

УДК 581.1;543.42.062;543.422.3

## ПРИМЕНЕНИЕ БРОМКРЕЗОЛОВОГО ЗЕЛЕНОГО ДЛЯ СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ СОДЕРЖАНИЯ АЛКАЛОИДОВ НА ПРИМЕРЕ РУТЫ ДУШИСТОЙ<sup>1</sup>

© 2024 г. А. И. Валиева<sup>а,\*</sup>, А. Н. Акулов<sup>а</sup>

<sup>а</sup>Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Казанский институт биохимии и биофизики – обособленное структурное подразделение Федерального исследовательского центра “Казанский научный центр Российской академии наук”, Казань, Россия

\*e-mail: cell-culture@yandex.ru

Поступила в редакцию 28.09.2023 г.

После доработки 15.11.2023 г.

Принята к публикации 16.11.2023 г.

Были проведены исследования по подбору условий для спектрофотометрического определения общего содержания алкалоидов с помощью бромкрезолового зеленого (БКЗ): рН буфера, время образования ионной пары БКЗ–алкалоид и время стабильности ионной пары БКЗ–алкалоид. Показано, что метод применим для тропановых, изохинолиновых, индольных, пиридиновых алкалоидов. Метод был использован для экспресс-оценки содержания алкалоидов в биомассе растений-регенерантов Руты душистой (*Ruta graveolens* L.) и в аптечном препарате “Рута душистая трава”. При использовании минимального объема сухого растительного материала (20 мг) было определено, что содержание алкалоидов в растениях-регенерантах составило 10.55 мг/г сухого веса, что в 1.62 раза меньше, чем в образцах аптечного препарата. Методом обращенно-фазной ВЭЖХ в очищенных фракциях алкалоидов было выявлено 16 соединений разной интенсивности, из них 6 были общими для растений-регенерантов и для аптечного препарата.

**Ключевые слова:** *Ruta graveolens*, алкалоиды, бромкрезоловый зеленый, растения-регенеранты

**DOI:** 10.31857/S0015330324010171, **EDN:** NUUMWT

### ВВЕДЕНИЕ

Определение содержания биологически активных веществ в растениях является необходимым как для понимания их роли в растительном организме, так и для безопасного практического использования растительных ресурсов. В медицине, ветеринарии и пищевой промышленности особенно критичным является точное определение содержания БАВ, способных проявить свое действие на организм человека и животных в микромолярных концентрациях. К таким веществам относится большинство алкалоидов, азотсодержащих органических соединений вторичного происхождения. Алкалоиды обладают свойствами слабых оснований и накапливаются в растениях в виде солей органических кислот. Из растительного материала соли алкалоидов извлекают с помощью полярных растворителей, очищают от примесей, затем подщелачивают, в результате чего алкалоиды переходят в

свободное состояние и становятся доступными для экстракции неполярными растворителями. Это свойство алкалоидов используют в таких аналитических методах определения содержания алкалоидов, как титрометрический и гравиметрический. Однако эти методы не подходят для рутинного анализа, поскольку трудоемки, требуют большого объема растительного материала и при этом имеют свои ограничения. В частности, титрометрический метод не годится для определения содержания алкалоидов со слабыми основными и/или амфотерными свойствами, а гравиметрический метод не подходит для определения содержания малых доз алкалоидов, а также содержания термолабильных алкалоидов.

Спектрофотометрические методы характеризуются высокой чувствительностью, поэтому их можно применять при малом объеме растительного материала, однако универсального реактива для определения содержания алкалоидов до сих пор не найдено. Разнородность групп алкалоидов по структуре и свойствам делает разработку единого спектрофотометрического метода определения общего содержания алкалоидов

<sup>1</sup> Дополнительные материалы размещены в электронном виде по DOI статьи: 10.31857/S0015330324010171

**Сокращения:** БКЗ – бромкрезоловый зеленый, опт.ед. – оптических единиц, УЗ – ультразвук.

затруднительной, но изучение роли алкалоидов невозможно без решения методологических проблем определения содержания алкалоидов, поэтому продолжается поиск простых, надежных методов для рутинного анализа.

В 1957 году для титрометрического определения содержания алкалоидов было предложено использовать кислотно-основные индикаторы из группы сульфоталеинов, поскольку они могут реагировать с третичными аминами с образованием окрашенных продуктов присоединения [1]. Thomis и Kotionis протестировали 8 индикаторов и заключили, что все они на один-два порядка чувствительнее, чем пикриновая кислота, реактивы Драгендорфа, Майера, Шейблера, традиционно используемые для качественного определения алкалоидов [1].

Позднее бромкрезоловый зеленый (БКЗ), один из сульфоталеинов, стали использовать для спектрофотометрического определения содержания алкалоидов [2]. Однако единый метод не был разработан. Например, все авторы отмечают, что максимальное поглощение ионной пары БКЗ–алкалоид находится в области 410–420 нм, при этом измерения проводят при разных аналитических длинах волн: при  $\lambda_{\max}$  [3–5], или же при 470 нм, на спаде поглощения ионной пары БКЗ–алкалоид [6].

В методиках, представленных в литературе, может различаться не только длина волны, выбранная для измерения оптической плотности, но также рН используемого буфера, время, отводимое для формирования комплекса. Несмотря на разные, часто противоречащие друг другу подходы, используемые в статьях, сам метод достаточно простой и недорогой, поэтому может быть перспективным и удобным как в качестве экспресс-теста перед применением более дорогостоящих и трудоемких методов анализа, так и в качестве самостоятельного анализа.

Рута душистая содержит алкалоиды разных классов – акридоновых, хинолиновых, фуорохинолиновых [7]. Они обладают антибактериальными [8, 9], противогрибковыми [10] и противовирусными свойствами [11], а также проявляют активность против простейших [10]. Выявлены антиканцерогенные свойства алкалоидов Руты душистой. Показано, что хинолиновый алкалоид гравеолин индуцирует апоптоз в клетках меланомы [12], фуорохинолиновые алкалоиды подавляют рост опухолевых клеток [10], акридоновые алкалоиды проявляют цитотоксический эффект, воздействуют на опухолевые клетки на регуляторном уровне, связываясь с топоизомеразами I и II, теломеразы, протеинкиназами [13]. В настоящее время изучаются механизмы действия алкалоидов Руты душистой и разрабатываются лекарства нового поколения для лечения рака [13].

Следует подчеркнуть, что акридоновые и фуорохинолиновые алкалоиды обнаружены только в растениях семейства Рутовые, а химический синтез сложных алкалоидов в большинстве случаев нерентабелен, при получении синтетических аналогов часто модифицируют природные алкалоиды, поэтому в фармакологии в качестве основного источника алкалоидов продолжают использовать растительный материал. Это могут быть растения, собранные в местах их естественного произрастания, растения, выращиваемые в промышленных масштабах, а также культура клеток и тканей *in vitro* и регенеранты растений, полученные из нее [14].

Рута душистая произрастает в субтропическом климате как многолетнее травянистое растение, в умеренных широтах культивируется как однолетнее растение и не всегда хорошо наращивает биомассу, однако этот вид легко вводится и поддерживается в культуре *in vitro*. Хотя состав алкалоидов Руты душистой известен хорошо, общее содержание алкалоидов в литературе широко не представлено. Целью данной работы было оптимизировать метод спектрофотометрического определения содержания алкалоидов, оценить его надежность; применить для определения содержания алкалоидов в растительном материале Руты душистой, выращенной в условиях *in vitro* и *in vivo*.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве объектов исследования были использованы: 1 – аптечный препарат “Рута душистая трава” (ООО “Беловодье”, Россия), представлявший собой высушенную надземную часть растения (кусочки стеблей, листьев, соцветий), 2 – биомасса растений-регенерантов, полученных *in vitro* из морфогенной каллусной культуры Руты душистой (*Ruta graveolens* L.), способной к геммогенезу.

Для индукции роста растений-регенерантов, каллусную культуру Руты душистой переносили на свет на безгормональную МС-среду (МС<sub>6/г</sub>) на основе минеральных компонентов среды Мурасиге-Скуга [15] с добавлением: 2.0 мг/л тиамина·НСl, 2.0 мг/л пиридоксина·НСl, 2.0 мг/л никотиновой кислоты, 100 мг/л мезоинозитола, 30 г/л сахарозы, 8 г/л агара, рН 5.6. Появившиеся зеленые побеги отделяли от каллуса и переносили в колбы со средой МС<sub>6/г</sub> для получения новых побегов и оставляли на свету. Каждые 30 суток побеги отделяли и высаживали на свежую питательную среду.

### Реактивы и аптечные препараты

Реактивы для приготовления среды МС<sub>6/г</sub>, перечисленные выше, имеют маркировку А.С.С. grade, производства фирм “Serva” и “Sigma-Aldrich”.

Бромкрезоловый зеленый, кофеин (“Sigma-Aldrich”, A.C.S. grade), этанол, хлороформ, ацетонитрил, этилацетат, аммиак, ледяная уксусная кислота, муравьиная кислота (“Chemman Мос-реактив”, Россия, х.ч.), сахараза, йодид калия, нитрат висмута основной (“Реахим”, х.ч.).

Аптечные препараты: атропина сульфат (ФГУП “Московский эндокринологический завод”, Россия, 1 мг/мл), папаверина гидрохлорид (ОАО “Дальхимпром”, Россия, 20 мг/мл), никотин (“Enshi Heno”, Китай, 100 мг/мл, extra pure grade), Руты душистой трава (ООО “Беловодье”, Россия), Раунатин (ЗАО “Вифитех”, Россия), Сангвинаритрин (АО “Фармцентр Вилар”, Россия).

#### *Приготовление растворов*

Раствор 0.1 мМ БКЗ в хлороформе содержит: 1 мг БКЗ растворяли в 14 мл хлороформа.

Для получения 0.1 мМ атропина сульфат/папаверина гидрохлорид/никотин/кофеин в хлороформе необходимый объем алкалоида смешивали на вортексе (“Elmi”, Латвия) с 3 мл хлороформа: 6 мкл 2% папаверина гидрохлорида, 0.5 мкл 10% никотина, 1 мкл 6% кофеина, 205 мкл 0.1% атропина сульфата; при приготовлении атропина сульфата после смешивания с хлороформом дожидались разделения фаз и отбирали нижнюю хлороформную фазу.

Для получения 0.1 мМ водного раствора бромкрезолового зеленого (БКЗ): 7 мг БКЗ растворяли в 300 мкл 2N NaOH, добавляли 2 мл деионизированной воды MilliQ (“Millipore”, Италия) и затем доводили до 100 мл водой MilliQ.

Фосфатно-цитратный буфер (0.25 М) готовили так: к 50 мл 0.5 М  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  добавляли 50 мл 0.2 М моногидрат лимонной кислоты, pH доводили до 4.7. В эксперименте по подбору pH буфера была использована серия 0.25 М фосфатно-цитратного буфера с pH 3.0, 4.5, 4.6, 4.7, 4.8, 5.4.

#### *Подготовка образцов и проведение спектрофотометрических измерений*

Для получения спектров поглощения БКЗ, алкалоидов и их смеси (1 : 1) БКЗ и алкалоиды растворяли в хлороформе как описано выше и снимали спектр поглощения напротив хлороформа в кварцевых кюветах на спектрофотометре LAMBDA 25 (“PerkinElmer”, США) в области 240–700 нм.

Для построения калибровочных кривых использовали 0.1% раствор атропина сульфата, папаверина гидрохлорида, никотина. К 0.5 мл фосфатно-цитратного буфера, pH 4.7 добавляли необходимый объем алкалоида (0.5, 1, 2, 4, 5, 6, 8, 10, 20 мкл) и 0.5 мл 0.1 мМ водного раствора БКЗ. Для формирования ионной пары БКЗ–алкалоид реакцию смесь (буфер, алкалоид, БКЗ) выдерживали 3–5 мин при комнатной температуре и затем экстрагировали дважды

хлороформом. Для этого реакционную смесь интенсивно перемешивали на вортексе (“Elmi”, Латвия) с 0.5 мл хлороформа, затем дожидались расслоения фаз, пипеткой отбирали нижнюю фазу, а к водной фазе добавляли 0.5 мл хлороформа и повторяли процедуру. Конечный объем хлороформного образца доводили чистым хлороформом до 1 мл. Для получения холостого раствора к буферу добавляли БКЗ и проводили экстракцию хлороформом как описано выше. Образцы сканировали на спектрофотометре LAMBDA 25 (“PerkinElmer”, США) в диапазоне от 350 до 700 нм. По значениям оптической плотности при максимуме поглощения ионной пары (417 нм – для атропина, 418 нм – для папаверина, 414 нм – для никотина) были построены калибровочные кривые.

В экспериментах по подбору pH буферного раствора в качестве тестового алкалоида был использован папаверина гидрохлорид в концентрации 5 мкг и буфер с pH равным 3.0, либо 4.5, 4.6, 4.7, 4.8, 5.4. В экспериментах по подбору оптимального времени реакционную смесь, содержащую 4 мкг алкалоида (атропина сульфата, папаверина гидрохлорида, либо никотина), выдерживали в течение 0, 5, 10, 30 мин при комнатной температуре до экстракции хлороформом. В экспериментах по изучению стабильности ионной пары спектры поглощения снимали через 10, 20, 60 мин, 1 сут.

#### *Подготовка образцов препарата с известной концентрацией алкалоидов*

Таблетку препарата “Раунатин” взвешивали и измельчали в ступке. К навеске из полученного порошка, соответствующей 1 мг алкалоидов Раувольфии змеиной, добавляли 1 мл подкисленного 70% этанола (0.5% уксусная кислота, об/об). Экстракцию алкалоидов проводили при 80°C 30 мин, затем центрифугировали (10 мин, 10000 g на центрифуге MiniSpin (Eppendorf, США)), полученный супернатант использовали в качестве стокового раствора (1 мг/мл) для анализа.

Препарат “Сангвинаритрин”, который, согласно инструкции по применению препарата, содержал сумму гидрохлоридов сангвинина и хелеритрина (0.2% раствор в этаноле), смешивали с водой MilliQ (1 : 1), использовали в качестве стокового раствора (1 мг/мл).

#### *Экстракция алкалоидов из образцов Руты душистой*

Побеги регенерантов лиофильно высушивали на сублимационной сушилке Alpha 1-4 LD-2 (“Martin Christ”, Германия). Высушенные побеги растений-регенерантов и содержимое аптечного препарата “Рута душистая трава” размалывали на шаровой мельнице MM400 (“Retsch”, Германия) при частоте 25 Гц в течение 3 мин.

Для экстракции алкалоидов 20 мг образца заливали 0.5 мл подкисленного 70% этанола в 0.5% уксусной кислоте, обрабатывали ультразвуком (УЗ) (5 мин, 30 кГц, 20°C), а затем инкубировали в термостате в течение 1 ч при 80°C (“Labtex”, Россия). Гомогенат центрифугировали (10 мин, 10000 g), супернатант отбирали, к осадку добавляли 0.2 мл 70% подкисленного этанола, обрабатывали УЗ (2–3 мин) и инкубировали при 80°C в течение 0.5 ч. Гомогенат центрифугировали (10 мин, 10000 g), супернатанты объединяли. Аликвоты по 0.2 мл спиртового экстракта высушивали при 35°C, 20 ГПа на вакуумном концентраторе (“Eppendorf Concentrator plus/Vacufuge TM”, USA), использовали для последующего извлечения из них алкалоидов.

*Экстракция алкалоидов из этанольного экстракта для спектрофотометрического определения алкалоидов*

К высушенному экстракту добавляли 50 мкл 2N HCl, обрабатывали УЗ (5 мин, 30 кГц, 20°C), центрифугировали (5 мин, 10000 g), супернатант отбирали, к осадку добавляли 50 мкл 2N HCl и процедуру повторяли. Объединенный супернатант, содержащий алкалоиды в виде водорастворимых солей, отмывали от липофильных веществ 1 мл хлороформа. Верхнюю водную фазу отбирали пипеткой и нейтрализовали равным объемом 2N NaOH. Объем нейтрализованного раствора доводили водой до 0.5 мл и использовали для спектрофотометрического определения алкалоидов как описано выше.

*Подготовка образцов для ТСХ и проведение ТСХ-анализа*

Аликвоту (0.2 мл) нейтрализованного раствора лиофильно высушивали. К полученному осадку добавляли 100 мкл метанола и центрифугировали (1 мин, 10000 g). Для ТСХ алкалоидов использовали пластины ПТСХ-АФ А-УФ с индикатором УФ-254 (“Sorbfil”, Россия). 20 мкл супернатанта наносили на стартовую линию в виде полос шириной 4–5 мм. Разделение веществ проводили в смеси этилацетат–уксусная кислота–муравьиная кислота–вода (90:10:10:24). Смесь после смешивания расслаивали центрифугированием (1 мин, 1000 g), использовали верхнюю фазу. ТСХ-пластину рассматривали на трансиллюминаторе ТСП-20 МС (“Vilbert Lourmat”, Франция) при 254 и 312 нм. Для проявления пятен алкалоидов применяли реактив Драгендорфа, модифицированный по Мунье [16].

*Выделение и очистка алкалоидов из спиртового экстракта для ВЭЖХ анализа*

Очистку фракции алкалоидов проводили по модифицированной методике [17]. К высушенному экстракту добавляли 0.25 мл 2N HCl

и оставляли при 24°C на 1 час. К этому раствору добавляли равный объем хлороформа, перемешивали и расслаивали центрифугированием (1 мин, 1000 g). Нижнюю (хлороформную) фазу, содержащую кумарины, отбрасывали. Верхнюю (водную) фазу, содержащую соли алкалоидов, отбирали и подщелачивали 10% раствором NH<sub>4</sub>OH до pH 9.5, оставляли на 30 мин при 24°C, затем добавляли равный объем хлороформа, перемешивали и расслаивали центрифугированием (1 мин, 1000 g). Нижнюю (хлороформную) фазу, содержащую основания алкалоидов, отбирали и высушивали досуха в струе воздуха при 50°C. Полученный осадок смеси алкалоидов растворяли в 100 мкл 80% этанола, подкисленного с помощью HCl (до 2%, об/об), и использовали для дальнейшего ВЭЖХ анализа.

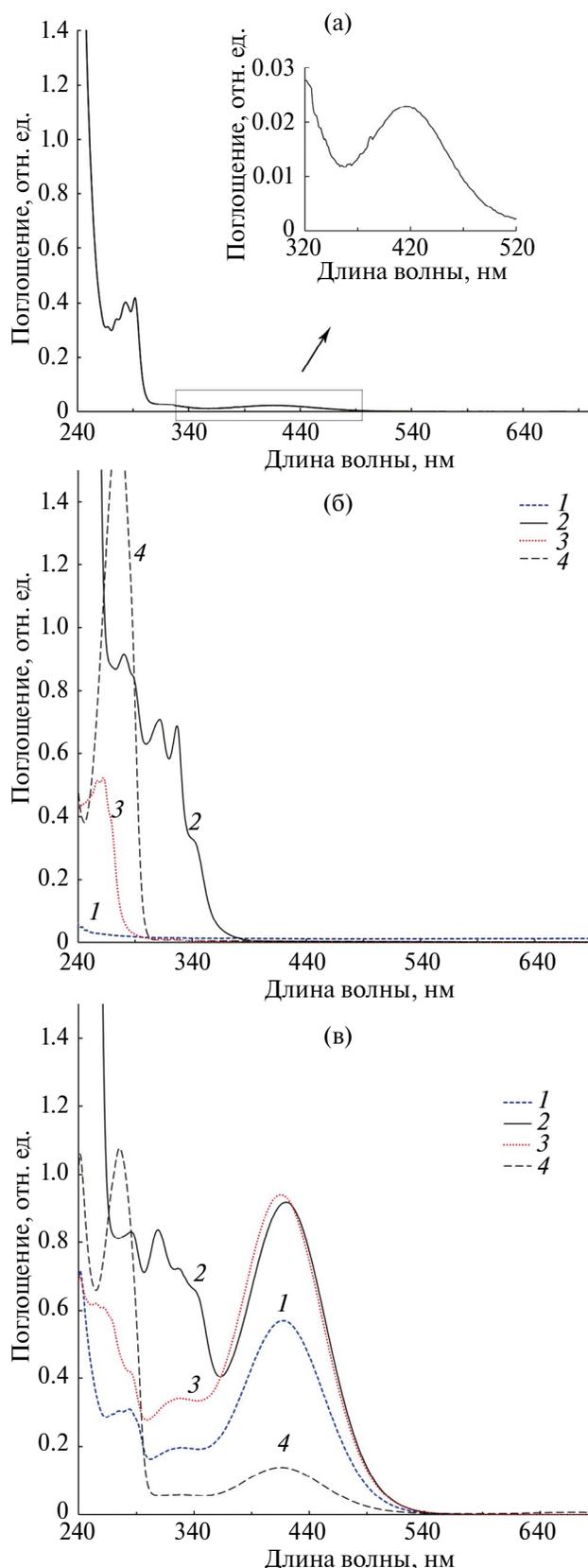
ВЭЖХ алкалоидов проводили на хроматографической системе высокого давления BioLogic DuoFlow™ (“BioRad”, США), использовали колонку “Symmetry® C18”, размеры колонки – 3.9 × 150 мм, наполнитель с размером частиц 5 мкм и размером пор 100Å (“Waters”, США). Детекцию пиков алкалоидов осуществляли посредством детектора BioLogic QuadTec UV/Vis (“BioRad”, США) при длине волны 280 нм. Для разделения использовали следующие растворы: раствор А – деионизированная вода MilliQ, раствор Б – 60% ацетонитрил. Скорость потока – 0.8 мл/мин. Градиент раствора Б был применен по следующей схеме: 0–1 мин – 0%; 1–11 мин – 0–10%; 11–36 мин – 10–100%; 36–41 мин – 100%; 41–42 мин – 100–0%; 42–45 мин – 0%. В колонку вносили по 50 мкл полученной смеси алкалоидов.

Статистическую обработку данных проводили с использованием программы “SigmaPlot”. Данные представлены в виде среднего значения ± стандартная ошибка. Значимость отличий определяли, используя критерий Тьюки для множественных сравнений (ANOVA) при уровне  $P \leq 0.05$  и Т-критерий Стьюдента для сравнения двух вариантов между собой при уровне  $P \leq 0.05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ

*Спектры поглощения БКЗ, алкалоидов и ионной пары БКЗ–алкалоид*

Для получения спектров поглощения чистых веществ в диапазоне 200–700 нм алкалоиды и БКЗ были растворены в хлороформе в конечной концентрации 10<sup>-4</sup> М как описано в разделе “Материалы и Методы”; в качестве холостого раствора был использован хлороформ. Было выявлено, что БКЗ (рис. 1а) и алкалоиды (рис. 1б) поглощают свет в УФ области. Пики поглощения в области 200–380 нм были: для БКЗ – 244, 284, 294 нм, для атропина – 209 нм, для папаве-



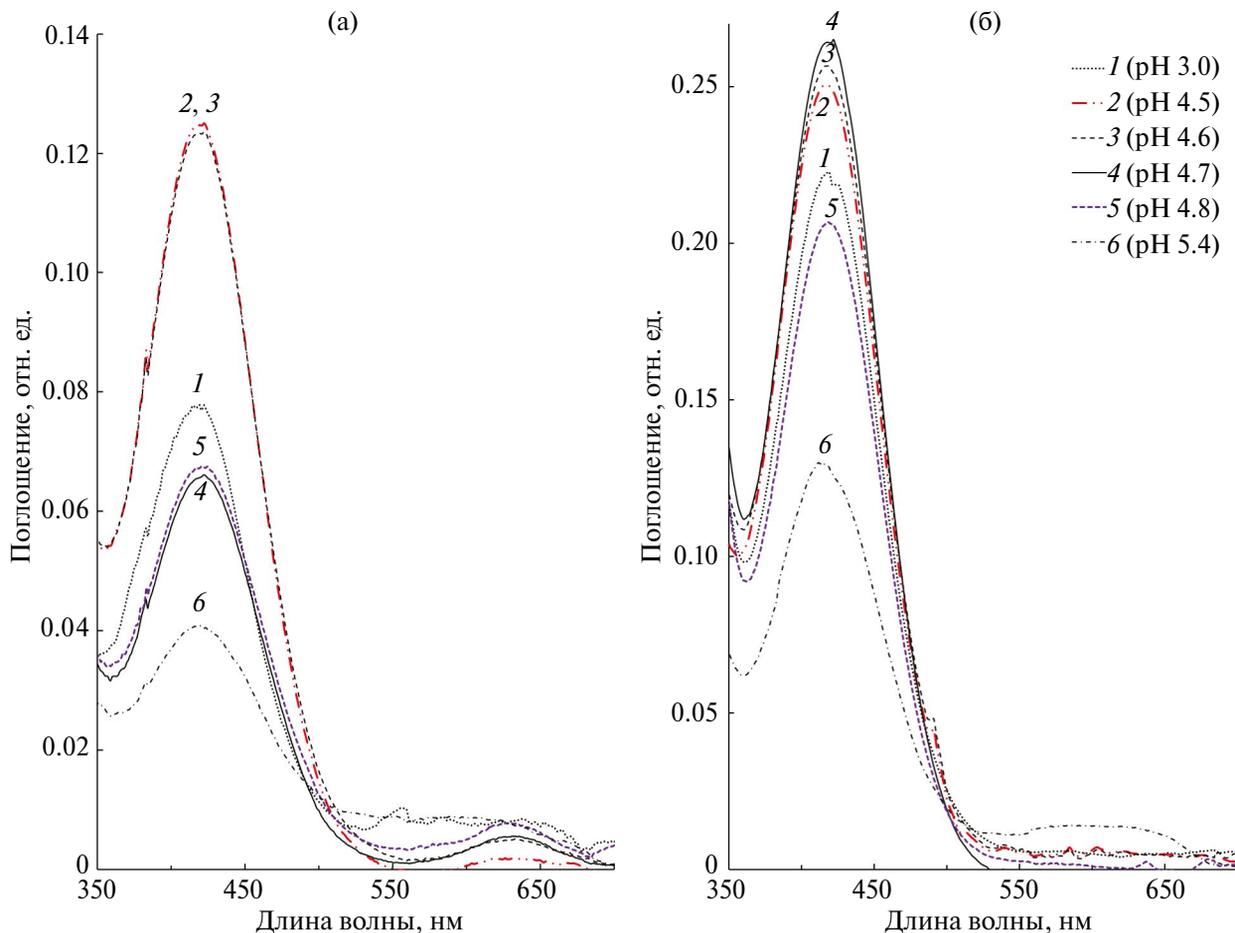
**Рис. 1.** Спектры поглощения растворенных в хлороформе: бромкрезолового зеленого (БКЗ,  $10^{-4}M$ ) (а), алкалоидов ( $10^{-4}M$ ) (б), ионной пары БКЗ–алкалоид ( $5 \cdot 10^{-3}M$ ) (в). Алкалоиды: атропина сульфат (1), папаверина гидрохлорид (2), никотин (3), кофеин (4). Ионные пары: БКЗ–атропина сульфат (1), БКЗ–папаверина гидрохлорид (2), БКЗ–никотин (3), БКЗ–кофеин (4).

рина гидрохлорида – 254 нм, для никотина – 264 нм, для кофеина – 260 нм. В видимой области в спектре БКЗ обнаружено слабое поглощение в области 420 нм с оптической плотностью менее 0.02 ед. (рис. 1а, верхняя вставка), в спектре алкалоидов в этой области – плато (рис. 1б). Однако при смешивании БКЗ с образцами алкалоидов в соотношении 1 : 1 появлялся пик с широким плато в области 410–420 нм, что свидетельствует о формировании связи между БКЗ и алкалоидом (рис. 1в).

*Влияние рН на формирование ионной пары БКЗ–алкалоид*

Для формирования ионной пары БКЗ–алкалоид большое значение имеет рН среды, в которой смешивается два реагента. БКЗ в водном растворе находится в двух состояниях – моноанионной и дианионной формах. В кислой среде преобладает моноанионная форма, раствор индикатора в этом состоянии имеет желтый цвет, а в нейтральной и щелочной среде происходит депротонизация и образуется дианионная форма, при которой БКЗ имеет синий цвет. Соответственно, при одной аналитической концентрации индикатора спектры поглощения БКЗ будут иметь преобладающий пик либо в фиолетовой (410 нм), либо в красной (620 нм) частях спектра в зависимости от рН среды. Известно, что рКа для раствора БКЗ равна 4.8 [18], а рН 5.4 является точкой перехода в доминирующую дианионную форму [1].

Для того чтобы подобрать оптимальное значение рН для формирования ионной пары, были протестированы фосфатно-цитратные буферные растворы с рН 3.0, 4.5, 4.6, 4.7, 4.8 и 5.4. В первую очередь были сняты спектры поглощения холостых растворов, в качестве зануляющего раствора был использован хлороформ (рис. 2а). Было выявлено, что при использовании буфера с рН 4.5 и рН 4.6 оптическая плотность при 417 нм была наивысшей и составляла 0.12 опт. ед. Можно предположить, что при рН 4.5, 4.6 в хлороформ переходит наибольшее количество анионной формы БКЗ, чем при рН 3.0, 4.7, 4.8, 5.4. Далее были сняты спектры поглощения ионных пар БКЗ–папаверин, сформированных при разных рН, каждый с использованием своего холостого раствора. Как следует из рис. 2б, рН буфера влияло на оптическую плотность раствора с ионной парой. Следует отметить, что при использовании буферов с рН 4.5, 4.6 и 4.7 и значения оптической плотности при 417 нм были самыми высокими среди всех снятых спектров и составляли 0.25, 0.255, 0.264 опт. ед., соответственно (рис. 2б). При рН 5.4 оптическая плотность при 417 нм была наименьшей и составляла 0.13 опт. ед. В дальнейших исследованиях для приготовления реакционной смеси был выбран



**Рис. 2.** Спектры поглощения холостых растворов (а), ионной пары БКЗ–папаверин гидрохлорида (б) при разном рН буфера в реакционной смеси: рН 3.0 (1), рН 4.5 (2), рН 4.6 (3), рН 4.7 (4), рН 4.8 (5), рН 5.4 (6). В качестве зануляющих растворов были взяты: хлороформ для холостых растворов, холостые растворы – для ионных пар.

буфер с рН 4.7, поскольку при его использовании поглощение ионной пары было максимальным (0.26 опт. ед.), а поглощение холостого раствора приемлемо невысоким (0.06 опт. ед.).

*Подбор оптимального времени для спектрофотометрических измерений ионной пары БКЗ–алкалоид*

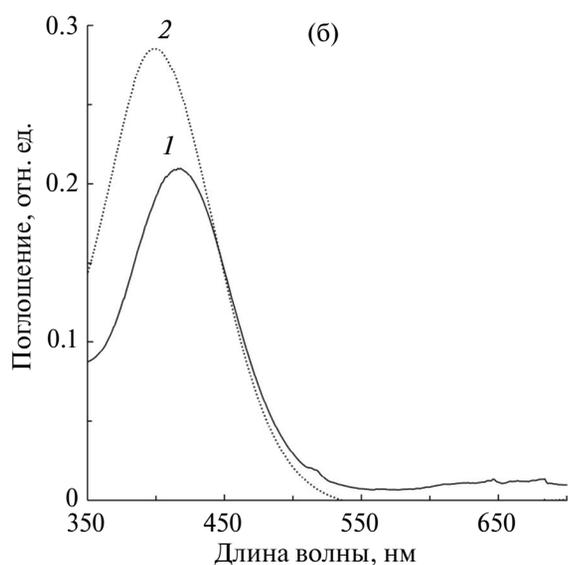
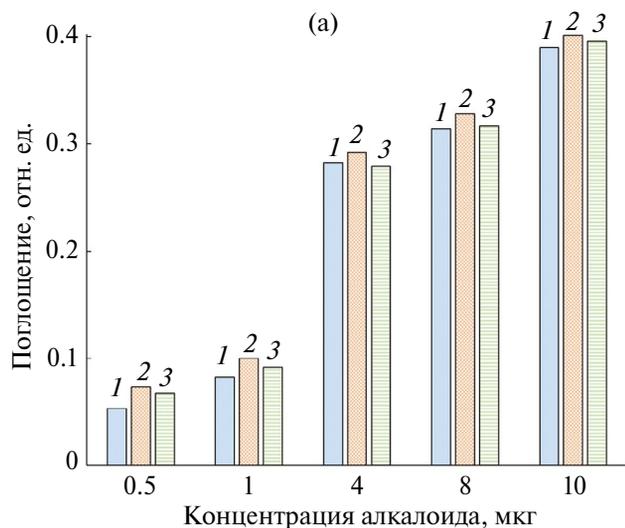
На разброс получаемых значений может оказывать время, необходимое для формирования ионной пары, а также время, в течение которого ионная пара сохраняется в органическом растворителе в неизменной форме. Согласно литературным данным, реакционную смесь до экстракции хлороформом выдерживают от 1–5 мин [19, 20] до 1 ч [4]. Нами показано, что максимальное развитие окраски достигается практически сразу и в течение 5–30 мин выдерживания реакционной смеси до экстракции ионной пары хлороформом, достоверной разницы между образцами выявлено не было (Дополнительные материалы, табл. 1).

В литературе отмечается разное время стабильности ионной пары от 2 ч [5] до 2 сут [19],

что может зависеть от структуры алкалоида. Показано, что при выдерживании алкалоида в органическом растворителе происходит изменение спектров поглощения алкалоидов, которые имеют в гетероцикле третичный амин (но не вторичный амин), либо первичный амин в боковой цепи [21], что, по данным авторов, связано с медленным химическим взаимодействием хлороформа с третичным амином [21]. Наши исследования показали, что спектр поглощения (данные не представлены) и оптическая плотность (рис. 3а) ионных пар не изменялись в течение часа, однако через сутки происходил сдвиг пика поглощения ионной пары в более коротковолновую область на 17 нм (рис. 3б).

Для дальнейших исследований были выбраны следующие оптимальные условия:

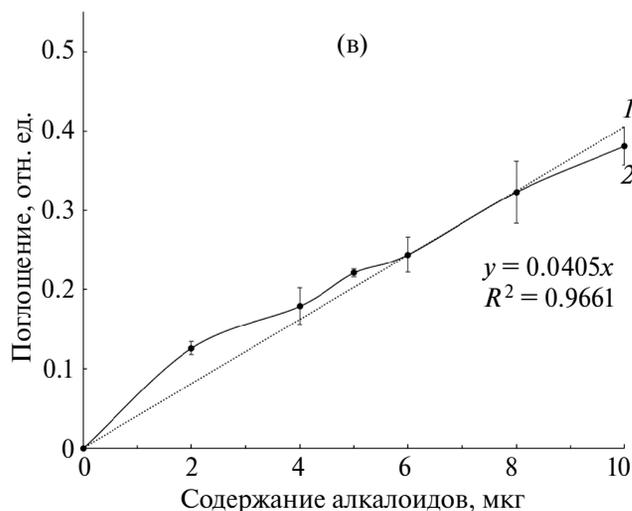
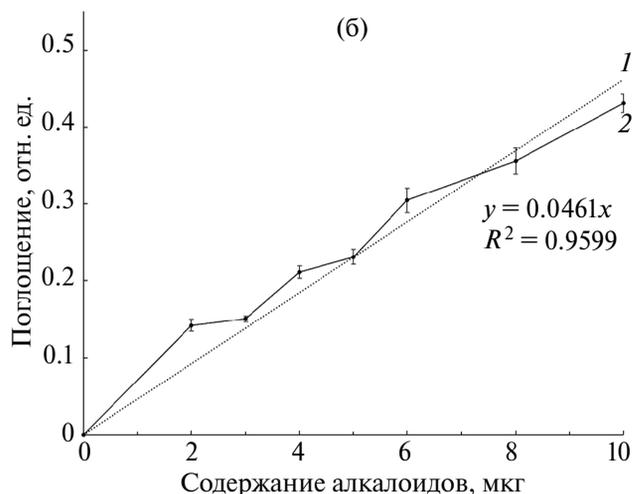
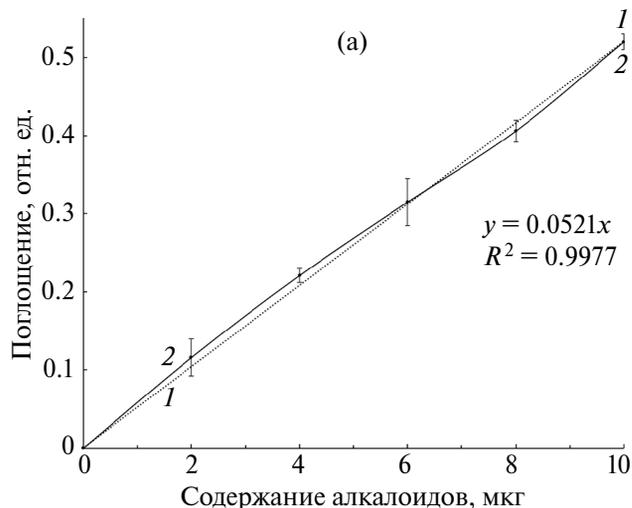
1. рН реакционной смеси – 4.7;
2. время выдерживания реакционной смеси до экстракции хлороформом – 5 мин;
3. измерение спектров поглощения – в течение часа после экстракции ионной пары хлороформом.



**Рис. 3.** Значения оптической плотности ионной пары БКЗ–алкалоид при 418 нм через 10 (1), 20 (2), 60 мин (3) после экстракции из реакционной смеси хлороформом (а) и спектры поглощения ионной пары БКЗ–алкалоид (б, БКЗ–раунатин, 4 мкг), измеренные через 5 мин (сплошная линия, 1) и через 1 сут (пунктирная линия, 2) после экстракции из реакционной смеси хлороформом.

*Сравнение калибровочных кривых для разных алкалоидов*

Для построения калибровочных кривых были использованы алкалоиды разных классов: тропановый алкалоид атропин, изохинолиновый алкалоид папаверин, пиридиновый алкалоид никотин. Спектры поглощения ионных пар были сняты для различных концентраций алкалоида от 0.5 до 100 мкг/мл хлороформа (Дополнительные материалы, рис. S1). Для диапазона концентраций алкалоида от 2 до 10 мкг/мл, где соблюдался закон Бугера-Ламберта-Бера, были построены калибровочные кривые по зависимости поглощения при  $\lambda_{max}$  от концентрации алкалоида: при 417, 418, 414 нм для атропина сульфата (рис. 4а),



**Рис. 4.** Калибровочные кривые для определения содержания алкалоидов в растительных образцах: по атропину (а), папаверину (б), никотину (в). Пунктирными линиями отмечены линии тренда (1) для каждой калибровочной кривой (2).

папаверина гидрохлорида (рис. 4б) и никотина (рис. 4в) соответственно. Коэффициент корреляции и уравнение регрессии представлены на рис. 4 и в табл. 2 (Дополнительные материалы).

### Верификация метода

Для верификации спектрофотометрического метода определения содержания алкалоидов были использованы аптечные препарат “Раунатин”, в таблетках которого по данным производителя содержится по 2 мг алкалоидов индольного ряда из Раувольфии змеиной, и препарат “Сангвиритрин”, представлявший собой этанольный раствор солей алкалоидов изохинолинового ряда, сангвинарина и хелеритина. Для измерений были взяты аликвоты образцов, соответствующие 4 мкг алкалоидов, для расчетов была использована калибровочная кривая для папаверина, алкалоида изохинолинового ряда. Спектрофотометрическое определение алкалоидов показало, что в аликвоте препарата “Раунатин” содержится в среднем  $4.053 \pm 0.270$  мкг алкалоидов, а в аликвоте препарата “Сангвиритрин” –  $4.199 \pm 0.304$  мкг алкалоидов, что составило соответственно 101.3% и 105% от заявленного производителем содержания алкалоидов.

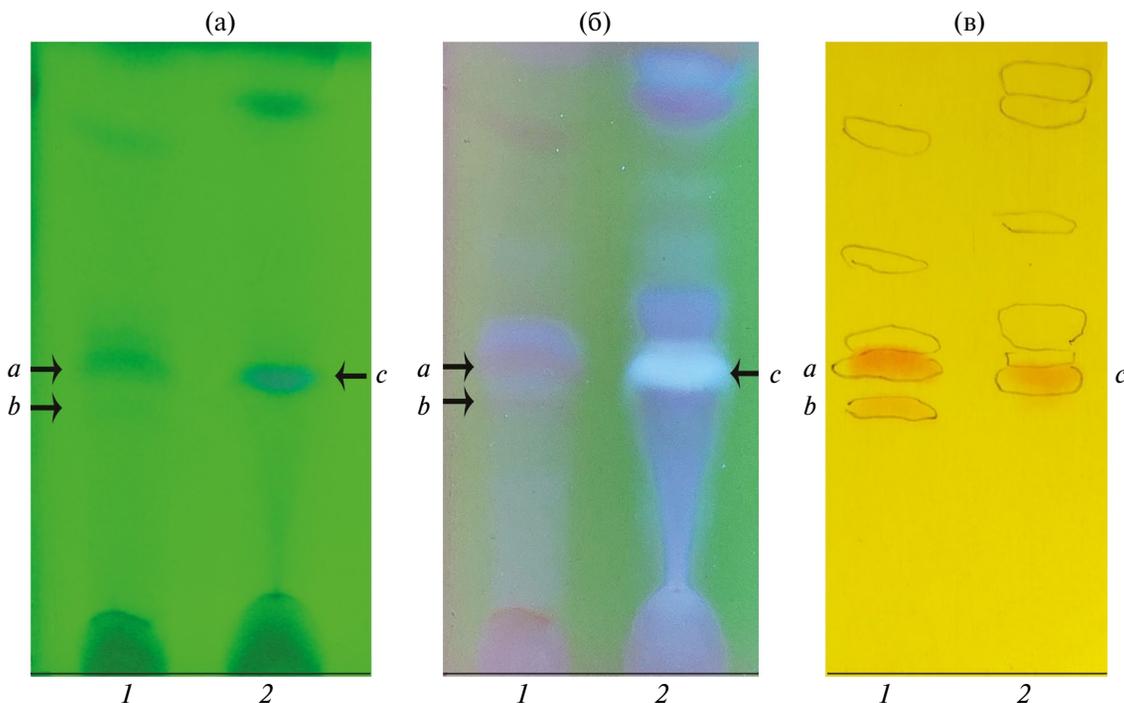
### Определение содержания алкалоидов в образцах Руты душистой

Спектрофотометрическое определение содержания алкалоидов в образцах Руты душистой выявило, что в аптечном препарате содержание алкалоидов в 1.62 раз выше, чем в растениях-регенерантах, полученных из культуры клеток *in vitro*. Содержание алкалоидов в аптечном препарате и в растениях-регенерантах,

рассчитанное по калибровочной кривой для папаверина гидрохлорида, составило  $17.12 \pm 0.52$  и  $10.55 \pm 0.33$  мг/г сухого веса соответственно. Разница между образцами была достоверной ( $P < 0.001$ ).

### ТСХ этанольного экстракта образцов Руты душистой

ТСХ анализ экстракта выявил наличие трех разных пятен, окрашиваемых реактивом Драгендорфа (рис. 5в, 1а, 1б, 2с). Алкалоиды, обнаруженные в аптечном препарате “Руты душистой трава”, не флуоресцируют, а, наоборот, гасят свечение флуорофора при 254 нм, на светящемся зеленом фоне флуорофора они выглядят как темные пятна (рис. 5а, 1а, 1б, отмечены стрелками). При рассматривании пластины при 312 нм эти пятна имеют темно-фиолетовую окраску (рис. 5б, 1а, 1б, отмечены стрелками). Алкалоид из образца растений-регенерантов представляет собой пятно темно-синего цвета при обследовании пластины при 254 нм (рис. 5а, 2с), при 312 нм это пятно флуоресцирует ярко-голубым цветом (рис. 5б, 2с). Следует отметить, что ТСХ-анализ имеет слабую разрешающую способность и несколько разных соединений могут мигрировать с фронтом растворителя с близкой скоростью и на ТСХ-пластине будут представлены в виде единого пятна. Таким образом, ТСХ-анализ подтвердил наличие алкалоидов в образцах Руты душистой и было определено, что образцы могут



**Рис. 5.** ТСХ экстрактов аптечного препарата “Руты душистой трава” (1) и растений-регенерантов Руты душистой (2): а – флуоресценция при 254 нм, б – флуоресценция при 312 нм, в – окрашивание реактивом Драгендорфа. Стрелками и разными буквами латинского алфавита отмечены алкалоиды, прореагировавшие с реактивом Драгендорфа.

содержать разные типы алкалоидов, но точное количество соединений в нейтрализованном растворе фракции алкалоидов из спиртового экстракта определить не удалось.

*ВЭЖХ очищенных алкалоидов*

ВЭЖХ анализ очищенной фракции алкалоидов аптечного препарата и растений-регенерантов выявил наличие 16 пиков, из которых 6 пиков присутствовали в спектрах обоих образцов, но имели разную интенсивность (рис. 6). Пик 5 был специфичен для образца аптечного препарата, а пики 6, 7, 9, 10, 12, 14, 15 и 16 присутствовали только в образце растений-регенерантов. В ВЭЖХ-спектре образца аптечного препарата наибольшую интенсивность имел пик 1, в спектре растений-регенерантов по интенсивности пики были сравнимыми между собой, наибольшую интенсивность имели пики 6 и 13.

**ОБСУЖДЕНИЕ**

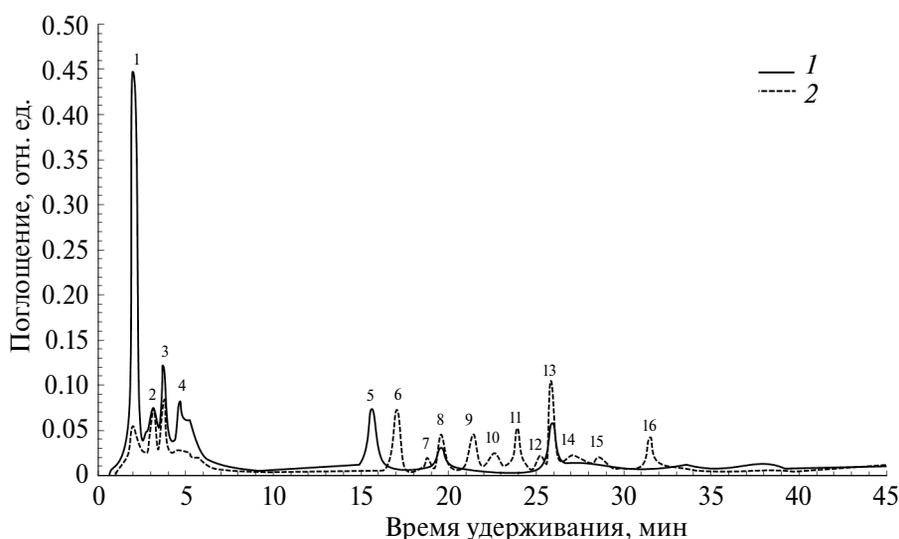
подавляющее большинство истинных алкалоидов, а также псевдоалкалоидов содержат атом азота внутри гетероцикла, в основном в виде третичного или вторичного амина, реже — четвертичного, тогда как протоалкалоиды содержат первичный амин в боковой алифатической цепи. В литературе отмечается, что с БКЗ не реагируют протоалкалоиды [22]. Нами было выявлено, что спектр поглощения колхицина не изменялся при смешивании с БКЗ (1 : 1), происходил только “эффект разведения” — интенсивность поглощения всего спектра снижалась (Дополнительные материалы, рис. S2).

БКЗ с алкалоидами образует ионную пару [23], поэтому большое значение для реакции имеет способность алкалоидов проявлять основ-

ные свойства. Окружение неподеленной пары электронов азота, например, при наличии амидных групп, может ослаблять основные свойства алкалоида, приводя к нейтральным или амфотерным свойствам. Слабая реакция кофеина с БКЗ (рис. 1в), наиболее вероятно, связана со слабыми основными свойствами данного алкалоида. Концентрационную кривую для кофеина построить не удалось, поскольку не был найден диапазон линейной зависимости концентрации кофеина от оптической плотности, при которой прямая проходила бы через начало координат (данные не представлены).

Пик поглощения ионной пары БКЗ–алкалоид лежит в области 412–420 нм (рис. 1в): для атропина сульфата — 417 нм, для папаверина гидрохлорида — 418 нм, для никотина — 414 нм. Эти значения близки к данным, представленным в литературе: 415 нм — для аконитина [4] и берберина [5], 420 нм — для атропина [6]. Следует отметить, что у всех изученных ионных пар достаточно широкое плато с близкими значениями оптической плотности, поэтому пик поглощения сглаживается.

Согласно литературным данным, существует зависимость между молярным соотношением алкалоида к БКЗ и спектром поглощения ионной пары [1, 23]. Это соотношение должно быть близким к 1 : 1. По данным Gaínza, при избытке индикатора или при эквимольном соотношении индикатора и алкалоида наблюдается пик поглощения при 410 нм и соблюдается линейная зависимость оптической плотности от концентрации алкалоида [23]. Тогда как при избытке алкалоида наблюдается появление дополнительного пика при 562 нм. Мы не обнаружили появления значимого пика в красной области при избытке алкалоидов (данные не представлены).



**Рис. 6.** ВЭЖХ-спектры очищенных фракций алкалоидов аптечного препарата “Рута душистая трава” (1, сплошная линия) и растений-регенерантов Руты душистой (2, пунктирная линия).

Наиболее важным фактором является влияние рН на спектр поглощения ионной пары БКЗ–алкалоид и ее экстрагируемость хлороформом. В методиках, представленных в литературе, использовался буфер с разной кислотностью: от сильно кислых с рН 3.0 [19] и рН 4.0 [4], до слабо кислых с рН 4.7 [5,6] и рН 5.4 [1]. Sakai с соавт. для формирования ионной пары БКЗ–алкалоид используют слабо щелочную рН 8.5 и измерения проводят в красной области спектра [24]. На примере никотина мы оценили приемлемость такого подхода для данного метода (Дополнительные материалы, рис. S3). Действительно, появляется пик в красной области (при 620 нм), однако пик моноанионной формы (при 414 нм) остается, а наличие двух пиков делает расчеты концентрации вещества более сложными.

Thomis и Kotionis отмечают, что чувствительность метода снижается, если реакция образования ионной пары проводится при рН, превышающих значения, характеризующие “щелочную” реакцию БКЗ [1]. С другой стороны, при значениях рН ниже оптимального БКЗ частично переходит в органический растворитель, поэтому необходимо подбирать оптимальный рН буферного раствора [1]. Нами было показано, что при рН 4.5 и 4.6 БКЗ сильнее экстрагируется хлороформом, чем при рН 4.7 (рис. 2а), поэтому несмотря на то, что буфер с рН 4.5, 4.6 и 4.7 дает одинаковые значения оптической плотности для ионных пар БКЗ–алкалоид (рис. 2б), значения рН 4.5 и 4.6 не являются оптимальными. Для уменьшения погрешностей предпочтительнее использовать тот буфер, в котором БКЗ меньше экстрагируется в растворитель и создает меньший фон. По этой же причине лучше использовать меньшую концентрацию БКЗ (0.1 мМ), поскольку при большей концентрации (0.5 мМ) БКЗ переходит в хлороформ в большем количестве (Дополнительные материалы, рис. S4), при этом по сравнению с 0.1 мМ БКЗ сложно выделить диапазон линейной зависимости в калибровочной кривой, где бы соблюдался закон Бугера-Ламберта-Бера (Дополнительные материалы, рис. S1б, 2).

Li с соавт. вместо холостого раствора используют чистый хлороформ [3], однако, как следует из данных, представленных нами на рис. 2, даже при смешивании БКЗ с буфером рН 5.4 в этой части спектра наблюдается небольшой пик поглощения, поэтому при измерении образцов необходимо проводить обнуление по холостому раствору, приготовленному с БКЗ.

Таким образом, рН является важным фактором для экстракции ионной пары БКЗ–алкалоид органическим растворителем из водного раствора.

Калибровочные кривые для атропина сульфата, папаверина гидрохлорида и никотина имеют узкий диапазон концентраций (от 2 до

10 мкг/мл), в котором соблюдается закон Бугера-Ламберта-Бера (рис. 4, Дополнительные материалы, рис. S1, Дополнительные материалы, табл. 2). Тем не менее, эти значения являются приемлемыми, поскольку для растений, содержащих алкалоиды в незначительных количествах, можно детектировать их без предварительной очистки и концентрирования, а в растениях, содержащих алкалоиды в высоких концентрациях, следует подобрать необходимое разведение. Сангвинарин, как и папаверин, является алкалоидом изохинолинового ряда, а индольные алкалоиды препарата “Раунатин” более близки по структуре к папаверину, чем к атропину и никотину. На препаратах “Раунатин” и “Сангвинаритин” нами показано, что методика является хорошо воспроизводимой. Наиболее близкие значения по содержанию алкалоидов к значениям, заявленным производителем, были при расчете содержания по калибровочной кривой, построенной для папаверина. Представленный в статье метод не может претендовать на универсальность, поскольку имеет ограничения. Например, он не подходит для определения содержания колхицина (и других алкалоидов с азотом в боковой цепи), а также кофеина и, вероятно, для других алкалоидов со слабыми основными свойствами. Однако для тропановых, изохинолиновых, индольных, пиридиновых алкалоидов и с высокой долей вероятности для большинства других истинных алкалоидов данный метод работает. Следует также помнить, что каждый этап процесса подготовки образца вносит свои погрешности и стандартное отклонение для выборки растительных образцов будет большим, чем для выборки образцов чистых алкалоидов, не нуждающихся в процедуре очистки. Тем не менее, на основании данных, представленных в данной статье, метод спектрофотометрического определения алкалоидов с БКЗ может использоваться как экспресс-метод определения содержания алкалоидов и как альтернатива трудоемким методам определения содержания алкалоидов.

В одном виде растений обычно содержатся родственные алкалоиды одной группы, однако в некоторых видах, например, в Руте душистой, могут встречаться алкалоиды разных классов. Кроме того, содержание и состав алкалоидов изменяется под воздействием внешних условий и зависит от возраста растений или растительной культуры [7, 25, 26]. Szewczyk с соавт. отмечают, что побеги Руты душистой, культивируемой *in vitro*, сильно отличаются от материнских растений, их метаболизм направлен в сторону синтеза фуурохинолиновых алкалоидов, содержание которых в культуре *in vitro* достигает 0.8–1.6 мг/г сухого веса [7]. К фуурохинолиновым алкалоидам, обнаруженным в Руте душистой, относят диктамнин, скимианин,  $\gamma$ -фагарин, кокусаги-

нин [10, 16]. Показано также, что суспензионная культура [25], каллусы и культура растений-регенерантов руты *in vitro* [26] содержат акридоновые алкалоиды. Обнаружено порядка 20 различных акридоновых алкалоидов, из которых наиболее распространенным является рутакридон [13, 27]. Содержание рутакридона в отселектированной высокопроизводительной каллусной культуре Руты душистой достигало 1.8% от сухого веса, что по данным авторов в 10 раз больше, чем содержание рутакридона в 3-недельных растениях, выращенных в условиях *in vivo* [28]. В работе Ramawat с соавт. показано, что общее содержание алкалоидов в каллусной линии, обильно образующей побеги, составляло 9.44 мг/г сухого веса [29]. Для растений-регенерантов мы получили близкое значение – 10.13 мг/г сухого веса. Мы показали, что в аптечном препарате общее содержание алкалоидов выше, чем в растениях-регенерантах, однако состав алкалоидов в них отличался. На ТСХ-пластине в образце аптечного препарата были выявлены два нефлуоресцирующих пятна, которые должны содержать алкалоиды, поскольку реагируют с реактивом Драгендорфа, но, скорее всего, не относятся ни к акридоновым алкалоидам, имеющим желтую флуоресценцию [26], ни к фуорохинолиновым алкалоидам, флуоресцирующим синим цветом [16]. Возможно, это хинолиновый алкалоид, например, гравеолин, который содержится преимущественно в надземных частях растения. В образцах растений-регенерантов обнаруживается соединение с голубой флуоресценцией, оно реагирует с реактивом Драгендорфа (рис. 5) и, возможно, относится к фуорохинолиновым алкалоидам. Следует отметить, что реактив Драгендорфа с разными алкалоидами реагирует в разной степени [30]. Содержание алкалоидов на ТСХ пластине может быть достаточным для выявления соединений в виде флуоресцирующих либо темных пятен, но при этом может быть недостаточным для получения положительной реакции с реактивом Драгендорфа.

ВЭЖХ анализ очищенных фракций алкалоидов выявил наличие 16 соединений. Время удерживания четырех пиков, выходящих первыми, составляет всего 2–5 мин, что свидетельствует об их гидрофильности, возможно это гликозилированные формы алкалоидов. Следует отметить, что их содержание выше в аптечном препарате. Кузовкиной с соавт. [31] показано, что в каллусной и суспензионной культуре тканей Руты душистой, также как и в растениях, может содержаться гликозид гравакридонииола. Основные отличия между образцами по составу отмечены среди гидрофобных соединений, соответствующим пикам 5–16, спектр соединений у растений-регенерантов богаче (рис. 6).

Выявленные по результатам ТСХ и ВЭЖХ качественные различия между экстрактами аптечного препарата и регенерантами, полученными *in vitro*, вероятно, опосредованы изменением метаболизма алкалоидов в растениях *in vitro*, что требует дополнительных исследований.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации в рамках государственных заданий, выполняемых КИББ ФИЦ КазНЦ РАН (№ госрегистрации 122011800137-0).

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов. Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей и животных в качестве объектов исследований.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Thomis G.N., Kotionis A.Z.* Les indicateurs acides comme réactifs sensibles des alcaloïdes // *Anal. Chim. Acta.* 1957. V. 16. P. 201.  
[https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(00\)89913-4](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(00)89913-4)
2. *Maghssoudi R.H., Fawzi A.B.* Direct spectrophotometric determination of thebaine in Arya II population capsules of *Papaver bracteatum* Lindl // *J. Pharm. Sci. (Philadelphia, PA, U. S.)*. 1978. V. 67. P. 32.  
<https://doi.org/10.1002/jps.2600670109>
3. *Li L., Long W., Wan X., Ding Q., Zhang F., Wan D.* Studies on quantitative determination of total alkaloids and berberine in five origins of crude medicine “Sankezhen” // *J. Chromatogr. Sci.* 2015. V. 53. P. 307.  
<https://doi.org/10.1093/chromsci/bmu060>
4. *Liu Y., Liu C.* Determination of total alkaloids in different parts of *Actinidia arguta* by spectrophotography // *Proc. International Conference on Materials, Environmental and Biological Engineering (MEBE 2015)*. Guilin, 2015.  
<https://doi.org/10.2991/mebe-15.2015.31>
5. *Patel R.K., Patel J.B., Trivedi P.D.* Spectrophotometric method for the estimation of total alkaloids in the *Tinospora cordifolia* M. and its herbal formulations // *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.* 2015. V. 7. P. 249.
6. *Shamsa F., Monsef H.R., Ghamooshi R., Verdian R.M.R.* Spectrophotometric determination of total alkaloids in *Peganum harmala* L. using bromocresol green // *Res. J. Phytochem.* 2007. V. 1. P. 79.
7. *Szewczyk A., Marino A., Molinari J., Ekiert H., Micali N.* Phytochemical characterization, and antioxidant and antimicrobial properties of agitated cultures of three Rue species: *Ruta chalepensis*, *Ruta corsica*, and *Ruta graveolens* // *Antioxidants*. 2022. V. 11. P. 592.  
<https://doi.org/10.3390/antiox11030592>
8. *Kamal L.Z.M., Adam M.A.A., Shahpuhin S.N. Mohd., Shuib A.N., Sandai R., Hassan N.M., Tabana Y., Basri D.F., Than L.T.L., Sandai D.* Identification of alkaloid compounds arborinine and graveoline from *Ruta*

- angustifolia* (L.) Pers for their antifungal potential against isocitrate lyase (ICL1) gene of *Candida albicans* // Mycopathologia. 2021. V. 186. P. 221. <https://doi.org/10.1007/s11046-020-00523-z>
9. Wolters B., Eilert U. Antimicrobial substances in callus cultures of *Ruta graveolens* // Planta Med. 1981. V. 43. P. 166. <https://doi.org/10.1055/s-2007-971494>
  10. Adamska-Szewczyk A., Glowniak K., Baj T. Furuchinoline alkaloids in plants from Rutaceae family – a review // Curr. Issues Pharm. Med. Sci. 2016. V. 29. P. 33. <https://doi.org/10.1515/cipms-2016-0008>
  11. Kaur R., Kumar K. Synthetic and medicinal perspective of quinolines as antiviral agents // Eur. J. Med. Chem. 2021. V. 215. P. 113220. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2021.113220>
  12. Ghosh S., Bishayee K., Khuda-Bukhsh A.R. Graveoline Isolated from Ethanolic extract of *Ruta graveolens* triggers apoptosis and autophagy in skin melanoma cells: A novel apoptosis-independent autophagic signaling pathway: Graveoline induces apoptosis and autophagy in A375 cells // Phytother. Res. 2014. V. 28. P. 1153. <https://doi.org/10.1002/ptr.5107>
  13. Yadav T.T., Murahari M., Peters G.J., Yc M. A comprehensive review on acridone based derivatives as future anti-cancer agents and their structure activity relationships // Eur. J. Med. Chem. 2022. V. 239. P. 114527. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2022.114527>
  14. Misawa M. Plant issue culture: An alternative for production of useful metabolites. Rome: Food and Agriculture Organization, 1994. 87 p. <https://www.fao.org/3/t0831E/t0831e00.htm#con>
  15. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures // Physiol. Plant. 1962. V. 15. P. 473. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>
  16. Wagner H., Bladt S. Plant drug analysis: A thin layer chromatography atlas. 2nd ed. Berlin; New York: Springer, 1996. 384 p.
  17. Orłita A., Sidwa-Gorycka M., Kumirska J., Malinski E., Siedlecka E.M., Gajdus J., Lojkowska E., Stepnowski P. Identification of *Ruta graveolens* L. metabolites accumulated in the presence of abiotic elicitors // Biotechnol. Prog. 2008. V. 24. P. 128.
  18. Diamond D., Lau K. T., Brady S., Cleary J. Integration of analytical measurements and wireless communications—Current issues and future strategies // Talanta. 2008. V. 75. P. 606. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2007.11.022>
  19. Saad B. Ion-association method for the spectrophotometric determination of the antitussive drug noscipine // Talanta. 1997. V. 44. P. 53. [https://doi.org/10.1016/S0039-9140\(96\)02009-7](https://doi.org/10.1016/S0039-9140(96)02009-7)
  20. Zhu S.-C., Shi M.-Z., Yu Y.-L., Jiao Y.-H., Zheng H., Liu F.-M., Cao J. In-situ formation of ion pair assisted liquid-liquid microextraction of natural alkaloids by response surface methodology // Microchem. J. 2021. V. 171. P. 106813. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2021.106813>
  21. Gainza A.H. Reaction of halogenated hydrocarbon solvents with tertiary amines: Spectrophotometric and conductimetric study // Int. J. Chem. Kinet. 2004. V. 36. P. 500. <https://doi.org/10.1002/kin.20022>
  22. Shamsa F., Monsef H.R., Ghamooshi R., Verdian-rizi R. Spectrophotometric determination of total alkaloids in some Iranian medicinal plants // Thai J. Pharm. Sci. 2008. V. 32. P. 17.
  23. Gaiñza A.H. Associations of ajmaline and homatropine with bromocresol green and bromophenol blue in dichloromethane: Thermodynamic and kinetic parameters // Can. J. Chem. 1987. V. 65. P. 1279. <https://doi.org/10.1139/v87-215>
  24. Sakai, T., Ohno N., Sasaki H., Hyuga T. Extraction-spectrophotometric determination of berberine in crude drugs by the formation of a new ion associate // Anal. Sci. 1991. V. 7. P. 39. <https://doi.org/10.2116/analsci.7.39>
  25. Baumert A., Maier W., Schumann B., Gröger D. Increased accumulation of acridone alkaloids by cell suspension cultures of *Ruta graveolens* in response to elicitors // J. Plant Physiol. 1991. V. 139. P. 224. [https://doi.org/10.1016/S0176-1617\(11\)80612-7](https://doi.org/10.1016/S0176-1617(11)80612-7)
  26. Eilert U. Acridones (*Ruta* Alkaloids) // Phytochemicals in Plant Cell Cultures / Eds. Friedrich L., Vasil I.K. Elsevier. 1988. P. 419. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-715005-5.50031-5>
  27. Kuzovkina I.N. Specific accumulation and revised structures of acridone alkaloid glucosides in the tips of transformed roots of *Ruta graveolens* // Phytochemistry. 2004. V. 65. P. 1095. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2004.03.003>
  28. Кузовкина И.Н., Чернышева Т.П., Альтерман И.Е. Характеристика штамма каллусной ткани Руты душистой, продуцирующей рутакиридон // Физиология растений. 1979. Т. 26. С. 492.
  29. Ramawat K.G., Rideau M., Chenieux J.-C. Growth and quaternary alkaloid production in differentiating and non-differentiating strains of *Ruta graveolens* // Phytochemistry. 1985. V. 24. P. 441. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)80743-8](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)80743-8)
  30. Zhang N., Wang M., Li Y., Zhou M., Wu T., Cheng Z. TLC–MS identification of alkaloids in *Leonuri herba* and *Leonuri fructus* aided by a newly developed universal derivatisation reagent optimised by the response surface method: 3 // Phytochem. Anal. 2021. V. 32. P. 242. <https://doi.org/10.1002/pca.2970>
  31. Кузовкина И.Н., Сендереи К., Роса С., Райш И. Состав алкалоидов изолированных корней, каллусных тканей и суспензии клеток *Ruta graveolens* L. // Растительные ресурсы. 1980. Т. 16. С. 112.