

МЕТОДЫ КАЧЕСТВЕННОГО И КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ТЕРПЕНО-ИНДОЛЬНЫХ АЛКАЛОИДОВ РАСТЕНИЯ РОДА *CATHARANTHUS* (ОБЗОР)

О. В. Тринеева, А. И. Сливкин, А. Д. Халахакун

ФГБОУ ВО «Воронежский государственный университет»

Поступила в редакцию 13.04.2019 г.

Аннотация. Онкологические заболевания остаются одними из самых опасных, согласно данным ВОЗ - с 10 миллионами новых случаев каждый год. Противоопухолевая химиотерапия – один из важнейших и наиболее динамично развивающихся отделов современной онкологии. Терпено-индольные алкалоиды (ТИА) - винкрестин (VCR), винбластин (VLB) и их производные в качестве цитостатиков включают в моно- и комбинированный режим химиотерапии при лечении различных онкологических заболеваний. VCR и VLB являются одними из наиболее хорошо изученных и эффективных лекарственных средств в химиотерапии. Цель работы – обобщение и систематизация методов выделения, качественного и количественного определения ТИА растения рода *Catharanthus* (на примере VCR и VLB).

В *C. roseus* биосинтезируется более 130 видов ТИА, некоторые из которых обладают выраженной фармакологической активностью. Десятилетние исследования показали фармакологическую активность алкалоидов: серпентина, аджмалсина, бис-индольных алкалоидов VLB, VCR и 3,4-ангидровинбластин. VLB и VCR были обнаружены в результате программы лекарственного скрининга, выполненной в конце 1950-х годов.

Определение физико-химических констант (угол вращения плоскости поляризации, показатель преломления, УФ- и ИК-спектры поглощения) может давать информацию, которая является дополнительным доказательством идентичности и чистоты образцов. ТСХ применяется для идентификации и количественного определения алкалоидов *C. Roseus*, в том числе для VCR и VLB в зарубежных фармакопеях и многих других литературных источниках. В настоящее время в зарубежных фармакопеях для количественного определения препаратов группы ТИА наиболее часто используется метод ВЭЖХ. Этот метод рекомендован для обнаружения и количественного определения VLB, VCR и их метаболитов в биологических жидкостях.

Таким образом, в контроле качества данных фармацевтических субстанций и лекарственных форм на их основе лидирующие позиции занимают физико-химические, в частности хроматографические (ВЭЖХ), методы анализа. В фитохимических исследованиях *C. roseus* для качественного и количественного определения применяются различные аналитические методы: ВЭЖХ, ВЭЖХ-УФ, ВЭЖХ-МС, ВЭЖХ-ЭХ, УЭЖХ, ТСХ, ГХ, спектральные методы (УФ-, ИК-), МГС, ЖХ/МС-ВР, электрофорез и др.

Ключевые слова: терпено-индольные алкалоиды, винкрестин, винбластин, качественное и количественное определение.

Онкологические заболевания остаются одними из самых опасных, согласно данным ВОЗ - с 10 миллионами новых случаев каждый год. Тем не менее, за последнее время смертность уменьшилась, благодаря лучшему пониманию биологии опухоли и улучшенным диагностическим приборам, ранней диагностике, а также процедурам лечения. Противоопухолевая химиотерапия – один из важнейших и наиболее динамично развивающихся отделов

современной онкологии. Химиотерапия злокачественных опухолей – это использование с лечебной целью лекарственных средств, тормозящих пролиферацию или приводящих к необратимым повреждениям опухолевых клеток. В настоящее время противоопухолевая химиотерапия применяет различные режимы и различные группы противоопухолевых препаратов (антиметаболиты, цитостатики, алкилирующие соединения и др.). При этом терпено-индольные алкалоиды (ТИА) винкрестин (VCR), винбластин (VLB) и их производ-

дные в качестве цитостатиков включают в моно- и комбинированный режимы химиотерапии при лечении различных онкологических заболеваний [1]. Например, VCR применяется в режимах BACOD, m-BACOD, СНОЕР, СНОР, ProMACE/MOPP (при неходжкинской лимфоме) [2], BEACOPP (при лимфогранулематозе), CAV (при раке лёгкого, Карциноме Меркеля), CVAMP (при лимфогранулематозе, лейкозе), ChlVPP/EVA (при лимфогранулематозе), VAI (при саркоме Юнинге и мезенхимальной хондросаркоме) и др. VLB применяется в режимах VIP (при раке яичка, герминоме), VCRT (при лёгочном раке), CISCA/VB (Fizazi, K et al.) [3] (nongerminotous зародышевых клеток опухоли).

Цель работы – обобщение и систематизация методов выделения, качественного и количественного определения терпено-индольных алкалоидов растения рода *Catharanthus* (на примере винкристина и винбластина).

Фитохимический состав *C. roseus*

Catharanthus - это многолетнее тропическое лекарственное растение, которое относится к семейству *Aporocynaceae*, включающему восемь видов (*C. coriaceus* Markgr., *C. lanceus* (Vojer ex A.DC.) Pichon, *C. longifolius* (Pichon) Pichon, *C. ovalis* Markgr., *C. roseus* (L.) G. Don, *C. scitulus* (Pichon) Pichon, *C. trichophyllus* (Bak.) Pichon, *C. pusillus* (Murray) G. Don) [4-6]. Вегетативные органы, а также корни *C. roseus* чрезвычайно богаты различными химическими соединениями, такими как: алкалоиды, флавоноиды, тритерпеноиды, дубильные вещества, сапонины, кумарины, углеводы, хининовые и фенольные соединения [5]. Цветки растения содержат обильное количество дубильных веществ, тритерпеноидов и алкалоидов. Листья *C. roseus* богаты алкалоидами, углеводами и фенольными соединениями, такими как: C₆-C₁ соединения - 2,3-дигидроксibenзойной кислоты, а также фенилпропаноидов - производных

коричной кислоты, флавоноиды и антоцианы. Корень и стебель растения содержат хиноны.

В *C. roseus* биосинтезируется более 130 видов ТИА [4,6-8], некоторые из них обладают выраженной фармакологической активностью [4,9]. Все части растения имеют богатый состав различных производных ТИА (таблица 1). Максимальная концентрация алкалоидов обнаруживается в корнях растений [10]. При этом биосинтез VCR и VLB в *C. roseus* очень низкий (0.001-0.0003%) [11]. Содержание алкалоидов в различных частях варьирует, так корни содержат 0.14-1.34%, стебель – 0.074-0.48%, листья – 0.32-1.16%, цветки – 0.005-0.84%, плоды – 0.40%, семена - 0,18% и околоплодник -1.14% [12,13]. Сухие листья содержат VLB 0,00013-0.00063% и VCR – 0.0000003-0.0000153% [13]. Jossang *et al.* (1998 г) [14] обнаружили и изолировали два алкалоида (*Vingramine* и *Methylvingramine*) из семян, которые до этого не были выявлены в *C. roseus*. В таблице 1 перечислены некоторые алкалоиды, выделенные из разных органов и культур тканей растения *C. roseus*. Кисакуресс и Хессе определили различные подклассы алкалоидов из *C. roseus*: *vincosan*, *corynanthean*, *vallesiachotaman*, *strychnan*, *aspidospermatan*, *plumeran*, *ibogan*, *eburnan* и бисиндольные алкалоиды [15]. *C. roseus* является особенно богатым бисиндольными алкалоидами (около 40 соединений), большинство из которых содержат фрагменты виндолина (*vindoline*) и катарантина (*catharanthine*). Десятилетние исследования показали фармакологическую активность алкалоидов: серпентина (*serpentine*), аджмалсина (*ajmalicine*), бис-идольных алкалоидов VLB, VCR [9] и 3,4-ангидровинбластина (*3,4-anhydrovinblastine*). VLB и VCR были обнаружены в результате программы лекарственного скрининга, выполненной в конце 1950-х годов [9].

Таблица 1

Некоторые фармакологически активные алкалоиды *C. roseus*

Алкалоиды	М.М (г/моль)	Тип алкалоида	Изолирован из*
Аджмалицин (<i>ajmalicine</i>)	352.432	Кориантан (<i>corynanthean</i>) [9,16,17]	РЭ, Л, Ц, Р, С, КК, СКК, П, КВ [6]
<i>ajmalicine</i> , 19- <i>epi</i> , 3- <i>iso</i>	352.432	Кориантан (<i>corynanthean</i>) [9,17]	РЭ, КК, СКК
<i>ajmalicine</i> , 3- <i>epi</i>	352.432	Кориантан (<i>corynanthean</i>) [9,17]	РЭ, КК, СКК
Катарантин (<i>catharanthine</i>)	336.433	<i>catharanthine</i> (Ibogan)	РЭ, Л, Ц, Р, С, КК, СКК, П, КВ [6]
Катенамин (<i>cathenamine</i>)	350.416	Кориантан (<i>corynanthean</i>)	РЭ
3',4'- <i>anhydro vinblastine</i>	792.970	Бисиндол (<i>bisindole</i>)	Л, П
Стиктоцидин (<i>strictosidine</i>)	530.574	Винкозан (<i>vincosan</i>)	РЭ, Л, КК, СКК, Кр
Винбластин (<i>vinblastine</i>)	810.986	Бисиндол (<i>bisindole</i>)	РЭ, Л, Ц, Р
Винкрестин (<i>vincristine</i>)	824.96	Бисиндол (<i>bisindole</i>)	РЭ, Л, Ц, Р
<i>vindoline</i>	456.538	Плюмеран (<i>plumeran</i>)	РЭ, Л, Ц, С, Кр
Катарантамин (<i>catharanthamine</i>)	808.970	Бисиндол (<i>bisindole</i>)	РЭ, Л

*- РЭ - растительный экстракт, Л- листья, Ц- цветки, Р- рассада, С- семена, КК- каллус культуры, СКК- суспензии клеток культуры, П- побег, КВ- волосатый корень, Кр- корень

Бисиндольные алкалоиды VCR и VLB. Химические и физико-химические свойства. По классификации А.П. Орехова все алкалоиды *C. roseus* относятся к группе производных индола (рис. 1) [18].

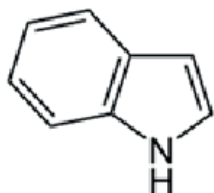


Рис. 1. Индол (C₈H₇N)

Молекулярная структура димерных и ассиметричных алкалоидов VLB и VCR имеет индолиновые фрагменты, которые получают в результате образующейся -C-C- связи между атомами углерода у виндолина (C₆) и катарантина (C₁₉) (рис. 2) [19,20]. VLB и VCR в своих молекулах имеют -COOCH₃, -OCOCH₃, -OCH₃ (ароматические), -OH (свободные), -CHO, -C₂H₅, -NH (индольные) и -N-CH₃ функциональные группы, которые характеризуют их химические свойства. Эти алкалоиды имеют очень схожую химическую структуру, а отличаются друг от друга одной радикальной группой: VLB имеет метильный (-CH₃) радикал у атома N во фрагменте виндолина, а VCR - формильный (-CHO) радикал.

Присутствие индольного фрагмента в структуре молекулы ТИА *C. roseus* обуславливает сла-

боосновные и в то же время слабокислые химические свойства. В фармацевтическом производстве VCR и VLB используются в виде солей, физико-химические свойства которых представлены в таблице 2 (В. Ph. 2013; Е. Ph. 8.; J. Ph. XVII).

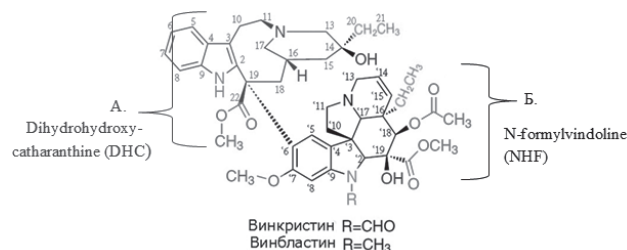


Рис. 2. Химическая структура VCR и VLB. А. фрагмент катарантина (индольный фрагмент). Б. фрагмент виндолина (индолиновый фрагмент)

Оптические свойства VCR и VLB. В соответствии с химической структурой VCR и VLB являются оптически активными веществами. Определение физико-химических констант, таких как угол вращения плоскости поляризации ($[\alpha]_D^{20}$), показатель преломления, УФ-спектр и ИК-спектр поглощения могут давать информацию, которая является дополнительным доказательством идентичности и чистоты образцов (таблица 3).

Методы качественного и количественного определения ТИА препаратов из *C. roseus*

Методы выделения и идентификации ТИА. В настоящее время бисиндольные алкалоиды

Таблица 2

Физико-химические свойства VCR сульфата и VLB сульфата

Физико-химические свойства	VCR сульфат	VLB сульфат
Элементный состав	C - 59.86%; H - 6.33%; N - 6.07%; S - 3.47%; O - 24.27%	C - 60.78%; H - 6.65%; N - 6.16%; S - 3.53%; O - 22.88%
Описание	Белый или слегка желтоватый кристаллический порошок	
Растворимость	Очень легко растворимы в воде, практически не растворимы в спиртах	
М.м (г/моль)	923.05	909.06
pH раствора	(50 мг /10 мл дис. воды) 3.5 – 4.5	(50 мг /10 мл дис. воды) 3.5 – 5.0

Таблица 3

Значения некоторых констант для VLB и VCR

Физико-химические константы	VLB sulfate	VCR sulfate
$[\alpha]_D^{20}$	- 28° ~ - 35° (C= 1.01, метанол) (J.Ph XVII. pp. 1762)	+ 8,5° (C= 1.01, метанол) +28.5° ~ +35.5° - (0.2 г в 10 мл H ₂ O, L-100 мм) (J.Ph XVII. pp. 1764)
T _{пл} C°	284-285	273-281
Константы диссоциации pKa	7.4	7.4 (в 33% ДМФА)

Катарантуса в основном получают экстракцией из листьев *C. roseus*. Для изолирования *C. roseus* алкалоидов используют различные методы. Некоторые методы экстракции были интенсивно оптимизированы, а несколько методов были запатентованы. Например, надземные части *C. roseus* могут экстрагировать водой, затем полученный водный экстракт концентрируют, а далее экстракция проводится органическим растворителем, например, этилацетатом [7,21]. Полученный концентрат богат катарантином, виндолином и ангидровинбластином. Для выделения ТИА применяются два различных способа, один из них – использование обычной схемы экстрагирования и изолирования, второй – синтетический, основанный на сопряжении мономеров в качестве исходного материала [22-24]. В последние годы особенно широко применяется новый метод экстракции – кавитационная экстракция с отрицательным давлением (NPCE-Negative-Pressure Cavitation Extraction) [25]. NPCE более эффективен при постоянных низких температурах и интенсивностях, чем классические экстракционные технологии, такие как экстракция путем мацерации, тепло-рефлюкс экстракции и ультразвуковая экстракция [25].

ТИА в виде солей получают добавлением водного или спиртового раствора серной кислоты к раствору ТИА в этаноле или ацетоне. Полученную смесь выпаривают в вакууме и остаток кристаллизуют из абсолютного этанола с получением кристаллов VCR или VLB сульфатов.

Методы анализа ТИА (VCR и VLB)

Методы установления подлинности. В фармацевтическом качественном анализе VCR и VLB используют следующие цветные реакции, некоторые из которых неспецифичны по отношению к VCR и VLB (ванилин является реагентом для обнаружения фенолов, в то время как 4-диметиламинобензальдегид чувствителен к ароматическим аминам). Специфичные реакции приведены в таблице 4.

Цветные реакции для идентификации VCR и VLB:

- К 1.0 мг VCR сульфата добавляют 0.2 мл свежеприготовленного 1% раствора ванилина в хлористоводородной кислоте. Оранжевый цвет получается примерно через 1 минуту (отличие от VLB сульфата – розовый цвет) [26, 27].
- 0.5 мг VCR сульфата растворяют в смеси 5.0 мг 4-диметиламинобензальдегида с 0.2 мл ледяной уксусной кислоты, затем добавляют 0.2 мл серной кислоты и получается красновато-коричневый цвет. При добавлении 1.0 мл ледяной уксусной кислоты цвет меняется на розовый [26, 27] (VLB сульфат также дает идентичный результат).
- VCR и VLB с реагентом Драгендорфа образуют оранжевый осадок [26, 27].

Методы количественного определения

Титриметрические методы. Существуют литературные данные, которые демонстрируют возможности применения метода неводного титрования для количественного определения VCR сульфата и VLB сульфата. В качестве титранта применяется 0,1 М раствор хлорной кислоты (HClO_4) в среде ледяной уксусной кислоты, а индикатором является кристаллический фиолетовый [26].

Физико-химические методы определения ТИА VCR и VLB

Спектральные методы

Американская, Британская, Европейская, Японская и международная фармакопеи рекомендуют использовать УФ- и ИК-спектральные характеристики чистых субстанций VCR сульфата и VLB сульфата для идентификации и установления подлинности препаратов (B.Ph. 2015, pp.1158-1159; E.Ph 8, pp. 3536-3537; J.Ph XVII, pp. 1762-1765; Ph. Int.7 2017, <http://apps.who.int/phint/2017/index.html#d/b.6.1.357>). Длинноволновая часть инфракрасного спектра ($\nu < 1500 \text{ см}^{-1}$) содержит, наряду с характеристическими полосами, боль-

Таблица 4

Некоторые цветные реакции для идентификации VCR и VLB

Название <i>C. roseus</i> алкалоида	Реагент		
	1% Аммоний церий (IV) сульфат + 85% H_3PO_4 (После нагревания 10 мин на водяной бане)	1.0 % раствор сульфата железа (III) в 75%-ной серной кислоте	1.0 % раствор аммония железа (III) сульфата + 85% H_3PO_4 (После нагревания 10 мин на водяной бане)
VLB	Пурпурный	Синий	Фиолетовый
VCR	Сине-фиолетовый	Синий → серо-голубой	Розовый
Leurosine	Розовый	Желтый → зеленый	Бледно-желтый
Vindoline	Фиолетовый (сильный)	Фиолетовый (сильный)	Серо-голубой
Catharanthine	Индиго → зеленый	Сине-фиолетовый	Желтый
Reserpine	Небесно-голубой → желтый	Синий → зеленый	Лимонно-желтый
Isoleurosine	Медный	Зеленый → синий	Желто - оранжевый

шое число интенсивных полос поглощения, положение и контур которых сугубо индивидуальны для каждой сложной молекулы (рис. 3 и табл. 5).

Вид УФ-спектров и спектральные характеристики [31] представлены в таблице 6 и на рис. 4.

Для количественного определения некоторых алкалоидов *C. roseus* существуют колориметрические и флуориметрические методы. Колориметрический метод определения VCR сульфата основан на цветных реакциях. Так с реагентом, состоящим из пиридина (35.0 мл), концентрированной серной кислоты (1.0 мл), уксусного ангидрида (35.0 мл) и 0.05% ацетилхлорида при нагревании до 80 °С, об-

разуется розовый цвет раствор, оптическая плотность которого измеряется на спектрофотометре при длине волны 574 нм [28,29].

Хроматографические методы

Планарная хроматография в тонких слоях

Бумажная хроматография (БХ) была когда-то широко используется для анализа флавоноидов, алкалоидов и др. фитохимических соединений, но в настоящее время более предпочтительным методом является тонкослойная хроматография (ТСХ) в виду его простоты и низкой себестоимости. ТСХ также идеально подходит для предварительного

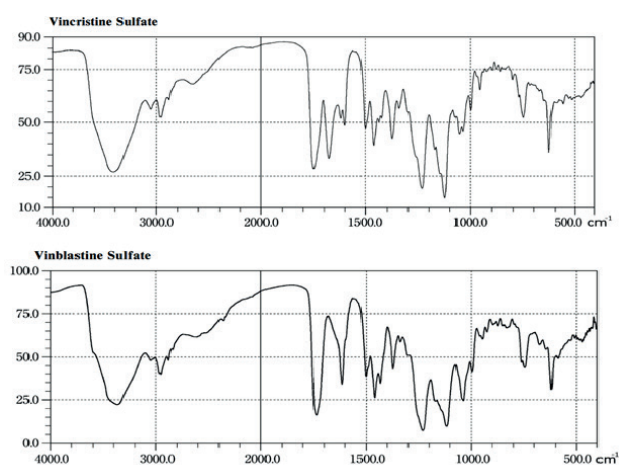


Рис. 3. ИК-спектры стандартных образцов VCR и VLB (J.Ph XVII)

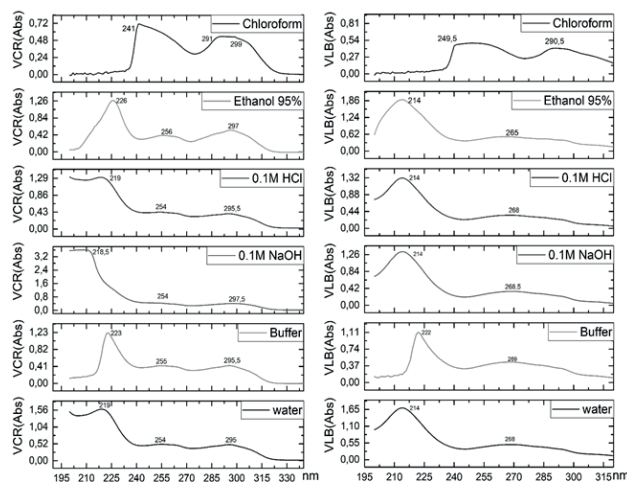


Рис. 4. УФ-спектры растворов VCR сульфата и VBL сульфата в различных растворителях (25 мкг/мл) [31]

Таблица 5

Спектральные характеристики VCR и VBL по данным ИК-спектров

ν, см ⁻¹ на спектре		Интенсивность	Диапазон частот функциональной группы [30]	Функциональная группа
VCR	VBL			
3450	3437	средняя	3550-3350	Первичные и вторичные амины и амиды
			3500-3300	Спирты (связанная ОН-группа)
2920	2935 2879	средняя	2900-2400	Амины, спирты
			3000-2800	Валентное, СН-
1725	1715	сильная	1900-1600	Карбонильные соединения, валентное, -C=O
			1730-1710	Насыщенные альдегиды, валентное, -C=O
1680	1650	средняя	1660-1600	Ароматические соединения
1650		сильная	1650-1580	Первичные и вторичные амины, деформационные -NH-
1225	1230	сильная	1250-1180	Эфиры карбоновых кислот, валентное -C-O-
775	769	сильная	770-730	Монозамещенный производные бензола, деформационные, -C-H

Таблица 6

Спектральные характеристики VCR сульфата и VBL сульфата в различных растворителях (25 мкг/мл)

Растворитель	VCR, λ _{max} нм			VBL, λ _{max} нм	
Метанол	222 ± 2	256 ± 2	298 ± 2	214 ± 2	266 ± 2
Вода очищенная	219 ± 1	254 ± 1	295 ± 1	214 ± 1	268 ± 1
0.1 М NaOH	218,5 ± 1	254 ± 1	297,5 ± 1	214 ± 1	268,5 ± 1
0.1 М HCl	219 ± 1	254 ± 1	295,5 ± 1	214 ± 1	268 ± 1
Фосфатный буферный раствор	223 ± 1	255 ± 1	295,5 ± 1	222 ± 1	269 ± 1
95% этанол	226 ± 1	256 ± 1	297 ± 1	214 ± 1	265 ± 1
Хлороформ	241 ± 1	291 ± 1	299 ± 1	249,5 ± 1	290,5 ± 1

определения химических веществ в растительных экстрактах перед анализом методом ВЭЖХ. Для получения удовлетворительной картины разделения ТИА методом ТСХ, хроматографирование проводят на ВЭТСХ-пластинах с силикагелем 60 F₂₅₄, RP-18 или, реже, пластины диоля.

ТСХ применяется для идентификации и количественного определения алкалоидов *C. Roseus*, в том числе для VCR и VLB. В зарубежных фармакопеях: (USP, E.Ph., V.Ph., J.Ph. в поздних изданиях, Int.Ph. 2017) ТСХ рекомендована для установления подлинности VCR и VLB. Кроме фармакопейной рекомендации существует много источников информации о применении метода ТСХ для анализа VCR и VLB. Следующие системы для ТСХ были использованы в разных источниках для идентификации VCR (таблица 7).

Для разделения VCR с другими димерными алкалоидами Катарантуса была рекомендована методика двухступенчатого хроматографирования на пластинках оксида алюминия. Хроматограммы сначала разгоняют в этилацетате, затем после высушивания проводится второй прогон в подвижной фазе этилацетат: абсолютный спирт (3:1). В этом методе VCR показывает значение R_f = 0.54. Двухмерная технология ТСХ применяется для разделения более сложных смесей алкалоидов из *C. roseus*. Пятна на ТСХ могут быть обнаружены при помощи ультрафиолетового излучения (254 нм), опрыскивания хроматографической пластинки реагентом Драгендорфа [33], подкисленным иодплатиновым реагентом (K₂PtI₆) или с раствором 1% сульфата церия аммония в 85% фосфорной кислоте.

Камал Абид и др. [32] разработали валидированный ВЭТСХ метод для одновременного определения VCR и VLB в экстракте листьев *C. roseus*. В разработанной методике подвижная фаза состояла из толуол-метанол-диэтиламина (8.75:0.75:0.5). На основе полученных хромато-

грамм построена калибровочная кривая зависимости площади пика от концентрации [32].

Газо-жидкостная хроматография (ГЖХ)

Из научно-исследовательской литературы известно о том, что ГЖХ применяется для идентификации VCR и алкалоидов *C. roseus*. Для этих целей используют газовый хроматограф «Chrom Q» со стеклянными колонками с гексаметилдисулфидом, упакованным неподвижной жидкой фазой 3% OV-101 (1.0 мм x 3.2 мм), при программировании температуры от 200 до 300 °С в течение 5 мин. Газ-носитель: азот при расходе 30 мл/мин. В качестве детектора использовали пламенно-ионизационный детектор.

Метод высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ)

ВЭЖХ является ценным инструментом в анализе растений благодаря своей высокой разрешающей способности и совместимости для определения нелетучих и термически лабильных соединений. Поэтому ВЭЖХ часто применяют при определении алкалоидов, в том числе препаратов группы ТИА. Этот метод рекомендован для обнаружения и количественного определения VLB и VCR в зарубежных фармакопеях (E.Ph.8.0; J.Ph XVII; V.Ph.2013; USP Convention 2011). Имеются данные об использовании метода ВЭЖХ для определения VCR и его метаболитов в биологических жидкостях и тканях. Современные методы ВЭЖХ в основном обеспечивают отделение и идентификацию только ограниченного перечня алкалоидов Катарантуса, таких как амальцицин, серпентин, виндолин, VLB, VCR, лохнерицин, селологанин, стросозидин, капрантин, и таберон так, как стандарты других алкалоидов, обнаруженных в *C. Roseus*, пока не являются коммерчески доступными.

При анализе сложных образцов с помощью ВЭЖХ важно выбрать систему детектирования. Для обнаружения алкалоидов и прекурсоров *C. roseus* в настоящее время применяются различ-

Таблица 7

Некоторые подвижные фазы, применяемые в ТСХ для обнаружения ТИА

Неподвижная фаза	Подвижная фаза	Значение R _f	Источник
0,5 н LiOH / оксид алюминия	Абсолютный спирт-ацетонитрил (5: 95)	0.51	[26]
Silica gel HF ₂₅₄	Толуол-хлороформ-диэтиламин (80: 40: 6)	-	BPh. 1998
Silica gel 60 F ₂₅₄	Толуол-метанол-диэтиламин (8.75: 0,75: 0,5)	0.39	[32]
Смесь Silica gel	Эфир: метанол: метиламин (19: 2:1)	Сравнить со стандартным раствором	USP -2011
Silica gel R4	Толуол-хлороформ-диэтиламин (80: 40: 6)	-	Int.Ph. 2017
Silica gel G	метанол	0.39	[26]
	Н-Бутанол-ледяная уксусная кислота-вода (4: 1: 1)	0.16	
	Метанол: хлороформ (95:5)	0.16	
	Этилацетат - абсолютный спирт (3: 1)	0.18	

ные современные детекторы, такие как матричная фотодиодная (Photodiode Array - PDA) флуоресценция, электрораспылительная ионизация - масс-спектрометрия (ESI-MS), tandemная масс-спектрометрия (MS-MS), ЯМР и круговой дихроизм (circular dichroism - CD) [7].

Несмотря на существующую обширную базу литературы по анализу индольных алкалоидов *C. roseus*, продолжают дальнейшие усовершенствования методик ВЭЖХ для лучшего разрешения и количественного определения важных алкалоидов - VCR, VLB, виндолина и катарантина. В научной литературе показано, что для анализа этих алкалоидов применяются различные системы растворителей, буферы, длины волн обнаружения и колонки для разделения, такие как C_8 и C_{18} . Некоторые исследователи утверждают, что в анализе на колонке C_8 с использованием изократического элюирования с ацетонитрилом: карбонатом аммония (43:57), виндолин первым элюируется из колонки, а последующим - VCR, катарантин и VLB. Аналогичную картину элюции

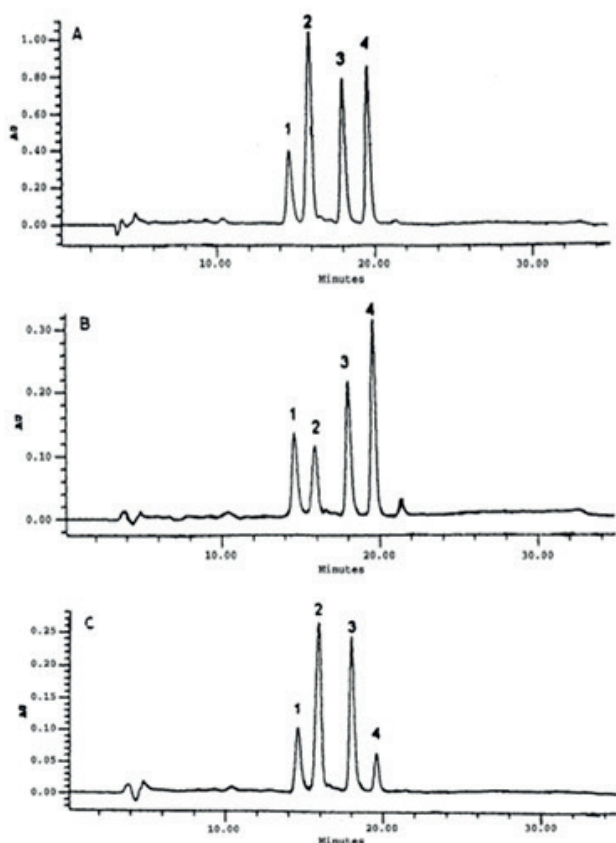


Рис. 5. ВЭЖХ хроматограмма [11]. А- детектирование при 220 нм, В - 254 нм, С - 280 нм. 1. VCR (R_t - 14.62 мин), 2. Катарантин (R_t - 15.92), 3. VLB (R_t - 18.02 мин), 4. Индолин (R_t - 19.60 мин)

сообщали другие исследователи, используя колонку C_{18} и градиентное элюирование в системе метанол:вода, содержащей 0,1% этаноламина, с обнаружением при 238 нм. Большинство исследователей использовали для обнаружения длины волн 254, 280 или 296 нм [26]. Кроме того Uniyal, G.C *et al.* [11] утверждают, что виндолин, VCR, VLB и катарантин обладают большей поглощающей способностью при 220 нм по сравнению с 254 или 280 нм (рис. 5 (А), (В) и (С) соответственно) и могут быть определены в диапазоне обнаружения 0.5-1.0 мкг или выше.

Kumar *et al.* [36] применяли ВЭЖХ в сочетании с масс-спектрометрией (HPLC/ESI-QTOF-MS/MS) для идентификации и распределения ТИА в этанольных экстрактах *C. roseus*. В эксперименте хроматографическое разделение всех экстрактов проводили на колонке Thermo Betasil C_8 (250 мм × 4.5 мм, 5 мкм) при 25 °С с использованием системы HPLC Agilent 1200. Подвижные фазы состояли из 0.1% муравьиной кислоты / воды (А) и ацетонитрила (В) при скорости потока 0.5 мкл/мин с использованием объема инъекции 1 мкл. Градиентное элюирование составляло: 0-10 мин, 20-30% В (линейный); 10-20 мин, 30-30% В; 20-25 мин, 30-80% В; 25-30 мин, 80-90% В, 30-37 мин, 90-20% В, наконец, подвижная фаза В поддерживалась на уровне 20% в течение последних 5 мин.

Jimmy Black *et al.* применяли ВЭЖХ для исследования стабильности сульфата VLB в водном растворе [1]. В проведенном эксперименте они применяли для всех аналитических определений систему HPLC LC19533 с колонкой с обращенной фазой (p-Bondapak CIS, 10 мкм, 3,9 мм × 30.0 см, Waters P/ N 27324). Мобильная фаза состояла из 65% метанола и 35% водного раствора 0.01 М гидроксида калия, доведенного 8.9% раствором о-фосфорной кислоты до pH 4.5 и детектирование VLB проводили с помощью УФ-детектора при 254 нм.

Won Tae Jeong *et al.* [37] разработали новый метод масс-спектрометрии с ультраэффективной жидкостной хроматографией (UPLC-Q-TOF), который обеспечивает чувствительное, быстрое и надежное обнаружение и идентификацию шести представителей индол-алкалоидов в *C. roseus* (VCR, VLB, аймалицин, капрантин, серпентин и виндолин). В эксперименте при элюировании алкалоидов на колонке C_{18} с помощью ацетонитрила и воды, содержащей 0.1% муравьиную кислоту и 10 мМ ацетат аммония, удалось достичь хороших показателей разрешения. Для характеристики мо-

лекул и их фрагментных ионов проводился анализ ионизации электрораспылением Q-TOF (ESI-Q-TOF), а для идентификации алкалоидов были использованы характерные ионы и фрагментация. Оценка аналитической методики согласно руководящим принципам ИСН, показала отличную линейность ($R^2 > 0,9988$), высокие пределы обнаружения (от 1 нг/мл до 10 нг/мл) и предел количественной оценки (от 3 нг/мл до 30 нг/мл), эффективность обнаружения (от 92.8 до 104.1%) для всех компонентов.

Naaranlahti T. *et al.* [34] применяли метод ВЭЖХ с электрохимическим детектированием для исследования алкалоидов *C. roseus*. Разработаны методики с применением колонки Supelcosil LC-18-DB (150 x 4.6 мм, диаметр 5 мкм). Изократическое разделение аджмалцина и катарантина достигалось при скорости потока 1.0 мл/мин, используя 0.1 М ацетат натрия - метанол - ацетонитрил (49:15:36, pH 6.5) в качестве подвижной фазы. Эталонным электродом в ячейке служил твердый Pd-Pd-черный электрод. Авторы сообщают, что потенциалы, которые применяли в данной работе, на 0.24 – 0.3 В ниже, чем при использовании электрода сравнения Ag-AgCl. Авторы в проведенном эксперименте установили содержание исследуемых алкалоидов аджмалцина и катарантина (0.465 мкг/мл и 0.467 мкг/мл) в сырье.

Методы радиоиммунологического анализа алкалоидов C. roseus

Анализ литературных данных показал, что радиоиммуноанализы (РИА), в основном, разработаны для определения ингибиторов новообразований VCR и VLB в крови. Разработка радиоиммуноанализов VCR и VLB позволила получить подробную информацию о распределении и элиминации этих препаратов в организме. Методом радиоиммунологического анализа можно обнаружить до нг/мл содержания в исследуемых образцах с высокой достоверностью [38-40].

Методы обнаружения ТИА в живых клетках

Флуоресценция клеток достигается за счет применения соответствующих красителей, которые связываются с определенной структурой клетки, сохраняя при этом способность флуоресцировать. Лаброс Мейметис (*Labros G. Meimetis*) и коллеги разработали новые методики для обнаружения VLB в живых клетках на основе применения флуоресцентных винбластин-флуорофор конъюгатов [42]. Их метод был основан на получении ацилазид соединений из VLB, которые в дальнейшем реагируют с этилендиами-

ном, либо 1,11-диамино-3,6,9-триоксаундеканом для получения соответствующих аминов. Затем с соответствующими флуоресцирующими соединениями (бора-дипиррометена флуорофор – BODIPY и кремний-родамин -SiR) получили VLB-флуорофор конъюгаты.

Ацилазид получали путем обработки VLB гидразином в метаноле при 60 °С для получения деацетилвинбластинового гидразида (рис. 6).

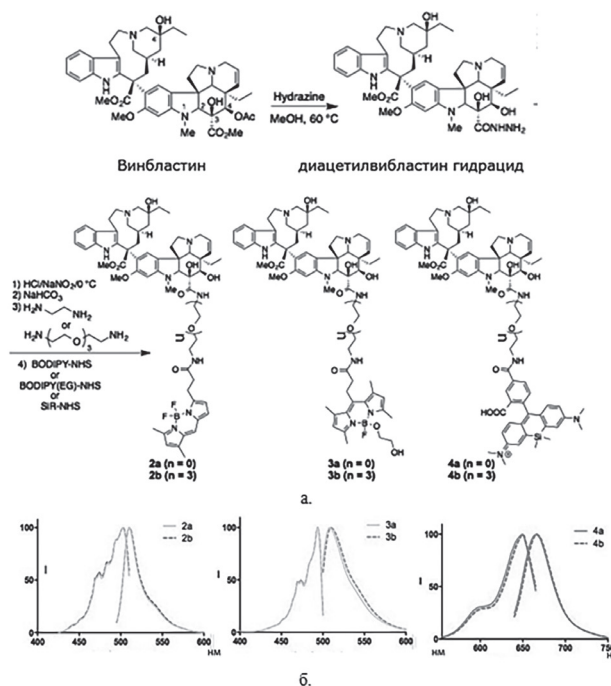


Рис. 6. а. Синтез винбластин-флуорофор конъюгатов. б. Спектры возбуждения и излучения винбластин-флуорофор конъюгатов в фосфатно-солевом буфере (PBS). NHS - Карбоксифлуоресцеин сукцинимидиловый эфир (Carboxyfluorescein succinimidyl ester)

Гидразид затем растворяли в 1.0 М HCl при 0 °С и перемешивали с нитритом натрия в течение 10 минут, получая соответствующий ацилазид. Это промежуточное соединение сразу же подвергали взаимодействию либо с этилендиамином, либо с 1,11-диамино-3,6,9-триоксаундеканом с получением соответствующих аминов. Получаемые флуорофоры для визуализации живых клеток должны быть яркими, фотостабильными и нетоксичными. Разработчики использовали флуорофор на основе зеленого излучающего бора-дипиррометена (BODIPY) и дальний красный излучающий кремний-родамин (SiR) для конъюгации.

Для получения спектров флуоресценции поглощения и излучения конъюгатов 2a / 2b, 3a / 3b

и 4a / 4b, 10 мМ исходного раствора ДМСО разбавляли до 1,0 мкМ с использованием фосфатно-солевого буфера и затем сканировали. Измерения квантового выхода были получены путем разбавления 10 мМ ДМСО запасами зондов 2a / 2b и 3a / 3b до 0.5-2.5 мкМ в этаноле и 10 мМ исходного раствора ДМСО 4a / 4b до 0.5-2.5 мкМ в этаноле / 1.0 мМ HCl. Спектры возбуждения при длине волны 470 нм зарегистрированы для конъюгатов 2a / 2b, 3a / 3b и коммерческого VLB-BODIPY (ThermoFisher Scientific, США), а для конъюгатов 4a / 4b – при длине волны возбуждения 640 нм.

Лаброс Мейметис и коллеги с применением синтезированных VLB-флуорофор конъюгатов получили высококачественные изображения в живых клетках. Они предполагают, что эти зонды найдут применение в исследовании одноклеточной фармакокинетики, фармакодинамики и механизмов транспортировки ЛС в тканях и клетках.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, VCR и VLB являются одними из наиболее хорошо изученных и эффективных ЛС в химиотерапевтической онкологической практике. Анализ данных литературы позволяет сделать следующие выводы.

Во-первых, ТИА являются многочисленной группой природных биологически активных соединений сложной гетероциклической структуры, и поэтому для их изучения необходимо использовать комплекс современных физико-химических методов, таких как инфракрасная спектроскопия, ВЭЖХ, капиллярный электрофорез, ЯМР и др.

Во-вторых, в контроле качества данных фармацевтических субстанций и лекарственных форм на их основе лидирующие позиции занимают физико-химические, в частности хроматографические (ВЭЖХ), методы анализа, поскольку с их помощью в минимально короткое время возможно определить наиболее важные критерии качества (подлинность, чистоту, количественное содержание). Кроме того, метод позволяет контролировать содержание ТИА в биологических жидкостях (моча, кровь) и таким образом корректировать лечение больного данными противоопухолевыми лекарственными препаратами.

В-третьих, использование метода спектрофотометрии в ультрафиолетовой области, который рекомендован некоторыми литературными источниками, возможно только после предварительного разделения ТИА, так как они имеют близкие максимумы поглощения в УФ-области спектра.

В-четвертых, для изучения ТИА в различных растительных объектах, целесообразно использовать метод ТСХ, который сочетая в себе высокую чувствительность и простоту, позволяет разделить ТИА, проводить их идентификацию и определить их количественное содержание

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Black J., Buechter D.D., Chinn J.W. // Journal of pharmaceutical sciences. 1988. Vol. 77. № 7. P. 630-634.
2. Haim N., Epelbaum R., Ben-Shahar M. // Cancer. 1994. Vol. 73. № 10. P. 2515-2519. doi:10.1002/1097-0142(19940515)73:10<2515::AID-CNCR2820731011>3.0.CO;2-G.
3. Fizazi K., Do K.A., Wang X. // Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology. 2002. Vol. 13. № 1. P. 125-34. doi:10.1093/annonc/mdf005.
4. Almagro L., Fernández-Pérez F., Pedreño M. // Molecules. 2015. Vol. 20. P. 2973-3000. doi:10.3390/molecules20022973.
5. Barik K., Sao S., Parihar D.K. // Indo American Pharmaceutical science. 2016. Vol. 3. № 3. P. 288-293.
6. Nejat N., Valdiani A., Cahill D. // The Scientific World Journal. 2015. Vol. 2015. P. 1-19. doi:10.1155/2015/982412.
7. Hisiger S., Jolicoeur M. // Phytochemistry Reviews. 2007. Vol. 6. № 2-3. P. 207-234. doi:10.1007/s11101-006-9036-y.
8. Shukla A.K., Shasany A.K., Gupta M.M. // Journal of Experimental Botany. 2006. Vol. 57. № 14. P. 3921-3932. doi:10.1093/jxb/erl146.
9. R. van der Heijden, Jacobs D.I., Snoeijer W. // Current Medicinal Chemistry. 2004. Vol. 11. P. 607-628.
10. Muthulakshmi S., Pandiyarajan V. // Asian Journal of Plant Science and Research. 2013. Vol. 3. № 4. P. 81-87.
11. Uniyal G.C., Bala S., Mathur A.K. // Phytochemical Analysis. 2001. Vol. 12. № 3. P. 206-210. doi:10.1002/pca.575.
12. Goswami S. Preliminary Phytochemical Screening and Standardisation of Leaves of *Catharanthus Roseus (L.) G. Don*, 2009, P. 21-24.
13. P.P. Joy Medicinal Plants. Med. Plants. Kerala: Kerala agricultural university, 1998, 211 p.
14. Jossang A., Fodor P., Bodo B. // The Journal of Organic Chemistry. 1998. Vol. 63. № 21. P. 7162-7167. doi:10.1021/jo972333t.
15. Banoczi Z., Gorka-Kereskenyi A., Remenyi J. // Bioconjugate Chemistry. 2010. Vol. 21. № 11. P. 1948-1955. doi:10.1021/bc100028z.

16. Naeem M., Aftab T., Khan M.M.A. *Catharanthus roseus*: Current Research and Future Prospects. International Publishing, 2017, 412 p. doi:10.1007/978-3-319-51620-2.
17. Szabó L.F. // *Molecules*. 2008. Vol. 13. № 8. P. 1875-1896. doi:10.3390/molecules13081875.
18. Ивонин А.Г., Пименов Е.В., Оборин В.А., Девришов Д.А., Копылов С.Н. // Известия Коми научного центра УрО РАН. 2012. Т. 1. № 9. С. 46-55.
19. Svoboda G.H. The Role of the Alkaloids of *Catharanthus Roseus* (*L.*) *G. Don* (*Vinca Rosea*) and Their Derivatives in Cancer Chemotherapy. Plants: The Potentials for Extracting Protein, Medicines, and Other Useful Chemicals. Indianapolis, IN., 1983. – P. 154-169.
20. Gidding C.E., Kellie S.J., Kamps W.A. // Critical reviews in oncology/hematology. 1999. Vol. 29. № 3. P. 267-287. doi:10.1016/S1040-8428(98)00023-7.
21. Johnson I.S., Armstrong J.G., Gorman M. // Cancer research. 1963. Vol. 23. № 77. P. 1390-427.
22. Desireddy S., Rasineni K., Bellamkonda R. // Pharmacognosy Research. 2010. Vol. 2. № 3. P. 195. doi:10.4103/0974-8490.65523.
23. Yang T., Choi M.-K., Cui F.-D. // Pharmaceutical Research. 2007. Vol. 24. № 12. P. 2402-2411. doi:10.1007/s11095-007-9425-y.
24. Banerjee N., Singh S. // International Journal of Research in Pharmaceutical and Biomedical Sciences. 2013. Vol. 4. № 2. P. 436-455.
25. Akhmanova A., Steinmetz M.O. // Nature Reviews Molecular Cell Biology. 2008. Vol. 9. № 4. P. 309-322. doi:10.1038/nrm2369.
26. Brittain H.G. Analytical Profiles of Drug Substances and Excipients. Academic press, 1993, 153 p.
27. Volkov S.K. // Pharmaceutical Chemistry Journal. 1996. Vol. 30. № 6. P. 391-399.
28. Jakovljevic I.M., David Seay L., Shaffer R.W. // Journal of Pharmaceutical Sciences. 1964. Vol. 53. № 5. P. 553-557. doi:10.1002/jps.2600530521.
29. Jakovljevic I.M. // Journal of Pharmaceutical Sciences. 1962. Vol. 51. № 2. P. 187-188. doi:10.1002/jps.2600510226.
30. Наканиси К. Инфракрасная спектроскопия и строение органических соединений. Москва, Мир, 1965, 216 с.
31. Халахакун А.Д. Автореферат диссертации кандидата фармацевтических наук. Москва, 2018, 26 с.
32. Abid K., Sayeed A., Jalees A.F. // International journal of drug development and reaserch. 2013. Vol. 5. № 3. P. 341-348.
33. Cazes J., Waksmundzka-Hajnos M., Sherma J., Kowalska T. Thin Layer Chromatography in Phytochemistry: Chromatographic Science Series. Vol. 99, CRC Press, 2008, 888 p. doi:10.1201/9781420046786.
34. Naaranlahti T., Ranta V.P., Jarho P. // The Analyst. 1989. Vol. 114. № 10. P. 1229-31.
35. Ranta V.-P., Callaway J.C., Naaranlahti T. Electrochemical Detection of Alkaloids in HPLC. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 1994. Vol. 15. P. 91-114. doi:10.1007/978-3-642-84226-9_3.
36. Kumar S., Bajpai V., Singh A. // Rapid Communications in Mass Spectrometry. 2018. Vol. 32. № 4. P. 319-332. doi:10.1002/rcm.8037.
37. Jeong W.T., Bin Lim. // Journal of Chromatography B. 2018. Vol. 1080. P. 27-36. doi:10.1016/j.jchromb.2018.02.018.
38. Langone J.J., D'Onofrio M.R., Van H. // Analytical Biochemistry. 1979. Vol. 95. № 1. P. 214-221. doi:10.1016/0003-2697(79)90208-2.
39. Sethi V.S., Burton S.S., Jackson D.V. // Cancer chemotherapy and pharmacology. 1980. Vol. 4. № 3. P. 183-187. doi:10.1007/BF00254016.
40. Teale J., Clough J., Marks V. // British Journal of Clinical Pharmacology. 1977. Vol. 4. № 2. P. 169-172. doi:10.1111/j.1365-2125.1977.tb00690.x.
41. Tikhomiroff C., Jolicoeur M. // Journal of Chromatography A. 2002. Vol. 955. № 1. P. 87-93. doi:10.1016/S0021-9673(02)00204-2.
42. Meimetis L.G., Giedt R.J., Mikula H. // Chemical Communications. 2016. Vol. 52. № 64. P. 9953-9956. doi:10.1039/C6CC04129A.

Воронежский государственный университет

**Тринева О. В., докт. фарм. наук, доцент каф. фарм. химии и фармацевтической технологии*
E-mail: trineevaov@mail.ru

Сливкин А. И., докт. фарм. наук, профессор,

зав. кафедрой фарм. химии и фармацевтической технологии
E-mail: slivkin@pharmvsu.ru

Voronezh State University

**Trineeva O. V., PhD., DSci, associate professor, dept. of pharmaceutical chemistry and pharmaceutical technology*
E-mail: trineevaov@mail.ru

Slivkin A. I., PhD., DSci, Full Professor, head of the department of pharmaceutical chemistry and pharmaceutical technology

E-mail: slivkin@pharmvsu.ru

Халахакун М. А. Д., выпускник аспирантуры
фармацевтического факультета
E-mail: amilajh1982@hotmail.com

Halakhakun M. A. D., post graduate student
E-mail: amilajh1982@hotmail.com

METHODS OF QUALITATIVE AND QUANTITATIVE DETERMINATION OF TERPEN-INDOLE ALKALOIDS OF THE PLANT OF THE GENUS CATHARANTHUS (REVIEW)

O. V. Trineeva, A. I. Slivkin, A. D. Halahakun

Voronezh State University

Abstract. Cancer remains one of the most dangerous, according to WHO, with 10 million new cases each year. Antitumor chemotherapy is one of the most important and most dynamically developing departments of modern oncology. Terpenal-indole alkaloids (TIA) - vincristine (VCR), vinblastine (VLB), and their derivatives as cytostatics include mono- and combined chemotherapy in the treatment of various oncological diseases. VCR and VLB are among the most well-studied and effective drugs in chemotherapy. The goal of the work is to generalize and systematize the methods for isolating, qualitative and quantitative determination of TIA plants of the plant genus Catharanthus (on the example of VCR and VLB).

In *C. roseus*, more than 130 types of TIA are biosynthesized, some of which have pronounced pharmacological activity. Decades of research have shown the pharmacological activity of alkaloids: serpentine, ajmalsin, bisidol alkaloids VLB, VCR and 3,4-anhydrovinblastine. VLB and VCR were discovered as a result of a drug screening program carried out in the late 1950.

Determination of physicochemical constants (angle of rotation of the polarization plane, refractive index, UV- and IR- absorption spectra) can provide information that is further evidence of the identity and purity of the samples. TLC is used to identify and quantify *C. Roseus* alkaloids, including VCR and VLB in foreign pharmacopoeias and many other references. For the quantitative determination of preparations of the TIA group, currently the most frequently used method is HPLC in foreign pharmacopoeias. This method is recommended for the detection and quantification of VLB and VCR and their metabolites in biological fluids. Thus, in the quality control of the data of pharmaceutical substances and dosage forms based on them, the leading positions are occupied by physicochemical, in particular chromatographic (HPLC), methods of analysis. In phytochemical studies of *C. roseus*, various analytical methods are used for qualitative and quantitative determination: HPLC, HPLC-UV, HPLC-MS, HPLC-EC, HPLC, TLC, GC, spectral methods (UV, IR), MHC, LC/MS-BP, electrophoresis etc.

Keywords: terpene-indole alkaloids, vincristine, vinblastine, qualitative and quantitative determination.

REFERENCES

1. Black J., Buechter D.D., Chinn J.W., Journal of pharmaceutical sciences, 1988, Vol.77, №7, P. 630-634.
2. Haim N., Epelbaum R., Ben-Shahar M., Cancer, 1994, Vol. 73, № 10, P. 2515-2519. doi:10.1002/1097-0142(19940515)73:10<2515::AID-CNCR2820731011>3.0.CO;2-G.
3. Fizazi K., Do K.A., Wang X., Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology, 2002, Vol. 13, №1, P. 125-34. doi:10.1093/annonc/mdf005.
4. Almagro L., Fernández-Pérez F., Pedreño M., Molecules, 2015, Vol. 20, P. 2973-3000. doi:10.3390/molecules20022973.
5. Barik K., Sao S., Parihar D.K., Indo American Pharmaceutical science, 2016, Vol. 3, № 3, P. 288-293.
6. Nejat N., Valdiani A., Cahill D., The Scientific World Journal, 2015, Vol. 2015, P. 1-19. doi:10.1155/2015/982412.
7. Hisiger S., Jolicoeur M., Phytochemistry Reviews, 2007, Vol. 6, №2-3, P. 207-234. doi:10.1007/s11101-006-9036-y.
8. Shukla A.K., Shasany A.K., Gupta M.M., Journal of Experimental Botany, 2006, Vol. 57, № 14, P. 3921-3932. doi:10.1093/jxb/erl146.
9. R. van der Heijden, Jacobs D.I., Snoeijer W., Current Medicinal Chemistry, 2004, Vol. 11, P. 607-628.
10. Muthulakshmi S., Pandiyarajan V., Asian Journal of Plant Science and Research, 2013, Vol. 3, №4, P. 81-87.
11. Uniyal G.C., Bala S., Mathur A.K., Phytochemical Analysis, 2001, Vol. 12, № 3, P. 206-210. doi:10.1002/pca.575.

12. Goswami S. Preliminary Phytochemical Screening and Standardisation of Leaves of *Catharanthus Roseus* (L .) G . Don, 2009, P. 21-24.
13. P.P. Joy Medicinal Plants. Med. Plants. Kerala: Kerala agricultural university, 1998, 211 p.
14. Jossang A., Fodor P., Bodo B., The Journal of Organic Chemistry, 1998, Vol. 63, № 21, P. 7162-7167. doi:10.1021/jo972333t.
15. Banoczi Z., Gorka-Kereskenyi A., Remenyi J., Bioconjugate Chemistry, 2010, Vol. 21, № 11, P. 1948-1955. doi:10.1021/bc100028z.
16. Naeem M., Aftab T., Khan M.M.A. *Catharanthus roseus*: Current Research and Future Prospects. International Publishing, 2017, 412 p. doi:10.1007/978-3-319-51620-2.
17. Szabó L.F., *Molecules*, 2008, Vol. 13, № 8, P. 1875-1896. doi:10.3390/molecules13081875.
18. Ivonin A.G., Pimenov E.V., Oborin V.A., Devrishov D.A., Kopylov S.N., *Izvestiya Komi nauchnogo tsentra UrO RAN*, 2012, T. 1, № 9, P. 46-55.
19. Svoboda G.H. The Role of the Alkaloids of *Catharanthus Roseus* (L.) G . Don (*Vinca Rosea*) and Their Derivatives in Cancer Chemotherapy. *Plants: The Potentials for Extracting Protein, Medicines, and Other Useful Chemicals*. Indianapolis, IN, 1983, P. 154-169.
20. Gidding C.E., Kellie S.J., Kamps W.A., *Critical reviews in oncology/hematology*, 1999, Vol. 29, № 3, P. 267-287. doi:10.1016/S1040-8428(98)00023-7.
21. Johnson I.S., Armstrong J.G., Gorman M., *Cancer research*, 1963, Vol. 23, № 77, P. 1390-427.
22. Desireddy S., Rasineni K., Bellamkonda R., *Pharmacognosy Research*, 2010, Vol. 2, №3, P. 195. doi:10.4103/0974-8490.65523.
23. Yang T., Choi M.-K., Cui F.-D., *Pharmaceutical Research*, 2007, Vol. 24, № 12, P. 2402-2411. doi:10.1007/s11095-007-9425-y.
24. Banerjee N., Singh S., *International Journal of Research in Pharmaceutical and Biomedical Sciences*, 2013, Vol. 4, № 2, P. 436-455.
25. Akhmanova A., Steinmetz M.O., *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2008, Vol. 9, № 4, P. 309-322. doi:10.1038/nrm2369.
26. Brittain H.G., *Analytical Profiles of Drug Substances and Excipients*. Academic Press, 1993, 153 p.
27. Volkov S.K., *Pharmaceutical Chemistry Journal*, 1996, Vol. 30, № 6, P. 391-399.
28. Jakovljevic I.M., David Seay L., Shaffer R.W., *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 1964, Vol. 53, №5, P. 553-557. doi:10.1002/jps.2600530521.
29. Jakovljevic I.M., *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 1962, Vol. 51, № 2, P. 187-188. doi:10.1002/jps.2600510226.
30. Nakanisi K., *Infrakrasnaya spektroskopiya i stroenie organicheskikh so-edinenii*. Moskva, Mir, 1965, 216 p.
31. Khalakhakun A.D., *Avtoreferat dissertatsii kandidata farmatsevticheskikh nauk*, Moskva, 2018, 26 p.
32. Abid K., Sayeed A., Jalees A.F., *International journal of drug development and reaserch*, 2013, Vol. 5, №3, P. 341-348.
33. Cazes J., Waksmundzka-Hajnos M., Sherma J., Kowalska T., *Thin Layer Chromatography in Phytochemistry: Chromatographic Science Series*, Vol. 99, CRC Press, 2008, 888 p. doi:10.1201/9781420046786.
34. Naaranlahti T., Ranta V.P., Jarho P., *The Analyst.*, 1989, Vol. 114, № 10, P. 1229-31.
35. Ranta V.-P., Callaway J.C., Naaranlahti T., *Electrochemical Detection of Alkaloids in HPLC*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 1994, Vol. 15, P. 91-114. doi:10.1007/978-3-642-84226-9_3.
36. Kumar S., Bajpai V., Singh A., *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 2018, Vol. 32, № 4, P. 319-332. doi:10.1002/rcm.8037.
37. Jeong W.T., Bin Lim., *Journal of Chromatography B*, 2018, Vol. 1080, P. 27-36. doi:10.1016/j.jchromb.2018.02.018.
38. Langone J.J., D'Onofrio M.R., Van H., *Analytical Biochemistry*, 1979, Vol. 95, №1, P. 214-221. doi:10.1016/0003-2697(79)90208-2.
39. Sethi V.S., Burton S.S., Jackson D.V., *Cancer chemotherapy and pharmacology*, 1980, Vol. 4, № 3, P. 183-187. doi:10.1007/BF00254016.
40. Teale J., Clough J., Marks V., *British Journal of Clinical Pharmacology*, 1977, Vol. 4, № 2, P. 169-172. doi:10.1111/j.1365-2125.1977.tb00690.x.
41. Tikhomiroff C., Jolicoeur M., *Journal of Chromatography A*, 2002, Vol. 955, № 1, P. 87-93. doi:10.1016/S0021-9673(02)00204-2.
42. Meimetis L.G., Giedt R.J., Mikula H., *Chemical Communications*, 2016, Vol. 52, № 64, P. 9953-9956. doi:10.1039/C6CC04129A.