвольно дегидрируются в исходные соединения — пеганин, дезоксивазицинон, вазицинон. Более того, в последнем случае помимо вазицинона получен еще дезоксивазицинон, т. е. произошло восстановление OH-группы [29,47].

Полосы поглощения замещенных хиназолонов претерпевают bathochromный сдвиг по сравнению с незамещенными ( $\lambda_{\text{max}}$ , 237, 276—280, 287—289, 319—322, 332—343 нм). Гидроксильная группа в положениях 5,8 в хиназолоновых и хиназолиновых производных обладает слабыми фенольными свойствами. УФ-спектры замещенных и незамещенных хиназолиновых оснований совпадают.

В масс-спектрах хиназолиновых соединений независимо от характера и положения заместителя, как и в дезоксиpegанине, максимальным является пик иона (M-1)<sup>+</sup>, в случае метоксипроизводных наблюдается последовательное элиминирование CH<sub>3</sub> и CO. В триметиленхиназолинах процесс распада кольца

Слабо выражен, в пентаметиленхиназолинах он приобретает более отчетливый характер. Масс-спектры гидрокси-хиназолоновых оснований мало отличаются друг от друга и аналогичны спектру дезоксивазицинона. В спектрах метоксихиназолонов преобладают процессы, связанные с участием метоксила. [49]

Хиназолиновые и хиназолоновые основания по-разному ведут себя в реакциях бромирования.

Изучены скорости фотохимического окисления хиназолиновых оснований: пеганина, пеганола, дезоксипеганина, пентаметилен-хиназолина в соответствующие оксопроизводные. Устойчивость соединений в перечисленном ряду уменьшается слева направо. С помощью ВЭЖХ-анализа на примере дезоксипеганина показали, что процесс окисления идет через образование карбиноламина (дезоксипеганин  $\rightarrow$  пеганол  $\rightarrow$  дезоксивазицинон). Отметим некоторые необычные реакции пеганина и вазицинона. При метилировании пеганола йодистым метилом в диоксане в присутствии NaH получили 4-гидрокси-9-метоксидезоксипеганин, а дезоксипеганин в этих условиях образует пеганол [32,34].

### 1.3. Фармакологические свойства алкалоидов *Peganum harmala*

Как отмечалось ранее, растение широко используется в народной медицине при разных заболеваниях, как например, простудных, желудочно-кишечного тракта, малярии и др. [1]

Результаты исследований показывают, что многие алкалоиды *Peganum harmala* являются физиологически активными соединениями. В результате изучения фармакологических свойств хиназолиновых алкалоидов и их синтетических аналогов выявлены их антихолинэстеразное, холиносенсибилизирующее, холинолитическое, антиаминоксидазное, спотворное действие [30].

Выполнены фармакологические испытания алкалоидов: вазицинон, гармин, дезоксивазицинон, дезоксипеганидин, пеганидинпеганин, пеганол на белых мышах и кошках. Выявлены следующие действия на организм:

- Дезоксипеганин обладает антихолинэстеразными свойствами. На его основе создано лекарственное средство «Дезоксипеганина гидрохлорид», применяемое для лечения поражений периферической нервной системы, последствий нарушения мозгового кровообращения. Препарат способствует восстановлению нервно-мышечной проводимости, повышает тонус гладкой мускулатуры.

- Вазицинон обладает бронхорасширяющим действием.

- Гармин хлористоводородный применяется для лечения болезни Паркинсона [31].

### Выводы по литературному обзору

1. *Peganum harmala* является типичным алкалоидоносным растением, содержание алкалоидов в зависимости от места и время вегетации колеблется от 0,3-3,3 %

2. В растении содержится алкалоиды хинозолинового, хинозолонового,  $\beta$ -карболинового и хинолонового ряда. Всего выделены 17 оснований.

3. Для установления химического строения алкалоидов *Peganum harmala* используются УФ-, ИК-, ЯМР- и масс-спектрометрические методы анализа. Выявлены закономерности масс-спектрометрические фрагментации, а также смещение химических сигналов протонов в ПМР спектрах в зависимости от химического строения выделенных алкалоидов.

4. Индивидуальные алкалоиды, а также фракции и сумма алкалоидов *Peganum harmala* обладают антихолинэстеразным, холиносенсибилизирующим, холинолитическим, антиаминооксидазным, спотворным действием.

## II. Экспериментальная часть

### 2.1. Выделение и идентификация алкалоидов *Peganum harmala*

#### 2.1.1. Объекты и методы исследования получения экстракта

Для фитохимического анализа использовали высушенную и измельченную надземную часть растения *Peganum harmala* L. (Гармала обыкновенная), заготовленную в период цветения и начале плодоношения в июне 2006 года (Ташкентская область, Республика Узбекистан).

В ходе выполнения диссертационной работы исследования проводили на следующих приборах:

- спектрофотометр «Lambola 16» Perkin-Elmer (для снятия УФ-спектра);
- Фурье спектрометр Perkin-Elmer System 2000 FT-IR с KBr (для снятия ИК-спектра);
- спектрометре Tesla BS-567 А (д.м.д., относительно ГМДС) при частоте 100 МГц в  $\text{Pu-d}_5$  (для снятия ПМР-спектра).

Химические сдвиги приведены в миллионных долях (м.д.) в  $\delta$  - шкале, а константы спин – спинового взаимодействия (КССВ) – в герцах, с – синглет, д – дублет, уш. с - уширенный синглет, дд – дублет дублетов.

Температуру плавления выделенных веществ определяли на приборе типа «БООЦИУС» с визуальным устройством РНМК 0,5.

Для колоночной хроматографии использовали силикагель КСК с размером частиц 100-250 мкм. Тонкослойную хроматографию проводили на пластинках «Silufol UV-254» (Чехия). Бумажную хроматографию (БХ) – на хроматографической бумаге Filtrak №12. Пятна алкалоидов обнаруживали путем опрыскивания реактивом Драгендорфа.

В ходе получения экстракта были использованы следующие приборы:

- весы РП-150 кг по ТУ25-06.1307-76 переносные платформенные, указательный прибор - коромысло школьного типа, материал - металл.

Технические характеристики: диапазон измерений -7,5-150,0 кг. Допустимая погрешность- до 0,1%. Габаритные размеры – 800x515x41300 см;

- вакуум-циркуляционный выпарной аппарат. Рабочий объем – 25 л. Производитель - фирма «Kavalier» (Чехия). Материал - бромсиликатное стекло марки 3,3 - Simax. Обогрев - паровой, температура пара - 125°C. Охлаждающий агент-вода. Рабочее давление внутри аппарата – не менее 10кПа. Производительность – 10 л/час;

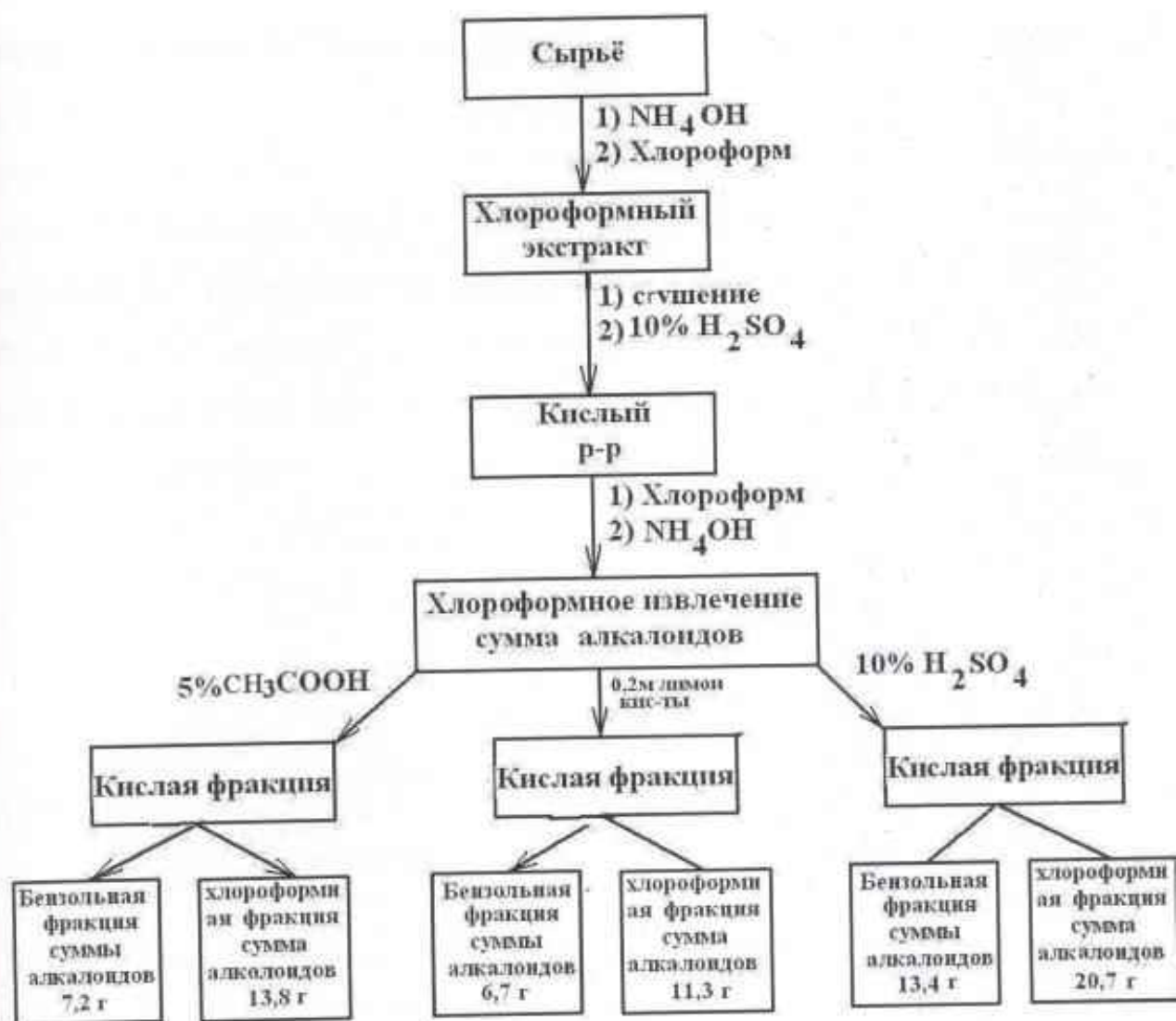
- экстрактор. Производитель-Фирма «Kavalier» (Чехия). Материал - бромсиликатное стекло марки 3,3-Simax. Рабочий объем - 65 л.

Распылительная сушилка фирмы «Ангидро» (Дания). Параметры: температура теплоносителя на входе - 170-190°C, на выходе - 70-80°C. Расход концентрата - 4,0-4,5 л/час.

Для измельчения сырья использовалась дробилка КДУ-2.

## 2.1.2. Получение суммы алкалоидов из растения *Peganum harmala*

Схема 1



Как мы уже сообщали, просмотр литературных данных показал, что работы, посвященные изучению *Peganum harmala* L. — гармала обыкновенная малочисленны и в основном они зарубежные. Известно, что химический состав растений в зависимости от места произрастания, бывает разным. Исходя из этого, целесообразно было изучить химический состав *Peganum harmala* L., культивируемой на территории Республики Узбекистан.

7 кг воздушно-сухого растительного сырья, собранной в июне 2006 г (конец цветения начало плодоношения) смачивали 8%-ным раствором аммиака и оставляли на два часа, после чего заливали хлороформом, хлороформ сливали через сутки. Произвели 10 сливов. Из сгущенного хлороформного экстракта сумму алкалоидов извлекали 10%-ной серной кислотой. Кислый раствор промывали хлороформом, а затем подщелачивали конц. водным раствором аммиака, смесь оснований извлекали хлороформом. Хлороформный раствор суммы алкалоидов обрабатывали 5% уксусной кислотой, 0,2 М лимонной кислотой и 10%-ной серной кислотой. После получения каждую фракцию по отдельной взбалтывали последовательно с бензолом и хлороформом.

Таблица 3

Фракция	Сумма алкалоидов	Результат
А.	Бензольная сумма	7,2 г
	Хлороформная сумма	13,8 г
Б.	Бензольная сумма	6,7 г
	Хлороформная сумма	11,3 г
В.	Бензольная сумма	13,4 г
	Хлороформная сумма	20,7 г

Всего, общий выход 84,1 г, что составляет 1,2% от веса сухого растения.

### 2.1.3. Получение суммы алкалоидов из растения *Peganum harmala* методом ионообменной хроматографии

10 г измельченной надземной части растения поместили в колбу ёмкостью 100 мл, заливали 50 мл этилового спирта присоединяли с обратным холодильником и нагревали на водяной бане в течение 30 мин. После охлаждения спиртовой экстракт сливали, а растение заливали 50 мл новой порции этилового спирта. Присоединяли с обратным холодильником и после нагревания спиртовой экстракт отделяли. Эту операцию проводили еще 2 раза.

Полноту извлечения алкалоидов проверяли реакцией с кремневольфрамовой кислотой. Спиртовые экстракты объединяли.

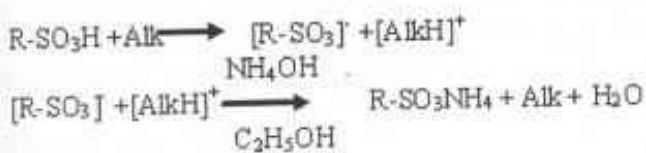
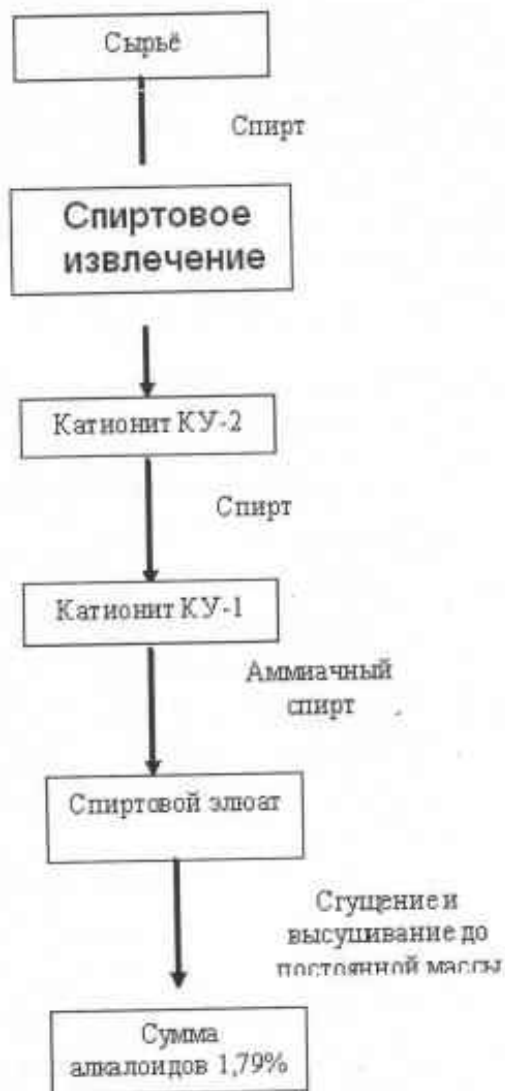
10 г катионита марки КУ-2 поместили в стакан ёмкостью 100 мл 2 раза промывали очищенной водой, заливали разбавленным раствором соляной кислоты и оставляли на 12 часов. По истечению времени раствор соляной кислоты сливали, катионит промывали очищенной водой до нейтральной реакции. Подготовленные таким образом сорбенты перенесли в колонку и промывали водой до нейтральной реакции. Колонка для хроматографирования представляет собой стеклянную трубку, нижняя сгущенная часть которой снабжена стеклянным краном для регулирования скорости фильтрации. Диаметр колонки 2 см, а высота 25 см. На высоте 0,5-1 см от места сгущения трубки выпаяно пористая стеклянная пластинка (фильтр №1). Колонку устанавливали в вертикальном положении, кран закрывали. На  $\frac{3}{4}$  объема наполняли очищенной водой. Затем подготовленный сорбент смывали в колонку одновременно открывая кран. Пузырьки воздуха удаляли пропуская через колонку снизу вверх струю воды. Когда слой сорбента достигло высоты 8-10 см кран закрывали и поверх сорбента поместили тампон из ваты, препятствующий к всплыванию зерен к поверхности раствора.

Спиртовые извлечения перегоняли на вакуум-ротаторно испарителе до 50 мл и пропускали через хроматографическую колонку, поддерживая скорость вытекания 20-25 кап/мин. Вытекающую жидкость собирали в коническую колбу, колонку промывали спиртом для удаления из поверхности зерен сорбента веществ нейтрального и кислого характера.

Колонку промывали до получения бесцветного спиртового элюата. Затем удержанные катионитом основания регенерировали аммиачным раствором этилового спирта. Полноту регенерации алкалоидов проверяли с качественной реакцией на алкалоиды реактивом Драгендорфа.

Спиртовой элюат сгущали под вакуумом и высушивали до постоянного веса.

Выделение суммы алкалоидов из надземной части растения  
*Reganium harmala* методом ион обменной хроматографии



Процентное содержание суммы алкалоидов в растении рассчитывали по расчетной формуле:

$$X = \frac{M \cdot 100}{a}$$

1.  $a_1 = 10,0880$  г;  $m_1 = 0,1802$  г

2.  $a_2 = 10,0990$  г;  $m_2 = 0,1810$  г

3.  $a_3 = 10,0050$  г;  $m_3 = 0,1805$  г

4.  $a_4 = 10,1080$  г;  $m_4 = 0,1820$  г

5.  $a_5 = 10,2000$  г;  $m_5 = 0,1840$  г

Математическая обработка результатов полученных суммы алкалоидов из растения *Reganium harmala* методом ионообменной хроматографии

1. Арифметическое среднее значение

$$x_1 = 1,79$$

$$x_2 = 1,78$$

$$x_3 = 1,80$$

$$X_{cp} = 1,79$$

$$x_4 = 1,80$$

$$x_5 = 1,80$$

2. Число степеней свободы

$$f = n - 1 = 5 - 1 = 4$$

2. Значение отклонения

$$d_1 = |x_1 - X_{cp}| = |1,79 - 1,79| = 0$$

$$d_2 = |x_2 - X_{cp}| = |1,78 - 1,79| = 0,01$$

$$d_3 = |x_3 - X_{cp}| = |1,80 - 1,79| = 0,01$$

$$d_4 = |x_4 - X_{cp}| = |1,80 - 1,79| = 0,01$$

$$d_5 = |x_5 - X_{cp}| = |1,80 - 1,79| = 0,01$$

3. Дисперсия

$$S^2 = \sum x_i - nx^2 = 0,00008$$

5. Стандартное отклонение

$$S = \sqrt{S^2} = 0,0089$$

6. Полуширина доверительного интервала величины

$$T = 2,78$$

$$\Delta x = t \cdot S = 2,78 \cdot 0,0089 = 0,025$$

$$\Delta x_{\text{ср}} = \frac{t \cdot S}{\sqrt{n}} = \frac{0,025}{2,24} = 0,01$$

6. Относительные ошибки соответственно результата отдельного определения

$$\Sigma = \frac{\Delta x \cdot 100}{x_{\text{ср}}} = \frac{0,025 \cdot 100}{1,79} = 1,386$$

7. Относительные ошибки соответственно результата среднего определения

$$\Sigma = \frac{\Delta x_{\text{ср}} \cdot 100}{x_{\text{ср}}} = \frac{0,01 \cdot 100}{1,79} = 0,61$$

### 2.2.1. Выделение и разделение суммы алкалоидов из растения,

собранного в стадии цветения и начала плодоношения.

Полученные суммы алкалоидов разделялись по растворимости, с помощью буферных растворов, по силе основности, хроматографированием на окиси алюминия и получением различных солей.

Хлороформной экстракцией 7 кг надземной части растения получены (фракция А) смеси оснований выпавших при подщелачивании кислых извлечений раствором аммиака, обработкой ацетоном делили растворимые в ацетоне часть (фракция Б) и не растворимая в ацетоне часть (фракция В).

Смесь оснований из фракции А обрабатывали 50 мл спирта, при этом выделили смесь пеганина с дезоксипеганином. После отгонки спирта, остаток растворили в 10%-ной серной кислоте и промыли 200 мл хлороформа. Из

промывного хлороформа выделили смесь пеганина и пеганола. Кислый раствор подщелачивали концентрированным аммиаком, алкалоиды извлекали бензолом и хлороформом. Остаток после удаления бензола перекристаллизовали из спирта и выделили пеганина с т.пл. 185-186°, спиртовой маточник упаривали (фракция Г).

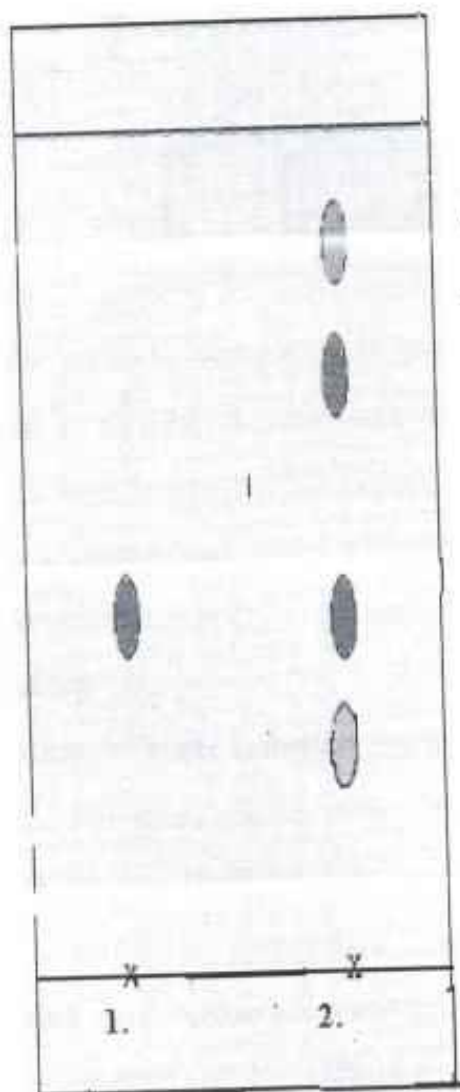
Хлороформное извлечение объединили с фракцией Г, затем растирали с бензолом, при этом остается нерастворившаяся часть в виде черного порошка, а растворившаяся часть, которую делили буферными растворами с pH=7,5; 7,0; 6,0; 5,0 и 0,2 М лимонной, 10%-ной серной кислотами. Полученные в процессе обработки кислые растворы промывали хлороформом, при упаривании последнего выделили пеганина.

### 2.3. Идентификация выделенных алкалоидов

При идентификации выделенных алкалоидов, наряду с физико-химическими константами использовалось тонкослойная хроматография на незакрепленном слое окиси алюминия, II степени активности, также на закрепленном слое силикагеля марки КСК с гипсом в различных системах растворителей. Результаты представлены в таблицах.

Таблица подбора системы растворителей для дезоксипеганина

Система растворителей	Rf
Хлороформ-метанол (4:1)	0,59
Хлороформ-ацетон-метанол (5:4:1)	0,54
Хлороформ-эфир-ацетон (2:4:5)	0,49
Бензол – хлороформ-метанол (5:4:2)	0,54
Бензол-хлороформ-этанол (5:4:1)	0,45

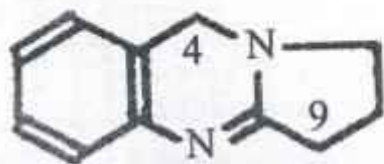


Система Хлороформ-метанол  
(4:1). Проявитель реактив  
Драгендорфа

1. Ст. Дезоксипеганин  
гидрохлорид  
2. Сумма выделенных  
алкалоидов

Рис. 1. Хроматограмма суммы алкалоидов выделенного из растения *Peganum harmala*

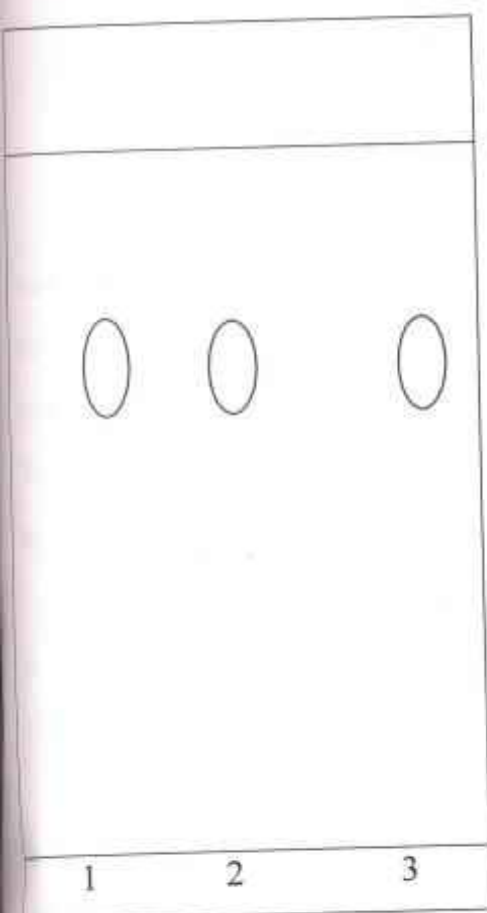
### 2.3.1. Идентификация дезоксипеганина



Разделением суммы алкалоидов полученного из растения собранного в стадии цветения и начале плодоношения выделено основание с т.пл. 86-87°, которое дает ряд хорошо кристаллизирующиеся соли: хлоргидрат 250°, нитрат 137-138° (с разл.), перхлорат 244-245°, пикрат-203-204°. Молекулярный вес-172. Вещество легко растворяется в органических растворителях. Кристаллизуется из петролейного эфира.

Идентификацию выделенного дезоксипеганина гидрохлорид проводили методами ТСХ, ИК-спектрометрии. Изучение хроматографических свойств дезоксипеганина гидрохлорид проводили на пластинке «Silufol UV-254». Были приготовлены спиртовые растворы дезоксипеганина гидрохлорид с целью подбора условий для хроматографического анализа. Для обнаружения зон локализации дезоксипеганина гидрохлорид в качестве реагентов использовали ряд химических соединений и их смесей в различной последовательности: такие как УФ – свет, реактив Драгендорфа, пары йода. Растворы готовились по требованиям ГФ XI.

Были использованы различные системы растворителей (указаны в таблице). Хроматографический анализ спиртовых растворов дезоксипеганина гидрохлорид проводится способом указанным выше. [39,40]



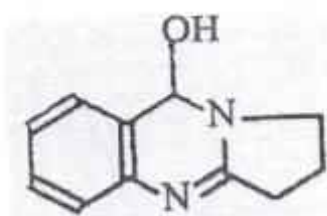
- 1. стандартный образец дезоксипеганин гидрохлорида
- 2- дезоксипеганин гидрохлорид выделенный из суммы алкалоидов
- 3- зона суммы алкалоидов соответствующей дезоксипеганин гидрохлорид

Рис.2. Хроматограмма дезоксипеганина



Рис.3. ИК спектр дезоксипеганина гидрохлорид

#### 2.2.4. Идентификация пеганола.



Продолжив разделение смеси оснований, выделенных из растения в стадии цветения и начала плодоношения, получили белое кристаллическое вещество, которое плавится при 178-180° (с разл.). Основание растворяется в метаноле, спирте и в хлороформе, трудно в бензоле и ацетоне, не растворяется в эфире. Кристаллизуется из бензола, дает кристаллический нитрат. Оптически не активно. Молекулярный вес - 188. [16]

Наличие только одного максимума поглощения в УФ-спектре при 275 нм и отсутствия поглощения в области 1695-1645см<sup>-1</sup> для амидного карбонила в ИК-спектре приводят к выводу, пеганол является хиназолиновым производным.

Из за плохого растворения пеганола в органических растворителях, ЯМР-спектр основания сняли в трифторуксусной кислоте. В спектре пеганола наблюдаются сигналы протонов трех метиленовых групп (триплет при 3,40; мультиплет при 2,40; триплет при 4,71 м.д. ), отнесенные нами к 9, 10, 11-метиленовым группам соответственно. Известно, что карбиноламины в кислой среде образуют ангидроениевые соединения и сигнал метинного протона, находящегося при двойной связи, проявляется в слабом поле. Поэтому в спектре основания в области ароматических протонов имеется пятипротонный мультиплет при 7,96 - 7,71 м.д., относящийся к четырем ароматическим и метинному протону при С-4.

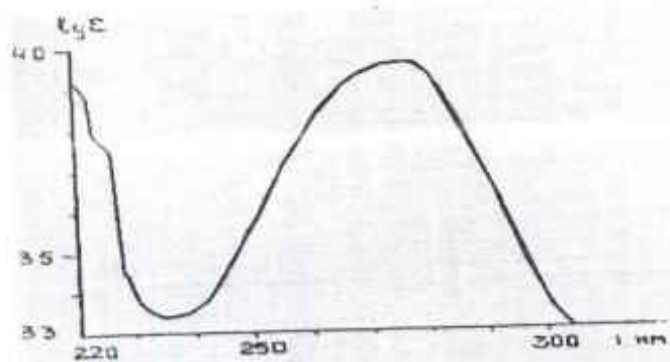


Рис.4. УФ-спектр пеганола

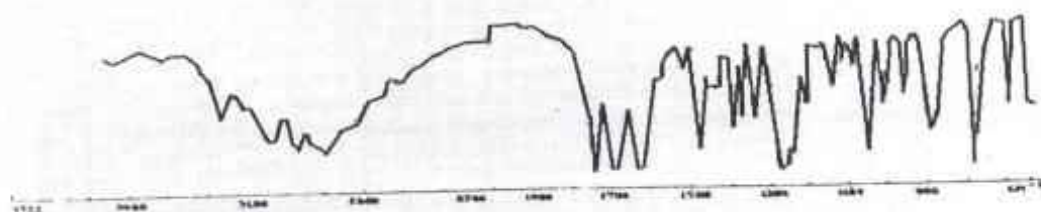


Рис 5. ИК - спектр пеганола

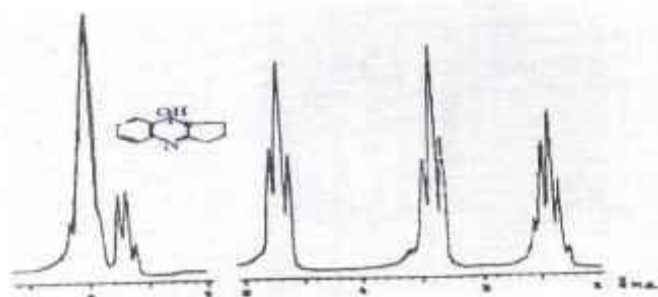


Рис.6. ЯМР - спектр пеганола

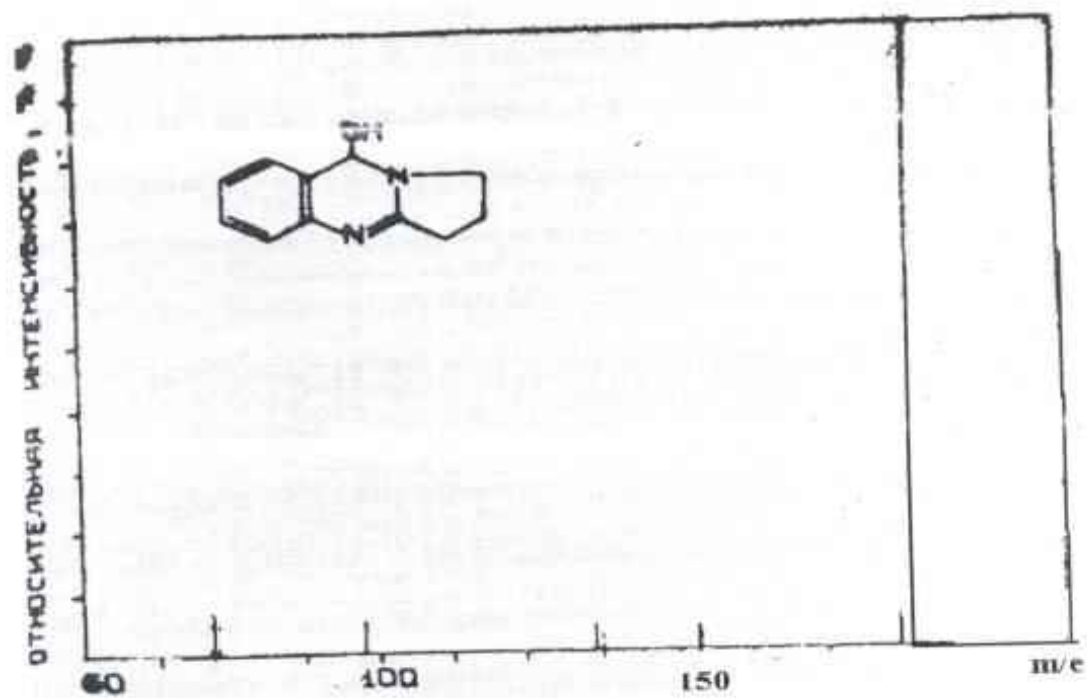
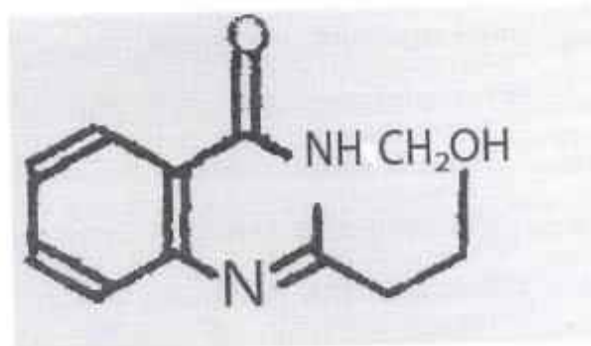


Рис.7. Масс-спектр пеганола

### 2.2.5. Идентификация пегамина



Из суммы алкалоидов *Peganum harmala* L, выделили основание с т.пл. 160-161°. Белое кристаллическое вещество, плохо растворимое в органических растворителях. Кристаллизуется из смеси спирта-аcetона (1:5). Молекулярный вес 204. Основание монокислотное, дает кристаллический перхлорат и легко ацетируется.

В УФ-спектре основания имеются следующие максимумы: 226, 266, 306 и 318 нм, характерные для хиначолоновых алкалоидов.

В ИК-спектре пегамина имеются характерные полосы поглощения амидного карбонила ( $1695\text{ см}^{-1}$ ) в положении 4, а поглощение в области 1618, 1510 и  $1440\text{ см}^{-1}$  можно отнести к конъюгированной системе двойных связей хиначолонового ядра. Масс спектр основания в области низких масс напоминает масс-спектр вазизинона, однако молекулярный ион в пегамине сдвинут на две единицы в сторону высоких масс, по сравнению с вазизиноном. Это дает возможность предположить, что пятичленный цикл находится в разомкнутом состоянии.

В ИК-спектре пегамина имеются полосы поглощения активного водорода в области  $2700 - 3500\text{ см}^{-1}$ . Наличие пиков ионов. M-17, M-18, M-19 масс-спектре говорит о присутствии спиртового гидроксила в боковой цепи. Это подтверждается получением ацетильного производного пегамина при действии уксусного ангидрида. В ИК-спектре ацетилпегамина (мол.вес 246) сохраняется ряд полос поглощения в области  $2700-3200\text{ см}^{-1}$ ; в области

карбонильной группы появляется дополнительная полоса поглощения при  $1740 \text{ см}^{-1}$ , а в ЯМР-спектре - трёхпротонный синглет при  $1,72 \text{ м.д.}$

На основании данных масс- и ЯМР-спектров мы предположили что замещающей группой должна быть оксипропильная. Образование максимального пика иона с  $m/e$  160 из молекулярного иона, которое подтверждается метастабильным переходом, наличие довольно интенсивных пиков M-30 и M-31, отсутствие характерных сигналов для протонов  $-\text{CH}_3$  и  $-\text{CH}_2-\text{CH}_3$  групп, а также пиков ионов M-15 и M-29 позволяет исключить все возможные варианты для оксипропильной группы, кроме одного - прямая цепь с первичной спиртовой группой.

Наличие сигналов для протонов трех метиленовых групп при 3,0; 2,14 и 4,2 м.д. ещё раз подтверждает прямую цепь оксипропильного заместителя. В области 7,47 - 8,3 м.д. отмечаются сигналы для четырех ароматических протонов. Следовательно, бензольное кольцо хиназолоновой части - незамещенное.

Однопротонный дублет в наиболее слабом поле при 8,15 м.д. ( $J = 7,5 \text{ гц}$ ) относится к протону в peri - положении к карбонильной группе, триплет с центром при 7,47 м.д. - к  $\text{C}_7$  протону. Для выяснения положения заместителя мы сняли масс-спектр продукта дейтрирования пегамина. Пик  $\text{M}^+$  оказался сдвинутым на две массовые единицы, а 100% ион на одну м.е. ( $m/e$  161), что указывает на отсутствие заместителя в положении 3. [42,33]

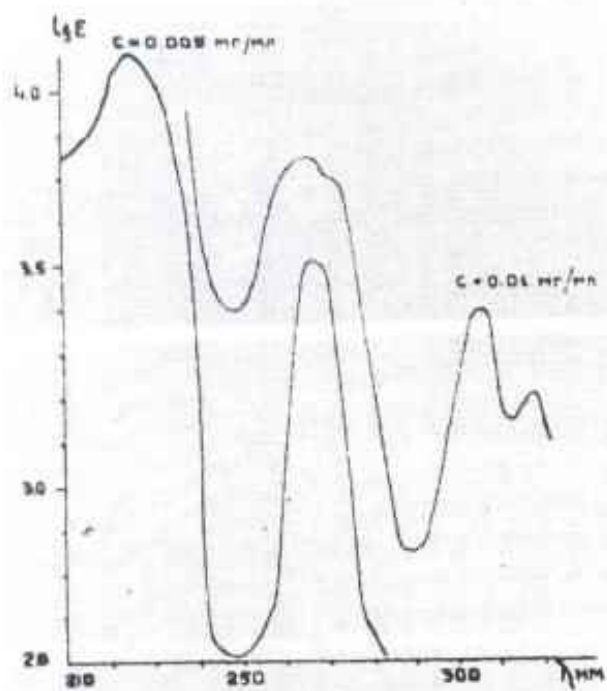


Рис.8. УФ-спектр пегамина

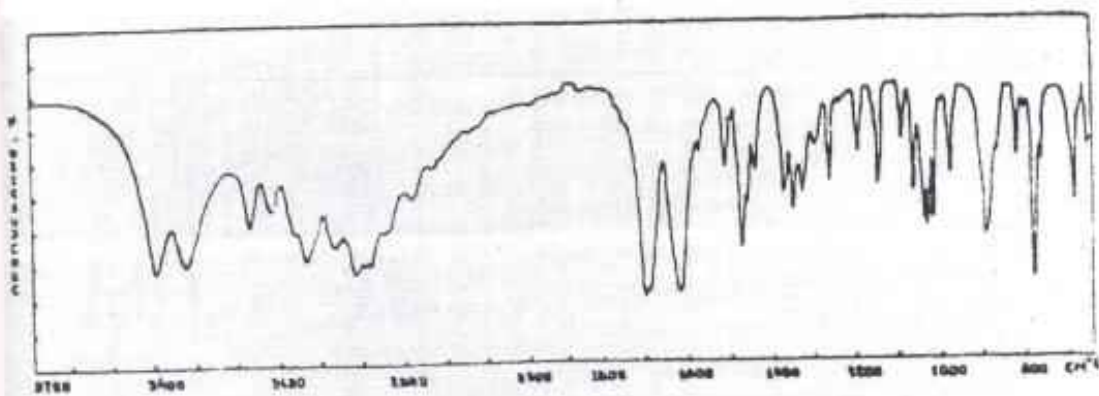


Рис.9. ИК-спектр ацетилпроизводного пегамина.

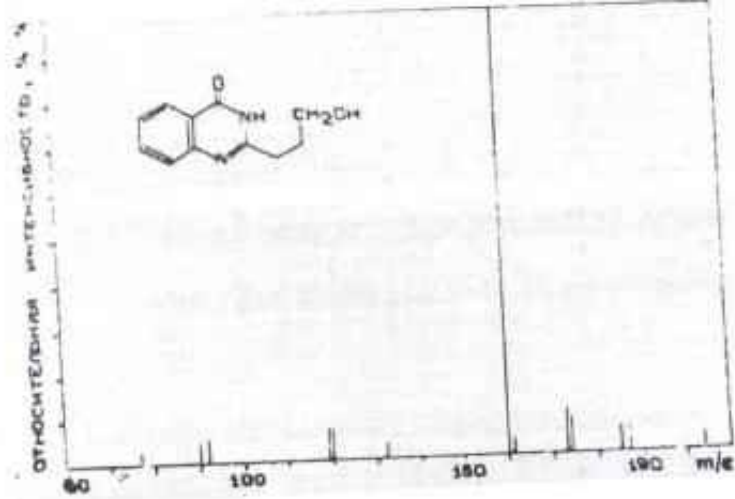


Рис.10. Масс-спектр пегамина

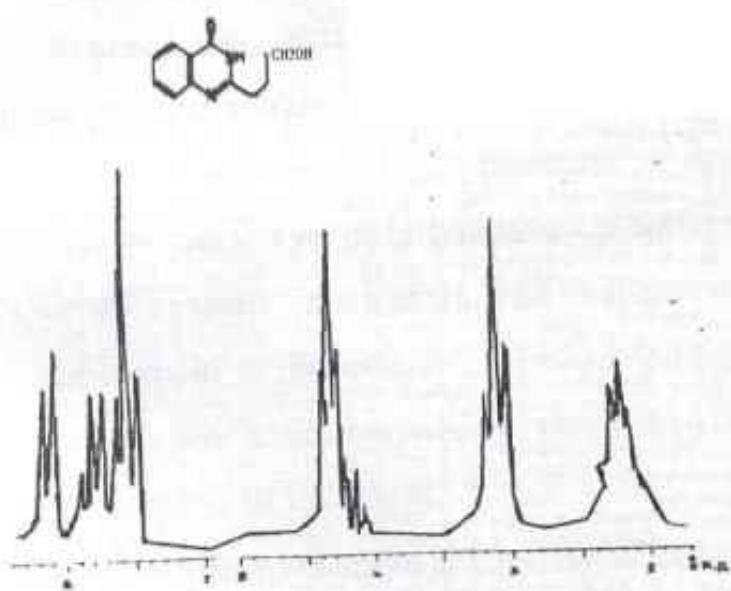


Рис.11. ЯМР - спектр пегамина

## 2.3. Разработка и усовершенствование методов анализа алкалоидов *Peganum harmala*

### 2.3.1. Количественное определение методом титрования.

Аналитическую пробу сырья измельчали до размера частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 1 мм. Около 4 г (т.н.) измельченного сырья помещали в коническую колбу вместимостью 100 мл, смачивали 7 мл 1% раствора аммиака, закрывали пробкой и выдерживали в течение 15 мин. Затем прибавляли 80 мл хлороформа, перемешивали и оставляли на 16-17 часов при комнатной температуре. Извлечение фильтровали через тампон из стеклянной ваты. 50 мл извлечения переносили в делительную воронку, алкалоиды тщательно извлекали 5% раствором серной кислоты. К объединенным сернокислым извлечениям прибавляли 8 мл 25% раствора аммиака и алкалоиды тщательно извлекали хлороформом. Объединенные хлороформные извлечения переносили в круглодонную колбу и отгоняли хлороформом досуха на ротационном испарителе.

Сухой остаток количественно переносили в стакан для титрования последовательно с помощью 5 мл хлороформа, 10 мл ледяной уксусной кислоты, 10 мл ацетонитрила и титровали потенциметрически раствором хлорной кислоты (0,1 моль/л).

Параллельно проводили контрольный опыт.

Содержание суммы алкалоидов в пересчете на дезоксипеганин гидрохлорид в абсолютно сухом сырье в процентах (X) вычисляли по формуле:

$$X = \frac{(V - V_1) \cdot 0,02087 \cdot 100 \cdot 100 \cdot 80}{m \cdot (100 - W) \cdot 50}$$

Где,

0,02087 - количество суммы алкалоидов в пересчете на дезоксиэпеганин гидрохлорид, соответствующее 1 мл раствора хлорной кислоты (0,1 моль/л)

V - объем хлорной кислоты (0,1 моль/л) пошедший на титрование суммы алкалоидов, в мл

V1 - объем хлорной кислоты (0,1 моль/л), пошедший на титрование в контрольном опыте, в мл.

m - масса сырья, в граммах

W - потеря в массе при высушивании сырья в процентах

### Математическая обработка результатов количественного определения методом титрования

$$v_1=3,23$$

$$v_2=3,22$$

$$v_3=3,24 \quad v_{cp}=3,22$$

$$v_4=3,20$$

$$v_5=3,21$$

1. Арифметическое среднее значение

$$x_1=1,198$$

$$x_2=1,195$$

$$x_3=1,2 \quad X_{cp}=1,194$$

$$x_4=1,187$$

$$x_5=1,19$$

2. Число степеней свободы

$$f=n-1=5-1=4$$

4. Значение отклонения

$$d_1 = |x_1 - x_{cp}| = |1,198 - 1,194| = 0,004$$

$$d_2 = |x_2 - x_{cp}| = |1,195 - 1,194| = 0,001$$

$$d_3 = |x_3 - x_{cp}| = |1,2 - 1,194| = 0,006$$

$$d_4 = |x_4 - x_{cp}| = |1,187 - 1,194| = 0,007$$

$$d_5 = |x_5 - x_{cp}| = |1,19 - 1,194| = 0,004$$

5. Дисперсия

$$S^2 = \sum x_i - nx^2 = 0,00025$$

5. Стандартное отклонение

$$S = \sqrt{S^2} = 0,0158$$

6. Полуширина доверительного интервала величины

$$T = 2,78$$

$$\Delta x = t * S = 2,78 * 0,0158 = 0,043924$$

$$\Delta x_{cp} = \frac{t * S}{\sqrt{n}} = \frac{0,043924}{2,24} = 0,0196$$

6. Относительные ошибки соответственно результата отдельного определения

$$\Sigma = \frac{\Delta x * 100}{x_{cp}} = \frac{0,043924 * 100}{1,194} = 3,68$$

7. Относительные ошибки соответственно результата среднего определения

$$\Sigma = \frac{\Delta x_{cp} * 100}{x_{cp}} = \frac{0,0196 * 100}{1,194} = 1,64$$

### 2.3.2. Количественное определение дезоксиπεганина гидрохлорид выделенного из растительного сырья методом УФ-спектрофотометрии.

Количественное определение проводили спектрофотометрическим методом при длине волны 280 нм и толщине слоя кюветы 10 мм. Раствором сравнения использовали 95% спирт.

Количество дезоксипеганина гидрохлорид в исследуемом растворе вычисляли по формуле

$$X = D \cdot V \cdot a \cdot E_{1\%1\text{см}}$$

где X-количество ДОП ГХ, мкг

D-оптическая плотность

V- конечный объем, мл

$E_{1\%1\text{см}}$  - удельный показатель поглощения

### Построение калибровочного графика.

0,02 г (т.н.) дезоксипеганина гидрохлорид внесли в мерную колбу вместимостью 100 мл и объем довели 95% спиртом до метки (раствор А). В ряд мерных колб вместимостью 100 мл вносили 1,2,3,4,5 мл раствора А и объем довели 95% спиртом до метки.

Оптическую плотность полученных растворов определяли спектрофотометрическим методом при длине волны 280 нм в кювете толщиной слоя 10 мм. Раствором сравнения использовали 95% спирт. Полученные данные использовали для построения калибровочного графика.

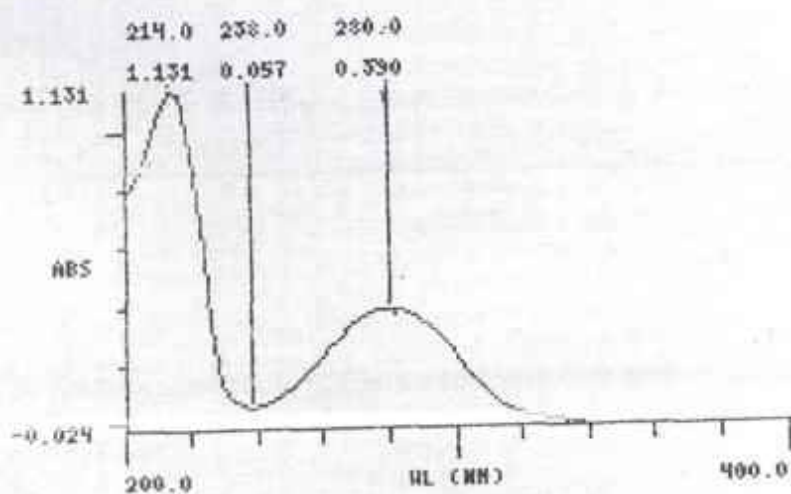


Рис.12. УФ спектр дезоксипеганина гидрохлорид.

Значения оптических плотностей раствора ДОП ГХ в 95% спирте

C, концентрация, мкг/мл	D, оптическая плотность	E1%1см, удельный показатель поглощения	Среднее значение удельного показателя поглощения
2	0,125	625	626
4	0,245	612	
6	0,38	633	
8	0,51	638	
10	0,62	620	

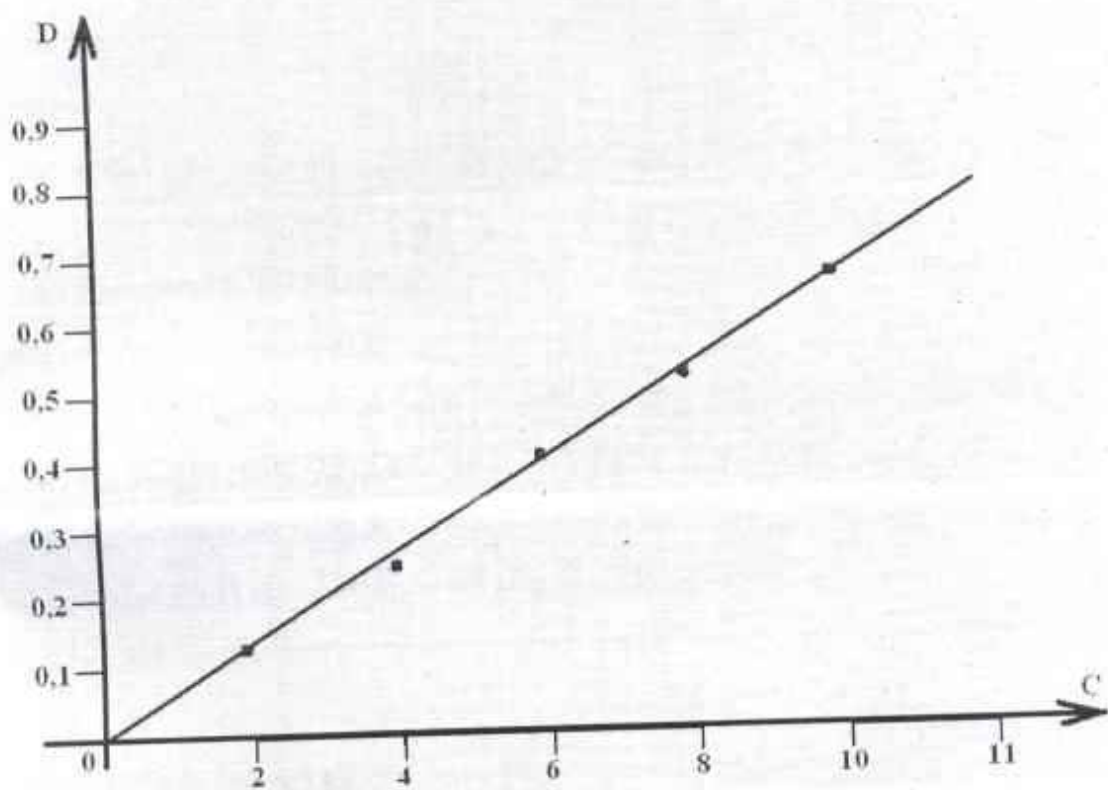


Рис.13. Калибровочный график зависимости значения оптической плотности от концентрации

$$X = \frac{D \cdot 100 \cdot 100}{\sum_{1\%1\text{см}} a \cdot 3}$$

**Математическая обработка результатов  
количественного определения методом УФ- спектрофотометрии**

$$a_1=0,0205 \quad a_2=0,0210 \quad a_3=0,0211 \quad a_4=0,0205 \quad a_5=0,0220$$

$$D_1=0,38 \quad D_2=0,385 \quad D_3=0,385 \quad D_4=0,39 \quad D_5=0,392$$

1.  $x_1=98,7$

$x_2=97,6$

$x_3=97,0$

$x_4=101,3$

$x_5=94,9$

$X_{cp}=97,9$

2.  $f=n-1=5-1=4$

3.  $d_1=|x_1-x_{cp}|=|98,7-97,9|=0,8$

$d_2=|x_2-x_{cp}|=|97,6-97,9|=0,3$

$d_3=|x_3-x_{cp}|=|97,0-97,9|=0,9$

$d_4=|x_4-x_{cp}|=|101,3-97,9|=3,4$

$d_5=|x_5-x_{cp}|=|94,9-97,9|=3,0$

4.  $S^2=\sum x_i-nx^2=5,525$

5.  $S=\sqrt{S^2}=2,35$

6.  $T=2,78$

$\Delta x = t \cdot S = 2,78 \cdot 2,35 = 6,53$

$$\Delta x_{cp} = \frac{t \cdot S}{\sqrt{n}} = \frac{6,53}{2,24} = 2,9$$

6.

$$\Sigma = \frac{\Delta x \cdot 100}{x_{cp}} = \frac{6,53 \cdot 100}{97,9} = 6,67$$

7.

$$\Sigma = \frac{\Delta x_{\text{ср}} * 100}{x_{\text{ср}}} = \frac{2,9 * 100}{97,94} = 2,98$$

### 2.3.3. Количественное определение дезоксипеганина гидрохлорид методом хроматоспектрофотометрии.

0,1 г (т.н.) суммы алкалоидов растворяли в 25 мл этиловом спирте. 0,1 мл этого раствора наносили на линию старта пластинки Силуфол с помощью микропипетки в виде продолговатой линии (3-4 см). Для сравнения использовали стандартный образец раствора дезоксипеганин гидрохлорид. Хроматографировали на колонке в системе хлороформ-метанол (4:1). После достижения системы растворителей линии фронта (12 см) пластинку взяли из камеры и сушили при комнатной температуре.

Используя УФ-лампу определили совпадающие хроматографические зоны дезоксипеганина гидрохлорид и стандартного образца дезоксипеганина гидрохлорида. Выявленные зоны проявляли реактивом Драгендорфа. При помощи скальпеля соскребали образовавшиеся пятна испытуемого вещества и стандартного образца дезоксипеганина гидрохлорида. Полученный образец переносили в мерный стакан объемом 20 мл и заливали 10 мл 95% этилового спирта. Полученную смесь перемешивали в течение 10 мин для экстракции дезоксипеганин гидрохлорида. В этанольный слой. В результате часть спирта улетучилась. Объем смеси доводили до 10 мл 95% этиловым спиртом. Осторожно пипеткой взяли 2 мл над осадочной жидкости. Снимали УФ-спектр приготовленного раствора в области спектра 200-400 нм. На УФ-спектре отмечали максимум поглощения при 280 нм. При сравнении УФ спектров исследуемого раствора и стандартного образцов дезоксипеганина гидрохлорид была подтверждена их идентичность.

УФ-спектр других зон хроматограммы оказалось отличной от УФ спектра стандартного образца дезоксипеганина гидрохлорид.

Измеряли оптическую плотность исследуемого раствора и стандартного образца дезоксипеганина гидрохлорид при длине волны 280 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм. В качестве раствора сравнения использовали 95% этанол.

Содержание дезоксипеганина гидрохлорид в сумме алкалоидов вычисляли по формуле:

$$X = \frac{D \cdot C \cdot 25}{D_0 \cdot a \cdot 0,1 \cdot 25}$$

Где: X – количество дезоксипеганина гидрохлорид в сумме алкалоидов, %

D – оптическая плотность исследуемого образца

$D_0$  – оптическая плотность раствора сравнения

C – масса стандартного образца дезоксипеганина гидрохлорид

a – точная навеска суммы алкалоидов

Приготовление стандартного раствора дезоксипеганин гидрохлорид.

0,1 г (т.н.) стандартного образца дезоксипеганина гидрохлорид растворяли в 25 мл мерной колбе 95% этиловом спирте (р-р А).

1 мл раствора А переносили в 25 мл мерную колбу, доводили 95% этиловым спиртом до метки (р-р В).

Математическая обработка результатов количественного  
определения методом хроматоспектофотометрии

1.  $a_1=0,099452$ ;  $c=0,1000$  г  $D=0,19$ ;  $D_0=0,3$

2.  $a_2=0,099602$ ;  $c=0,1000$  г;  $D=0,195$ ;  $D_0=0,8$

3.  $a_3=0,09995$  г;  $c=0,1000$  г;  $D=0,20$ ;  $D_0=0,8$

4.  $a_4=0,1010$  г;  $c=0,1000$  г;  $D=0,205$ ;  $D_0=0,8$

5.  $a_5=0,1020$  г;  $c=0,1000$  г;  $D=0,21$ ;  $D_0=0,8$

1. Арифметическое среднее значение

$$x_1=2,39$$

$$x_2=2,40$$

$$x_3=2,50$$

$$x_4=2,56$$

$$x_5=2,57$$

$$X_{cp}=2,484$$

2. Число степеней свободы

$$f=n-1=5-1=4$$

6. Значение отклонения

$$d_1=|x_1-x_{cp}|=|2,39-2,484|=0,094$$

$$d_2=|x_2-x_{cp}|=|2,40-2,484|=0,084$$

$$d_3=|x_3-x_{cp}|=|2,50-2,484|=0,016$$

$$d_4=|x_4-x_{cp}|=|2,56-2,484|=0,076$$

$$d_5=|x_5-x_{cp}|=|2,57-2,484|=0,086$$

7. Дисперсия

$$S^2=\sum x_i - nx^2 = 0,00733$$

5. Стандартное отклонение

$$S=\sqrt{S^2}=0,0856$$

6. Полуширина доверительного интервала величины

$$T=2,78$$

$$\Delta x = t \cdot S = 2,78 \cdot 0,0856 = 0,238$$

$$\Delta x_{\text{ср}} = \frac{t \cdot S}{\sqrt{n}} = \frac{0,238}{2,24} = 0,106$$

6. Относительные ошибки соответственно результата отдельного определения

$$\Sigma = \frac{\Delta x \cdot 100}{x_{\text{ср}}} = \frac{0,238 \cdot 100}{2,484} = 9,582$$

7. Относительные ошибки соответственно результата среднего определения

$$\Sigma = \frac{\Delta x_{\text{ср}} \cdot 100}{x_{\text{ср}}} = \frac{0,106 \cdot 100}{2,484} = 4,285$$

#### IV. Выводы

1. Из надземной части растения *Peganum harmala*, произрастающего в Ташкентской области используя традиционный метод экстракции выделена сумма алкалоидов – 1,2% от веса воздушно-сухого сырья. При использовании метода ионообменной хроматографии выделенная сумма алкалоидов составляет 1,79% от веса воздушно-сухого сырья.
2. Разделением суммы алкалоидов по растворимости, по силе основности и колоночной хроматографией выделены 3 индивидуальных основания
3. Основание с  $T_{пл}$  86-87°C, сравнением ИК-ПМР- спектров и пробой смещения с истинным образцом идентифицирован дезоксипеганином гидрохлорид.
4. Основание с  $T_{пл}$  178-180°C (с разложением), изучением спектральных данных, тонкослойной хроматографией и пробой смещения с истинным образцом идентифицировали с пеганолом.
5. Третье основание аналогичным образом идентифицирован с пегамином
6. Разработан ацидометрический метод количественного анализа суммы алкалоидов в надземной части растения.
7. Разработан хроматоспектрофотометрический метод количественного анализа дезоксипеганина гидрохлорид в сумме алкалоидов.
8. Проведена валидация разработанных методов количественного анализа изучением математических характеристик полученных результатов.
9. По полученным результатам опубликован один тезис докладов, а также второй тезис отправлен на публикацию.
10. Разработанные методы выделения и анализа алкалоидов надземной части могут быть использованы в производстве и контроле качества дезоксипеганина гидрохлорид, как в субстанции, так и в лекарственных препаратах.

#### IV. Список литературы.

1. Шарахимов Н.Н. Гармала (*Peganum harmala*). Её биологические особенности и лекарственное значение: Автореф. Дис. .. к биол.н. Ташкент, 1975
2. Флора СССР, М.-Л., 1953, Т.19С.146
3. Сафина Л.К. Гармала обыкновенная. Алма-ата:Наука, 1977
4. Абу Али Ибн Сина. Канон врачебной науки., Ташкент, 1956, Кн.2
5. Соколов В.С. Алкалоидоносные растения СССР. М.-Л., 1952. С.230, 288
6. Землинский С.Е. Лекарственные растения СССР. М., 1958.,С.388
7. Махлаюк В.П. Лекарственные растения в народной медицине., Саратов, 1967, С.98, 455
8. Исамухамедов И., Шарахимов Н. //Фармакология алкалоидов и их производных. Ташкент, 1972, С.187
9. Артамонов Д. //ХИМИЯ И ЖИЗНЬ. 1984. №1.
10. Орехов А.П. Химия алкалоидов. М.,1955. С.565;
11. Генри Т.А. Химия растительных алкалоидов. М., 1956, С.522
12. Юнусов С.Ю. //Изв. АН УзССР., 1948. №4С 11
13. Юнусов С.Ю. Химия в Узбекистане., Ташкент. Наука., 1965, С.58
14. Хашимов Х.Н., Тележенецкая М.В., Шарахимов Н.Н., Юнусов С.Ю. Алкалоиды *Peganum Harmala* //ХПС. 1971. С.382
15. Хашимов Х.Н., Тележенецкая М.В., Юнусов С.Ю. Дезоксипеганин – новый алкалоид из *Peganum Harmala* //ХПС. 1969., С.456
16. Тележенецкая М.В., Хашимов Х.Н., Юнусов С.Ю. Пеганол – новый алкалоид из *Peganum Harmala* //ХПС. 1971. С.849
17. Хашимов Х.Н., Тележенецкая М.В., Юнусов С.Ю. Пеганидин-новое основание из *Peganum Harmala* //ХПС. 1969. С.599
18. Хашимов Х.Н., Тележенецкая М.В.,Рашкес Я.В., Юнусов С.Ю. Пегамин – новый алкалоид из *Peganum harmala* //ХПС. 1970. С.453

19. Жарекеев Б.Х., Тележенецкая М.В., Юнусов С.Ю. Дезоксипеганидин – новый алкалоид из *Peganum harmala* //ХПС. 1973., С.279
20. Жарекеев Б.Х., Хашимов Х.Н., Тележенецкая М.В., Юнусов С.Ю. //ХПС. 1974., Новые алкалоиды из *Peganum Harmala* С.264
21. Хашимов Х.Н.// Автореф. дисс. ... к хим.н. Ташкент, 1973
22. Курбанов Д., Жарекеев Б.Х. Исследование алкалоидов *Vieberstenia Miltisida* и *Peganum Harmala* из Каракалпакии. //ХПС., 1974., С. 685
23. Жарекеев Б.Х. // Автореф. дисс. ... к хим.н. Ташкент, 1974
24. Батсурэн Д., Тележенецкая М.В., Юнусов С.Ю. Алкалоиды *Peganum Harmala* и *Nigellastrum*. //ХПС. 1980., С.736
25. Батсурэн Д., Тележенецкая М.В., Юнусов С.Ю., Балдан Т. Алкалоиды *Peganum Harmala*.//ХПС. 1978., С.418
26. Мирзахмедов Б.К., Жарекеев Б.Х., Тележенецкая М.В., Арипов Х.Н., Шакиров Т.Т., Юнусов С.Ю. Полибуферное распределение суммы алкалоидов *Peganum Harmala*.//ХПС. 1976., С.404
27. Тележенецкая М.В. Ташходжаев Б., Ягудаев М.Р., Ибрагимов Б.Т., Юнусов С.Ю. Восстановление некоторых алкалоидов *Peganum Harmala* боргидридом натрия. //ХПС. 1974., С.18
28. Жарекеев Б.Х., Хашимов Х.Н., Тележенецкая М.В., Юнусов С.Ю. Масс-спектры тетрагидрохинозолина и тетрагидрохинозазинона-4//ХПС. 1974., С.679
29. Рашкес Я.В., Тележенецкая М.В., Плугарь В.Н., Юнусов С.Ю. //ХПС. 1977., С.378
30. Садриддинов Ф.С., Курмукова А.Г., Фармакология растительных алкалоидов и их применение в медицине., Ташкент:Медицина, 1980, С.301-305
31. Юнусов С.Ю., Туляганов Н., Тележенецкая М.В., Садриддинов Ф.С., Хашимов Х.А. С. СССР №605614. Бюлл.изобр. 1978., №17,

32. Каримов А., Тележенецкая М.В., Юнусов С.Ю. Алкалоиды *Peganum Harmala*. //ХПС. 1982., С.498
33. Каримов А., Плугарь В.Н., Тележенецкая М.В., Юнусов С.Ю. Алкалоиды *Peganum Harmala*. //ХПС. 1983., С.369
34. Дьяконов А.Л., Тележенецкая М.В., Юнусов С.Ю. Алкалоиды *Peganum Harmala*. //ХПС. 1986., С.465
35. Плугарь В.Н., Рашкес Я.В., Каримов А., Тележенецкая М.В., Юнусов С.Ю. Сопоставление масс-спектров дезоксипеганина и дезоксивазицинона.//ХПС. 1983., С.68
36. Добронравова Е.К., Тележенецкая М.В., Шакиров Т.Т. Поляграфическое исследование алкалоидов *Peganum Harmala*. //ХПС. 1976., С.363
37. Тележенецкая М.В., Дьяконов А.Л., Юнусов С.Ю. Синтетические аналоги алкалоидов *Peganum Harmala*. //ХПС. 1989., С.857
38. Дьяконов А.Л., Тележенецкая М.В., Ташходжаев Б. Синтетические аналоги алкалоидов *Peganum Harmala*. //ХПС. 1992., С.233
39. Тележенецкая М.В., Дьяконов А.Л. Синтетические аналоги алкалоидов *Peganum Harmala*. //ХПС. 1987., С.309
40. Дьяконов А.Л., Тележенецкая М.В. Синтетические аналоги алкалоидов *Peganum Harmala*. //ХПС. 1991., С.528
41. Тележенецкая М.В., Дьяконов А.Л. Алкалоиды *Peganum harmala* //ХПС. 1991., С.541
42. Тележенецкая М.В., Юнусов С.Ю. Алкалоиды *Peganum harmala* //ХПС. 1977., С.732
43. Туляганов Н., Алимджонова Х., Джахангиров Ф.Н. //Фармакология природных веществ. Ташкент:Фан, 1978, С.61
44. Арипов Х.Н., Мирзахмедов Б.К., Шакиров Т.Т. Добронравова Е.К., Тележенецкая М.В., Юнусов С.Ю., Рахматуллаев Т.У. А.с. СССР 3878295. Бюлл.изобр., 1981. №41., С.17

45. Dhar K.L., Jain M/P., Koul S.K., //Phytochem.1981. V.20.P.319
46. Spath E., Kuffner F., Platzer N. //Ber.1935.B.68.S.497
47. Hanford W.E., Adams R. //J.Amer.Chem.Sos.1935.V.57.P.921
48. Macholan L // Coll/1959.V.24. P.550
49. Schopf, Oechleer F. //Ann.1936.B.523.S.I.
50. Адылов Т.А. Ядовитые и алкалоидоносные растения Узбекистана, Ташкент 1970,с.118
51. Максютин И.Ф. и др. Методы анализа лекарств, Киев, Здоровье, 1984,с.66
52. Джумашев А, Аймухамедова Г.Б. Спекрохроматометрическое определение морфина в коробках мака., Фрунзе, 1972, .102-105
53. [www.harmala@mail.ru](mailto:www.harmala@mail.ru)