



ШОЕВ СУХБАТУЛЛО ХИДОЯТУЛЛОЕВИЧ

**ЭКСТРАКЦИЯ И ИДЕНТИФИКАЦИЯ БИОЛОГИЧЕСКИ
АКТИВНЫХ ОРГАНИЧЕСКИХ КОМПОНЕНТОВ
ПРИРОДНОГО МУМИЁ**

02.00.03 – Органическая химия

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т

**диссертации на соискание учёной
степени кандидата химических наук**

Душанбе – 2019

Работа выполнена на кафедре органической химии и в научно-исследовательской лаборатории «Пептид» ВМ-5 научно-исследовательского института Таджикского национального университета

Научный руководитель: Халиков Ширинбек Халикович

доктор химических наук, профессор кафедры органической химии Таджикского национального университета

Официальные оппоненты: Заварзин Игорь Викторович

доктор химических наук, профессор, заведующий лабораторией химии стероидных соединений ФГБУ Института органической химии им. Н.Д.Зелинского РАН.

Мухамеджанов Музафар Собирович

кандидат химических наук, доцент кафедры органической и прикладной химии Худжандского государственного университета им. академика Б.Гафурова

Ведущая организация: Таджикский государственный педагогический университет им. С. Айни, кафедра органической и биологической химии

Защита состоится « **21** » августа **2019** г. в **9.00** часов на заседании диссертационного совета Д 047.003.03 при Институте химии им.В.И.Никитина Академии наук Республики Таджикистан по адресу: 734063, г. Душанбе, ул.Айни, 299/2.

E-mail: dissovet@ikai.tj

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке и на сайте Института химии им.В.И.Никитина АН Республики Таджикистан www.ikai.tj (www.chemistry.tj)

Автореферат разослан « _____ » _____ 2019 г.

**Учёный секретарь
Диссертационного совета,
кандидат химических наук**



С.Р. Усманова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Современная научная медицина охватывает комплекс достижений многочисленных отраслей естествознания, в особенности таких наук, как химия, биология, физиология, наномедицина и нанотехнология. За последние десятилетия в области медицины были внедрены сотни высокоэффективных химических препаратов, приносящие большую пользу человечеству. Из многочисленных лекарственных препаратов, применяемых в медицинской отрасли для лечения различных заболеваний и профилактики многих болезней, можно выделить природные лечебные средства, изготавливаемые из всевозможных природных источников-растений, животных и минералов. Большинство активных препаратов были получены из органических материалов различными способами, а также химическими методами синтеза. Кроме того, большинство найденных народом лечебных средств изучаются и используются в медицинской науке и в клинической практике. В этом отношении мумиё занимает особое место среди многочисленных средств. Достоверно установлено, что любые виды мумиё имеют ту или иную биологическую активность и лечебные свойства. Мумиё не токсично, не мутагенно и не канцерогенно. Многие исследования направлены на применение комплексной патологической терапии, выявление патологических процессов, нейрорепитических и других свойств мумиё. Однако, из-за богатого химического состава мумиё, механизм действия его на живой организм представляется весьма сложным и до конца неизученным. Следует отметить, что химикам удалось с помощью различных методов исследования выяснить неорганическую природу основополагающих компонентов мумиё. Что касается органической части мумиё, из-за сложности структурной организации составляющих композиции на молекулярном уровне, до конца остаётся аддитивной. Поэтому, выделение, идентификация и исследование биологически активных органических биорегуляторов, относящихся к стероидам, гормонам, аминокислотам, белковым продуктам азотсодержащим гетероциклы является весьма актуальным и полезным.

Цель данной работы: экстракционно-хроматографическими и химическими методами извлечь органические компоненты, обладающие биологическими свойствами из природного мумиё. Провести идентификацию и в индивидуальном порядке охарактеризовать выделенные вещества. Физико-химическими методами анализов установить истинную структуру каждого полученного вещества, в отдельности идентифицировав с эталоном (оригиналом).

Поставленная цель исследований достигается решением следующих задач:

- экстрагировать органические компоненты из мумиё органическими и водно-спиртовыми экстрагентами;
- хроматографическими и спектральными методами изучить метанольный и этанольный экстракты мумиё и выявить структурно-функциональные особенности присутствующих компонентов.
- получить и идентифицировать 2-хлор-10-(3-диметиламинопропил) - фенотиазин (аминазин), витамин D₃, гормон тестостерон из спиртового экстракта мумиё;
- путём реакции ацилирования карбобензоксид хлоридом извлечь из экстракта природного мумиё композит карбобензилоксиаминокислот, прогидрировав их, получить свободные смеси аминокислот;
- дать качественные и количественные характеристики выделенных соединений путём комплексных физико-химических исследований;
- охарактеризовать присутствие капропорфирина и витамина B₁₂ УФ- и ИК-спектральными анализами.

Научная новизна. В результате проведённых экспериментальных работ из состава мумиё традиционными методами выделены и исследованы такие важные биологически активные органические компоненты как 2-хлор-10-(3-диметиламинопропил)-фенотиазин (аминазин или хлорпромазин), холекальциферол (витамин D₃), гормон тестостерон и свободные аминокислоты: глицин, аланин, валин, пролин и гистидин. УФ-и ИК-

спектральными методами определены капропорфирины и витамин В₁₂, присутствующие в мумиё.

Для обнаружения функциональных групп, характеристических свойств и выяснения строения углеродного скелета веществ также использовали качественные и количественные реакции. Вместе с тем:

- исследован процесс экстракции органических компонентов разными экстрагентами, с использованием способов сбора и анализа экстракта после перехода компонентов из твёрдой фазы в жидкую.

- на основе интерпретации полученных результатов разработаны условия выделения отдельных компонентов из мумиё.

- изучены физико-химические свойства всех выделенных из мумиё биологически активных соединений, установлены их структура, функциональные особенности, и выделенные соединения сопоставили с оригиналами.

- разработаны титрометрический и потенциометрический способы титрования, способствующие количественному определению аминазина в мумиё, с использованием разработанной нами формулы:

$$m = \frac{N \cdot V \cdot (E_x \cdot a)}{1000}$$

- сублимационным превращением из мумиё выделен однородный витамин Д₃, который идентичен витамину Д₃-эталону.

Найдены методы определения гормона тестостерона в экстракте мумиё и выделения его в чистом виде с помощью распределительной хроматографии с применением проявителя м-динитробензола.

Практическая значимость работы заключается в том, что на основе проведённых исследований разработан способ экстракции конгломератного комплекса органических компонентов из мумиё, содержащий алифатические, ароматические и гетероциклические соединения.

Основные положения, выносимые на защиту:

- получение из мумиё отдельных биологически активных органических компонентов путём экстракции, сублимации и хроматографии;

- исследование выделенных из мумиё биологически активных компонентов, физико-химическими методами анализа.

- структурно-функциональное исследование полученных компонентов аминазина, (2-хлор-10-(3-диметиламинопропил)- фенотиазина, витамина Д₃, гормона тестостерона из спиртового экстракта мумиё и аминокислот.

Апробация работы. Основные результаты докладывались и обсуждались на Республиканской конференции и в материалах научно-теоретической конференции профессорско-преподавательского состава и студентов, посвящённой «17-й годовщине независимости республики Таджикистан» (Душанбе, 2008 г.), «Новые теоретические и прикладные исследования химии в высших учебных заведениях республики Таджикистан» (Душанбе, 2010 г.), на международной конференции «Синтез, выделение и изучение комплексных свойств новых биологически активных соединений», посвящённой 50-летию кафедры органической химии и 70-летию юбилею доктора химических наук, профессора Халикова Ширинбека Халиковича (Душанбе, 2011 г.), на республиканской конференции «Перспективы синтеза в области химии и технологии гетеро-соединений», посвящённой 20-летию кафедры высокомолекулярных соединений и химической технологии и научно-исследовательской лаборатории «Химия глицерина» (Душанбе, 2012 г.); в материалах X международной научно – практической конференции «Найновите научни постижения-2014», т.29, София, «БЯЛ ГРАД.БГ» ООД-2014, -С.35-40.

Публикации. По теме диссертации опубликованы 4 статьи в научных журналах, рекомендованных ВАК Российской Федерации и 4 тезиса докладов в материалах конференций.

Личный вклад автора заключается в постановке задачи исследования, определении путей и методов их решения, получении и обработке большинства экспериментальных данных, анализе и обобщении результатов экспериментов, формулировке основных выводов и положений диссертации.

Структура и объём работы. Диссертационная работа состоит из введения, трёх глав, заключения, выводов и списка использованной литературы, включающего 87 наименований, изложена на 110 страницах компьютерного набора, иллюстрирована 17 рисунками и 14 таблицами.

Основное содержание работы

Во введении диссертации обоснована актуальность темы, сформулированы цель и задачи диссертационной работы, отражена научная и практическая значимость работы.

В первой главе приводится обзор литературы, относящийся к заслугам и вкладам учёных древнего востока по изучению мумиё; о современных высказываниях учёных о мумиё на основе научных наблюдений; о химических компонентах состава и способах исследования мумиё, а также о его лечебных свойствах. Также приводятся исследования мумиё советскими учёными и учёными ближнего востока.

Во второй главе, относящейся к экспериментальной части, приводятся получение спиртового экстракта мумиё, фракционирование экстрактивного состава, титрометрическое определение 2-хлор-10-(3-диметиламинопропил)-фенотиазина (аминазина) и его количественного выделения; определение витамина D₃ в мумиё и способы его извлечения; применение бензилового эфира хлоругольной кислоты (карбобензилокси хлорида) для модификации аминокислот присутствующих в мумиё, выделение аминокислот, гормона тестостерона и его идентификация.

В третий главе обсуждаются полученные результаты, рассматривается общая характеристика, физико-химические свойства мумиё и его компонентный состав; экстракция, хроматографические, спектрометрические и потенциметрические исследования. Также приведены результаты исследования отдельных компонентов, выделенных из мумиё разными способами, и их интерпретация.

1. Общая характеристика и химический состав мумиё

Первичное мумиё тёмно-коричневое, янтарное или вино-жёлтое, канифолеподобное, молекулярнодисперсное, пластичное, клейкое вещество, иногда хрупкое. Оно даёт стекловатоподобный излом с многочисленными остроугольными просвечивающими мелкими обломками, с характерным ярким восковым или смоляным блеском.

Под оптическим прибором при многократном увеличении можно увидеть игольчатые кристаллы. Удельный вес мумиё колеблется от 1.8 до 2.2. На морозе при -20⁰С не замерзает, сохраняя летучесть и пластичность. Плавится в интервале 80-200⁰С (с разложением), при 150-200⁰С выделяет пары воды и углекислый газ. При 350-400⁰С начинается полный распад, и протекают сложные химические превращения. На открытом пламени мумиё сгорает без копоти, оставляя тёмно-сероватую золу. При длительном хранении мумиё твердеет из-за потери воды. Мумиё неплохо растворяется в воде в соотношениях 1:7, 1:9; сравнительно меньше в этиловом спирте, в метаноле, в эфире (1:7000), плохо в хлороформе. Растворимость увеличивается в смеси этанол-вода, метанол-вода, в смеси органических растворителей. Водный раствор коричневатого цвета, при стоянии постепенно темнеет. На вкус горьковатый, запах особо специфический, напоминающий частично запах навоза. рН свежеприготовленного водного раствора колеблется от 6.7 до 7.0. Простоявший подобный раствор имеет рН 8.

В результате химического и спектрального анализов было установлено, что в составе мумиё присутствуют более 20 микроэлементов: Si, Al, Ca, Na, K, Fe, Mg, P, Ba, S, Be, Mn, V, Ti, Ag, Cu, Zn, Bi, Co, Sr, Sn, Cr, Ga, Mo и т.д. Из оксидов металлов: двуокись кремния, окись алюминия, железа, титана, кальция, свинца, магния, бария, марганца, калия, натрия и оксид стронция.

Если говорить об органической составляющей части, мумиё представляет собой комплекс соединений с различными простыми и сложными компонентами, включающие в себя такие функции как гидроксильная, карбонильная, карбоксильная, аминная, двойные связи и т.д., группы, относящиеся к предельным, непредельным, ароматическим и гетероциклическим соединениям.

На самом деле мумиё, по меньшей мере, содержит влагу, минеральную часть, аминокислоты, органические кислоты, белки, липиды, углеводы, стероиды, клетчатку, восковое вещество, алкалоиды и многие другие соединения. Изучая все опубликованные материалы относительно физико-химического исследования состава мумиё, мы пришли к выводу, что неорганический и минеральный состав мумиё изучен достаточно и подробно. Что касается его органического состава, то он изучен поверхностно и имеется недостаточно достоверных результатов по содержанию и изучению ряда органических компонентов, таких как: белки, липиды, углеводы, органические кислоты, стероиды, фосфолипиды аминокислоты и др. Однако, много ещё неизученных компонентов, среди которых бальзамические вещества, эфирные масла, стероиды, полифенолы, витамины и гормоны, которые являются важными биологически активными компонентами. Наше исследование было направлено на выделение отдельных биологически активных органических соединений и изучение этой части мумиё.

2. Экстракция и хроматографическое исследование органических компонентов мумиё

Для экстракции органических компонентов из водного экстракта мумиё использовали полярные и неполярные гомогенные и гетерогенные растворители со следующими соотношениями: петролейный эфир + бензол + метанол (90:10:30), дистиллированная вода + метанол, дистиллированная вода + этанол (1:1), метанол + вода (98:2), этанол + метанол (1:1), хлороформ + гептан (1:4). Следует отметить, что из всех вышеприведенных экстрагентов наилучшими для мумия оказались смесь метанол + вода (98:2) и этанол + вода (98:2), а также метанол + этанол (1:1).

Для исследования экстрактов мумиё мы использовали жидкостную, адсорбционную, распределительную и ситевую хроматографию. В первую очередь использовали бумажную, тонкослойную и колоночную хроматографию. Бумажную хроматографию (БХ) проводили на хроматографической бумаге (матовая) Марки «М» (filtrak), производства Германии. Тонкослойную хроматографию (ТСХ) проводили на готовых пластинках Silufol UV-254 (Чехословакия), колоночную хроматографию проводили на стеклянных колонках (30x1 см и 49x2 см) с использованием сорбентов и сефадексов. Проявителями хроматограмм являются растворы нингидрина, бензидина, пары йода, йодистый калий и хлористый палладий.

Нингидриновый раствор готовили в ацетоне или этаноле 0.5 до 0.75%. Бензидиновый проявитель готовили в 2% уксусной кислоте. Хроматограмму насыщали в камере газообразным хлором, вынимая из камеры, проветривали, а затем смачивали раствором бензидина. Камеру с порошкообразным йодом готовили путём растворения кристаллического йода в эфире. Раствор хлорида палладия готовили, растворив 0.5 г PdCl_2 в 50 мл H_2O и 50 мл ацетона и к раствору добавляли 2 капли конц. HCl .

Из природного сырья мумиё экстракцией (водой) получали водорастворимый мумиё, который представляет собой гигроскопический порошок тёмно-коричневого цвета. Из этого полученного водного экстракта криогенным способом и, тщательно высушив на вакууме, получили чистый мумиё с 30%-ным выходом. Отсюда взяли определённое количество экстракта, обработали экстракционной системой из петролейного эфира + бензол + метанол

(90:10:30), настаивая в течение суток с периодическим перемешиванием и один час постоянного перемешивания. После фильтрования фильтрат промыли водой, высушили над Na_2SO_4 и концентрировали на вакууме; получили сухой экстракт из органических компонентов с 27%-ным выходом.

Подобное экстрагирование проводили с этанолом, при этом раствор имел тёмно-коричневый цвет. Выход экстракта составлял 24% от сухой массы мумиё, взятого для экстрагирования. Точно такой же результат получили при экстрагировании мумиё метанолом. В отличие от этанола метанол оказался лучшим экстрагентом при одинаковых условиях. Метанольный экстракт получился с 25% - 30%-ным выходом.

Экстрагирование мумиё смесью метанол + вода (98:2), которое проводили простаиванием в течение 24 ч, дало сухой экстракт с выходом 37%.

Лучший результат при экстрагировании мумиё смесью метанол + H_2O (98:2) получили при 4-х кратном увеличении объёма растворителя и постоянном перемешивании в течение 3-х часов. При таком экстрагировании получили экстракт в сухом виде, выход которого составил около 50%.

Из всех приведённых экстрагентов наиболее лучшим экстрагентом оказалась смесь метанол + вода (98:2), т.к. во всех случаях выход экстракта количественно был больше. Полученный экстракт из вышеприведенной экстракционной системы петролейный эфир + бензол + метанол (90:10:30) (небольшое количество) пропустили через колонку (30x1 см), наполненную тремя слоями CaCO_3 , сахарозы и Al_2O_3 , залитыми смесью петролейного эфира + бензола (4:1). Между слоями адсорбентов поместили кружочки фильтровальной бумаги. Органические компоненты экстракта мумиё элюировали данным элюентом в 30-и пробирках по 5 мл со скоростью одна капля в 4 сек. После расхода 120 мл элюента (выхода элюата из колонки) отделили осторожно слои носителей друг от друга, перенесли в отдельные конические колбочки и каждую в отдельности обработали смесью, состоящей из эфира + н. бутанола (68:1.68) для извлечения адсорбированных реагентов. Затем эфир упарили, оставшийся элюат-н.бутанол-использовали для снятия спектра в УФ- области поглощения 400-200 нм на спектрофотометре «Хитачи-332».

Элюат из слоя Al_2O_3 показал спектры поглощения, имеющие чёткие максимумы поглощения в УФ-области 336, 298, 259, 250 нм. Элюат из сахарозного слоя показал спектры с максимумами поглощения в области 277, 220, 303, 274, 269, 224, 208 нм. Элюат из слоя CaCO_3 не показал никаких спектров, в нём не содержалось компонентов.

Параллельно этанольный экстракт (160 мг) растворили в хлороформе, нерастворившуюся часть отделили, хлороформную вытяжку пропустили через колонку (350x2мм), наполненную силикагелем марки 100/160 и элюировали хлороформом в 40 пробирках. При длине волны 530 нм на спектрофотометре СФ-26 определили оптическую плотность. Получили две фракции, упаривая которые выделили по 16 и 11.5мг вещества соответственно.

Параллельно (85 мг) этанольный экстракт пропустили через такую же колонку, но в качестве элюента использовали этанол. Элюат собирали в 40 пробирках, определили их оптическую плотность при длине волны 280 нм и сгруппировали пробирки с элюатами; получили 3-фракции (пробирки 1-16, 17-20, 27-40). После концентрирования фракций получили 20 мг, 40 мг и 20 мг вещества соответственно. Приготовили этанольный раствор с 0,0035 мг/мл этих фракций и сняли спектры поглощения в УФ и видимой области (500-200 нм) на приборе СФ-332, «Хитачи». Были получены следующие результаты: в I-фракции выявляются максимумы поглощения в области 350, 270, 200 нм; во II- фракции- 270, 250, 200 нм, в III- фракции - 325 и 201 нм.

Сопоставляя результаты двух экстракционных и спектральных анализов, мы ещё раз убедились в том, что во всех фракциях исследователь будет иметь дело в основном с органическими компонентами. Данные спектры относятся к хромофорам-полиенам, функциональным группам, свободным спаренным p-электронам, которые относятся к сложным ароматическим и гетероциклическим соединениям с несколькими двойными связями и хромофорам-амино, имино, гидроксо, карбонильным и др. функциональным группам.

3. Спектрометрическое исследование хроматографического экстракта мумиё

Для установления предполагаемых биологически активных органических компонентов, присутствующих в мумиё, проводили проверочно-контрольные качественные и спектральные анализы спиртового экстракта мумиё. На бумажную хроматограмму нанесли в виде двух точек водный концентрированный раствор мумиё, хроматографировали в системе метанол+вода (98:2), высота хроматографической бумаги составляла 55 см, время хроматографирования 18 ч. После проявления хроматограммы ацетоновым раствором нингидрина и бензидина четкое разделение вещества на полоске бумаги в виде пятен не было обнаружено, хотя опыт проводился неоднократно. Во всех случаях получали измазанные и прерывистые полосы вдоль хроматографической бумаги без четкого разделения веществ. Пришлось подобрать более плотную хроматографическую бумагу марки FN- 14 (Германия). Этим путём достигли четкого разделения нингидрин чувствительных компонентов. На рисунке 1 приводится зона хроматографических веществ экстракта мумиё в системе метанол+вода (98:2), с использованием раствора нингидрина в качестве проявителя для обнаружения на полоске хроматограммы компонентов. Все окрашенные пятна на хроматограмме отличаются по яркости и оттенкам окраски, а также по значениям R_f (коэффициента распределения), которые равны: R_{f1} 0.12; R_{f2} 0.25; R_{f3} 0.44; R_{f4} 0.54; R_{f5} 0.61; R_{f6} 0.74; R_{f7} 0.80;

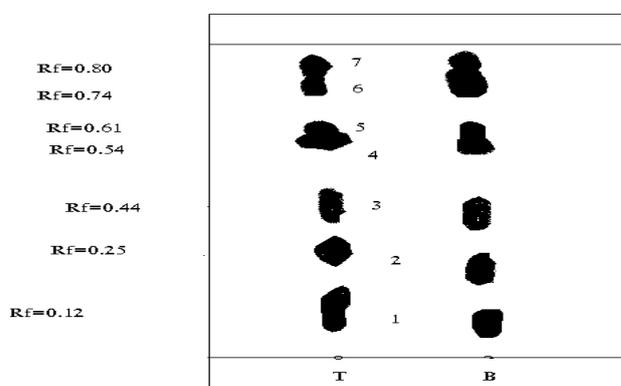


Рис 1. Зона хроматографических веществ спиртового экстракта мумиё (Т- с меньшей концентрацией, В - с большой концентрацией)

Повторяя этот же опыт, на широкополосной хроматографической бумаге с увеличением концентрации экстракта вырезали отдельную узкую полоску с одной стороны (левой части) хроматограммы, высушили и проявили раствором нингидрина и бензидина. После обнаружения веществ в виде окрашенных пятен на полоске хроматограммы, её расположили рядом с непроявленной частью широкой хроматограммы в первоначальном положении. Проводя соответствующую линию по величине пятен, хроматограмму разрезали поперёк полоски и измельчили ножницами на мелкие куски, соответствующему объёму пятен, и поместили в семь пробирок с притёртыми пробками, отдельно для каждого пятна. Одновременно вырезали участок хроматограммы, не содержащий вещество, примерно того же размера, как окрашенные зоны, измельчили и тоже поместили в отдельную пробирку для сравнения. Во все пробирки, включая контрольную налили по 4 мл метанола и оставили на сутки для декантации продуктов, встряхивая содержимое периодически. Элюаты из каждой пробирки спектрофотометрировали в кюветах длиной 1 см относительно элюата последней пробирки (содержащих чистые измельченные хроматографические бумаги) на автоматическом приборе «Хитачи», СФ-330 при длине волны 400-200 нм. Характер спектральных кривых для исследуемых элюатов заключается в ярко выраженных максимумах, а интенсивность полосы связана с присутствием разных хромофоров в молекулах органических соединений, что способствует батохромному сдвигу максимума в сторону более длинных волн. Например, вещество, элюированное из пятна с $R_{f1}=0.12$ (1), имело интенсивные полосы поглощения в

области 320, 302, 270, 248 нм, соответствующие полосам поглощения эталона витамина В₁₂, использованного для сравнения спектры В₁₂ (361, 322, 305, 278, 243 нм). Вещество, содержащееся в пятне с R_{f5} 0.62 (5) соответствовало аминазину, имеющему полосы поглощения в области 306, 270, 265 нм. Для сравнения сняли УФ-спектр аминазина-эталона, полосы поглощения которого расположены в области 306 и 250 нм. Общие данные по спектрам поглощения компонентов, элюированных из хроматографических пятен, приведены в таблице 1.

Таблица 1

Спектры поглощения нингидрин чувствительных компонентов элюированных из хроматографических пятен

Хроматографические элюаты	λ max (нм)	Вещество, взятое в качестве сравнения (эталон)	λ max - (нм)	Растворитель
1	2	3	4	5
Вещество, элюированное смесью метанол + вода (98:2), из хроматографического пятна (1) с R _{f1} =0.12	320 302 270 248	Витамин В ₁₂	361 322 305 278 243	метанол + вода (98:2)
Вещество, элюированное смесью метанол + вода (98:2), из хроматографического пятна (2) с R _{f2} =0.25	326 308 286 255	Гормон Тестостерон	322 305 286 250	метанол + вода (98:2)
Вещество, элюированное смесью метанол + вода (98:2) из хроматографического пятна (4) с R _{f4} =0.54	340 303 286 360 236	Витамин D ₃ кальциферол	346 310 286 350 240	метанол + вода (98:2)
Вещество, элюированное смесью метанол + вода (98:2), из хроматографического пятна (5) с R _{f5} =0.61	306 270 255	Аминазин	306 275 256	метанол + вода (98:2)
Вещество, элюированное смесью метанол + вода (98:2) из хроматографического пятна (6) с R _{f6} =0.74	640 584 408 272	Капропорфирин (1)	625 585 410 274	метанол + вода (98:2)
Метанольный элюат хроматографической бумаги	462 (небольшая полоса)			метанол + вода (98:2)

4. Качественные реакции на стероиды и серосодержащие ароматические соединения мумиё

Таким образом, спектрофотометрическое исследование спиртового экстракта мумиё информирует нас о присутствии трёх основных групп органических компонентов-стероидов, порфиринов и серосодержащих соединений.

К йодазидному раствору (йод, азид натрия, Н₂О) прибавляют водный раствор экстракта мумиё, появляется синий цвет. По истечению времени наблюдается обесцвечивание, а на

стенках пробирки собираются многочисленные пузырьки азота, которые свидетельствуют о присутствии в мумиё ароматических соединений, содержащих атом серы.

Качественные реакции на стероиды. Несколько капель исследуемого спиртового раствора экстракта мумиё (3%) наносят на хроматографическую бумагу и опрыскивают раствором хлорида железа (2%) в метаноле. На хроматограмме появляются пятна с пурпурной окраской, свидетельствующие о присутствии стероидов (эстрогенные класса стероидов).

5. Выделение и исследование отдельных алифатических, ароматических и гетероциклических соединений

Нами проведены ряд химических и физико-химических исследований по извлечению и идентификации отдельных биологически активных компонентов органической части мумиё.

Методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) в мумиё обнаружили 18 органических компонентов, большинство из которых находятся в очень низкой концентрации, количественное выделение которых обычными методами было невозможно.

Наше внимание было направлено в основном на присутствие и извлечение аминазина, витаминов, порфиринов и свободных аминокислот из мумиё, которые играют ключевую роль в его физиологической активности.

5.1. Выделение 2-хлор-10-(3-диметиламинопропил)-фенотиазина (аминазина) из мумиё и его исследование

На двух полосках хроматографической бумаги нанесли в виде точек раствор метанольного экстракта мумиё. Рядом с точкой нанесли также раствор аминазина такой же концентрации, как стандартный эталон, для сравнения. После 18-часового хроматографирования и проявления для обнаружения 2-хлор-10-(3-диметиламинопропил)-фенотиазина (аминазина), хроматограмму опрыскивали растворами нингидрина и PdCl_2 , и только пятно с R_f 0.62 и расположенное рядом контрольное пятно аминазина (эталона) окрасились в вишнёвый цвет (рис. 2. I и II).

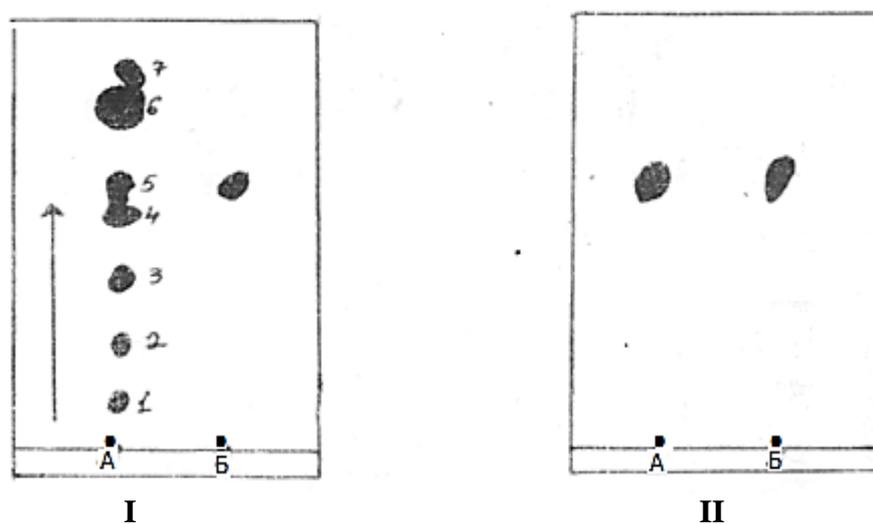
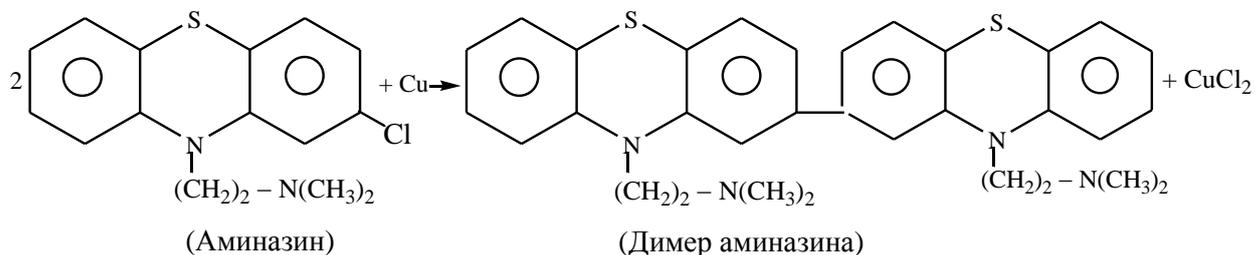


Рис 2. Бумажные хроматограммы метанольного экстракта мумиё (А) и аминазина эталона (Б) в системе метанол-вода (98:2), проявитель раствор нингидрина.

Бумажная хроматограмма метанольного экстракта мумиё (А) и аминазина эталона (Б) в системе метанол-вода (98:2), проявитель раствор PdCl_2

Для подтверждения данного факта использовали реакцию Ульмана, действуя параллельно на метанольные растворы экстракта мумиё и аминазина (эталона) порошкообразной медью. В обоих случаях при выдержке растворы окрашивались одинаково в зелёный цвет за счёт образовавшейся хлористой меди наряду с димерным продуктом. Ниже приведена общая схема реакции по Ульману:



При хроматографировании метанольного экстракта мумиё на колонке, заполненной сефадексом LH-20, получили три фракции-фр. 1 (50 мл), фр. 2 (60 мл) и фр. 3 (60 мл) (рис 3.)

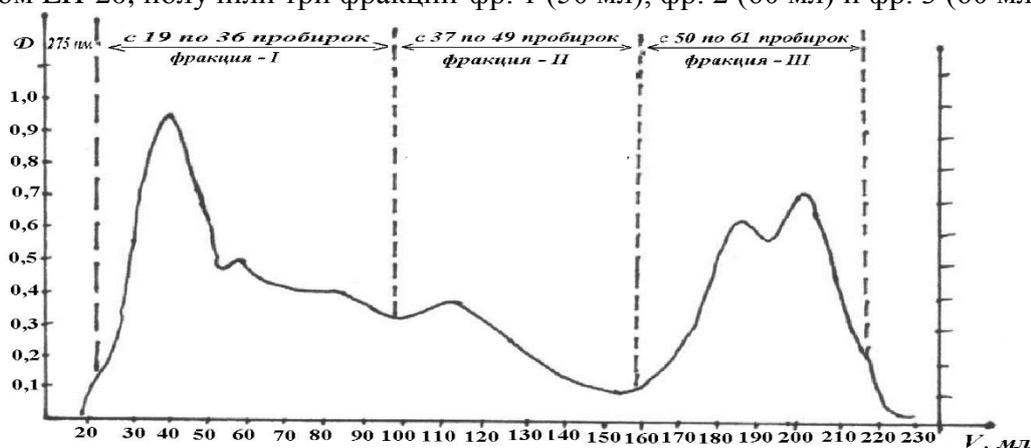


Рис 3. Кривые элюции метанольного экстракта мумиё на колонке с сефадексом LH-20 (25-100 мкм) в смеси- метанол:вода (98:2). Скорость элюции 30 капель/мин.

Аминазин обнаружили во фракции 1 с помощью цветных реакций, используя растворы PdCl_2 , FeCl_2 , HNO_3 и H_2SO_4 . С помощью ТСХ-анализа на пластинке Silufol UV-254 в системе метанол-уксусная кислота-вода (95:3:2) установили, что фракция 1 состоит из трёх разных компонентов, включая аминазин с R_f 0.91.

Для разделения фр-1 на отдельные компоненты использовали повторное расфракционирование, результаты которого приведены на рисунке 4. Анализ с помощью спектрофотометрии показал, что аминазин ($\lambda=306$ нм) находится во фракции 1-2 (рис. 4), выход, которого составил 63% от вводимого количества.

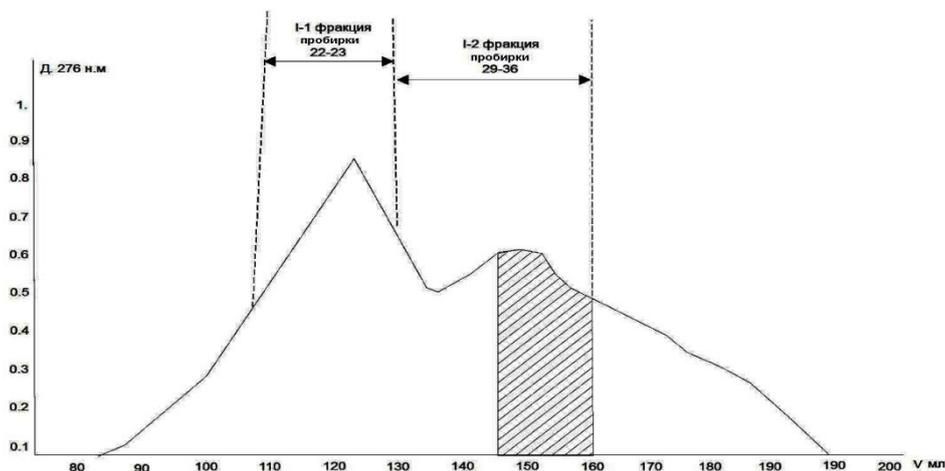


Рис 4. Разделение фракции-1 (рис.3) содержащей аминазин, от других компонентов методом распределительной хроматографии на колонке с сефадексом LH-20, 20-100 μ (размер колонки 26x400 мм, загрузка 22 мг, элюент метанол +H₂O (98:2), скорость потока 10 капель/40 сек). Заштрихованная часть относится к аминазину (было установлено с помощью цветных реакций).

Так как кривая на хроматограмме имела пологую форму, свидетельствующую о наличии ещё дополнительного компонента во фракции, пришлось для уточнения использовать ТСХ-анализ. В результате выяснили, что фракция 1-2 на самом деле состоит из двух компонентов, включая аминазин. И наконец, фракционирование в последний раз позволило окончательно выделить аминазин из состава мумиё (рисунок 5).

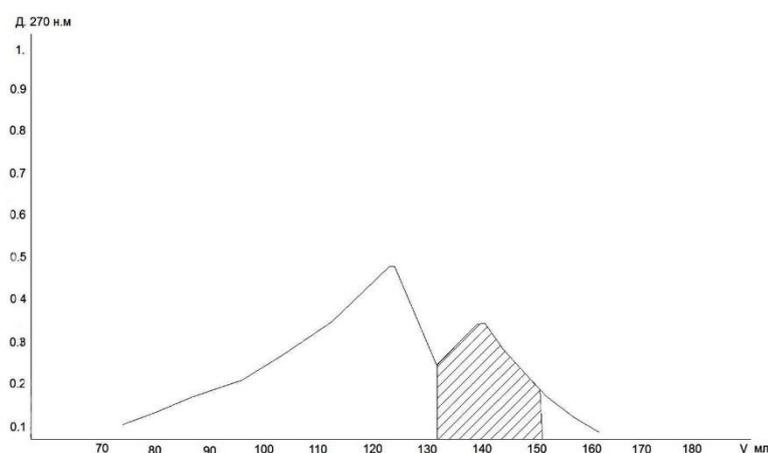


Рис.5. Разделение аминазина из фракции 1-2(рис.4) на колонке (26x400мм) с сефадексом LH-20, 20-100 μ , (элюент метанол+H₂O(98:2), скорость потока 10 капель/20 сек). Заштрихованная часть относится к аминазину

Этим способом удалось выделить 3.2% аминазина из общего количества мумиё, взятого для опыта. Хлоргидрат выделенного аминазина имеет т.пл. 192-195⁰С (лит.т.пл. 194-198⁰С).

При сравнении кривых обращенно-фазовой ВЭЖХ выделенного аминазина из мумиё и эталона аминазина (рис 6) отмечена полная их идентичность. При снятии УФ-спектров выделенного аминазина и аминазина-эталона, получены два идентичных спектра (метанол) λ max 310 (рис 7).

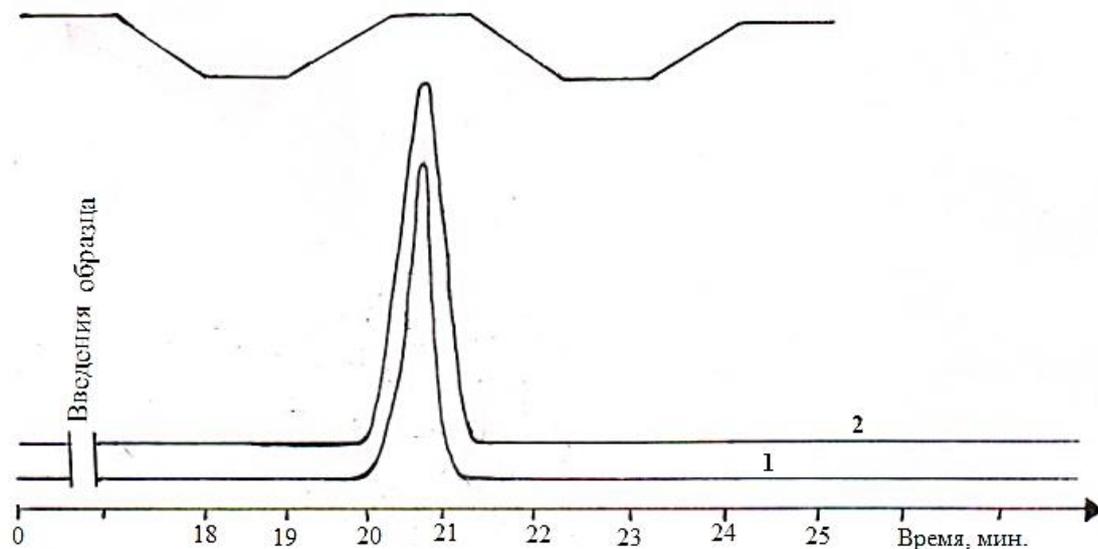


Рис 6. Аналитическая ВЭЖХ амиазина, выделенного из экстракта мумиё (1) и амиазина эталона (2) на колонке 5 мкм, 10x250 мм. Градиент концентрации метанола в 0.2% CH_3COOH . Скорость элюации 0.5 мл/мин. Скорость ленты 0.32 см/мин. Масса разделяемой пробы 0.005г.

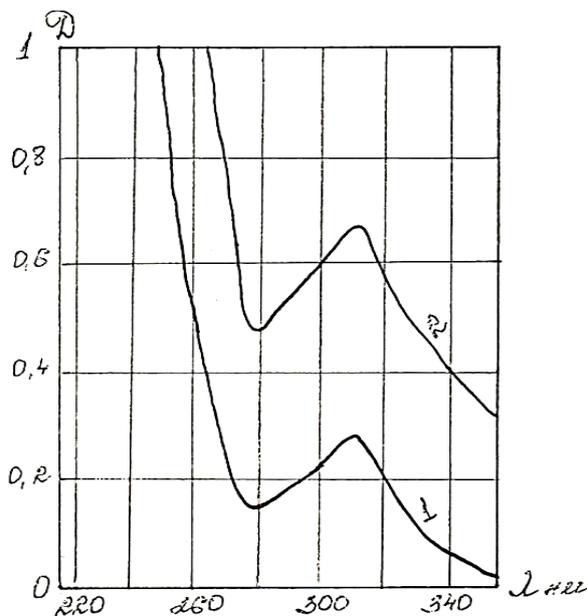


Рис 7. Кривые поглощения амиазина (I), выделенного из состава мумиё и амиазина эталона (II). Спектр снят в метаноле, кювета с толщиной слоя в 1см

5.2. Определение амиазина в мумиё визуальным и потенциометрическим методами титрования

Нами, разработаны также титрометрический и потенциометрический способы количественного определения амиазина в мумиё.

Аналитическое количество метанольной или этанольной фракции мумиё в среде уксусной кислоты в присутствии ацетата окисной ртути (II) титровали раствором хлорной

кислоты. Содержание 2-хлор-10-(3-диметиламинопропил)-фенотиазина (аминазина) вычисляли по предложенной нами формуле:

$$m = \frac{N \cdot V \cdot (E_x \cdot a)}{1000} \quad (A)$$

где m-масса аминазина в анализируемом экстракте, мг;

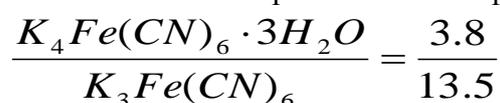
N-нормальность титруемого раствора HClO_4 ;

V-объем раствора HClO_4 , израсходованного на титрование анализируемого вещества, мл;

E_x -эквивалентная масса аминазина; а-фактор пересчета, равный отношению эквивалентной массы хлора к эквивалентной массе аминазина, где $a=0.1$. Точность определения ± 0.5 %.

Точку эквивалентности устанавливали визуально и потенциометрически.

При потенциометрическом титровании использовали платиновый электрод в паре с хлорсеребряным электродом. Для проверки рН-метра (потенциометра) при измерении E использовали свежеприготовленный раствор состава:



Э.Д.С. электродов при $+25^\circ\text{C}$ составляла 275 ± 20 мВ.

Количество аминазина определяли по формуле (A). Результаты потенциометрического титрования приведены в таблице 2. Кривая потенциометрического титрования (рис.8.) имеет S-образную форму, характеризующуюся резким скачком потенциала титрования, соответствующего нейтрализации аминазина.

Таблица 2
Результаты потенциометрического титрования раствора 2-хлор-10-(3-диметиламинопропил)-фенотиазина (аминазина) 0.1 н. HClO_4

Объем титранта, мл (V)	Значение ОВ потенциала E(мВ)	Изменение значения E потенциала $\frac{\nabla E}{\nabla V}$ (мВ)
0.05	+475	-
0.1	+452	23
0.2	+495	43
0.3	+674	179
0.4	+697	23
0.5	+705	8
0.6	+709	10
0.7	+708	1
0.8	+704	4
0.9	+703	1
1.0	+703	0

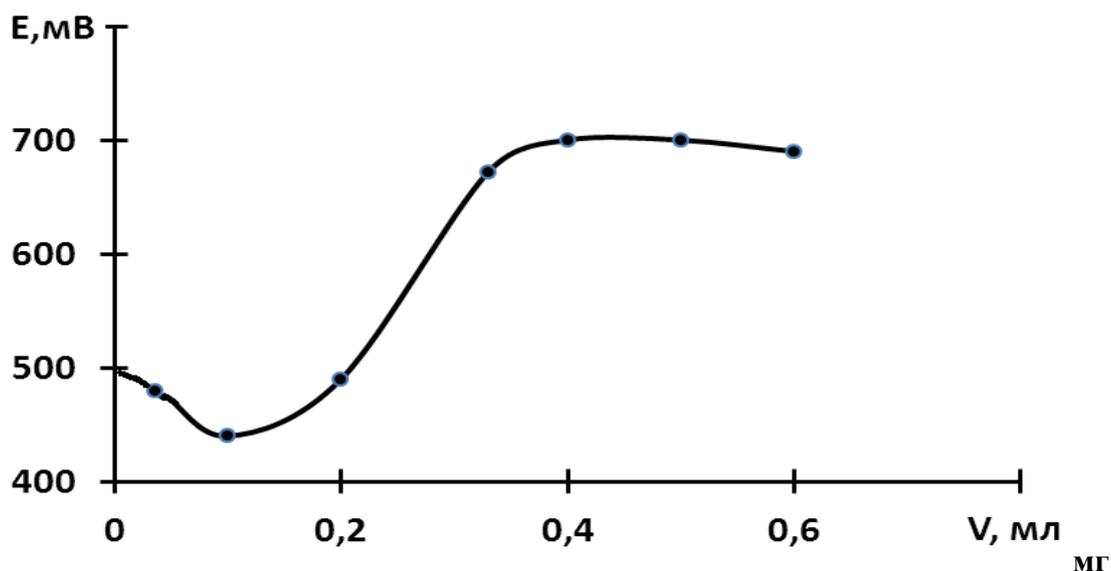


Рис 8. Кривая потенциометрического титрования аминазина в метанольном экстракте мумиё в среде ацетата окисной ртути (II). Было вычислено, что в 1 г мумиё содержится 0.039 г аминазина (3.94%). Эталонном для сравнения служил аминазин.

6. Выделение витамина D из экстракта мумиё и его идентификация

Кальциферолы- это группа витамина Д (антирахитный витамин), которая существует в виде изомеров Д₂, Д₃ (наиболее распространенные), Д₄, Д₅, Д₆ (наименее распространенные): таблица 3.

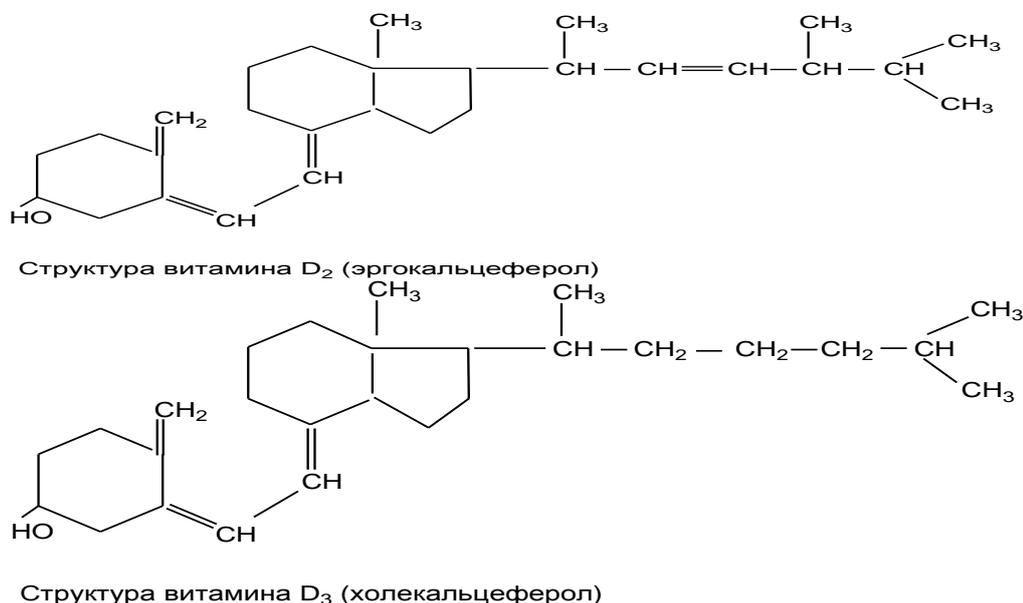


Таблица 3

Физико-химические параметры витаминов Д₂ и Д₃

	Витамин Д ₂	Витамин Д ₃
Температура плавления	115-118 ⁰ С	84-88 ⁰ С
Уф-максимум, нм	265	265
[d] _D ²⁰ (спирт)	103-106 ⁰	105-112 ⁰

Основная функция витамина D₃ -регуляция транспорта кальция и фосфатов в клетках слизистой оболочки тонкого кишечника и костной ткани. Из кишечника витамин D₃ поступает в печень и при участии специфических ферментов-гидроксил превращается в метаболит 25-

ОН D₃, переносимый током крови в почки. Здесь происходит его дальнейшее превращение в метаболит 25-ОН D₂, который способствует усиленной реасорбции фосфатов. В почечных каналах образуется фосфорнокальциевая соль, которая током крови приносится в костную ткань, где используется ее минерализация.

Рыбий жир, сливочное масло, желток яйца, печень животных, молоко-источники витамина D для человека.

Химическое строение витаминов группы D было выяснено в 1935-1936 гг. Правильность строения витамина D₃ подтверждена в 1958-1959 гг. (Инхоффен) путем полного синтеза этого витамина.

Наш интерес к изучению химического состава мумиё был вызван тем, что в течение десятилетий разными исследователями, в том числе, медиками, биохимиками и химиками был изучен широкий спектр физиологической активности этого природного бальзама. Примером может служить предписание ему многих целебных свойств, среди которых можно привести использование мумиё для ускорения заживления костей после переломов и предотвращения нарушения фосфорнокальциевого обмена. Среди многочисленных исследований по мумиё, особое место занимают работы профессора Шакирова А.Ш. (г. Ташкент) по D –витаминной активности мумиё.

Исходя из этого, мы решили определить и извлечь витамина D₃ из мумиё. После проведения ряда экспериментальных опытов разными методами, удалось разработать схему химической обработки мумиё для определения в нём содержания витамина D₃ (холекальциферола). Это мы сделали, используя качественные реакции на присутствие витамина D в мумиё. Для этого в сухую пробирку налили спиртовой раствор экстракта мумиё и добавили раствор брома в хлороформе (1:60). Раствор принял зеленовато-голубую окраску, свидетельствующую о наличии в растворе витамина D. Опрыскивание хроматограммы этанольного экстракта мумиё хлороформным раствором пентахлорида сурьмы даёт коричнево-синюю окраску, характерную витаминам группы D. Для сравнения в качестве эталона взяли витамин D₂, который показал идентичные свойства.

Так как мумиё считается самой многокомпонентной системой, в состав которого входит около 50 разных микроэлементов и соединений, разделение электрофоретическими методами колоночной хроматографии не привело к успеху. Отдельные типовые сгруппировавшиеся соединения не отделились друг от друга при использовании этих методов.

Исходя из этого, мы пришли к выводу, что в мумиё витамин D₃ связан с фосфолипидами, белками, аминокислотами и другими азотистыми основаниями в виде прочного конгломератного комплекса, который необходимо было разрушать действием ацетилхлорида, как ацилирующего реагента для связывания высокомолекулярных белковых компонентов и нуклеофил содержащих соединений. (аминокислот, фенолов).

Витамин D₃ в экстракте мумиё связывали с хлоридом сурьмы (III) для образования окрашенного продукта, необходимого для определения оптической плотности раствора, служащего мерой для уточнения количества витамина D₃. Калибровочную кривую строили, откладывая значения оптической плотности (D) растворов при 260 нм по оси ординат и значения 2:1:0.5:0.25:0.125 и 0.0625 концентрации витамина D₂ по оси абсциссы (рис 9).

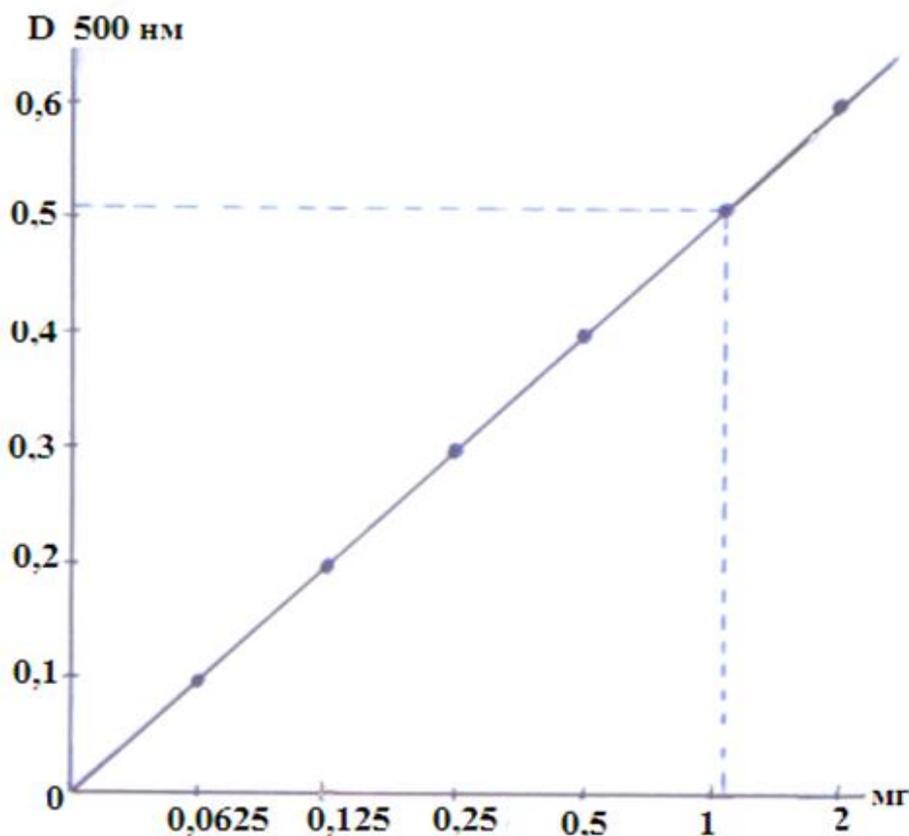


Рис. 9. Калибровочная кривая, построенная на основе витамина D₂ для определения содержания витамина D₃ в мумиё

Суть данной работы заключается в том, что определенное количество спиртового экстракта мумиё обрабатывают сухим эфиром, остаток растворяют в хлороформе и к точному объёму данного раствора добавляют ацетилхлорид и хлорид сурьмы (111), затем определяют оптическую плотность данной смеси на спектрофотометре СФ-26 при 260 нм в кювете с толщиной слоя в 1 см относительно смеси ацетилхлорида, хлорида сурьмы (111) в хлороформе. По найденному показателю оптической плотности после измерения и использования калибровочного графика, построенного на основании витамина D₂ в мг, находят количество витамина D₃ в экстракте мумиё с переводом на содержание витамина D₃ в мумиё.

Данный способ хорош тем, что способствует определению количества присутствующих витаминов группы D в исследуемом объекте. Однако, нас интересовало выделение конкретного витамина D₃, который больше всего имеется в мумиё. Так как было отмечено, что мумиё считается самой многокомпонентной системой, большая часть которых относится к органическим сложным веществам, и из-за сложной конгломератной агрегации выделение отдельного компонента из этого комплекса путём экстракции, осаждения, колоночной хроматографии не дало ожидаемых результатов. Осуществить расчленение компонентов удалось путем растворения мумиё в одномолярном растворе NaHCO₃ и путем действия сильного ацилирующего реагента C₆H₅CH₂OSOC₂Cl (бензильного эфира хлоругольной кислоты), как блокирующего реагента азотсодержащих функциональных групп в условиях Шотен-Баумана (pH 8-10). После подкисления свободного раствора мумиё 6 н HCl, выпавшее масло экстрагировали хлороформом и после упаривания растворителя образовался маслообразный остаток, содержащий наряду с другими компонентами и витамин D₃. Хроматографирование данного продукта на силуфольной пластинке и опрыскивание хроматограммы раствором пентахлорида сурьмы дало одно характерное пятно коричнево-синей окраски с R_f 0.84, характерное для витамина группы- D. Эталонном для сравнения служил витамин D₂, изомер витамина D₃. Затем полученное масло подвергли возгонке в вакууме на специальном приборе, (рис.10).

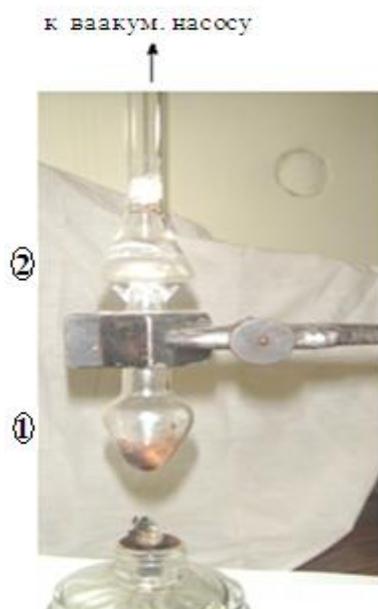


Рис. 10. Прибор для возгонки витамина D₃. Верхняя часть (2) охлаждается

Витамин D₃ из комплексной смеси возгоняется в виде белых тонких игольчатых кристаллов, которые оседают на стенках охлаждаемого сосуда. Выход перегнанного витамина D₃ составлял 2.33 % от сухой массы мумиё, взятого для разработки. Анализ выделенного витамина D₃ проводили тонкослойной хроматографией на силуфоле UV-254, R_f 0.84 (н. бутанол-уксусная кислота-вода) (4:1:1), R_f 0.66 (пиридин-изоамиловый спирт, 1:1), R_f 0.94 (метанол-вода, 98:2). Зоны вещества проявляли парами йода.

Масс-спектр электронного удара продукта витамина D₃ представлен на рис.11. В масс-спектре наблюдается существенная фрагментация.

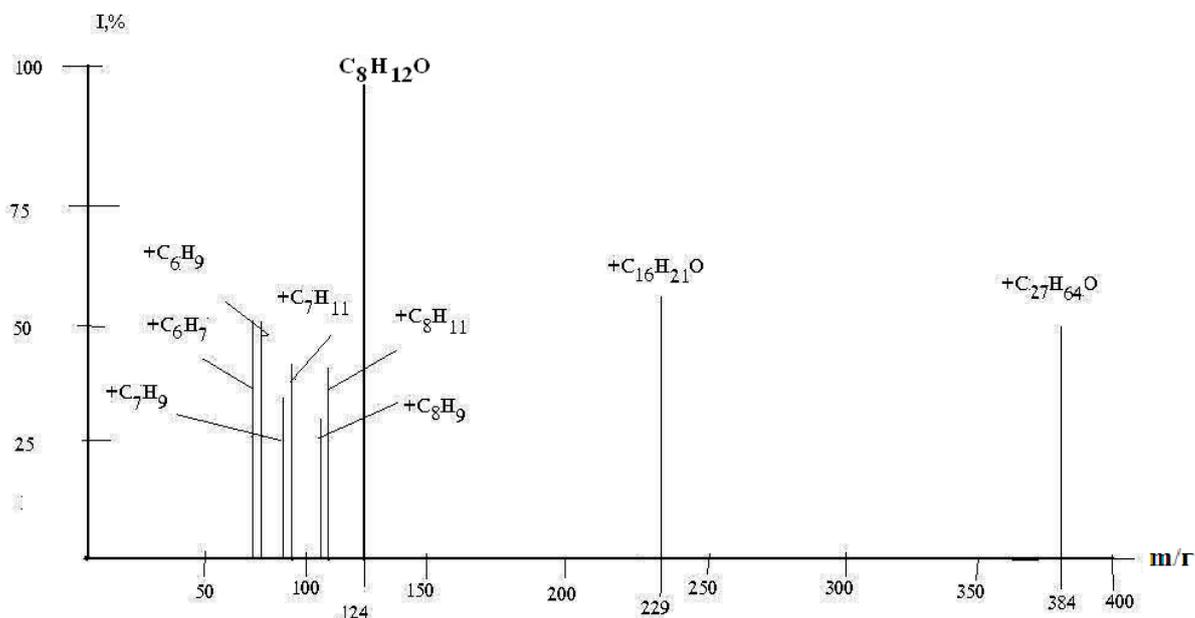


Рис 11. Масс-спектр холекальциферола (витамина D₃). В масс-спектре обнаруживаются интенсивные пики ионов на 384 а.е.м., (M⁺-C₂₇H₄₄O), 229 (M⁺-C₁₆H₂₁O), 124 (M⁺-C₈H₁₂O), 107 (M⁺-C₈H₁₁O), 105 (M⁺-C₈H₉O), 95 (M⁺-C₇H₁₁O), 93 (M⁺-C₇H₉O), 81(M⁺-C₆H₉O), 79 (M⁺-C₆H₇) фрагменты с более высоким содержанием водорода похожи на серии ионов в полиенах.

7. Извлечение и исследование свободных аминокислот мумиё

О присутствии свободных аминокислот в составе мумиё впервые высказались медики-исследователи Узбекистана во главе с известным учёным по исследованию лечебных свойств мумиё профессором Шакировым А.Ш., а также таджикские ученые из Института химии АН РТ под руководством академика Порошина К.Т. Однако, ими не были выделены и охарактеризованы аминокислоты какими-то специальными методами, кроме качественных реакций на аминокислоты. Поэтому, это сообщение носило сугубо информативный характер. Для проверки и подтверждения наличия аминокислот в мумиё были сняты ИК-спектры исследуемой фракции, полученной методом прессования с KBr на спектрофотометре UR-75 (ГДР) (рис.12).

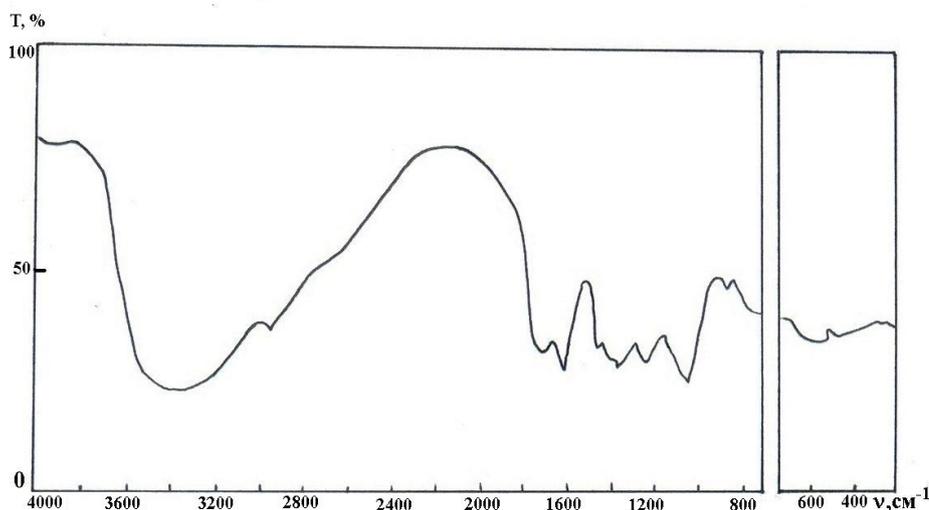


Рис 12. ИК-спектр чистого мумиё – «асиль»

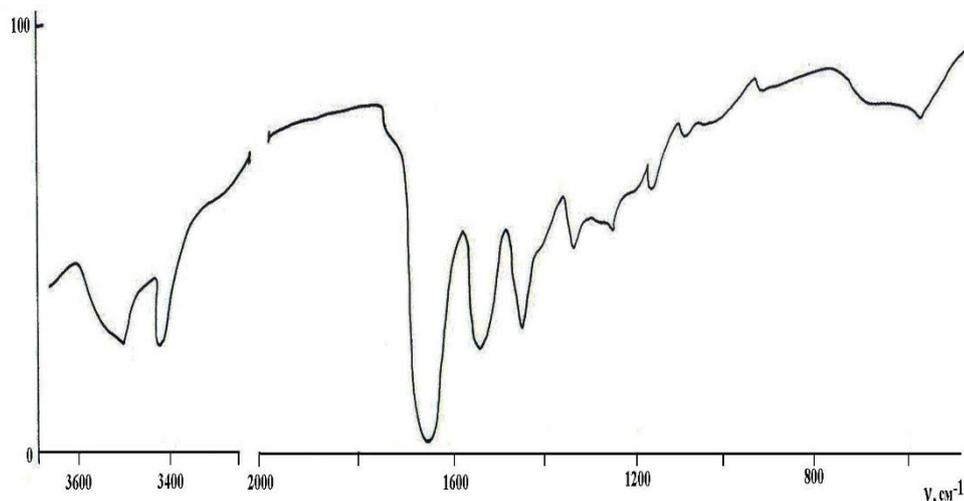


Рис 13. ИК-спектр смеси аминокислот: Глицина (Гли), Аланина (Ала), Валина (Вал), Пролина (Про), Гистидина (Гис)

Полученные ИК-спектры разных образцов мумиё показали присутствие идентичных полос валентного и деформационного колебания, относящихся к функциональным группам аминокислот, в том числе, к первичным и вторичным аминам в связанной форме ($1580 - 1645\text{cm}^{-1}$). Поглощение в области 1660cm^{-1} обусловлено валентными колебаниями NHCO -групп. Для карбонильных групп характерны интенсивные полосы поглощения в области $1900 - 1580\text{cm}^{-1}$, относящиеся к валентным колебаниям. Для сравнения мы приведем ИК-спектр смеси пяти аминокислот Gly, Ala, Val, Pro, His (рис. 13).

Разработанный нами способ связывания и выделения свободных аминокислот из сложной смеси мумиё включает в себя химическую обработку содового раствора мумиё при pH=9, действием сильного ацилирующего реагента аминной и иминовой групп, карбобензоксихлоридом (C₆H₅CH₂OCOCl) в условиях Шотен-Баумана с последующим подкислением реакционной среды до pH 3,5 и осаждения продукта.

Карбобензоксихлорид взаимодействует с α-амин и иминовой группой свободных аминокислот, превращая их в натриевые соли карбобензоксиаминокислот C₆H₅CH₂OCO–NH–(R)CH–COONa). Подкисление реакционной среды соляной кислотой (pH=3–3,5) приводит к получению смеси карбобензоксиаминокислот со свободной –COOH функцией и выделению продукта реакции в маслообразном состоянии.

Процесс ацилирования аминокислот в щелочной среде раствора мумиё контролируют с помощью анализа ТСХ на силуфоле - UV-254. Образование защищённых аминокислот на хроматограмме обнаруживают через 2-3 часа, и далее их концентрация постепенно возрастает. По окончании реакции раствор обрабатывают серным эфиром, при этом вся чернота из раствора и эфирорастворимые компоненты, не вступившие в реакцию ацилирования, а также избыток карбобензоксихлорида переходят в эфирный слой. Выпавшая масса из основного раствора после подкисления бн. соляной кислотой, является смесью карбобензоксиаминокислот, которая представляет собой густое светло-коричневое маслообразное образование, выход которого составляет 3,5 % от сухой массы мумиё, взятой для разработки. ТСХ анализ на силуфоле в системе метанол – уксусная кислота – вода (4:1:1) показал присутствие пяти продуктов в виде хроматографических пятен с R_{f1} 0.33; R_{f2} 0.47; R_{f3} 0.6; R_{f4} 0.8; и R_{f5} 0.89; в качестве проявителя использовали пары йода. Проявление раствором нингидрина не дало окрашенных пятен. Это свидетельствует о полном блокировании аминной группы аминокислот в мумиё карбобензоксихлоридом. Полученную смесь карбобензоксиаминокислот, после очистки, подвергли гидрогенолизу над палладиевой чернью до полного отщепления карбобензокси-группы. Полноту снятия карбобензоксизащиты контролировали с помощью ТСХ. Качественный состав прогидрированных аминокислот над палладиевой чернью определяли методом БХ и ТСХ, на бумаге марки Filtrak FN-14 и на пластинках силуфола UV-254 в системе растворителей МУВ (95:3:2) и БУВ (4:1:1). Для сравнения брали стандартный набор аминокислот (ТУ 6-09-3147-83) в концентрации 0,3 %. Хроматограммы проявляли 0,2 % - ным раствором нингидрина в ацетоне и парами йода. На хроматограммах проявляются пять нингидрино- и йодочувствительных окрашенных пятен, соответствующих аминокислотам: Глицину, Аланину, Валину, Пролину и Гистидину (таб. 4).

Таблица 4

Данные хроматографического анализа аминокислотной фракции мумиё

Аминокислоты, выделенные из мумиё (М), и контрольные (К)	R _f , система метанол+вода+CH ₃ COOH, 95:2:3			
	ТСХ		БХ	
	М	К	М	К
Глицин (Gly)	0.13	0.090	0.17	0.16
Аланин (Ala)	0.06	0.070	0.26	0.26
Валин (Val)	0.085	0.080	0.47	0.49
Пролин (Pro)	0.081	0.060	0.34	0.34
Гистидин (His)	0.055	0.050	0.14	0.14

Количественный состав аминокислот из мумиё устанавливали при помощи аминокислотного анализатора Hitachi 635. Аминокислотный анализ: Gly 0.9 (I); Ala 0.97 (I); Val 0.98 (I); Pro 0.96 (I); His 0.95 (I).

Для лучшего разделения и получения соответствующего результата проводили фракционирование аминокислот методом зонального разделения (двумерная хроматография). Для анализа использовали раствор прогидрированной фракции аминокислот и смесь равных количеств пяти аминокислот (Глицин + Аланин + Валин + Пролин + Гистидин) (рис. 14).

Для получения более достоверных результатов хроматографию комбинировали с зональным электрофорезом (рис. 15). Анализ электрофореограммы фракций аминокислот, выделенных из мумиё, показал более заметную относительно электрофоретическую подвижность (ОЭП) по интенсивности полос и идентичных по ОЭП с аминокислотами, нанесенными в качестве контроля. ОЭП вычисляли по формуле:

$$U = \frac{d \cdot l}{v \cdot t} \text{ см}^2 / \text{вольт. сек.}$$

d – путь, пройденный веществом от старта,

l - длина бумажной полосы,

t - время проведения электрофореза,

v- напряжение (400V)

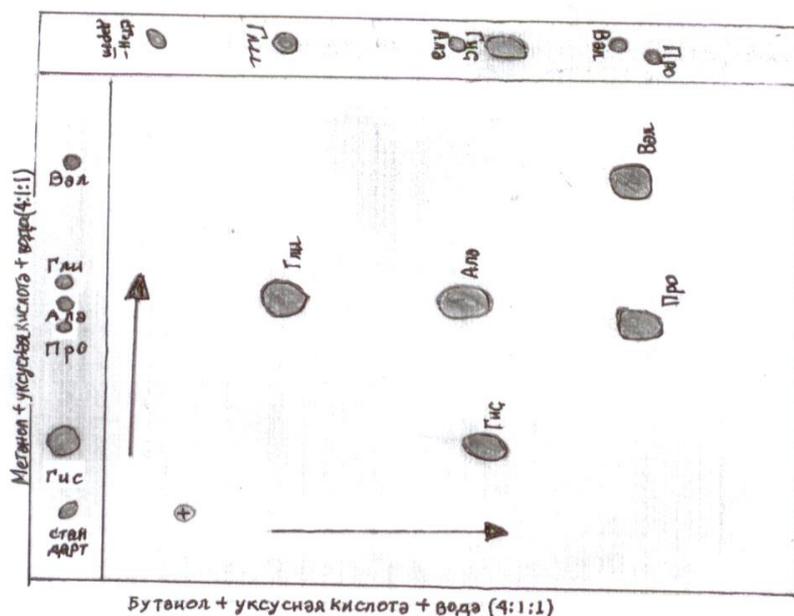


Рис 14. Двумерная ТСХ аминокислотной фракции: мумиё нанесли в точке (+), рядом с левой стороны нанесли смесь (стандарт) аминокислот (Gly + Ala + Val + Pro + His). Для разделения использовали систему смесь: метанол - уксусная кислота - вода (4:1:1). Затем хроматограмму удаляли, высушивали, вырезали линию стандарта, поворачивали на 90°С и наносили с левой стороны опять стандарт аминокислоты через систему бутанол - уксусная кислота - вода (4:1:1), проявитель нингидрин.

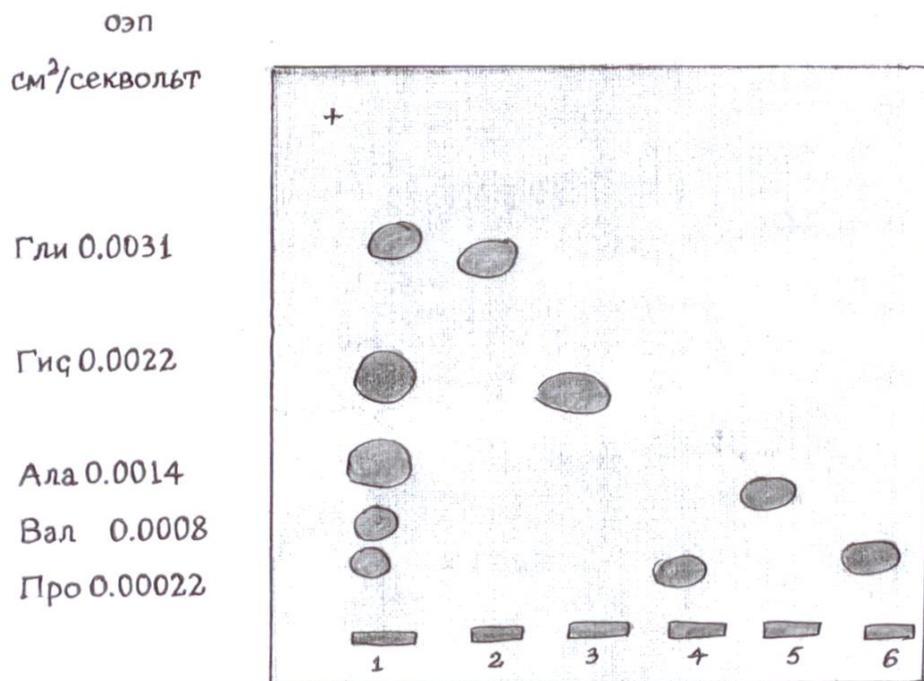


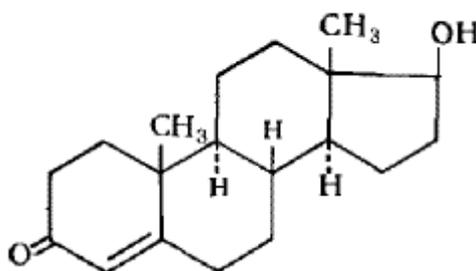
Рис. 15. Электрофореограмма аминокислот (1) после гидрирования Кбз-аминокислот и контроля: Гли (2), Ала (3), Вал (4), Про (5) Гис (6). Буферный раствор 5% уксусной кислоты. Проявитель ацетоновый раствор нингидрина, содержащий: 20 мг нингидрина, 0.3 мл уксусной кислоты, 1.5 мл пиридина в 39 мл ацетона. ОЭП вычисляли по формуле:

$$U = \frac{d \cdot l}{v \cdot t} \text{ см}^2 / \text{вольт} \cdot \text{сек.}$$

d - путь пройденный веществом от линии старта,
l - длина бумажной полосы,
t - время проведения электрофореза,
v - напряжение электрического тока (400V)

8. Выделение гормона тестостерона из мумиё и его идентификация. Тестостерон, мужской половой гормон, регулирует развитие половых органов и вторичных признаков.

По физиологическому действию тестостерон очень активен, даже в малых количествах. Формула тестостерона выглядит следующим образом.



а) Для обнаружения стероидов мы провели ряд качественных реакций. При этом наш выбор выпал на реакцию, которая относится к качественной реакции на определение тестостерона: в спиртовой раствор экстракта мумиё добавляют несколько капель гидроксида натрия и м-динитробензола, после перемешивания раствор окрашивается в вишнево-красный цвет. Это специфическая реакция на присутствие стероидов и андростеронов.

б) Опыт проводили на хроматографической бумаге в системе метанол-вода-уксусная кислота (95:2:3). Спиртовый экстракт мумиё нанесли на хроматографическую бумагу в виде точек. Хроматографировали в системе метанол-вода-уксусная кислота (95:2:3). Хроматограмму проявляли раствором нингидрина, при этом проявились лишь нингидринчувствительные соединения (7 пятен). Такую же непроявленную хроматограмму опрыскивали м-динитробензолом; одно пятно с R_f 0.66 проявилось в виде пурпурной окраски, что свидетельствует о присутствии тестостерона в мумиё. В качестве эталона использовали тестостерон.

в) Опыт проводили на пластинках силуфола (ТСХ) в системе метанол-вода-уксусная кислота (95:2:3). Сухую хроматограмму проявляли м-динитробензолом. Проявилось только одно пятно с R_f 0.66.

Опыт повторили. На этот раз наряду с основным веществом на хроматографическую бумагу нанесли тестостерон, как контрольно стандартное вещество. После хроматографирования и проявления хроматограммы м-динитробензолом проявились два пурпурно окрашенных пятна с одинаковыми R_f -ами, равными 0.66 (рис. 16).



Рис 16. Хроматограмма, показывающая тестостерон в мумиё.

1-тестостерон из спиртового экстракта мумиё

2- тестостерон, эталон для сравнения

Система метанол-вода-уксусная кислота (95:2:3)

Проявитель спиртовый раствор м-динитробензол

г) Определённое количество мумиё поместили в мини аппарат Сокслета и экстрагировали эфиром в течение 15 часов. Эфирную часть упарили, остаток растворили в этаноле и исследовали хроматографически. На полоску хроматографической бумаги нанесли в виде точек спиртовый раствор полученного экстракта и рядом в качестве эталона нанесли тестостерон, полученный после гидролиза из тестостеронпропионата в системе хлороформ-метанол-вода (100:40:7). После хроматографирования, хроматограмму проявили на тестостерона. Для этого в ванночку налили раствор, (а) состоящий из 1 объёма (15 мл) раствора КОН (80 г КОН+60 мл H_2O +300 мл C_2H_5OH), разбавили 5 объёмами этанола, перемешали. Хроматограмму промочили этим раствором, быстро промокнули фильтровальной бумагой и хроматограмму погрузили в раствор, (б) т.е. 2% этанольный раствор м-динитробензола: хроматограмму промокнули. На расстоянии половины от линии старта проявились два новых цветных пятна с R_f 0.55 пурпурного цвета, свидетельствующие о присутствии тестостерона в мумиё. Тестостерон количественно выделяли из мумиё с помощью колоночной и бумажной хроматографии методом элюирования продукта этанолом из полоски хроматограммы, содержащей тестостерон. После упаривания элюата и высушивания на вакууме получили полукристаллический продукт, который закристаллизовался после недолгого хранения в холодильнике. Отдельные кристаллы плавил на аппарате Бойтуса, который показывал 150-152⁰С (лит. 150-152⁰С). Часть полученного гормона смешивали с

пропионовым ангидридом (микросинтез) при 100-110⁰С с последующей перекристаллизацией из метанола. Затем получили тестостеронпропионат-кремо-сероватый кристаллический продукт с т.пл. 162-164⁰С.

ИК-спектры полученного тестостерона и тестостерона эталона приведены на рисунках 17 и 18.

При сравнении спектров с максимумами поглощения найдены идентичные спектры, характеризующие однородность и соответственность по структуре двух сравниваемых продуктов тестостерона и стандарта. Основные характеристические параметры ИК-спектров, следующие: 3500-3000см⁻¹(ОН), 1740-1700см⁻¹C=O (сильная), 2990-2927см⁻¹(СН-слабая).

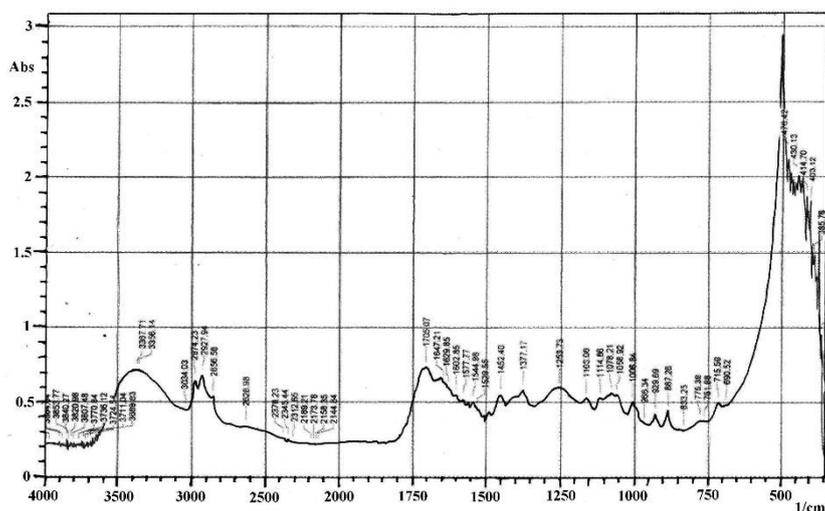


Рис 17. ИК- характеристические спектры тестостерона, полученного из мумиё

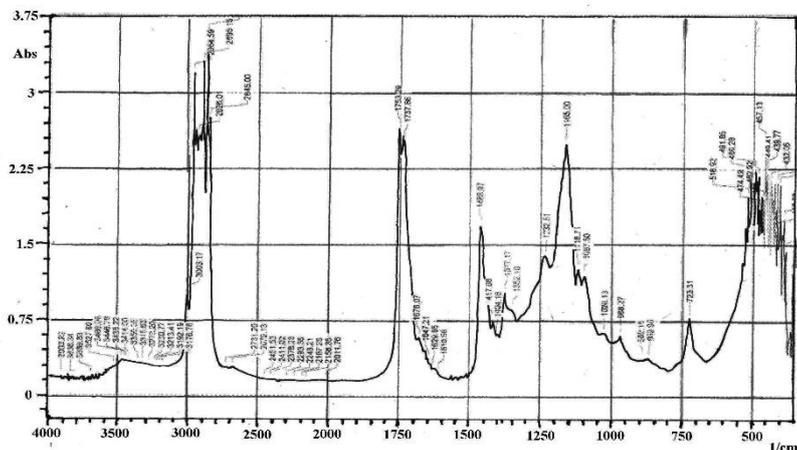


Рис 18. ИК-спектр тестостерона - стандарта

Сравнение ИК-спектров выделенного тестостерона и тестостерона – стандарта показывает их идентичность. Максимум поглощения в обоих спектрах характеризуют их однородность и соответствие по структуре двух сравниваемых продуктов тестостерона из мумиё и тестостерона – стандарта.

ВЫВОДЫ

1. Экспериментальным путём в составе природного мумиё обнаружены биологически активные компоненты – витамины, стероиды, порфирины, аминокислоты и другие соединения, охарактеризовано их строение.

2. С помощью распределительной, тонкослойной, бумажной и высокоэффективной хроматографии (ВЭЖХ) в спиртовом экстракте мумиё расфракционированы и определены: витамины D₃, B₁₂, аминазин, аминокислоты, тестостерон, капропорфирин и проведены их идентификации.

3. Путём ацилирования свободных α – аминокислот, присутствующих в мумиё, получен композит карбобензоксиаминокислот (КБЗ), и последующего гидрогенолиза защитной группы (КБЗ) получены в свободном виде композита аминокислоты: Gly-, Ala-, Val-, Pro-, His с выходом 0,4%.

4. Методом сублимации в вакууме из фракции мумиё получен витамин D₃ с выходом 2,2%. С использованием титрометрического и потенциометрического методов определено количество аминазина в мумиё, что составляет 3,2%.

5. С помощью колоночной и бумажной хроматографии из экстракта мумиё извлечён тестостерон с выходом 0,5%.

Основные результаты диссертации изложены в следующих публикациях:

1. Ш.Х.Холиков. 2-хлор-10-(3-диметиламино-пропил)- фенотиазин (аминазин) из мумиё / Ш.Х.Холиков, С.В.Алиева, **С.Х. Шоев** // Докл.АН РТ. Душанбе-2008. Т.51. №2. -С. 122-126.
 2. Ш.Х.Холиков. Определение витамина D₃ из природного мумиё / Ш.Х.Холиков, **С.Х.Шоев**, М.М. Ходжаев // Вестник Таджикского национального университета (научный журнал). Душанбе-2009. №1(49). -С.158-162.
 3. Ш.Х.Холиков. Получение и идентификация свободных аминокислот из мумиё / Ш.Х.Холиков, **С.Х. Шоев** // Вестник Таджикского национального университета (научный журнал). Душанбе-2010. №3(59). -С.180-183.
 4. Sh.Khalikov. Allocation and characteristic some ningidrin sensitive connection from a natural mumiyo / Sh.Khalikov, S.V.Alieva, M.Z.Kadirov, **S.H. Shoyev** // Journal The Scientific Heritage. Budapest, Hungary- 2018. No 25. -P.10-25.
- материалах научных конференциях, симпозиумах и семинарах:
5. Ш.Х.Холиков. Рациональный подход к получению витамина D₃ из природного мумиё / Ш.Х.Холиков, **С.Х. Шоев**, М.З. Кодиров // Материалы на X международной научно – практической конференции «Найновите научни постижения-2014», Химия и химически технологии, София «Бял ГРАД-БГ» ООД -2014. Т.29. -С.35-40.
 6. Шоев С.Х. Выделение тестостерона из органической экстракции мумиё / **С.Х. Шоев**, Ф.К. Гулахмад // Материалы международной конференции «Синтез, выделение и изучение комплексных свойств новых биологически активных соеди-

- нений» посвященной 50-летию кафедры органической химии и 70-летию доктора химических наук, профессора Халикова Ширинбека Халиковича. Душанбе-2011. -С.117-118.
7. Ш.Х.Холиков. Электрофоретический и хроматографический анализ аминокислот состава мумиё / Ш.Х.Холиков, **С.Х. Шоев** // Материалы научно-теоретической конференции профессорско-преподавательского состава и студентов, посвященной «17-й годовщине независимости Республики Таджикистан», 1150-летию основоположника таджикско-персидской литературы Абуабдулло Рудаки и году таджикского языка. Душанбе -2008. -С.220-221.
8. Ш.Х.Холиков. Выделение и идентификация гормона тестостерона из мумиё с помощью ИК-спектроскопии /Ш.Х.Холиков, **С.Х. Шоев** //Материалы республиканской конференции «Перспективы синтеза в области химии и технологии гетеросоединений». Душанбе - 2012. -С.105-107.