

Иммунный анализ алкалоидов

С.К.Волков

Научно-производственное объединение

«Всероссийский институт лекарственных и ароматических растений»

113628 Москва, ул. Грина, 7

В обзоре обобщены литературные данные по разработке и применению иммунохимических методов анализа алкалоидов – одного из наиболее широко используемых в медицинской практике классов физиологически активных соединений растительной природы.

Библиография – 141 ссылка.

Оглавление

I. Введение	831
II. Иммунные методы анализа низкомолекулярных соединений	832
III. Иммунные методы анализа алкалоидов	834
IV. Заключение	840

I. Введение

Алкалоиды – азотсодержащие органические основания, встречающиеся в растениях и, как правило, обладающие физиологической активностью. Аналогичные соединения обнаружены и в некоторых животных организмах, в высших и низших грибах, водорослях. В настоящее время описано свыше пяти тысяч различных алкалоидов, для многих из них полностью установлено химическое строение.

Одной из важнейших областей современной науки о лекарственных растениях является анализ содержания биологически активных веществ в тканях растений. От содержания физиологически активных веществ в растительном сырье зависят не только экономические показатели производства ряда лекарственных препаратов, но и их качество.

Другой важной областью применения аналитических методов является исследование биосинтеза алкалоидов в тканях растений.

Кроме того, аналитические методы широко применяются при исследованиях метаболизма и фармакокинетики алкалоидов, использующихся в медицинской практике.

Ряд алкалоидов обладает наркотическими свойствами, поэтому быстрое и достоверное обнаружение этих соединений в организме человека очень важно с медицинской точки зрения. Анализ наркотических веществ важен и с криминалистической точки зрения.

В последние годы активно развиваются методы получения биологически активных соединений в культурах клеток и тканей растений, что теоретически может позволить отказаться от трудоемких операций сбора растительного материала, особенно дикорастущих видов, и от эксплуатации значительных площадей плодородных земель при культиви-

ровании растений. Успешная разработка биотехнологических методов также связана с анализом содержания целевых веществ.

Необходимость проведения большого количества анализов, особенно при селекционных работах, ставит задачу автоматизации аналитических методов.

Методы количественного анализа содержащихся в растениях веществ можно разделить на три группы: фотометрические, хроматографические и белок-связывающие.

Наибольшее распространение при анализе биологически активных веществ растительного происхождения получили фотометрические методы анализа. Эти методы относительно малочувствительны и неспецифичны, однако благодаря своей простоте они используются и до сих пор.

Хроматографические методы (тонкослойная хроматография – ТСХ, газожидкостная хроматография – ГЖХ, хроматомасс-спектрометрия ГЖХ-МС и высокоэффективная жидкостная хроматография – ВЭЖХ) позволяют достаточно быстро и точно определить несколько анализируемых веществ в одной пробе. Однако эти методы довольно трудоемки. Наиболее точным и достоверным из них является ГЖХ-МС, но применение этого метода ограничивается высокой стоимостью и сложностью проведения анализа, что требует специально подготовленного обслуживающего персонала.

Белок-связывающие методы включают рецепторный и иммунные методы. Рецепторный метод анализа основан на конкурентном ингибировании анализируемым соединением связывания радиоактивно-меченного лиганда специфическими к нему мембранными рецепторами.^{1–3} Этот метод практически не применяется при анализе содержащихся в растениях веществ. Причиной малой распространенности этого метода являются трудности идентификации и выделения специфических рецепторов.

Иммунные методы анализа основаны на специфическом взаимодействии молекул анализируемого вещества с антителами, вырабатываемыми организмом животного в ответ на попадание в него чужеродных веществ.

Белок-связывающие и, в частности, иммунные методы имеют ряд преимуществ перед фотометрическими и хрома-

С.К.Волков. Кандидат химических наук, научный сотрудник Отдела стандартизации НПО ВИЛАР. Телефон (095)388–4522
Область научных интересов: методы выделения и анализа алкалоидов, хроматография (особенно – ВЭЖХ), иммунные методы.

тографическими методами анализа: они не требуют большой работы по подготовке анализируемого образца, обладают высокой чувствительностью, не требуют сложного и дорогостоящего оборудования, позволяют одновременно анализировать большое количество образцов.

Основной недостаток иммунных методов анализа низкомолекулярных соединений состоит в необходимости большой предварительной работы, связанной с синтезом и очисткой антигена, иммунизацией и содержанием животных, выделением, очисткой и характеристикой антител. Другим существенным недостатком иммунных методов анализа является возможность перекрестного взаимодействия антител с рядом соединений, имеющих сходную с антигеном структуру.

II. Иммунные методы анализа низкомолекулярных соединений

Иммунным методам анализа посвящено большое число обзоров и монографий, в которых детально рассмотрены различные способы постановки и проведения анализов.^{4–14}

В настоящее время существует довольно много вариантов проведения иммунного анализа. Наиболее часто используемыми при анализе низкомолекулярных соединений гетерогенными методами иммуноанализа являются следующие: радиоиммунный, прямой конкурентный иммуноферментный и непрямой иммуноферментный с использованием вторичных антител.

В радиоиммунном анализе (Radioimmunoassay – RIA) стандартное количество радиоактивно-меченного гаптена смешивают с анализируемым образцом. Радиоактивный гаптен и молекулы образца конкурентно взаимодействуют с антителами, при этом степень связывания радиоактивного гаптена с антителами обратно пропорциональна количеству анализируемых молекул в образце. После установления равновесия связавшиеся с антителами молекулы гаптена отделяют от оставшихся свободными либо быстрой адсорбцией гаптенных, либо осаждением белков, после чего измеряют радиоактивность той или иной фазы.

В прямом конкурентном иммуноферментном анализе (Enzyme Immunoassay – EIA) используется не радиоактивная, а ферментная метка. Антитела, присутствующие в ограниченном количестве, связаны с твердой фазой. Обычно это полистирольная пробирка или стенки планшета (плашки) для микротитрования. Конкуренция между анализируемым веществом в образце и связанным с ферментом гаптенем приводит к иммобилизации некоторой части фермента на твердой фазе. Несвязавшийся фермент удаляют, а количество связавшегося фермента определяют после добавления субстрата по интенсивности окраски раствора, обусловливаемой продуктом разложения субстрата.

При анализе непрямим иммуноферментным методом с использованием вторичных антител (Enzyme-linked immunosorbent assay – ELISA) гаптен, конъюгированный с белком, сорбируют на твердой фазе, обычно – на стенках плашки для микротитрования. На этой стадии используется не тот конъюгат, которым иммунизировали животное, а другой – с белком, неродственным белку иммуногенного конъюгата. Затем добавляют анализируемый образец, содержащий свободный гаптен и антисыворотку. Антитела распределяются между свободным гаптенем образца и иммобилизованным гаптен-белковым конъюгатом. Жидкость сливают и добавляют избыток конъюгированных с ферментом вторичных антител, специфичных к иммуноглобулинам G (Ig G) иммунизированного животного. Вторичные антитела связываются с первичными и задерживаются на твердой фазе. Жидкую фазу вновь сливают и количество вторичных антител определяют после добавления субстрата к конъюгированному ферменту и образования окрашенного продукта.

Наиболее часто используемыми гомогенными методами иммуноанализа являются методы, основанные на измерении степени поляризации флуоресценции и изменении активности фермента.

При иммуноанализе, основанном на измерении степени поляризации флуоресценции (Fluorescence-polarization immunoassay – FPIA), используют гаптен, конъюгированный с флуоресцентной или иной молекулой, флуоресцирующей при облучении потоком поляризованного света. В свободном состоянии гаптен-флуоресцентный конъюгат в растворе подвижен, и степень поляризации проходящего сквозь раствор света мала. В связанном с антителами виде подвижность гаптен-флуоресцентного конъюгата ограничена, что вызывает повышение степени поляризации света. Количество гаптена в образце определяется по степени замещения им гаптенфлуоресцентного конъюгата во взаимодействии с антителами, что приводит к снижению степени поляризации света.

При иммуноанализе, основанном на изменении активности фермента (Enzyme-multiplied immunoassay – EMIA), используют гаптен, который конъюгирован с ферментом так, что связывание гаптена с антителом приводит к снижению активности фермента из-за блокирования его активного центра. Таким образом, степень восстановления ферментативной активности анализируемого образца в присутствии свободного гаптена позволяет определить его количество.

Каждый из этих методов имеет свои преимущества и недостатки. Радиоиммунный метод требует синтеза радиоактивно-меченного гаптена. Необходимо также довольно дорогое оборудование – центрифуга, позволяющая одновременно центрифугировать до 100–200 образцов, и жидкостно-сцинтилляционный (в случае изотопа ^3H) или γ -эмиссионный (в случае изотопа ^{125}I) счетчик. Преимущество изотопа ^3H состоит в том, что сохраняется нативная структура молекулы.

Флуоресцентные и хемилюминесцентные метки, позволяющие избежать применения радиоактивных изотопов, значительно изменяют нативную структуру гаптена. Эти методы также требуют дорогостоящего оборудования.

Использование ферментных меток и неподвижной фазы в прямом конкурентном иммуноферментном методе упрощает анализ, так как разделение фаз происходит очень просто, а для количественного определения нужен лишь колориметр. Однако этот метод требует синтеза гаптен-ферментного конъюгата с подбором необходимого соотношения гаптен/фермент. Кроме того, из-за неполной адсорбции фермента не рационально расходуются антисыворотка – наиболее важный компонент метода. Другой недостаток этого метода состоит в том, что фермент и анализируемый образец, часто содержащий множество компонентов, инкубируются вместе, что может привести к инаktivации фермента. Гомогенные методы к тому же и менее чувствительны.

Многих из перечисленных недостатков лишен непрямой иммуноферментный анализ с использованием вторичных антител. В этом методе антисыворотка расходуетсся достаточно экономно, так как используются сильно разбавленные растворы. Высокая аффинность и специфичность антител позволяют добиться высокой чувствительности и специфичности анализа. Хотя в этом методе имеется дополнительная стадия инкубации со вторичными антителами, использование вторичных антител позволяет повысить чувствительность анализа и расширить диапазон измеряемых концентраций. Конъюгаты ферментов со вторичными антителами к иммуноглобулинам из различных источников поступают в продажу и достаточно доступны. Этот метод является наиболее популярным и, пожалуй, лучшим из всех, существующих в настоящее время иммунных методов. Наивысшая чувствительность метода, достигнутая при анализе холерного токсина, составляет 10^{-16} г, т. е. для определения достаточно 600 молекул этого токсина.¹⁵

Основное преимущество гомогенных методов иммунного анализа состоит в том, что проведение анализа в одной фазе легко может быть автоматизировано и это делает их особенно привлекательными для рутинных анализов больших количеств образцов. Сложнее автоматизировать гетерогенные методы анализа, хотя и здесь применение лабораторных роботов позволяет достичь производительности до 1000 образцов в день.

Анализ опубликованных работ за период с 1959 по 1982 гг. выявил переход в 1979–1981 гг. от радиоиммунных методов к иммуноферментным, которые с 1985 г. практически преобладают.¹⁴

Проведение анализа химических соединений иммунными методами предполагает использование антител, специфически узнающих анализируемые соединения. Однако вещества с молекулярной массой менее 1000, в том числе и алкалоиды, при попадании в организм животного не вызывают иммунного ответа и образования антител. Для того, чтобы стимулировать иммунный ответ, такие вещества должны быть ковалентно соединены с крупными молекулами (обычно – с белком); полученные конъюгаты и используются для иммунизации животных. Выделяемая после иммунизации антисыворотка содержит смесь антител, часть которых может оказаться способной узнавать гаптен не только в связанном, но и в свободном состоянии.

Для синтеза иммуногенных конъюгатов предложен ряд методов, основанных на использовании различных функциональных групп гаптена. Специфичность получаемых при этом антител определяется наиболее удаленными от точки конъюгации участками молекулы.¹⁶ Внимательное изучение структуры и свойств молекулы гаптена и правильный выбор точки конъюгации в ряде случаев позволяет получить антисыворотку требуемой селективности.¹⁷ Многие природные соединения содержат несколько функциональных групп, что в ряде случаев дает возможность варьировать способ конъюгации. Если же подходящей группы нет, то можно использовать производные, содержащие функциональную группу в нужном месте молекулы.

Часто в образовании иммуногенного конъюгата участвуют карбоксильные или гидроксильные группы гаптена. При связывании белковой молекулы с гаптенем по карбоксильной группе, как правило, имеет место двухстадийный синтез. На первой стадии с помощью бифункционального реагента получают производное гаптена со свободной карбоксильной группой. Для этого используют методы смешанных ангидридов и карбодиимидный.

Широко известный в органической химии метод смешанных ангидридов¹⁸ применяли для получения конъюгатов аймалина еще в 1959 г.,¹⁹ а для получения конъюгатов серпентина,¹⁹ котинина,²⁰ винбластина, винкристина²¹ и колхицина²² использовали карбодиимидный метод,²³ который был предложен для синтеза иммуногенных конъюгатов в 1981 г.

При синтезе конъюгатов с участием гидроксильной группы гаптена используют бифункциональные реагенты, например янтарный ангидрид. Последний применялся для получения конъюгатов никотина,²⁰ виндолина,²⁴ хинина²⁵ и хинидина.²⁶ Для синтеза конъюгата виндолина использовали также глутаровый ангидрид.²⁷

Наличие в молекуле гаптена фенольного гидроксила позволяет использовать для присоединения такой молекулы к белку карбоксиметилирование; так были получены конъюгаты морфина.^{28–30}

Наличие аминогруппы в молекуле гаптена позволяет получать конъюгаты с помощью реакции Манниха или акриловой кислоты. Реакцию Манниха использовали для синтеза конъюгатов винбластина,^{31,32} а акриловую кислоту – для синтеза конъюгата *нор*-(–)-скополамина.³³

Описанные способы конъюгации предполагают встраивание между гаптенем и белковой молекулой довольно

короткой промежуточной цепи (спейсера). Однако в тех случаях, когда спейсер содержит цепь лишь из двух–трех углеродных атомов, не всегда удается получить антисыворотку, способную узнавать гаптен. В этих случаях полезно увеличить длину спейсера до 5–6 метиленовых звеньев. Увеличения длины спейсера добиваются, например, использованием 6-амино-*н*-гексановой кислоты, аминогруппа которой присоединяется к гаптену, а карбоксильная – к белку. Именно так был получен конъюгат хинидина.²⁶ Введение спейсера длиной в 4 или 5 углеродных атомов осуществляется при использовании янтарного или глутарового ангидрида. Более жесткий спейсер получают в случае применения *транс*-1,4-циклогександикарбоксидихлорида, а более длинный – с помощью 4-аминогиппуровой кислоты.³⁴

Природа спейсера оказывает существенное влияние на характеристики метода анализа. На примере поляризационного флуороиммуноанализа метамфетамина с использованием его конъюгата с флуоресцеином установлено, что наилучшие результаты получаются при использовании спейсера, полностью идентичного таковому в иммуногенном конъюгате, используемом для получения антител.³⁵

Большинство методов конъюгации основано на взаимодействии между активированными функциональными группами гаптена и аминогруппами белка. Поэтому одним из требований, предъявляемых к белку, является доступность ϵ -аминогрупп остатков лизина. Наиболее часто для конъюгации применяют такие белки, как альбумин из сыворотки крови крупного рогатого скота (Bovine Serum Albumine – BSA), альбумин из сыворотки крови человека (Human Serum Albumine – HSA) и гемоцианин виноградной улитки (Keyhole Limpet Hemocyanin – KLH). В некоторых случаях для конъюгации используют поли-*L*-лизин,^{20,29} однако, как выяснилось, он не имеет заметных преимуществ перед упомянутыми выше белками. Эмпирическим путем показано, что для получения антител к небольшим соединениям более предпочтительно конъюгировать гаптен с KLH, чем с альбумином.³⁶

В иммуноферментных методах, где имеет место конъюгация с двумя белками, важно, чтобы эти белки не были родственными, а иммунизируемое животное ранее с этими белками не встречалось.

Синтезированный конъюгат обычно очищают гелефильтрацией на колонке с сефадексом G-25 или диализом, что позволяет отделить непрореагировавшие низкомолекулярные компоненты.

В очищенном конъюгате определяют молярное соотношение компонентов конъюгата – гаптенную плотность. Опытным путем установлено, что следует избегать как очень высокой, так и очень низкой гаптенной плотности. Так, для BSA соотношение гаптен:белок должно лежать в пределах от 10:1 до 25:1, в этом случае обычно получается антисыворотка хорошего качества. Гаптенную плотность часто удается определить УФ- или флуоресцентной спектроскопией, однако в некоторых случаях может потребоваться химическое отщепление гаптена и определение его количества иными методами.³⁷

Работа с конъюгатами низкомолекулярных соединений растительного происхождения практически не отличается от обычных манипуляций с традиционными (белковыми) антигенами.

Так как низкомолекулярные органические вещества имеют небольшую и строго определенную антигенную детерминанту, то для них с успехом могут быть получены высокоспецифичные поликлональные антитела, которые с успехом используются для рутинных анализов низкомолекулярных соединений. Моноклональные антитела для гаптенных, как правило, не имеют особых преимуществ, а их получение требует значительно больших усилий и средств.

В настоящее время разработаны иммунохимические методы анализа ряда низкомолекулярных соединений (алка-

лоидов, терпенов, витаминов, стероидов, регуляторов роста и развития растений) и таких биологически активных соединений растительного происхождения, как фитогормоны, цитокинины, фитоалексины, ферменты.

Известно, что лечебные свойства лекарственных растений в значительной степени определяются именно низкомолекулярными соединениями. Ряд низкомолекулярных соединений растительного происхождения, для которых разработаны иммунные методы анализа, постоянно расширяется, и эти методы, став уже довольно обычными в клинической практике, находят все большее применение в растениеводстве и в производстве лекарственных препаратов растительной природы. Иммунохимические методы широко используются для отбора наиболее продуктивных видов растений. Внедрены в промышленное производство и выпускаются рядом фирм антисыворотки для некоторых выделенных из растений низкомолекулярных биологически активных и загрязняющих растительный материал веществ.^{36, 38}

Высокая специфичность антител позволяет определять иммунохимическими методами индивидуальные вещества в присутствии множества других соединений или их метаболитов, однако в ряде случаев бывает необходимо анализировать не одно какое-то соединение, а целый класс веществ. Для одновременного анализа нескольких соединений применяют метод с использованием смеси нескольких высокоспецифичных антител. Так, описан гомогенный поляризационный флуороиммуноанализ с использованием смеси антител для определения большинства обычно используемых классов наркотиков – амфетаминов, барбитуратов и каннабиноидов.³⁹

III. Иммунные методы анализа алкалоидов

1. Индольные алкалоиды *Catharanthus roseus*

Чрезвычайно высокое фармацевтическое значение алкалоидов *C. roseus*, а особенно – винбластин (1) и винкристин (2), вызывает постоянный интерес исследователей к этим алкалоидам. Большой спрос на алкалоиды *C. roseus*, а особенно на 1 и 2, стимулировал интенсивные исследования, направленные на увеличение производства данных алкалоидов. Два основных подхода к решению этой проблемы – селекция наиболее продуктивных растений и культивирование клеток *C. roseus* в ферментерах – потребовали разработки новых быстрых и точных методов анализа.

а. Винбластин и винкристин

Эти бисиндольные алкалоиды, являясь минорными компонентами суммарного алкалоидного экстракта *C. roseus*, считаются одними из наиболее важных биологически активных веществ растительного происхождения и широко применяются в медицинской практике как антинеопластические агенты. Ввиду их высокой активности и наличия таких побочных эффектов, как нейротоксичность и миелосупрессивность, клиническое использование этих алкалоидов тре-

бует тщательного контроля, для чего идеально подходят иммунные методы.

По месту конъюгации молекулы алкалоида иммунные методы анализа 1 и 2 можно разделить на несколько групп.⁴⁰

Хронологически первой и наиболее широко использовавшейся была конъюгация по атому С(3). В 1975 г. появилось краткое сообщение⁴¹ о разработке радиоиммунного метода анализа 1 и 2. Используя примененный в этой работе способ конъюгации 1 с белком компании «Eli Lilly and Company» (США) начала производство антисыворотки к антигену, полученному превращением 1 сначала в 3-гидразид, а затем в 3-карбоксамид 4-дезацетилвинбластин, который конъюгируется с белком.⁴²

Антитела к таким конъюгатам, даже моноклональные, как правило, обладают невысокой специфичностью: наблюдаются перекрестные реакции антител с производными 1, виндезином и его производными, 2 и его производными, лейрозином, лейрозидином. Поликлональные антитела участвуют также в перекрестных реакциях с мономерными алкалоидами виндолином и катарантоном.

Поликлональные антитела к конъюгатам 1 и 2 по атому С(3) использовались для разработки радиоиммунного⁴³ и иммуноферментного³² методов анализа этих соединений. В радиоиммунном методе с применением [³H]-1 и [³H]-2, анализируемый образец предварительно инкубируется с иммунной сывороткой, а затем к нему добавляют радиоактивно-меченное вещество. Это позволяет повысить чувствительность определения алкалоидов: диапазон определения 1 и 2 – 0.2–30 нг. В иммуноферментном методе анализ 1 и 2 проводится в планшетах для микротитрования, лунки которых покрыты антителами (разбавление 1:10000); диапазон определения 1 и 2 – 0.01–0.1 нг. Однако ни один из этих методов не позволяет провести различие между алкалоидами 1 и 2.

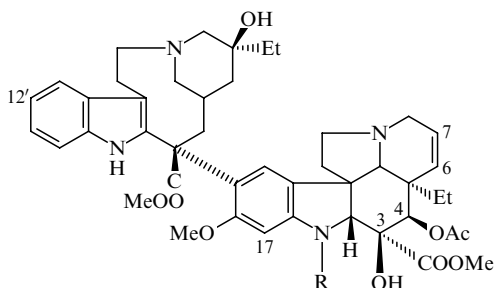
Радиоиммунный метод⁴⁴ определения 1, также основанный на использовании конъюгата по атому С(3), применявшийся при изучении фармакокинетики и метаболизма 1 в организме человека, позволяет определять 1 в диапазоне концентраций 0.2–100 мкг/л. Моноклональные антитела к конъюгатам 1 по атому С(3) были использованы при разработке твердофазного и жидкофазного радиоиммунных методов анализа⁴⁵ и иммуноферментного метода.⁴⁶ Последний позволяет определять 1 в диапазоне концентраций 1–100 мкг/л; предел определения 1 – 0.64 мкг/л. Однако в этом случае имеют место перекрестные реакции с виндезином (3%), винбластином (75%), лейрозином (152%) и рядом их производных.

Превращение 1 в активированный азид в положении 3 и конъюгация его с дипептидом Gly-Tyr позволили создать радиоиммунный метод анализа винкристина и виндезина с использованием [¹²⁵I]-меченного конъюгата.⁴⁷

В 1979 г. был разработан метод конъюгации,²¹ позволяющий определять оба алкалоида и уверенно отличать 1 от 2. Этот метод основан на окислении двойной связи между атомами С(6) и С(7) смесью перманганата калия и периодата натрия.⁴⁸ Такое окисление приводит к образованию дикарбоксипроизводного, которое дает конъюгат с белком.

Антитела, образующиеся в ответ на введение в организм такого конъюгата, более специфичны: антитела к конъюгату 1 взаимодействуют с 2 в 5 раз слабее, чем с 1, тогда как антитела к конъюгату 2 взаимодействуют с 1 в 200 раз слабее, чем с 2.

Оба алкалоида 1 и 2 порознь превращали в 6,7-дикарбоксипроизводные, которые в свою очередь присоединяли к HSA. Эти конъюгаты были использованы для разработки радиоиммунных методов с применением [³H]-1 и [³H]-2. «Связанную» и «свободную» фазы разделяли с помощью козых антител к иммуноглобулинам G кролика и измеряли радиоактивность «связанной» фазы. Одна из полученных антисывороток оказалась специфичной по отношению к 2, перекрестная реакция с 1 составляла лишь 0.05%; диапазон



R = Me (1), CHO (2)

определения **2** – 1–10 нг. Другая антисыворотка была умеренно селективна к **1**, перекрестная реакция с **2** составляла 25%; диапазон определения **1** – 1–15 нг, предел определения **1** – 0.4 пг/л.²¹ Эти антисыворотки могут использоваться для селекции растений по содержанию **1** и **2**.

Дальнейшего повышения чувствительности и селективности определения **1** и **2** удалось достичь, используя иммуноферментный метод анализа с применением **1**, присоединенным по атому C(17) к BSA реакцией Манниха.^{31, 32} Атом C(17) ароматического кольца, приближенный к углеродному атому, несущему метоксильную группу, оказывается активированным и способен взаимодействовать с формальдегидом.

Антитела к конъюгату по атому C(17) были использованы при разработке радиоиммунного метода анализа **1**. Метод позволяет определять **1** в плазме в диапазоне концентраций от 1 до 200–300 мкг/л.³¹ Позднее был разработан иммуноферментный метод определения **1** с помощью моноклональных антител. Этот метод позволил определять **1** в диапазоне концентраций 1–100 мкг/л; предел определения **1** – 0.54 мкг/мл.³²

Моноклональные антитела к конъюгату по атому C(17) обладают несколько более высокой специфичностью, чем антитела к конъюгату по атому C(3), но и для них отмечены значительные перекрестные реакции с производными **1**, виндезина, **2** и его производными, лейрозином и лейрозидином.³²

В последние годы появились работы^{49–51}, в которых был использован метод конъюгации **2** по атому C(12') ароматического кольца молекулы. Антитела к конъюгату по атому C(12') обладают высокой селективностью, практически не идут перекрестные реакции с **1**. Для этого к атому C(12') (соответствующему атому C(10) по биогенетической нумерации) молекулы **2** после нитрования присоединяли *п*-аминобензойную кислоту и присоединяли полученное производное к белку по аминогруппам карбодиимидным методом.⁴⁹

Такой способ конъюгации позволяет еще более уверенно различать **1** и **2**: антитела к конъюгату **2** взаимодействуют с **1** и виндолином в 1500 раз слабее, чем с **2**.^{50, 51}

Полученная к данному конъюгату антисыворотка была использована для разработки радиоиммунного метода анализа **2**.⁵¹ Диапазон определения **2** – 0.1–100 нг; перекрестные реакции с **1** – 0.03% и с виндолином – 0.09%. На основе этого же конъюгата разработан и иммуноферментный метод⁵⁰ определения **2**; диапазон определения – 5–500 пг.

В 1989 г. была опубликована работа,⁵² в которой присоединение **1** к белку проводилось с использованием глутарового альдегида.⁵³ Применение этого конъюгата приводит к образованию антисыворотки, узнающей в основном **1**, что позволило разработать радиоиммунный метод анализа **1** в диапазоне 0.5–10 нг/мл. Перекрестные реакции с **2** – 30%, с лейрозином – 0.23%, со всеми остальными алкалоидами *C. roseus* – менее 0.1%.

Этот конъюгат был использован при разработке радиоиммунного метода определения **1** в культурах тканей *C. roseus*.⁵²

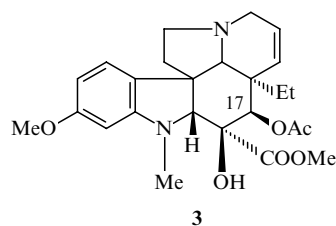
Следует отметить, что почти все иммунные методы анализа **1** и **2** разрабатывались и использовались для определения содержания этих алкалоидов в сыворотке крови пациентов, которым производились внутривенные инъекции препаратов **1** и **2**.^{31, 43, 45, 50} и для изучения фармакокинетики и метаболизма этих алкалоидов.^{32, 44, 54} Для определения содержания **1** и **2** в растениях иммунные методы пока не нашли широкого применения. Для количественного анализа этих алкалоидов в различных частях растения *C. roseus* были использованы только радиоиммунный²¹ и иммуноферментный⁵⁰ методы. При этом установлено, что максимальная концентрация алкалоидов обнаруживается в цветках, но из-за малой абсолютной массы цветков почти все количество алкалоидов содержится в листьях.²¹ Иммунофермент-

ным методом определяли содержание **2** в экстрактах листьев *C. roseus*.⁵⁰ Суммарное количество димерных индольных алкалоидов *C. roseus* определяли иммуноферментным методом.⁴⁶ Несколько более широко иммунные методы используются при количественном анализе **1** и **2** в культурах клеток *C. roseus*.^{52, 55–57}

Высокая стоимость и фармацевтическая значимость **1** и **2** способствовали интенсификации разработок иммунных методов анализа этих веществ. Это привело к появлению на мировом рынке первичных антисывороток к **1** и **2**, производимых такими фирмами, как «Bioanalysis» Ltd. и «Guildhay Antiser» (Великобритания), «Eli Lilly and Company».

б. Виндолин

Виндолин (**3**) – индольный алкалоид – является биогенетическим предшественником **1** и **2** и может быть использован для химического синтеза **1**.⁵⁸ При разработке иммунного метода анализа **3** 17-деацетилвиндолин сначала активировали янтарным ангидридом, а затем, образующийся гемисукцинат карбодиимидным методом присоединяли к BSA.²⁷ Полученная с помощью этого конъюгата антисыворотка использовалась в радиоиммунном анализе **3**; диапазон определения **3** – 0.2–45 нг. Конъюгат 17-деацетилвиндолин с BSA был также синтезирован с помощью янтарного ангидрида.²⁴ Этот конъюгат использовали при разработке радиоиммунного метода анализа **3**, однако он оказался менее чувствительным: диапазон определения **3** – 10–1000 нг.



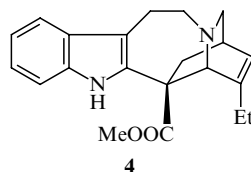
Использование антисыворотки к конъюгату **1** с BSA, полученному реакцией по атому C(12'), позволило разработать иммуноферментный и радиоиммунный методы анализа **3**.^{59, 60} Диапазон определения **3** иммуноферментным методом – 5–500 пг.

Эти методы были использованы для определения содержания **3** в различных частях растения *C. roseus*²⁷ и в культурах клеток *C. roseus*.^{27, 59, 61}

в. Катарантин

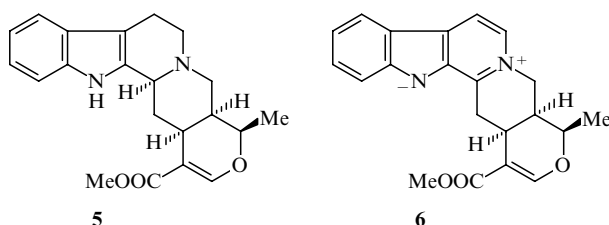
Как и **3**, катарантин (**4**) является биогенетическим предшественником **1** и **2**, представляя собой как бы «верхнюю» половину молекулы димерных алкалоидов, и, так же как и **3**, может быть использован для химического синтеза димерных алкалоидов. Разработан⁶¹ радиоиммунный метод анализа **4** в диапазоне 0.02–20 нг. Для получения антисыворотки, кроликов иммунизировали конъюгатом катарантиновой кислоты с HSA. В качестве радиоактивного лиганда использовали [³H]-**4**. Предел определения **4** радиоиммунным методом – 66 пг. Отмечены перекрестные реакции с катарантиновой кислотой, дигидро-**4** и карбокси-**4**.

Радиоиммунный метод был использован для определения **4** в *C. roseus*.⁶²



г. Аймалицин и серпентин

Аймалицин (**5**) является одним из основных алкалоидов, выделенных из растений видов *Catharanthus* и *Rauwolfia*. Он широко используется при лечении заболеваний системы кровообращения, в частности, при патологии сосудов головного мозга. Серпентин (**6**), родственный аймалицину алкалоид, как лекарственное средство не применяется, но может служить источником получения **5**.



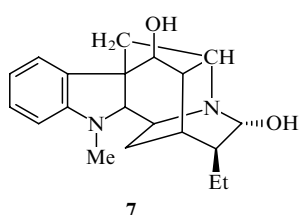
Для эффективного производства **5** важно проводить селекцию растений по максимальному соотношению содержания **5** к **6**, поэтому были получены антисыворотки к каждому из этих алкалоидов.¹⁹ Для этого щелочным гидролизом **5** получали аймалиновую кислоту, которую присоединяли к HSA модифицированным методом смешанных ангидридов. Полученный конъюгат использовали для создания антисыворотки; антисыворотка оказалась специфичной по отношению к **5** и нечувствительной к **6**. Радиоиммунный метод анализа, разработанный с использованием этой антисыворотки, позволяет определять **5** в диапазоне 2–50 нг.¹⁹

Серпентиновую кислоту, полученную щелочным гидролизом **6**, конъюгировали с HSA через N-гидроксисукцинимидный эфир модифицированным карбодиимидным методом. Антисыворотка к этому конъюгату оказалась специфичной по отношению к **6** и нечувствительной к **5**. Радиоиммунный метод анализа позволяет обнаруживать **6** в диапазоне 2–50 нг.¹⁹

Оба эти метода были использованы при изучении распределения **5** и **6** в тканях растений. Показано, что, в отличие от **3**, максимальная концентрация обоих алкалоидов наблюдается в корнях растения сразу под поверхностью почвы, причем концентрация **6** там приблизительно в пять раз выше концентрации **5**. Радиоиммунный анализ применяли в селекционной работе¹⁹, что позволило отобрать популяцию растений с повышенным общим содержанием алкалоидов и повышенным соотношением **5/6**, а также при определении содержания этих алкалоидов при суспензионном культивировании клеток *C. roseus*.⁶² Эти же методы использовались при изучении биосинтеза **5**.⁶³

д. Аймалин

Для получения антисыворотки, специфичной к алкалоиду аймалину (**7**), гемисукцинат **7** конъюгировали с BSA и иммунизировали этим конъюгатом кроликов.⁶⁴ Полученная антисыворотка позволила разработать радиоиммунный метод анализа **7**. В качестве радиоактивного лиганда использовали [³H]-**7**. Диапазон определения **7** – 0.05–20 нг. Отмечены значительные перекрестные реакции с 17-хлор-ацетил-аймалином, сандвичином и изоаймалином.



Разработанный метод был использован для определения содержания **7** в растениях семейства *Rauwolfia*.⁶⁴

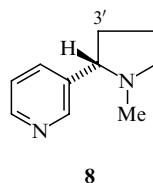
2. Алкалоиды табака

Одним из самых известных алкалоидов табака (*Nicotiana tabacum*, *Nicotiana rustica* и др.) является никотин (**8**). В настоящее время **8** выделяют из растений главным образом для окисления его до никотиновой кислоты и синтеза препаратов на ее основе, а сам алкалоид находит ограниченное применение как инсектицид и эктопаразитоцид в ветеринарии.

В 1973 г. был разработан радиоиммунный метод анализа **8** и его главного метаболита в организме – котинина (**9**).²⁰

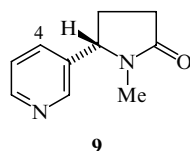
а. Никотин

При синтезе антигена для анализа **8** синтезированный, как было описано ранее,⁶⁵ 3'-гидроксиметилникотин активировали янтарным ангидридом и получали *транс*-3'-сукцинилметилникотин, который присоединяли к HSA, KLH и поли-L-лизину карбодиимидным методом. Каталитическим ³H-обменом в пиридиновом кольце получали [³H]-**8**. При проведении радиоиммунного анализа «связанную» и «свободную» фазы разделяли иммунопреципитацией с использованием козьих антител против Ig G кролика и измеряли радиоактивность «связанной» фазы. Метод позволяет определять **8** в диапазоне 0.35–7 нг, а заметная перекрестная реакция обнаружена только с *dl*-амино-**8** (2.4%). Котинин не детектируется, если его содержание в пробе не превышает 50 нг.²⁰



б. Котинин

При синтезе иммуногена для анализа котинина (**9**) *транс*-4-карбокси-**9** карбодиимидным методом конъюгировали с HSA, KLH и поли-L-Lys. Радиоактивный ¹²⁵I вводили в N-(4-гидроксибензил)-*транс*-карбоксамида-**9**. Анализ проводили так же, как для **8**. Чувствительность метода – 0.01–1 нг. Заметная перекрестная реакция обнаружена только для *dl*-дезметил-**9** (0.9%); **8** на уровне ниже 70 нг не детектируется.²⁰

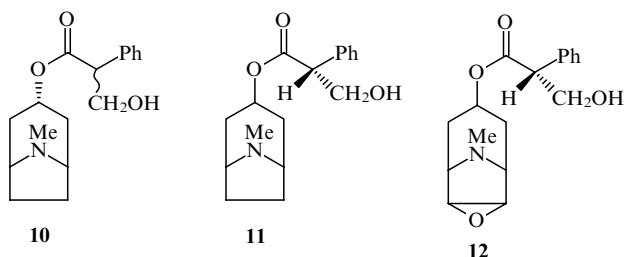


Эти методы были использованы для изучения превращения **8** в **9** экстрактами печени кролика. Показано, что полного окисления **8** не происходит: за 10 ч только 37% **8** превращается в **9**. Эти методы применяли также для анализа превращения **8** в **9** *in vitro* с использованием экстрактов культивируемых клеток печени и для определения содержания этих алкалоидов в биологических жидкостях курильщиков. Установлено, что основным метаболитом **8**, присутствующим в сыворотке крови и в моче курильщиков, является **9**. Содержание **9** в сыворотке крови и в моче после прекращения курения быстро снижается. В биологических жидкостях некурящих **9** не обнаружено.²⁰ Этот же метод был использован при определении содержания никотина и

его метаболитов в волосах.⁶⁶ Для анализа содержания **8** в тканях растений этот метод не применялся.

3. Тропановые алкалоиды

В основе структур этих алкалоидов лежит скелет тропана. Наиболее известные из них – атропин (**10**), гиосциамин (**11**) и скополамин (**12**). К этой же группе относятся и алкалоиды группы кокаина, которые будут рассмотрены ниже. Атропин представляет собой рацемическую форму гиосциамин, образующуюся при выделении алкалоидов из растений.



Скополамин, продуцируемый растениями вида *Datura* и *Duboisia* (*Solanaceae*), используется как парасимпатолитическое, антиэметическое и антихолинэргическое средство. Являясь типичным блоком *m*-холинорецепторов, по физиологическому действию он близок **10**, но его влияние на центральную нервную систему значительно сильнее, и он часто применяется как успокаивающее средство в психиатрии, наркологии и при морской болезни. В растительных тканях наряду с алкалоидом **12** обычно содержатся большие количества **11** – биогенетического предшественника **12**.

Для синтеза иммуогенного конъюгата **12** присоединяли к HSA по гидроксильной группе с помощью глutarового ангидрида, однако активная антисыворотка к этому конъюгату получена не была.³³ Хороший антиген был синтезирован реакцией *nor*-(–)-**12** с акриловой кислотой с последующим присоединением полученного производного к HSA методом смешанных ангидридов или карбодиимидным методом. Антисыворотка к этому конъюгату, специфичная к **12** и *nor*-**12**, позволила разработать радиоиммунный метод анализа **12** в диапазоне 0.5–50 нг. Перекрестная реакция с **12** составляет лишь 0.8%.

Метод был использован при изучении распределения **12** в тканях *D. innoxia* и *D. sanguinea*. Наивысшая концентрация **12** была обнаружена в незрелых семенах, однако из-за малого абсолютного количества семян практически весь алкалоид **12** содержится в листьях. Аналогичный метод был использован для анализа **12** в культурах тканей *Datura*.⁶⁷

Позднее появилось сообщение⁶⁸ о разработке иммуоферментного метода с использованием антисыворотки кролика к конъюгату троповой кислоты с BSA. Метод позволяет одновременно определять основные тропановые алкалоиды **10**–**12**. Предел определения **10** – 0.1 нг. При определении **11** и **12** предварительно проводят их рацемизацию.

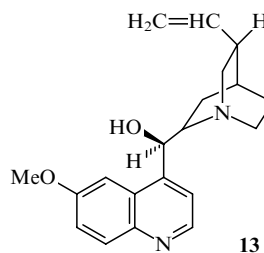
4. Хинолиновые алкалоиды

Некоторые виды растений рода *Cinchona* (*Rubiaceae*) продуцируют изомерные алкалоиды хинин (**13**) и хинидин (**14**). С фармакологической точки зрения **13** представляет собой антибиотик. Он эффективен против гаметоцитных форм *Plasmodium vivax* и *Plasmodium malariae* в эритроцитах, причем механизм его биологической активности, который заключается в избирательном подавлении репликации ДНК и транскрипции РНК, типичен для антибиотиков. Хинин широко используется как противомаларийное средство и в качестве горечи, а также находит ограниченное применение для лечения некоторых сердечных заболеваний и в акушер-

ской практике. Стереизомер **13** – хинидин является мощным антиаритмическим средством.

а. Хинин

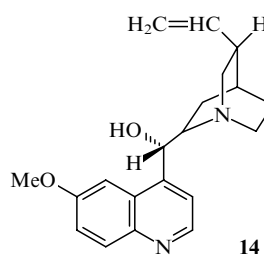
Активация **13** янтарным ангидридом и присоединение его к BSA методом смешанных ангидридов дает иммуогенный конъюгат, позволяющий получить специфичную к **13** антисыворотку. На основе этой антисыворотки были разработаны радиоиммунный^{25,26} и иммуоферментный²⁶ методы, позволяющие определять **13** в диапазоне 1–50 и 0.1–10 нг соответственно. Предел определения **13** составляет 10 пг для иммуоферментного и 50 пг – для радиоиммунного методов.²⁶



Иммуоферментный метод был использован для определения **13** в образцах биологических жидкостей человека.⁶⁹

б. Хинидин

В настоящее время существуют наборы для иммунного анализа **14**. Так, фирма «Beckman» (США) разработала набор для нефелометрического иммуноанализа, позволяющий определять **14** и ряд его физиологически активных метаболитов в организме млекопитающих.⁷⁰ Компания «Syva Corporation» производит набор для иммуоферментного определения **14**.⁷¹ Оба метода рассчитаны на использование специального оборудования, потребляют большие количества антисыворотки и обладают довольно низкой чувствительностью (1–10 мг/мл). Однако полная автоматизация процесса определения делает их очень удобными для клинического применения.



Проведено сравнение иммуоферментного метода, разработанного компанией «Syva Corporation», с методом, использующим обращеннофазовую ВЭЖХ с флуоресцентной детекцией.⁷² Установлено, что при определении содержания **14** в сыворотке крови получавших его пациентов иммуоферментный метод дает значения в 1.2 раза выше, чем хроматографический метод. Разработана автоматическая система для иммуноанализа с флуоресцентно-меченным лигандом, позволяющая среди прочих веществ определять и **14**.⁷³

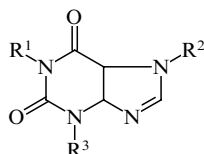
В 1985 г. были разработаны радиоиммунный и иммуоферментный методы анализа, использующие антисыворотку к конъюгату 9-гемисукцинилхинидина, присоединенному к BSA через 6-амино-*n*-гексановую кислоту.²⁶ Диапазон определения **14** радиоиммунным методом – 1–1000 нг, а иммуоферментным – 0.1–10 нг. Радиоиммунный метод использовали для скрининга клональных культур *C. ledgeriana* при анализе на содержание **13**.²⁵

Иммуный метод, основанный на измерении степени поляризации флуоресценции, использован для исследования фармакокинетики **14**.⁷⁴ Быстрый комбинированный ультрафильтрационно-иммуноферментный и диализно-иммуноферментный методы определения **14** в сыворотке крови пациентов дали результаты, хорошо совпадающие с результатами, полученными ультрафильтрационно-жидкостнохроматографическим и диализно-жидкостнохроматографическим методами.⁷⁵

Иммуноферментные и иммунофлуоресцентные методы определения **14** получили довольно широкое распространение, главным образом, в клинической практике.^{76–78} Разработана и активно применяется автоматическая система «Optimate», позволяющая проводить анализ содержания **14** иммунофлуоресцентным методом.⁷³

5. Пуриновые алкалоиды

В эту группу входят производные ксантина ($R^1 = R^2 = R^3 = H$): кофеин ($R^1 = R^2 = R^3 = Me$) (**15**), теofilлин ($R^1 = R^3 = Me$, $R^2 = H$) (**16**) и теобромин ($R^1 = H$, $R^2 = R^3 = Me$) (**17**). Кофеин содержится в листьях чая и зернах кофе, теобромин впервые был обнаружен в бобах какао, а теofilлин – в чае.



15–17

Механизм физиологической активности этих алкалоидов связан с угнетением фосфодиэстеразы и накоплением внутриклеточного медиатора – циклического аденозин-3',5'-монофосфата (сАМР).

Для количественного анализа производных ксантина используются две группы методов: иммунные методы и методы на основе ВЭЖХ.⁷⁹

Наличие в молекулах этих соединений большого количества функциональных групп позволяет довольно легко получать иммуногенные конъюгаты этих алкалоидов с белками.

а. Кофеин

Кофеин является типичным психостимулятором, он также возбуждает сердечную деятельность, расширяет коронарные сосуды, усиливает двигательную активность и диурез.

Существующие в настоящее время иммунные методы определения **15** применяются только в медицинской практике, в частности – иммуноферментный метод определения **15** в сыворотке используется в педиатрии.⁸⁰

Проведено сравнение результатов анализов **15** в сыворотке и плазме иммуноферментным и ВЭЖХ методами и показано, что они практически совпадают.^{80,81}

б. Теофиллин

Теофиллин обладает сходной с **15** физиологической активностью, но у него преобладают бронхолитическое и мочегонное действия.

Довольно широкое распространение **16** как лекарственного средства способствовало разработке большого количества иммунных методов анализа этого алкалоида. В настоящее время наибольшее распространение получили иммуноферментный,^{82–86} иммунофлуоресцентный,^{73,87–90} иммунохроматографический,⁹¹ иммунотурбидиметрический^{92,93} методы, иммунохроматографический метод с ис-

пользованием апоферментных реагентных полосок,^{94–98} иммуноферментный метод с использованием фермента, инкапсулированного в липосомы.⁹⁹ Для автоматического анализа **16** применяется система «Optimate», основанная на иммунофлуоресцентном методе.⁷³

Эти методы были использованы при изучении фармакокинетики **16**,^{100–102} при определении содержания **16** в сухих пятнах крови,^{83,84} в цельной крови,⁹⁷ моче,¹⁰³ слюне,⁸⁸ сыворотке крови,^{82,83,93–95,104–106} плазме.^{89–91,107–111}

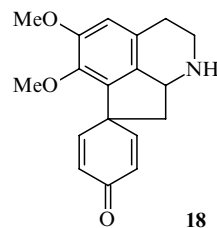
Исследовано влияние веществ, обычно встречающихся в анализируемых образцах, на результаты определения **16**.^{108,112–115}

Проведено сравнение различных иммунных методов и методов, основанных на ВЭЖХ.^{92,98,101,104–107,109–111} Установлено, что по точности и воспроизводимости результатов лучшими являются иммуноферментный метод, иммунный метод, основанный на измерении степени поляризации флуоресценции, и метод на основе ВЭЖХ.^{103,109}

6. Проапорфиновые алкалоиды

В основе строения этих алкалоидов лежит апорфиновая структура.

Стефарин (18) – алкалоид, выделенный из стефании гладкой (*Stephania glabra*). Он обладает холинэстеразной активностью и применяется при лечении заболеваний периферической нервной системы, миопатии, бокового амиотрофического склероза, парезов лицевого нерва.

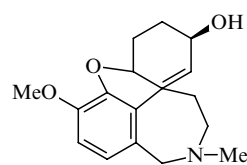


18

Для получения антител **18** обрабатывали янтарным ангидридом, затем N-гидроксисукцинимидом и N,N'-дициклогексилкарбодиимидом и конъюгировали с BSA. Полученные с помощью этого конъюгата антитела были использованы при разработке твердофазного иммуноферментного метода, имеющего чувствительность 10 пг/мл. Метод был применен при анализе **18** в культуре растительной ткани, а также при определении содержания **18** в крови пациентов.¹¹⁶

7. Алкалоиды группы физостигмина

Галантамин (19) – алкалоид, выделенный из клубней подснежника *Galanthus woronowii* и *Galanthus nivalis*. Механизм его физиологического действия связан с усилением влияния ацетилхолина на *n*-холинергические синапсы в результате ингибирования холинэстеразы. В медицинской практике он используется для снижения внутриглазного давления, а также для лечения некоторых нервных болезней и для усиления перистальтики при парезе кишечника.



19

Существует специфичный радиоиммунный метод определения **19**. Для получения иммуногенного конъюгата алка-

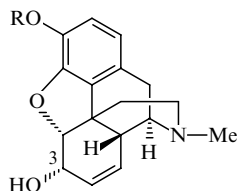
лоид **19** обрабатывали янтарным ангидридом и получали 2-О-гемисукцинат галантамина, который конъюгировали с BSA с помощью 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимида. Метод¹¹⁷ позволяет определять **19** в диапазоне 0.5–100 нг.

8. Алкалоиды мака

В эту группу входят морфин (**20**), кодеин (**21**), наркотин, папаверин (**22**), тебаин и около двадцати других алкалоидов.

а. Морфин

Морфин – основной алкалоид, выделенный наряду с двумя десятками других алкалоидов из мака снотворного (*Papaver somniferum*). Морфин относится к болеутоляющим веществам – наркотическим анальгетикам. Он обладает также седативным и снотворным действием, стимулирует гладкую мускулатуру, а в больших концентрациях вызывает рвоту, запоры, затрудняет диурез, угнетает центры терморегуляции и дыхания. Установлено, что **20** влияет на специфические рецепторы коры больших полушарий головного мозга; он широко используется в качестве обезболивающего наркотического средства.



R = H (**20**), Me (**21**)

б. Кодеин

Кодеин также входит в состав *P. somniferum*. Он обладает слабым наркотическим действием и широко применяется как обезболивающее средство, а также как препарат против кашля.

Ввиду трудностей скрещивания и селекции штаммов *P. somniferum* желательно было иметь быстрый метод анализа содержания **20**, что и обусловило в начале 70-х годов разработку иммунных методов анализа **20**.

Для анализа **20** и **21** были разработаны радиоиммунные методы^{28, 29, 118, 119} и методы, основанные на ингибировании гемагглютинации.^{30, 120} Во всех случаях иммуногенный конъюгат получали карбоксиметилированием молекулы **20** по гидроксильной группе в положении 3 и присоединением полученного производного к белку, а также – конъюгацией карбодиимидным методом. Антисыворотку к такому конъюгату выделяли из крови кролика или из крови морской свинки.

Наиболее чувствительным и специфичным оказался радиоиммунный метод с использованием [¹²⁵I]-меченного по остаткам тирозина сополимера *L*-Glu, *L*-Lys, *L*-Ala и *L*-Tyr, к ε-аминогруппам остатков лизина которого присоединен 3-О-карбоксиметилморфин, и антисыворотки из крови морской свинки. Диапазон определения **20** – 0.05–5 нг. Недостатком этого метода²⁹ является невозможность провести различие между **20** и **21**. Метод применялся для определения времени существования **20** в крови,¹¹⁸ а также при анализе образцов сыворотки крови, взятой в случаях так называемой «внезапной смерти». Показано, что результаты радиоиммунного анализа хорошо совпадают с результатами, полученными хроматографическими методами.²⁹

В начале 70-х годов был разработан гомогенный иммуноферментный метод определения **20** на основе использования конъюгата морфина с лизоцимом и антиопиатных

антител.^{121, 122} Этот метод позволяет определять **20** в диапазоне концентраций 0.5–3 мкг/мл. В дальнейшем лизоцим был заменен другими ферментами (малатдегидрогеназой и глюкозо-6-фосфатдегидрогеназой), что позволило в 10 раз повысить чувствительность.^{123–125}

Антитела к **20** были использованы при разработке метода и набора реактивов для одновременного автоматического иммуноферментного анализа ряда наркотических препаратов в микрообразцах мочи.¹²⁶ Концентрационный предел обнаружения **20** составил 0.3 мг/мл.

Иммуноферментный метод был использован для определения **20** в образцах крови людей, умерших от употребления героина.¹²⁷

В 1984 г. появилось краткое сообщение о разработке радиоиммунных методов анализа (*S*)- и (*R*)-ретикулина, салутаридина, тебаина, **20** и **21**. Все полученные антисыворотки обладали высокой специфичностью и позволяли определять перечисленные вещества в диапазоне 0.01–10 нг.¹²⁸ Эти методы дают возможность исследовать пути биосинтеза перечисленных алкалоидов и проводить селекцию растений или культур клеток по продуктивности биосинтеза этих алкалоидов.

Иммунные методы определения **20** используются главным образом в клинической практике.¹²⁹ Для обнаружения **20** в моче был успешно применен иммунный метод анализа с помощью индикаторных полосок.¹³⁰

При скрининг-анализе опиатов широкое распространение нашел метод, основанный на латексной агглютинации.¹³¹

Для обнаружения опиатов используется и гетерогенный иммуноферментный метод анализа.¹³² Конкурентный твердофазный иммуноферментный анализ опиатов позволяет достичь высокой чувствительности – до 0.25 нг/мл. При использовании этого метода в качественном варианте, без инструментального оснащения, чувствительность определения составляет 300 нг/мл, что сопоставимо с чувствительностью гомогенного иммуноферментного метода анализа.

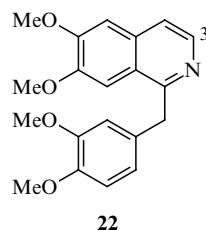
Позже появились сведения о разработке высокочувствительных иммунофлуоресцентных методов определения **20** в моче.^{133, 134}

Фирма «Hofmann La Roche» (Швейцария) выпустила набор для качественного визуального определения опиатов с чувствительностью 300 нг/мл.¹³⁵

Иммунные методы используются при анализе опиатов в образцах сыворотки, мочи, слюны и других биологических жидкостей человека.¹³⁵ Существует высокочувствительный метод, позволяющий определять содержание **20** в волосах,¹³⁶ чувствительность при этом достигает 0.2 нг/мл.

в. Папаверин

Папаверин (**22**) также является одним из наиболее ценных алкалоидов, выделенных из мака. Он обладает спазмолитическим и умеренным сосудорасширяющим действием, повышает потребление кислорода миокардом. Папаверин применяется при гипертонии, стенокардии, спазмах коронарных сосудов и сосудов головного мозга, гладкой мускулатуры брюшной полости и других заболеваниях.



22

Для получения антител к **22** использовали конъюгат синтетического 3-аминопапаверина.¹³⁷ Для этого последний обрабатывали глутаровым ангидридом, превращали в 1-(3,4-

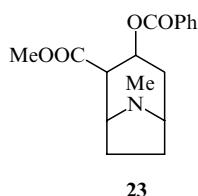
диметоксибензил)-3-N-(4-карбоксибутирил)амино-6,7-диметоксиизохинолин, который присоединяли к BSA с помощью N-гидроксисукцинимид и N,N'-дициклогексилкарбодиимида. На основе полученных антител был разработан твердофазный иммуоферментный метод определения **22**.¹³⁸ Чувствительность метода составляет 10^{-6} г/мл.

9. Алкалоиды группы кокаина

Эти алкалоиды содержатся в листьях кокаинового куста (*Erythroxylon coca*). Основной структуры этих алкалоидов является бициклический скелет тропана, и по этому признаку они могут быть отнесены к тропановым алкалоидам.

Как и в случае пуриновых алкалоидов, большое количество функциональных групп в молекулах этих алкалоидов позволяет легко получать иммуногенные конъюгаты с белками.

Кокаин (23) обладает мощным локальным обезболивающим действием и относится к местным анестетикам. Он оказывает парализующее действие на парасимпатическую нервную систему.



В настоящее время существует флуоресцентно-поляризационный иммунный метод анализа, позволяющий определять содержание **23** в моче в концентрации 1 мг/мл и выше.⁴⁰

Как и для других наркотиков, иммунные методы анализа **23** и его метаболитов используются практически только в медицинской практике.¹³⁹

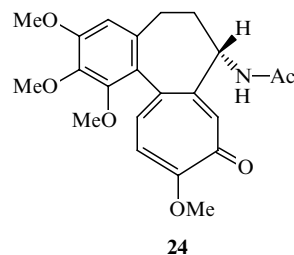
Попытки упростить и ускорить анализ наркотических веществ привели к появлению методов одновременного анализа широкого спектра наркотиков. В этих методах используются смеси антител к каждому веществу или группе веществ. Среди таких методов можно назвать флуоресцентно-поляризационный метод, позволяющий одновременно определять метаболиты **23**, амфетамин и некоторые барбитураты в моче,³⁹ и иммуоферментный метод одновременного определения амфетамина, хиалбербитона, оксазепамы, бензоилэкогонины, метадона, метаквалона, **20**, фенциклидина, фенитоина, пропоксифена и нортриптилина в моче.¹²⁶

В наркологической практике широкое распространение получили методы определения наркотических веществ, предложенные фирмой «Syva Corporation», основанные на гомогенном иммуноанализе.^{98, 121, 124, 136, 140} Впоследствии эти методы были автоматизированы.¹⁴⁰

10. Алкалоиды группы колхицина

Колхицин (**24**) и колхамин, наряду с несколькими другими алкалоидами, содержатся в луковицах растений родов *Colchicum* и *Merendera*.

Колхицин широко применяется в селекционной работе как агент, вызывающий удвоение числа хромосом и образование полиплоидных форм растений, а также при изучении цитоскелета растений. Являясь ядом нервно-паралитического действия, он, в то же время, применяется для лечения рака пищевода и рака кожи, как антиконвульсант и, кроме того, **24** – лучшее на сегодняшний день средство против средиземноморской лихорадки.



В 1975 г. был разработан радиоиммунный метод анализа **24** с использованием конъюгата N-дезацетилтиоколхицина, присоединенного карбодиимидным методом к BSA, и [³H]-**24**. Метод позволяет определять **24** в диапазоне 5–50 нг.²² Отмечены перекрестные реакции с N-дезацетилтиоколхицином и N-дезацетил-N-метилколхицином (8%). Метод разработан для анализа **24** в сыворотке крови человека; для определения **24** в растениях он не применялся.

Позднее был разработан аналогичный метод, основанный на использовании моноклональных антител, который позволил значительно повысить специфичность анализа.¹⁴¹

IV. Заключение

Иммунохимические методы анализа алкалоидов становятся все более популярными. Они превосходят хроматографические по чувствительности и скорости подготовки аналитической пробы, почти не уступая им в точности и воспроизводимости.

При разработке иммунных методов анализа алкалоидов в большинстве случаев удается обойти трудности, связанные с получением иммуногенных конъюгатов алкалоидов с белками, и получить достаточно специфичные антисыворотки.

Радиоиммунные методы анализа алкалоидов, занимавшие ведущее место в 60–70-х годах, в 80-х годах уступили лидерство иммуоферментным методам; все шире начинают использоваться иммуофлуоресцентные методы.

Наиболее широкой областью применения иммунных методов анализа алкалоидов является измерение их концентрации в физиологических жидкостях пациентов, получавших препараты алкалоидов. Это связано как с необходимостью быстро и точно контролировать ход лечения, так и с изучением фармакокинетики и метаболизма алкалоидов.

Быстрые и точные методы анализа алкалоидов, обладающих наркотическими свойствами, важны как с медицинской, так и с криминалистической точки зрения. И здесь все более активно применяются иммунные методы анализа.

Так как во многих случаях алкалоиды все еще получают из растительного сырья, часто бывает необходимо знать содержание этих алкалоидов в сырье. Но отсутствие в большинстве стран нормативов содержания биологически активных веществ в растительном сырье является сдерживающим фактором в разработке иммунных методов анализа в приложении к растениям. Однако в ряде случаев иммунные методы применялись при исследованиях биосинтеза некоторых алкалоидов в растениях.

Недостатки традиционного пути выделения алкалоидов из растительного сырья – зависимость содержания алкалоидов от климатических и погодных условий, трудности сбора (для дикорастущих растений) и использование плодородных земель (для культивируемых растений) – привели к тому, что в последнее время активно развиваются биотехнологические методы получения алкалоидов в культурах клеток и тканей растений. Именно в области контроля содержания алкалоидов в таких культурах все более широкое применение находят иммунные методы анализа, приходящие на смену хроматографическим методам, традиционно используемым для этих целей.

Литература

1. V.Marko. *Farm. Obz.*, **55**, 37 (1986)
2. С.Д.Варфоломеев, С.В.Зайцев, А.Т.Мевх. *Физико-химические исследования молекулярных механизмов действия физиологически активных соединений. Итоги науки и техники. Сер. биорг. химия. Т.3.* Изд-во ВИНТИ, Москва, 1985. С.116
3. E.L.Manchester, E.Geisbrecht, S.J.Soldin. *Ther. Drug Monit.* **9**, 61 (1987)
4. Р.В.Петров, И.В.Березин. *Журн. Всесоюз. хим. об-ва им. Д.И.Менделеева*, **27**, 362 (1982)
5. Б.Б.Дзантиев, А.М.Егоров. *Журн. Всесоюз. хим. об-ва им. Д.И.Менделеева*, **27**, 442 (1982)
6. А.М.Егоров. *Журн. Всесоюз. хим. об-ва им. Д.И.Менделеева*, **33**, 494 (1988)
7. С.А.Еремин. *Журн. Всесоюз. хим. об-ва им. Д.И.Менделеева*, **34**, 46 (1982)
8. *Иммунологические методы.* (Под ред. Г.Фримеля). Медицина, Москва, 1987
9. *Иммуноферментный анализ.* (Под ред. Т.Т.Нго, Г.Ленхоффа). Мир, Москва, 1988
10. *Неизотопные методы иммуноанализа. Итоги науки и техники. Сер. Биотехнология. Т.3* (Под ред. А.М.Егорова). Изд-во ВИНТИ, Москва, 1987
11. *ELISA and Other Solid Phase Immunoassays. Theoretical and Practical Aspects* (Eds D.M.Kemeny, S.J.Challacombe). John Wiley and Sons, Chichester; New York; Brisbane; Toronto; Singapore, 1988
12. *Immunoassays in Food Analysis.* (Eds B.A.Morris, M.N.Clifford). Elsevier Appl. Sci. Publ., London; New York, 1985
13. *Immunology in Plant Sciences* (Eds H.F.Linskens, J.F.Jackson). Springer-Verlag, Berlin; Heidelberg; New York; London; Paris; Tokyo, 1986
14. T.Braun, A.Klein, S.Zsindely, W.S.Lyon. *Trends Anal. Chem.*, **11**, 5 (1992)
15. C.C.Harris, R.H.Yolken, H.Krokan, I.C.Hsu. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**, 5336 (1979)
16. K.Landsteiner. *The specificity of serological reactions*, Harvard University Press, Cambridge, 1946
17. R.J.Robins, M.R.A.Morgan, M.J.C.Rhodes, J.M.Furze. In *Immunoassays in Food Analysis.* (Eds B.A.Morris, M.N.Clifford). Elsevier Appl. Sci., London, 1985. P.177
18. B.F.Erlanger, O.F.Borek, S.M.Beiser, S.Leiberman. *J. Biol. Chem.*, **234**, 1090 (1959)
19. H.Arens, J.Stockigt, E.W.Weiler, M.H.Zenk. *Planta Med.*, **34**, 37 (1978)
20. J.J.Langone, H.B.Gjika, H.Van Vunakis. *Biochemistry*, **12**, 5025 (1973)
21. J.J.Langone, M.R.D'Onofrio, H.Van Vunakis. *Anal. Biochem.*, **95**, 214 (1979)
22. C.Boudene, F.Duprey, C.Bohuon. *Biochem. J.*, **151**, 413 (1975)
23. H.Meisner, P.Meisner. *Arch. Biochem. Biophys.*, **208**, 146 (1981)
24. J.P.Kutney, L.S.L.Choi, B.R.Worth. *Phytochemistry*, **19**, 2083 (1980)
25. R.J.Robins, A.J.Webb, M.J.C.Rhodes, J.M.Furze. *Planta Med.*, **50**, 235 (1984)
26. M.R.A.Morgan, S.Bramham, A.J.Webb, R.J.Robins, M.J.C.Rhodes. *Planta Med.*, **51**, 237 (1985)
27. P.Westekemper, U.Wieczorek, F.Gueritte, N.Langlois, Y.Langlois, P.Potier, M.H.Zenk. *Planta Med.*, **39**, 24 (1980)
28. S.Spector, C.W.Parker. *Science*, **168**, 1347 (1970)
29. H.Van Vunakis, E.Wasserman, L.Levine. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **180**, 514 (1972)
30. F.L.Adler, C.-T.Liu. *J. Immunol.*, **106**, 1684 (1971)
31. J.D.Teale, J.M.Clough, V.Marks. *Brit. J. Clin. Pharmacol.*, **4**, 169 (1977)
32. M.P.Hacker, J.P.Dank, W.B.Ershler. *Cancer Res.*, **44**, 478 (1984)
33. E.W.Weiler, J.Stockigt, M.H.Zenk. *Phytochemistry*, **20**, 2009 (1981)
34. P.S.Jourdan, R.L.Mansell, E.W.Weiler. *Planta Med.*, **44**, 82 (1982)
35. S.A.Eremin. *Ther. Drug Monit.*, **10**, 400 (1988)
36. J.Marrero. *J. Med. Technol.*, **1**, 47 (1984)
37. M.R.A.Morgan, R.McNerney, J.A.Matthew, D.T.Coxon, H.W.-S.Chan. *J. Sci. Food Agric.*, **34**, 593 (1983)
38. L.Fukal, J.Kas. *Trends Anal. Chem.*, **8**, 112 (1989)
39. D.L.Colbert, M.Childerstone. *Clin. Chem.*, **33**, 1921 (1987)
40. С.К.Волков. *Лекарственное растениеводство. Обзорная информация.* ВНИИСЭНТИ НПО «Медбиоэкономика», Москва, 1990
41. M.A.Root, K.Gerzon, R.W.Dyke. In *Federation of Analytical Chemistry and Spectroscopy Societies, 2nd National Meeting*, Indianapolis, IN, 1975. P.125 (Abstr. 183)
42. C.J.Barnett, G.J.Cullinan, K.Gerzon, R.C.Hoying, W.E.Jones, W.M.Newlon, G.A.Poore, R.L.Robison, M.J.Sweeney, G.C.Todd. *J. Med. Chem.*, **21**, 88 (1978)
43. V.S.Sethi, S.S.Burton, D.V.Jackson. *Cancer Chemother. Pharmacol.*, **4**, 183 (1980)
44. R.J.Owells, C.A.Hartke, F.O.Hains. *Cancer Res.*, **37**, 2597 (1977)
45. P.A.Ponarotti, R.Rahmani, M.Martin, J.Barbet. *Molec. Immunol.* **22**, 277 (1985)
46. M.C.Cibotti, C.Freier, J.Andrieux, M.Plant, L.Cosson, C.Bonun. *Phytochemistry*, **29**, 2109 (1990)
47. R.Rahmani, J.Barbet, J.P.Cano. *Clin. Chim. Acta*, **129**, 57 (1983)
48. A.S.Perlin. In *Oxidation. Techniques and Applications in Organic Synthesis. V.1.* (Ed. R.L.Augustine). Marcel Dekker; New York, 1969. P.189
49. M.Lounasmaa, R.Jokela, A.Huhtikangas, S.Lapinjoki, J.Heiskanen, T.Lehtola, T.Naaranlahti. *Heterocycles*, **24**, 1355 (1986)
50. S.P.Lapinjoki, H.M.Verajankorva, A.Huhtikangas, T.J.Lehtola, M.Lounasmaa. *J. Immunoassay*, **7**, 113 (1986)
51. A.Huhtikangas, T.Lehtola, S.Lapinjoki, M.Lounasmaa. *Planta Med.*, **53**, 85 (1987)
52. K.Hirata, M.Kobayashi, K.Miyamoto, T.Hoshi, M.Okazaki, Y.Miura. *Planta Med.*, **55**, 262 (1989)
53. M.Reihlin, J.J.Schnurre, V.K.Vance. *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, **128**, 347 (1968)
54. R.J.Owells, M.A.Root, F.O.Hains. *Cancer Res.*, **37**, 2603 (1977)
55. M.Tabata. In *Plant Tissue Culture and Its Bio-Technological Application.* (Eds W.Barz, E.Reinhard, M.H.Zenk). Springer, Berlin; Heidelberg; New York, 1977. P.3
56. W.G.W.Kurz, K.B.Chatson, F.Constabel, J.P.Kutney, L.S.L.Choi, P.Kolodziejczyk, S.K.Sleigh, K.L.Stuart, B.R.Worth. *Phytochemistry*, **19**, 2583 (1980)
57. J.P.Kutney, L.S.L.Choi, P.Kolodziejczyk, S.K.Sleigh, K.L.Stuart, B.R.Worth, W.G.W.Kurz, K.B.Chatson, F.Constabel. *Helv. Chim. Acta*, **64**, 1837 (1981)
58. P.Manganey, R.Z.Andriamialisoa, N.Langlois, Y.Langlois, P.Potier. *J. Am. Chem. Soc.*, **101**, 2243 (1979)
59. A.Huhtikangas, J.Heiskanen, V.Kauppinen, S.Lapinjoki, M.Lounasmaa, H.Verajankorva. *Pharm. Weekblad - Sci. Ed.*, **9**, 236 (1987)
60. S.Lapinjoki, H.Verajankorva, J.Heiskanen, M.Niskanen, A.Huhtikangas, M.Lounasmaa. *Planta Med.*, **53**, 565 (1987)
61. B.Deus-Neumann, J.Stockigt, M.H.Zenk. *Planta Med.*, **53**, 184 (1987)
62. M.H.Zenk, H.El-Shagi, H.Arens, J.Stockigt, E.W.Weiler, B.Deus. In *Plant Tissue Culture and Its Bio-Technological Application.* (Eds W.Barz, E.Reinhard, M.H.Zenk). Springer, Berlin; Heidelberg; New York, 1977. P.27
63. J.F.Treimer, M.H.Zenk. *Phytochemistry*, **17**, 227 (1978)
64. H.Arens, B.Deus-Neumann, M.H.Zenk. *Planta Med.*, **53**, 179 (1987)
65. M.Cushman, N.Castagnoli, jr. *J. Org. Chem.*, **37**, 1268 (1972)
66. S.Balabanova, E.Schneider, G.Buhler. *Dtsch. Apoth.-Ztg.*, **130**, 2200 (1990)
67. B.J.Savary, D.K.Dougall. *Phytochemistry*, **29**, 1567 (1990)
68. M.A.Fliniaux, A.Jacquín-Dubreuil. *Planta Med.*, **53**, 87 (1987)
69. V.Rowell, F.J.Rowell. *Analyst*, **112**, 1437 (1987)
70. A.J.Quattrone, R.Joseph, T.Jones, S.Sarmir, A.Selvaggi, K.Maloney, T.Lockwood. *J. Med. Technol.*, **1**, 381 (1984)
71. B.E.Pape. *Ther. Drug Monit.*, **3**, 357 (1981)
72. C.R.Lehmann, K.J.Boran, W.P.Pierson, A.P.Melikian, G.W.Wright. *Ther. Drug Monit.*, **8**, 336 (1986)
73. M.Sheehan, G.Caron. *Ther. Drug Monit.*, **7**, 108 (1985)
74. M.B.Bottorff, R.L.Lalonde, A.B.Straughn. *Biopharm. Drug Dispos.*, **8**, 213 (1987)
75. H.R.Ha, S.Vozeh, F.Follath. *Ther. Drug Monit.*, **8**, 331 (1986)

76. D.J.Mazak, J.Y.Lee, J.A.Ferringer. *ASHP Midyear Clinical Meeting*, **25**, 26E (1990)
77. M.Tod, G.Resplandy, R.Farinotti, Y.Provost, A.Dauphin. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **8**, 279 (1990)
78. Y.W.Lam, C.Watkins. *ASHP Midyear Clinical Meeting*, **26**, 348E (1991)
79. A.Yamasaki, K.Yamamoto, K.Shinozaki, R.Takao, Y.Tanaka. *J. Pract. Pharm.*, **42**, 191 (1991).
80. J.V.Aranda, K.Beharry, J.Rex, R.J.Johannes, L.Charest-Boule. *Ther. Drug Monit.*, **9**, 97 (1987)
81. K.H.Carpenter, M.J.Bennett. *Ann. Clin. Biochem.*, **24** (Suppl. 1), 61 (1987)
82. Н.П.Данилова, Н.И.Бекман, Л.В.Шустова, Р.Г.Василов. *Хим.-фарм. журн.*, **23**, 871 (1989)
83. Н.П.Данилова, Н.И.Бекман, А.С.Зиганшин, Р.Г.Василов. *Хим.-фарм. журн.*, **26**, 92 (1992)
84. J.M.Rattenbury, T.Taylor. *Ann. Clin. Biochem.*, **650** (1988)
85. P.A.Kyd, S.J.Evans. *Ann. Clin. Biochem.*, **24**, (Suppl. 1), 60 (1987)
86. N.Massoud, P.Munzenberger, A.Sarniak. *Am. J. Hosp. Pharm.*, **43**, 1722 (1986)
87. J.Babjuk, I.Bilyk, J.Kalousova, H.Nekvasilova, B.Rybakova. *Cesk. Farm.*, **36**, 322 (1987)
88. A.Neumann, M.Oellerich, G.Schumann, G.W.Sybrecht. *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.*, **23**, 725 (1985)
89. P.W.Thies, B.Nalge. *Hosp. Pharm.*, **21**, 230 (1986)
90. R.Kino, R.O.Day, G.A.Pearce, G.W.Fulde. *Aust. J. Hosp. Pharm.*, **21**, 292 (1991)
91. M.J.Otero, A.Martin Suarez, M.Barrueco, E.Gomez, A.Dominguez-Gil. *Farm. Clin.*, **4**, 528 (1987)
92. G.Gotelli, M.Mitchell. *Clin. Chem.*, **31**, 1085 (1985)
93. P.Goebbels, J.Boulanger, P.Ers, A.Adam. *Clin. Chem.*, **33**, 1077 (1987)
94. M.Plebani, A.Burlina. *Ther. Drug Monit.*, **7**, 451 (1985)
95. D.L.Morris. *Anal. Biochem.*, **151**, 235 (1985)
96. T.Kuzuya, Y.Ogura, M.Hasegawa, T.A.Nakamura, S.Katazama. *Japan J. Hosp. Pharm.*, **12**, 362 (1986)
97. R.Chen, T.M.Li, H.Merrick, R.F.Parrish, V.Bruno, A.Kwong, C.Stiso, D.J.Litman. *Clin. Chem.*, **33**, 1521 (1986)
98. R.H.Drost, H.U.Schulz, R.A.Maes, J.M.Van Rossum. *J. Toxicol. Clin. Toxicol.*, **25**, 231 (1987)
99. E.F.Ullman, T.Tarnowski, P.Felgner, I.Gibbons. *Clin. Chem.*, **33**, 1579 (1987)
100. P.J.Aznar, B.M.Toreda, A.M.Alos, B.J.Ezqner, O.M.D.Fuentez. *Farm. Clin.*, **8**, 139 (1991)
101. R.L.Lalonde, M.B.Bottorff, A.B.Staughn. *Ther. Drug Monit.*, **7**, 442 (1985)
102. J.H.Jonkman. *Ther. Drug Monit.*, **10**, 345 (1988)
103. M.Pokrajac, D.Agbaba, V.M.Varagic, L.Glisovic. *Acta Pharm. Jugosl.*, **36**, 445 (1986)
104. E.Pietruszewska. *Farm. Pol.*, **41**, 382 (1985)
105. H.M.Izquiero, F.O.Calatayud, G.G.Sangrador, A.A.Sanchez. *Farm. Clin.*, **4**, 802 (1987)
106. H.Wallinder, L.L.Gustafsson, K.Angback, P.Hoglung, L.Arvanus. *Ther. Drug Monit.*, **13**, 233 (1991)
107. M.Mordelet-Dambrine, J.Y.Baglin, A.Roux, D.Dusser, G.Huchon. *Ther. Drug Monit.*, **8**, 106 (1986)
108. M.M.Canto Pascual, M.Alos Alminana, J.Magraner Gil, J.Ezquer Borrás, M.D.Fuentes Ortiz, M.L.Calduch Alvarez, M.T.Torrecilla Junyent. *Farm. Clin.*, **4**, 38 (1987)
109. P.-L.C.Lopez, M.T.Miranda-Leon, M.A.Agudo-Martinez, D.Villalba-Bedoya. *Farm. Clin.*, **7**, 485 (1990)
110. R.J.West, L.N.Sansom, A.C.Penna. *Aust. J. Hosp. Pharm.*, **20**, 430 (1990)
111. A.W.Krings. *Ziekenhuisfarmacie*, **7**, 7 (1991)
112. I.S.Kampa, J.I.Jarabek. *Ther. Drug Monit.*, **7**, 489 (1985)
113. I.A.Cohen, C.E.Johnson, L.Wesolowicz, K.Converse-Swastek. *Clin. Pharm.*, **4**, 457 (1988)
114. J.S.Wei, C.Y.Tsai, H.M.Huang, M.E.Chai. *Ther. Drug Monit.*, **11**, 84 (1989)
115. M.Morton, R.C.Parish, W.J.Spruill. *Ther. Drug Monit.*, **11**, 347 (1989)
116. Н.П.Данилова, С.Н.Луцкова, И.И.Фадеева, Р.Г.Василов, А.И.Мирошников. *Хим.-фарм. журн.*, **24**, 56 (1990)
117. T.Tanahashi, A.Poulev, M.H.Zenk. *Planta Med.*, **56**, 77 (1990)
118. S.Spector. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **178**, 253 (1971)
119. D.H.Catlin, R.Cleeland, E.Grunbarg. *Clin. Chem.*, **19**, 216 (1973)
120. F.L.Adler, C.T.Lin, D.H.Catlin. *Clin. Immunol. Immunopathol.*, **1**, 53 (1972)
121. K.E.Rubenstein, R.S.Schneider, E.F.Ullman. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **47**, 846 (1972)
122. R.S.Schneider, P.Lindqvist, E.Tong-in-Wong, K.E.Rubenstein, E.F.Ullman. *Clin. Chem.*, **19**, 821 (1973)
123. G.L.Rowley, K.E.Rubenstein, S.T.Weber, E.F.Ullman. In *Am. Chem. Soc. Meeting BIOL.* Washington, 1976. P. 151
124. G.L.Rowley, K.E.Rubenstein, J.Huisjen, E.F.Ullman. *J. Biol. Chem.*, **250**, 3759 (1975)
125. J.W.Lee, J.E.Pedersen, T.L.Moravetz, A.M.Dzerk, A.D.Mundt, K.V.Shepard. *J. Pharm. Sci.*, **80**, 284 (1991)
126. D.L.Black, B.A.Goldberger, Y.H.Caplan. *Clin. Chem.*, **33**, 367 (1987)
127. C.Lora-Tamayo, T.Tena, G.Tena. *J. Chromatogr.*, **422**, 267 (1987)
128. U.Wieczorek, N.Nagakura, M.H.Zenk. *Phytochem. Soc. Symp.* London, 1984. Abstr. 36
129. P.A.Glare. *Ther. Drug Monit.*, **13**, 1 (1990)
130. D.J.Litman, R.H.Lee, H.J.Jeong, H.K.Tom, S.N.Stiso, N.C.Sizto, E.F.Ullman. *Clin. Chem.*, **29**, 1598 (1983)
131. R.Ross, C.A.Horwitz, H.Hager, M.Usategui, M.D.Burke, P.C.J.Ward. *Clin. Chem.*, **21**, 139 (1975)
132. D.Laurie, A.J.Manson, A.Mounsey, F.J.Rowell, J.Sevior. *Analyst*, **112**, 687 (1987)
133. D.L.Colbert, G.Gallacher, P.Ayling, G.L.Turner. *Clin. Chim. Acta*, **171**, 37 (1988)
134. D.L.Colbert, D.S.Smith, A.M.Sidki. *Ann. Clin. Biochem.*, **23**, 37 (1986)
135. М.А.Мягкова, М.В.Лушникова. *Хим.-фарм. журн.*, **24**, 76 (1990)
136. A.Francheshin, L.Morosine. *Clin. Chem.*, **33**, 303 (1987)
137. A.V.Sereda, I.E.Sukhov, B.M.Zolotarev, I.V.Yartseva, O.N.Tolkachev. *Tetrahedron Lett.*, **33**, 4205 (1992)
138. С.Н.Еременко, И.Е.Сузов, Н.П.Данилова, О.Н.Толкачев, Р.Г.Василов, А.И.Мирошников. *Хим.-фарм. журн.*, **26**, 100 (1992)
139. M.J.Kogan, D.J.Pierson, M.M.Durkin, N.J.Willson. *J. Chromatogr. Biomed. Appl.*, **490**, 236 (1989)
140. C.R.Hamlin. *Clin Chem.*, **34**, 158 (1988)
141. S.K.Rouan, I.G.Otterness, D.J.Gans, C.T.Rhodes. *Drug. Dev. Ind. Pharm.*, **17**, 2391 (1991)

IMMUNOASSAY OF ALKALOIDS

S.K.Volkov

Scientific-Industrial Association «All-Russian Institute of Medicinal and Aromatic Plants»
7 Grina St., 113628 Moscow, Russian Federation

Alkaloids are plant origin physiologically active compounds widely used in medical practice. Literary information about developments and applications of immunochemical methods for alkaloid analysis is reviewed.

Bibliography – 141 references.

Received 20th April, 1993