

ТОШКЕНТ ФАРМАЦЕВТИКА ИНСТИТУТИ
ХУЗУРИДАГИ ИЛМИЙ ДАРАЖАЛАР БЕРУВЧИ
DSc.04/30.12.2019.Far.32.01 РАҚАМЛИ ИЛМИЙ КЕНГАШ

ТОШКЕНТ ФАРМАЦЕВТИКА ИНСТИТУТИ

ЗУЛФИКАРИЕВА ДИЛНОЗА АЛИШЕРОВНА

АЛКАЛОИД САҚЛОВЧИ ЎСИМЛИКЛАР БИЛАН
ЗАҲАРЛАНИШЛАРНИНГ КИМЁ-ТОКСИКОЛОГИК
ИЗЛАНИШЛАРИ

15.00.02 – фармацевтик кимё ва фармакогнозия

ФАРМАЦЕВТИКА ФАНЛАРИ ДОКТОРИ (DSc)
ДИССЕРТАЦИЯСИ АВТОРЕФЕРАТИ

Тошкент-2020

Фан доктори диссертацияси (DSc) автореферати мундарижаси

Оглавление автореферата диссертации доктора наук (DSc)

Contents of the abstract of doctoral dissertation (DSc)

Зулфикариева Дилноза Алишеровна

Алкалоид сақловчи ўсимликлар билан заҳарланишларнинг кимё-токсикологик изланишлари 3

Зулфикариева Дилноза Алишеровна

Химико-токсикологические исследования отравлений алкалоид-содержащими растениями 29

Zulfikarieva Dilnoza Alisherovna

Chemical and toxicological researches of poisonings with plants of the containing alkaloid 53

Эълон қилинган ишлар рўйхати

Список опубликованных работ
List of published works 57

ТОШКЕНТ ФАРМАЦЕВТИКА ИНСТИТУТИ
ХУЗУРИДАГИ ИЛМИЙ ДАРАЖАЛАР БЕРУВЧИ
DSc.04/30.12.2019.Far.32.01 РАҚАМЛИ ИЛМИЙ КЕНГАШ

ТОШКЕНТ ФАРМАЦЕВТИКА ИНСТИТУТИ

ЗУЛФИКАРИЕВА ДИЛНОЗА АЛИШЕРОВНА

АЛКАЛОИД САҚЛОВЧИ ЎСИМЛИКЛАР БИЛАН
ЗАҲАРЛАНИШЛАРНИНГ КИМЁ-ТОКСИКОЛОГИК
ИЗЛАНИШЛАРИ

15.00.02 – фармацевтик кимё ва фармакогнозия

ФАРМАЦЕВТИКА ФАНЛАРИ ДОКТОРИ (DSc)
ДИССЕРТАЦИЯСИ АВТОРЕФЕРАТИ

Тошкент-2020

Фан доктори (DSc) диссертацияси мавзуси **Ўзбекистон Республикаси Вазирлар Маҳкамаси** хузуридаги Олий аттестация комиссиясида B2017.3.DSc/Far.13. рақам билан рўйхатга олинган.

Диссертация Тошкент фармацевтика институтида бажарилган.
Диссертация автореферати уч тилда (Ўзбек, рус, инглиз (резюме)) Илмий кенгаш веб-саҳифаси (www.pharmi.uz) ва "ZiyoNet" Ахборот таълим порталида (www.ziyounet.uz) жойлаштирилган.

Илмий маслаҳатчи: Юлдашев Закирджан Абидович
фармацевтика фанлари доктори, профессор

Расмий оппонентлар: Урманова Флюра Фаридовна
фармацевтика фанлари доктори, профессор

Тулаганов Абдуқодир Абдурахмонович
фармацевтика фанлари доктори, профессор

Юнусходжаева Нодира Абдулхамитовна
фармацевтика фанлари доктори, доцент

Етакчи ташкилот: Тошкент педиатрия тиббиёт институти

Диссертация химояси Тошкент фармацевтика институти хузуридаги DSc 04/30.12.2019.Far.32.01 рақамли Илмий кенгашнинг 2020 йил «4» 12 соат 11 даги мажлисида бўлиб ўтади (Манзил: 100015, Тошкент ш., Миробод тумани, Ойбек кўчаси, 45-уй. Тел.: (+99871) 256-37-38, факс: (+99871) 256-45-04, e-mail: pharmi@pharmi.uz).

Диссертация билан Тошкент фармацевтика институти Ахборот-ресурс марказида танишиш мумкин (9 рақами билан рўйхатга олинган). Манзил: 100015, Тошкент ш., Миробод тумани, Ойбек кўчаси, 45 уй. Тел.: (+99871) 256-37-38.

Диссертация автореферати 2020 йил «18» 11 куни тарқатилди.
(2020 йил «18» 11 даги 9 рақамли реестр баённомаси).



К.С.Ризаев
Илмий даражалар берувчи илмий кенгаш раиси, т.ф.д.

Ё.С.Кариева
Илмий даражалар берувчи илмий кенгаш илмий котиби, фарм.ф.д., профессор

Ф.Ф.Урманова
Илмий даражалар берувчи илмий кенгаш қошидаги илмий семинар раиси, фарм.ф.д., профессор

КИРИШ (фан доктори (DSc) диссертацияси аннотацияси)

Диссертация мавзусининг долзарблиги ва зарурати. Бутун дунёда бугунги кунда ишлаб чиқарилаётган дори воситаларининг 1/3 қисми доривор ўсимликлардан олиниши маълум. Аҳоли орасида фитопрепарат ва биологик фаол қўшимчаларга бўлган талабнинг ортиши, айниқса, доривор ўсимлик хом ашёлари ва улардан олинган дори воситаларининг арзон ва безарар, ножўя таъсирлардан холи деб ҳисобловчи, сурункали касалликларга дучор бўлган катта ёшдаги беморларнинг билиб-билмай қўллаш ёки доривор ўсимликни кўп миқдорда сурункали равишда истеъмол қилиши оқибатида ушбу маҳсулотлар билан турли даражадаги заҳарланиш ҳолатларининг кўплаб учрашига олиб келмоқда. Шунинг учун, ўсимликлар билан заҳарланиш ҳолатларини ўрганиш ва заҳарланиш юз берганда улар таркибидаги асосий таъсир этувчи моддаларни тезкор ва аниқ таҳлил усуллари ёрдамида аниқлаш катта аҳамиятга эга.

Ҳозирги кунда жаҳон миқёсида соғлиқни сақлаш ташкилотлари томонидан “биофаол қўшимча” сифатида қўлланилган доривор ўсимликларнинг ножўя таъсиридан инсонларнинг турли даражада заҳарланиш ҳолатларига катта эътибор қаратилмоқда. Бу борада дунё миқёсида кенг тарқалган ва ҳозирги кунда одамларни заҳарланишига сабаб бўлган айрим доривор ва заҳарли ўсимликлар таркибидаги моддаларни ўсимлик хом ашёси ва биологик объектлардан ажратиб олишнинг умумий, ўзига хос усуллариининг назарий ва амалий асосларини ўрганишни тақозо этмоқда.

Республикамизда турли моддалар билан заҳарланишни олдини олиш, экспертиза жараёнларини самарали амалга оширишга алоҳида эътибор қаратилиб, муайян натижаларга эришилмоқда. Ўзбекистон Республикасини 2017-2021 йилларда ривожлантиришнинг бешта устувор йўналиши бўйича Ҳаракатлар стратегиясининг тўртинчи бобида “аҳолига тиббий ва ижтимоий-тиббий хизмат кўрсатиш қулайлиги ҳамда сифатини оширишга.., аҳоли ўртасида касалланиш кўрсаткичлари пасайишини ва умр узайишини таъминлаш...”¹ бўйича муҳим вазифалар белгилаб берилган. Бу борада ўсимлик таркибидаги биологик фаол моддани экстракция қилиш ва биологик объектлардан уларни ажратиб олиш усуллари ўртасидаги боғлиқлик ва ўзига хосликни ўрганиш, ушбу моддаларнинг суд-кимё экспертизаси ва кимё-токсикологик таҳлиллари талабларини қондирувчи тезкор ва юқори самарали аниқлаш усуллариини ишлаб чиқиш борасидаги тадқиқотларни ўтказиш амалий масалалардан бири ҳисобланади.

Ўзбекистон Республикаси Президентининг 2019 йил 10 апрелдаги “2019-2021 йилларда республиканинг фармацевтика тармоғини янада жадал ривожлантириш чора-тадбирлари тўғрисида”ги ПФ-5707-сонли Фармони, 2019 йил 6 майдаги “Тиббиёт ва фармацевтика таълими ва илм-фани тизимини янада ривожлантириш чора-тадбирлари тўғрисида”ги ПҚ-4310-

¹ Ўзбекистон Республикаси Президентининг 2017 йил 7 февралдаги “Ўзбекистон Республикасини янада ривожлантириш бўйича Ҳаракатлар стратегияси тўғрисида”ги ПФ-4947-сон Фармони

сонли, шунингдек, 2018 йил 4 декабрдаги “Ўзбекистон Республикаси Соғлиқни сақлаш вазирлиги суд-тиббий хизмати фаолиятини янада такомиллаштириш чора-тадбирлари тўғрисида”ги ПҚ-4049-сон, 2019 йил 17 январдаги “Суд экспертлик фаолиятини янада такомиллаштириш чора-тадбирлари тўғрисида”ги ПҚ-4125-сон қарорлари ва мазкур фаолиятга оид меъёрий-ҳуқуқий ҳужжатларда белгиланган вазифаларни амалга оширишга ушбу диссертация тадқиқоти муайян даражада хизмат қилади.

Тадқиқотнинг республика фан ва технологиялари ривожланишининг устувор йўналишларига боғлиқлиги. Мазкур илмий тадқиқот республика фан ва технологиялари ривожланишининг VI. «Тиббиёт ва фармакология» устувор йўналишига мувофиқ бажарилган.

Диссертация мавзуси бўйича хорижий илмий тадқиқотлар шарҳи².

Ўрганилаётган ўсимликлар таркибидаги алкалоидларни таҳлил қилишга йўналтирилган илмий изланишлар жаҳоннинг етакчи илмий марказлари ва олий таълим муассасалари, жумладан, Кубань давлат университети, Томск давлат университетининг Биология институти (Россия Федерацияси), Витебск давлат тиббиёт университети, Белоруссия давлат университети (Белорусь), Словакия Фанлар академияси Кимё институти (Словакия), Хитой тиббиёт академияси, Гуанхи доривор ўсимликлар ботаника боғи (Хитой Халқ республикаси), Калифорния университети токсикология лабораторияси, Питтсбург захарли ўсимликларни тадқиқот лабораторияси (АҚШ), Манитоба университетида (Канада) олиб борилмоқда.

Ўсимликлар таркибидаги алкалоидларни биологик объектлардан ажратиб олиш, уларни идентификация қилиш, турли усуллар ёрдамида таҳлилни амалга оширишга оид олиб борилган тадқиқотлар натижасида қатор, жумладан, қуйидаги илмий натижалар олинган: пирролизидин алкалоидларини модел объектларида таҳлили ишлаб чиқилган (University of Utah, USA); яшил шамшод ўсимлиги таркибидаги алкалоидларни ажратиш усуллари ишлаб чиқилган (Institute of Chemistry, Slovak Academy of Sciences, Словакия); сассиқ алаф ўсимлиги таркибидаги алкалоидларни захарли таъсири аниқланган (School of Pharmacy, University of London, United Kingdom); пирролизидин алкалоидларини идентификация қилиш усуллари ишлаб чиқилган (University Porto, Portugal); биологик объектларда ЮССХ усулида кониин алкалоидини таҳлил қилиш усули ишлаб чиқилган (Национальный фармацевтический университет, Украина); тропан алкалоидларини хроматографик таҳлил усуллари яратилган (Кубанский государственный университет, Россия Федерацияси).

Дунёда доривор ўсимлик хом ашёлари, улар асосида тайёрланган биологик фаол қўшимчалардан захарланишни олдини олиш бўйича қатор, жумладан қуйидаги устувор йўналишларда тадқиқотлар олиб борилмоқда: захарли таъсир этувчи ўсимликлар таркибидаги алкалоидларни аниқлашнинг замонавий таҳлил усуллари ишлаб чиқиш, ушбу усулларни суд-кимё

² Диссертациянинг мавзуси бўйича хорижий илмий-тадқиқотлар шарҳи www.elsevier.com/locate/jethpharm, www.springerlink.com/content ва бошқа манбалар асосида шакллантирилган

экспертиза лабораториялар амалиётига татбиқ этиш, тезкор тиббий ёрдам кўрсатиш марказларида экспресс таҳлил усуллари олиб бориш, суд-тиббий экспертизаси марказларида аниқ ва сезгир таҳлил усуллари қўллаш, суд кимёгарлари фаолияти учун амалий ёрдам кўрсатиш.

Муаммонинг ўрганилганлик даражаси. Алкалоид сакловчи заҳарли ўсимликлар билан заҳарланган одамлар мурдаси ички аъзоларидан кучли таъсир этувчи моддаларни ажратиб олиб кимё-токсикологик нуқтаи назардан таҳлил қилиш услубларини ишлаб чиқиш устида хорижий ва маҳаллий олимлар томонидан олиб борилган тадқиқот ишлари муҳим аҳамиятга эга.

Дунё миқёсида ўсимликлар билан заҳарланиш ҳолатлари ва унда кузатиладиган белгилар, дастлабки таҳлил усуллари ишлаб чиқиш бўйича изланишлар куйидаги олимлар томонидан олиб борилган: А.В.Ахутина, М.Кедрова, М.В.Филонова, Ю.Ю.Малиновский, В.С.Бондарь, Н.Х.Шевченко, Е.А.Фомичева, В.М.Серов, А.П.Кудряшов, Д.В.Моисеев, В.А.Куркин, А.А.Погоцкая, С.И.Арутюнянц, Ф.Ибадуллаев, А.З.Темердашев, И.А.Колычев, Н.В.Киселева, О.Бауерова, В.Т.Кромвель, З.Вотиски, Yao Chen, Zhao Zhang, Lander Ave, A.Fisher, P.R.Cheeke, S.L.Everist, G.D.Oswailer, K.E.Panter, J.Vetter, A.Mitsutoshi, T.A.Lopez, B.S.Frank, A.Sarfraz томонидан олиб борилган.

Алкалоидлар сакловчи ўсимликлар билан заҳарланганда уларни ўсимлик ва биологик объектлардан ажратиб олиш ҳамда замонавий физик-кимёвий усулларда тезкор аниқлаш услублари ишлаб чиқиш бўйича ўзбек олимларидан С.Ш.Фахрутдинова, М.В.Икрамова, Х.З.Ибрагимовлар илмий тадқиқот ишларини олиб борганлар.

Мазкур диссертация иши илк бор кимё-токсикологик тадқиқотлар талабини қондирадиган сезгир, тезкор ва аниқлик даражаси юқори бўлган услубларни ишлаб чиқиш, ишлаб чиқилган таҳлил услубларини биологик объектлар таркибидан ажратиб олинган моддаларни аниқлаш учун татбиқ этиш ва улар асосида суд-тиббий экспертиза марказларида суд-кимёгарлари учун зарур бўлган умумлаштирилган услубий қўлланмалар тайёрлаш бўйича биринчи илмий изланиш ҳисобланади.

Диссертация мавзусининг диссертация бажарилган олий таълим муассасасининг илмий-тадқиқот ишлари билан боғлиқлиги. Диссертация тадқиқоти Тошкент фармацевтика институтининг “Фармацевтик ва токсикологик таҳлил усуллари такомиллаштириш” илмий-тадқиқот ишлари режасига мувофиқ амалга оширилди.

Тадқиқотнинг мақсади Ўзбекистонда ўсувчи заҳарли ўсимликлар билан заҳарланиш ҳолатларининг назарий жиҳатдан асосланган суд-кимё ва кимё-токсикологик таҳлил усуллари ишлаб чиқишдан иборат.

Тадқиқотнинг вазифалари:

ўсимликлар билан заҳарланишларни суд-кимё ва кимё-токсикологик таҳлили бўйича хорижий ва миллий меъёрий ҳужжатларнинг талаблари даражасини ўрганиш, уларни суд-кимё ва кимё-токсикологик таҳлил усуллари ривожланиш тенденцияларини аниқлаш ҳамда ахборот-таҳлилий

тадқиқотлар асосида ҳозирги талаблар даражасига мувофиқ услубий тизимли ёндашувни таклиф қилиш;

ўрганилаётган ўсимликлар хом ашёлари ва биологик объектлар (шу жумладан биологик суюқликлар) таркибидан алкалоидларни ажратиб олишнинг тезкор диагностик усуллари ишлаб чиқиш;

ўсимликлар билан заҳарланган тажриба ҳайвонлари ошқозон-ичак тизимида ўсимлик қолдиқ қисмларини дастлабки микроскопик текширув услубларини ишлаб чиқиш ва суд-кимё экспертиза амалиётига тадбиқ этиш;

алкалоидларни юпқа қатлам хроматографиясининг скрининг усули ёрдамида таҳлил услубини ишлаб чиқиш;

юқори самарали суюқлик хроматографияси усули ёрдамида алкалоидларни таҳлил қилиш услубини ишлаб чиқиш ва биологик объектлар таркибидан ажратиб олинган моддаларни аниқлашга тадбиқ этиш;

термодесорбцион сирт ионлашув спектроскопия усулида алкалоидларнинг таҳлилин ишлаб чиқиш ва уни кимё-токсикологик объектлардаги алкалоидларни аниқлашга жорий этиш;

ўрганилаётган ўсимликлар алкалоидларини аниқлашнинг ишлаб чиқилган таҳлил услубларини суд-тиббий экспертиза объектлари ва ашёвий далиллардан ажратиб олинган моддаларни идентификация қилиш ва аниқлаш учун тавсия этиш.

Тадқиқотнинг объекти сифатида сассиқ алаф, яшил шамшод, кампирчопон, катта қончўп, қора мингдевона, оддий белладонна, улар билан заҳарланган лаборатория ҳайвонлари ички аъзолари (жигар, буйрак, ошқозон ва ичак) ва биологик суюқликлар (қон, пешоб, ошқозон чайинди сувлари)дан фойдаланилган.

Тадқиқотнинг предмети алкалоидларни суд-тиббий экспертиза объектлари (мурда ички аъзолари, қон, пешоб ва ошқозон чайинди сувлари)дан ажратиб олиш, идентификация қилиш ва миқдорини аниқлашнинг юпқа қатлам хроматография (ЮҚХ), юқори самарали суюқлик хроматографияси (ЮССХ), газ-хромато-масс-спектрометрия (ГХ-МС), ультрабинафша спектрофотометрия (УБ-СФ), термодесорбцион сирт ионлашув спектроскопия (ТДСИС) усуллари ўрганиш, ўткир заҳарланиш ҳолатларида тез тиббий ёрдам кўрсатиш учун заҳарли ўсимликларни аниқлашнинг тезкор таҳлил услубларини ишлаб чиқиш; ошқозон чайинди сувларидан ўсимлик қолдиқларининг микроскопик текширувини олиб бориш.

Тадқиқотнинг усуллари. Тадқиқотда таҳлилнинг замонавий физик-кимёвий усуллари (ЮҚХ, ЮССХ, ГХ-МС, УБ-СФ, ТДСИС) ва микроскопик таҳлилнинг анъанавий усулларидан фойдаланилди.

Тадқиқотнинг илмий янгилиги қуйидагилардан иборат:

сассиқ алаф, яшил шамшод, кампирчопон, катта қончўп таркибидаги алкалоидларни биологик суюқлик ва объектлардан ажратиб олишнинг назарий асосланган услублари ишлаб чиқилган;

сассиқ алаф, яшил шамшод, кампирчопон, катта қончўп, қора мингдевона, оддий белладонна ўсимликларининг асосий заҳарли таъсир этувчи моддаларини кимё-токсикологик нуқтаи назардан ЮҚХ-скрининг,

ГХ-МС, ЮССХ, УБ-СФ, ТДСИС усулида идентификация қилиш ва миқдор таҳлили услубларида аниқланган;

ўсимликлардан ажратиб олинган ва ЮҚХ усулида тозалаб олинган алкалоидлар экстрактини таклиф этилаётган таҳлил усулларида ишончли ишчи стандарт сифатида қўллаш мумкинлиги ГХ-МС усулида идентификация қилиш орқали исботланган;

барча ишлаб чиқилган таҳлил усул ва услублари кимё-токсикологик объектлардаги алкалоидларни аниқлаш учун асосланган;

ўсимликлар билан заҳарланган тажриба ҳайвонларининг ошқозон-ичак тизимида ўсимлик қолдиқ қисмларини дастлабки микроскопик текширув услублари ишлаб чиқилган;

кучли таъсир этувчи моддаларини биологик объектлардан ажратиб олиш ва таҳлил қилишнинг ишлаб чиқилган усул ва услублари ўсимликлар ҳамда уларнинг маҳсулотлари билан заҳарланишлар содир бўлган ҳолатларда суд-кимё экспертизаси ва кимё-токсикологик текширувлар яратилган.

Тадқиқотнинг амалий натижалари қуйидагилардан иборат:

сассиқ алаф, яшил шамшод, кампирчопон, катта қончўп, ўсимликлари билан заҳарланганда улар таркибидаги алкалоидларни биологик суюқлик ва биологик объектлардан ажратиб олишнинг мўътадил шароитлари ишлаб чиқилган;

объектлардан ажратиб олинган алкалоидларни ЮҚХ-скрининг усулида ёт моддалардан тозалаш услуби ишлаб чиқилган;

турли объектлардан ажратиб олинган ва тозаланган алкалоидларни ЮССХ, ТДСИС усуллари ёрдамида тезкор аниқлаш услублари ишлаб чиқилган;

олинган натижалар асосида услубий тавсияномалар ишлаб чиқилган ва Республика Суд-тиббий экспертиза илмий-амалий маркази ва унинг вилоятлардаги филиаллари лабораториялари фаолиятида тасдиқланган.

Тадқиқот натижаларининг ишончлилиги. Олинган натижаларнинг ишончлилиги даражаси замонавий математик статистик таҳлил усуллари, физик-кимёвий, лаборатория ҳайвонларидаги текширувлар асосида тасдиқланган. Ўтказилган тадқиқотлар суд-кимё экспертизаси жараёнида апробациядан ўтганлиги билан изоҳланади.

Тадқиқот натижаларининг илмий ва амалий аҳамияти. Тадқиқот натижаларининг илмий аҳамияти алкалоид сақловчи ўсимликлар билан инсонларнинг ўткир ва сурункали заҳарланиш ҳолатларида мурда ички аъзолари ва биосуюқликларнинг суд-кимё экспертизасини ўтказиш жараёнида алкалоидларни ЮҚХ-скрининг, ЮССХ, ТДСИС таҳлил услублари каби замонавий кимё-токсикологик таҳлил усуллари ўлим сабабларини объектив баҳолашда ёрдам бериши Суд-кимё экспертизаси кимёгар экспертлари томонидан алкалоидларни биологик объектлар таркибидан аниқлаш имконини яратиши билан изоҳланади.

Тадқиқот натижаларининг амалий аҳамияти ишлаб чиқилган таҳлил усуллари асосида тайёрланган услубий тавсияномалар Республика Суд-тиббий экспертизаси илмий-амалий маркази ва унинг вилоятлардаги

филиаллари суд-кимё лабораторияларида мазкур ўсимликлар билан юз берган заҳарланишларнинг текширувида синовдан ўтказилганлиги билан изоҳланади.

Тадқиқот натижаларининг жорий қилиниши. Алкалоид сақловчи ўсимликлар билан заҳарланишлар билан кимё-токсикологик изланишлари бўйича олинган илмий натижалар асосида:

“Биологик объект ва биологик суюқликлардан катта қончўп ўсимлиги алкалоидларини ажратиб олиш ва таҳлил қилиш” (22.06.2020 й., №8н-р/185) услубий тавсияномаси тасдиқланган (Соғлиқни сақлаш вазирлигининг 2020 йил 4 ноябрдаги 8н-з/140-сон маълумотномаси). Натижада, катта қончўп ўсимлиги билан заҳарланишларни таҳлил қилиш имконини берган;

“Биологик объект ва биологик суюқликлардан сассиқ алаф ўсимлиги алкалоидларини ажратиб олиш ва таҳлил қилиш” (18.06.2020 й., №8н-р/166) услубий тавсияномаси тасдиқланган (Соғлиқни сақлаш вазирлигининг 2020 йил 4 ноябрдаги 8н-з/140-сон маълумотномаси). Натижада, сассиқ алаф ўсимлигини суд-тиббий экспертизаси нуктаи назардан таҳлил қилиш имконини берган;

“Биологик объект ва биологик суюқликлардан кампирчопон ўсимлиги алкалоидларини ажратиб олиш ва таҳлил қилиш” (18.06.2020 й., №8н-р/167) услубий тавсияномаси тасдиқланган (Соғлиқни сақлаш вазирлигининг 2020 йил 4 ноябрдаги 8н-з/140-сон маълумотномаси). Натижада, кампирчопон ўсимлиги билан заҳарланишларда унинг алкалоидларини ажратиб олиб таҳлил қилиш имконияти яратилган;

“Биологик объект ва биологик суюқликлардан яшил шамшод ўсимлиги алкалоидларини ажратиб олиш ва таҳлил қилиш” (18.06.2020 й., №8н-р/165) услубий тавсияномаси тасдиқланган (Соғлиқни сақлаш вазирлигининг 2020 йил 4 ноябрдаги 8н-з/140-сон маълумотномаси). Натижада, яшил шамшодни биологик объект ва суюқликлардан ажратиб олиш ва таҳлил қилиш имконини берган;

ўсимликлар билан заҳарланиш ҳолатларида уларни турли объектларда замонавий таҳлил усулларида аниқлашга оид натижалар асосида «5510500-фармация» бакалаврият таълим йўналиши бўйича «Суд токсикологияси» ўқув қўлланмаси ишлаб чиқилган (гувоҳнома №359-483). Натижада, бакалаврларнинг суд-кимё экспертизаси соҳасидаги билимларини бойитиш ва мустаҳкамлаш имконини берган.

Тадқиқот натижаларининг апробацияси. Мазкур тадқиқот натижалари 9 та халқаро ва 16 та республика илмий-амалий анжуманларида муҳокамадан ўтган.

Тадқиқот натижаларининг эълон қилинганлиги. Диссертация мавзуси бўйича жами 36 та илмий иш чоп этилган, шулардан Ўзбекистон Республикаси Олий аттестация комиссиясининг докторлик диссертациялари асосий илмий натижаларини чоп этиш тавсия этилган илмий нашрларда 11 та мақола, жумладан 9 таси республика ва 2 таси хорижий журналларда нашр этилган.

Диссертациянинг тузилиши ва ҳажми. Диссертация таркиби кириш,

адабиётлар шарҳи, бешта боб, хулоса, фойдаланилган адабиётлар рўйхати ва иловалардан иборат. Диссертация ҳажми 171 бетни ташкил этган.

ДИССЕРТАЦИЯНИНГ АСОСИЙ МАЗМУНИ

Кириш қисмида олиб борилган тадқиқотларнинг долзарблиги ва зарурати асосланган, тадқиқотнинг мақсади ва вазифалари, объект ва предметлари тавсифланган, республика фан ва технологиялари ривожланишининг устувор йўналишларига мослиги кўрсатилган, тадқиқотнинг илмий янгилиги ва амалий натижалари баён қилинган, олинган натижаларнинг илмий ва амалий аҳамияти очиқ берилган, тадқиқот натижаларини амалиётга жорий қилиш ҳамда нашр этилган ишлар ва диссертация таркиби юзасидан маълумотлар келтирилган.

Диссертациянинг биринчи боби «**Ўсимликлар билан заҳарланишлар ва уларнинг тадқиқотлари**» бўлиб, Ўзбекистонда ўсадиган заҳарли ўсимликларнинг таъсири бўйича таснифи тўғрисида умумий маълумотларни ўз ичига олган адабиётлар шарҳи келтирилган. Унда заҳарланиш ҳолатларининг қисқача тавсифи ва классификацияси ҳамда ўрганилаётган алкалоид сақловчи ўсимликлар, улар билан заҳарланиш белгилари ҳақида маълумотлар келтирилган. Шунингдек, изланишлар объекти бўлган сассик алаф, яшил шамшод, кампирчопон, катта қончўп, қора мингдевона, оддий белладонна ўсимликлари ҳақида умумий маълумотлар, кимёвий таркиби ҳамда улар билан заҳарланиш ҳолатларида юз берадиган организмдаги ўзгаришлар ва касаллик аломатлари келтирилган.

Иккинчи боб «**Алкалоидларни турли объектлар таркибидан ажратиш олиш**»га бағишланган бўлиб, унда ўсимликлар таркибидан заҳарланишга сабаб бўлиши мумкин бўлган алкалоидларни ажратиш олишнинг 3 та усули ишлаб чиқилган. Улар орасидан мўътадил услуб танлаб олинган: майдаланган ва тешиклари диаметри 1 мм бўлган элакдан ўтказилган ўсимлик маҳсулотидан 10 г миқдорда тортиб олинган. Олинган хом ашё 250 мл ҳажмли конуссимон колбага ўтказилган. Колбадаги хом ашёга 15 мл оксалат кислотасининг 5% эритмаси ва 75 мл диэтил эфиридан солиб, чайқатиб турган ҳолда 1 соатга қолдирилган. Бунда ўсимлик таркибидаги алкалоидлар асос ҳолидан оксалат кислота тузларига ўтган. Бу тузлар сувда эрийди ва сув-кислотали қатламга ўтади. Эфир қатламида эса бошқа ёт моддалар, шунингдек, ўсимликнинг хлорофилл қолдиқлари қолган. Бу нисбатан тоза ажратма олиш имконини берган. Ажратмани қоғоз филтр ёрдамида филтрлаб олиниб, кислотали қатлам органик эритувчи қатламидан ажраткич воронка билан ажратиш олинган. Бу жараён уч марта қайтарилган. Олинган кислотали ажратмалар бирлаштирилиб, рН муҳити универсал индикатор ёрдамида назорат қилинган ҳолда аммиакнинг концентрланган эритмаси ёрдамида ишқорий (рН=9) шароитга келтирилган. Бунда алкалоидлар асос ҳолига ўтган ва улар 20 мл хлороформ билан 5 дақиқа давомида экстракцияланган. Аралашмадан органик эритувчи қатлами ажраткич воронка ёрдамида ажратиш олинган. Сувли қатлам эса яна икки

марта (15 ва 10 мл) хлороформ билан 5 дақиқадан экстракцияланган. Учта хлороформли экстрактлар бирлаштирилган. Хлороформли экстракт таркибидаги намликни бартараф этиш учун 3-5 г сувсизлангилган натрий сульфат солинган фильтр қоғози орқали филтрланган. Филтрат курук қолдиқ қолгунча хона ҳароратида қуритилган. Қурук қолдиқлар 1 мл этанолда эритилиб, ЮҚХ усулида тозаланган ва таҳлил учун олиб қўйилган.

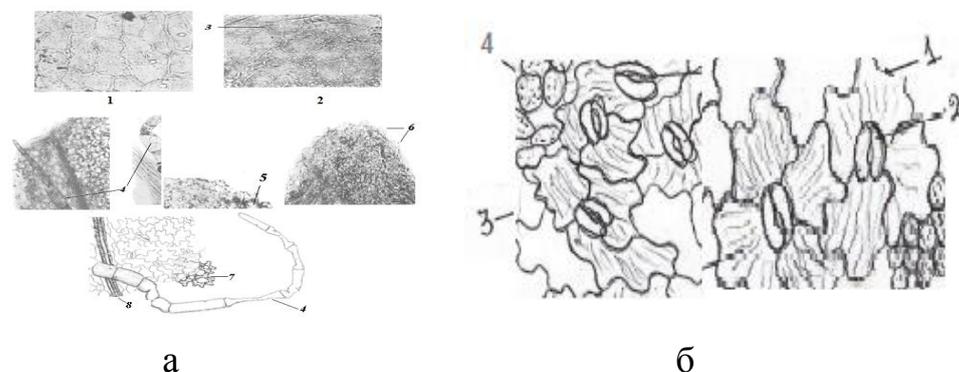
Шунингдек, алкалоидлар билан захарланиш ҳолатларида биологик суюқликлар (қон, пешоб) ва биологик объектлардан ажратиб олиш услуби ишлаб чиқилган. Мурда қони (5мл) ва пешоби (25мл) модел намуналаридан алкалоидларни ажратиб олиш учун уларга 5 млдан оксалат кислотасининг 5% эритмаси, 2 млдан (95%) этил спирти ва 5 млдан диэтил эфири қўшиб, 1 соатга қолдирилган. Аралашмалар вақти-вақти билан чайқатиб турилган. Кислотали сув қатлами органик эритувчи қатламидан ажратиб олиб филтрланган ва унга натрий ишқорининг 1 М эритмасидан (рН=9) 10 мл ва 5 мл хлороформ қўшилган. Ушбу аралашма механик чайқатгичга 10 дақиқага қўйилган. Сўнгра 3000 айл/дақ. тезликда 5 дақиқа центрифуга қилинган. Хлороформли қаватлар ажратиб олиниб, 1-3 г сувсиз натрий сульфат сақлаган фильтр қоғози орқали ўтказилган. Филтратлар курук қолдиқ қолгунча қуритилган. Қурук қолдиқлар 1 мл этанолда эритилиб, ЮҚХ усулида тозаланган. Тозаланган ажратма тавсия этилаётган услубларда таҳлил қилинган (1-жадвал).

Биологик объект таркибидан алкалоидларни ажратиб олиш учун 100,0 объект модел намуналарига оксалат кислотасининг 5% эритмасидан 15 млдан ва диэтил эфиридан 75 млдан солиб, чайқатиб турган ҳолда 1 соатга қолдирилган. Сўнгра аралашмалар 3000 айл/дақ. тезликда 5 дақиқа центрифуга қилинган. Ажратмаларни филтрлаб олиб, кислотали қатламлар органик эритувчи қатламларидан ажраткич воронка ёрдамида ажратиб олинган ва филтрланган. Бу жараён уч марта қайтарилган. Олинган кислотали ажратмалар бирлаштирилиб, рН муҳити универсал индикатор ёрдамида назорат қилинган ҳолда аммиакнинг концентрланган эритмаси ёрдамида ишқорий шароитга (рН=8-9) келтирилган. Бунда алкалоидлар асос ҳолига ўтган ва улар 20 мл хлороформ билан 5 дақиқа давомида экстракцияланган. Аралашмалардан органик эритувчи қатламлари ажраткич воронка ёрдамида ажратиб олинган. Сувли қатламлар эса яна икки марта (15 ва 10 мл) хлороформ билан 5 дақиқадан экстракцияланган. Учта хлороформли экстрактлар бирлаштирилган. Хлороформли экстракт таркибидаги намликни бартараф этиш учун 3-5 г сувсиз натрий сульфат солинган фильтр қоғози орқали филтрланган. Хлороформли филтратлар курук қолдиқ қолгунча хона ҳароратида қуритилган. Қурук қолдиқлар 1 мл этанолда эритилиб, ЮҚХ усулида тозаланган. Тозаланган элюатлар ишлаб чиқилган услубларда таҳлил қилинганда натижалар усулнинг яроқлилигини кўрсатган. Олинган натижалар 1-жадвалда келтирилган.

Таклиф этилаётган услубларда турли объектлардан алкалоидларни ажратиб олиш натижалари

Алкалоидлар	Турли объектлардан ажратиб олинган миқдор, %		
	қон	пешоб	жигар
Кониин	55,12	76,31	43,97
Буксин	58,57	77,39	43,07
Триходесмин	55,38	74,55	43,61
Хелидонин	45,12	67,23	47,92
Сангвинарин	58,78	72,03	48,17
Атропин	59,50	75,06	50,54
Скополамин	49,56	72,86	47,14

Диссертациянинг «Ўсимликларни турли объектлардаги микроскопик таҳлили» деб номланган учинчи бобида ўрганилаётган ўсимликлар билан заҳарланиш ҳолатлари юз берганда дастлабки текширув усулларини ишлаб чиқиш мақсадида олиб борилган микроскопик таҳлиллар натижалари келтирилган. Сассиқ алаф, яшил шамшод ва кампирчопон ўсимликлар баргларининг микроскопик таҳлили алоҳида ўрганилиб, диагностик белгилар аниқланган. Қора мингдевона, белладонна ва катта қончўп ўсимликлари микроскопик тузилиши адабиётларда келтирилган бўлиб, уларнинг заҳарланган инсон ошқозонидан олинган масса таркибида аниқлаш мақсадида солиштирма таҳлиллар олиб борилган.



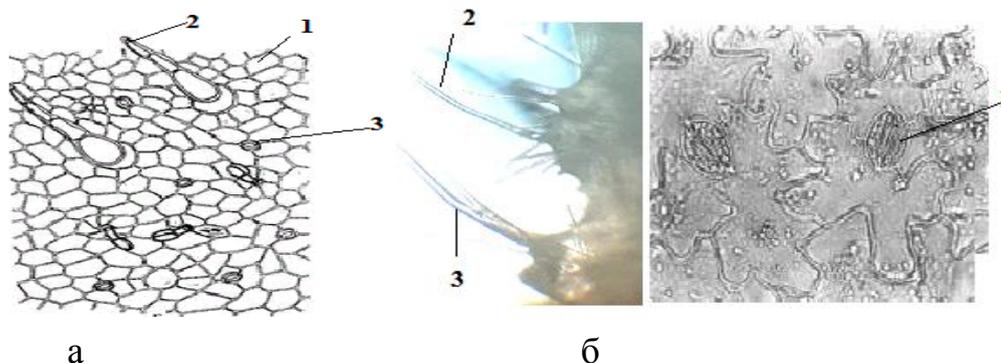
1-расм. Катта қончўп (а) ва сассиқ алаф (б) барги диагностик белгилари

а - 1 – баргнинг устки эпидермиси; 2 – баргнинг пастки эпидермиси; 3 – устьицалар; 4 – тукчалар; 5 – гидатодалар; 6 – йирик сувли устьицалар; 7 – паренхима ғовак тўқималарининг сувли устьицалари; 8 – сут найчалари

б - 1 - барг эпидермиси; 2 - устьица; 3 - қат-қат кутикула; 4 - булутсимон тўқима

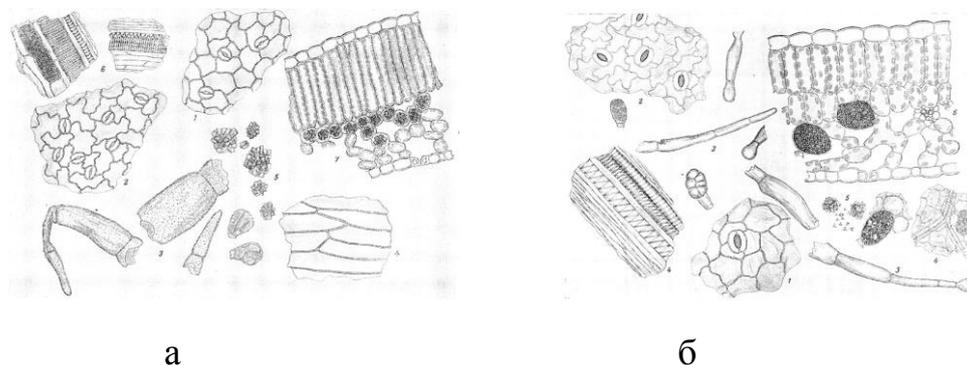
Тажриба учун мос равишда алоҳида-алоҳида лаборатория қуёнларининг овқатига сассиқ алаф, яшил шамшод, кампирчопон, катта қончўп, қора мингдевона, оддий белладонна ўсимликларидан аралаштириб, енгил

заҳарланиш ҳолатини юзага келтирилган. Заҳарланган қуёнлар 0,5-1 соатдан сўнг жонсизлантирилиб, уларнинг ошқозонини ювиб, ювинди сувлар алоҳида идишга йиғилган. Ўсимлик қисмлари пинцет ёрдамида ажратиб олиниб, аввал глицерин-спирт-сув (1:1:1) аралашмаси билан, сўнгра хлоралгидрат эритмаси билан ювилган. Тайёрланган намуналар микроскоп остида кўрилганда ўсимликлар қисмларининг фармакогностик белгилари каби ўзига хос диагностик белгилар аниқланган (1,2,3-расмлар).



2-расм. Яшил шамшод (а) ва кампирчопон (б) барги диагностик белгилари

а - 1 – баргнинг устки эпидермиси; 2 – устьицалар; 3 – тукчалар
 б - 1 – баргнинг устки эпидермиси ва устьицалар; 2 – тукчалар; 3-кўп тармоқли тукчалар



3-расм. Қора мингдевона (а) ва оддий белладонна (б) барги диагностик белгилари

1, 2 – барг эпидермиси қолдиқлари; 3 – тукчалар; 4 – барг томири қолдиқлари; 5 – друзлар (кальций оксалат кристаллари); 6 – баргнинг бўлинган фрагментлари.

Расмда келтирилган диагностик белгилар ушбу ўсимликлар қисмлари билан одамларни заҳарланиш ҳолатларининг суд-кимё экспертизаси ва кимё-токсикологик текширувларида қўлланиши мумкинлигини кўрсатган. Натижалар ошқозон чайинди сувларини микроскопик таҳлил қилинганда турли қисмларининг диагностик белгилари ёрдамида ўсимликни идентификация қилиш мумкинлигини, бу эса ушбу ўсимликнинг кучли таъсир қилувчи моддасини физик ва кимёвий усулларда исбот қилишга йўналиш беради.

Диссертациянинг тўртинчи боби “Хроматографик усулларда алкалоидларни аниқлаш”га бағишланган. Ўсимликлар таркибида неча хил

алкалоидлар борлиги ва уларнинг дастлабки – тахминий идентификация қилишда хроматографик таҳлил усулларида қўғоз ва юпка қаватда ўтказиладиган тақсимланиш хроматографик усуллари жуда ҳам қулай ҳисобланади. ЮҚХ-скрининг усули суд-кимё, экология ва кимё-токсикологик таҳлилларда бир томондан моддани аниқловчи услуб, иккинчи томондан биологик объектлардан олинган ажратмаларни тозалаш усули сифатида қўлланилиши мумкин. ЮҚХ-скрининг таҳлилини олиб бориш учун LS 5/40 маркали силикагелдан (13% гипс сақлаган) пластинкалар қуйидаги тартибда тайёрланди:

Чинни идишга 35 г силикагел, 2 г гипс ва 90 мл тозаланган сув солиб, яхшилаб аралаштирилди. Ҳосил бўлган суспензияни 9x12 см ўлчамдаги 10 та шиша пластинкаларга тенг миқдорда, бир текисда қуйиб чиқилди. Хроматографик пластинкалар хона ҳароратида қуритилди ва 105°C ҳароратда 30 дақиқа давомида қуритиш жавонида фаоллаштирилди. Тайёр бўлган силикагел пластинкалар таҳлилгача махсус идишларда – эксикаторларда сақланди.

Таҳлилларда хатоликларни камайтириш мақсадида пластинкаларни ишлатишдан аввал мос эритувчилар системасида ювиб олинди. Тадқиқотларда бир қатор кўзғалувчи фазалар ҳамда очувчи реактивлар ўрганилди (2-жадвал).

2-жадвал

Ўрганилаётган ўсимликларнинг алкалоидлари учун тавсия этилаётган ЮҚХ-скрининг таҳлили услублари

Алкалоидлар	Эритувчилар системаси	Очувчи реактив	Rf кўрсаткичи	Элюант
Атропин	хлороформ-ацетон-диэтиламин (50:30:2)	Мунье бўйича модификацияланган Драгендорф реактиви	0,25	Метанол-диэтиламин (9:1)
Скополамин		Мунье бўйича модификацияланган Драгендорф реактиви ёки йод буғлари	0,64	
Кониин	хлороформ-ацетон-диэтиламин (50:30:2)	Мунье бўйича модификацияланган Драгендорф реактиви ёки йод буғлари	0,26	
Конгидрин		Мунье бўйича модификацияланган Драгендорф реактиви	0,68	
Хелидонин	н-бутанол-сирка кислота-сув (40:10:10)	364 нм УБ нурлари ёки Мунье бўйича модификацияланган Драгендорф реактиви	0,53	Хлороформ-метанол (95:5)
Сангвинарин		364 нм УБ нурлари ёки Мунье бўйича модификацияланган Драгендорф реактиви	0,79	
Буксин	этанол-диэтил эфир (8:2) гексан-этилацетат (9:1)	364 нм УБ нурлари ёки Мунье бўйича модификацияланган Драгендорф реактиви	0,72	
Циклобуксин		Мунье бўйича модификацияланган Драгендорф реактиви	0,32	
Триходесмин	хлороформ-ацетон-диэтил-амин (5:4:1)	Мунье бўйича модификацияланган Драгендорф реактиви	0,53	
Инканин		Мунье бўйича модификацияланган Драгендорф реактиви	0,61	

Юпка қатлам хроматографик таҳлилда аниқланган алкалоидларни балласт моддалардан тозалаш мақсадида элюация жараёни ўрганилди.

Ўрганилаётган ўсимликларнинг таркибидаги алкалоидларни тозалаш билан бир қаторда уларни бир-биридан ажратиш олиш мақсадида эритувчилар системаси, очувчи реактив ва элюантлар танлаб олинди.

Тадқиқотлар натижасида ўрганилаётган ўсимликлардан олинган ажратмаларнинг ЮҚХ-скрининг таҳлили учун мўътадил услублар ишлаб чиқилди. Ушбу таҳлил услубларида биологик суюқликлар ва биологик объект таркибидан ажратиш олинган алкалоидларни аниқлаш ва тозалаш мақсадида тажрибалар ўтказилди. Натижалар ишлаб чиқилган ЮҚХ-скрининг усули ўрганилаётган алкалоидларни идентификациялаш ва ажратмаларни тозалашда яроқлилигини кўрсатди.

Ўсимликлар таркибидан ажратиш олинган алкалоидларнинг турини идентификация қилиш мақсадида ГХ-МС усулида таҳлил олиб борилди. Олинган натижалар изланишларимизнинг кейинги босқичида ташқи стандарт сифатида ўсимликнинг ўзидан ажратиш олинган элюантни қўллаш орқали ЮССХ усулида алкалоидларни аниқлаш имконини берди. Бу эса стандарт моддалар бўлмаган ҳолларда суд-кимёгарларга тезкор таҳлилларни олиб боришга ёрдам беради. Ўсимликлардан олинган ажратмалар 2-жадвалда келтирилган шароитларда ЮҚХ-скрининг усулида тозалаб ажратиш олинди. Олинган ажратмаларнинг хроматограммалари ва масс-спектрлари таҳлили NIST11.L, W10N11_Full.L, Wiley275.L. маълумотлар базасидаги чўққиларга солиштириш орқали амалга оширилди. Ҳар бир хроматографик чўққи интерпретацияси амалга оширилганда мос равишда сассиқ алаф ўсимлигида кониин, катта қончўп ўсимлигида хелидонин ва сангвинарин, яшил шамшод ўсимлигида буксин, кампирчопон ўсимлигида триходесмин алкалоидига хос фрагментлар аниқланди.

ЮССХ усулида таҳлил қилиш тезкор услуб ҳисобланади, чунки мураккаб аралашмаларни бир-биридан ажратиш учун бир неча дақиқа етарли. Бунда бир вақтнинг ўзида аралашма ҳолидаги моддаларни бир-биридан ажратиш, уларнинг чинлигини аниқлаш ва миқдорий таҳлил ўтказиш мумкин. Услубнинг афзалликларини инобатга олган ҳолда изланишларимиз давомида ЮССХ усулида ўрганилаётган ўсимликларни таҳлил қилиш шароитлари ишлаб чиқилди. Тажрибалар “Agilent 1100 series” русумли юқори самарали суюқлик хроматографида олиб борилди. Асбоб юқори босимда ишлашга мўлжалланган тўрт каналли градиент типидagi насос, 190-600 нм тўлқин узунликларида таҳлил ўтказувчи спектрофотометрик детектор, қўзғалувчи фаза таркибидаги газларни йўқотувчи қурилма, 20 мкл ҳажмли ўлчов ускуна – “Rheodyne” инжектори ва хроматографик колонкадан ташкил топган. Асбоб тўлалигича “Chemstation A.09.03” дастури ёрдамида компьютер орқали бошқарилади. ЮССХ таҳлили учун мўътадил шароит сифатида қуйидагилар танланди:

Сассиқ алаф таркибидаги кониинни ЮССХ усулида таҳлил қилиш учун мўътадил шароит сифатида қуйидагилар танланди:

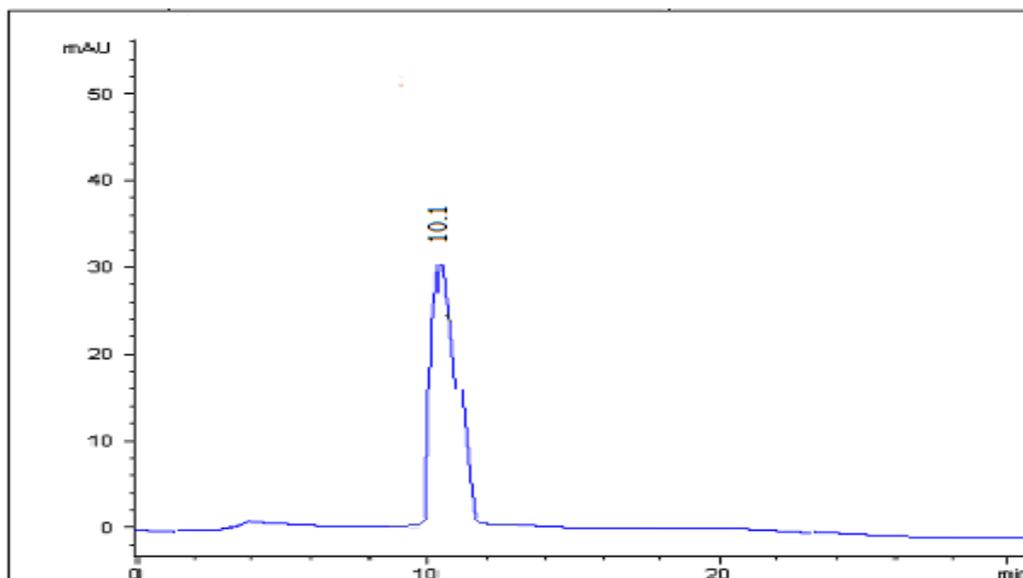
-хроматографик шиша колонка заррачалар йириклиги 3,5 мкм бўлган Zorbax Eclipse XDB C-18 сорбент билан тўлдирилган, ўлчами 4,6x75 мм;

- қўзғалувчи фаза: ацетонитрил (А) – KH_2PO_4 10 мМ эритмаси ва 1%

изопропанол 50:50 нисбатдаги аралашмаси (Б) (pH=3,5);

- градиент: 0 дақ: А-10%, Б-90%;
0-20 дақ: А-60%, Б-40%;
25 дақ: А-90%, Б-10%
- кўзгалувчи фаза сарфи 0,5 мл/дақ;
- детектор УФ-спектрофотометр;
- детекторлаш тўлқин узунлиги 266 нм;
- таҳлил давомийлиги 25 дақиқа.

Ушбу шароитларда сассиқ алаф ўсимлигидан ажратиб олинган элюат таҳлили олиб борилганда конииинни хроматограммада ҳосил қилган чўққисининг ушланиш вақти 10,1 дақиқани ташкил қилди (4-расм).



4-расм. Сассиқ алаф ўсимлигидан элюация қилиб олинган конииин хроматограммаси

Изланишларимиз давомида юқорида ишлаб чиқилган усул ёрдамида қон, пешоб ва биологик объект таркибидан ажратиб олинган сассиқ алаф ўсимлиги алкалоидини миқдори аниқланди.

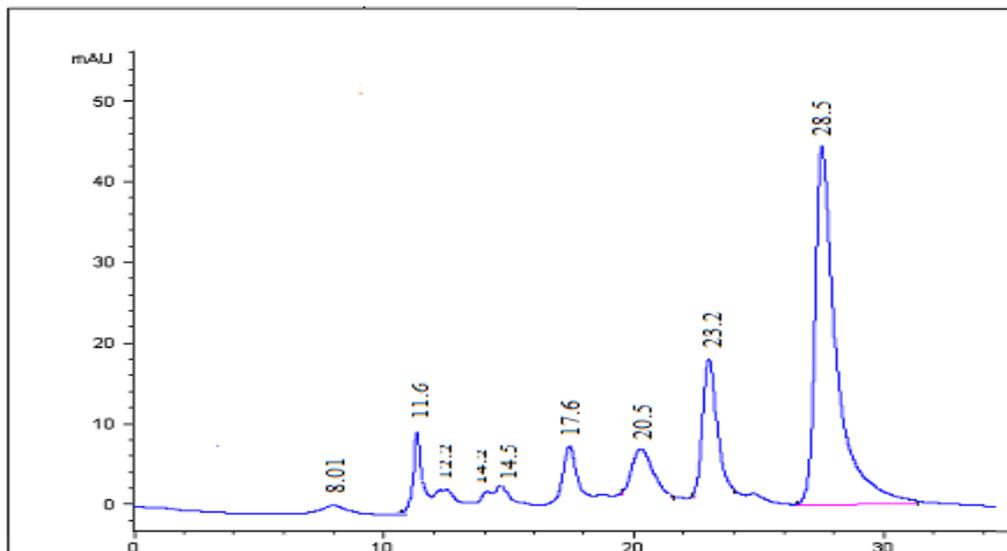
Қон модел намуналари таркибидан ишлаб чиқилган усул ёрдамида конииинни 55,12% миқдорда ажратиб олиб уни 3,02% нисбий хатолик билан аниқлаш мумкинлиги кўрсатилди. Ишлаб чиқилган ажратиб олиш услуби ёрдамида пешоб модел намуналари таркибидан конииинни 76,31% миқдорда ажратиб олиб, уни 0,91% нисбий хатолик билан аниқланди. Биологик объект модел намуналари таркибидаги конииинни 43,97% миқдорда ажратиб олиб, уни 3,49% нисбий хатолик билан аниқлаш мумкинлиги кўрсатилди.

Яшил шамшод таркибидаги буксин алкалоиди таҳлили учун мўътадил шароит сифатида қуйидагилар танланди:

- хроматографик шиша колонка заррачалар йириклиги 5 мкм бўлган Zorbax Eclipse XDB C-18 сорбент билан тўлдирилган, ўлчами 4,6x250 мм;
- кўзгалувчи фаза: (А) метанол– KH_2PO_4 10 мМ эритмасининг 50:50 нисбатдаги аралашмаси (Б) (pH=3,5);

- кўзгалувчи фаза сарфи 1,0 мл/дак;
- детектор УФ-спектрофотометр;
- детекторлаш тўлқин узунлиги 268 нм;
- таҳлил давомийлиги 40 дақиқа.

Ушбу шароитларда яшил шамшод ўсимлигидан ажратиб олинган ва хроматографик тозаланган ажратма таҳлили олиб борилганда буксин хроматографик чўққисининг ушланиш вақти 28,5 дақиқани ташкил қилди (5-расм).



5-расм. Яшил шамшод ўсимлигидан элюация қилиб олинган буксин хроматограммаси

Ишлаб чиқилган таҳлил услубларини биосуюқликлар таркибидан ажратиб олинган яшил шамшод ўсимлиги алкалоидини миқдорини аниқлашда тадбиқ этилди.

Ушбу таҳлил услублари ёрдамида қон модел намуналари таркибидаги буксинни тавсия этилаётган услуб билан 58,57% миқдорда ажратиб олиб, уни 2,28% нисбий хатоликда аниқлаш мумкинлиги кўрсатилди. Тавсия этилаётган услуб ёрдамида пешоб одел намуналари таркибидан буксинни 77,39% миқдорда ажратиб олиб, уни 0,92% нисбий хатолик билан аниқланди. Биологик объект модел намуналари таркибидаги буксинни 43,07% миқдорда ажратиб олиб, уни 3,78% нисбий хатолик билан аниқлаш мумкинлиги кўрсатилди.

Кампирчопон таркибидаги триходесмин алкалоиди таҳлили учун мўътадил шароит сифатида қуйидагилар танланди:

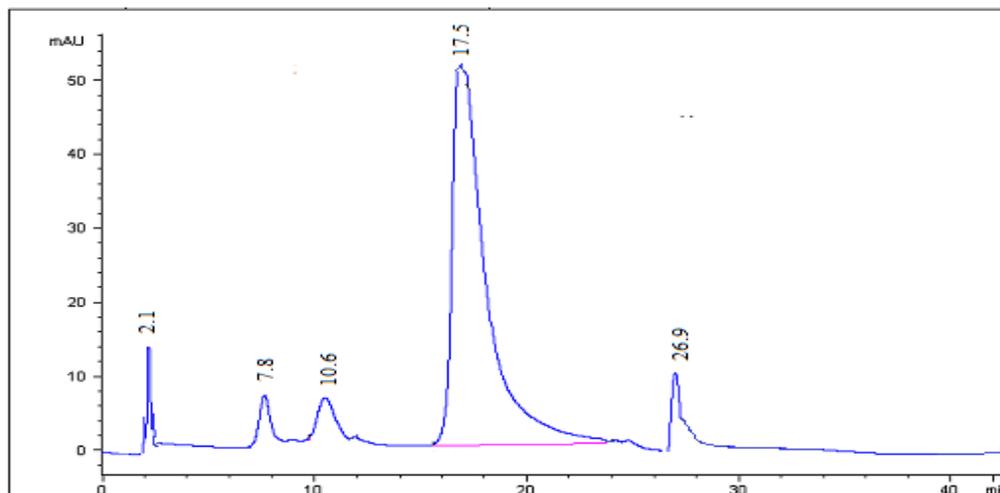
- хроматографик шиша колонка заррачалар йириклиги 5 мкм бўлган Zorbax Eclipse XDB C-18 сорбент билан тўлдирилган, ўлчами 4,6x150 мм;

- элюент изократик, кўзгалувчи фаза: (А) ацетонитрил-сув 70:30 нисбатдаги аралашмаси (рН=2,8);

- кўзгалувчи фаза сарфи 0,45 мл/дак;
- детектор УФ-спектрофотометр;
- детекторлаш тўлқин узунлиги 223 нм;

- таҳлил давомийлиги 30 дақиқа.

Ушбу шароитларда кампирчопон ўсимлигидан ажратиб олинган ва хроматографик тозаланган ажратма таҳлили олиб борилганда триходесмин алкалоиди хроматографик чўққисининг ушланиш вақти 17,5 дақиқани ташкил қилди (6-расм).



6-расм. Кампирчопон ўсимлигидан элюация қилиб олинган триходесмин хроматограммаси

Таҳлил услубларини биосууюқликлар модел намуналари таркибидан ажратиб олинган триходесмин алкалоидини аниқлашга тадбиқ этилди.

Тавсия этилаётган ажратиб олиш усуллари ёрдамида триходесминни қон намуналари таркибидан 55,38% миқдорда ажратиб олиб, уни 1,65% нисбий хатолик билан, пешоб модел намуналари таркибидан 74,55% миқдорда ажратиб олиб, уни 1,11% нисбий хатолик билан, биологик объект модел намуналари таркибидан 43,61% миқдорда ажратиб олиб, уни 2,93% нисбий хатолик билан аниқлаш мумкинлиги кўрсатилди.

Катта қончўп ўсимлиги алкалоидлари таҳлили учун ЮССХ усулида таҳлилнинг мўътадил шароити сифатида қуйидагилар танланди:

-хроматографик шиша колонка заррачалар йириклиги 3,5 мкм бўлган Zorbax Eclipse XDB C – 18 сорбент билан тўлдирилган, ўлчами 3x150 мм;

- қўзғалувчи фаза: (А) ацетонитрил– KH_2PO_4 (рН=7,4) 10 мМ эритмаси 50:50 нисбатдаги аралашмаси; изократик элюация;

- қўзғалувчи фаза сарфи 0,4 мл/дақ;

- ҳарорат 30 °С

- детектор – УФ-спектрофотометр;

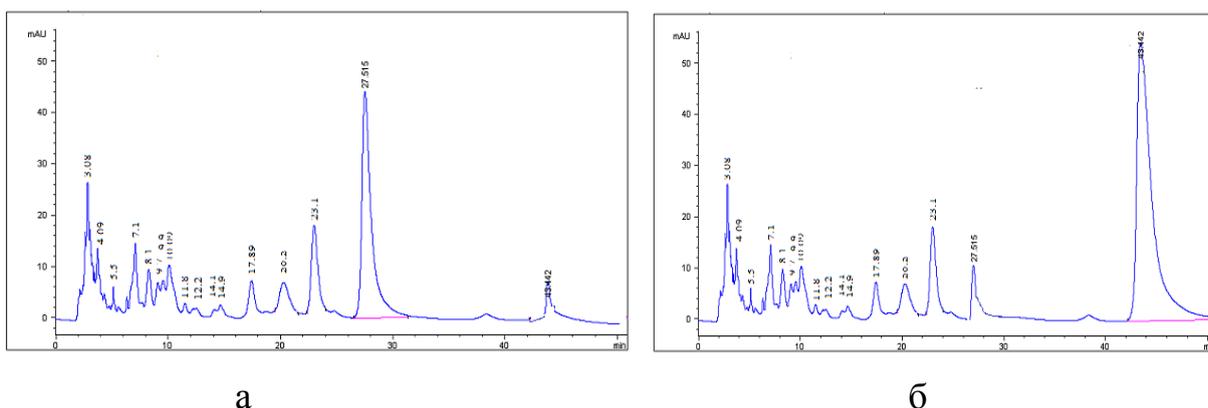
- детекторлаш тўлқин узунлиги 280 нм;

- таҳлил давомийлиги 50 дақиқа.

Ушбу шароитларда ўсимликдан олинган ажратма таҳлили олиб борилганда хелидонин учун ушланиш вақти 43,4 сангвинарин учун эса 27,5 ни ташкил қилди (7-расм).

Ишлаб чиқилган таҳлил услубларини диссертациянинг иккинчи бобида келтирилган усулда биосууюқликлар таркибидан ажратиб олинган катта

қончўп алкалоидларини аниқлашга тадбиқ этилди.



7-расм. Катта қончўп ўсимлигидан элюация қилиб олинган сангвинарин (а) ва хелидонин (б) хроматограммаси

Ишлаб чиқилган услуб ёрдамида қон модел намуналари таркибидан сангвинаринни 58,78%, хелидонинни эса 45,12% миқдорда ажратиб олиб, уларни мос равишда 3,06% ва 3,92% нисбий хатолик билан; пешоб модел намуналари таркибидан сангвинаринни 72,03%, хелидонинни эса 67,23% миқдорда ажратиб олиб, уларни мос равишда 3,97% ва 3,88% нисбий хатолик билан; биологик объект модел намуналари таркибидаги сангвинаринни 48,17%, хелидонинни эса 47,92% миқдорда ажратиб олиб, уларни мос равишда 3,83% ва 3,68% нисбий хатолик билан аниқлаш мумкинлиги кўрсатилди.

Қора мингдевона ва оддий белладонна ўсимликларидан олинган ажратмалар учун таҳлил шароитлари:

-хроматографик шиша колонка заррачалар йириклиги 3,5 мкм бўлган Zorbax Eclipse XDB C-18 сорбент билан тўлдирилган, ўлчами 4,6x75 мм;

- кўзгалувчи фаза: ацетонитрил (А) – KH_2PO_4 10 мМ эритмаси ва 1% изопропанол 50:50 нисбатдаги аралашмаси (Б) (рН=3,5);

- градиент: 0 дақ: А-10%, Б-90%;

0-20 дақ: А-60%, Б-40%;

25 дақ: А-90%, Б-10%

- кўзгалувчи фаза сарфи 0,5 мл/дақ;

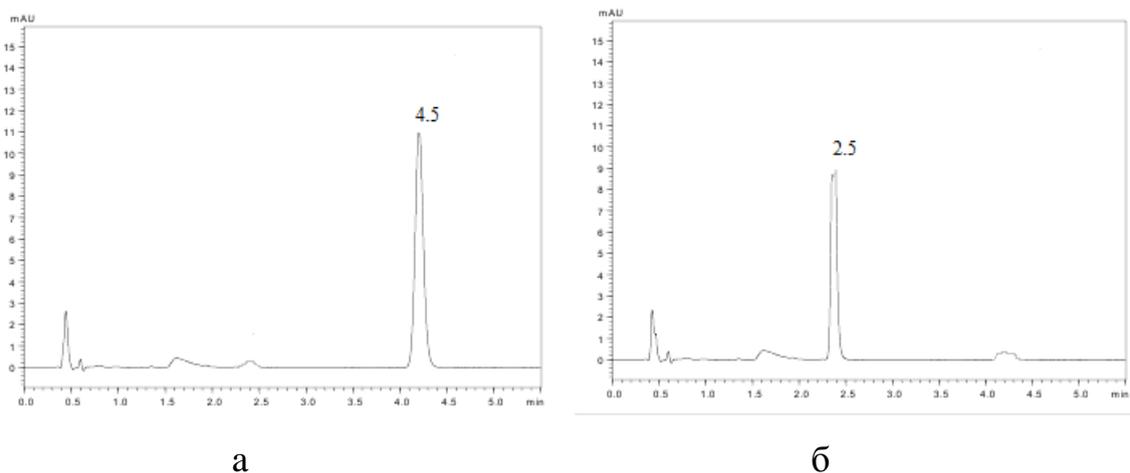
- детектор УФ-спектрофотометр;

- детекторлаш тўлқин узунлиги 254 нм;

- таҳлил давомийлиги 10 дақиқа.

Ушбу шароитларда ўсимликлардан ажратиб олинган атропин ва скополамин элюатларининг таҳлили олиб борилганда атропиннинг ушланиш вақти 4,5 дақиқани, скополаминики эса 2,5 дақиқани ташкил қилди (8-расм).

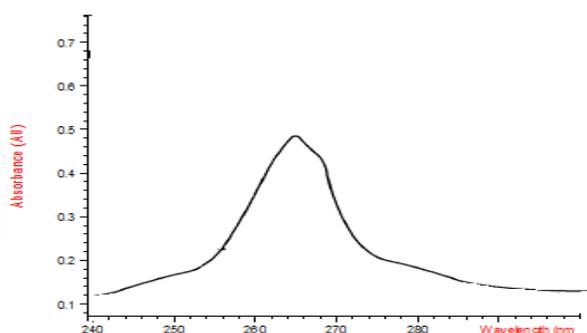
Ушбу таҳлил шароитлари биологик суюқликлардан ажратиб олинган алкалоидлар таҳлиliga тадбиқ этилди ва кутилган натижаларга эришилди.



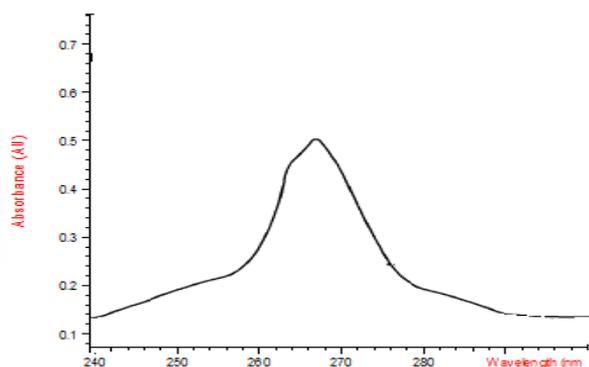
8-расм. Ўсимликдан ажратиб олинган атропин (а) ва скополамин (б) элюати хроматограммаси

Ушбу таҳлил услублари ёрдамида диссертациянинг иккинчи бобида келтирилган усулда алкалоидларни турли объектлардан ажратиб олинган ажратмалар таҳлил қилинди. Бунда қон таркибидан атропинни 59,50%, скополаминни эса 49,58% миқдорда ажратиб олиб, уларни 1,36% ва 1,91% нисбий хатолик билан аниқлаш мумкинлиги кўрсатилди. Пешоб модел намуналари таркибидан атропинни 75,26%, скополаминни эса 73,26% миқдорда ажратиб олиб, уларни 1,39% ва 1,79% нисбий хатолик билан аниқлашга эришилди. Биологик объект модел намуналари таркибидан атропинни 50,54% миқдорда, скополаминни эса 47,14% миқдорда ажратиб олиб, уларни 2,75% ва 1,31% нисбий хатолик билан аниқланди.

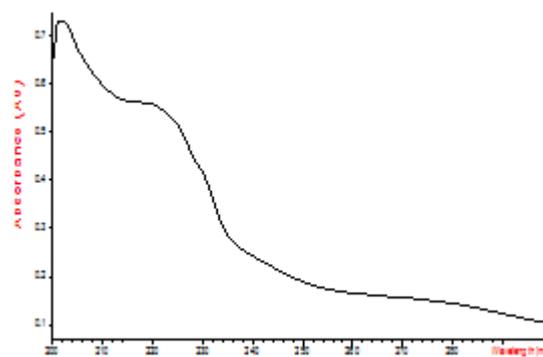
Диссертациянинг бешинчи боби “Спектрал усулларнинг алкалоидлар таҳлилида қўлланилиши”га бағишланган. УБ-спектрофотометрик усул нисбатан сезгирлиги паст бўлса ҳам кимё-токсикологик таҳлилларда кенг қўлланилади. Ушбу усул осон, тез бажариладиган, мураккаб жиҳоз ва тайёргарликни талаб этмайдиган усул, шунингдек барча суд-кимё лабораториялари УБ-спектрофотометр билан тўлиқ таъминланган. Ўсимликлардан олинган ажратмалар тўртинчи бобда келтирилган таҳлил шароитлари ёрдамида хроматографик тозаланди. Олинган элюатларнинг спектрал характеристикалари ўрганилди (9-12-расмлар).



9-расм. Сассиқ алаф ўсимлигидан ажратиб олинган конииин алкалоиди УБ-спектри

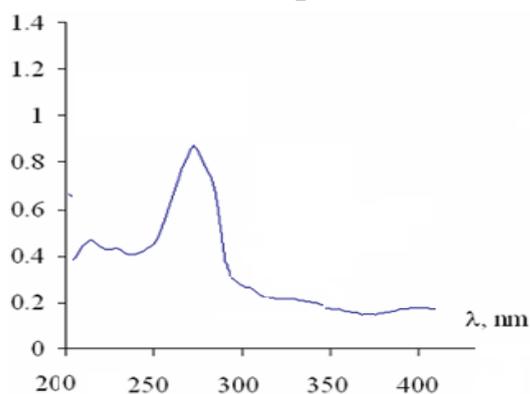


а

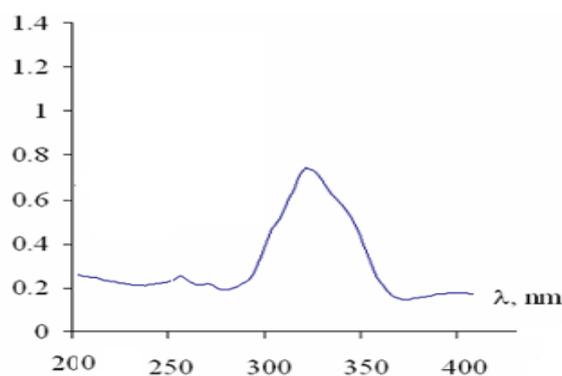


б

10-расм. Яшил шамшод ўсимлигидан ажратиб олинган буксин (а) ва кампирчопон ўсимлигидан ажратиб олинган триходесмин (б) алкалоидларининг УБ-спектрлари

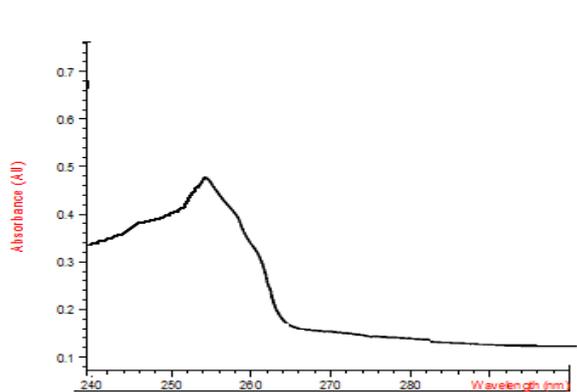


а

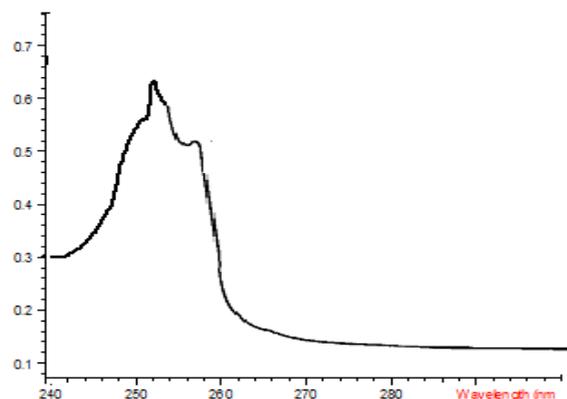


б

11-расм. Катта қончўп ўсимлигидан ажратиб олинган хелидонин (а) ва сангвинарин (б) алкалоидлари УБ-спектрлари



а



б

12-расм. Қора мингдевона ва оддий белладонна ўсимликларидан ажратиб олинган атропин (а) ва скополамин (б) алкалоидлари УБ-спектрлари

Модел биологик суяқликлар ва биологик объектлар таркибидан ажратиб олинган ажратмалар ЮҚХ-скрининг усулида тозаланиб, УБ-спектрофотометрда таҳлил қилинганда қатор спектрлар олинди. Олинган натижалар ўрганилаётган ўсимликлар билан ўткир заҳарланишлар содир

бўлганда, уларнинг таркибидаги алкалоидларни хлороформ билан экстракция усулида ажратиб олиб, хроматоспектрофотометрия усулида аниқлаш мумкинлигини кўрсатди.

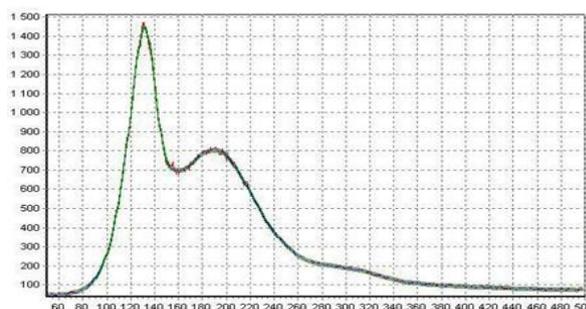
Суд-кимё экспертиза таҳлиларида биологик объектлар таркибидан моддаларни аниқлашда тезкор ва аниқ, сезгирлиги юқори бўлган усулларни қўллаш муҳим аҳамиятга эга. Шу мақсадда термодесорбцион сирт ионлашув спектроскопия усулида таҳлил шароитлари ишлаб чиқилди ва амалиётда қўллашга тавсия этилди.

Термодесорбцион сирт ионлашув спектроскопия (ТДСИС) усулида таҳлилни амалга оширишда Ўзбекистон Республикаси Фанлар Академиясининг У.А.Орифов номидаги Электроника институти томонидан гиёҳванд ва бошқа гангитувчи таъсирга эга бўлган доривор моддаларни тезкор аниқлаш учун тавсия этилган сирт ионлашув индикатори ПИИ-Н-С “Искович-1” дан фойдаланилди. Ўсимликлар таркибидан ажратиб олинган алкалоидларнинг термодесорбцион сирт ионлашув спектроскопик таҳлили қуйидаги шароитда олиб борилди:

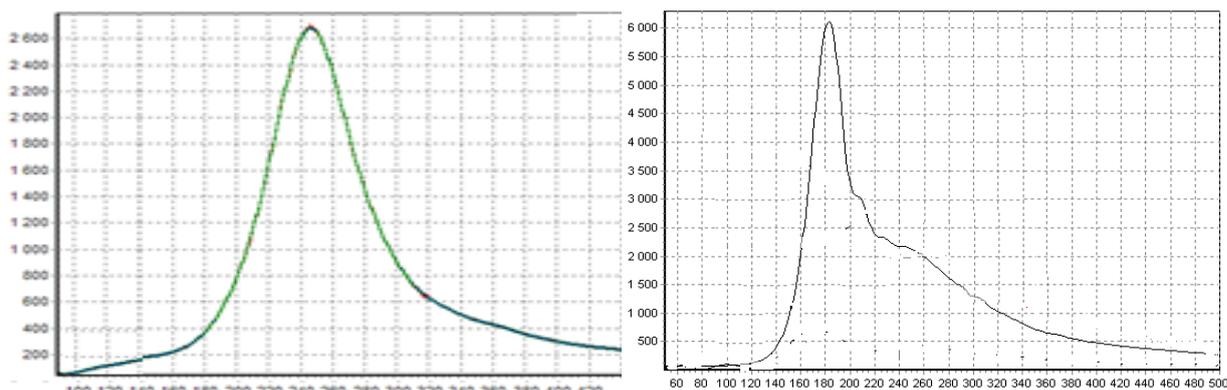
- эмиттер – иридий қоришмали оксидланган молибден,
- эмиттер кучланиши – 405 В,
- эмиттер ҳарорати – 200-300°С,
- буғлатиш ҳарорати – 20- 505°С,
- ҳаво оқими – 50 л/соат (компрессор кучланиши 12 В),
- таҳлил учун олинган текширилувчи намуна ҳажми - 1,0 мкл,
- таҳлил давомийлиги 3 дақиқа.

Спектрларни ёзиб олиш бевосита компьютер дастури ёрдамида амалга оширилди. Ҳар бир ўсимлик таркибидан ажратиб олинган алкалоидларнинг термодесорбцион сирт ионлашув (ТДСИ) спектрлари олинди. Олинган натижалар асосида алкалоидлар учун ТДСИ спектрлари ток кучининг уларнинг эритмадаги концентрациясига боғлиқлик графиги – калибрлаш чизмаси тузилди.

Сассиқ алаф таркибидан ажратиб олинган ажратма таҳлили учун ТДСИС таҳлил услуги қўлланилганда 130-140°С кониинга хос, яшил шамшод таркибидан ажратиб олинган ажратма таҳлилида 250-255°С буксинга хос, кампирчопон ўсимлиги таркибидан ажратиб олинган алкалоид таҳлилида 183-190°С триходесминга хос чизиқли чўққилар пайдо бўлиши кузатилди (13,14-расм).



13-расм. Ўсимликлардан ажратиб олинган кониин ТДСИ спектри



а б

14-расм. Ўсимликлардан ажратиб олинган буксин (а) ва триходесмин (б) ТДСИ спектрлари

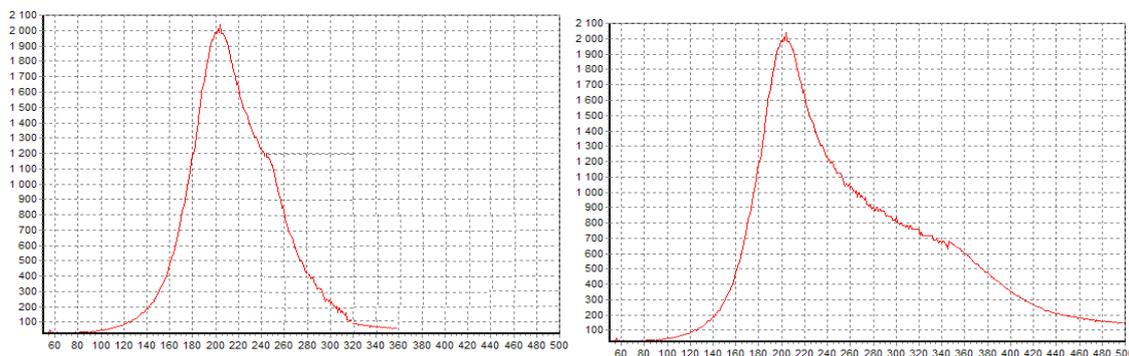
Биосуоқликлар таркибидан ажратиб олинган алкалоидлар таҳлили натижаларига кўра ТДСИС усулида қон таркибидан конииинни 45,62%, буксинни 53,82% ва триходесминни 45,46% миқдорда, пешоб таркибидан конииинни 69,55%, буксинни 85,13% ва триходесминни 73,45% миқдорда ажратиб аниқлашга эришилди (3-жадвал).

3-жадвал

Биосуоқликлардан ажратиб олинган конииин, буксин ва триходесминни миқдорий таҳлил натижалари

Конииин миқдори		Тажириба натижаларини метрологик тавсифи	Буксин миқдори		Тажириба натижаларини метрологик тавсифи	Триходесмин миқдори		Тажириба натижаларини метрологик тавсифи
нг	%		нг	%		нг	%	
ҚОН								
		f=4; T(95%,4)=2,78;			f=4; T(95%,4)=2,78;			f=4; T(95%,4)=2,78;
22,53	45,06	$\bar{X}=45,62$;	26,33	52,66	$\bar{X}=53,82$;	22,86	45,72	$\bar{X}=45,46$;
22,62	45,24	$S^2=0,6234$;	26,99	53,98	$S^2=0,5040$;	22,12	44,24	$S^2=0,5116$;
23,41	46,82	S=0,7895;	27,25	54,50	S=0,7099;	22,94	45,88	S=0,7152;
23,00	46,02	$S_x=0,3531$;	26,87	53,74	$S_x=0,3175$;	22,72	45,44	$S_x=0,3198$;
22,48	44,96	$\Delta X=2,1949$;	27,12	54,24	$\Delta X=1,9737$;	23,01	46,02	$\Delta X=1,9884$;
		$\Delta \bar{X}=0,9816$			$\Delta \bar{X}=0,8826$			$\Delta \bar{X}=0,8892$
		$\varepsilon=4,8114\%$;			$\varepsilon=3,66\%$;			$\varepsilon=4,37\%$;
		$\bar{\varepsilon}=2,15\%$			$\bar{\varepsilon}=1,64\%$			$\bar{\varepsilon}=1,95\%$
ПЕШОБ								
		f=4; T(95%,4)=2,78;			f=4; T(95%,4)=2,78;			f=4; T(95%,4)=2,78;
34,02	68,04	$\bar{X}=69,55$;	42,56	85,12	$\bar{X}=85,13$;	37,06	74,12	$\bar{X}=73,45$;
34,35	68,70	$S^2=1,3179$;	42,23	84,46	$S^2=0,5081$;	36,91	73,82	$S^2=0,4426$;
34,93	69,86	S=1,1480;	42,88	85,76	S=0,7128;	36,23	72,46	S=0,6653;
35,37	70,74	$S_x=0,5134$;	42,19	84,38	$S_x=0,3187$;	36,56	73,12	$S_x=0,2975$;
35,21	70,42	$\Delta X=3,1914$;	42,96	85,92	$\Delta X=1,9816$;	36,88	73,76	$\Delta X=1,8496$;
		$\Delta \bar{X}=1,4272$			$\Delta \bar{X}=0,8862$			$\Delta \bar{X}=0,8271$
		$\varepsilon=4,5885\%$;			$\varepsilon=2,33\%$;			$\varepsilon=2,52\%$;
		$\bar{\varepsilon}=2,05\%$			$\bar{\varepsilon}=1,04\%$			$\bar{\varepsilon}=1,13\%$

Катта қончўпдан ажратиб олинган алкалоидларни юқорида келтирилган услуб ёрдамида таҳлил қилинганда хелидонинга 189-200°C ва сангвинаринга 193-208°C хос чизиқли чўққилар пайдо бўлиши кузатилди (15-расм).



а б
15-расм. Катта қончўпдан ажратиб олинган хелидонин (а) ва сангвинарин (б) ТДСИ спектрлари

Ушбу таҳлил услублари биосуяқликлар таркибидан ажратиб олинган алкалоидлар таҳлиliga тадбиқ этилди. Олинган натижалар қон таркибидан хелидонинни 58,19% ва сангвинаринни 68,39% миқдорда, пешоб таркибидан хелидонинни 82,05% ва сангвинаринни 77,85% миқдорда ажратиб аниқлашга эришилди (4-жадвал).

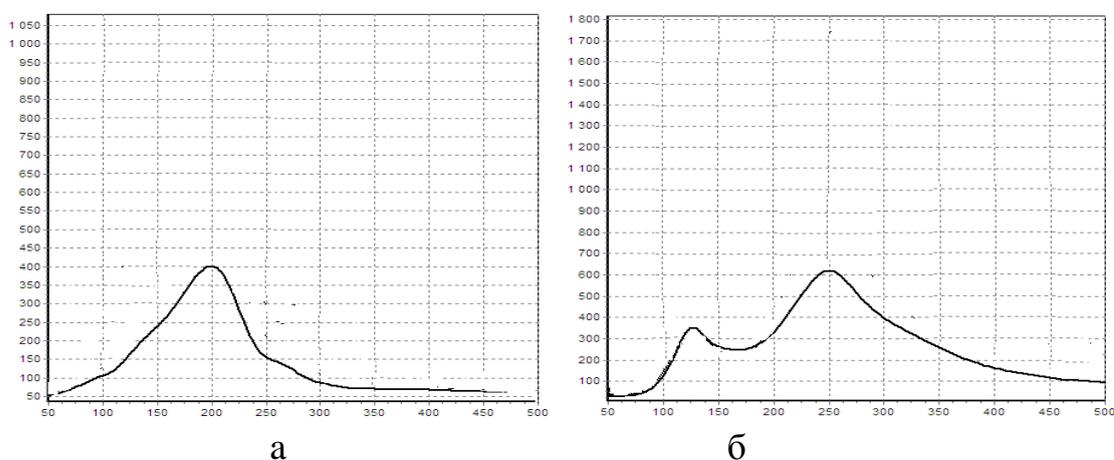
4-жадвал

Биосуяқликлардан ажратиб олинган хелидонин ва сангвинаринни миқдорий таҳлил натижалари

Хелидонин миқдори		Тажриба натижаларини метрологик тавсифи	Сангвинарин миқдори		Тажриба натижаларини метрологик тавсифи
нг	%		нг	%	
ҚОН					
28,03	56,06	$f=4; T(95\%, 4)=2,78;$ $\bar{X}=58,19; S^2=4,0546;$ $S=2,0136; S_x=0,9005;$ $\Delta X=5,5978; \Delta \bar{X}=2,5034$ $\varepsilon=9,619\%; \bar{\varepsilon}=4,301\%$	34,03	68,06	$f=4; T(95\%, 4)=2,78;$ $\bar{X}=68,39; S^2=4,9366;$ $S=2,2218; S_x=0,9936;$ $\Delta X=6,1767; \Delta \bar{X}=2,7623$ $\varepsilon=9,0309\%; \bar{\varepsilon}=4,0387\%$
28,45	56,90		34,45	68,90	
29,93	59,86		34,93	69,86	
30,38	60,76		32,38	64,76	
28,70	57,40		35,20	70,40	
ПЕШОБ					
40,55	81,10	$f=4; T(95\%, 4)=2,78;$ $\bar{X}=82,05; S^2=5,0521;$ $S=2,2476; S_x=1,0051;$ $\Delta X=6,2485; \Delta \bar{X}=2,7944$ $\varepsilon=7,615\%; \bar{\varepsilon}=3,405\%$	39,05	78,10	$f=4; T(95\%, 4)=2,78;$ $\bar{X}=77,85; S^2=1,4681;$ $S=1,2116; S_x=0,5418;$ $\Delta X=3,3684; \Delta \bar{X}=1,5064$ $\varepsilon=4,326\%; \bar{\varepsilon}=1,934\%$
41,98	83,96		37,98	75,96	
42,41	84,82		39,41	78,82	
40,46	80,92		39,46	78,92	
39,73	79,46		38,73	77,46	

Қора мингдевона ва оддий белладонна таркибидан ажратиб олинган

атропин ва скополамин таҳлили ТДСИС усулида олиб борилганда $\sim 200 \pm 15^\circ\text{C}$ атропинга ва $\sim 125 \pm 10^\circ\text{C}$ ҳамда $\sim 250 \pm 10^\circ\text{C}$ скополаминга хос чизиқли чўққилар пайдо бўлиши кузатилди (16-расм).



16-расм. Атропин (а) ва скополаминнинг (б) ТДСИ спектрлари

Ушбу таҳлил услублари биосуюқликлар таркибидан ажратиб олинган алкалоидлар таҳлиliga тадбиқ этилди. Олинган натижалар қон таркибидан атропинни 59,99% ва скополаминни 50,34% миқдорда, пешоб таркибидан атропинни 81,45%, ва скополаминни 69,43% миқдорда ажратиб аниқлаш имконини берди (5-жадвал).

5-жадвал

Биосуюқликлардан ажратиб олинган атропин ва скополаминни миқдорий таҳлил натижалари

Атропин миқдори		Олинган натижаларни статистик қайта ишлаш	Скополамин миқдори		Олинган натижаларни статистик қайта ишлаш
нг	%		нг	%	
ҚОН					
29,03	58,06	$f=4; T(95\%, 4)=2,78;$ $\bar{X}=59,99; S^2=3,1926;$ $S=1,7868; S_x=0,7990;$ $\Delta X=4,9673; \Delta \bar{X}=2,2214$ $\varepsilon=8,28\%; \bar{\varepsilon}=3,70\%$	25,12	50,24	$f=4; T(95\%, 4)=2,78;$ $\bar{X}=50,34; S^2=2,5076;$ $S=1,5835; S_x=0,7081;$ $\Delta X=4,4023; \Delta \bar{X}=1,9687$ $\varepsilon=8,74\%; \bar{\varepsilon}=3,91\%$
29,45	58,90		24,41	48,82	
29,93	59,86		24,39	48,78	
31,38	62,76		25,83	51,66	
30,20	60,40		26,11	52,22	
ПЕШОБ					
40,05	80,10	$f=4; T(95\%, 4)=2,78;$ $\bar{X}=81,45; S^2=4,4001;$ $S=2,0976; S_x=0,9380;$ $\Delta X=5,8314; \Delta \bar{X}=2,6079$ $\varepsilon=7,15\%; \bar{\varepsilon}=3,20\%$	35,19	70,38	$f=4; T(95\%, 4)=2,78;$ $\bar{X}=69,43; S^2=2,1824;$ $S=1,4773; S_x=0,6606;$ $\Delta X=4,1069; \Delta \bar{X}=1,8366$ $\varepsilon=5,91\%; \bar{\varepsilon}=2,64\%$
40,48	80,96		35,48	70,96	
42,41	84,82		33,64	67,28	
40,96	81,92		34,96	69,92	
35,23	79,46		34,32	68,64	

ХУЛОСАЛАР

1. Ўзбекистонда алкалоид сақловчи ўсимликлар билан учрайдиган захарланиш ҳолатлари суд-кимё ва кимё-токсикологик таҳлили бўйича хорижий ва миллий меъёрий ҳужжатларнинг талаблари даражаси ўрганилиб, мавжуд маълумотлари тизимлаштириш бўйича ёндошув таклиф этилди.

2. Сассиқ алаф, яшил шамшод, кампирчопон, катта қончўп, қора мингдевона, оддий белладонна ўсимликлари таркибидаги алкалоидларни ажратиб олишнинг мўътадил усуллари ва қулай услублар амалиётга тавсия этилди. Алкалоидларни ажратиб олишнинг таклиф этилаётган услублари биологик суюқликлар (қон, пешоб, ошқозон чайинди сувлари) ва биологик объект (мурда ички аъзолари) таркибидан уларни аниқлашнинг амалий жиҳатлари ҳал қилинди.

3. Сассиқ алаф, яшил шамшод, кампирчопон ўсимликлари хом ашёсининг микроскопик таҳлили ўтказилди ва ҳар бир ўсимликка хос характерли жиҳатлари белгиланди. Аниқланган диагностик белгилар асосида ўсимликлар билан захарланиш ҳолатлари юз берганда тезкор тиббий ёрдам бериш мақсадида дастлабки таҳлил усуллари сифатида ошқозон чайинди сувлари таркибини микроскопик таҳлилини ўтказиш учун тавсия этилди.

4. Сассиқ алаф, яшил шамшод, кампирчопон, катта қончўп, қора мингдевона, оддий белладонна ўсимликларини ЮҚХ-скрининг таҳлил шароитлари ҳамда ҳар бир ўсимлик таркибидаги тегишли алкалоидни аниқлаш ва объектлардан олинган ажратмаларни балласт моддалардан тозалаш учун элюация шароитлари таклиф этилди. Ушбу шароитларда тозалаб олинган алкалоидлар кейинги таҳлил усуллари учун ишчи стандарт сифатида фойдаланиш мумкинлиги белгиланди.

5. Сассиқ алаф, яшил шамшод, кампирчопон, катта қончўп, қора мингдевона, оддий белладонна ўсимликлари таркибидан ажратиб олинган ва ЮҚХ-скрининг усулида тозаланган ҳар бир алкалоидлар учун ЮССХ, ТДСИС таҳлил услублари тавсия этилди. Ушбу таҳлил услублари алкалоидларни биологик суюқлик ҳамда объектлар таркибидан аниқлашга татбиқ этилди.

6. Олинган натижалар асосида Ўзбекистон Республикаси Соғлиқни сақлаш вазирлиги Республика суд-тиббий экспертизаси илмий-амалий маркази, унинг вилоят филиаллари суд-кимё бўлимларида қўллаш учун “Биологик объект ва биологик суюқликлардан катта қончўп ўсимлиги алкалоидларини ажратиб олиш ва таҳлил қилиш”, “Биологик объект ва биологик суюқликлардан сассиқ алаф ўсимлиги алкалоидларини ажратиб олиш ва таҳлил қилиш”, “Биологик объект ва биологик суюқликлардан кампирчопон ўсимлиги алкалоидларини ажратиб олиш ва таҳлил қилиш”, “Биологик объект ва биологик суюқликлардан яшил шамшод ўсимлиги

алкалоидларини ажратиб олиш ва таҳлил қилиш” номли услубий тавсияномалар чоп этирилди, шунингдек, олинган натижалар Суд токсикологияси ўқув қўлланмасига киритилиб, Тошкент фармацевтика институти ўқув жараёнига татбиқ этилди.

**НАУЧНЫЙ СОВЕТ DSc.04/30.12.2019.FAR.32.01 ПО ПРИСУЖДЕНИЮ
УЧЕНЫХ СТЕПЕНЕЙ ПРИ ТАШКЕНТСКОМ
ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОМ ИНСТИТУТЕ**

ТАШКЕНТСКИЙ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЙ ИНСТИТУТ

ЗУЛФИКАРИЕВА ДИЛНОЗА АЛИШЕРОВНА

**ХИМИКО-ТОКСИКОЛОГИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ
ОТРАВЛЕНИЙ АЛКАЛОИДСОДЕРЖАЩИМИ РАСТЕНИЯМИ**

15.00.02 – фармацевтическая химия и фармакогнозия

**АВТОРЕФЕРАТ ДИССЕРТАЦИИ
ДОКТОРА ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИХ НАУК (DSc)**

Ташкент-2020

Тема диссертации доктора наук (DSc) зарегистрирована в Высшей аттестационной комиссии при Кабинете Министров Республики Узбекистан за номером B2017.3.DSc /Far 13.

Диссертация выполнена в Ташкентском фармацевтическом институте.

Автореферат диссертации на трех языках (узбекском, русском, английском (резюме)) размещен на веб-странице Научного совета (www.pharmi.uz) и Информационно-образовательном портале "ZiyoNet" (www.ziynet.uz).

Научный консультант: Юлдашев Закирджан Абидович
доктор фармацевтических наук, профессор

Официальные оппоненты: Урманова Флюра Фаридовна
доктор фармацевтических наук, профессор

Тулаганов Абдукодир Абдурахмонович
доктор фармацевтических наук, профессор

Юнусходжаевна Нодира Абдулхамитовна
доктор фармацевтических наук, доцент

Ведущая организация: Ташкентский педиатрический медицинский институт

Защита диссертации состоится «4» 12 2020 года в 11⁰⁰ часов на заседании Научного совета DSc.04/30.12.2019.Far.32.01 при Ташкентском фармацевтическом институте (адрес: 100015, г.Ташкент, Мирабадский район, ул. Айбека, 45. Тел.: (+99871) 256-37-38; факс: (+99871) 256-45-04; e-mail: pharmi@pharmi.uz).

С диссертацией можно ознакомиться в Информационно-ресурсном центре Ташкентского фармацевтического института (регистрационный номер 9) по адресу: 100015, г. Ташкент, Мирабадский район, ул. Айбека, 45. Тел.: (+99871) 256-37-38.

Автореферат диссертации разослан «18» 11 2020 года
(реестр протокола рассылки № 9 от «18» 11 2020 г.).



К.С.Ризаев

Председатель Научного совета по
присуждению ученых степеней,
д.м.н.

Ё.С. Кариева

Ученый секретарь Научного совета
по присуждению ученых степеней,
д.фарм.н., профессор

Ф.Ф. Урманова

Председатель научного семинара
при Научном совете по
присуждению ученых степеней,
д.фарм.н., профессор

ВВЕДЕНИЕ (аннотация диссертации доктора наук (DSc))

Актуальность и востребованность темы диссертации. Известно, что 1/3 лекарственных средств, производимых на сегодняшний день в мире получают из лекарственных растений. Между тем, растущий интерес среди населения к фитопрепаратам, биологически активным добавкам к пище и особенно к лекарственному растительному сырью, лекарственных средств на их основе, приводит к учащению случаев отравлений различной степени. Это происходит в результате ошибочного и постоянного употребления их в больших количествах пожилыми лицами, имеющими хронические заболевания, и считающими их безвредными, дешевыми, легкодоступными, не имеющими побочных отрицательных действий. В связи с этим большое значение уделяется изучению случаев отравлений лекарственными растениями и определению основных действующих веществ, входящих в их состав, экспрессными и точными методами анализа.

В настоящее время организации здравоохранения всего мира уделяют большое внимание случаям отравления людей в различной степени, лекарственными растениями, используемых в качестве «биоактивной добавки». В этом отношении требуется изучение теоретических и практических основ общих и частных методов изолирования из лекарственного растительного сырья и биологических объектов веществ, входящих в состав отдельных лекарственных и ядовитых растений, широко распространенных в мире и на сегодняшний день неоднократно ставшими причиной отравления людей.

В республике уделяют особое внимание профилактике отравлений различными веществами, эффективному проведению процессов экспертизы, и в этом отношении достигнуты определенные результаты. В четвертой главе Стратегии действий по дальнейшему развитию Республики Узбекистан определены важные задачи¹ «дальнейшее реформирование сферы здравоохранения, прежде всего первичного звена, скорой и экстренной медицинской помощи, направленное на повышение доступности и качества медицинского и социально-медицинского обслуживания населению..., обеспечение снижения показателей заболеваемости населения и повышения продолжительности жизни населения...». В этом отношении проведение исследований по изучению взаимосвязи и своеобразия между экстракцией биологически активных веществ, входящих в состав растений, и изолированием их из биологических объектов, разработке экспресс и высокоэффективных методов анализа этих веществ, удовлетворяющих требований судебно-медицинской экспертизы и химико-токсикологических исследований, считается одним из прикладных задач.

¹ Указ Президента Республики Узбекистан УП-4947 от 7 февраля 2017 года «О Стратегии действий по дальнейшему развитию Республики Узбекистан»

Данное диссертационное исследование в определенной степени служит выполнению задач, изложенных в Указе и Постановлениях Президента Республики Узбекистан УП-5707 от 10 апреля 2019 года «О мерах по дальнейшему ускорению развития фармацевтической отрасли республики в 2019-2021 годах», ПП-4310 от 6 мая 2019 года «О мерах по дальнейшему развитию системы медицинского и фармацевтического образования и науки», ПП-4049 от 4 декабря 2018 года «О мерах по дальнейшему совершенствованию деятельности судебно-медицинской службы Министерства здравоохранения Республики Узбекистан», ПП-4125 от 17 января 2019 года «О мерах по дальнейшему совершенствованию судебной медицины», а также других нормативно-правовых документов, принятых в данной сфере.

Соответствие исследования приоритетным направлениям развития науки и технологий республики. Данное исследование выполнено в соответствии с приоритетным направлением развития науки и технологий республики VI. «Медицина и фармакология».

Обзор зарубежных научных исследований по теме диссертации². Научные исследования, направленные на анализ алкалоидов исследуемых растений проводятся ведущими мировыми научно-исследовательскими учреждениями и высшими учебными заведениями, в том числе Кубанским государственным университетом, Институтом биологии Томского государственного университета (Российская Федерация), Витебским государственным медицинским университетом, Белорусским государственным университетом (Белорусь), Институтом химии Словацкой академии наук (Словакия), Китайской медицинской академией, Ботаническим садом лекарственных растений Гуанхи (Китайская Народная Республика), Лабораторией токсикологии Калифорнийского университета, Питтсбургской лабораторией по исследованию ядовитых растений (США), Университетом Манитобы (Канада).

В исследованиях по выделению алкалоидов растений из биологических объектов и их идентификации, а также анализу, с использованием различных методов, был получен ряд научных результатов, в том числе следующие: предложены методы обнаружения пирролизидиновых алкалоидов в моделных объектах (University of Utah, USA); разработаны методы выделения алкалоидов самшита вечнозеленого (Institute of Chemistry, Slovak Academy of Sciences, Словакия); определено ядовитое действие алкалоидов, входящих в состав растения болиголова пятнистого (School of Pharmacy, University of London, United Kingdom); разработаны методы идентификации пирролизидиновых алкалоидов (University Porto, Portugal); разработаны методы анализа алкалоида конииин в биологических объектах методом ВЭЖХ (Национальный фармацевтический университет, Украина); созданы хроматографические методы анализа тропановых алкалоидов (Кубанский государственный университет, Российская Федерация).

² Обзор зарубежных научных исследований по теме диссертации оформлен на основании данных источников www.elsevier.com/locate/jethpharm, www.springerlink.com/content

В мире проводится ряд исследований по приоритетным направлениям в области профилактики отравлений лекарственным растительным сырьем и биологически активными добавками на их основ: разработка современных методов анализа алкалоидов ядовитых растений, внедрение разработанных методов анализа в практику лабораторий судебно-медицинской экспертизы, проведение экспресс-методов в центрах экстренной медицинской помощи, использование точных и чувствительных методов анализа в центрах судебной экспертизы, оказание практической помощи в деятельности судебных медиков-химиков.

Степень изученности проблемы. Важное значения имеют исследования, проведенные зарубежными и отечественными исследователями по разработке методов выделения сильнодействующих веществ из внутренних органов трупов лиц, отравленных алкалоидсодержащими ядовитыми растениями, методов анализа с точки зрения химико-токсикологического анализа.

В мире проводятся исследования по разработке предварительных методик анализа случаев отравления растениями и наблюдаемых при этом симптомов, следующими учеными: А.В.Ахутиной, М.Кедровой, М.В.Филоновой, Ю.Ю.Малиновским, В.С.Бондарь, Н.Х.Шевченко, Е.А.Фомичевой, В.М.Серовым, А.П.Кудряшовым, Д.В.Моисеевым, В.А.Куркином, А.А.Погоцкой, С.И.Арутюнянц, Ф.Ибадуллаевым, А.З.Темердашевым, И.А.Колычевым, Н.В.Киселевой, О.Бауеровой, В.Т.Кромвель, З.Вотиски, Yao Chen, Zhao Zhang, Lander Ave, A.Fisher, P.R.Cheeke, S.L.Everist, G.D.Osweiler, K.E.Panter, J.Vetter, A.Mitsutoshi, T.A.Lopez, B.S.Frank, A.Sarfraz.

Отечественными учеными С.Ш.Фахрутдиновой, М.В.Икрамовой, Х.З.Ибрагимовым проводились научно-исследовательские работы по разработке методов экспресс-обнаружения алкалоидов в растениях, биологических объектах физико-химическими методами в случаях отравлений алкалоидсодержащими растениями.

Данная диссертационная работа является первым научным исследованием по разработке чувствительных, ускоренных и высокоточных методик, удовлетворяющих требования химико-токсикологических исследований, внедрению разработанных методик в анализе веществ изолированных из биологических объектов, подготовке востребованных методических рекомендаций для судебных-химиков научно-практических центров судебно-медицинской экспертизы.

Связь темы диссертации с планом научно-исследовательских работ высшего образовательного учреждения, где выполнена диссертация. Диссертационная работа выполнена в соответствии с планом научно-исследовательских работ Ташкентского фармацевтического института «Совершенствование методов фармацевтического и токсикологического анализа»

Целью исследования является разработка теоретически обоснованных судебно-химических и химико-токсикологических методов анализа случаев отравления растениями, произрастающими в Узбекистане.

Задачи исследования:

изучить уровень требований зарубежных и отечественных нормативных документов по судебно-химическому и химико-токсикологическому анализу отравлений растениями, выявить тенденции развития методов судебно-химического и химико-токсикологического анализа, а также рекомендовать методический системный подход в соответствии с современным уровнем требований на основе информационно-аналитических исследований;

разработать экспресс-диагностические методы изолирования алкалоидов из растительного сырья изучаемых растений и биологических объектов (в том числе из биологических жидкостей);

разработать методы предварительного микроскопического исследования растительных остатков в желудочно-кишечном тракте экспериментальных животных, отравленных алкалоидсодержащими растениями, и внедрить их в практику судебно-химической экспертизы;

разработать оптимальные методики анализа алкалоидов методом тонкослойного хроматографического скрининга;

разработать методику анализа алкалоидов с помощью метода высокоэффективной жидкостной хроматографии и внедрение их в определение алкалоидов, выделенных из биологических объектов;

разработать методику анализа алкалоидов методом поверхностно-ионизационной термодесорбционной спектроскопии и внедрение его для обнаружения алкалоидов в химико-токсикологических объектах;

рекомендовать разработанные методики для идентификации и определения алкалоидов изучаемых растений, изолированных из объектов и вещественных доказательств судебно-медицинской экспертизы.

Объектами исследования явились болиголов пятнистый, самшит вечнозеленый, триходесма седая, чистотел большой, белена черная, красавка обыкновенная, внутренние органы и биологические жидкости лабораторных животных (печень, почки, желудок и кишечник, кровь, моча, промывные воды желудка), отравленные ими.

Предметом исследования явились изолирование алкалоидов из объектов судебно-медицинской экспертизы (внутренние органы животных, кровь, моча, промывные воды желудка); разработка методик идентификации и количественного анализа изолированных из объектов веществ методами тонкослойной хроматографии (ТСХ), высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ), газ-хромато-масс-спектрометрии (ГХ-МС), ультрафиолетовой спектрофотометрии (УФ-СФ), термодесорбционной поверхностно-ионизационной спектроскопии (ТДПИС); разработка экспресс-анализов микроскопического исследования остатков растений в промывных водах желудка, для оказания неотложной медицинской помощи при острых отравлениях.

Методы исследования. В диссертации использованы современные физико-химические (ТСХ, ВЭЖХ, ГХ-МС, УФ-СФ, ТДПИС) и микроскопические методы анализа.

Научная новизна исследования заключается в следующем:

разработаны научно обоснованные методики изолирования алкалоидов болиголова пятнистого, самшита вечнозеленого, триходесмы седой,

чистотела большого из биологических объектов;

определены методики идентификации и количественного определения основных токсических веществ растений болиголова пятнистого, самшита вечнозеленого, триходесмы седой, чистотела большого, белены черной и красавки обыкновенной с точки зрения химико-токсикологического исследования используя методов ТСХ, ВЭЖХ, ГХ-МС, УФ-СФ, ТДПИС;

доказана возможность применения экстрактов алкалоидов, выделенных из растений, и очищенных методом ТСХ, а также идентифицированных методом ГХ-МС, в качестве достоверного рабочего стандарта в рекомендуемых методах анализа;

все разработанные методы и методики анализа обоснованы и рекомендованы для определения алкалоидов в химико-токсикологических объектах.

разработаны методики микроскопического исследования растительных остатков в желудочно-кишечном тракте экспериментальных животных, отравленных растениями.

созданы методики изолирования и анализа сильнодействующих веществ из биологических объектов для судебно-химической экспертизы и химико-токсикологического исследования случаев отравлений этими растениями и продуктами их переработки.

Практические результаты исследования заключается в следующем:

разработаны оптимальные методики изолирования алкалоидов из растений и биологических объектов в случаях отравления болиголовом пятнистым, самшитом вечнозеленым, триходесмой седой, чистотелом большим;

разработана методика очистки алкалоидов, изолированных из объектов от балластных веществ методом ТСХ-скрининга;

разработаны методики экспресс анализа изолированных из различных объектов и очищенных алкалоидов методами ВЭЖХ и ТДПИС.

по результатам исследований разработаны методические рекомендации, которые внедрены в лаборатории Республиканского научно-практического центра судебно-медицинской экспертизы и его областных филиалов.

Достоверность результатов исследования. Уровень достоверности полученных результатов подтвержден на основании современных методов математико-статистического анализа, физико-химических и лабораторных исследований на животных. Аprobация на практике судебно-химической экспертизы дает объяснения проведенным исследованиям.

Научная и практическая значимость результатов исследования. Научная значимость результатов исследования определяется способствованием облегчению процессов обнаружения алкалоидов в биологических объектах в судебно-химической экспертизе острых и хронических отравлений людей алкалоидсодержащими растениями, позволяя объективно оценить причину смерти в процессах судебно-химической экспертизы биожидкостей и внутренних органов трупа с помощью современных химико-токсикологических методов анализа, таких как: ТСХ-скрининг, ВЭЖХ, ТДПИС.

Практическая значимость результатов исследования заключается в том, что подготовлены методические рекомендации, на основе разработанных методик анализа, позволяющие проводить экспресс-анализ, в случаях отравления алкалоидсодержащими растениями в лабораториях Республиканского научно-практического центра судебно-медицинской экспертизы и его областных филиалов.

Внедрение результатов исследований. На основании научных результатов химико-токсикологического исследования отравлений алкалоидсодержащими растениями разработаны и внедрены в практику:

утверждена методическая рекомендация «Изолирование и обнаружение алкалоидов чистотела из биологических объектов и биологических жидкостей» (22.06.2020 й., №8н-р/185) (справка №8н-з/140 от 4 ноября 2020 года Министерства здравоохранения). В результате появилась возможность анализа отравлений людей чистотелом большим;

утверждена методическая рекомендация «Изолирование и обнаружение алкалоидов болиголова пятнистого из биологических объектов и биологических жидкостей» (18.06.2020 й., №8н-р/166) (справка №8н-з/140 от 4 ноября 2020 года Министерства здравоохранения). Эта дала возможность анализировать болиголова пятнистого с точки зрения химико-токсикологического исследования;

утверждена методическая рекомендация «Изолирование и обнаружение алкалоидов триходесмы седой из биологических объектов и биологических жидкостей» (18.06.2020 й., №8н-р/167) (справка №8н-з/140 от 4 ноября 2020 года Министерства здравоохранения). В результате создана возможность выделения и анализа алкалоидов при отравлении триходесмы седой;

утверждена методическая рекомендация «Изолирование и обнаружение алкалоидов самшита вечнозеленого из биологических объектов и биологических жидкостей» (18.06.2020 й., №8н-р/165) (справка №8н-з/140 от 4 ноября 2020 года Министерства здравоохранения). В результате создана возможность выделения и анализа алкалоидов самшита из биологических объектов и жидкостей;

на основе результатов по определению алкалоидов в различных объектах в случаях отравления растениями разработано учебное пособие по «Судебной токсикологии» для бакалавров образовательного направления «5510500 – Фармация (по видам)» (свидетельство №359-483). В результате это позволило обогатить и укрепить знания бакалавров в области судебно-химической экспертизы.

Апробация результатов исследования. Результаты настоящего исследования обсуждены на 9 международных и 16 республиканских научно-практических конференциях.

Опубликованность результатов исследования. По теме диссертации опубликованы 36 научных работ, из них 11 статей в научных изданиях, рекомендованных ВАК Республики Узбекистан для публикации основных научных результатов диссертаций на соискание ученой степени доктора наук (DSc), в том числе 9 статей опубликованы в республиканских и 2 статьи в зарубежных журналах.

Структура и объем диссертации. Структура диссертации состоит из введения, обзора литературы, пяти глав, заключения, списка использованной литературы и приложений. Объем диссертации составляет 171 страниц.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ ДИSSERTАЦИИ

Во введении обоснована актуальность и востребованность проведенных исследований, определены цель и задачи, объект и предмет исследования, указано соответствие исследования приоритетным направлениям развития науки и технологий, изложены научная новизна и практические результаты исследования, раскрыты научные и практические значения полученных результатов, приведены сведения по реализации результатов исследования в практику, а также опубликованных работ и структуре диссертаций.

Первая глава диссертации **«Отравления растениями и их исследования»** представляет собой обзор литературы, включающая общие сведения о классификации ядовитых растений на основе их действия, произрастающих в Узбекистане. Кратко приведены описания и классификации случаев отравления исследуемыми алкалоидсодержащими растениями. Также представлена общая информация о растениях, являющихся объектом исследования (болиголове пятнистом, чистотеле большом, самшите вечнозеленом, триходесме седой, белене черной, красавке обыкновенной) их химический состав, картина заболевания и проходящие изменения в организме при отравлении ими.

Вторая глава посвящена **«Изолированию алкалоидов из различных объектов»**. В этой главе приведены результаты разработки трех методов извлечения алкалоидов из растений, которые могут быть причиной отравления. Из трех выбрана оптимальная методика изолирования: в качестве сырья использовали высушенную надземную часть растений. Пробу сырья измельчали до размера частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 1 мм. Около 10 г измельченного сырья помещали в колбу вместимостью 250 мл, приливали 15 мл 5% раствор щавелевой кислоты и 75 мл диэтилового эфира, взбалтывали смесь в течение 1 ч. В этом случае алкалоиды в растениях переходят из основания в соли щавелевой кислоты. Соли растворяются в воде и переходят в водно-кислый слой. В эфирной фазе остаются балластные вещества, а также остатки хлорофила растения. Это позволяет получить относительно чистую вытяжку. Вытяжку фильтровали через бумажный фильтр, водно-кислый слой отделяли от слоя органического растворителя с помощью делительной воронки. Этот процесс повторяли ещё трижды. Все кислые вытяжки соединяли и подщелачивали концентрированным раствором аммиака до щелочной реакции (pH=9) по фенолфталеину. Алкалоиды из солей щавелевой кислоты переходят в основания. Алкалоиды экстрагировали хлороформом последовательно порциями по 20, 15, 10 мл, взбалтывая по 3 мин. Хлороформные экстракты фильтровали в колбу для отгонки вместимостью 100 мл через бумажный фильтр, на который предварительно помещали 3-5 г безводного натрия сульфата. Хлороформ в колбе удаляли потоком воздуха до полного исчезновения запаха растворителя. Сухой остаток растворяли 1 мл этанола и очищали методом ТСХ и оставляли для анализа.

Также разработана методика изолирования алкалоидов из биологических жидкостей (кровь, моча) и биологических объектов в случаях отравлении ими.

Для выделения алкалоидов из модельных образцов трупной крови (5мл) и мочи (25мл), добавляли им по 5 мл 5%-ного раствора щавелевой кислоты, 2 мл этилового спирта и 5 мл диэтилового эфира. Оставляли на один час при периодическом встряхивании. Кисло-водные вытяжки отделяли из слоя органического растворителя фильтровали и подщелачивали 1М раствором натрия гидроксида до щелочной реакции (рН=9) по фенолфталеину. Затем добавляли по 5 мл хлороформа. Смеси встряхивали 10 мин, центрифугировали в течение 5 мин при 3000 об/мин. Хлороформные слои отделяли и пропускали через фильтр, содержащий 3-5 г безводного натрия сульфата. Из фильтрата хлороформ удаляли в потоке воздуха до получения сухого остатка. Сухой остаток растворяли в 1 мл этанола, очищали методом ТСХ. Очищенные вытяжки анализировали по разработанной методике (табл.1).

Для выделения алкалоидов из биологического объекта к модельным образцам трупной печени (100,0 г), добавляли по 5 мл 5%-ного раствора щавелевой кислоты и 75 мл диэтилового эфира и смесь оставляли на один час при периодическом встряхивании. Затем смеси центрифугировали в течение 5 мин при 3000 об/мин. Вытяжки отделяли, фильтровали и отделяли кислородный слой от органического растворителя с помощью делительной воронки. Этот процесс повторяли три раза. Полученные кислородные вытяжки объединяли и доводили рН среды до щелочной реакции универсального индикатора (рН=8-9) с помощью концентрированного раствора аммиака. При этом алкалоиды переходят в основания и их экстрагировали в течение 5 мин 20 мл хлороформа. Из смеси слой органического растворителя отделяли с помощью делительной воронки. Водный слой еще дважды экстрагировали в течение 5 мин хлороформом (по 15 и 10 мл). Три хлороформных экстракта объединяли. Для удаления влаги из хлороформного экстракта его фильтровали через фильтр, содержащий 3-5 г безводного натрия сульфата. Хлороформные экстракты упаривали при комнатной температуре. Сухой остаток растворяли в 1 мл этанола и очищали методом ТСХ. Очищенные элюаты анализировали по рекомендованной методике и результаты пригодность метода. Полученные результаты представлены в таблице 1.

Таблица 1

Результаты изолирования алкалоидов из различных объектов по рекомендуемой методике

Алкалоиды	Количество, изолированного из различных объектов, %		
	кровь	моча	печень
Кониин	55,12	76,31	43,97
Буксин	58,57	77,39	43,07
Триходесмин	55,38	74,55	43,61
Хелидонин	45,12	67,23	47,92

Сангвинарин	58,78	72,03	48,17
Атропин	59,50	75,06	50,54
Скополамин	49,56	72,86	47,14

В третьей главе диссертации названной «**Микроскопический анализ растений в различных объектах**» приведены результаты микроскопического анализа проведенного для разработки методов предварительного исследования в случаях отравления растениями. Отдельно проведены исследования по выявлению диагностических признаков сырья болиголова пятнистого, самшита вечнозеленного и триходесмы седой. Микроскопическое строение белены черной, красавки обыкновенной и чистотела большого описаны в литературе, и в связи с этим было проведено сравнительное микроскопическое определение этих растений в промывных водах желудка.

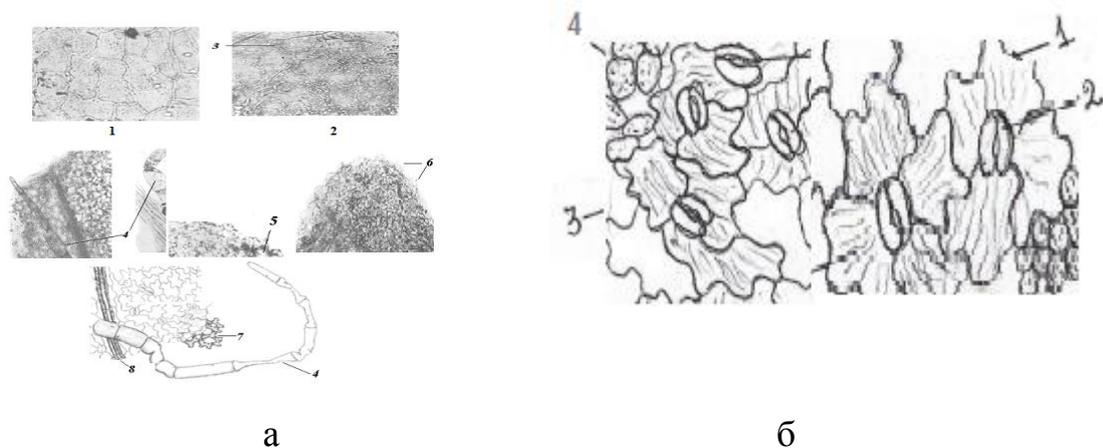


Рис. 1. Диагностические признаки чистотела большого (а) и болиголова пятнистого (б)

а - 1 - верхний эпидермис листа; 2 - нижний эпидермис листа; 3 - устицы; 4 - волосы; 5 - гидатоды; 6 - крупные водные устицы; 7 - водные устицы паренхиматозной пористой ткани; 8 - молочные трубки.

б - 1 - эпидермис листа; 2 - устица; 3 - складка кутикулы; 4 - облачная ткань.

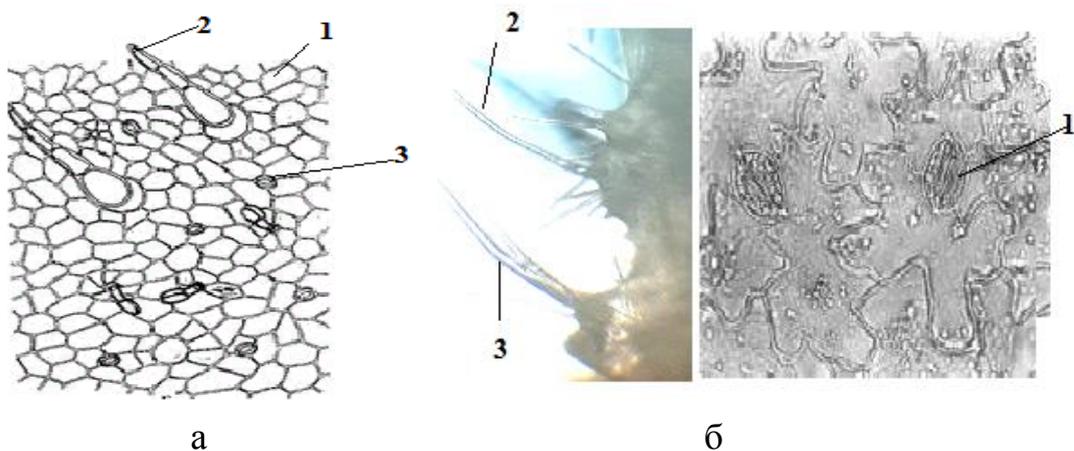


Рис. 2. Диагностические признаки листьев самшита вечнозеленного (а) и триходесмы седой (б)

а - 1 - верхний эпидермис листа; 2 - устьицы; 3 - волоски

б - 1 - верхний эпидермис листа и устьицы; 2 - волосы; 3 разветвленные волосы.

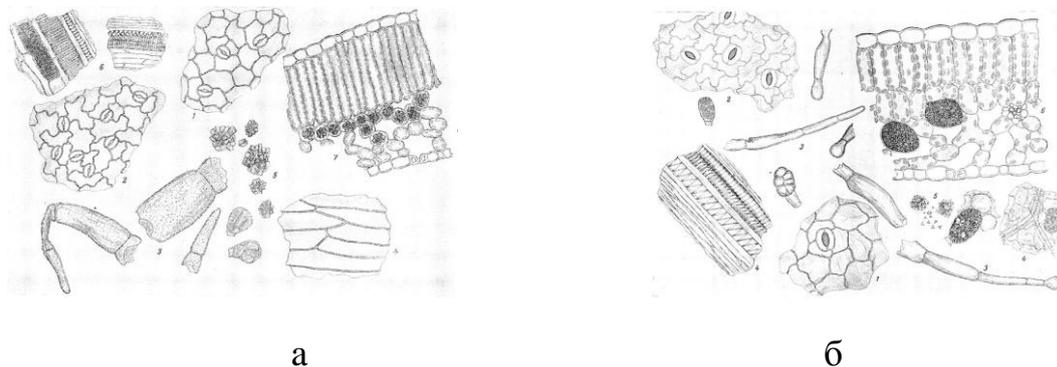


Рис. 3. Диагностические признаки листьев белены черной (а) и красавки обыкновенной (б)

1, 2 - остатки эпидермиса листа; 3 - волоски; 4 - остатки жилок листа; 5 - друзы (кристаллы оксалата кальция); 6 - отдельные фрагменты листа.

В лабораторных условиях было вызвано легкое отравление лабораторных кроликов добавлением по отдельности в корм, изучаемых растений. Отравленных кроликов интактировали через 0,5–1 ч, промывали желудки и собирали промывные воды в отдельную емкость. Части растений отделяли пинцетом и сначала промывали смесью глицерин-спирт-вода (1: 1: 1), а затем раствором хлоралгидрата. При просмотре образцов под микроскопом наблюдались микроскопические признаки, соответствующие отдельным растениям (рисунки 1,2,3).

Результаты показали, что при микроскопическом исследовании промывных вод желудка с помощью диагностических признаков возможно идентифицировать растения по выявленным частям, которые дают направление для доказательства сильнодействующих веществ физико-химическими методами.

Представленные на рисунках диагностические признаки показывают на возможность использования их в судебно-химической экспертизе и химико-токсикологических исследованиях по установлению отравлений людей этими растениями.

Четвертая глава диссертации посвящена «**Определению алкалоидов хроматографическими методами**». При обнаружении алкалоидов в растениях и определения их наличия, установления подлинности очень удобны методы распределительной хроматографии на бумаге и в тонких слоях сорбента. Метод ТСХ-скрининга может быть использован в судебной химии, экологии и химико-токсикологическом анализе как метод обнаружения веществ, с одной стороны, и как метод очистки экстрактов, полученных из биологических объектов, с другой. Для проведения исследований методом ТСХ-скрининга были приготовлены пластинки из силикагеля LS 5/40 (содержащего 13% гипса) следующим образом: в фарфоровую посуду помещали 35 г силикагеля, 2 г гипса и 90 мл очищенной воды, хорошо перемешали. Полученную суспензию равномерно разливали и распределяли на 10 стеклянных пластинках размером 9x12 см.

Хроматографические пластинки сушили при комнатной температуре и активировали в сушильном шкафу при 105 ° С в течение 30 мин. Готовые пластинки со силикагелем до анализа хранили в специальных емкостях – эксикаторах. Чтобы предотвратить ошибки в анализе, перед использованием пластинки промывали в соответствующей системе растворителей. В исследованиях был изучен ряд подвижных фаз, а также реагентов для проявления пятен (табл.2).

Таблица 2

Рекомендуемые методики ТСХ-скрининга алкалоидов исследуемых растений

Алкалоиды	Система растворителей	Проявитель	Значение Rf	Элюант
Атропин	Хлороформ-ацетон-диэтиламин (50:30:2)	реактив Драгендорфа, модифицированный по Мунье	0,25	Метанол-диэтиламин (9:1)
Скополамин			0,64	
Кониин	Хлороформ-ацетон-диэтиламин (50:30:2)	реактив Драгендорфа, модифицированный по Мунье	0,26	
Конгидрин			0,68	
Хелидонин	Бутанол-уксусная кислота-вода (40:10:10)	УФ-облучение при 364 нм или реактив Драгендорфа, модифицированный по Мунье	0,53	Хлороформ-метанол (95:5)
Сангвинарин			0,79	
Буксин	Этанол-диэтиловый эфир (8:2) гексан-этилацетат (9:1)	УФ-облучение при 364 нм или реактив Драгендорфа, модифицированный по Мунье	0,72	
Триходесмин	Хлороформ-ацетон-диэтиламин (5:4:1)	реактив Драгендорфа, модифицированный по Мунье	0,53	
Инканин			0,61	

В результате исследования были разработаны оптимальные условия для проведения ТСХ-скрининга экстрактов исследуемых растений.

С целью обнаружения и определения алкалоидов, извлеченных из биологических объектов и жидкостей и очистке от балластных веществ был изучен процесс элюирования.

Разработанные методики были рекомендованы для очистки алкалоидов, изолированных из биологических жидкостей и биологического объекта. Полученные результаты показали пригодность разработанной методики ТСХ скрининга для идентификации и очистки алкалоидов изучаемых растений.

Для определения природы алкалоидов, выделенных из растений, был проведен анализ экстракта методом ГХ-МС. Полученные результаты позволяют использовать очищенный элюат растительного экстракта в качестве внешнего стандарта в последующих анализах проводимых методом ВЭЖХ. Это помогает судебным химикам проводить экспресс-анализы в отсутствие стандартных веществ. Экстракты растений очищали и алкалоиды

выделяли методом ТСХ-скрининга в условиях, приведенных в таблице 2. Анализ хроматограмм и масс-спектров полученных экстрактов проводили путем сравнения пиков с базой данных NIST11.L, W10N11_Full.L, Wiley275.L. При интерпретации каждого хроматографического пика идентифицировали соответствующий алкалоид растений: кониин в болиголове пятнистом, хелидонин и сангвинарин в чистотеле большом, буксин в самшите вечнозеленом и алкалоид триходесмин в триходесме седой.

ВЭЖХ считают быстрым методом анализа, поскольку для разделения сложных смесей достаточно нескольких минут. При этом одновременно можно разделить смеси на отдельные вещества, установить их подлинность и определить количественное содержание. Принимая во внимание достоинства метода, в ходе наших исследований были разработаны методики для анализа изучаемых растений методом ВЭЖХ. Эксперименты проводились на высокоэффективном жидкостном хроматографе Agilent 1100 series. Прибор состоит из четырехканального градиентного насоса высокого давления, спектрофотометрического детектора, анализирующего в диапазоне волн 190-600 нм, устройства для удаления газов из подвижной фазы, анализирующего устройства объемом 20 мкл - инжектора Rheodyne и хроматографической колонки. Аппарат полностью управляется компьютером с помощью программы Chemstation A.09.03.

В качестве оптимальных условий для анализа экстрактов из болиголова пятнистого были выбраны следующие:

- хроматографическая стеклянная колонка 4,6x75 мм, заполненная сорбентом Zorbax Eclipse XDB C-18 с размером частиц 3,5 мкм;

- подвижная фаза: ацетонитрил (А) - смесь 10 мМ раствора KH_2PO_4 и 1% изопропанола в соотношении 50:50 (Б) (рН = 3,5);

- градиент: 0 мин: А-10%, Б-90%;

 - 0-20 мин: А-60%, Б-40%;

 - 25 мин: А-90%, Б-10%

- расход подвижной фазы – 0,5 мл/мин;

- детектор – УФ-спектрофотометр;

- детектирование при длине волны 266 нм;

- продолжительность анализа 25 минут.

При проведении анализ элюата, выделенного из болиголова пятнистого, был получен хроматографический пик кониина время удерживания которого составило 10,1 мин (рис. 4).

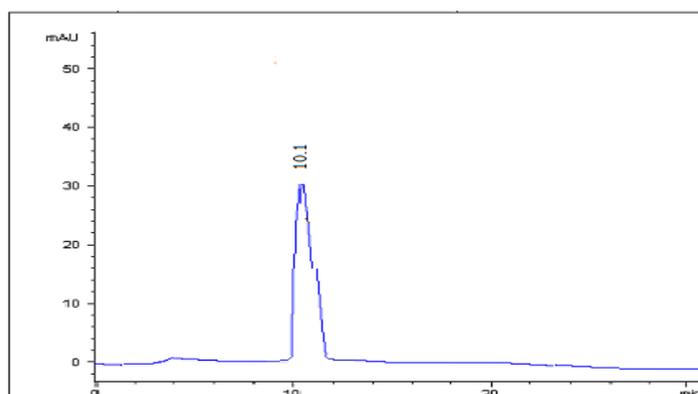


Рис.4. Хроматограмма кониина, извлеченного из экстракта болиголова пятнистого

С помощью разработанной методики было определено количественное содержание алкалоида болиголова пятнистого, изолированного из крови, мочи и биологического объекта.

С помощью разработанной методики кониин изолируется из крови в количестве 55,12%, из мочи 76,31%. Относительные ошибки определений при этом составили 3,02% и 0,91%, соответственно. Было показано, что разработанной методикой удается изолировать 43,97% кониина из биологического объекта, и определить его с относительной ошибкой 3,49%.

Для анализа буксина были выбраны следующие оптимальные условия анализа:

хроматографическая стеклянная колонка 4,6x250 мм, заполненная сорбентом Zorbax Eclipse XDB C -18 с размером частиц 5 мкм;

- подвижная фаза: смесь метанол–10 мМ раствора KH_2PO_4 в соотношении 50:50; (pH=3,5);

- расход подвижной фазы – 1,0 мл/мин;

- детектор – УФ-спектрофотометр;

- детектирование при длине волны 268 нм.

- продолжительность анализа 40 мин.

При хроматографировании в этих условиях время удерживания буксина, изолированного и очищенного методом ТСХ из самшита вечнозеленого, составило 28,5 мин. (рис. 5).

Разработанная методика была апробирована для определения содержания алкалоида самшита вечнозеленого, выделенного из биожидкостей.

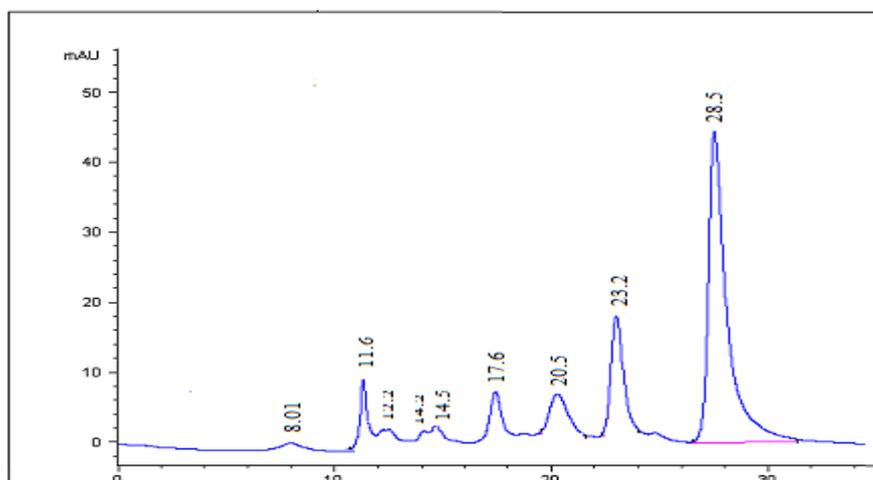


Рис.5. Хроматограмма буксина, выделенного из экстракта самшита вечнозеленого

С помощью разработанной методики анализа можно изолировать и определить буксина в крови 58,57%, с относительной погрешностью 2,28%. Рекомендованная методика позволяет изолировать 77,39% буксина из мочи, с относительной погрешностью 0,92%. Было показано, что с помощью разработанной методики можно изолировать 43,07% буксина и определить его с относительной ошибкой 3,78% в биологических объектах.

Для определения триходесмина выбраны следующие оптимальные условия:

- хроматографическая стеклянная колонка 4,6x150 мм заполненная сорбентом Zorbax Eclipse XDB C -18 с размером частиц 5 мкм;
- элюент изократический, подвижная фаза: ацетонитрил-вода, в соотношении 70:30 (pH=2,8);
- расход подвижной фазы 0,45 мл/мин;
- детектор УФ-спектрофотометр;
- детектирование при длине волны 223 нм,
- продолжительность анализа 30 минут.

В этих условиях время удерживания триходесмина, экстрагированного из растения составило 17,5 минут (рис.6).

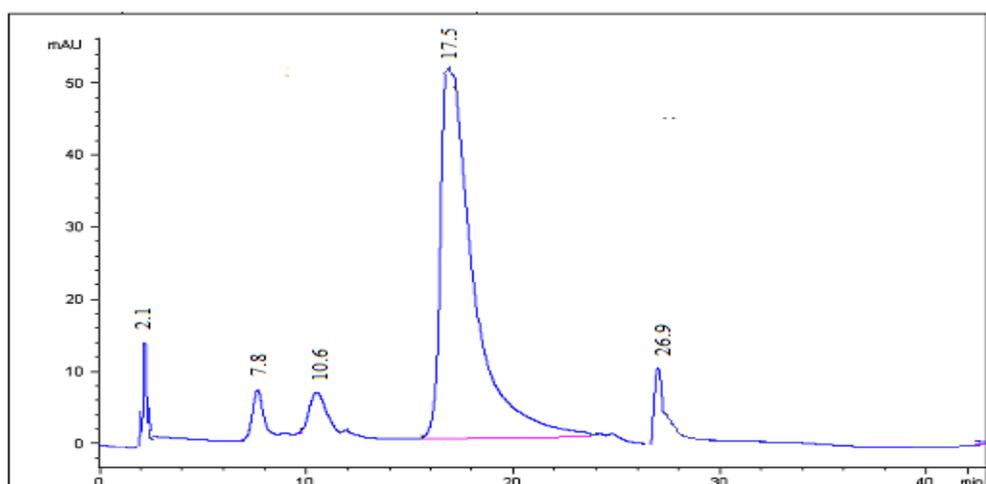


Рис.6. Хроматограмма триходесмина, выделенного из экстракта триходесмы седой

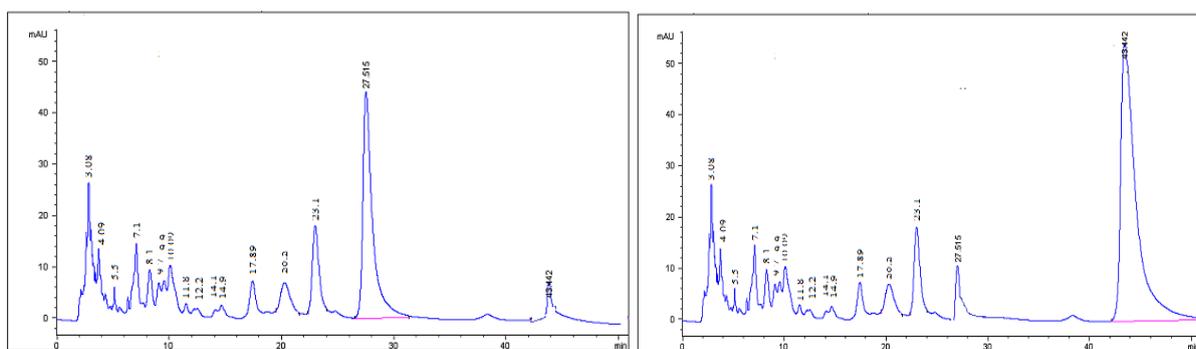
Разработанные методики анализа апробированы в определении триходесмина, изолированного из биожидкостей.

С помощью разработанных методов изолирования можно выделить из крови 55,38% триходесмина и определить его с относительной погрешностью 1,65%, а из мочи в количестве 74,55%, с относительной погрешностью 1,11%, из биологического объекта - 43,61%, относительная ошибка методики составляет 2,93%.

Для анализа алкалоидов чистотела большого в качестве оптимальных условий анализа методом ВЭЖХ были выбраны следующие:

- хроматографическая стеклянная колонка 3x150 мм, заполненная сорбентом Zorbax Eclipse XDB C -18 с размером частиц 3,5 мкм;
- подвижная фаза: смесь ацетонитрила - 10 мМ раствор KH_2PO_4 (pH = 7,4) в соотношении 50:50; изократический элюент;
- расход подвижной фазы 0,4 мл/мин;
- температура – 30 °С
- детектор – УФ-спектрофотометр;
- детектирование при длине волны - 280 нм.
- продолжительность анализа - 50 мин.

При анализировании экстракта, полученного из растения, с использованием выше представленных условий, время удерживания хелидонина составляло 43,4 мин, сангвинарина 27,5 мин (рис. 7).



а

б

Рис.7. Хроматограмма сангвинарина (а) и хелидонина (б), выделенного из экстракта чистотела большого

Разработанная методика анализа была апробирована при определении алкалоидов чистотела, экстрагированных из биологических жидкостей (рис. 8,9).

При этом показано, что с помощью разработанной методики можно выделить из крови 58,78% сангвинарина и 45,12% хелидонина, с относительной ошибкой 3,06% и 3,92%, соответственно; из мочи - 72,03% сангвинарина и 67,23% хелидонина, с относительной погрешностью 3,97% и 3,88%, соответственно; из биологического объекта - 48,17% сангвинарина и 47,92% хелидонина, с относительной погрешностью 5,19% и 3,68% соответственно.

В качестве оптимальных условий для анализа экстрактов, полученных из белены черной и красавки обыкновенной, были выбраны следующие:

- хроматографическая стеклянная колонка 4,6x75 мм, заполненная сорбентом Zorbax Eclipse XDB C-18 с размером частиц 3,5 мкм;
- подвижная фаза: ацетонитрил (А) - смесь 10 мМ раствора KH_2PO_4 и 1% изопропанола в соотношении 50:50 (Б) (рН = 3,5);
- градиент: 0 мин: А-10%, Б-90%;
0-20 мин: А-60%, Б-40%;
25 мин: А-90%, Б-10%
- расход подвижной фазы – 0,5 мл/мин;
- детектор – УФ-спектрофотометр;
- детектирование при длине волны 254 нм;
- продолжительность анализа - 15 минут.

При анализе элюатов атропина и скополамина выделенных из растений, в этих условиях время удерживания первого составило 4,5 мин, а второго 2,5 мин (рис. 8). Разработанная методика анализа была использована при анализе алкалоидов, выделенных из биологических жидкостей, и были получены соответствующие результаты.

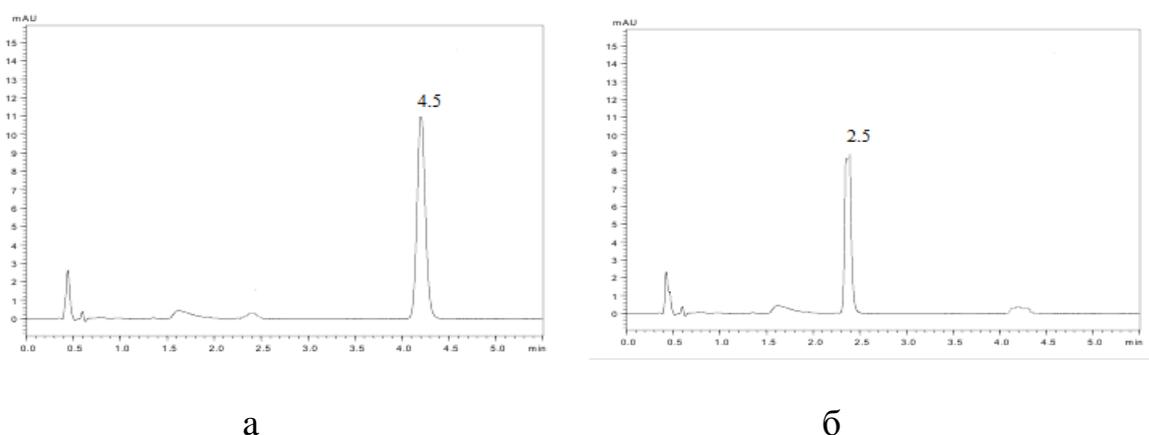


Рис.8. Хроматограмма атропина (а) и скополамина (б) выделенного из экстракта растений

С помощью разработанной методики анализа были определены атропин

и скополамин изолированных из крови. Содержание атропина составило 59,50% и скополамина 49,56%, алкалоиды определяли с относительной ошибкой метода 1,02% - 1,86%, соответственно, что отвечает требованиям, предъявляемым к аналогичным методам. Из мочи атропин и скополамин изолируются 75,06% и 72,86%, соответственно, с относительной погрешностью 0,97% и 1,11%, из биологических объектов – 50,54% и 47,14%, с относительной погрешностью 2,75% и 1,31%, соответственно.

Пятая глава диссертации посвящена «**Применению спектральных методов в анализе алкалоидов**». УФ-спектрофотометрический метод широко используется в химико-токсикологическом анализе, хотя чувствительность его относительно невысокая. Этот метод прост, быстр в исполнении, не требует сложного оборудования и подготовки, все лаборатории судебно-химического отделения полностью оснащены УФ-спектрофотометрами. Экстракты растений очищали хроматографическим методом, приведенном в главе 4. Затем были изучены спектральные характеристики полученных элюатов (рисунки 9-12).

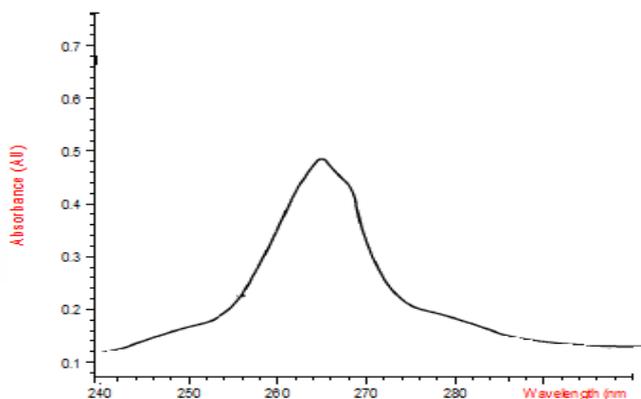
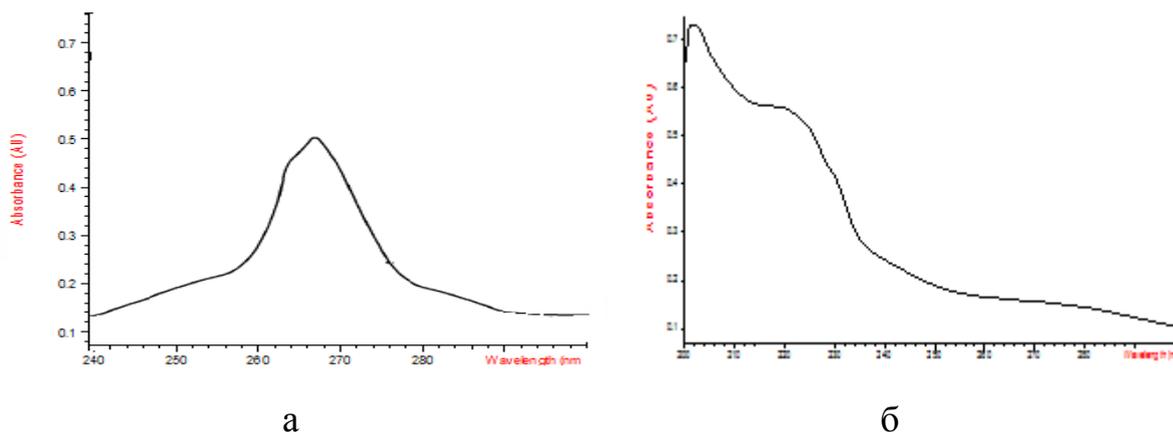
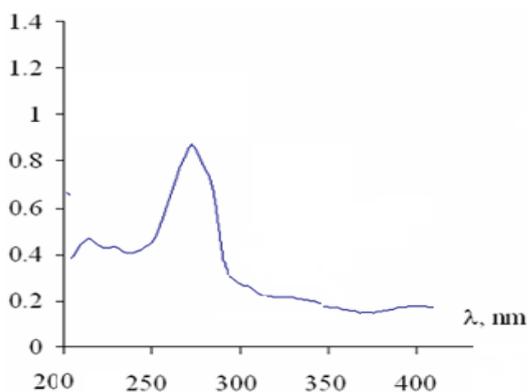
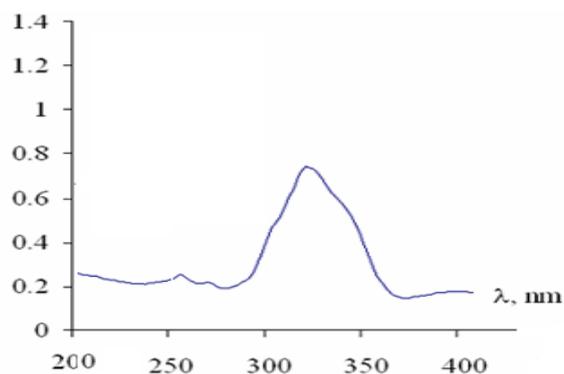


Рис.9. УФ-спектр кониина, выделенного из болиголова пятнистого



**Рис.10. УФ-спектры буксина (а), выделенного из самшита
вечнозеленого и триходесмина (б)
выделенного из
триходесмы седой**

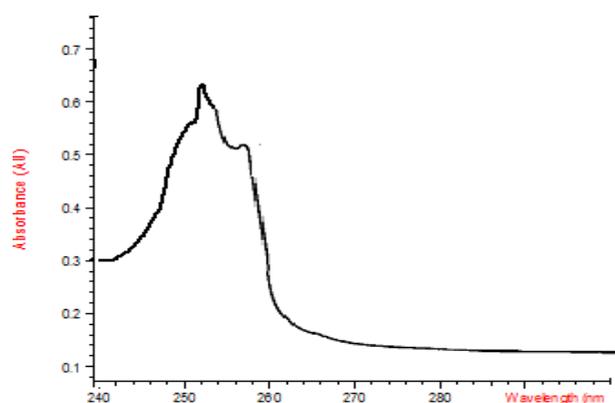
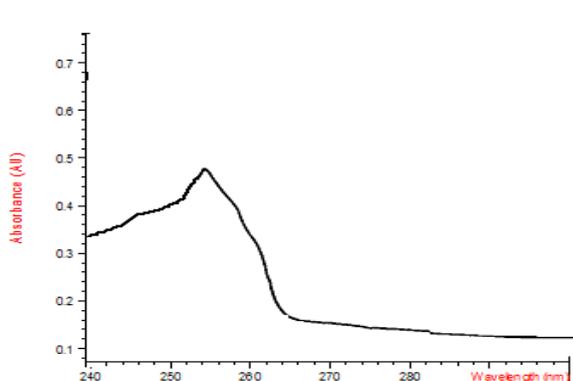




а

б

Рис.11. УФ-спектры хелидонина (а) и сангвинарина (б), выделенного из чистотела большого



а

б

Рис.12. УФ-спектры атропина (а) и скополамина (б), выделенного из белены черной и красавки обыкновенной

Извлечения, полученные из модельных образцов биологических жидкостей и биологических объектов, очищали с помощью ТСХ-скрининга и снимали их УФ-спектры. Полученные результаты показали, что при остром отравлении исследуемыми растениями, алкалоиды могут быть обнаружены методом хроматоспектрофотометрии, после экстракции их хлороформом.

В судебно-химическом анализе важное значение имеют использование быстрых и точных методов обладающих высокой чувствительности, при обнаружении веществ, находящихся в биологическом объекте. С этой целью были разработаны и рекомендованы к практическому применению методики анализа алкалоидов методом термодесорбционной спектроскопии поверхностной ионизации.

Для разработки методик анализа методом термодесорбционной спектроскопии поверхностной ионизации (ТДСИС) использовали аппарат поверхностной ионизации ПИИ-Н-С «Искович-1», разработанного рекомендованный Институтом электроники им. У.А. Орифова Академии наук Республики Узбекистан для быстрого обнаружения наркотиков и других

одурманивающих веществ. Для обнаружения основных алкалоидов растений методом ТДПИС были подобраны следующие условия анализа: эмиттер – оксидированный молибден, имеющий в своем составе иридий; напряжение эмиттера – 405 В; температура эмиттера – 200-300 °С; температура испарения – 20-505°С; поток воздуха – 50 л/час (напряжение компрессора 12 В); объем исследуемой пробы, взятой для анализа – 1 мкл; время анализа – 3 мин.; запись спектров производится непосредственно с помощью компьютерной программы.

При этом были получены термодесорбционные спектры поверхностной ионизации алкалоидов, выделенных из каждого растения. На основании полученных результатов построен калибровочный график зависимости силы тока спектров ТДПИ алкалоидов от их концентрации в растворе.

При анализе кониина, выделенного из болиголова пятнистого, наблюдался характерный пик при 130-140 °С, для буксина, выделенного из самшита вечнозеленного, характерный пик при 250-255 °С, для триходесмина, извлеченного из триходесмы седой, наблюдались линейные пики при 183-190 °С (рис. 13-14).

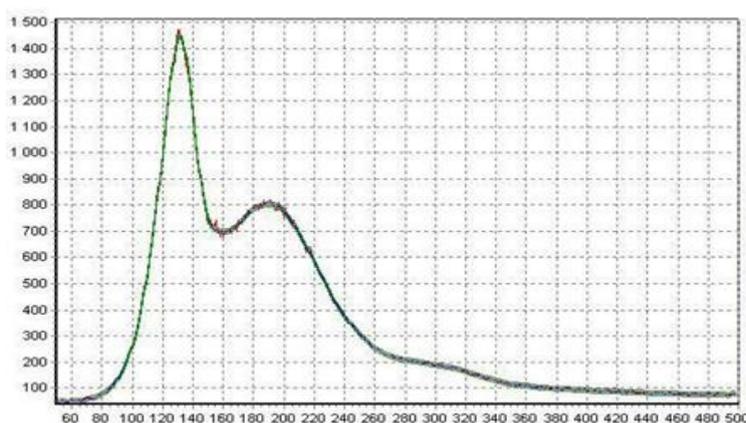


Рис.13. ТДПИ спектр кониина, выделенного из болиголова пятнистого

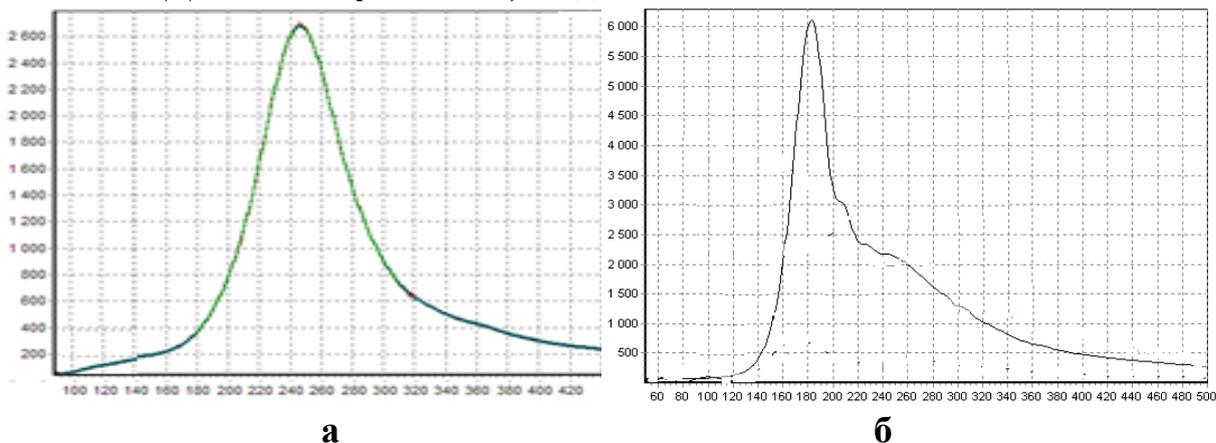


Рис.14. ТДПИ спектр буксина (а), выделенного из самшита вечнозеленного и триходесмина (б), выделенного из триходесмы седой

В этих условиях были получены спектры растворов алкалоидов разной

концентрации, а также построен калибровочный график зависимости тока от концентрации.

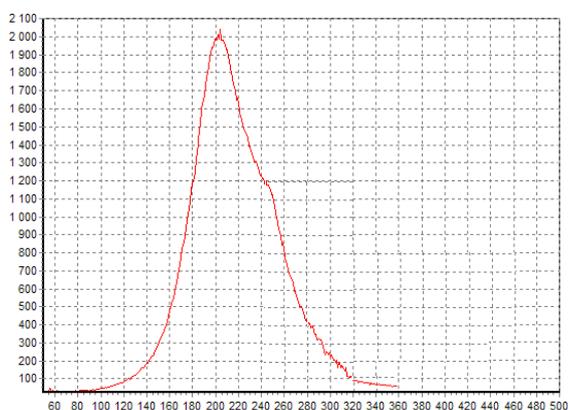
По результатам анализа алкалоидов, изолированных из биожидкостей, установлено, что содержание кониина в крови составило 45,62%, буксина 53,81% и триходесмина 45,46%, в моче установлено 69,55% кониина, 85,13% буксина и 73,45% триходесмина (табл.3).

Таблица 3

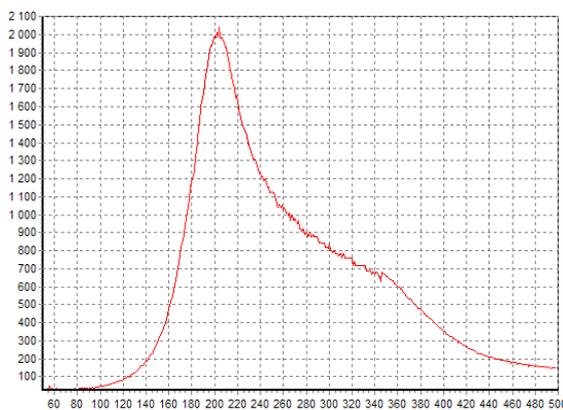
Результаты количественного анализа кониина, буксина и триходесмина, изолированных из биожидкостей

Количество кониина		Метрологическая характеристика полученных результатов	Количество буксина		Метрологическая характеристика полученных результатов	Количество триходесмина		Метрологическая характеристика полученных результатов
нг	%		нг	%		нг	%	
КРОВЬ								
22,53	45,06	$f=4;$ $T(95\%,4)=2,78;$ $\bar{X}=45,62;$ $S^2=0,6234;$ $S=0,7895;$ $S_x=0,3531;$ $\Delta X=2,1949;$ $\Delta \bar{X}=0,9816$ $\varepsilon=4,8114\%;$ $\bar{\varepsilon}=2,1517\%$	26,33	52,66	$f=4;$ $T(95\%,4)=2,78;$ $\bar{X}=53,82;$ $S^2=0,5040;$ $S=0,7099;$ $S_x=0,3175;$ $\Delta X=1,9737;$ $\Delta \bar{X}=0,8826$ $\varepsilon=3,66\%;$ $\bar{\varepsilon}=1,64\%$	22,86	45,72	$f=4;$ $T(95\%,4)=2,78;$ $\bar{X}=45,46;$ $S^2=0,5116;$ $S=0,7152;$ $S_x=0,3198;$ $\Delta X=1,9884;$ $\Delta \bar{X}=0,8892$ $\varepsilon=4,37\%;$ $\bar{\varepsilon}=1,95\%$
22,62	45,24		26,99	53,98		22,12	44,24	
23,41	46,82		27,25	54,50		22,94	45,88	
23,00	46,02		26,87	53,74		22,72	45,44	
22,48	44,96		27,12	54,24		23,01	46,02	
МОЧА								
34,02	68,04	$f=4;$ $T(95\%,4)=2,78;$ $\bar{X}=69,55;$ $S^2=1,3179;$ $S=1,1480;$ $S_x=0,5134;$ $\Delta X=3,1914;$ $\Delta \bar{X}=1,4272$ $\varepsilon=4,5885\%;$ $\bar{\varepsilon}=2,0520\%$	42,56	85,12	$f=4;$ $T(95\%,4)=2,78;$ $\bar{X}=85,13;$ $S^2=0,5081;$ $S=0,7128;$ $S_x=0,3187;$ $\Delta X=1,9816;$ $\Delta \bar{X}=0,8862$ $\varepsilon=2,33\%;$ $\bar{\varepsilon}=1,04\%$	37,06	74,12	$f=4;$ $T(95\%,4)=2,78;$ $\bar{X}=73,45;$ $S^2=0,4426;$ $S=0,6653;$ $S_x=0,2975;$ $\Delta X=1,8496;$ $\Delta \bar{X}=0,8271$ $\varepsilon=2,52\%;$ $\bar{\varepsilon}=1,13\%$
34,35	68,70		42,23	84,46		36,91	73,82	
34,93	69,86		42,88	85,76		36,23	72,46	
35,37	70,74		42,19	84,38		36,56	73,12	
35,21	70,42		42,96	85,92		36,88	73,76	

При анализе алкалоидов, выделенных из чистотела большого, наблюдалось образование линейных пиков, характерных для хелидонина 189-200 ° С и сангвинара 193-208 ° С (рис. 15).



а



б

**Рис.15. ТДПИ спектры хелидонина (а) и сангвинарина (б),
извлеченного из чистотела большого**

Эти же условия анализа были использованы при исследовании алкалоидов, выделенных из биожидкостей. Результаты показали, что хелидонин изолируется из крови 58,19%, сангвинарин 68,39%; хелидонин экстрагируется из мочи 82,05% а сангвинарин 77,85% (табл.4).

Таблица 4

**Результаты количественного анализа хелидонина и сангвинарина,
выделенных из биожидкостей**

Количество хелидонина		Метрологическая характеристика полученных результатов	Количество сангвинарина		Метрологическая характеристика полученных результатов
нг	%		нг	%	
КРОВЬ					
28,03	56,06	f=4; T (95%, 4)=2,78; $\bar{X} = 58,19$; $S^2=4,0546$; $S=2,0136$; $S_x=0,9005$; $\Delta X=5,5978$; $\Delta \bar{X} = 2,5034$ $\varepsilon = 9,619\%$; $\bar{\varepsilon} = 4,301\%$	34,03	68,06	f=4; T (95%, 4)=2,78; $\bar{X} = 68,39$; $S^2=4,9366$; $S=2,2218$; $S_x=0,9936$; $\Delta X=6,1767$; $\Delta \bar{X} = 2,7623$ $\varepsilon = 9,0309\%$; $\bar{\varepsilon} = 4,0387\%$
28,45	56,90		34,45	68,90	
29,93	59,86		34,93	69,86	
30,38	60,76		32,38	64,76	
28,70	57,40		35,20	70,40	
МОЧА					
40,55	81,10	f=4; T (95%, 4)=2,78; $\bar{X} = 82,05$; $S^2=5,0521$; $S=2,2476$; $S_x=1,0051$; $\Delta X=6,2485$; $\Delta \bar{X} = 2,7944$ $\varepsilon = 7,615\%$; $\bar{\varepsilon} = 3,405\%$	39,05	78,10	f=4; T (95%, 4)=2,78; $\bar{X} = 77,85$; $S^2=1,4681$; $S=1,2116$; $S_x=0,5418$; $\Delta X=3,3684$; $\Delta \bar{X} = 1,5064$ $\varepsilon = 4,326\%$; $\bar{\varepsilon} = 1,934\%$
41,98	83,96		37,98	75,96	
42,41	84,82		39,41	78,82	
40,46	80,92		39,46	78,92	
39,73	79,46		38,73	77,46	

При анализе алкалоидов, выделенных из белены черной и белладонны обыкновенной, наблюдалось образование линейных пиков, характерных для атропина $\sim 200 \pm 15^\circ\text{C}$ и сангвинарина $\sim 125 \pm 10^\circ\text{C}$; $\sim 250 \pm 10^\circ\text{C}$ (рис. 16).

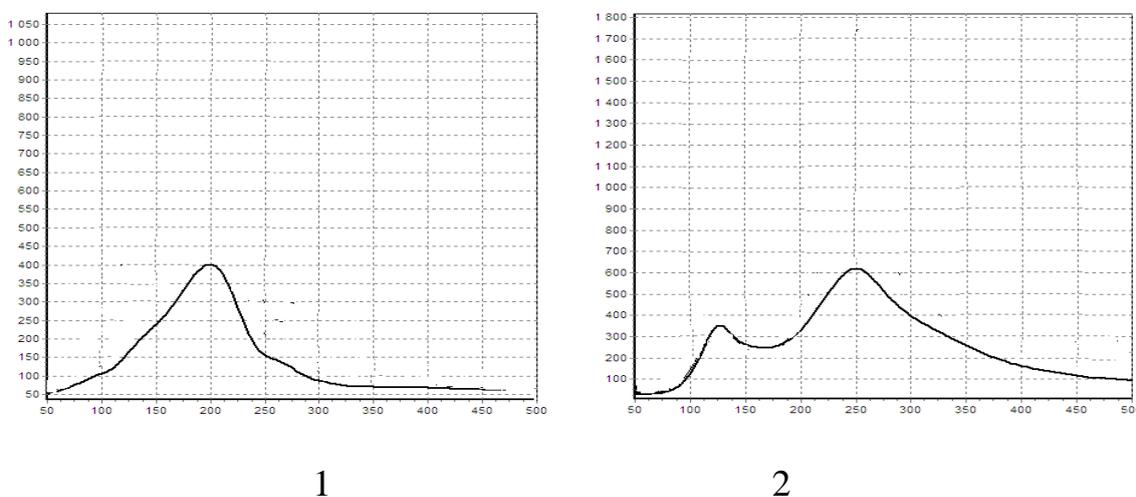


Рис.16. ТДПИ спектры атропина (1) и скополамина (2)

Указанные выше условия анализа были использованы при определении алкалоидов, выделенных из биожидкостей. Результаты показали, что содержание атропина в крови составило 59,99%, скополамина - 50,34%, атропина в моче - - 81,45%, скополамина – 69,43% (табл.5).

Таблица 5

Результаты количественного анализа атропина и скополамина, выделенных из биожидкостей

Количество атропина		Метрологическая характеристика полученных результатов	Количество скополамина		Метрологическая характеристика полученных результатов
нг	%		нг	%	
КРОВЬ					
29,03	58,06	$f=4; T(95\%, 4)=2,78;$ $\bar{X}=59,99; S^2=3,1926;$ $S=1,7868; S_x=0,7990;$ $\Delta X=4,9673; \Delta \bar{X}=2,2214$ $\varepsilon=8,28\%; \bar{\varepsilon}=3,70\%$	25,12	50,24	$f=4; T(95\%, 4)=2,78;$ $\bar{X}=50,34; S^2=2,5076;$ $S=1,5835; S_x=0,7081;$ $\Delta X=4,4023; \Delta \bar{X}=1,9687$ $\varepsilon=8,74\%; \bar{\varepsilon}=3,91\%$
29,45	58,90		24,41	48,82	
29,93	59,86		24,39	48,78	
31,38	62,76		25,83	51,66	
30,20	60,40		26,11	52,22	
МОЧА					
40,05	80,10	$f=4; T(95\%, 4)=2,78;$ $\bar{X}=81,45; S^2=4,4001;$ $S=2,0976; S_x=0,9380;$ $\Delta X=5,8314; \Delta \bar{X}=2,6079$ $\varepsilon=7,15\%; \bar{\varepsilon}=3,20\%$	35,19	70,38	$f=4; T(95\%, 4)=2,78;$ $\bar{X}=69,43; S^2=2,1824;$ $S=1,4773; S_x=0,6606;$ $\Delta X=4,1069; \Delta \bar{X}=1,8366$ $\varepsilon=5,91\%; \bar{\varepsilon}=2,64\%$
40,48	80,96		35,48	70,96	
42,41	84,82		33,64	67,28	
40,96	81,92		34,96	69,92	
35,23	79,46		34,32	68,64	

ВЫВОДЫ

1. На основании изученных зарубежных и отечественных нормативных документов по судебно-химическому и химико-токсикологическому анализу случаев отравлений алкалоидсодержащими растениями Узбекистана предложен научно-практический подход к систематизации имеющихся данных.

2. Рекомендованы для практики разработанные оптимальные методы и удобные методики изолирования алкалоидов из болиголова пятнистого, самшита вечнозеленого, триходесмы седой, чистотела большой, белены черной и красавки обыкновенной. Предложенные методики дают возможность извлечь из биологических объектов более очищенных вытяжек. Решены практические аспекты определения алкалоидов, изолированных из биологических жидкостей (кровь, моча, промывные воды желудка), а также биологических объектов (внутренние органы трупа).

3. По проведённому микроскопическому анализу болиголова пятнистого, самшита вечнозеленого и триходесмы седой были выявлены специфические аспекты для каждого из растений. С целью своевременного и точного установления диагноза рекомендовано исследовать промывные воды желудка на наличие частиц по разработанной методике.

4. Предложена разработанная оптимальная методика ТСХ-скрининга и методика элюации алкалоидов болиголова пятнистого, самшита вечнозеленого, триходесмы седой, чистотела большой, белены черной и

красавки обыкновенной, для очистки полученных экстрактов и вытяжек из объектов, растений от балластных веществ. Определена возможность использования алкалоидов, очищенных предложенной методикой, в качестве рабочего стандарта в последующих анализах.

5. Рекомендованы оптимальные методики анализа алкалоидов методами ВЭЖХ и ТДПИС, выделенных из болиголова пятнистого, самшита вечнозеленого, триходесмы седой, чистотела большой, белены черной и красавки обыкновенной, и очищенных методом ТСХ-скрининга. Разработанные методики анализа внедрены для обнаружения алкалоидов в биологических жидкостях и объектах.

6. На основании полученных результатов разработаны и внедрены в практику судебно-химических отделов Республиканского научно-практического центра судебной медицинской экспертизы Министерства Здравоохранения Республики Узбекистан и его областных филиалов методические рекомендации, «Изолирование и обнаружение алкалоидов чистотела из биологических объектов и биологических жидкостей», «Изолирование и обнаружение алкалоидов болиголова пятнистого из биологических объектов и биологических жидкостей», «Изолирование и обнаружение алкалоидов триходесмы седой из биологических объектов и биологических жидкостей» «Изолирование и обнаружение алкалоидов самшита вечнозеленого из биологических объектов и биологических жидкостей». Полученные результаты включены в учебное пособие «Судебная токсикология» и внедрены в учебный процесс Ташкентского фармацевтического института.

**SCIENTIFIC COUNCIL ON AWARD OF SCIENTIFIC DEGREE OF
DOCTOR OF SCIENCE DSC.04/30.12.2019.FAR.32.01 AT THE
TASHKENT PHARMACEUTICAL INSTITUTE**

TASHKENT PHARMACEUTICAL INSTITUTE

ZULFIKARIEVA DILNOZA ALISHEROVNA

**CHEMICAL AND TOXICOLOGICAL RESEARCHES OF POISONINGS
WITH PLANTS OF THE CONTAINING ALKALOID**

15.00.02-Pharmaceutical chemistry and pharmacognosy

**ABSTRACT OF DISSERTATION DOCTOR OF
PHARMACEUTICAL SCIENCES (DSc)**

Tashkent-2020

The subject of doctor of pharmaceutical sciences (DSc) dissertation is registered at the Supreme Attestation Commission at the Cabinet of Ministers of the Republic of Uzbekistan under number B2017.3. DSc /Far 13.

Doctor of Science (DSc) dissertation has been carried out at the Tashkent pharmaceutical institute. Abstract of dissertation in three languages (Uzbek, Russian, English) is placed on web page of Scientific council(www.pharmi.uz) and on Information-educational portal "ZiyoNet" (www.ziynet.uz)

Scientific consultant: **Yuldashev Zakirdjan Abidovich**
Doctor of pharmaceutical Sciences, professor

Official opponents: **Urmanova Flyura Faridovna**
Doctor of Pharmaceutical Sciences, professor

Tolaganov Abdukadir Abduraxmanovich
Doctor of pharmaceutical Sciences, professor

Yunuskhodjaeva Nodira Abdulxamitovna
Doctor of chemical Sciences, dotsent

Leading organization: **Tashkent Pediatric Medical Institute**

Defense will take place on "4" 12 2020 at 11⁰⁰ at the meeting of the Scientific Council DSc.04/30.12.2019.Far.32.01 at the Tashkent pharmaceutical institute (Address:100015, Tashkent, Mirabad district, Aybek str 45, phone +99871 256-37-38, fax +99871 256-45-04, e-mail:pharmi@pharmi.uz).

The dissertation has been registered at the Information Resource Centre of Tashkent pharmaceutical institute (№ 9). Address:100015, Tashkent, Mirabad district, Aibek str., 45. Phone: (99871) 256-37-38.

Abstract of dissertation sent out on "18" 11 2020.
(mailing report № 9 on 18.11 2020)



K.S. Rizayev
Chairman of the scientific council on awarding of scientific degrees doctor of medical sciences

Yo.S.Karrieva
Scientific secretary of the scientific council on award of scientific degree of doctor of sciences, doctor of medical sciences, professor

F.F.Urmanova
Chairman of the scientific seminar under scientific council on award of scientific degrees of doctor of sciences, doctor of medical sciences, professor

INTRODUCTION (abstract of the thesis of the Doctor of Sciences (DSc))

The aim of the study is to development of theoretically based on forensic-chemical and chemical-toxicological methods of analysis in the case of the poisoning of plants which is growing in Uzbekistan.

The object of the study are *Conium maculatum*, *Buxus sempervirens*, *Trixodesma inkanum*, *Chelidonium majus*, *Hyosciamus niger*, *Atropa belladonna*, internal organs and biological fluids (liver, kidneys, stomach and intestines, blood, urine, gastric washings) of poisoned laboratory animals.

The scientific novelty of the study is as follows:

scientifically based methods of isolation alkaloids of *conium maculatum*, *buxus sempervirens*, *trixodesma inkanum*, *chelidonium majus* of a biological object has been developed;

identification methods and quantitative analysis of the main toxic plants substances of *conium maculatum*, *buxus sempervirens*, *trixodesma inkanum*, *chelidonium majus* from chemical and toxicological point of view by TLC, HPLC, GC-MS, UV-SF, TDPIS have been determined;

the possibility of using extracts of alkaloids isolated from plants and by the purified method TLC, as well as identified by the method of GC-MS, as a valid working standard has been proved;

all developed methods and analysis techniques are substantiated and recommended for the determination of alkaloids in chemical-toxicological objects;

methods of microscopic research of paternal residues in the gastrointestinal tract of experimental animals poisoned by plants have been developed;

methods of isolation and analysis of potent substances from biological objects for forensic chemical examination and chemical-toxicological investigation of cases of poisoning by these plants and products of their conversion have been created.

Implementation of research results. Based on the scientific results on the development chemical and toxicological study the poisoning of alcohol-containing plants have been developed and implemented in practice:

Methodological recommendation "Isolation and supply of alkaloids of purity from biological objects and biological fluids" (No. 8n-p/185 June 22, 2020,) (Ministry of Health No. 8n-z / 140 dated November 4, 2020) was approved. As a result, there were appeared the possibility of analyzing the poisoning people by a wartwort;

Methodological recommendation "Isolation and supply of alkaloids of the celandine from biological objects and biological fluids" (No. 8n-p/ 166 June 18. 2020) (Ministry of Health No. 8n-z/140 dated November 4, 2020) was approved. This gave the opportunity to analyze the celandine from the point of view of chemical-toxicological research;

Methodological recommendation "Isolation and supply of alkaloids of *trichodesm gray-haired* from biological objects and biological fluids" (No. 8n-p/ 166 June 18. 2020) (Ministry of Health No. 8n-z / 140 dated November 4, 2020)

was approved. As a result, the possibility of isolating and analyzing alkaloids during the poisoning of gray-haired trichodesma was created;

Methodological recommendation "Isolation and supply of alkaloids from the boxwood of the evergreen from biological objects and biological fluids" (No.8n-p/166 June 18. 2020) (Ministry of Health No. 8n-z / 140 dated November 4, 2020) was approved. As a result, the possibility of isolation and analysis of boxwood alkaloids from biological objects and liquids was created;

Based on the results of the determination of alkaloids in various objects in cases of plant poisoning, a textbook on "Forensic toxicology" for bachelors of the educational direction "5510500 - Pharmacy (by type)" (certificate No. 359-483) was edited. As a result, it became possible to enrich and strengthen the knowledge of bachelors in the field of forensic chemical expertise.

The structure and volume of dissertation. The structure of the dissertation consists of an introduction, five chapters, conclusions, a list of literatures and applications. The volume of the dissertation is 171 pages.

ЭЪЛОН ҚИЛИНГАН ИШЛАР РЎЙХАТИ
СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ
LIST OF PUBLISHED WORKS

I бўлим (I часть; I part)

1. Зулфикариева Д.А., Юлдашев З.А. Ўсимликлар билан захарланиш ҳолатлари ва уларни тадқиқ қилиш муаммолари ҳақида // Ўзбекистон Фармацевтик хабарномаси. -Тошкент. -2011.-№4. -Б.18-21. (15.00.02., №4).
2. Зулфиқориева Д.А., Пўлатова Т.П. Conium maculatum L. ўсимлигини анатомик тузилишини ўрганиш // Фармацевтика журнали.-Тошкент. -2011.-№4. -Б.38-41. (15.00.00., №2).
3. Зулфикариева Д.А., Юлдашев З.А. Алкалоиды в химико-токсикологическом отношении (обзор) // Фармацевтический журнал.-Ташкент. -2012. -№4.-С.39-44 (15.00.00., №4).
4. Зулфиқориева Д.А., Юлдашев З.А. Сассиқ алаф ва катта қончўп ўсимликларининг алкалоидларини ГХ-МС усулида таҳлил қилиш // Фармацевтика журнали. –Тошкент. -2013. -№2. -Б.38-41.(15.00.00., №2).
5. Зулфиқориева Д.А., Юлдашев З.А. Оддий белладонна ва қора мингдевона ўсимликлари алкалоидларини ЮССХ усулида таҳлил услубларини ўрганиш // Фармацевтика журнали. –Тошкент. -2014. -№4. -Б.62-66. (15.00.00., 30.12.2013й., 201/3; №5).
6. Зулфикариева Д.А., Юлдашев З.А. Применение метода термодесорбционной поверхностно-ионизационной спектроскопии в анализе биологически активных веществ белладонны // Ўзбекистон Фармацевтик хабарномаси. –Ташкент. -2014. -№4. -Б.52-56. (15.00.00., 30.12.2013й., 201/3; №6)
7. Зулфикариева Д.А., Юлдашев З.А. Применение метода термодесорбционной поверхностно-ионизационной спектроскопии в анализе алкалоидов чистотела // Фармацевтический журнал. –Ташкент. -2016. -№1. -Б.46-50.(15.00.00., №2).
8. Зулфикариева Д.А., Юлдашев З.А. Применение метода ВЭЖХ в анализе кониина - алкалоида болиголова пятнистого // Фармацевтический журнал. –Ташкент. -2016. -№3.-Б.59-62.(15.00.00., №2).
9. Zulfikarieva D.A., Yuldashev Z.A. Application of the method of thermal-security surface-ionization spectroscopy in analysis of alkaloids of conium maculatum // World journal of pharmacy and pharmaceutical sciences. -2019. -Vol.8, Issue 6.-pp.48-53 (SJIF Impact Factor 7.421).
10. Zulfikarieva D.A., Yuldashev Z.A. Development ways of detecting boxwood evergreens alkaloids by gc-ms method // Global Journal of Medical, Physical and Health Education. -USA. -2019. -Vol. 7 (3). -pp. 280-283 (GIF Impact Factor 0.676).

11. Зулфикариева Д.А., Юлдашев З.А. Химико-токсикологический анализ при отравлении самшитом вечнозеленым // Инфекция, иммунитет и фармакология. -Ташкент. -2020г. -№2. -С.37-41.(15.00.00., №6)

II бўлим (II часть; Part)

12. Зулфикариева Д.А., Юлдашев З.А. Ўсимликлар билан захарланиш ҳолатлари ҳақида // Фармацияда таълим, фан ва ишлаб чиқаришнинг долзарб муаммолари. Илмий-амал. конф. материал. –Тошкент. -2011. - Б.237.
13. Зулфикариева Д.А., Юлдашев З.А., Пулатова Т.П. Ибн Сино мероси асосида доривор ўсимликлардан дори воситаларини яратиш масалаларига доир // Буюк аллома Ибн Сино таълимоти ва замонавий тиббиёт. Илмий-амал. конф. материал. –Бухоро. -2011. Ноябрь. -Б.121.
14. Зулфикариева Д.А., Юлдашев З.А. Разработка методов диагностики случаев отравления чистотелом большим // “Состояние и пути совершенствования судебно-медицинской службы Узбекистана” Материалы международной научно-практической конференции. Центр судебной экспертизы им. Х. Сулаймановой. –Ташкент. -2012. 11-12 декабря. -С.131-134.
15. Зулфикариева Д.А. Разработка методики ТСХ-скрининга алкалоидов *Hyoscyamus niger* L. // “Состояние и пути совершенствования судебно-медицинской службы Узбекистана” Материалы международной научно-практической конференции. Центр судебной экспертизы им. Х. Сулаймановой. –Ташкент. -2012. 11-12 декабрь. -С.128-131.
16. Зулфикариева Д.А., Юлдашев З.А. Катта қончўп ўсимлиги таркибининг микрокристаллоскопик таҳлили // Фармацияда таълим, фан ва ишлаб чиқаришнинг долзарб муаммолари. Илмий-амал. конф. материал. – Тошкент. -2013. -Б.39.
17. Zulfikarieva D.A., Yuldashev Z.A., Ibragimova M.M. Detection of alkaloids *conium maculatum* l. by gas chromatography-mass spektrometry // 51st Conference of the International Association of Forensic Toxicologists.-Portugal. -2013. 2-6 September. -P.126.
18. Зулфикариева Д.А., Юлдашев З.А. Разработка методики ТСХ-скрининга алкалоидов *Chelidonium majus* // “Современное состояние судебно-экспертной деятельности в Узбекистане и перспективы её развития” Материалы международной научно-практической конференции. Центр судебной экспертизы им. Х. Сулаймановой. –Ташкент. -2013.19-20 ноября. -С.121-123.
19. Зулфикариева Д.А., Юлдашев З.А. Разработка метода термодесорбционной поверхностно ионизационной спектроскопии в анализе биологически активных веществ белены // Материалы научно-практической конференции: интеграция образования, науки и производства в Фармации. –Ташкент. -2014г. -С.20-21.

20. Zulfikarieva D.A., Yuldashev Z.A., Ibragimova M.M. Analysis of *belladonna* alkaloids by thermal desorption surface-ionization spectroscopy method // 52st Conference of the International Association of Forensic Toxicologists. - Argentina. -2014. 9-13 November. -P. 180.
21. Zulfikarieva D.A., Yuldashev Z.A., Ibragimova M.M. Isolation of *hyosciamus* alkaloids from biological liquids and their detection // 52st Conference of the International Association of Forensic Toxicologists. -Argentina. -2014. 9-13 November. -P. 180.
22. Зулфикариева Д.А., Юлдашев З.А. Изолирование и обнаружение алкалоидов чистотела в биожидкостях // Первая Региональная конференция Международной Ассоциации Судебных Токсикологов (The International Association of Forensic Toxicologists) для стран СНГ и Центральной Азии: «Проблемы судебной и клинической токсикологии». -Ташкент. -2015. 14-16 мая. -С.91-92.
23. Zulfikarieva D.A., Yuldashev Z.A., Ibragimova M.M. Analysis of alkaloids of *chelidonium majus* by thermal desorption surface-ionization spectroscopy method // 53st Conference of the International Association of Forensic Toxicologists. -Florence. -2015. 30 August-4 September. -P. 140.
24. Зулфиқориева Д.А., Юлдашев З.А. Оддий Белладонна ўсимлиги алкалоидларини ГСХ усулида таҳлил қилиш шароитларини ишлаб чиқиш // “Фармацияда таълим, фан ва ишлаб чиқариш интеграцияси”. Илмий-амалий анжуман материаллари. –Тошкент. -2015. -Б. 20-21.
25. Zulfikarieva D.A., Yuldashev Z.A., Ibragimova M.M. Analysis of *Conium maculatum* alkaloids by the method of thermo desorption surface- ionization spectroscopy // 54st Conference of the International Association of Forensic Toxicologists. -Australia. -Brisbane. -2016. 28 August - 2 September. –P. 146.
26. Зулфикариева Д.А., Юлдашев З.А. Обнаружение алкалоидов болиголовы методом ТДПИС // “Материалы научно-практической конференции: интеграция образования, науки и производства в Фармации. –Ташкент. - 2016. -С.26.
27. Зулфиқориева Д.А., Юлдашев З.А. Биосуюқликлар таркибидан буксин алкалоидини ЮҚХ усулида аниқлаш // “Фармация: фан, таълим, инновация ва ишлаб чиқариш”. Республика илмий-амалий анжуман (Халқаро иштирокида) материаллари. –Тошкент. -2017. -Б.480-481.
28. Зулфикариева Д.А., Юлдашев З.А. Анализ алкалоидов триходесмы седой методом ТСХ // “Фармация: наука, образование, инновация и производство”. Материалы Республиканской научно-практической конференции (с международным участием). -Ташкент. -2017. -С.482-483.
29. Зулфикариева Д.А. Анализ алкалоидов триходесмы седой хроматоспектрофотометрическим методом // “Пути совершенствования судебной экспертизы. Зарубежный опыт” Материалы научно-практической конференции. –Ташкент. 15-16 ноября. -2017. –С. 81.
30. Зулфикариева Д.А., Юлдашев З.А. Анализ алкалоидов самшита вечнозеленого хроматоспектрофотометрическим методом // “Вклад

- Абу Али Ибн Сино в развитие фармации и актуальные проблемы современной фармацевтики. Сборник материалов научно-практической конференции. –Ташкент. -2018. -Б. 172-173.
31. Zulfikarieva D.A., Yuldashev Z.A., Alakbarova N. Observation of Alkaloids condition in *Buxus Sempervirens* by the method of TLC // 55st Conference of the International Association of Forensic Toxicologists. -USA. –Boca Rotan. - 2018. 28 January. –P. 109.
 32. Зулфикариева Д.А., Юлдашев З.А. Обнаружение алкалоидов триходесмы седой методом ГХ-МС // Ліки – Людині, с учасні проблеми Фармакотерапії і призначення лікарських засобів. Матеріали III Міжнародної науково-практичної конференції. -Том 2 14-15 березня - 2019 року м.-Харків. –С.102.
 33. Зулфикариева Д.А., Юсупова Н.О. Исследование алкалоидов самшита вечнозеленого // Ліки – Людині, с учасні проблеми Фармакотерапії і призначення лікарських засобів. Матеріали III Міжнародної науково-практичної конференції. -Том 2 14-15 березня -2019 року м. -Харків. - С.104.
 34. Зулфикариева Д.А., Юлдашев З.А. Разработка методов диагностики случаев отравления беленой и дурманом // Современное состояние фармацевтической отрасли: проблемы и перспективы. Республиканская научно-практическая конференция с международным участием. – Ташкент. -2019. 15-16 ноябрь. -С.481-482.
 35. Зулфикариева Д.А., Юлдашев З.А. Разработка методов диагностики при отравлении триходесмой седой. // Международная научно-практическая конференция «Лекарства – человеку. Современные проблемы фармакотерапии и назначения лекарственных средств». –Харковь. 12-13 март -2020. -С. 252-253.
 36. Зулфикариева Д.А., Юлдашев З.А. Гиёҳванд, психотроп ва дори моддаларни ЮССХ ускунасида аниқлаш. // Суд-кимё амалиётининг долзарб муаммолари ва уларни бартараф этиш йўллари. Илмий-амалий семинар материаллари тўплами. –Тошкент. -2020. 7 июль. -Б. 19-26.

Автореферат «Фармацевтика журнали» тахририятида тахрирдан ўтказилиб,
ўзбек, рус ва инглиз тилларидаги матнлар ўзаро мувофиқлаштирилди.

Бичими: 84x60 ¹/₁₆. «Times New Roman» гарнитураси.
Рақамли босма усулда босилди.
Шартли босма табағи: 3. Адади 100. Буюртма № 230.

Гувоҳнома № 10-3719

“Тошкент кимё технология институти” босмаҳонасида чоп этилган.
Босмаҳона манзили: 100011, Тошкент ш., Навоий кўчаси, 32-уй.