

Иммунный анализ низкомолекулярных физиологически активных веществ растительного и микробного происхождения, встречающихся в растениях

С.К.Волков

Научно-производственное объединение

«Всероссийский институт лекарственных и ароматических растений»

113628 Москва, ул. Грина, 7

Рассматривается применение иммунных методов для анализа как эндогенных, так и экзогенных низкомолекулярных физиологически активных веществ, встречающихся в растениях.

Библиография — 161 ссылка.

Оглавление

I. Введение	93
II. Иммунный анализ	93
III. Заключение	101

I. Введение

Определение содержания биологически активных веществ в тканях растений представляет собой одну из важнейших частей науки о лекарственных растениях. Содержание физиологически активных веществ в растительном сырье определяет не только экономические показатели производства ряда лекарственных препаратов, но и их качество.

Селекционная работа, направленная на отбор наиболее продуктивных сортов растений, опирается на количественный анализ биологически активных веществ в различных частях растений. Развитие биотехнологических методов культивирования клеток и тканей растений также не может обойтись без количественного анализа биологически активных веществ. Так как ряд биологически активных соединений растительной природы является наркотиками, то количественное определение этих веществ важно и с криминалистической точки зрения.

Наиболее важными группами биологически активных веществ растительного происхождения являются алкалоиды, в их числе и ряд наркотических веществ, терпеноиды, флавоноиды, антроны, стероидные соединения, регуляторы роста и развития растений и некоторые другие. В тканях растений, особенно тех, которые употребляются в пищу человеком и как корм для скота, часто приходится определять некоторые вещества, не являющиеся эндогенными, а попадающие в растительный материал извне. К ним относятся антибиотики и микотоксины.

Настоящий обзор представляет собой продолжение ранее опубликованной работы по иммунному анализу алкалоидов,¹ поэтому здесь алкалоиды рассматриваться не будут,

за исключением тех групп алкалоидов, которые не были рассмотрены в предыдущем обзоре. По той же причине не будут здесь рассмотрены и наркотические вещества алкалоидной природы (опиаты и алкалоиды группы кокаина).

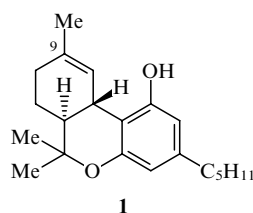
Основные преимущества и недостатки иммунных методов количественного анализа, подходы к иммунному анализу низкомолекулярных соединений и наиболее распространенные методы иммунного анализа также были достаточно подробно рассмотрены в предыдущем обзоре.

II. Иммунный анализ

1. Наркотические вещества

К наркотикам растительного происхождения относятся не только многие алкалоиды, но и ряд соединений неалкалоидной природы, обладающих биологической активностью. Не последнее место среди них занимают биологически активные вещества конопли — каннабиноиды.

Каннабиноиды составляют группу сильных наркотиков — галлюциногенов. Среди каннабиноидов особенно опасны тетрагидроканнабинолы. Так, Δ^9 -тетрагидроканнабинол (**1**) (или Δ^1 -тетрагидроканнабинол при иной нумерации атомов), является основным компонентом гашиша и марихуаны, которые готовят из индийской конопли (*Cannabis sativa*). При действии на организм в дозах порядка 10^{-5} – 10^{-6} г на один килограмм веса **1** вызывает расстройство психики, снижение кровяного давления и понижение болевой чувствительности.



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.

Дата поступления 28 ноября 1993 г.

В настоящее время существует несколько иммунных методов анализа **1**. Флуоресцентнополяризационный метод прост и удобен при анализе большого количества образцов, однако его чувствительность ($5 \cdot 10^{-5} \text{ г} \cdot \text{л}^{-1}$) не всегда достаточна.² Более высокой чувствительностью обладает иммунофлуоресцентный метод с использованием антител, ковалентно связанных с магнитными частицами, что позволяет легко проводить стадию разделения связанного и свободного антигена; в результате чувствительность метода достигает $5 \cdot 10^{-6} \text{ г} \cdot \text{л}^{-1}$ (см.²).

Существуют также гомогенный иммуноферментный метод определения каннабиноидов,³ чувствительность которого составляет $(1.5 - 2.5) \cdot 10^{-2} \text{ г} \cdot \text{л}^{-1}$, и твердофазный гетерогенный иммуноферментный метод.⁴ В последнем случае иммуногенный конъюгат получали окислением **1** феррицианидом калия и конъюгацией полученного производного с белком. Чувствительность твердофазного иммуноферментного метода достигает $10^{-4} \text{ г} \cdot \text{л}^{-1}$.

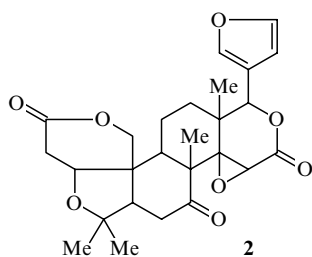
Диагностические наборы фирмы «Abbot» (Великобритания) позволяют обнаруживать **1** в концентрации $9 \cdot 10^{-6} \text{ г} \cdot \text{л}^{-1}$.

Иммунные методы анализа используются пока только при определении содержания каннабиноидов и их метаболитов в биологических жидкостях человека,^{6,7} но не для количественного анализа каннабиноидов в растениях.

2. Терпеноиды

Большую группу биологически активных соединений растительного и животного происхождения составляет класс терпеноидов, или изопреноидов, первые представители которого были выделены из скипидара. К терпеноидам относятся некоторые природные гликозиды (сапонины), желтые и оранжевые пигменты растений (каротиноиды, ксантофиллы), каучук, продукты живицы и ряд других веществ.

Лимонин (2). Этот тритерпен концентрируется в семенах многих типов растений вида *Citrus* (*Rutaceae*) и при попадании в лимонный сок придает ему избыточную горечь. Ввиду того, что количество **2** в растении может сильно различаться от партии к партии, его содержание необходимо контролировать, так как горечь сока резко возрастает в диапазоне концентраций **2** от 10^{-7} до $10^{-6} \text{ г} \cdot \text{л}^{-1}$. Это требование привело к разработке ряда иммунных методов анализа **2**.



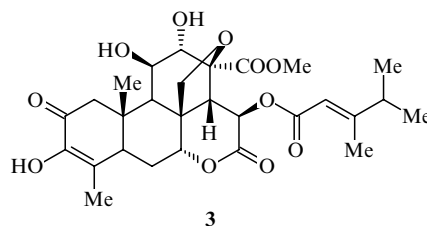
Для получения иммуногенного конъюгата **2** присоединяли к сывороточному альбумину крупного рогатого скота (BSA) с помощью (аминокси)уксусной кислоты. Антисыворотка к этому конъюгату была использована для разработки радиоиммунных методов анализа с применением конъюгата метилового эфира 7-(О-карбоксиметил)лимонина с [¹²⁵I]-меченым аминоксипроизводным тирозина,⁸ а также [³H]-меченого лимонина.⁹ Эта же антисыворотка была использована при разработке иммуноферментного метода анализа с использованием 7-(О-карбоксиметил)оксима **2**, конъюгированного с щелочной фосфатазой карбодимидным методом.¹⁰ Радиоиммунные методы с использованием [¹²⁵I]- и [³H]-меченых соединений позволяют определять **2** в диапазонах $10^{-10} - 10^{-7} \text{ г}$ и $5 \cdot 10^{-10} - 10^{-7} \text{ г}$ соответственно. Иммуноферментный метод, хотя и имеет несколько меньшую

чувствительность (диапазон определения $10^{-9} - 10^{-7} \text{ г}$), но все же позволяет работать с более стабильными веществами и производить анализ за один час.

Радиоиммунный метод был использован для исследования распределения **2** в тканях *Citrus paradisi*.⁸ Иммуноферментный метод применялся для анализа образцов лимонного сока и показал хорошее совпадение с результатами анализа методом ВЭЖХ, причем иммуноферментный метод не требует особой подготовки образца и занимает меньше времени.¹⁰

Набор для иммуноферментного анализа **2** выпускается фирмой «Idetek» (США).¹¹

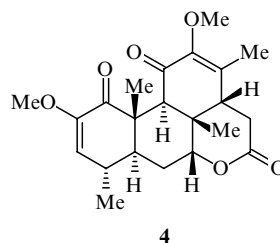
Бруцеантин (3). Этот секотритерпеноид, выделенный из *Brucea antidysenterica* (*Simaroubaceae*), обладает значительной противоопухолевой активностью. Как и для других лекарственных средств, иммунные методы анализа сильно облегчают исследования фармакологических свойств **3**.



При разработке радиоиммунного метода анализа **3** конъюгировали с BSA с помощью янтарного ангидрида и получали антисыворотку к этому конъюгату.¹² Радиоиммунный анализ с использованием [³H]-ацетилбруцеантина, полученного обработкой **3** [³H]-ацетангидридом, позволяет определять **3** в диапазоне $5 \cdot 10^{-10} - 5 \cdot 10^{-8} \text{ г}$ (см.¹²).

Метод использовали при изучении распределения **3** в тканях тела мыши и выведения его из организма собаки; для анализа **3** в растениях иммунные методы не применялись.

Куассин (4). Этот секотритерпеноид, чрезвычайно горький на вкус, был выделен из *Quassia amara*. Он используется для придания горечи в пищевой промышленности. Для контроля производства пищевых продуктов, а также для анализа клонов растительных клеток были разработаны иммунные методы анализа **4**.



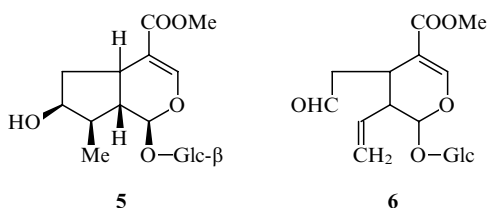
При создании иммуноферментного метода δ-лактон куассина превращали в производное со свободной карбоксильной группой, которое стабилизировали эпимеризацией в изокуассиновую кислоту.¹³ Изокуассиновую кислоту конъюгировали с BSA методом смешанных ангидридов и иммунизировали этим конъюгатом кролика. Конкурентный конъюгат **4** с гемоцианином виноградной улитки (KLH) получали карбодимидным методом. Иммуноферментный метод с использованием козьих антител против иммуноглобулинов G (Ig G) кролика, конъюгированных со щелочной фосфатазой, позволяет определять концентрацию **4** в диапазоне $2 \cdot 10^{-9} - 2 \cdot 10^{-7} \text{ г}$. Значительные перекрестные реакции отмечены для метилового эфира изокуассиновой кислоты, α- и β-неокуассина, 14,15-дегидрокуассина, 12- и 18-гидроксикуассина, а также нигакилактонов и пикразина А из *Picrasma excelsa*.

Другой метод основан на применении антисыворотки к 18-гидроксикуассину, конъюгированному с BSA с помощью янтарного ангидрида. В остальном же метод подобен предыдущему и позволяет определять куассин в диапазоне $5 \cdot 10^{-9} - 10^{-7}$ г (см.¹⁴). Метод использовали для изучения распределения иммунореактивных веществ в тканях *Q. amara*, *Q. indica* и *P. excelsa*.¹⁴

Иммуноферментный метод определения куассиноидов был использован при исследовании тканей и культуры клеток *Ailanthus altissima*.¹⁵

3. Иридоидные гликозиды

Монотерпеновые гликозиды **логанин (5)** и **секологанин (6)** являются промежуточными продуктами биосинтеза многих алкалоидов.



Для исследования биогенетических превращений соединений **5** и **6** разработаны радиоиммунные методы анализа.¹⁶ Логанин превращали в 6'-карбоксильное производное по остатку глюкозы и конъюгировали его с BSA карбодимидным методом. Радиоиммунный метод с использованием [³H]-меченого производного, полученного периодатным расщеплением **5** с последующим восстановлением с помощью NaB^3H_4 , позволяет определять концентрацию **5** в диапазоне $5 \cdot 10^{-10} - 10^{-7}$ г. Отмечены перекрестные реакции с **6** — 0.07% и с агликоном **5** — 30%.

Метод использовали для определения **5** и изучения его превращения в **6** в культурах клеток *Weigelia gigantiflora* и *Lonicera tatarica*.¹⁶

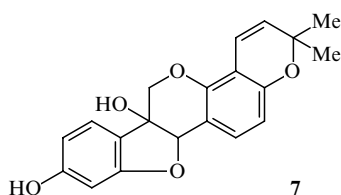
4. Сесквитерпены

Сесквитерпеноидные соединения содержатся в различных эфирных маслах и смолах (бальзамах) растений. В группу сесквитерпенов входят такие вещества, как ювенильные гормоны, душистые вещества, сесквитерпеновые лактоны и фитоалексины, а также ихтиотоксины.

5. Фитоалексины

В группу фитоалексинов входят высокоактивные соединения, защищающие растения от болезней. Они синтезируются растениями только в ответ на травмы тканей, поэтому их еще называют стрессовыми метаболитами. Систему выработки фитоалексинов растениями иногда образно называют иммунной системой растений. Фитоалексины обладают антимикробными свойствами.

Глицеоллин I (7), основной фитоалексин, который накапливается в местах травм тканей или при инфекции сои (*Glycine max* L. Merril).



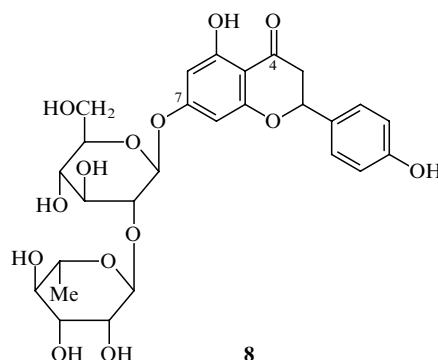
При синтезе иммуногенного конъюгата **7** сначала получали производное *n*-аминогиппуровой кислоты с BSA. Для этого смесь *n*-аминогиппуровой кислоты и BSA при pH 6.4 обрабатывали гидрохлоридом 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодимида.¹⁷ Полученное производное подвергали обработке NaNO_2 при pH 1.5 и 0°C (избыток NaNO_2 разрушали сульфаматом аммония), а затем конъюгировали с **7** при pH 9.0 и 0°C (см.¹⁸).

Антисыворотка к полученному конъюгату высокоспецифична по отношению к **7**. Структурные изомеры **7** — глицеоллин II и глицеоллин III — узнаются антисывороткой довольно слабо: 5.7 и 1.0% соответственно. Радиоиммунный метод анализа с использованием [¹²⁵I]-глицеоллина I позволяет определять **7** в концентрации $1 \cdot 10^{-5}$ моль · л⁻¹ (см.¹⁹). Метод был использован при определении содержания **7** в тканях сои.

6. Флавоноиды

В группу флавоноидов объединяют оксипроизводные флаванона, флаванолола, катехинов, флавана, флавонола, а также антоцианы. Эти вещества содержатся во многих растениях и обладают Р-витаминной активностью.

В плодах *Citrus* (*Rutaceae*) обнаружен ряд горьких флавоноид-7-О-неогесперидозидов. Основной из них — **нарингин (8)**. Содержание **8** в грейпфруте (*C. paradisi*) может достигать такого уровня, когда и сами плоды, и получаемый из них сок приобретают избыточную горечь. Для быстрого контроля качества продукции разработано два радиоиммунных метода анализа **8**. При получении иммуногенного конъюгата аминогруппы BSA модифицировали *n*-аминогиппуровой кислотой, а затем диазотированием соединяли с **8**. Радиоиммунный метод анализа с использованием [¹²⁵I]-меченого конкурентного конъюгата позволяет определять **8** в диапазоне $5 \cdot 10^{-9} - 2 \cdot 10^{-7}$ г. Метод очень чувствителен к природе сахаридного остатка в положении 7, но не чувствителен к изменениям в ароматическом кольце. Все флавоноид-7-О-неогесперидозиды узнаются антисывороткой в одинаковой степени.²⁰



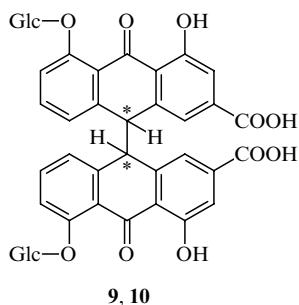
В другом случае для получения иммуногенного конъюгата 4-кетогруппу **8** активировали аминоксиксусной кислотой и присоединяли к BSA методом смешанных ангидридов. [³H]-Меченый конъюгат получали конденсацией (4-О-карбоксиметил)оксима **8** с 5-аминолевулиновой кислотой методом смешанных ангидридов и восстановлением боковой цепи с помощью NaB^3H_4 . Радиоиммунный метод анализа позволяет определять **8** в диапазоне $5 \cdot 10^{-10} - 5 \cdot 10^{-8}$ г (см.²¹).

Оба эти метода были применены для определения содержания флавоноид-7-О-неогесперидозидов в соке грейпфрута и при изучении распределения иммунореактивных веществ в тканях грейпфрута.²¹ Показано, что данные, полученные радиоиммунным методом, хорошо совпадают с результатами анализа методом ВЭЖХ. Второй метод использовали

также для анализа сока грейпфрута в условиях крупномасштабного производства.

7. Антроны

Изомерные диантроновые глюкозиды — **сеннозиды А (9) и В (10)**, выделенные из ряда видов *Cassia* (*Caesalpinaceae*) — являются сильнодействующими слабительными средствами и одними из наиболее широко используемых в фармацевтической практике веществ растительного происхождения. Это стимулировало разработку радиоиммунного метода анализа димерных глюкозидов.²²



9, 10

Для получения иммуногенного конъюгата **10** присоединили к BSA карбодиимидным методом. Радиоиммунный метод с использованием $[^3\text{H}]$ -8-глюкозидейнантрона, полученного восстановлением **10** с помощью NaB^3H_4 , позволяет определять **10** в диапазоне $4 \cdot 10^{-10}$ – $8 \cdot 10^{-9}$ г. Перекрестные реакции отмечены для **9** — 75%, сеннозида С — 100%, 8-глюкозидейнантрона — 55%, сеннидинов А — 25% и В — 10%.

Метод использовали для изучения распределения **9** и **10** в различных частях *Cassia augustifolia*.

8. Стероиды

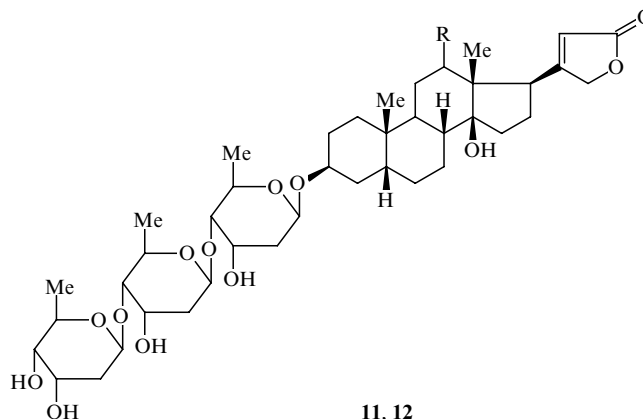
Большая группа стероидных гликозидов растительного и животного происхождения объединена под общим названием — сердечноактивные или кардиотонические вещества. В малых концентрациях они нормализуют работу сердечной мышцы, а в больших дозах вызывают остановку сердца в систоле. В отличие от своих агликонов, сердечные гликозиды концентрируются в сердечной мышце, и их содержание в ней в 10–40 раз выше, чем в других тканях организма.

а. Карденолиды дигиталиса

Стимуляторы миокарда дигоксин и дигитоксин выделяют из листьев *Digitalis lanata* (*Scrophulariaceae*), где они накапливаются вместе с родственными им глюкозидами.

Дигоксин (11, R = OH) является одним из веществ растительного происхождения, для анализа которых иммунные методы применяются очень широко.

Первые попытки создания иммунного метода анализа **11** относятся к 1967 г., когда были получены специфичные к **11** антитела.²³ В 1970 г. был разработан радиоиммунный метод анализа **11** для применения в клинических условиях,^{24, 25} а затем и методы, применимые для определения **11** в тканях растений.^{26–28} Во всех этих методах используется антисыворотка кролика к конъюгату **11** с BSA или сывороточным альбумином человека (HSA), полученным методом периодатного окисления. Диапазон определения **11** составляет $8 \cdot 10^{-10}$ – $4 \cdot 10^{-8}$ г с использованием $[^3\text{H}]$ -дигоксина (см.²⁵) и $5 \cdot 10^{-10}$ – $5 \cdot 10^{-9}$ г с использованием метилового эфира дигоксин- $[^{125}\text{I}]$ -тирозина.²⁶ Исследование перекрестных реакций с большим количеством родственных структур показало, что полученная сыворотка позволяет определять сумму дигитоксигениновых гликозидов в экстрактах *D. lanata*.



11, 12

Иммунные методы были использованы для определения уровня **11** в сыворотке крови пациентов²⁵ и для изучения распределения **11** в тканях *D. lanata*.^{26, 27} Установлено, что основное количество **11** накапливается в листьях за 8–12 недель. Радиоиммунный метод дает возможность определять оптимальные сроки сбора листьев. Этот же метод был применен для селекции наиболее продуктивных по **11** растений.²⁸ С его помощью определяли содержание **11** в тканях *D. lanata* и *D. purpurea* в процессе роста этих растений.²⁹

В последующие годы было разработано много иммунных методов анализа **11**: радиоиммунные,^{30–32} иммуноферментные,^{29, 32–34} иммунолюминесцентные,^{29, 35} флуороиммунный,³⁶ комбинированный жидкостнохроматографически-иммунный,³⁷ иммунные методы с измерением степени поляризации флуоресценции,^{32, 38–43} иммунный метод с использованием частиц полистирольного латекса,⁴⁴ хемилюминесцентный иммуноферментный метод,⁴⁵ гетерогенный конкурентный иммуноферментный метод с электрохимической детекцией,⁴⁶ флуоресцентный метод с переносом энергии возбуждения,^{32, 47–49} а также ряд других.^{42, 50} Разработанные методы использовались для анализа **11** в сыворотке,^{32, 33, 42, 47–49, 51–58} плазме,^{30, 39, 42, 49, 59} моче,³⁰ слюне,³¹ крови пациентов,⁶⁰ а также для исследования фармакокинетики **11**.⁶¹ Лишь один из этих методов был применен при определении содержания **11** в культуре клеток корней *D. lanata*.³³

Сравнение иммунных методов между собой, а также с методами на основе высокоэффективной жидкостной хроматографии показали, что ряд родственных дигоксину веществ, часто присутствующих в образце, а также некоторые метаболиты **11** заметно влияют на результаты определения **11** иммунными методами.^{30, 32, 38–40, 51–57, 62, 63} Попытки исключить это влияние привели к появлению иммунных методов на основе моноклональных антител⁵⁸ и к введению стадий дополнительной очистки анализируемых образцов.^{37, 43, 44, 64}

Многие фирмы выпускают наборы для иммунного анализа **11**. Наиболее широкое распространение получили наборы таких фирм, как «Syva Corp.», «E. I. du Pont de Nemours», «New England Nuclear», «Amersham Corp.» (США) и ряда других. Эти наборы широко используются в клинической и лабораторной практике для определения **11** в плазме и сыворотке крови, моче и других физиологических жидкостях. На основе одного из таких наборов — «Digoxin RIA kit» фирмы «Farnos Diagnostica» (Финляндия) — разработан радиоиммунный метод анализа суммы дигоксигениновых гликозидов в растении *D. lanata*.⁶⁴

Дигитоксин (12, R = H). В 1968 г. была выделена антисыворотка кролика к конъюгату дигитоксигенина (агликона) с BSA, полученному 3-О-сукцинированием и карбодиимидной конденсацией.⁶⁵ Радиоиммунный метод с использованием конъюгата метилового эфира 3-О-сукцинилдигитоксигенина с $[^{125}\text{I}]$ -тирозином, позволяет определять **12** в диапазоне $2 \cdot 10^{-10}$ – $2 \cdot 10^{-8}$ г. Перекрестная реакция с **11** —

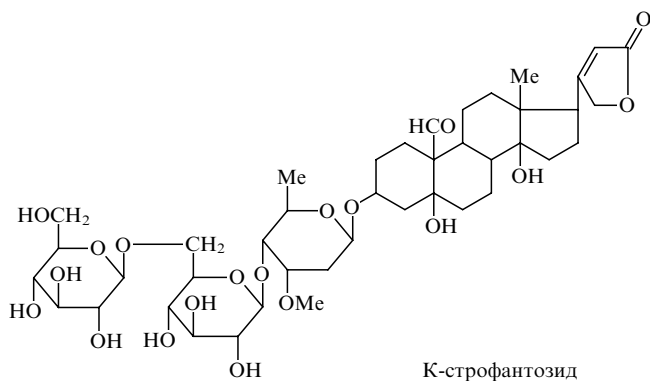
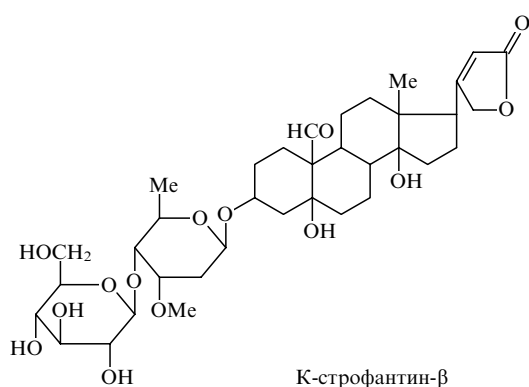
10%. Метод применяли для определения содержания **12** в сыворотке крови пациентов.

Разработанный впоследствии метод анализа крови пациентов с измерением степени поляризации флуоресценции показал такие же результаты, что и радиоиммунный метод.⁶⁶

Радиоиммунный метод с использованием [¹²⁵I]-дигитоксигенина был применен для анализа **12** в образцах мочи после предварительной очистки экстракта методом обращенно-фазовой ВЭЖХ.⁶⁷ Для анализа **12** в растениях иммунные методы пока не применялись.

6. Строфантин К

Строфантин К (**13**) является типичным представителем сердечных гликозидов с карденолидным агликоном. Он представляет собой смесь сердечных гликозидов К-строфантина-β и К-строфантозида. Строфантин содержится в различных видах строфанта (*Strophanthus*).



Иммуногенный конъюгат с BSA получали периодатным окислением **13**.⁶⁸ Использование этого конъюгата позволило получить специфичные к **13** антитела и разработать иммуноферментный метод анализа, позволяющий определять **13** в диапазоне концентраций 10^{-9} – 10^{-3} моль · л⁻¹ (см.⁶⁹). Впоследствии были разработаны иммуноферментные методы анализа **13** с использованием антигена, иммобилизованного на АН-агарозе,⁷⁰ на нитроцеллюлозных мембранах,⁷¹ а также на активированных полистирольных шариках.⁷² Последние методы позволяют определять **13** в диапазоне концентраций 10^{-8} – 10^{-3} моль · л⁻¹; чувствительность метода достигает 10^{-10} моль · л⁻¹ (см.^{71,72}). Эти методы разрабатывались для анализа содержания **13** в крови и других биологических жидкостях пациентов; для анализа **13** в тканях растений иммунные методы пока не применялись.

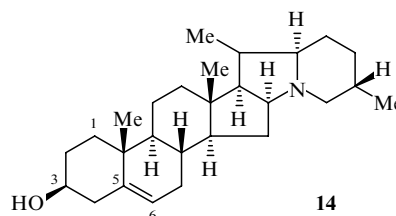
9. Стероидные гликоалкалоиды пасленовых

Растения рода *Solanum* (*Solanaceae*) продуцируют ряд гликоалкалоидов стероидной природы. Некоторые представители пасленовых с этой точки зрения наиболее интересны.

1. Картофель (*S. tuberosum*) содержит ряд токсичных производных соланидина горького вкуса, главным образом α-соланин и α-хаконин. Анализ этих соединений важен для селекционных работ. Кроме того, при неправильном хранении клубней или при выращивании картофеля в неблагоприятных климатических условиях содержание этих гликоалкалоидов может сильно возрастать, ухудшая вкусовые качества картофеля.

2. В листьях ряда видов пасленовых (*S. laciniatum* и *S. aviculare*) накапливается алкалоид соласодин, служащий исходным материалом для синтеза ряда стероидных препаратов — прогестерона и кортикостероидов.

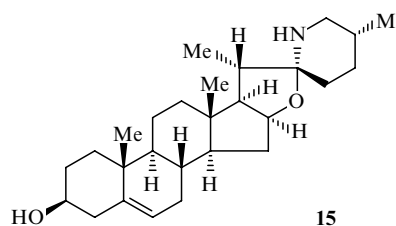
Гликоалкалоиды, гликозидные производные соланидина (14). В 1979 г. был разработан радиоиммунный метод анализа **14**, основанный на применении антисыворотки к **14**, конъюгированному с BSA через 3-гидроксильную группу.⁷³ Этот метод позволяет определять **14** в диапазоне $2 \cdot 10^{-10}$ – $5 \cdot 10^{-8}$ г. Перекрестная реакция с α-соланином — 28%.



В 1983 г. методом периодатного расщепления был синтезирован конъюгат α-соланина с BSA.^{74,75} Антисыворотка кролика к этому конъюгату одинаково чувствительна к **14**, α-соланину, α-хаконину и демиссидину, что очень удобно для определения суммарного содержания гликоалкалоидов в клубнях картофеля. Радиоиммунный метод с использованием [³H]-меченного **14** позволяет определять эти гликоалкалоиды в диапазоне $2 \cdot 10^{-10}$ – $8 \cdot 10^{-9}$ г,⁷⁶ а иммуноферментный метод — в диапазоне 10^{-11} – 10^{-9} г.⁷⁵

Радиоиммунный метод был использован для определения **14** в сыворотке крови человека.^{76,77} Проведено сравнение результатов анализа, полученных иммуноферментным методом и химическими методами. Установлено, что их результаты хорошо совпадают, однако иммуноферментный метод более прост, быстр и менее подвержен техническим ошибкам.^{78,79}

Гликоалкалоиды, гликозидные производные соласодина (15). Для получения иммуногенного конъюгата смесь соласодина и соламаргина (2:3) подвергали периодатному расщеплению и присоединяли к HSA.⁷⁵ Радиоиммунный метод с использованием [³H]-меченых гликоалкалоидов, основанный на применении антисыворотки кролика, позволяет определять производные **15** в диапазоне 10^{-9} – 10^{-7} г. Отмечены реакции с соласонином — 100%, соламаргином — 110%, томатином — 104%, с агликонами томатидина — 21%, соладульцина — 5% и **15** — 7%.



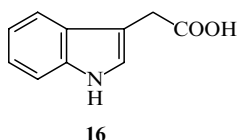
Этот метод применяли при изучении содержания **15** в тканях *S.laciniatum* и *S.aviculare*.⁷⁵

10. Регуляторы роста и развития растений

Растительные биорегуляторы являются низкомолекулярными продуктами вторичного метаболизма растений. Среди них различают фитогормоны, природные стимуляторы и ингибиторы.

К фитогормонам относятся ауксины, гиббереллины, абсцизовая кислота, цитокинины и этилен. В отличие от других физиологически активных соединений, фитогормоны являются общими для всех растений биорегуляторами. Они синтезируются в активно делящихся клетках, после чего транспортируются в другие органы и ткани, где осуществляют химический запуск физиологических программ. Молекулярные механизмы действия растительных гормонов, по-видимому, связаны с регуляцией белкового синтеза, активности ферментов и транспорта через биологические мембраны.

Ауксины представляют собой группу природных соединений, стимулирующих клеточное деление (митоз), корнеобразование, дыхание и синтез белка в растениях. Главным представителем ауксинов является индолилуксусная кислота (**16**).

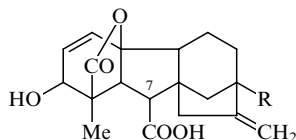


16

Для синтеза иммуногенного конъюгата **16** с BSA использовали реакцию Манниха; при этом **16** соединяется с белком по атому азота.⁷⁶

Образование связи по карбоксильной группе (метод смешанных ангидридов) дает более стабильные конъюгаты, вызывающие несколько бо́льший иммунный ответ как у кроликов,⁷⁷ так и у мышей.⁷⁸

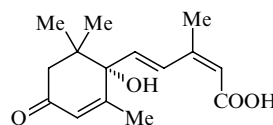
Гиббереллины представляют собой тетрациклические моно-, ди-, и трикарбоновые кислоты дитерпеноидной природы. Механизм биологического действия гиббереллинов исследован недостаточно. Известно, что в зернах ячменя они изменяют свойства мембран и индуцируют синтез α -амилазы, а в тканях других растений изменяют наборы РНК и функционирующих ферментов. В настоящее время в природе найдено около 70 гиббереллинов и для некоторых из них [в том числе для гиббереллинов A_3 (**17**, R = OH), A_7 (**18**, R = H)] получены антисыворотки и разработаны иммунные методы анализа.^{79–83}



17, 18

Для получения иммуногенных конъюгатов используют образование амидной связи между карбоксильной группой C(7) гиббереллина и аминогруппами белка.⁷⁹ Альтернативно используют метод смешанных ангидридов, однако в этом случае из-за стерических затруднений получаются конъюгаты с довольно низкой гаптенной плотностью. Для повышения гаптенной плотности между гаптеном и белком вводят спейсер.^{82, 83}

Абсцизовая кислота (19) является высокоспецифичным ингибитором роста высших растений. Она переводит растения в состояние покоя, вызывает увядание и опадение листьев и плодов.

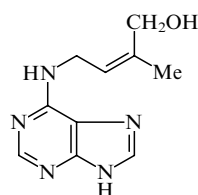


19

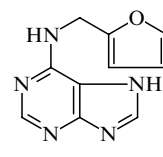
Для синтеза конъюгатов **19** могут использоваться и карбоксильная,^{84, 85} и карбонильная⁸⁵ группы. Для получения конъюгата **19** с белком по карбоксильной группе к раствору гаптена и белка в смеси диметилформамида с водой при pH 8 добавляют гидрохлорид 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимида.⁸⁵ Антисыворотка к такому конъюгату взаимодействует с протонированной формой **19** и ее эфирами, но почти не взаимодействует с депротонированной **19**, которая главным образом и существует в условиях проведения иммуноанализа (pH 7–8).

Для синтеза конъюгата по карбонильной группе сначала проводят реакцию **19** с гидразидом тирозина в присутствии уксусной кислоты с целью получения тирозилгидразона **19**. Параллельно, взаимодействием *n*-аминогиппуровой кислоты с BSA в присутствии 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимида получают *n*-аминогиппурат BSA. Модифицированный белок обрабатывают NaNO_2 при pH 1.5 и сульфаматом аммония и конденсируют с тирозилгидразоном **19** при pH 9 (см.⁸⁵). Антитела к такому конъюгату более предпочтительны в тех случаях, когда предполагается анализировать **19** в виде аниона. Такие антитела очень слабо или вообще не взаимодействуют с протонированной формой **19**.

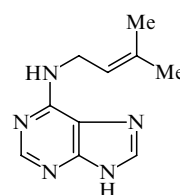
Цитокинины представляют собой особую группу регуляторов роста и развития растений, стимулирующих клеточное деление (цитокinesis). В эту группу входят N(6)-производные аденина — зеатин (**20**), кинетин (**21**) и изопентениладенин (**22**). В растениях они часто встречаются в виде менее активных рибозидов и риботидов и входят в качестве одной из составных частей в структуры некоторых транспортных РНК растений.



20



21



22

Механизм биологического действия цитокининов, по-видимому, связан с усилением биосинтеза ДНК, РНК и белка, а также с их влиянием на функционирование биологических мембран.

Цитокинины традиционно анализировали биологическими методами, однако эти методы обладают низкой чувствительностью и селективностью.^{86, 88} Физико-химические и иммунохимические методы анализа превосходят биологические методы по чувствительности, специфичности, воспроизводимости и требуют меньше времени.^{89, 90}

Получение иммуногенных конъюгатов цитокининов основано на реакции периодатного окисления рибозида до соответствующего альдегида, который может взаимодействовать с аминогруппами белка-носителя. Для этого рибозид цитокинина в метаноле обрабатывали периодатом натрия, избыток которого разрушали этиленгликолем. К раствору

белка-носителя при pH 9.3 прибавляли полученный из рибозида цитокинина диальдегид; образующийся при этом комплекс стабилизировали борогидридным восстановлением.⁹¹

Первые радиоиммунные методы анализа, позволяющие определять **22** в количестве около 10^{-8} г, были использованы при исследовании транспортной РНК растений.^{92–94} Анализ перекрестных реакций показал, что полученная антисыворотка к конъюгату **22** с белком взаимодействует с фосфатом **22** (100%) и с изопентениладенином (10%).⁹⁴ Взаимодействие этой антисыворотки с **21** в 100 раз, а с аденозином в 300000 раз слабее, чем с **22**.⁹⁴

Применение иммунного метода для анализа цитокининов в растении описано в 1979 г., однако антитела к **22** сильно взаимодействовали с *транс*-зеатинрибозидом и дигидрозеатинрибозидом.⁹⁵

Чувствительный и специфичный радиоиммунный метод определения *транс*-**20** был разработан в 1980 г.⁹⁶ Предел определения *транс*-**20** — несколько фемтомолей. С *цис*-**20** полученные антитела не взаимодействовали.

Антисыворотки к **22** позволили достичь предела определения **22** в $5 \cdot 10^{-11}$ – 10^{-9} г.^{89, 97–99} Эти антисыворотки слабо взаимодействуют с цитокининами зеатиновой группы, однако заметно реагируют с 6-бензиламинопуриновыми цитокининами.

Установлено, что взаимодействие молекул цитокинина с соответствующими антителами зависит главным образом от природы заместителя у атома N(6). Из-за значительных перекрестных взаимодействий для точного анализа цитокининов иммунными методами приходится вводить стадии предварительной хроматографической очистки.¹⁰⁰ Для этой цели используется колоночная хроматография на фосфате целлюлозы и сефадексе LH-20 (см.^{100, 101}). Однако эти способы требуют довольно много времени, поэтому были предложены более быстрые способы очистки с помощью ТСХ⁹⁹ и ВЭЖХ.¹⁰² Выбор подходящего сорбента при ВЭЖХ позволяет добиться полного разделения анализируемых цитокининов. Как правило, для этого используются обращенно-фазовые сорбенты — Bondapak C 18,^{102–104} Lichrosorb RP-8,¹⁰⁵ Hiperasil ODS,^{106, 107} Sep-Pak C 18.^{97, 108} Предварительная очистка образца может быть произведена с использованием иммуноаффинной колонки.¹⁰⁹

11. Прочие соединения

В этом разделе обзора будут рассмотрены иммунные методы анализа соединений, не являющихся эндогенными для растений, но которые бывает необходимо определять в растительном материале. В первую очередь это нежелательные вещества в растениях, предназначенных для использования в пищу, образующиеся при микробном заражении растительного материала.

а. Антибиотики

В ряде случаев растительное сырье, вследствие заражения его некоторыми микроорганизмами, может быть загрязнено антибиотиками, продуцируемыми этими микроорганизмами.

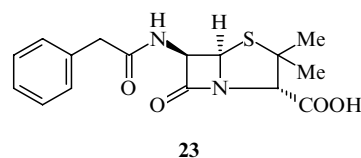
В настоящее время к антибиотикам относят природные вещества и продукты их химической модификации, способные в низких концентрациях (10^{-6} – 10^{-5} г·л⁻¹) подавлять развитие бактерий, низших грибов, простейших, вирусов и клеток злокачественных опухолей.

В группу β-лактамов антибиотиков входят пенициллины, цефалоспорины, цефамицины и некоторые другие антибиотики. Механизм действия β-лактамов антибиотиков состоит в подавлении синтеза бактериальной клеточной стенки.

Пенициллины обладают широким спектром антибактериального действия, проявляя как бактериостатическую, так и бактерицидную активность в отношении многих грамположительных микроорганизмов (стафилококков, пневмококков, стрептококков), некоторых грамотрицательных кокков (гонококков, менингококков), палочек сибирской язвы, клостридий, спирохет и некоторых грибов.

При иммунном анализе пенициллинов возникают серьезные проблемы, связанные с их нестабильностью: пенициллины легко гидролизуются в водных растворах, причем продукты гидролиза способны связываться с белками. Из-за этого чувствительность, степень перекрестного взаимодействия и параметры связывания антител с антигенами меняются в зависимости от степени гидролиза пенициллинов и состава буферного раствора. Гидролиз β-лактамного кольца пенициллинов в 0.1 М растворе NaOH или под действием β-лактамазы также влияет на эти параметры. Дополнительным источником ошибок является неспецифическое связывание пенициллинов с белками, присутствующими в анализируемом образце.¹¹⁰

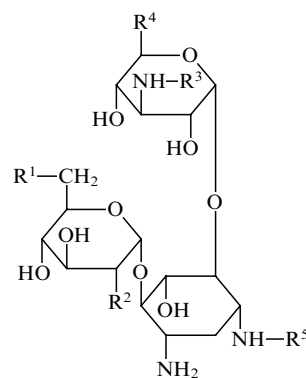
Несмотря на сложности разработки и использования иммунных методов для анализа пенициллинов, их описание все чаще появляется на страницах научной печати. Так, разработан иммуноферментный метод определения пенициллина G (**23**) и его производных в коровьем молоке и сыворотке крови крупного рогатого скота.¹¹¹



23

Аминогликозидные антибиотики — многочисленное семейство антибиотиков, насчитывающее более ста природных соединений, продуцируемых микроорганизмами родов *Streptomyces*, *Micromonospora* и *Bacillus*, а также большое число полусинтетических аналогов. Механизм действия этих антибиотиков окончательно не установлен.

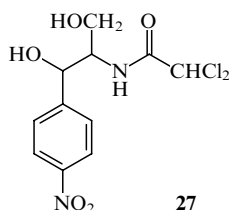
Для анализа аминогликозидных антибиотиков применяется широкий спектр иммунных методов анализа.^{112–114} Так, иммуноферментные методы применялись при анализе гентамицина (**24**, $R^1 = \text{OH}$, $R^2 = \text{NH}_2$, $R^3 = \text{Me}$, $R^4 = R^5 = \text{H}$),^{115, 117} амикацина [**25**, $R^1 = \text{NH}_2$, $R^2 = \text{OH}$, $R^3 = \text{H}$, $R^4 = \text{CH}_2\text{OH}$, $R^5 = \text{C}(\text{O})\text{CH}(\text{OH})\text{Pr}$],^{117, 118} тобрамицина (**26**, $R^1 = R^2 = \text{NH}_2$, $R^3 = R^5 = \text{H}$, $R^4 = \text{CH}_2\text{OH}$) (см.^{117, 119–121}). При анализе этих антибиотиков широко применяются и иммунофлуоресцентные методы.^{118, 121, 122}



24–26

Для анализа **24** и **25** используется автоматическая система «Optimate», основанная на иммунофлуоресцентном методе анализа.

Хлорамфеникол (27) занимает среди антибиотиков особое место. Он оказался первым препаратом, активным против риккетсий, внутриклеточных паразитов, являющихся возбудителями таких заболеваний, как сыпной тиф и пятнистая лихорадка. Хлорамфеникол подавляет также многие грамотрицательные и некоторые грамположительные бактерии и эффективен при лечении брюшного тифа и инфекций, вызываемых *Haemophilus influenzae*, *Klebsiella pneumoniae*, спирохетами и сальмонеллами, в особенности, устойчивыми к другим антибиотикам. Терапевтическое использование **27** ограничивают аллергические реакции и редкие случаи нарушения эритропоэза в костном мозге, однако он широко используется для ингибирования биосинтеза белка в хлоропластах растений.



27

В 1966 г. были получены антитела к конъюгату **27** с γ -глобулином крупного рогатого скота,¹²³ синтезированному методом диазотирования. В 1984 г. был разработан иммуноферментный метод анализа **27**, основанный на использовании антисыворотки кролика к конъюгату **27** с KLH, полученному с помощью янтарного ангидрида и карбодиимида.¹²⁴ Использование козьих антител к Ig G кролика, конъюгированных с пероксидазой, позволяет определять содержание **27** в диапазоне $4 \cdot 10^{-10} - 4 \cdot 10^{-8}$ г.

Разработан радиоиммунный метод анализа остатков **27** в пищевых продуктах.^{125, 126} Относительно недавно был опубликован обзор по иммуноферментным и жидкостнохроматографическим методам определения остатков **27** в молоке и тканях свиньи.¹²⁷ Набор для иммуноферментного анализа **27** в сыворотке крови человека выпускается фирмой «Aesculaar BV» (Голландия).¹²⁸

Для определения антибиотиков в растительном материале иммунные методы пока не применялись.

6. Микотоксины

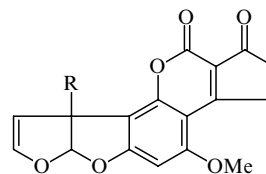
Некоторые виды плесеней (*Aspergillus*, *Penicillium*) в определенных условиях продуцируют микотоксины — высокотоксичные, иногда канцерогенные, вторичные метаболиты. Для разработки иммунных методов анализа микотоксинов были приложены особые усилия. Это связано с несколькими причинами. Во-первых, загрязнение партии продуктов часто бывает неоднородным, что требует анализа большого количества образцов. Во-вторых, ввиду высокой токсичности часто требуется анализ токсинов на уровне 10^{-12} г. В-третьих, из-за присутствия больших количеств химически родственных соединений метод должен быть высокоспецифичным.

Хотя с 1976 г. появилось уже несколько десятков работ по иммуноанализу микотоксинов, лишь очень немногие из предложенных в них методов нашли практическое применение. Это связано, как правило, либо с низким качеством получаемой антисыворотки (малое количество, низкая avidность, плохая специфичность), либо с неудовлетворительной воспроизводимостью метода.

Однако интерес к разработке иммунных методов анализа микотоксинов не ослабевает из-за больших потерь пищевых продуктов от заражения их микотоксинами. По данным фирмы «Biotech Research» (США) за 1985 г. только на тестирование присутствия афлатоксинов в пищевых продуктах в мире было израсходовано около 50 миллионов долларов.¹²⁹

В настоящее время существует ряд иммунных методов анализа микотоксинов.^{130, 131}

Среди большого количества микотоксинов основную опасность представляют афлатоксины, являющиеся вторичными метаболитами, продуцируемыми видами *A. flavus* и *A. parasiticus*.¹³² Разработано несколько иммунных методов анализа афлатоксинов.^{132–136}



28, 29

Афлатоксин В₁ (28, R = H). Этот микотоксин является одним из наиболее канцерогенных среди известных в настоящее время веществ. Он продуцируется некоторыми видами *Aspergillus*. Доказано, что **28** является причиной цирроза и рака печени у детей. При попадании в организм, афлатоксин В₁ эпоксидируется цитохромом Р-450 и связывается с РНК, что приводит к ингибированию белкового синтеза. Значение LD₅₀ для **28** составляет $3 \cdot 10^{-4} - 1.02 \cdot 10^{-2}$ г на кг.

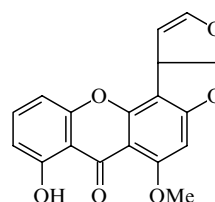
Для получения антисыворотки к кетогруппе **28** присоединяли (аминоокси)уксусную кислоту и конъюгировали полученное производное с BSA методом смешанных ангидридов. На основе этого конъюгата получены поликлональная¹³⁸ и моноклональная¹³⁹ антисыворотки. Обе антисыворотки при использовании их в иммуноферментном методе позволяют достичь предела определения 10^{-13} г и применяются для контроля содержания **28** в зерне и других пищевых продуктах, например, в масле земляного ореха.^{138, 139}

В другом методе гемацеталь **28** реакцией Манниха конъюгировали с метилальбумином либо непосредственно, либо через ϵ -аминокапроновую кислоту.¹⁴⁰ На основе антисывороток к этим конъюгатам разработан иммуноферментный метод, позволяющий определять **28** и афлатоксин М₁ (**29, R = OH**) в диапазоне $10^{-12} - 2 \cdot 10^{-10}$ г, афлатоксин Р₁ — в диапазоне $10^{-11} - 2 \cdot 10^{-10}$ г и афлатоксин G₁ — в диапазоне $(1-2) \cdot 10^{-10}$ г.

Наборы для иммуноферментного анализа **28** выпускаются фирмами «Neogen Corp.», «Agritech Systems», «Immuno Systems», «Biotech Research Laboratories», «Bio-kits» (США), «May and Baker Diagnostics» (Великобритания). Фирма «URVJT» (Чехословакия) выпускает набор для радиоиммунного анализа **28**.^{11, 141}

Афлатоксин М₁ (29, R = OH). Этот афлатоксин является продуктом метаболического окисления **28** в организме коровы. Проникая с молоком коров в организм человека, он может стать причиной рака или цирроза печени. Поэтому практически все разработанные методы иммунного анализа **29** нацелены именно на анализ коровьего молока.^{142–145}

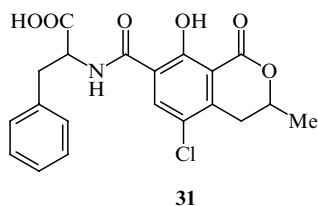
Стеригматоцистин (30). Это вещество, являющееся токсичным метаболитом видов *Aspergillus*, обладает сильными гепатоканцерогенными свойствами. Ввиду малой растворимости **30** в воде был разработан метод анализа его гидрокси-



30

лированного производного. Для этого конъюгат **30** с BSA превращали в гемиацеталь, которым иммунизировали кроликов.^{146, 147} Иммуноферментный метод, разработанный на основе полученной антисыворотки, позволяет определять **30** в диапазоне 10^{-12} – 10^{-9} г.

Охратоксин А (31) является мощным печеночным ядом, часто образующимся при хранении зерна в зонах умеренного климата. Для разработки иммуноферментного метода анализа **31** присоединяли к белку по карбоксильной группе и получали антисыворотку, позволяющую детектировать **31** в концентрациях до 10^{-11} г. Перекрестная реакция отмечена только для нетоксичного охратоксина В (0.5%).^{148, 149}

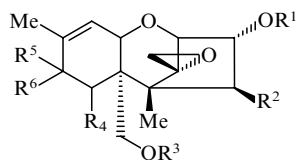


Разработанный метод был использован при исследовании образцов почек¹⁵⁰ и печени¹⁵¹ свиней, которых кормили зерном, подвергшимся длительному хранению, а также при анализе **31** в самом зерне.¹⁵²

Применение моноклональных антител позволило создать иммуноферментный метод определения охратоксина А в диапазоне $5 \cdot 10^{-13}$ – $2.5 \cdot 10^{-10}$ г.^{153, 154} Отмечены перекрестные реакции с этиловым эфиром **31** и с охратоксином С.

Наборы для иммуноферментного анализа **31** выпускаются фирмами «AFRC Food Research Institute» (Великобритания) и «Biokits». Фирма «URVJT» выпускает набор для радиоиммунного анализа **31**.¹¹

Трихотеценовые микотоксины представляют собой опаснейшую группу микотоксинов. Они продуцируются главным образом токсичными грибами рода *Fusarium*. Наиболее ядовиты диацетоксисцирпенол (**32**, $R^1 = R^4 = R^5 = R^6 = H$, $R^2 = OAc$, $R^3 = Ac$) и токсин Т-2 [**33**, $R^1 = R^4 = R^5 = H$, $R^2 = OAc$, $R^3 = Ac$, $R^6 = OCOCH_2C_4H_7-cyclo$]. Продуценты трихотеценов поражают в основном зерно, а у потребляющих его животных эти токсины вызывают поражения кожи, сепсис, некроз слизистых оболочек кишечника, почек, лимфатических узлов и костного мозга. У людей действие трихотеценов связывают со вспышками алиментарно-токсической алейкии, основными симптомами которой являются некроз тканей пищевого тракта и лейкопения. Причиной этих нарушений является, по-видимому, угнетение биосинтеза белка.



Для анализа трихотеценовых микотоксинов широко применяются иммунные методы. При получении иммуногенного конъюгата **32** превращали в гемиглутарат, который конъюгировали с BSA. Антитела, образующиеся при иммунизации животных этим конъюгатом, были использованы при разработке радиоиммунного¹⁵⁵ и иммуноферментных^{156, 157} методов анализа **32**.

Аналогичным образом были получены антитела и разработаны иммуноферментные методы анализа **33** (см.^{158, 159}) и 3-ацетилдезоксиниваленола (**34**, $R^1 = Ac$, $R^2 = R^3 = H$, $R^4 = OH$, $R^5 + R^6 = O$).¹⁶⁰

III. Заключение

Иммунные методы позволяют анализировать практически любые низкомолекулярные биологически активные вещества, встречающиеся в растениях.¹⁶¹ Эти методы превосходят хроматографические по чувствительности и скорости подготовки аналитической пробы, почти не уступая им в точности и воспроизводимости.

Однако для разработки иммунных методов анализа необходим индивидуальный подход к каждому конкретному веществу, и в каждом случае это требует довольно значительной подготовительной работы, объем которой зависит от объекта анализа. С этой точки зрения наибольшие трудности связаны с разработкой иммунных методов анализа для объектов, в которых происходит биосинтез или биodeградация анализируемых веществ, так как в этом случае в образце оказывается большое количество очень близких по структуре соединений. Именно к таким объектам относятся физиологически активные вещества растительного происхождения.

Несмотря на трудности, связанные с разработкой иммунных методов анализа (главные из которых — синтез иммуногенного конъюгата и получение высокоспецифичных антител), такие методы уже достаточно широко используются в клинической практике при контроле хода лечения и при исследованиях метаболизма физиологически активных веществ растительного происхождения.

Использование иммунных методов при анализе низкомолекулярных физиологически активных соединений в клетках и тканях растений затрудняется присутствием большого числа близкородственных соединений (биогенетических предшественников и метаболитов), которые принимают участие в сильных перекрестных взаимодействиях с используемыми при анализе антителами. Однако все более расширяется применение иммунных методов анализа в биотехнологии при получении культур клеток и тканей растений, продуцирующих физиологически активные вещества. Все шире применяются иммунные методы анализа в растениеводстве — при исследовании биосинтеза физиологически активных веществ и при анализе их содержания в тканях растений. При этом часто применяются методы, разработанные для использования в клинической практике, дополненные стадиями предварительной очистки образца.

В последние годы одной из наиболее бурно развивающихся областей применения иммунных методов анализа является контроль за содержанием веществ, загрязняющих растительный материал (микотоксины и др.).

Появление автоматизированных систем для проведения иммунных анализов и лабораторных роботов позволяет предположить, что применение иммунных методов будет расширяться.

Литература

1. С.К.Волков. *Успехи химии*, **62**, 831 (1993)
2. D.L.Colbert, A.M.Sidki, G.Gallacher, J.Landon. *Analyst*, **112**, 1483 (1987)
3. R.Rodgers, C.P.Crowl, W.M.Eimstad, M.W.Hu, J.K.Kam, R.C.Ronald, G.L.Rowley, E.F.Ullman. *Clin. Chem.*, **24**, 95 (1978)
4. М.А.Мягкова, Е.Б.Запольская, М.В.Лушникова, О.Ю.Полевая. *Хим.-фармацевт. журн.*, **26**, 101 (1992)
5. C.R.Hamlin. *Clin. Chem.*, **34**, 158 (1988)
6. T.J.Silber, P.Getson, S.Ridley, M.Iosefsohn, J.M.Hicks. *J. Pediatr.*, **111**, 299 (1987)
7. G.M.Ellis, M.A.Mann, B.A.Judson, N.T.Schramm, A.Tashchian. *Clin. Pharmacol. Ther.*, **38**, 572 (1985)
8. R.L.Mansell, E.W.Weiler. *Phytochemistry*, **19**, 1403 (1980)
9. E.W.Weiler, R.L.Mansell. *J. Agric. Food Chem.*, **28**, 543 (1980)
10. P.S.Jourdan, R.L.Mansell, D.G.Oliver, E.W.Weiler. *Anal. Biochem.*, **138**, 19 (1984)

11. L.Fukal, J.Kas. *Trends Anal. Chem.*, **8**, 112 (1989)
12. K.-L.L.Fong, D.H.W.Ho, C.J.K.Carter, N.S.Brown, R.S.Benjamin, E.J.Freireich, G.P.Bodey. *Anal. Biochem.*, **105**, 281 (1980)
13. R.J.Robins, M.R.A.Morgan, M.J.C.Rhodes, J.M.Furze. *Anal. Biochem.*, **136**, 145 (1984)
14. R.J.Robins, M.R.A.Morgan, M.J.C.Rhodes, J.M.Furze. *Phytochemistry*, **23**, 1119 (1984)
15. M.Jaziri. *Phytochemistry*, **29**, 829 (1990)
16. T.Tanahashi, N.Nagakura, H.Inouye, M.H.Zenk. *Phytochemistry*, **23**, 1917 (1984)
17. E.W.Weiler. *Planta*, **148**, 262 (1980)
18. P.Moesta, M.G.Hahn, H.Grisebach. *Plant Physiol.*, **73**, 233 (1983)
19. H.Grisebach, P.Moesta, M.G.Hahn. In *Immunology in plant sciences*. (Eds H.F.Linskens, J.F.Jackson). Springer-Verlag, Berlin; Heidelberg; New York; London; Paris; Tokyo, 1986. P.77
20. P.S.Jourdan, R.L.Mansell, E.W.Weiler. *Planta Med.*, **44**, 82 (1982)
21. P.S.Jourdan, E.W.Weiler, R.L.Mansell. *J. Agric. Food Chem.*, **31**, 1249 (1983)
22. R.Atzorn, E.W.Weiler, M.H.Zenk. *Planta Med.*, **41**, 1 (1981)
23. V.P.Butler, jr., J.P.Chen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **57**, 71 (1967)
24. T.W.Smith, V.P.Butler, jr., E.Haber. *New Engl. J. Med.*, **281**, 1212 (1969)
25. T.W.Smith, V.P.Butler, jr., E.Haber. *Biochemistry*, **9**, 331 (1970)
26. E.W.Weiler, M.H.Zenk. *Phytochemistry*, **15**, 1537 (1976)
27. E.W.Weiler. In *Plant Tissue Culture and its Biotechnological Application*. (Eds W.Barz, E.Reinhard, M.H.Zenk). Springer-Verlag, Berlin; Heidelberg; New York, 1977. P.266
28. E.W.Weiler, P.Westekemper. *Planta Med.*, **35**, 316 (1979)
29. S.Nickel, E.J.Staba. In *Plant Tissue Culture and its Biotechnological Application*. (Eds W.Barz, E.Reinhard, M.H.Zenk). Springer-Verlag, Berlin; Heidelberg; New York, 1977. P.278
30. P.H.Hinderling, J.O.Magnusson, L.Molin. *J. Pharm. Sci.*, **75**, 517 (1986)
31. S.Mahmod, D.S.Smith, J.Landon. *Ther. Drug Monit.*, **9**, 91 (1987)
32. B.J.Mora, C.J.M.Queralto, L.R.Arcelus, R.M.Cortes. *Farm. Clin.*, **2**, 44 (1985)
33. K.Yoshimatsu, M.Satake, K.Shimomura, J.Sawada, T.Terao. *J. Nat. Prod.*, **53**, 1498 (1990)
34. J.J.Chang, C.P.Crowl, R.S.Schneider. *Clin. Chem.*, **21**, 967 (1975)
35. W.Hubl, G.Daxenbichler, D.Meissner, H.J.Thiele. *Clin. Chem.*, **34**, 2521 (1988)
36. N.C.Paterson, M.J.Stewart. *Ann. Clin. Biochem.*, **24**, 205 (1987)
37. J.A.Stone, S.J.Soldin. *Clin. Chem.*, **34**, 2547 (1988)
38. M.Pupp. *G. Ital. Chim. Clin.*, **10**, 143 (1985)
39. J.C.Carrelts, D.E.Sweet. *Drug Intell. Clin. Pharm.*, **21**, 381 (1987)
40. H.Nekashima, K.Tsutsumi, M.Hashiguchi, Y.Kumagai, A.Ebihara. *J. Chromatogr.*, **489**, 425 (1989)
41. M.Bohbot, N.Chouvalidze, J.-L.Durand, A.-C.Steinmetz, C.Divine, G.Fredj, A.Thuillier. *Feuill. Biol.*, **28**, 71 (1987)
42. P.K.Ng, D.LeGatt, J.Coates, R.L.Collins-Nakai. *Am. J. Pharm.*, **42**, 1977 (1985)
43. A.M.Al-Fares, S.A.Mira, Y.M.El-Sayed. *Ther. Drug Monit.*, **6**, 454 (1984)
44. B.B.Lentrichia, S.J.Sciotto-Brown, M.F.Turanchik, I.K.Ropiak, K.K.Yeung. *Clin. Chem.*, **33**, 1548 (1987)
45. S.Takayasu, M.Maeda, A.Tsuji. *J. Immunol. Methods*, **83**, 317 (1985)
46. K.R.Wehmeyer, H.B.Halsall, W.R.Heineman, C.P.Volle, I.-W.Chen. *Anal. Chem.*, **58**, 135 (1986)
47. D.B.Frewin, H.Marmanidis, D.R.Lehmann, R.G.Morris. *Aust. N. Z. J. Med.*, **16**, 241 (1986)
48. M.Plebani, A.Burlina. *Clin. Chem.*, **31**, 1879 (1985)
49. D.R.Lehmann. *Clin. Biochem.*, **18**, 300 (1985)
50. J.Masse. *Ann. Biochem. Clin. Que.*, **26**, 1 (1987)
51. R.L.Smith. *Clin. Chem.*, **33**, 1679 (1987)
52. W.F.Skogen, M.R.Rea, R.Valdes, jr. *Clin. Chem.*, **33**, 837 (1987)
53. E.Evrard, M.Lesne. *J. Pharm. Belg.*, **41**, 380 (1986)
54. J.Frisolone, L.M.Sylvia, J.Gelwan, S.Pal, C.Pellechia. *Clin. Pharm.*, **7**, 444 (1988)
55. D.C.Greenway, A.A.Nanji. *Clin. Chem.*, **31**, 1078 (1985)
56. T.J.Hoon, M.B.Bottorf, J.L.Baumann. *Hosp. Ther.*, **12**, 80 (1987)
57. I.A.Kulaots, M.R.Pudek, D.W.Secombe. *Clin. Chem.*, **33**, 1490 (1987)
58. D.Wahyono, M.Piechaczyk, J.M.Scherrmann, J.C.Mani, B.Pau. *Ther. Drug Monit.*, **13**, 113 (1991)
59. A.A.Sanchez, G.G.Sangrador, V.B.Quintana. *Farm. Hosp.*, **15**, 307 (1991)
60. T.Suzuki, H.Nagaoka, Y.Nakagawa, K.Sugawara. *J. Jpn. Soc. Hosp. Pharm.*, **23**, 469 (1987)
61. R.A.Blum, J.M.DeVito, R.A.Pleasant, R.E.Crass, R.H.Gadsden, R.B.Leman. *Ther. Drug Monit.*, **9**, 416 (1987)
62. J.Stone, Y.Bentur, E.Zalstein, S.Soldin, E.Giesbrecht, G.Kogen. *J. Pediatr.*, **177**, 321 (1990)
63. T.Lehtola, A.Huhtikangas, R.Hiltunen, M.V.Schantz. *Planta Med.*, **42**, 250 (1981)
64. G.C.Oliver, B.M.Parker, D.L.Brasfield, C.W.Parker. *J. Clin. Invest.*, **47**, 1035 (1968)
65. H.I.Bussey, W.A.Watson, D.W.Hawkins, P.Wang. *Ther. Drug Monit.*, **8**, 90 (1986)
66. S.R.C.J.Santos, W.Kirch, E.E.Ohnhaus. *J. Chromatogr. Biomed. Appl.*, **63**, 155 (1987)
67. R.P.Vallejo, C.D.Ercegovich. In *Trace Organic Analysis: a New Frontier in Analytical Chemistry. Proceedings 9th Materials Res. Symp.* Natl. Bureau Standards (USA), Spec. publ. 519, 1979. P.333
68. P.K.Nakane, F.Kawaoi. *J. Histochem. Cytochem.*, **22**, 1084 (1974)
69. Е.И.Плюгачева, М.И.Савенкова, Д.И.Метелица. *Хим.-фармацевт. журн.*, **22**, 1392 (1988)
70. М.И.Савенкова. *Хим.-фармацевт. журн.*, **23**, 195 (1989)
71. М.И.Савенкова, Д.И.Метелица. *Хим.-фармацевт. журн.*, **24**, 82 (1990)
72. Е.И.Тарун, М.И.Савенкова, Д.И.Метелица. *Журн. анал. химии*, **48**, 145 (1993)
73. M.R.A.Morgan, R.McNerney, J.A.Matthew, D.T.Coxon, H.W.-S.Chan. *J. Sci. Food Agric.*, **34**, 593 (1983)
74. E.W.Weiler, H.Kruger, M.H.Zenk. *Planta Med.*, **39**, 112 (1980)
75. J.A.Matthew, M.R.A.Morgan, R.McNerney, H.W.-S.Chan. *Food Chem. Toxicol.*, **21**, 637 (1983)
76. W.L.Pengelly, F.Meins, jr. *Planta*, **136**, 173 (1977)
77. E.W.Weiler. *Planta*, **153**, 319 (1981)
78. R.Mertens, J.Eberle, A.Arnsccheidt, F.Ledebur, E.W.Weiler. *Planta*, **166**, 389 (1985)
79. E.W.Weiler, U.Wieczorek. *Planta*, **152**, 159 (1981)
80. R.Atzorn, E.W.Weiler. *Planta*, **159**, 1 (1983)
81. R.Atzorn, E.W.Weiler. *Planta*, **151**, 7 (1983)
82. P.C.Oden, E.W.Weiler, L.Schwenen, J.E.Graebe. *Physiol. Plant.*, **64**, 21A (1985)
83. J.Bianco, B.Ferrua. *Plant Physiol. Biochem.*, **28**, 799 (1990)
84. E.W.Weiler. *Planta*, **144**, 255 (1979)
85. E.W.Weiler. *Planta*, **148**, 262 (1980)
86. L.M.Brenner. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, **32**, 511 (1981)
87. E.W.Weiler. *Physiol. Plant*, **54**, 230 (1982)
88. D.Ernst, W.Schafer, D.Oesterhelt. *Planta*, **159**, 216 (1983)
89. D.R.Reeve, A.Crozier. In *Hormonal Regulation of Development. I. Molecular Aspects of Plant Hormones*. (Ed. J.McMillan). Springer-Verlag, Berlin; Heidelberg; New York, 1980. P.203
90. B.F.Erlanger, S.M.Beiser. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **52**, 68 (1964)
91. B.Hacker, H.VanVunakis, L.Levine. *J. Immunol.*, **6**, 1726 (1972)
92. M.Z.Humayun, T.M.Jacob. *Biochem. J.*, **141**, 313 (1974)
93. S.A.Khan, M.Z.Humayun, T.M.Jacob. *Anal. Biochem.*, **83**, 632 (1977)
94. D.S.Milstone, D.S.Vold, D.C.Glitz, N.Shutt. *Nucl. Acid Res.*, **5**, 3439 (1978)
95. D.L.Brandon, J.W.Corse, L.L.Layton. *Plant Physiol.*, **63(S)**, 82 (1979)
96. E.W.Weiler. *Planta*, **149**, 155 (1980)
97. E.M.S.McDonald, D.E.Akiyoshi, R.O.Morris. *J. Chromatogr.*, **214**, 101 (1981)
98. E.W.Weiler, K.Spanier. *Planta*, **153**, 326 (1981)
99. J.Badenoch-Jones, D.S.Latham, C.W.Parker, B.G.Rolfé. *Plant Physiol.*, **75**, 1117 (1984)
100. R.Horgan. In *Isolation of Plant Growth Substances*. (Ed. J.R.Hillman). Cambridge University Press, Cambridge, 1978. P.97
101. D.Ernst, D.Oesterhelt. *Plant Cell Rep.*, **4**, 140 (1985)
102. M.G.Carnes, M.L.Brenner, C.R.Andersen. *J. Chromatogr.*, **108**, 95 (1975)
103. R.A.Andersen, T.R.Kemp. *J. Chromatogr.*, **172**, 509 (1979)
104. J.M.Hardin, C.A.Stutte. *J. Chromatogr.*, **208**, 124 (1981)

105. J.A.Holland, E.H.McKerrell, K.J.Fuell, W.J.Burrows. *J. Chromatogr.*, **166**, **545** (1978)
106. R.Horgan, M.R.Kramers. *J. Chromatogr.*, **173**, 263 (1979)
107. I.M.Scott, R. Horgan. *J. Chromatogr.*, **237**, 311 (1982)
108. R.O.Morris, J.B.Zaerr, R.W.Chapman. *Planta*, **131**, 271 (1976)
109. C.Jayabaskaran, T.M.Jacob. *Plant Physiol.*, **70**, 1396 (1982)
110. T.H.Elsasser, R.K.Munns, W.Shimoda. *J. Immunoassay*, **8**, 73 (1987)
111. P.Rohner, M.Schallibaum, J. Nicolet. *J. Food Protection*, **48**, 59 (1985)
112. E.G.Boyce, L.A.Lawson, G.A.Gibson, I.Nachamkin. *Ther. Drug Monit.*, **11**, 97 (1989)
113. E.Evrard, F.Clerckx-Braun, M.Lesne, P.Pellegrin. *J. Pharm. Belg.*, **42**, 177 (1987)
114. L.O.White. *Trends Anal. Chem.*, **5**, 29 (1986)
115. K.P.Pavel, W.Hubl. *Z. Med. Laboratoriumsdiagn.*, **28**, 301 (1987)
116. W.M.Cai, J.Chen, G.Chen. *Clin. J. Hosp. Pharm.*, **11**, 485 (1991)
117. T.Kitaura, H.Fukuchi, S.Tsukiai, Y.Wada. *Jpn. J. Hosp. Pharm.*, **12**, 345 (1986)
118. B.E.Bleske, T.A.Larson, J.C.Rotschafer. *Ther. Drug Monit.*, **9**, 48 (1987)
119. A.S.Lewis, G.Tailor, H.N.Rowe, H.O.Williams, M.H.Lewis. *Am. J. Pharm.*, **44**, 568 (1987)
120. R.J.Anders, A.Lau, Sharifi, M.Lee. *Ther. Drug Monit.*, **9**, 472 (1987)
121. R.A.Pasants, R.E.Dupuis, W.T.Sawyer, C.Howlett. *ASHP Midyear Clin. Meet.*, **23**, 237 (1988)
122. M.A.Wilkerson, S.M.Toler, T.L.Golsmith, W.H.Porter, M.H.Chandler. *Clin. Pharm.*, **8**, 867 (1989)
123. R.N.Hamburger. *Science*, **152**, 203 (1966)
124. G.S.Campbell, R.P.Mageau, B.Schwab, R.W.Johnston. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **25**, 205 (1984)
125. D.Arnold, D.Von Berg, A.K.Boertz, U.Mallik, A.Somogyi. *Arch. Lebensmittelhygiene*, **35**, 131 (1984)
126. D.Arnold, A.Somogyi. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **68**, 984 (1985)
127. C.Van De Water, N.Haagsma. *J. Chromatogr.*, **566**, 173 (1991)
128. L.Fukal, J.Kas. *Trends Anal. Chem.*, **8**, 112 (1989)
129. T.Li. *Biotech Research Announces First Aflatoxin Detection Kit Using Enzyme Immunoassay Technology*. Press release, April 9, 1985. Robert Marston and Ass., New York, 1985
130. J.J.Pestka, F.S.Chu. *J. Food Protection*, **47**, 305 (1984)
131. M.R.A.Morgan. *Tetrahedron*, **45**, 2237 (1989)
132. A.P.Wilkinson, A.S.Kang, H.W.-S.Chan, M.R.A.Morgan. In *Immunoassays for Veterinary and Food Analysis. V.1.* (Eds B.A.Morgan, M.N.Clifford, R.Jackman). Elsevier, London; New York, 1988. P.343
133. J.D.Groopman, L.J.Trudel, P.R.Donahue, A.Marshak-Rothstein, G.N.Wogan. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **81**, 7728 (1984)
134. C.P.Wild, B.Chapot, E.Scherer, L.DenEngelse, R.Montesano. In *Methods for Detecting DNA Damaging Agents in Humans: Application in Cancer Epidemiology and Prevention*. (Eds H.Bartsch, K.Hemminki, I.K.O'Neil). International agency for research on cancer, Lyon. 1988, P.67
135. C.P.Wild, F.A.Pionneau, R.Montesano, C.F.Mutiro, C.J.Chetsanga. *Int. J. Cancer*, **40**, 328 (1987)
136. P.Sizaret, C.Malaveille, R.Montesano, C.Frayssinet. *J. Natl. Cancer Inst.*, **69**, 1375 (1982)
137. J.E.Smith. *World's Poultry Science Journal*, **38**, 201 (1982)
138. M.R.A.Morgan, A.S.Kang, H.W.-S.Chan. *J. Sci. Food Agric.*, **37**, 908 (1986)
139. A.A.G.Candlish, W.H.Stimson, J.E.Smith. *Lett. Appl. Microbiol.*, **1**, 57 (1985)
140. T.S.L.Fan, F.S.Chu. *J. Food Protection*, **47**, 263 (1984)
141. J.Marrero. *J. Med. Technol.*, **1**, **47** (1984)
142. J.M.Fremy, F.S.Chu. *J. Assoc. off Anal. Chem.*, **67**, 1098 (1984)
143. W.J.Hu, N.Woychik, F.S.Chu. *J. Food Protection*, **47**, 126 (1984)
144. E.Martlbauer, G.Terplan. *Arch. Lebensmittelhygiene*, **36**, 58 (1985)
145. R.Jackman. *J. Sci. Food Agric.*, **36**, 685 (1985)
146. M.R.A.Morgan, A.S.Kang, H.W.-S.Chan. *J. Sci. Food Agric.*, **37**, 873 (1986)
147. A.S.Kang, M.R.A.Morgan, H.W.-S.Chan. In *Proceedings 5th Meet Mycotoxins in Animal and Human Health*. (Eds M.O.Moss, M.Frank). Surrey University Press, Guildford, 1984. P.80
148. M.R.A.Morgan, R.McNerney, H.W.-S.Chan. *J. Assoc. off Anal. Chem.*, **66**, 1481 (1983)
149. M.R.A.Morgan, R.McNerney, H.W.-S.Chan. In *Immunoassays in Food Analysis*. (Eds B.A.Morris, M.N.Clifford). Elsevier, London; New York. 1985. P.159
150. M.R.A.Morgan, R.McNerney, H.W.-S.Chan, P.H.Anderson. *J. Sci. Food Agric.*, **37**, 475 (1986)
151. P.H.Anderson, G.A.H.Wells, R.Jackman, M.R.A.Morgan. *Proceedings 5th Meet Mycotoxins in Animal and Human Health*. (Eds M.O.Moss, M.Frank). Surrey University Press, Guildford, 1984. P.23
152. S.C.Lee, F.S.Chu. *J. Assoc. off Anal. Chem.*, **67**, 45 (1984)
153. A.A.G.Candlish, W.H.Stimson, J.E.Smith. *J. Assoc. off Anal. Chem.*, **77**, 961 (1988)
154. A.A.G.Candlish, W.H.Stimson, J.E.Smith. In *Immunoassays for Veterinary and Food Analysis*. (Eds B.A.Morris, M.N.Clifford, R.Jackman). Elsevier, London; New York, 1988. P.351
155. F.S.Chu, M.Y.Chen-Liang, G.S.Zhang. *Appl. Environ. Microbiol.*, **48**, 777 (1984)
156. J.U.Pauly, D.Bitter-Suermann, K.Dose. In *Proceedings of the 2nd World Congress on Food-borne Infections and Intoxications*. Institute of veterinary medicine, Robert von Ostertag Institute, Berlin, 1986. P.1212
157. E.N.C.Mills, J.M.Johnston, H.A.Kemp, M.R.A.Morgan. *J. Sci. Food Agric.*, **42**, 225 (1988)
158. K.W.Hunter, A.A.Brimfield, M.Miller, F.D.Finkelman, F.S.Chu. *Appl. Environ. Microbiol.*, **49**, 168 (1985)
159. E.H.Gendloff, J.J.Pestka, S.P.Swanson, L.P.Hart. *Appl. Environ. Microbiol.*, **47**, 1161 (1984)
160. H.A.Kemp, E.N.C.Mills, M.R.A.Morgan. *J. Sci. Food Agric.*, **37**, 888 (1986)
161. R.J.Robins. In *Immunology in Plant Sciences*. (Eds H.F.Linskens, J.F.Jackson). Springer-Verlag, Berlin; Heidelberg; New York; London; Paris; Tokyo, 1986. P.86

IMMUNOASSAY OF OCCURRING IN PLANTS LOW-MOLECULAR-WEIGHT PHYSIOLOGICALLY ACTIVE COMPOUNDS

S.K.Volkov

Scientific-Industrial Association "All-Russian Institute of Medicinal and Aromatic Plants"
7, Ul. Grina, 113628 Moscow, Russian Federation

The application of immune methods in the analysis of endogeneous and exogeneous low-molecular-weight physiologically active compounds occurring in plants is examined.

Bibliography — 161 references.

Received 28th November 1993