

Ж.Ж.Жумағалиева

Қарағандын қосударственнй университет им. Е.А.Букетова

**БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ НОВЫХ ПРОИЗВОДНЫХ АЛКАЛОИДА ГЛАУЦИНА, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ РАСТЕНИЙ *THALICTRUM FOETIDUM* L**

Орталық Қазақстан территориясында өсетін сасық маралоты өсімдігіне химиялық зерттеулер жүргізілді, құрамынан белгілі апорфинді алкалоид — глауцин молекуласы бөлініп алынды. Алынған алкалоидтар мен олардың синтезделген қосылыстарының биологиялық белсенділіктері зерттелді. Осы өсімдіктің алкалоид глауциннің жаңа қасиеттері қарастырылды.

On the basis of aporphine alkaloid glaucine her new derivatives were synthesized. The structures of obtained compounds were determined on basis of IR, -NMR  $^1H$ ,  $^{13}C$  spectral data. Aporfinic alkaloids and their derivatives possess wide spectrum of biological activity. On the basis of aporphine alkaloid glaucine her new derivatives were synthesized.

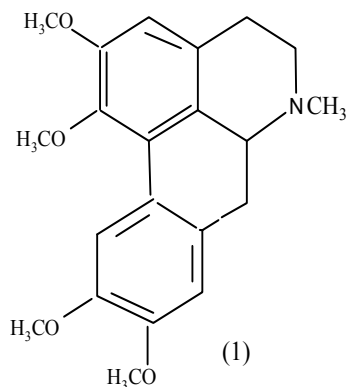
Поиск и создание новых физиологически активных веществ из растительного сырья считается наиболее актуальным и перспективным для получения лекарственных препаратов самого различного назначения. В этом отношении особый интерес представляют алкалоиды, занимающие уникальное место среди природных соединений благодаря их огромному структурному многообразию, высокой физиологической активности и широкому спектру действия. Так, на основе алкалоида лаппаконитина из некоторых видов растений рода *Aconitum* (аконит) создан препарат «Аллапинин», который рекомендован для применения в медицинской практике для лечения нарушения сердечного ритма [1–2].

Флора Казахстана в своем составе насчитывает более ста видов алкалоидоносных растений. Среди последних наибольшие запасы представлены такими, как акониты (*Aconitum*), живокост (*Delphinium*), василистник (*Thalictrum*), различные виды лютиковых [3].

Растения рода *Thalictrum* (Василистник) семейства *Ranunculaceae* (Лютиковые) широко распространены по всему земному шару и издавна применяются в народной медицине.

Из 9 видов Василистника, произрастающих на территории Казахстана, исследовано 7: *Thalictrum alpinum* L., *Thalictrum flavum*., *Thalictrum foetidum* L., *Thalictrum isopyr*., *Thalictrum longip*., *Thalictrum minus*., *Thalictrum simplex* L. Алкалоиды *Thalictrum* обнаруживают широкий спектр физиологической активности [4].

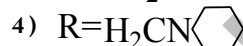
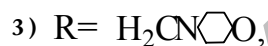
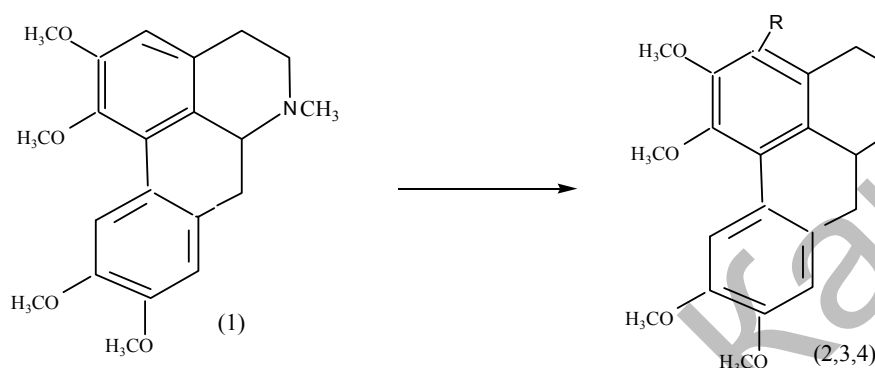
В данной работе нами изучено растение *Thalictrum foetidum* L. (василистник вонючий), собранное в Каркаралынском районе Карагандинской области в фазе цветения. Из надземной части растения *Thalictrum foetidum* L. методом хлороформной экстракции получили суммы экстрактивных веществ. В результате колоночной хроматографии суммы экстрактивных веществ выделили алкалоида глауцин.



ИК-спектр молекул (1) имеет полосы поглощения в области 2930, 1600, 1440, 2850, 2599, 2700  $\text{см}^{-1}$ , характерные соответственно для метильных групп, ароматических колец, метиленовых фрагментов.

В спектре ПМР- $^1\text{H}$  (II) проявляются сигналы протонов четырех метоксильных групп при 3.59, 3.87, 3.93, 3.94 м.д. (3H), а также N-метильных групп при 2.93 м.д. в виде синглета. В области ароматических протонов H-3, H-8, H-11 наблюдаются однопротонные синглеты при 6.56- 6.78 и 8.00 м.д.

При действии на глауцин (1) вторичных аминов в присутствии параформа при умеренном нагревании протекает региоселективное аминометилирование, приводящее к образованию аминопроизводных (2–4).



В ПМР-спектре (2) проявляются сигналы протонов  $\text{N}-(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$  группы при 2.18 м.д., четырех метоксильных групп при 3.87, 3.98, 3.99, 3.94 м.д. (3H), а также N-CH<sub>3</sub> — при 3.0 м.д. в виде синглета.

Были изучены антигрибковая и фагоцитарная активность диэтиламинометилглауцина и морфолинометилглауцина.

**Антигрибковая активность.** В результате испытаний установлено, что диэтиламинометилглауцин и морфолинометилглауцин проявляют умеренную антигрибковую активность. Умеренно-выраженное антигрибковое действие к грибковому штамму *Trichophyton men.* проявил диэтиламинометил глауцин. В отношении *Penicillium citrinum* эти вещества проявили слабую активность. Также эти вещества проявили слабую антигрибковую активность к грибковым штаммам *Aspergillus niger* и *Aspergillus flavus*.

**Фагоцитарной активности** — установлена только для 2 веществ: диэтиламинометил- и морфолинометилглауцины. Эти вещества в низкой концентрации (0,01 мг/мл) оказывают стимулирующее, а в высокой (1 мг/мл) — супрессирующее воздействие на фагоцитоз. Таким образом, диэтиламинометил- и морфолинометилглауцины оказывают выраженное стимулирующее фагоцитозное действие.

#### Материалы и методы исследования

Для колоночной хроматографии использовали прокаленный  $\text{A}_2\text{O}_3$  (Ист. активности), для ТСХ — пластинки Silufol UV-254 и Silicagel on Aluminum, 20X., проявитель — пары йода. Температуру плавления определяли на приборе Voethius. ИК-спектры снимали на Фурье-спектрофотометре Vektor-22 в КВг. Спектры ЯМР $^1\text{H}$  и  $^{13}\text{C}$  получены на спектрометрах Bruker AC 200 [рабочие частоты 200.13 ( $^1\text{H}$ ) и 50.32 МГц ( $^{13}\text{C}$ )] и Bruker DRX 500 [рабочие частоты 500.13 ( $^1\text{H}$ ) и 125.76 МГц ( $^{13}\text{C}$ )] для 5 %-ных растворов  $\text{CDCl}_3$  или  $\text{CD}_3\text{OD}$ .

**Хлороформная экстракция:** 900г надземной части воздушно-сухого сырья смачивали 5 %-ным раствором соды и исчерпывающе экстрагировали хлороформом. Хлороформный экстракт взбалтывали с 5 %-ным раствором серной кислоты. Кислый раствор промывали хлороформом, затем при охлаждении подщелачивали содой и алкалоиды экстрагировали хлороформом. Получили 12 г (1,3 %) суммы экстрактивных веществ (от веса воздушно-сухого сырья). При колоночной хроматографии на оксиде алюминия в соотношении сумма: носитель 1:70 с применением в качестве элюента смеси гексан-этилацетат выделили 0,03г алкалоида глауцина. Т.пл 115–117°C.

ИК- спектр (КВг  $\nu$ ,  $\text{см}^{-1}$ ): 846, 950, 975, 1005, 1121, 1161, 1200, 1228, 1318, 1392, 1440, 1535, 1595, 1600, 2850, 2930, 2958.

ПМР-  $^1\text{H}$  (200МГц,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ , м.д. J/Гц): 2.93 (3H, с., N-CH<sub>3</sub>), 3.59, 3.87, 3.93 (9H. с. OCH<sub>3</sub>), 6.56, 6.78, 8.00(1H, с, Н-3, Н-8, Н-11).

Таблица 1

Данные спектра ПМР-  $^{13}\text{C}$  (ацетон - $d_6$ , 125.76 мГц.,  $\delta$ /м.д., J/Гц)-молекулы (II)

Номера атома	$\delta$ /м.д.,
1	2
C-1a	126.17
C-1в	126.96
C-3	111.99
C-3a	124.76
C-9	149.98
C-10	147.06
C-11	113.45
C-1	155.54
C-2	150.6
C-8	112.01
C-11a	120.72
C-6a	70.85
C-7	44.25
C-7a	128.62
OMe	55.55
	56.62
	56.80
	60.87
N-CH <sub>3</sub>	30.50
CH <sub>3</sub>	25.01

#### Взаимодействие глауцина с диэтиламином и параформом

0,1 г (0,23 ммоль) глауцина растворили в абсолютном хлороформе, добавили 0,17 мл (0,36 ммоль) диэтиламина и 0,082 г (0,27 ммоль) параформа. Реакционную смесь выдержали в течение трех часов при нагревании до 50 °С. Затем обработали водой и экстрагировали хлороформом. Хлороформный слой сушили сульфатом натрия и упаривали. Остаток хроматографировали на колонке с окисью алюминия в соотношении сумма-носитель (1:20). При элюировании смесью гексан: этилацетат (1:3) получили 3-диэтиламинометилглауцин (2) с т.пл. 122–124 °С, выход (0,195г) 85 %.

ИК-спектр (КВг  $\nu$ ,  $\text{см}^{-1}$ ): 616, 760, 806, 957, 1001, 1032, 1086, 1100(-CH<sub>2</sub>), 1121, 1161, 1230, 1253, 1298, 1332, 1375 (CH<sub>3</sub>), 1511 (C-Ar), 1596 (C-N (C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>)<sub>2</sub>), 1611 (C=C), 2830(N -CH<sub>3</sub>) 2994(OCH<sub>3</sub>), 3164.

ПМР-спектр (200МГц,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ , м.д. J/Гц): 2.18 (с., N -(CH<sub>2</sub> CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, J =7,2); 3.0(3H, с., N-CH<sub>3</sub>) 3.40 (2H, тр., J=6, Н-5), 3.87, 3.98, 3.99, 3.94 (3H, с, OCH<sub>3</sub>), 6.98, 7.0, 7.20 (1H, с, Н-3, Н-8, Н-11).

#### Взаимодействие глауцина с пиперидином и параформом

0,1 г глауцина растворили в абсолютном хлороформе, добавили 0,17 мл пиперидина и 0,082 г параформа. Реакционную смесь выдержали в течение трех часов при нагревании до 50° С. Затем обработали водой и экстрагировали хлороформом. Хлороформный слой сушили сульфатом натрия и упаривали. Остаток хроматографировали на колонке с окисью алюминия в соотношении сумма-носитель (1:20). При элюировании смесью гексан: этилацетат (1:5) получили кристаллическое вещество с т.пл. 124–126° С, выход 75 %.

ИК-спектр (КВг  $\nu$ ,  $\text{см}^{-1}$ ): 614, 806, 846, 950, 1001, 1030, 1085, 1110(-CH<sub>2</sub>), 1121, 1161, 1200, 1228, 1259, 1298, 1332, 1392, 1510 (C-Ar), 1590 (C-Ы), 1637 (C=C), 1758, 2824 (N-CH<sub>3</sub>), 2958 (OCH<sub>3</sub>), 3000.

ПМР-спектр (200МГц,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ , м.д. J/Гц): 3.0, (3H, с., N-CH<sub>3</sub>), 3.35 (2H, тр., J =6, Н-5), 3.87, 3.96, 3.99, 4.0 (3H, с, OCH<sub>3</sub>), 6.79, 6.98, 7.1, 7.23 (1H, с, Н-3, Н-8, Н-11).

*Взаимодействие глауцина с морфолином и параформом*

0,3 г (0,68) глауцина растворили в абсолютном хлороформе, добавили 0,399 мл (5,9 ммоль) морфолина и 0,137 г (0,045 ммоль) параформа. Реакционную смесь выдержали в течение трех часов при нагревании до 50°C. Затем обработали водой и экстрагировали хлороформом. Хлороформный слой сушили сульфатом натрия и упаривали. Остаток хроматографировали на колонке с окисью алюминия в соотношении сумма-носитель (1:20). При элюировании смесью гексан: этилацетат (1:3) получили кристаллическое вещество с т.пл. 119–122 °С, выход 88 %.

ИК- спектр (КВг  $\nu$ ,  $\text{см}^{-1}$ ): 595, 869, 894, 1034, 1045, 1098, 1186 ( $-\text{CH}_2$ ), 1224, 1377 ( $\text{CH}_3$ ), 1563 (C-N), 1964, 2149, 2428, 2593, 2774 ( $\text{N}-\text{CH}_3$ ), 2810–2945 ( $\text{OCH}_3$ ).

ПМР-спектр (200МГц,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ , м.д./Гц): 2.99, (3H, с., N- $\text{CH}_3$ ), 3.33 (2H, тр., J =6, H-5), 3.81. 3.99, 4.0, 4.01 (3H, с,  $\text{OCH}_3$ ), 6.51, 6.98, 7.05, 9.00 (1H, с, H-3, H-8, H-11).

*Результаты исследований антигрибковой активности*

Материалы и методы. Объектом исследования служили 2 образца веществ на наличие противогрибковой активности.

Маркировка (название) образцов: 1. О-А — диэтиламинометилглауцин, 2. G-M морфолиноаминометил глауцин. Препаратом сравнения служил антигрибковый препарат нистатин.

Изучение антигрибковой активности веществ проводилось по отношению к грибам *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*, *Trichophyton mentagraphytos*, *Epidermophyton floccosum*, *Penicillium citrinum* методом дисков.

Культуры грибов выращивали на плотной среде (Сабуро) pH-5,6  $\pm$ 0,2 при t 37 и 28° С, в зависимости от особенностей роста грибов, в течение 48 часов. Культуры разводили 1/1000 изотоническим раствором натрия хлорида и засекали в чашки Петри со средой Сабуро по методу «сплошного газона». На подсушенную поверхность среды накладывали стерильные диски, на которые наносили растворы исследуемых веществ (10 мкг) в виде капли (разведение 1:10 в этиловом спирте). В чашки помещали также контрольные стандартные диски с антигрибковым препаратом нистатином. Посевы инкубировали в термостате в течение 48 часов при температуре от 20 до 25°C.

Антигрибковая активность оценивалась по диаметру зон задержки роста культуры грибов. Сплошной рост на чашке оценивали как отсутствие антигрибковой активности. Статистическую обработку проводили методами параметрической статистики с вычислением средней арифметической и ее стандартной ошибки.

Результаты исследований. Установлено, что практически все представленные образцы проявляют умеренную противогрибковую активность (табл.2). Умеренно-выраженное противогрибковое действие к *Trichophyton mentagraphytos* проявил диэтиламинометил глауцин. В отношении *Penicillium citrinum* все вещества проявили слабую активность. Также все образцы проявили слабую антигрибковую активность к грибковым штаммам *Aspergillus niger* и *Aspergillus flavus*. Результаты исследования антимикробной активности образцов приведены в таблице 2.

Т а б л и ц а 2

**Антигрибковая активность образцов**

Наименование образцов	Диаметр зон торможения роста, мм				
	<i>Penicillium citrinum</i>	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Aspergillus flavus</i>	<i>Trichophyton mentagraphytos</i>	<i>Epidermophyton floccosum</i>
Диэтиламинометилглауцин	8 $\pm$ 2	12 $\pm$ 3	-	18 $\pm$ 1	-
Морфолиноаминометил-глауцин	14 $\pm$ 2	10 $\pm$ 1	8 $\pm$ 2	15 $\pm$ 2	-
Нистатин	16 $\pm$ 3	12 $\pm$ 1	15 $\pm$ 3	14 $\pm$ 2	12 $\pm$ 1

*Результаты исследований фагоцитарной активности*

Материалы и методы. Объектом исследования служил О-А — диэти-ламинометилглауцин и морфолиноаминометилглауцин

Скрининговое исследование влияния веществ на фагоцитарную активность клеток проведено в цельной крови. 100 мкл гепаринизированной венозной крови (20 ЕД гепарина на 1 мл крови) вносили в лунку иммунологического планшета и инкубировали с 50 мкл раствора испытуемого вещества в течение 15 минут в термостате при 37° С. Затем вносили суточную культуру (концентрация 20 микробных тел на клетку, штамм) в объеме 50 мкл в лунки с кровью. Вновь инкубировали образцы в термостате при 37° С в течение 15 минут. После этого содержимое лунки переносили на обезжиренное спиртом предметное стекло и в течение 20 минут термостатировали при 37°С в условиях влажной камеры. Затем мазки высушивали на воздухе в вертикальном положении, проводили гемолиз эритроцитов дистиллированной водой в течение 3 минут, после чего высушенные мазки фиксировали 30 минут в смеси Никифорова и окрашивали азур-эозином в течение 10 минут. При микроскопировании (увеличение 10х40, масляная иммерсия) подсчитывали количество фагоцитирующих нейтрофилов (фагоцитарный индекс) на 200 фагоцитов и количество стафилококков, поглощенных одним нейтрофилом (фагоцитарное число).

Сухое вещество массой 2 мг с учетом известной его растворимости разводили в физиологическом растворе, или в 0,4 мл 96 %-ного спирта, до полного растворения и доводили до 2 мл физиологическим раствором. Конечная концентрация испытуемых веществ составила 1 мг/мл. Контролем служили мазки крови, инкубированной с физиологическим раствором. Вещества тестировались в концентрации 0,1 и 1 мг/мл. Препараты сравнения иммунал и левамизол. Каждое вещество в одной концентрации тестировалось в трех определениях. Статистическую обработку результатов проводили методами параметрической статистики с вычислением средней арифметической (М) и ее стандартной ошибки (т). Результаты скринингового исследования приведены в таблице 3.

Т а б л и ц а 3

№	Наименование вещества	Концентрация	Фагоцитарный индекс (М±m)	Фагоцитарное число (М±m)
	Физиологический раствор	-	51.0±5.23	2,47±0.21
1	Диэтиламинометилглауцин	1 мг/мл	63.89±5.98	2.82±0,11
		0,1 мг/мл	47,03±4,41	2,2±0,14
		0,1 мг/мл		
	Морфолиноаминометилглауцин	1 мг/мл	50.07±5.38	2.23±0,23
		0,1 мг/мл	67,24±4,57	3,02±0,19
	Левамизол	10	60.7± 1,95	2.4±0,3
		1	80.26±4.9	2.76±0.1
		0.1	72.5±5.9	2,58±0,3
	Имунал	1:1	72.36±5.0	4.5±0,23
		1:10	61,03±2,5	4.5±0.6
		1:100	76.84±7.9	3,85±0,5

В результате исследования установлено, что диэтиламинометилглауцин в обеих изученных дозах проявляет выраженные фагоцитозстимулирующие свойства.

Морфолиноаминометилглауцин проявляет дозозависимое влияние на фагоцитоз нейтрофилов, т.е. относится к группе модуляторов исследуемого процесса. Он в низкой концентрации (0,01 мг/мл) оказывает супрессирующее воздействие на фагоцитоз.

Список литературы

1. Юнусов С.Ю. Алкалоиды. — Ташкент, 1974. — С. 320.
1. Арипова Х.Н. Итоги исследования алкалоидоносных растений. — Ташкент, 1993. — 220 с.
2. Горяев М.И., Круглыхина Г.К., Сатдарова Э.И., Куринная Н.В., Шабанов И.М., Пояков П.П. Материалы к изучению алкалоидности флоры Казахстана и некоторых районов Средней Азии // Химия природных соединений: Тр. хим. наук. — 2000. — Т. 4. — С. 112–122.
3. Садриддинов Ф.С., Курмуков А.Г. Фармакология растительных алкалоидов и их применение в медицине. — Ташкент: Медицина, 1980.