

*На правах рукописи*



**Вишняков  
Евгений Владимирович**

**СИНТЕЗ, УСТАНОВЛЕНИЕ СТРУКТУРЫ И СКРИНИНГОВАЯ  
ОЦЕНКА БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ КОМПЛЕКСОВ  
МЕТАЛЛОВ С ФЕНОЛЬНЫМИ СОЕДИНЕНИЯМИ РАСТИТЕЛЬНОГО  
ПРОИСХОЖДЕНИЯ**

3.4.2. Фармацевтическая химия, фармакогнозия

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата фармацевтических наук

Санкт-Петербург

2024

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научный руководитель:

**Тернинко Инна Ивановна**

доктор фармацевтических наук, доцент

Официальные оппоненты:

**Селиванова Ирина Анатольевна**

доктор фармацевтических наук, профессор, федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Первый Московский государственный медицинский университет имени И. М. Сеченова» Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет), профессор кафедры химии

**Катаев Валерий Алексеевич**

доктор фармацевтических наук, профессор, федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Башкирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, заведующий кафедрой фармации

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Пермская государственная фармацевтическая академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита состоится «16» апреля 2024 года в 16.00 часов на заседании диссертационного совета 21.2.063.01, созданного на базе федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (197022, г. Санкт-Петербург, ул. Профессора Попова, д.14, лит. А).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (197227, г. Санкт-Петербург, пр. Испытателей, д.14) и на сайте организации (<https://sites.google.com/a/pharminnotech.com/dissovet>).

Автореферат разослан « \_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 20\_\_ г.

Ученый секретарь

диссертационного совета 21.2.063.01,  
кандидат фармацевтических наук, доцент



Орлов А.С.

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность темы исследования.** Фенольные соединения растительного происхождения обладают широким спектром полинаправленной биологической активности: антиоксидантная, противовоспалительная, противоопухолевая и др. В связи с этим активно ведётся модификация данных групп биологически активных веществ (БАВ) с целью получения нового или потенцирования уже имеющихся фармакологических эффектов, а также улучшения биодоступности.

В последнее время в фокусе фитохимиков находится направление синтеза комплексов металлов с фенольными соединениями растительного происхождения (флавоноиды, гидроксикоричные кислоты). Как показывает анализ научной литературы, синергизм металла и фенольного соединения (например, флавоноида) в одной молекуле может приводить к появлению новых фармакологических эффектов, а также к потенцированию уже характерных для лиганда-предшественника. Например, антиоксидантная активность комплексов возрастает, если в процессе хелатирования образуются димерные формы, в которых не затрагиваются эссенциальные для антиоксидантной активности группы. Сочетанное действие двух компонентов комплекса может приводить к росту антиоксидантной активности, что благоприятно воздействует на звенья патогенеза различных заболеваний, например, сахарного диабета II типа, ожирения.

Некоторые комплексы, содержащие цинк и марганец, также можно рассматривать как потенциальные источники микроэлементов, которые входят в состав многих ферментов и участвуют в выработке гормонов (например, инсулина). Уникальное строение изучаемых соединений даёт возможность применять их в качестве противоопухолевых препаратов. Кроме того, данные структуры можно рассматривать как системы доставки соединения-предшественника при таргетной терапии социально значимых патологий, в т.ч. онкологических заболеваний.

Важно сделать акцент на том, что нативным источником комплексов является лекарственное растительное сырьё (ЛРС), которое накапливает как металлы, так и фенольные соединения, предопределяя сочетанное фармакологическое действие и улучшая растворимость и, как следствие, накопление в растительных тканях данных групп БАВ.

Стоит отметить, что получение таких молекул, как металло-комплексы с фенольными соединениями, представляет нетривиальную проблему. Так, в литературе представлено большое количество методик по синтезу комплексов, однако они не унифицированы. Исходя из этого, актуальной остаётся задача по формулированию методологических подходов, позволяющих получить высокий выход целевого продукта при малых затратах реактивов с алгоритмизацией и возможным трансфером методологии синтеза на ряд фенольных соединений и металлов.

**Степень разработанности темы исследования.** В крупных обзорных статьях по теме исследования приводятся данные по синтезу металло-фенольных комплексов. Однако, как уже было сказано ранее, методики получения носят разрозненный характер. Полученные соединения чаще всего имеют аморфное строение, поэтому оценить их структуру методом РСА не всегда представляется возможным. Исходя из этого, прибегают к другим физико-химическим методам и компьютерному моделированию. Анализ научных публикаций показал, что в основном изучаемые структуры имеют низкие значения константы устойчивости, что может ограничивать их применение в качестве лекарственного средства. Большинство металло-фенольных комплексов показывают в исследованиях *in vitro* увеличение антиоксидантной активности в сравнении с лигандом. Также комплексы демонстрируют хорошую эффективность *in vitro* в отношении линии клеток рака шейки матки

(HeLa), гепатоцеллюлярной карциномы (HepG2), лейкемии (HL60), рака толстого кишечника (HCT15), печени (Bel-7402), рака лёгких (Hep62) в сравнении с цисплатином. Следовательно, данные соединения рассматриваются учёными как новый перспективный класс лекарственных средств. Однако стоит отметить, что в литературе представлено незначительное количество информации по анализу активности комплексов *in vivo*.

**Цель и задачи исследования.** Целью настоящего исследования является разработка и алгоритмизация способа получения, установление структуры и изучение биологического действия металло-фенольных комплексов для прогностической оценки возможности их применения.

Для достижения поставленной цели необходимо было решить ряд следующих **задач**:

1. Проанализировать качественный и количественный состав БАВ растительного сырья, обладающего противодиабетической активностью для оценки содержания потенциальных лигандов и комплексообразователей.
2. Выбрать потенциальные лиганды и комплексообразователи, которые в составе комплексного соединения будут потенцировать фармакологические эффекты друг друга и рассчитать оптимальное соотношение компонентов в комплексах и константы их устойчивости.
3. Подобрать оптимальные условия синтеза, получить комплексные соединения выбранных фенольных лиганд и оценить их структуру различными физико-химическими методами.
4. С учетом риск-ориентированного подхода, принятого в фармацевтической разработке, создать Дерево принятия решений на основе имеющихся и разработанных подходов по синтезу металло-фенольных комплексов для алгоритмизации процесса их получения.
5. Провести скрининговую оценку противодиабетической активности цинковых комплексов с рутином и кверцетином в биологических экспериментах *in vivo*.
6. Разработать альтернативную спектрофлуориметрическую методику определения примеси алюминия с помощью рутина.

**Научная новизна исследования.** Впервые разработан унифицированный алгоритм методологии синтеза металло-фенольных комплексов, который был апробирован на разных классах фенольных соединений (рутин, кверцетин, хлорогеновая кислота, ресвератрол) и металлах (цинк, марганец, кобальт) и даёт возможность получать продукт при малых издержках с большим выходом (так, выход комплекса цинка с хлорогеновой кислотой составил ~ 64,3 %).

Проведено направленное изучение лекарственного растительного сырья с потенциальным противодиабетическим действием (побеги черники обыкновенной и стручки фасоли обыкновенной) в качестве природного источника комплексов металлов с фенольными соединениями в структурно-логической доказательной связи «структура-действие». Так, изучен качественный и количественный состав основных групп БАВ – потенциальных лигандов, а также определён элементный профиль изучаемых растений. Полученные данные по количественному определению использовались для предварительной оценки наличия противодиабетической активности нативных комплексов *in vivo*.

Впервые был проведён скрининг противодиабетической активности природных и синтетических комплексов на дексаметазон-индуцированной модели и на мышах *db db*, склонных к развитию ожирения и сахарного диабета II типа. Показано, что комплексы благоприятно воздействуют на течение заболевания.

**Теоретическая и практическая значимость работы.** Определяющая значимость работы заключается в оценке возможности получения новых потенциальных лекарственных

кандидатов на основе металлов и фенольных соединений растительного происхождения. Одним из актуальных и приоритетных направлений исследования является создание алгоритма синтеза и подбор унифицированных условий, позволяющих получить высокий выход целевого продукта при малых затратах реактивов с возможным трансфером и алгоритмизацией методологии синтеза на различные фенольные соединения (например, гидроксикоричные кислоты, флавоноиды, антоцианы, стильбены) и металлы. Предложенный алгоритм возможно применять при получении других металло-фенольных комплексов.

Важной и значимой научной составляющей работы также является оценка структуры полученных соединений. Решение этой проблемы позволяет обосновать физико-химические свойства молекулы, устойчивость в различных растворителях, возможный механизм влияния комплексов на звенья патогенеза заболевания, а также подобрать методы и параметры контроля качества для последующей стандартизации наиболее перспективных лекарственных кандидатов.

Исследование противодиабетической активности позволило оценить полученные соединения с точки зрения возможности их использования в качестве перспективных лекарственных средств. В экспериментах было показано, что комплекс цинка с рутином способствует снижению уровня глюкозы в крови и моче, а также его приём приводит к повышению содержания в крови адипонектина, лептина, что благоприятно сказывается на течении заболевания.

Практическая значимость работы также подчеркнута разработкой альтернативной методики определения допустимой примеси алюминия в фармацевтических субстанциях (на примере субстанции калия хлорида). Предлагаемый подход (методика) спектрофлуориметрического определения элементных примесей является экспрессным, недорогим и экологичным. Исходя из этого, его можно рекомендовать с целью практического внедрения на предприятия, где контролируется содержания элементных примесей в лекарственных средствах. Это позволит снизить материальные и временные издержки, а также пагубное воздействие хлороформа на организм человека и окружающую среду.

Результаты исследования внедрены в учебный процесс и научно-исследовательскую деятельность кафедр химико-фармацевтических дисциплин Школы фармации Казахского национального медицинского университета им. С.Д. Асфендиярова (акт внедрения от 06 декабря 2023 г.) (Приложение А.1), кафедры химической технологии лекарственных веществ Санкт-Петербургского химико-фармацевтического университета (акты внедрения от 09 января 2024 г.) (Приложения А.2, А.3), Воронежского государственного университета (акт внедрения от 08 декабря 2023 г.) (Приложение А.4) и нашли практическое применение в лабораториях ООО «Центр фармацевтической аналитики» (акт внедрения от 20 июня 2023 г.) (Приложение А.5), Северо-Западного центра по контролю качества лекарственных средств (акт внедрения от 29 ноября 2023 г.) (Приложение А.6) и АО «Фирма Медполимер» (акт внедрения от 29 декабря 2023 г.) (Приложение А.7).

**Методология и методы исследования.** Для проведения экспериментальных работ был использован адекватный, относительно поставленных задач, комплекс аналитических исследований, основанный на различных классических и современных физико-химических методах. Качественный фитохимический скрининг лекарственного растительного сырья проводили с помощью высокоэффективной тонкослойной хроматографии (ВЭТСХ). Количественное определение суммы основных групп БАВ определяли спектральными и титриметрическими методами. Элементный профиль растений изучали методом атомно-эмиссионной спектроскопии с индукционно связанной плазмой (АЭС-ИСП).

Спектральными методами (УФ-спектрофотометрия) оценивали соотношения компонентов в комплексах. Константы комплексообразования рассчитывали потенциометрически. Оценку структуры комплексов устанавливали с помощью спектрофотометрии в видимой и УФ-областях, ИК-спектроскопия, спектроскопии ЯМР, масс-спектрометрии, рентгенофлуоресцентного анализа (РФА).

Предварительный скрининг биологической активности оценивался на модели дексаметазон-индуцированного сахарного диабета с участием лабораторных животных (крыс). Гипогликемический эффект полученных комплексов также подтверждался в эксперименте *in vivo*, но с участием генно-модифицированных мышей *db db*. Антиоксидантную активность определяли спектрофлуориметрически.

Оценка содержания элементной примеси алюминия с использованием в качестве лиганда рутина осуществлялась спектрофлуориметрическим методом. Валидационные параметры альтернативной методики оценивали в соответствии с рекомендациями ОФС.1.1.0012 «Валидация аналитических методик». Полученные результаты подтверждались методом АЭС-ИСП.

Статистическую обработку полученных результатов проводили методами математической статистики в соответствии с ОФС.1.1.0013 «Статистическая обработка результатов химического эксперимента» с применением программы Microsoft Excel, а также GraphPad Prism 9.0.

#### **Основные положения, выносимые на защиту:**

На защиту выносятся следующие положения и результаты, которые определяют научную новизну и практическую значимость работы:

1. Элементный профиль и определение содержания основных групп БАВ, потенциальных лигандов, в лекарственном растительном сырье;
2. Разработка оптимальной технологии синтеза металло-фенольных комплексов с последующей оценкой структуры и прогнозированием сайтов связывания;
3. Создание Деревя принятия решений для алгоритмизации подходов синтеза комплексов;
4. Скрининг биологической активности комплексов: *in vivo* на примере патологии сахарного диабета II типа и *in vitro* на примере антиоксидантной активности;
5. Разработка и валидация альтернативной методики спектрофлуориметрического определения элементной примеси алюминия с помощью рутина в субстанции калия хлорида.

**Степень достоверности и апробация результатов.** Основные результаты исследований докладывались и обсуждались на научных российских и международных конференциях различного уровня: XI, XII, XIII Всероссийской научной конференции студентов и аспирантов с международным участием «Молодая фармация – потенциал будущего» (г. Санкт-Петербург, 2021, 2022, 2023); международной научной конференции «90 лет – от растения до лекарственного препарата: достижения и перспективы» (г. Москва, 2021); на VII междисциплинарной конференции «Молекулярные и Биологические аспекты Химии, Фармацевтики и Фармакологии» МОБИ-ХимФарма (г. Москва, 2021); III Международной научно-практической интернет-конференции «Современные достижения фармацевтической науки в создании и стандартизации лекарственных средств и диетических добавок, содержащих компоненты природного происхождения» (г. Харьков, 2021); международной научной конференции «От биохимии растений к биохимии человека» (г. Москва, 2022).

**Публикации материалов исследования.** По теме диссертационной работы было опубликовано 12 печатных работ. Из которых 2 статьи в журналах, входящих в перечень

рецензируемых научных журналов и изданий для опубликования основных научных результатов диссертаций, рекомендованных ВАК Минобрнауки России, 1 статья в издании, индексируемом в наукометрической базе данных Scopus, и 9 тезисов.

**Связь задач исследования с проблемным планом фармацевтических наук.** Диссертационная работа выполнена в соответствии с планом исследовательских работ ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России в рамках тематики государственного задания «Разработка методологической концепции контроля качества лекарственных средств и субстанций природного происхождения с использованием инновационных аналитических методов» (регистрационный номер АААА-А20-120121790032-2 от 17.12.2020) и инициативной темы «Инновационные подходы в стандартизации лекарственных средств синтетического и природного происхождения» (номер гос. регистрации: АААА-А19-119030590044-6, зарегистрирована 05.03.2019).

**Личный вклад автора в проведенное исследование и получение научных результатов.** Вишняковым Е.В. совместно с научным руководителем д.фарм.н., доц. И.И. Тернинко были определены основные векторы исследовательской работы, сформулирована цель и спланированы задачи для её достижения. Литературный поиск, анализ и систематизацию данных научных публикаций Вишняков Е.В. осуществлял самостоятельно. Автором лично был произведён весь объем экспериментальных работ, осуществлена интерпретация и статистическая обработка результатов, их оформление в виде научных публикаций.

Экспериментальные исследования (АЭС-ИСП, масс-спектрометрия, ИК-спектроскопия, УФ-спектрофотометрия, спектрофлуориметрия, потенциометрия) проводили с использованием парка оборудования ЦКП «Аналитический центр ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России». Оценка противодиабетической активности осуществлялась в Центре экспериментальной фармакологии ФГОУ ВО СПХФУ Минздрава России. ЯМР анализ проводили на базе парка научно-технического оборудования СПбГУ им. Петра Великого. Личный вклад автора составил не менее 90%.

**Соответствие диссертации паспорту научной специальности.** Научные положения диссертационной работы соответствуют паспорту научной специальности 3.4.2 «Фармацевтическая химия, фармакогнозия», а именно: пункт 1 – Исследование и получение биологически активных веществ на основе направленного изменения структуры синтетического и природного происхождения и выявление связей и закономерностей между строением и свойствами веществ; и пункт 3 – Разработка новых, совершенствование, унификация и валидация существующих методов контроля качества лекарственных средств на этапах их разработки, производства и потребления.

**Объем и структура диссертации.** Диссертационная работа изложена на 145 страницах компьютерного набора, иллюстрирована 22 рисунками и 35 таблицами. Структура работы состоит из введения, обзора литературы, главы «Материалы и методы», 3 экспериментальных глав, заключения, списка сокращений и условных обозначений, списка литературы и 11 приложений. Библиография включает 129 ссылок на литературные источники, в том числе 119 ссылок на иностранных языках.

## ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

### Глава 1. Обзор литературы

В обзоре литературы уделено внимание фенольным соединениям растительного происхождения и поливекторности их биологической активности. Отмечено, что в последнее

время ведётся модификация фенольных соединений с целью получения металло-фенольных комплексов, которые могут как превосходить нативную молекулу по степени выраженности ряда фармакологических эффектов, так и демонстрировать новые виды биологической активности. Стоит отметить, что нативными источниками минеральных комплексов с БАВ растительного происхождения являются растения. В главе рассматриваются аспекты, связанные с имеющимися подходами к синтезу искомым соединений. Исходя из анализа научных публикаций, можно сделать заключение о том, что методики получения комплексов значительно разнятся. Следовательно, актуальной остаётся задача по поиску унифицированного алгоритма синтеза изучаемых соединений с возможностью последующего трансфера методологии на различные классы фенолов и металлы. Определенную нетривиальную задачу представляет собой оценка строения полученных комплексов. Так, не для всех металло-фенольных комплексов удаётся реализовать метод РСА, поэтому учёные прибегают к другим физико-химическим методам анализа, позволяющим оценить сайты связывания: спектрофотометрия в видимой и УФ-областях, ИК-спектроскопия, спектроскопия ЯМР, масс-спектрометрия, РФА. Оценка структуры – это важный аспект, который позволяет спрогнозировать физико-химические свойства молекулы, оценить механизм действия, предложить методы стандартизации.

В главе уделено внимание направлениям применения получаемых комплексов. Так, они показывают в основном повышенную антиоксидантную активность по сравнению с лигандом. Отдельные комплексы демонстрируют хороший профиль эффективности и безопасности в отношении ряда линий опухолевых клеток рака шейки матки (*HeLa*), гепатоцеллюлярной карциномы (*HepG2*), и др. в сравнении с цисплатином. Комплексы опосредованно используются для оценки содержания суммы БАВ, определения концентрации элементных примесей (металлов), а также применяются в текстильной промышленности.

## Глава 2. Материалы и методы исследования

В качестве оценки возможного содержания нативных комплексов металлов с фенольными соединениями были использованы растительные объекты: побеги черники обыкновенной и стручки фасоли обыкновенной, реализующие по данным литературы противодиабетическую активность. Сырьё было приобретено в аптечной сети г. Санкт-Петербурга и, следовательно, является стандартным, т.е. его качество соответствует требованиям нормативной документации. По информации на упаковке сырьё было заготовлено в Алтайском крае (г. Барнаул) в 2020 г.

Качественную оценку содержания основных групп БАВ, потенциальных лигандов, проводили с использованием метода высокоэффективной тонкослойной хроматографии (ВЭТСХ). Анализ проводился на приборе *SAMAG* (Швейцария) с применением пластин *MERCK HPTLC silica gel 60 F154*, 20x10 см. Количественное определение суммы флавоноидов в пересчёте на рутин и гидроксикоричных кислот в пересчёте на хлорогеновую кислоту в сырьё черники обыкновенной и фасоли обыкновенной проводили спектральным методом на приборе *СФ-2000* (Россия). Содержание органических кислот в ЛРС осуществляли методом кислотно-основного титрования в пересчёте на яблочную кислоту. Элементный анализ проводили с помощью АЭС-ИСП на спектрометре *Optima 8000* (Perkin Elmer, США) в соответствии с рекомендациями ГФ РФ XIV ОФС.1.2.1.1.0004.15 и ОФС.1.5.3.0009.15.

Для оптимизации процесса синтеза комплексов были использованы: лиганды – ресвератрол (Evolva Inc, США), рутин (Sichuan Guangsong Pharmaceutical, Китай), кверцетин (Molekula, Франция), хлорогеновая кислота (Carl Roth, Швейцария); комплексообразователи – ацетаты цинка (ООО «Донецк-Реактив», Украина), марганца (Alfa Aesar, США) и кобальта (АО



«Реахим, Россия). Выбор лигандов обусловлен их высокой биологической активностью в том числе и в отношении сахарного диабета II типа. Цинк, марганец и кобальт являются микроэлементами, а также входят в состав многих ферментов в качестве кофакторов.

Соотношение компонентов оценивали методом Джоба. Константа устойчивости рассчитывалась с помощью потенциометрического титрования (метод Бьеррума).

Была предложена следующая унифицированная методика синтеза комплексов: в круглодонную колбу помещали  $n_1$  ммоль лиганда и растворяли в метаноле (АО «Вектон», Россия). К метанольному раствору прибавляли метоксид натрия 25% (Sigma Aldrich, США) в количестве  $V$  мл. К смеси осторожно по каплям добавляли метанольный раствор, содержащий  $n_2$  ммоль комплексообразователя. Колбы подсоединяли к обратному холодильнику и нагревали при температуре  $t$  °С, постоянно перемешивая с помощью магнитной мешалки (*Heidolph*, Германия) (400 об/мин) в течение  $T$  часов. Содержимое колбы охлаждали до комнатной температуры. Выпавший в колбе осадок отфильтровывали с помощью установки для вакуумной фильтрации (*Supelco*, Германия), промывали трёхкратно порциями метанола по 30 мл, собирали с фильтра и сушили в эксикаторе. В таблице 1 приведены данные о переменных оптимальных условиях синтеза исследуемых комплексов.

Таблица 1 – Переменные оптимальные условия синтеза исследуемых комплексов

Комплекс	Число моль лиганда ( $n_1$ ), ммоль	Число моль соли металла ( $n_2$ ), ммоль	Объём метоксида натрия ( $V$ ), мл	Температура ( $t$ ), °С	Время ( $T$ ), час
Zn-Rut	0,25	0,25	0,15	60	6
Zn-Querc	0,5	0,25	0,35	60	8
Zn-CA	0,25	0,5	0,50	60	6
Co-Rut	0,25	0,25	0,15	65	6
Co-Querc	0,5	0,25	0,35	60	8
Co-CA	0,25	0,5	0,50	60	7
Mn-Rut	0,25	0,25	0,15	60	8
Mn-Querc	0,5	0,25	0,35	65	8
Mn-CA	0,25	0,5	0,50	65	8

*Пояснение:* Zn-Rut, Zn-Querc, Zn-CA – комплексы цинка с рутином, кверцетином и хлорогеновой кислотой, соответственно; Co-Rut, Co-Querc, Co-CA – комплексы кобальта с рутином, кверцетином и хлорогеновой кислотой, соответственно; Mn-Rut, Mn-Querc, Mn-CA – комплексы марганца с рутином, кверцетином и хлорогеновой кислотой, соответственно.

С помощью спектрофотометра *UV 1800* (Shimadzu, Япония) регистрировали спектры поглощения лигандов и комплексов в диапазоне длин волн от 200 до 500 нм. Инфракрасную (ИК) спектроскопию проводили на ИК-спектрометре *Spectrum 3* (PerkinElmer, США) с применением приставки НПВО. Исследование полученных комплексов в сравнении с лигандами также осуществляли методом ядерного магнитного резонанса с использованием прибора *Bruker Avance III* (Германия), рабочая частота для спектров  $^1\text{H}$  – 400 МГц, растворители – ДМСО-*d*6 и D<sub>2</sub>O. ЯМР – спектры были обработаны с помощью программы *ACD/SpecManager 10.0* (AdvancedChemistryDevelopment, Inc). Масс-спектрометрический анализ проводили с помощью ВЭЖХ-МС с использованием в качестве детектора *Flexar SQ 300 MS* (PerkinElmer, США). Режим ионизации (+) – электроспрей (ESI), диапазон значений  $m/z$  200-900, 900-1300. Для оценки химического состава исследуемые соединения были проанализированы на энергодисперсионном рентгеновском спектрометре *Shimadzu EDX-7000* (Япония).

Антиоксидантную активность определяли спектрофлуориметрически на приборе *FL 6500* (PerkinElmer, США). Противодиабетическая активность нативных (растительных) и

синтезируемых комплексов исследовалась на модели дексаметазон-индуцированного сахарного диабета *in vivo* с участием белых крыс-самцов. Комплексы цинка с рутином и кверцетином также участвовали в эксперименте с применением генно-модифицированных мышей *C57BL/KsJ-db/db*, страдающих диабетом и ожирением с последующей оценкой фармакологического ответа по содержанию гормонов С-пептида, адипонектина и лептина. Работа проводилась с соблюдением требований Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях и была согласована биоэтической комиссией ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России.

Для расширения направлений практического применения комплексов, разработана и валидирована методика определения примеси алюминия (на примере субстанции калия хлорида) с помощью рутина спектрофлуориметрическим методом на приборе *FL 6500* (PerkinElmer, США). Подтверждение полученных результатов осуществлялось методом АЭС-ИСП.

Все количественные результаты химического эксперимента обрабатывали статистически с учетом рекомендаций ОФС.1.1.0013 «Статистическая обработка результатов химического эксперимента» и программы Microsoft Excel. Статистическую обработку результатов биологического эксперимента проводили с помощью программы GraphPad Prism 9.0, США. Проверку нормальности распределения количественных признаков осуществляли с использованием W-критерия Шапиро-Уилка. Значимость различий между двумя выборками при нормальном распределении количественных признаков оценивали с помощью t-критерия Стьюдента, при ненормальном — с помощью U-теста Манна-Уитни. Значимость различий между тремя выборками при нормальном распределении количественных признаков оценивали с помощью однофакторного дисперсионного анализа ANOVA, при ненормальном распределении — с помощью непараметрического критерия Краскела-Уоллиса.

### **Глава 3. Фитохимический скрининг лекарственного растительного сырья, обладающего противодиабетической активностью**

Фитохимический скрининг показал наличие в обоих растениях флавоноидов (рутина, гиперозида); фенилпропаноидов (у побегов черники обыкновенной – хлорогеновой п-кумаровой, протокатеховой, коричной, синаповой кислот, у фасоли – хлорогеновой и п-кумаровой кислот), органических кислот (у черники – яблочной, винной, янтарной кислот, у фасоли – яблочной кислоты).

Спектральными и титриметрическими методами установлено, что побеги черники обыкновенной содержат большее количество фенольных соединений (потенциальных лигандов) в сравнении со створками фасоли обыкновенной (сумма флавоноидов – 1,35% против 0,08%; сумма гидроксикоричных кислот – 1,39% против 0,48%; сумма органических кислот – 2,11% против 1,24 %, соответственно). Это позволяет предположить различные количественные характеристики образования комплексных соединений в ЛРС. Методом АЭС-ИСП установлено наличие и определено количественное содержание 14 элементов в каждом из растений. Установлено, что в исследуемом ЛРС преобладают ионы кальция, магния, марганца, алюминия и цинка. Следовательно, на основе полученных результатов в совокупности с данными литературы о значении элементов в терапии сахарного диабета можно предположить, что для побегов черники в большей степени характерно антиоксидантное и, как следствие, опосредованное гипогликемическое действие. Поэтому в качестве объекта предварительной фармакологической оценки гипогликемического действия нативных минеральных комплексов выбраны **побеги черники обыкновенной**.

## Глава 4. Синтез и оценка структуры металло-фенольных комплексов

Апробация методик синтеза комплексов металлов с фенольными соединениями, приведенных в литературе, показала, что синтез металло-фенольных комплексов не унифицирован. Следовательно, необходима алгоритмизация имеющихся подходов с возможностью повышения выхода продукта и трансфером методологии синтеза на другие катионы и лиганды. Данная алгоритмизация нашла своё отражение в Дереве принятия решений, которое даёт возможность унифицировать процесс получения комплексов (Рисунок 1).

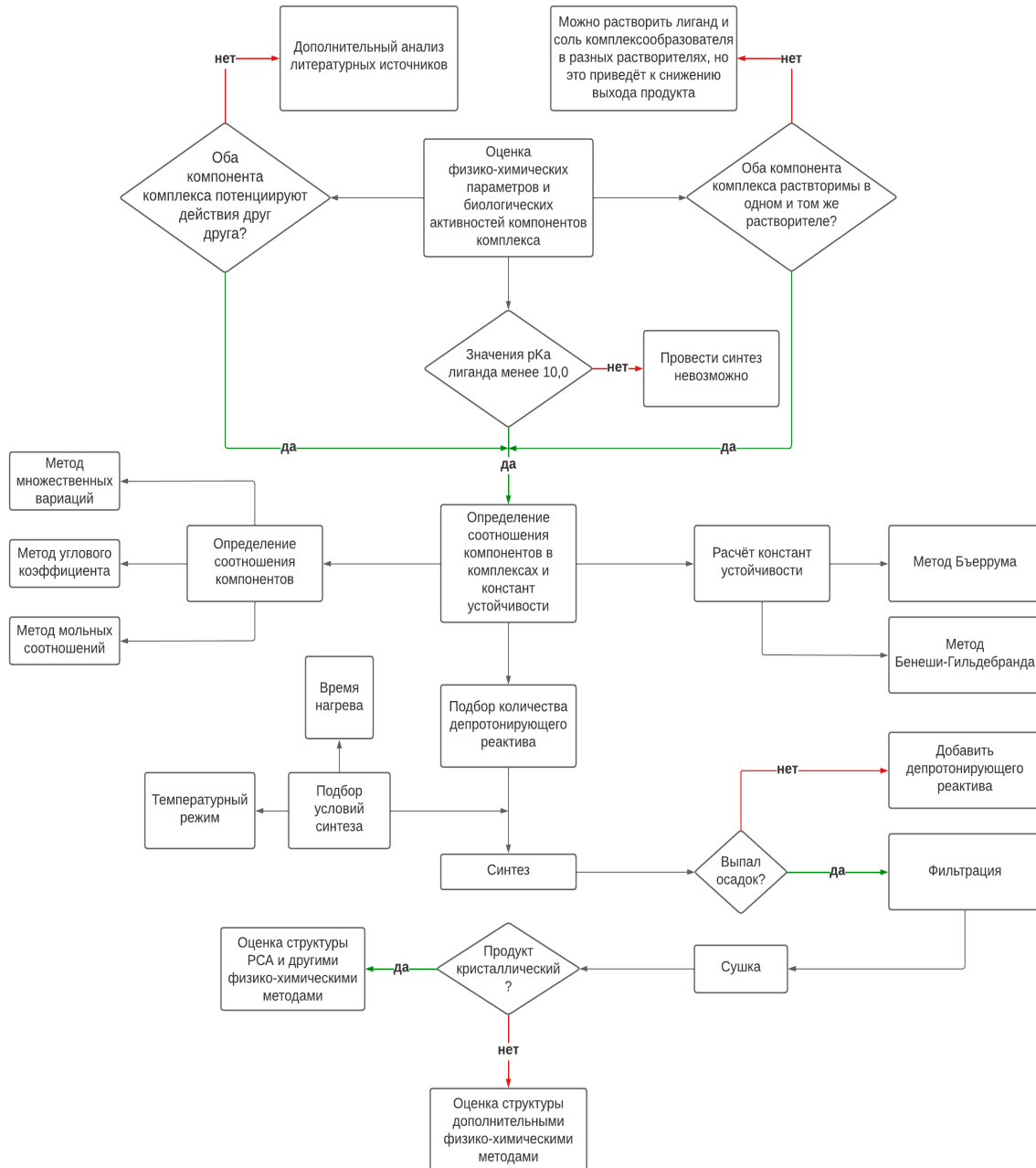


Рисунок 1 – Дерево решений «Синтез металло-фенольных комплексов»

Состоятельность предложенного алгоритма подтверждалась на четырёх лигандах (ресвератрол, хлорогеновая кислота, кверцетин, рутин) и трёх солях металлов (ацетаты цинка, марганца и кобальта).

В первую очередь проводилась оценка сайтов связывания лигандов, исходя из констант диссоциации, представленных в литературе. В таблице 2 показаны места возможного взаимодействия металла с фенольными соединениями и их  $pK_a$ .

Таблица 2 – Возможные сайты связывания и рKa рутина, кверцетина, ресвератрола и хлорогеновой кислоты

Лиганд	рKa	Возможные сайты связывания	Пояснение
Рутин	<p><b>рKa=7,21</b> (4'-ОН)            рKa=7,52 (3'-ОН)            рKa=7,82 (5-ОН)            рKa=11,52 (7-ОН)</p>	<p>The diagram shows the chemical structure of Rutin, a flavonoid glycoside. It consists of a flavanone core (rhamnetin) linked to a rhamnose sugar and a galactose sugar. The metal ion M<sup>n+</sup> is coordinated to the 3'-OH and 4'-OH groups of the B-ring, the 5-OH group of the C-ring, and the 7-OH group of the A-ring. The galactose sugar is also shown with its hydroxyl groups.</p>	<p>3'-4' – сайт (ОН-группы кольца В);            4-5 – сайт (кето- и ОН-группы).</p>
Кверцетин	<p><b>рKa=5,81</b> (3-ОН)            рKa=6,62 (3'-ОН)            рKa=7,12 (4'-ОН)            рKa=9,7</p>	<p>The diagram shows the chemical structure of Quercetin, a flavonoid. The metal ion M<sup>n+</sup> is coordinated to the 3-OH and 4-OH groups of the A-ring, the 3'-OH and 4'-OH groups of the B-ring, and the 5-OH group of the C-ring.</p>	<p>3'-4' – сайт (ОН-группы кольца В);            3-4 – сайт (кето- и ОН-группы);            4-5 – сайт (кето- и ОН-группы).</p>
Хлорогеновая кислота	<p><b>рKa=3,59</b> (7-COОН)            рKa=8,60            рKa=12,50</p>	<p>The diagram shows the chemical structure of Chlorogenic acid, a hydroxycinnamic acid derivative. The metal ion M<sup>n+</sup> is coordinated to the 3'-OH and 4'-OH groups of the B-ring, the 5-OH group of the C-ring, and the 7-COOH group of the A-ring.</p>	<p>3'-4' – сайт (ОН-группы);            Карбокси-группа по 7 положению</p>
Ресвератрол	<p>рKa=8,8            рKa=9,8            рKa=11,4</p>	<p>The diagram shows the chemical structure of Resveratrol, a stilbenoid. The metal ion M<sup>n+</sup> is coordinated to the 3'-OH and 4'-OH groups of the B-ring, the 5-OH group of the C-ring, and the 7-OH group of the A-ring.</p>	<p>Металл <b>не связывается</b> с лигандом (высокие значения рKa)</p>
<p>Пояснение: рKa – -log(Ka), Ka – константа кислотности, M<sup>n+</sup> = Zn, Co, Mn</p>			

Из таблицы 2 видно, что ресвератрол, в виду малых значений констант диссоциации, не способен связывать катионы металлов в прочные комплексы, что также подтверждалось экспериментально. Следовательно, было принято решение в ходе дальнейшей работы отказаться от использования в качестве лиганда ресвератрола.

Методом Джоба показано, что рутин образует устойчивые комплексы с металлами в соотношении 1:1, кверцетин – 1:2, хлорогеновая кислота – 2:1. Хлорогенаты являются более стабильными комплексами в виду наличия в составе молекулы хлорогеновой кислоты COOH-группы. Комплексы с рутином менее стабильны в связи с тем, что рутин самая слабая из представленных кислот. Описание, растворимость и выходы комплексов представлены в таблице 3.

Таблица 3 – Описание, растворимость и выходы комплексов

Комплекс	Описание и растворимость	Выход, % $x_{cp} \pm \Delta x$
Zn-Rut	Комплекс оранжевого цвета, легко растворим в воде, ДМСО. Мало растворим в спирте, метаноле.	$56,4 \pm 0,8$
Zn-Querc	Комплекс коричневого цвета, легко растворим в воде, ДМСО. Мало растворим в спирте, метаноле.	$53,1 \pm 0,5$
Zn-CA	Комплекс жёлтого цвета, легко растворим в воде, ДМСО. Мало растворим в спирте, метаноле.	$64,3 \pm 0,6$
Co-Rut	Комплекс коричневого цвета, легко растворим в воде. Мало растворим в спирте, метаноле, ДМСО.	$54,4 \pm 0,8$
Co-Querc	Комплекс зелёного цвета, легко растворим в воде. Мало растворим в спирте, метаноле, ДМСО	$55,3 \pm 0,9$
Co-CA	Комплекс коричневого цвета, легко растворим в воде. Мало растворим в спирте, метаноле, ДМСО	$64,4 \pm 0,4$
Mn-Rut	Комплекс жёлтого цвета, легко растворим в воде. Мало растворим в спирте, метаноле, ДМСО.	$56,1 \pm 0,5$
Mn-Querc	Комплекс коричневого цвета, легко растворим в воде. Мало растворим в спирте, метаноле, ДМСО.	$52,1 \pm 0,6$
Mn-CA	Комплекс бурого цвета, легко растворим в воде. Мало растворим в спирте, метаноле, ДМСО.	$60,1 \pm 0,6$

Структуру полученных комплексов подтверждали методами спектрофотометрии в видимой и УФ областях, ИК-спектроскопии, спектроскопии ЯМР, масс-спектрометрии и РФА. Исходя из анализа УФ – спектров образцов можно сделать заключение о том, что для всех комплексов кверцетина и рутина, кроме Mn-Querc характерно смещение максимума поглощения коричневого фрагмента в длинноволновую область. Это означает, что, скорее всего, для комплексов с рутином оптимальным сайтом связывания являются гидроксилы кольца В (3'-4' – сайт). Катионы металлов с кверцетином могут взаимодействовать по 3'-4' – и/или 3-4 – сайту. При изучении спектров комплексов и нативной молекулы хлорогеновой кислоты был отмечен батохромный сдвиг всех максимумов поглощения. Это даёт возможность предположить, что комплексообразование затрагивает как карбоксигруппу, так и фенольные гидроксилы. Примеры УФ-спектров комплексов (Zn-CA, Co-CA, Mn-CA) и хлорогеновой кислоты представлен на Рисунке 2.

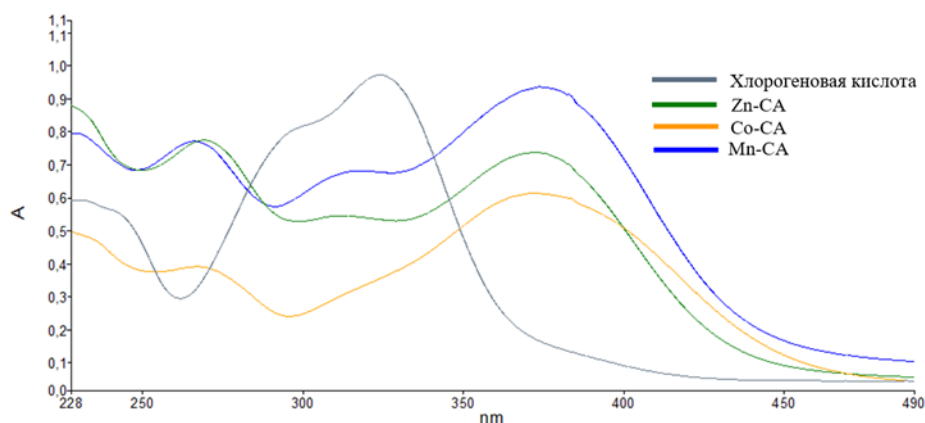


Рисунок 2 – УФ-спектры хлорогеновой кислоты и её комплексов

По данным ИК-спектроскопии, исходя из оценки потенциальных сайтов связывания металла с лигандами (рутин, кверцетин), были исследованы области валентных колебаний -

ОН, С-О-С и С=О групп. Как видно из данных спектров (рисунки 3 и 4), полоса поглощения -ОН группы комплексов при значении волнового числа  $\nu(\text{OH})$  3400-3250  $\text{cm}^{-1}$  подверглась значительным изменениям в сравнении со спектрами нативных флавоноидов. Из этого можно сделать вывод, что комплексообразование затрагивает -ОН группы. Однако точно определить по какой конкретно гидроксильной группе происходит взаимодействие с металлом нельзя. Характерная полоса поглощения  $\nu(\text{C}=\text{O})$  при 1690  $\text{cm}^{-1}$  подверглась значительным девиациям на спектрах комплексов с кверцетином в отличие от комплексов с рутином (незначительные девиации). Также на спектрах комплексов наблюдаются характерные полосы поглощения  $\nu(\text{Me-O})$ .

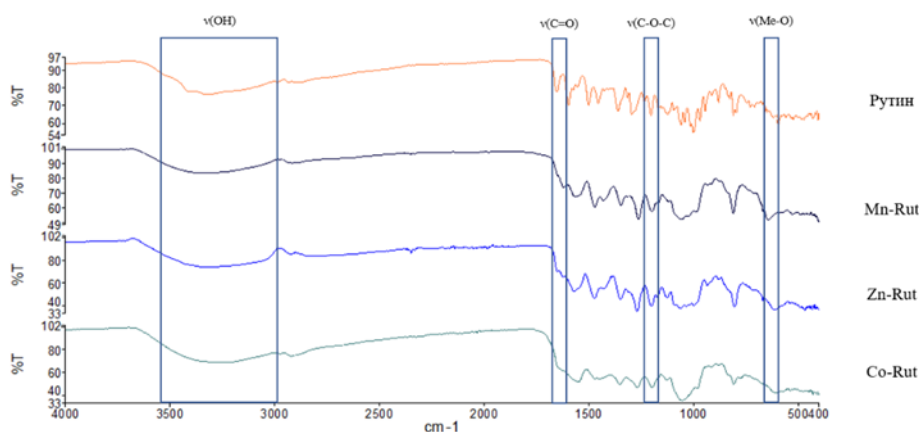


Рисунок 3 – ИК-спектры рутина и его комплексов

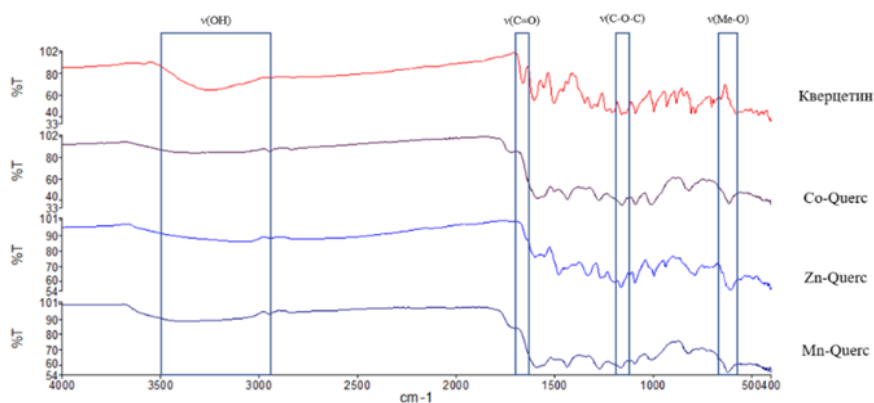


Рисунок 4 – ИК-спектры кверцетина и его комплексов

На ИК-спектрах комплексов металлов с хлорогеновой кислотой (рисунок 5) заметны значительные девиации полос поглощения, характерных для -ОН групп  $\nu(\text{OH})$  (3400-3250  $\text{cm}^{-1}$ ), карбоксильной группы  $\nu(\text{C}=\text{O})_{\text{COOH}}$  (1684  $\text{cm}^{-1}$ ), сложноэфирной группы  $\nu(\text{C}=\text{O})_{\text{est}}$  (1638  $\text{cm}^{-1}$ ). Смещению также подверглись полосы деформационных колебаний остатка хинной кислоты  $\delta(\text{COH})_{\text{qr}}$  (1442  $\text{cm}^{-1}$ ) и полосы валентных колебаний связей «углерод-углерод» бензольного ядра  $\nu(\text{CC})_{\text{ar}}$  (1516  $\text{cm}^{-1}$ ). Также стоит отметить появление полосы поглощения, характерной для связи Me-O.

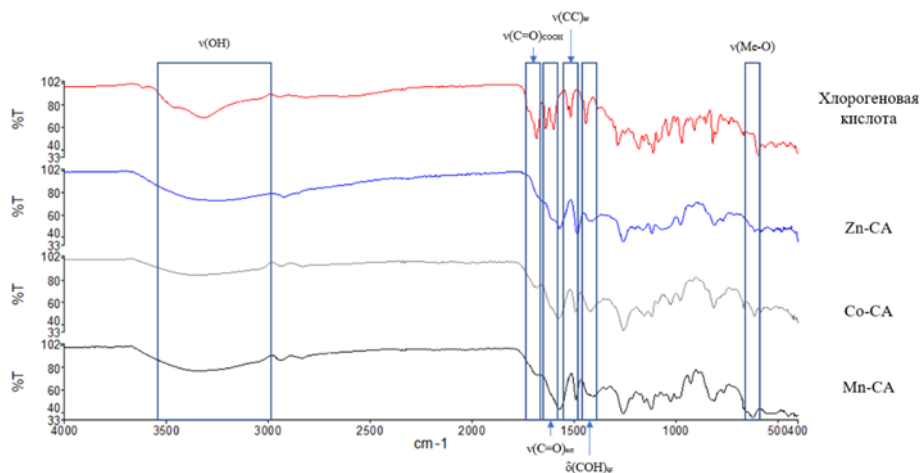
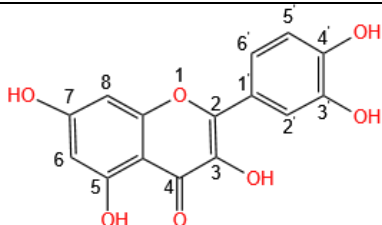
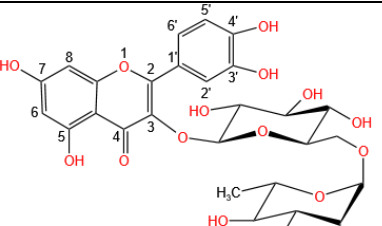
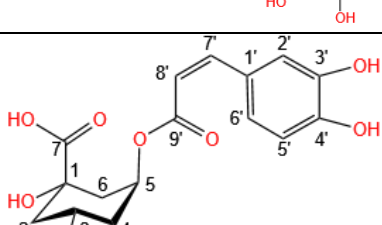
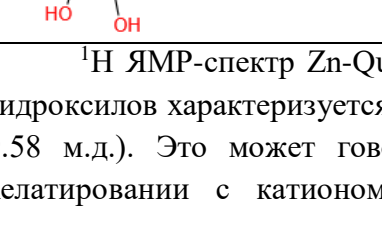
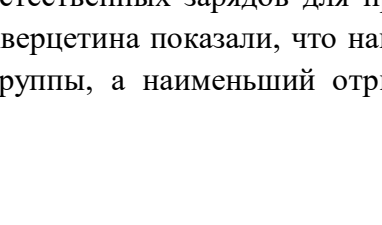



Рисунок 5 – ИК-спектры хлорогеновой кислоты и её комплексов

В связи с тем, что только комплексы с цинком (Zn-Rut, Zn-Querc, Zn-CA) растворимы в ДМСО, для них удалось снять  $^1\text{H}$  ЯМР спектры и проанализировать область фенольных гидроксильных групп. Интерпретация спектров в области фенольных гидроксильных групп приведена в таблице 5.

Таблица 5 – Сигналы протонов OH- и COOH – групп лигандов и их цинковых комплексов

Лиганд	5-OH	7-OH	3-OH	3'-OH	4'-OH	7-COOH
	Кверцетин					
	12,48	10,79	9,58	9,35	9,28	-
	Zn-Querc					
	12,52	10,80	-	9,36	9,32	-
	Рутин					
	12,63	10,84	-	9,68	9,18	-
	Zn-Rut					
	12,95	10,65	-	9,96	-	-
	Хлорогеновая кислота					
	-	-	-	9,21	9,63	12,44
	Zn-CA					
	-	-	-	-	-	-

$^1\text{H}$  ЯМР-спектр Zn-Querc в сравнении со спектром кверцетина в области фенольных гидроксильных групп характеризуется отсутствием сигнала протона OH-группы по 3-му положению ( $\delta = 9.58$  м.д.). Это может говорить о депротонировании C-3OH группы и ее участии в хелатировании с катионом цинка (таблица 5). Также квантово-химические расчеты естественных зарядов для протонов гидроксильных групп и атомов кислорода в молекуле кверцетина показали, что наибольший положительный заряд сосредоточен на протоне 3-OH группы, а наименьший отрицательный заряд на атоме кислорода карбонильной группы.

Исходя из этого, можно предположить, что предпочтительная атака металло-комплексообразователя осуществляется по 3-4 сайту связывания.

На  $^1\text{H}$  ЯМР-спектрах (область фенольных гидроксильных) комплекса Zn-Rut в сравнении со спектром нативного флавоноида наблюдается исчезновение сигнала протона гидроксила по 4' положению при  $\delta = 9.18$  м.д. Это даёт возможность предположить, что в процессе комплексообразования участвует сайт связывания, в котором присутствуют гидроксогруппы по 3' и 4' положениям (3'-4' сайт). Стоит отметить, что на ЯМР спектрах комплексов Zn-Rut и Zn-Querc сигналы протонов уширяются за счёт перераспределения электронной плотности и уменьшения времени релаксации. Также связывание металла с молекулой флавоноида приводит к изменению химических сдвигов сигналов протонов, что объясняется процессом комплексообразования.

Комплекс цинка с хлорогеновой кислотой характеризуется отсутствием сигналов протонов OH-групп по 3' и 4' положениям, а также сигнала протона COOH-группы. Это подтверждает возможность связывания металла по данным группировкам.

Масс-спектрометрия даёт возможность оценить молекулярную массу исследуемых комплексов и тех фрагментов, которые образуются в ходе ионизации. Анализ данных масс-спектров также показывает, что для комплексов кверцетина характерно образование димерных форм, что подтверждалось методом Джоба. Хлорогенаты имеют соотношение лиганд: металл = 1:2. Комплекс цинка с рутином имеет соотношение лиганд: металл = 1:1. В виду малой стабильности комплексов Co-Rut, Mn-Rut, Mn-Querc на их масс-спектрах отмечались лишь пики осколочных и молекулярных ионов лигандов.

Благодаря методу РФА удалось доказать, что все металлы, участвующие в комплексообразовании, выявлены в исследуемых комплексах. Стоит отметить наличие примесей, которые могут переходить в образцы из субстанций и растворителей, используемых в процессе синтеза. Поэтому содержание основных металлов-комплексообразователей не равно 100%.

По совокупности данных с помощью комплекса спектральных физико-химических методов анализа установлено, что металлы формируют координационные связи с рутином по 3'-4' сайту; с кверцетином по 3-4 сайту с образованием димерных форм; с хлорогеновой кислотой катионы взаимодействуют по фенольным гидроксилам и COOH-группе (Рисунок 6).

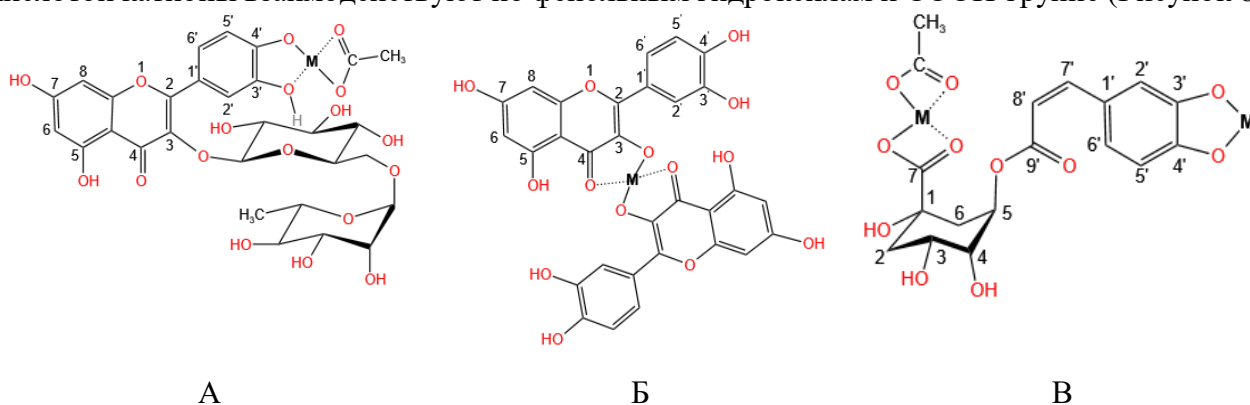


Рисунок 6 – Варианты комплексообразования для А – рутина; Б – кверцетина; В – хлорогеновой кислоты (M=Zn, Co, Mn).

## Глава 5. Возможные направления применения металло-фенольных комплексов

В ходе оценки АОА определяли ПИХ (%) девяти комплексов и трёх лигандов при одинаковой концентрации. Данные, полученные в результате исследования, представлены на рисунке 7.



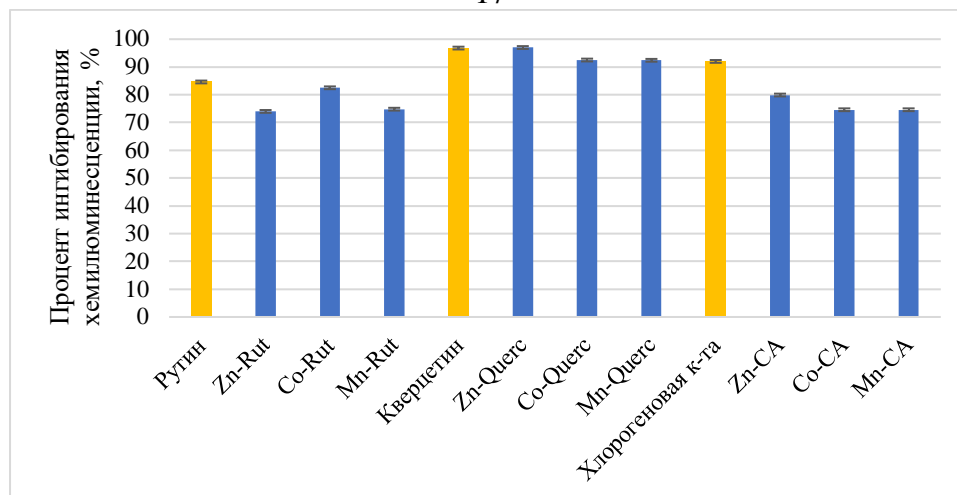


Рисунок 7 – Проценты ингибирования хемилюминесценции комплексов и лигандов

Исходя из приведённой выше диаграммы, можно сделать заключение о том, что внедрение в структуру фенольного соединения катиона металла в целом приводит к уменьшению АОА в сравнении с лигандами. Снижение АОА может косвенно говорить о том, что в ходе комплексообразования затрагиваются эссенциальные для АОА группировки.

Для комплексов металлов с хлорогеновой кислотой наблюдается самое значительное снижение АОА из-за взаимодействия металлов с фенольными гидроксилами, которые дают наибольший вклад в «гашение» свободных радикалов. В хелатировании молекулы рутина участвуют ОН-группы кольца В, которые в большей степени отвечают за АОА, что приводит к её уменьшению. Среди всех изучаемых соединений наименьшее изменение в АОА продемонстрировали комплексы с кверцетином, а Zn-Querc превзошёл по данному показателю лиганд на 0,2 %. Данный факт может свидетельствовать о том, что металлы в молекуле кверцетина не затрагивают группировки, ответственные за АОА.

Впервые была проведена оценка противодиабетической активности нативных и синтетических металло-фенольных комплексов *in vivo*. Изначально осуществляли скрининг гипогликемического действия комплекса цинка с рутином (Zn-Rut), водного извлечения из **побегов черники** обыкновенной, раствора цинка хлорида, смеси раствора цинка хлорида с извлечением из побегов черники на крысах с дексаметазон-индуцированной моделью сахарного диабета. Во всех группах вели мониторинг массы тела, оценивали содержание глюкозы в крови и моче, а также кетонов (моча). Смесь водного раствора цинка хлорида и водного извлечения из ЛРС (**побеги черники**) по данным исследования обладает более выраженным гипогликемическим действием, чем вещества при индивидуальном применении, что позволяет говорить об аддитивном эффекте фенольных соединений и цинка и может быть обусловлено как незначительной концентрацией металло-фенольных комплексов в извлечениях из побегов черники, так и их полным отсутствием в экстрактах ввиду низкой стабильности. Стоит отметить, что комплекс рутина с цинком в эксперименте продемонстрировал наибольшую эффективность при нарушениях гликемического профиля в сравнении с другими испытуемыми группами. Следовательно, синтетические комплексы по отношению к нативным представляют больший интерес и, в дальнейшем, они были отобраны для подтверждения противодиабетического действия на мышах *C57BL/KsJ-db/db*, склонных к ожирению и сахарному диабету II типа.

В рамках данного эксперимента проводили мониторинг массы тела, а в конце исследования оценивали содержание трёх гормонов (С-пептид, лептин, адипонектин), концентрация которых в крови зависит от тяжести протекания изучаемой патологии.

Мониторинг массы тела мышей в испытуемых группах и контроле представлен на рисунке 8. Исходя из анализа диаграммы, можно проследить тенденцию к снижению массы тела животных в испытуемых группах относительно контроля.

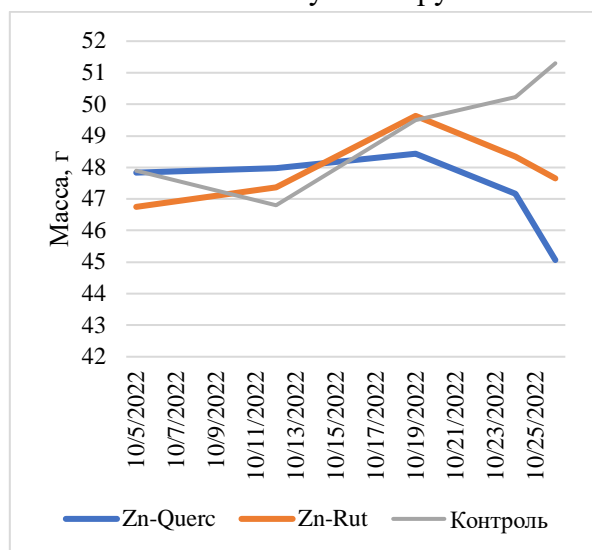


Рисунок 8 – Динамика массы тела мышей на протяжении эксперимента ( $p < 0,05$ )

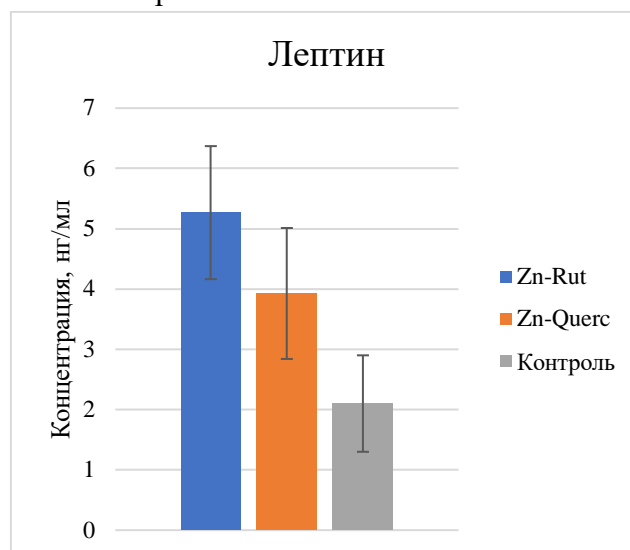


Рисунок 9 – Содержание лептина в контрольной и испытуемых группах на конец эксперимента ( $p < 0,05$ )

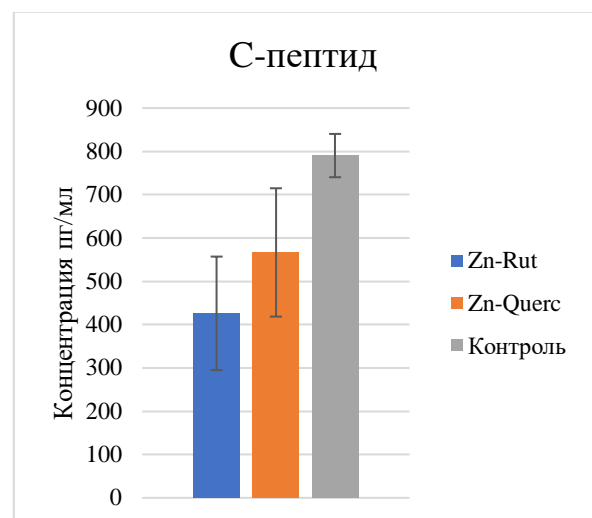


Рисунок 10 – Содержание С-пептида в контрольной и испытуемых группах на конец эксперимента ( $p < 0,05$ )

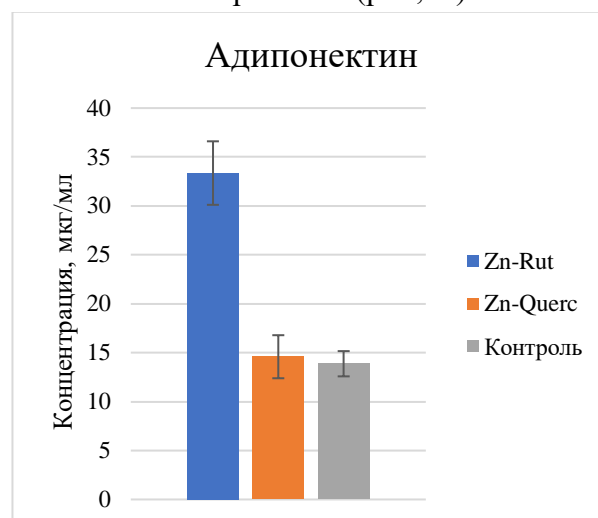


Рисунок 11 – Содержание адипонектина в контрольной и испытуемых группах на конец эксперимента ( $p < 0,05$ )

Содержание лептина в испытуемых группах возросло по сравнению с контролем для Zn-Rut в 2,5 раза, Zn-Querc – в 1,9 раз (Рисунок 9), что говорит о влиянии данных комплексов на выработку гормона, как следствие, снижению инсулинорезистентности. На диаграмме (Рисунок 10) можно отметить уменьшение концентрации С-пептида для обеих испытуемых групп. Однако снижение уровня данного гормона, параллельно со снижением секреции инсулина, может отмечаться при длительно протекающем сахарном диабете II типа. Следовательно, однозначно судить об отрицательном или положительном воздействии комплексов на течение сахарного диабета по данному показателю нельзя. Наибольший рост уровня адипонектина отмечен у Zn-Rut (в 2,4 раза) относительно контроля (Рисунок 11). Комплекс Zn-Querc не показал существенного влияния на рост исследуемого показателя. Следовательно, суммируя вышесказанное, комплекс Zn-Rut в сравнении с Zn-Querc обладает более выраженным противодиабетическим эффектом.

В качестве расширения возможного практического использования металло-фенольных комплексов нами была разработана и валидирована альтернативная методика спектрофлуориметрического определения примеси алюминия с помощью рутина (на примере субстанции калия хлорида). В мерную колбу на 50 мл к испытуемому раствору (4,0г субстанции калия хлорида в 10 мл ацетатного буферного раствора с рН 6,0) добавляли 10,0 мл раствора рутина в 70% спирте ( $C = 0,5$  г/мл), доводили до метки ацетатным буферным раствором с рН 6,0. В мерную колбу на 50 мл к эталонному раствору (4,0 мл стандартного раствора алюминий-иона с концентрацией 1 мкг/мл) и контрольному раствору (10 мл ацетатного буферного раствора с рН 6) добавляли 10,0 мл раствора рутина в 70% спирте ( $C = 0,5$  мг/мл), доводили до метки ацетатным буферным раствором с рН 6,0. Измеряли интенсивность флуоресценции испытуемого, эталонного и контрольного растворов при характерной длине волны возбуждения (445 нм) и длине волны флуоресценции (565 нм) комплекса алюминия с рутином. Критерий приемлемости: флуоресценция испытуемого раствора не должна превышать флуоресценцию эталонного раствора.

Валидацию методики проводили по параметрам «Специфичность», «Предел обнаружения», «Линейность».

*Специфичность.* Значения максимумов на спектрах возбуждения и эмиссии составили  $445 \pm 2$  нм и  $565 \pm 2$  нм, соответственно. Для характеристики специфичности предложенной альтернативой методики также оценивали влияние сопутствующих ионов ( $Zn^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$ ,  $Pb^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Cr^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$ ) на определение примеси алюминия при возможном совместном присутствии.

*Линейность.* Построение градуировочной зависимости проводилось на 5 пробах с различным содержанием алюминий-иона (2 мкг, 3 мкг, 4 мкг, 5 мкг, 6 мкг). Установлено, что зависимость интенсивности флуоресценции от концентрации имеет линейный характер:  $y = 9305,243x + 10700,841$ . Коэффициент корреляции составил  $0,9959 > 0,99$ .

*Предел обнаружения.* Предел обнаружения (ПО) находили по величине стандартного отклонения аналитического сигнала и угловому коэффициенту калибровочного графика:

$$ПО = 3.3 \times \frac{S}{b} = \frac{3.3 \times 1785.23}{9305.243} = 0.7 \text{ мкг,}$$

где  $S$  – стандартное отклонение аналитического сигнала;  $b$  – коэффициент чувствительности, представляющий собой отношение аналитического сигнала к определяемой величине (тангенс угла наклона калибровочной кривой).

Данная методика была апробирована на субстанции калия хлорида. Результаты исследования показали, что содержание алюминия в субстанции не превышает предельную концентрацию (не более 0,0001%), заявленную в нормативной документации. Способность методики давать воспроизводимые результаты подтверждена сопоставимостью с данными, полученными методом АЭС-ИСП.

Предложенная методика эргономична, то есть она удобна и безопасна относительно подхода, представленного в ГФ РФ, так как исключается стадия экстракции комплекса алюминия в органический слой, что существенно повышает воспроизводимость методики и сходимость данных, а также устраняется токсическое влияние хлороформа на организм человека и окружающую среду.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Критический анализ массива научных данных в отношении степени изученности комплексов металлов с фенольными соединениями растительного происхождения показал перспективность применения данных молекул в качестве потенциальных лекарственных

кандидатов. Исходя из этого, важным аспектом является создание унифицированного алгоритма получения данных структур с оценкой сайтов связывания.

1. В ходе исследовательской работы был проведён качественный и количественный анализ основных групп БАВ сырья черники обыкновенной и фасоли обыкновенной, которые по данным литературы позиционируются как ЛРС с гипогликемическим действием. ВЭТСХ-скрининг показал наличие в обоих растениях флавоноидов (рутина, гиперозида); фенилпропаноидов (у побегов черники обыкновенной – хлорогеновой п-кумаровой, протокатеховой, коричной, синаповой кислот, у створок фасоли – хлорогеновой и п-кумаровой кислот), органических кислот (у черники – яблочной, винной, янтарной кислот, у фасоли – яблочной кислоты). Также спектральными и титриметрическими методами было определено содержание флавоноидов (черника – 1,35%, фасоль – 0,08%), гидроксикоричных (черника – 1,39%, фасоль – 0,48%) и органических кислот (черника – 2,11%, фасоль – 1,24%). Эти данные позволили рассчитать оптимальное количество комплексообразователя (цинка хлорида) с целью проведения предварительного скрингового исследования противодиабетической активности. С помощью метода АЭС-ИСП установлено наличие и определено количественное содержание 14 элементов в изучаемых растениях. Показано, что в исследуемом ЛРС преобладают ионы кальция, магния, марганца, алюминия и цинка. Однако стоит отметить, что створки фасоли содержат меньше микроэлементов, чем побеги черники, но для этого вида сырья характерно большее накопление макроэлементов (в 2 раза больше кальция, в 4,9 раз больше магния). Элементный профиль растения демонстрирует какие металлы потенциально могут выступать в качестве комплексообразователей в нативных комплексах с фенольными соединениями, полученными в ходе экстракции.

2. На основании результатов оценки фитохимического профиля растений в качестве целевых лигандов были выбраны рутин, кверцетин, хлорогеновая кислота и ресвератрол, а в качестве комплексообразователей цинк, марганец и кобальт. Показано, что ресвератрол, являясь очень слабой кислотой, не способен связывать катионы металлов. В виду выраженных кислотных свойств хлорогеновой кислоты её комплексы показывают наибольшую стабильность в сравнении с другими изучаемыми лигандами. Методом Джоба установлено, что рутин образует устойчивые комплексы с металлами в соотношении 1:1, кверцетин – 1:2, хлорогеновая кислота – 2:1.

3. Подобраны оптимальные условия синтеза металло-фенольных комплексов. В качестве оптимального растворителя был выбран метанол, депротонирующего реактива – метоксид натрия. К метанольному раствору, содержащему лиганд и депротонирующий реактив прибавляли метанольный раствор соли комплексообразователя. Реакционную смесь нагревали с обратным холодильником. Выпавший осадок отфильтровывали и высушивали. С помощью физико-химических методов анализа установлено, что металл формируют координационные связи с рутином по 3'-4' сайту; с кверцетином по 3-4 сайту с образованием димерных форм; с хлорогеновой кислотой катионы взаимодействуют по фенольным гидроксилам и COOH-группе. Выходы комплексов варьировались в диапазоне от 52,1 – 64,4%.

4. На основании проведенных исследований с учетом принятого в фармацевтической практике риск-ориентированного подхода разработано Дерево принятия решений, которое алгоритмизирует возможность получения комплекса, дает возможность проанализировать основные процессы, переменные участки, оценить последствия принятия серии связанных между собой решений. Также предложенный алгоритм можно трансферировать на разные классы фенольных соединений и металлы.

5. Предварительное исследование противодиабетического действия комплекса рутина с цинком в сравнении с водным извлечением из побегов черники обыкновенной, водным раствором цинка хлорида и их смесью показало наибольшую эффективность комплексного соединения, которая оценивалась по показателям: концентрация глюкозы в крови, концентрация глюкозы в моче, концентрация кетонов в моче. Смесь водного раствора цинка хлорида и водного извлечения из ЛРС обладает более значительным гипогликемическим действием, чем данные вещества при индивидуальном применении, что позволяет говорить об аддитивном эффекте фенольных соединений и цинка и может быть обусловлено как незначительной концентрацией металло-фенольных комплексов в извлечениях из побегов черники, так и их полным отсутствием в экстрактах ввиду низкой стабильности. В эксперименте на мышах линии *C57BL/KsJ-db/db* было показано, что комплекс цинка с рутином положительно влияет на течение сахарного диабета II типа за счёт увеличения содержания в крови адипонектина (в 2,4 раза относительно контроля) и лептина (в 2,5 раза относительно контроля). Комплекс цинка с кверцетином демонстрирует рост уровня лептина (в 1,9 раз относительно контроля), однако концентрация адипонектина возросла незначительно. Уменьшение концентрации С-пептида в испытуемых группах можно объяснить снижением инсулинорезистентности.

6. Разработана альтернативная методика определения примеси алюминия с помощью рутина спектрофлуориметрическим методом. Валидация методики проводилась по параметрам «Специфичность», «Предел обнаружения», «Линейность». Специфичность характеризуется конкретными значениями длин волн возбуждения и флуоресценции комплекса. В ходе построения калибровочной зависимости интенсивности эмиссии от концентрации алюминий-иона был рассчитан коэффициент корреляции, который составил 0,9959 ( $>0,99$ ). Предел обнаружения составил 0,7 мкг. Данная методика была апробирована на субстанции калия хлорида. Результаты исследования показали, что содержание алюминия в субстанции не превышает предельную концентрацию (не более 0,0001%), заявленную в нормативной документации. Способность методики давать воспроизводимые результаты подтверждена сопоставимостью с данными, полученными методом АЭС-ИСП. Предложенная методика эргономична, то есть удобна и безопасна относительно подхода, представленного в ГФ РФ, так как исключается стадия экстракции комплекса алюминия в органический слой и устраняется токсическое влияние хлороформа на организм человека и окружающую среду.

**СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ**

1. **Вишняков, Е. В.** Оценка микро- и макроэлементного профиля растительного сырья с потенциальным противодиабетическим действием / **Е. В. Вишняков**, И. И. Тернинко, Ю. Э. Генералова, В. И. Топоркова // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. – 2021. – Том 24. – № 11. – С. 42-46.
2. **Вишняков, Е. В.** Оптимизация способа спектрофлуориметрического определения примеси алюминия в субстанциях / **Е. В. Вишняков**, А. А. Толстикова, Ю. Э. Генералова, А. К. Калдыбаева, И. И. Тернинко // Разработка и регистрация лекарственных средств. – 2024. – Том 13. – № 1. – С. 18-25.
3. Топоркова, В. И. Оценка влияния минерального комплекса рутина на степень выраженности противодиабетической активности / В. И. Топоркова, **Е. В. Вишняков**, К. О. Сидоров, И. И. Тернинко, Д. Ю. Ивкин // Разработка и регистрация лекарственных средств. 2021. – Том 10. – № S4. – С. 197-205.
4. **Вишняков, Е. В.** Оценка структуры комплекса цинка с рутином с помощью метода ИК-спектроскопии / **Е. В. Вишняков**, И. И. Тернинко, В. И. Топоркова, Л. Н. Зинчук // Современные достижения фармацевтической науки в создании и стандартизации лекарственных средств и диетических добавок, которые содержат компоненты природного происхождения: Материалы III Международной научно-практической интернет-конференции. – Харьков, 2021. – С. 69-70.
5. **Вишняков, Е. В.** Фитохимический скрининг лекарственных растений, обладающих противодиабетической активностью и являющихся потенциальным источником минеральных комплексов с биологически активными веществами / **Е. В. Вишняков**, В. И. Топоркова // Сборник материалов XI Всероссийской научной конференции студентов и аспирантов с международным участием «Молодая фармация – потенциал будущего». – Санкт-Петербург: СПХФУ, 2021. – Т. 2. – С.21-25.
6. Тернинко, И. И. Изучение структуры комплекса рутина с цинком методами ЯМР и спектрофотометрии / И. И. Тернинко, **Е. В. Вишняков**, В. И. Топоркова, А. К. Уэйли // Сборник материалов международной научной конференции «90 лет – от растения до лекарственного препарата: достижения и перспективы» – Москва, 2021. – С. 379-384.
7. **Вишняков, Е. В.** Определение оптимального соотношения компонентов в комплексе цинка с рутином методом Джоба / **Е. В. Вишняков**, В. И. Топоркова, И. И. Тернинко // Сборник VII Междисциплинарной конференции «Молекулярные и Биологические аспекты Химии, Фармацевтики и Фармакологии» МОБИ-ХимФарма2021. – Москва, 2021. – С. 12.
8. **Вишняков, Е. В.** Подходы к получению комплекса цинка с кверцетином в сравнительном аспекте / **Е. В. Вишняков**, К. В. Орлова // Сборник материалов XII Всероссийской научной конференции студентов и аспирантов с международным участием «Молодая фармация – потенциал будущего». – Санкт-Петербург: СПХФУ, 2022. – Т.1. – С. 99-101.
9. **Вишняков, Е. В.** Оценка структурных характеристик комплекса цинка с кверцетином / **Е. В. Вишняков**, И. И. Тернинко, К. В. Орлова // Сборник материалов международной научной конференции «От биохимии растений к биохимии человека». – Москва, 2022. – С.143-148.
10. **Vishnyakov, E. V.** Mass spectrometric structure evaluation of zinc-rutin complex / E. V. Vishnyakov, U. A. Efremova, I. I. Terninko // The 4th Belt & Road International Conference on Traditional Medicine and 2021 Symposium on the Chinese MEDICINAL Materials. – Chinese, 2022. – P. 116.

11. Орлова, К. В. Синтез и оценка структуры комплекса цинка с хлорогеновой кислотой / К. В. Орлова, **Е. В. Вишняков**, И. И. Тернинко // Сборник материалов XIII Всероссийской научной конференции студентов и аспирантов с международным участием «Молодая фармация – потенциал будущего». – Санкт-Петербург: СПХФУ, 2023. – Том 1. – С.289-293.

12. Толстикова, А. А. Альтернативный способ спектрофлуориметрического определения примеси алюминия / А. А. Толстикова, **Е. В. Вишняков**, И. И. Тернинко // Сборник материалов XII Всероссийской научной конференции студентов и аспирантов с международным участием «Молодая фармация – потенциал будущего». – Санкт-Петербург: СПХФУ, 2023. – Том 1. – С.340-344.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ**

- АОА – антиоксидантная активность  
АЭС-ИСП – атомно-эмиссионная спектроскопия с индуктивно связанной плазмой  
БАВ – биологически активные вещества  
ВЭТСХ – высокоэффективная тонкослойная хроматография  
ГФ РФ XIV – Государственная фармакопея Российской Федерации XIV  
ДМСО – диметилсульфоксид  
ИК-спектроскопия – инфракрасная спектроскопия  
ЛРС – лекарственное растительное сырье  
НПВО – нарушенное полное внутреннее отражение  
ОФС – общая фармакопейная статья  
ПИХ – процент ингибирования хемилюминесценции  
РСА – рентгеноструктурный анализ  
РФА – рентгенофлуоресцентный анализ  
УФ-спектрофотометрия – ультрафиолетовая спектрофотометрия  
ЯМР-спектроскопия – спектроскопия ядерного магнитного резонанса  
Zn-Rut – комплекса цинка с рутином  
Zn-Querc – комплекс цинка с кверцетином  
Zn-SA – комплекс цинка с хлорогеновой кислотой  
Co-Rut – комплекс кобальта с рутином  
Co-Querc – комплекс кобальта с кверцетином  
Co-SA – комплекс кобальта с хлорогеновой кислотой  
Mn-Rut – комплекс марганца с рутином  
Mn-Querc – комплекс марганца с кверцетином  
Mn-SA – комплекс марганца с хлорогеновой кислотой