

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ  
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ  
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ  
«САНКТ-ПЕТЕРБУРГСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ ХИМИКО-  
ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»

*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

Диссертация на соискание учёной степени  
кандидата фармацевтических наук

Научный руководитель  
доктор фармацевтических наук, доцент  
**Тернинко Инна Ивановна**

Санкт-Петербург – 2024 г.

## ОГЛАВЛЕНИЕ

<b>ВВЕДЕНИЕ</b> .....	4
<b>ГЛАВА 1. КОМПЛЕКСЫ МЕТАЛЛОВ С ФЕНОЛЬНЫМИ СОЕДИНЕНИЯМИ РАСТИТЕЛЬНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ</b> .....	14
1.1. Характеристика фенольных соединений растительного происхождения как потенциальных лигандов .....	14
1.2. Синтез и оценка структуры комплексов металлов с фенольными соединениями.....	18
1.2.1. Особенности синтеза комплексов .....	18
1.2.2 Методы оценки структуры металло-фенольных комплексов.....	22
1.3. Применение металло-фенольных комплексов.....	29
1.3.1. Биологическая активность комплексов .....	29
1.3.2. Альтернативные варианты применения металло-фенольных комплексов .....	33
Выводы к главе 1 .....	35
<b>ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ</b> .....	37
2.1. Фитохимический скрининг лекарственного растительного сырья - потенциального источника минеральных комплексов .....	37
2.1.1. Изучение компонентного состава фенольных соединений в лекарственном растительном сырье, которое обладает противодиабетической активностью .....	37
2.1.2. Количественное определение потенциальных лигандов в лекарственном растительном сырье.....	38
2.1.3. Установление элементного профиля лекарственного растительного сырья, обладающего противодиабетической активностью .....	41
2.2. Синтез и оценка структуры металло-фенольных комплексов .....	43
2.2.1. Определение оптимальных соотношений компонентов в комплексах и констант устойчивости .....	43
2.2.2. Синтез и оценка структуры металло-фенольных комплексов...	45
2.3. Исследование биологической активности металло-фенольных комплексов .....	47
2.3.1. Оценка антиоксидантной активности комплексов.....	47
2.3.2. Предварительный скрининг противодиабетической активности модельного комплекса в сравнительном аспекте .....	48
2.3.3. Оценка противодиабетической активности комплексов цинка с кверцетином и рутином .....	51
2.3.4. Методы статистической обработки результатов .....	52
2.4. Спектрофлуориметрическое определение примеси алюминий с помощью рутина .....	53
Выводы к главе 2 .....	56
<b>ГЛАВА 3. ФИТОХИМИЧЕСКИЙ СКРИНИНГ ЛЕКАРСТВЕННОГО РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ, ОБЛАДАЮЩЕГО ПРОТИВОДИАБЕТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТЬЮ</b> .....	57
3.1. ВЭТСХ-скрининг створок фасоли обыкновенной и побегов черники	

обыкновенной.....	57
3.2. Количественное определение суммы основных групп БАВ-потенциальных лигандов в створках фасоли обыкновенной и побегах черники обыкновенной .....	60
3.3. Элементный профиль створок фасоли обыкновенной и побегов черники обыкновенной.....	62
Выводы к главе 3 .....	64
<b>ГЛАВА 4. СИНТЕЗ И ОЦЕНКА СТРУКТУРЫ МЕТАЛЛО-ФЕНОЛЬНЫХ КОМПЛЕКСОВ .....</b>	<b>66</b>
4.1. Расчёт оптимальных соотношений компонентов и констант устойчивости комплексов.....	69
4.2. Синтез и оценка структуры комплексов .....	71
Выводы к главе 4 .....	77
<b>ГЛАВА 5. ВОЗМОЖНЫЕ НАПРАВЛЕНИЯ ПРИМЕНЕНИЯ МЕТАЛЛО-ФЕНОЛЬНЫХ КОМПЛЕКСОВ.....</b>	<b>79</b>
5.1. Оценка антиоксидантной активности комплексов .....	79
5.2. Оценка влияния металло-фенольных комплексов на степень выраженности противодиабетической активности .....	80
5.2.1. Предварительный скрининг противодиабетической активности модельного комплекса в сравнительном аспекте .....	80
5.2.2 Оценка противодиабетической активности комплексов цинка с кверцетином и рутином .....	83
5.3. Разработка альтернативной методики спектрофлуориметрического определения примеси алюминия с помощью рутина .....	85
Выводы к главе 5 .....	91
<b>ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....</b>	<b>93</b>
<b>СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....</b>	<b>97</b>
<b>СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ .....</b>	<b>99</b>
<b>ПРИЛОЖЕНИЕ А .....</b>	<b>116</b>
<b>ПРИЛОЖЕНИЕ Б.....</b>	<b>125</b>
<b>ПРИЛОЖЕНИЕ В.....</b>	<b>129</b>
<b>ПРИЛОЖЕНИЕ Г .....</b>	<b>131</b>
<b>ПРИЛОЖЕНИЕ Д.....</b>	<b>132</b>
<b>ПРИЛОЖЕНИЕ Е.....</b>	<b>134</b>
<b>ПРИЛОЖЕНИЕ Ж .....</b>	<b>135</b>
<b>ПРИЛОЖЕНИЕ И .....</b>	<b>136</b>
<b>ПРИЛОЖЕНИЕ К .....</b>	<b>137</b>
<b>ПРИЛОЖЕНИЕ Л .....</b>	<b>139</b>
<b>ПРИЛОЖЕНИЕ М.....</b>	<b>142</b>

## ВВЕДЕНИЕ

**Актуальность темы исследования.** Фенольные соединения растительного происхождения обладают широким спектром полинаправленной биологической активности: антиоксидантная, противовоспалительная, противоопухолевая и др. [1-4]. 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 [5-9]. 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 [10-13].

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 [14-16].

Важно сделать акцент на том, что нативным источником комплексов является лекарственное растительное сырье (ЛРС), которое накапливает как металлы, так и фенольные соединения, предопределяя сочетанное фармакологическое действие [17-19] 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 [20, 21]. 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 [22-24] 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 [22, 25] 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 [25, 26-28]. 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-спектроскопия) оценивали соотношения компонентов в комплексах. Константы комплексообразования рассчитывали потенциметрически. Оценку структуры комплексов устанавливали с помощью спектроскопии в видимой и УФ-областях, ИК-

спектроскопии, 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» [29]. 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» [29] 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 Дерева 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-спектроскопия, 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.

# ГЛАВА 1. КОМПЛЕКСЫ МЕТАЛЛОВ С ФЕНОЛЬНЫМИ СОЕДИНЕНИЯМИ РАСТИТЕЛЬНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

## **1.1. Характеристика фенольных соединений растительного происхождения как потенциальных лигандов**

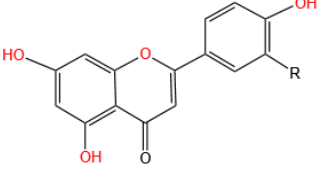
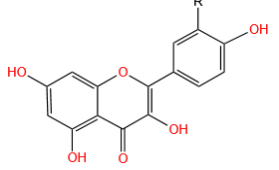
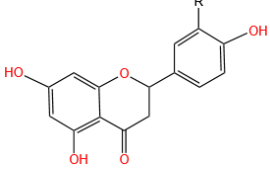
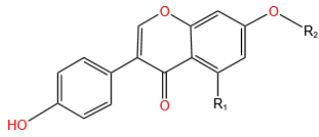
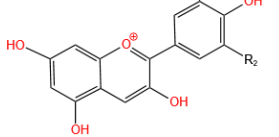
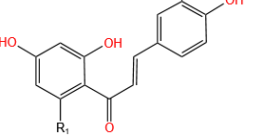
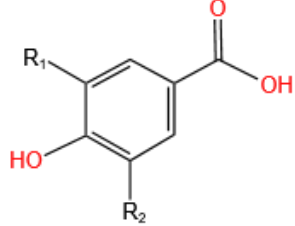
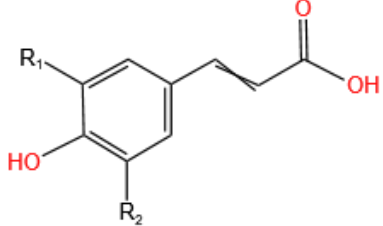
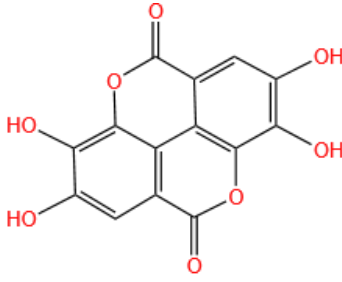
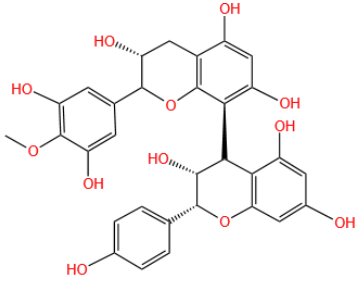
Фенольные соединения представляют собой обширный класс вторичных метаболитов шикиматного (фенилпропаноидного) происхождения, одна из основных функций которых в растениях - защитная. Они проявляют широкий спектр различной биологической активности и поэтому остаются в фокусе научных интересов многих научных групп [30-34].

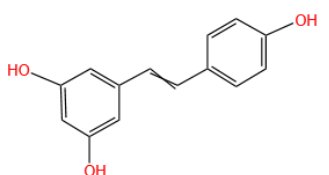
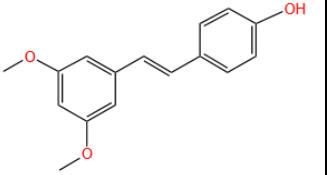
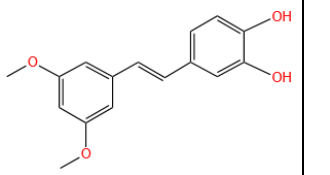
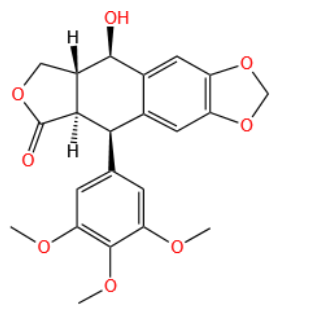
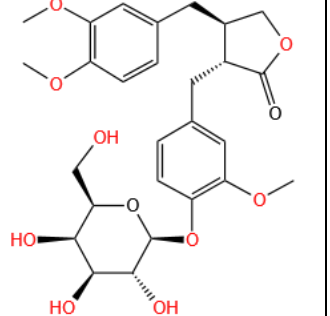
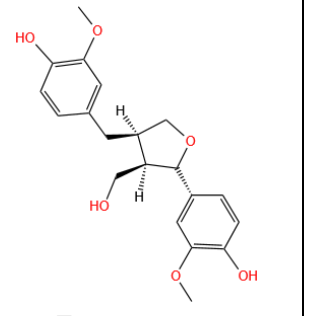
В последнее время активно ведётся модификация фенольных соединений с целью получения минеральных комплексов, которые в приоритете могут обладать новыми или более выраженными фармакологическими эффектами в сравнении с молекулой-предшественницей [13, 22, 25].

Существуют разнообразные классификации фенольных соединений. В таблице 1 представлена их систематизация с точки зрения потенциальных лигандов с указанием группировок, которые могут быть вовлечены в процесс комплексообразования (сайты связывания).

Стоит отметить, что представленные в таблице 1 группы веществ отличаются разнообразием фармакологических эффектов, которые могут потенцироваться при введении в их структуру катионов металлов. Также комплексообразование может приводить к изменению физико-химических свойств и биодоступности нативных молекул [35, 36].

Таблица 1 – Классификация фенольных соединений растительного происхождения как потенциальных лигандов

Класс	Представители		Сайты связывания	
1	2		3	
Флавоноиды	<p><b>Флавоны</b></p>  <p>R=H – Апигенин R=OH – Лютеолин</p>	<p><b>Флавонолы</b></p>  <p>R=OH – Кверцетин R=H – Кемпферол</p>	<p><b>Флаваноны</b></p>  <p>R=H – Нарингенин R=OH – Эриодиктиол</p>	ОН-группы, кетогруппа
	<p><b>Изофлавоны</b></p>  <p>R<sub>1</sub>=R<sub>2</sub>=H – Даидзеин R<sub>1</sub>=OH, R<sub>2</sub>=H – Генистеин R<sub>1</sub>=OH, R<sub>2</sub>=CH<sub>3</sub> – Биоханин А</p>	<p><b>Антоцианы</b></p>  <p>R<sub>1</sub>=OH, R<sub>2</sub>=H – Цианидин R<sub>1</sub>=OCH<sub>3</sub>, R<sub>2</sub>=H – Пеонидин R<sub>1</sub>=OCH<sub>3</sub>, R<sub>2</sub>=OCH<sub>3</sub> – Мальвидин</p>	<p><b>Халконы</b></p>  <p>R<sub>1</sub>=OH, R<sub>2</sub>=H – Халкон нарингенина R<sub>1</sub>=H, R<sub>2</sub>=OH – Бутеин</p>	
Фенольные кислоты	<p><b>Гидроксибензойные кислоты</b></p>  <p>R<sub>1</sub>=OH, R<sub>2</sub>=H – Протокатеховая кислота R<sub>1</sub>=R<sub>2</sub>=OH – Галловая кислота R<sub>1</sub>=OCH<sub>3</sub>, R<sub>2</sub>=H – Ванилиновая кислота</p>	<p><b>Гидроксикоричные кислоты</b></p>  <p>R<sub>1</sub>=R<sub>2</sub>=H – Кумаровая кислота R<sub>1</sub>=OH, R<sub>2</sub>=H – Кофейная кислота R<sub>1</sub>=OCH<sub>3</sub>, R<sub>2</sub>=H – Феруловая кислота</p>	СООН - группы, ОН-группы	
Таннины	<p><b>Гидролизуемые таннины</b></p>  <p>Эллаговая кислота</p>	<p><b>Конденсированные таннины</b></p>  <p>Проантоцианидин</p>	ОН-группы	

1	2		3	
Стильбены	 Ресвератрол	 Птеростильбен	 3'-гидроксиптеростильбен	ОН-группы
Лигнаны	 Подофиллотоксин	 Арктиин	 Ларицирезинол	ОН-группы

В таблице 2 представлена сводная информация по биологической активности классов фенольных соединений, представляющих особый интерес с точки зрения лигандов.

Таблица 2 – Биологическая активность фенольных соединений растительного происхождения

Класс	Краткая информация
1	2
<b>Флавоноиды</b>	Антиоксидантная активность (способность вещества «гасить» свободные радикалы) является основной для данной группы соединений. Другие виды активности опосредованы через антиоксидантную. Например, снижение оксидативного стресса уменьшает резистентность тканей к инсулину, что в свою очередь обуславливает противодиабетический эффект. Противоопухолевое действие флавоноидов обусловлено индуцированием апоптоза через каспазный путь. Характерен кардиопротективный, противомикробный эффект [37-39].
<b>Фенольные кислоты</b>	Оказывают гипотензивное действие, а также снижают активность ключевых ферментов, связанных с патогенезом артериальной гипертензии. Было показано, что галловая кислота специфически воздействует на жировую ткань, подавляя липогенез. Это приводит к снижению оксидативного стресса, а также к торможению процесса перекисного окисления липидов. Ванилиновая кислота является ингибитором HIF-1 фактора, значительно подавляет рост опухолей в ксенотрансплантированных моделях <i>in vivo</i> [40, 41].



1	2
<b>Таннины</b>	Данная группа соединений обладает различной биологической активностью, включая противомикробную, противопаразитарную, противовирусную, антиоксидантную, противовоспалительную, иммуномодулирующую. Находят применение как вяжущие, противодиарейные, кровоостанавливающие, противогеморроидальные средства и противоядия (отравления тяжёлыми металлами). Описанные выше эффекты объясняются наличием большого числа фенольных гидроксиллов [1-4].
<b>Стильбены</b>	Относительно небольшая группа фенольных вторичных метаболитов растений, ключевым среди которых является ресвератрол (3,5,4'-тригидроксистильбен). Ресвератрол – это известный антиоксидант. Установлено, что он способен предупреждать возникновение и развитие онкологических и сердечно-сосудистых заболеваний, а также оказывать антиаллергическое действие и замедлять процесс старения [44, 45].
<b>Лигнаны</b>	Представляют собой большую группу фенольных соединений, полученных в ходе окислительной димеризации двух фенилпропановых звеньев. Обладают антиоксидантной, противоопухолевой, противовирусной активностью. Подофиллотоксин используется как цитостатическое средство. Также лигнаны обладают эстрогенной активностью, могут оказывать стимулирующее влияние на ЦНС [46, 47].

Как уже было отмечено ранее, в растениях фенольные соединения выполняют ряд жизненно важных функций, среди которых есть и запасаящая. Она в том числе связана с накоплением металлов, играющих важную роль в жизнедеятельности растительного организма. Основные лиганды природного происхождения, связывающие макро- и микроэлементы в растениях представлены на рисунке 1.

Многие учёные [18, 48, 49] утверждают, что суммарное фармакологическое действие растительного сырья обеспечивается сочетанным действием металлов и биологически активных веществ (БАВ). Комплексообразование может способствовать лучшему растворению БАВ в ходе экстракции, что приводит к высоким значениям выхода фармакологически активных соединений. Как отмечается в публикациях [18, 48] элементы, аккумулированные в компартментах, высвобождаются и связываются с лигандами, обладающими наибольшей комплексообразующей способностью.

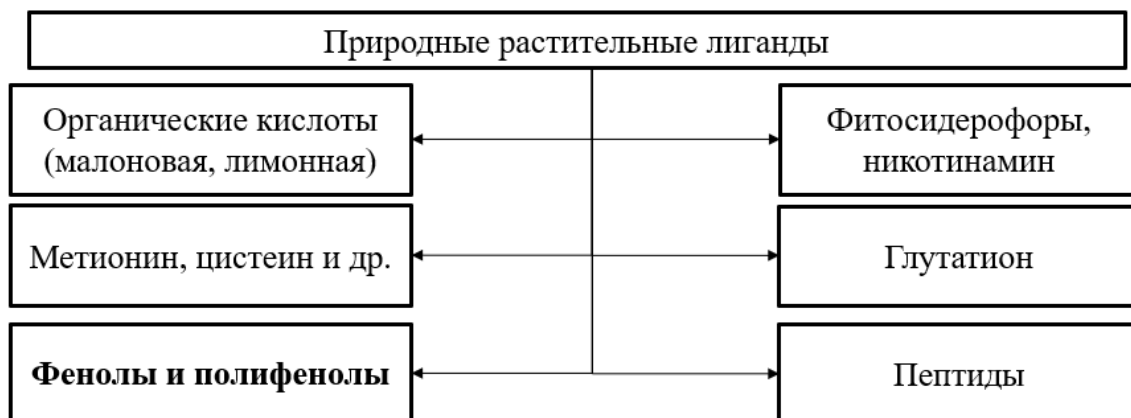


Рисунок 1 – Растительные лиганды, связывающие катионы металлов

Исходя из вышесказанного, важно сделать акцент на растительные объекты, которые являются нативными источниками минеральных комплексов с БАВ.

## 1.2. Синтез и оценка структуры комплексов металлов с фенольными соединениями

### 1.2.1. Особенности синтеза комплексов

Получение комплексов металлов с фенольными соединениями представляет из себя нетривиальную задачу. Исходя из анализа литературных источников, включая три крупные обзорные статьи [22, 25, 50], можно сделать заключение о том, что подходы к синтезу металло-фенольных комплексов в разных статьях для одних и тех же объектов разнятся. Следовательно, важным остаётся вопрос по созданию унифицированного алгоритма получения комплексов с возможным трансфером методологии синтеза на разные группы лигандов и металлы.

Однако несмотря на различия имеющихся в литературе подходов, можно проследить общие закономерности. В первую очередь, необходимо оценить природу соли металла, лиганда и их растворимость в выбранном растворителе (метанол, вода, этанол, диметилсульфоксид, пиридин). Стоит отметить, что для повышения выхода продукта необходимо, чтобы оба компонента комплекса растворялись в одном и том же растворителе. Перед тем как приступить к синтезу важно определить оптимальное соотношение соли

металла и фенольного соединения с помощью одного из предложенных спектральных методов: метод множественных вариаций (метод Джебба), метод мольных соотношений, метод углового коэффициента (таблица 3).

Таблица 3 – Методы оценки стехиометрии в комплексах [51-53].

Метод	Пояснение
1	2
<p><b>Метод множественных вариаций</b> (Метод Джебба).</p> <p>Процесс комплексообразования:</p> $M + yL \rightleftharpoons ML_y$ $n_{(\text{общ.})} = n_{(\text{лиганд})} + n_{(\text{металл})}$ <p>Фракционный состав лиганда:</p> $(X)_{(\text{лиганд})} i = \frac{n_{(\text{лиганд})} i}{n_{(\text{общ})}}$ $(X)_{(\text{металл})} i = 1 - \frac{n_{(\text{лиганд})} i}{n_{(\text{общ})}}$ <p>Нахождение стехиометрического соотношения:</p> $y = \frac{X_{(\text{лиганд})}}{X_{(\text{металл})}} = \frac{X_{(\text{лиганд})}}{1 - X_{(\text{лиганд})}}$	<p>В данном методе готовят серию растворов, в которых сумма моль лиганда и металла остаётся постоянной, но меняется только отношение лиганда к общему числу моль.</p> <p>После снятия спектров абсорбции каждого раствора строят график зависимости оптической плотности при максимуме поглощения комплекса от фракционного состава лиганда в растворе. В ходе построения графика получают две линии: первая – лиганд находится в избытке, а вторая – в недостатке. Пересечение этих двух линий соответствует стехиометрическому соотношению компонентов (металла и лиганда). <b>Ограничения:</b></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Металл и лиганд должны образовывать только один вариант комплекса;</li> <li>2. Должен выполняться закон Бугера-Ламберта-Бера;</li> <li>3. Малая константа комплексообразования влияет на кривизну линий графика, что затрудняет построение аппроксимированных касательных;</li> <li>4. Необходимо контролировать pH растворов.</li> </ol>
<p><b>Метод мольных соотношений</b></p>	<p>В методе мольных соотношений число моль одного из компонентов (металла) остаётся постоянной, а другого компонента меняется. График оптической плотности строят относительно мольного соотношения металл-лиганд. В ходе построения графика получают две линии, на пересечении которых опускают перпендикуляр к оси абсцисс и определяют стехиометрическое соотношение компонентов.</p> <p><b>Преимущество</b> этого метода состоит в том, что можно оценить стехиометрию для комплексов, которые образуются ступенчато (если комплекс на каждой ступени имеет отличную величину оптической плотности).</p>
<p><b>Метод углового коэффициента</b></p> <p>Нахождение равновесной концентрации (первый набор растворов):</p> $[M_x L_y] = \frac{C_L}{y}$ <p>3. Бугера-Ламберта-Бера (1)</p> $A = \varepsilon b [M_x L_y] = \frac{\varepsilon b C_L}{y}$ <p>Нахождение углового коэффициента (2):</p> $s_L = \frac{\varepsilon b}{y}$ <p>Нахождение равновесной концентрации (второй набор растворов):</p>	<p>В данном методе готовят два набора растворов. Первый набор содержит постоянное количество металла и переменное количество лиганда, подобранное таким образом, что концентрация металла (<math>C_M</math>) была бы во много раз больше концентрации лиганда (<math>C_L</math>). Исходя из этого можно судить о том, что всё количество лиганда взаимодействовало с металлом. Тогда равновесная концентрация комплекса <math>[M_x L_y]</math> будет равна отношению концентрации лиганда к стехиометрическому коэффициенту лиганда. Подставив, равновесную концентрацию в уравнение Бугера-Ламберта-Бера, выражают угловой коэффициент. Вторым набором растворов готовят таким же образом, но уже фиксированная концентрация лиганда больше переменной концентрации металла.</p>

1	2
$[M_xL_y] = \frac{C_M}{x}$ $A = \varepsilon b[M_xL_y] = \frac{\varepsilon b C_M}{x}$ $s_M = \frac{\varepsilon b}{x}$ <p>Отношение угловых коэффициентов равно соотношению металла и лиганда в комплексе:</p> $\frac{s_M}{s_L} = \frac{y}{x}$	<p>Находят также равновесную концентрацию, подставляют в уравнения Бугера-Ламберта-Бера и определяют угловой коэффициент. Отношение угловых коэффициентов для металла и для лиганда, будет соответствовать их стехиометрическому соотношению в комплексе.</p>

Важно сделать акцент на том, что возможность протекания комплексообразования будет зависеть от константы устойчивости комплекса. Константы комплексообразования металло-фенольных комплексов можно вывести методами, представленными в таблице 4 [54, 55].

Таблица 4 – Методы определения констант комплексообразования

Метод	Основные уравнения	Пояснение
Метод Бьеррума	$K_f = \frac{[ML^+]}{[L][M^+]}$ $K_a = \frac{[HL^+]}{[L][H^+]}$ <p>где <math>K_f</math> и <math>K_a</math> – константы комплексообразования и диссоциации, соответственно; <math>[ML^+]</math>, <math>[L]</math>, <math>[M^+]</math> – равновесные концентрации комплекса, лиганда и металла, соответственно; <math>[HL^+]</math>, <math>[L]</math>, <math>[H^+]</math> – равновесные концентрации кислоты, лиганда и протонов, соответственно.</p>	<p>Метод основан на конкуренции между ионами металла и водорода за анион слабой кислоты. Возникающее при этом изменение рН раствора определяют с помощью стеклянного электрода. При известных константах протонизации лиганда <math>K_a</math> с помощью уравнений материального баланса и закона действующих масс рассчитывают константы устойчивости комплексов <math>K_f</math>.</p>
Метод Бенеш-Гильдебранда	$K_f = \frac{[ML^+]}{[L][M^+]}$ $A = \varepsilon C_{[ML^+]} b,$ <p>где <math>K_f</math> – константа комплексообразования; <math>[ML^+]</math>, <math>[L]</math>, <math>[M^+]</math> – равновесные концентрации комплекса, лиганда и металла, соответственно; <math>\varepsilon</math> – молярный коэффициент поглощения, <math>A</math> – оптическая плотность, <math>b</math> – толщина кюветы.</p>	<p>Теоретической основой этого метода является предположение о том, что в большинстве случаев только часть донора или акцептора входит в состав комплекса даже в присутствии большого избытка другого компонента. Коэффициенты поглощения для свободных доноров и акцепторов можно вычислить из оптической плотности растворов известной концентрации чистых компонентов. Следовательно, измеряя спектры поглощения реакции до и после образования продукта, можно определить константу комплексообразования.</p>

В приложении Б приведены данные по константам устойчивости и стехиометрическим соотношениям компонентов некоторых металло-

фенольных комплексов [21, 56-81]. Однако стабильность комплексов в виду малой растворимости некоторых лигандов в воде определялась в неводных растворителях, поэтому сравнивать константы комплексообразования, которые были рассчитаны потенциометрически, следует с учетом природы растворителя.

Важным этапом в синтезе металло-фенольных комплексов является подбор депротонирующего агента (пиридин, этоксид натрия, метоксид натрия, гидроксид натрия и др.). Его роль заключается в открытии сайтов связывания. То есть он способствует переводу неионизированной формы фенола в анионную, что упрощает процесс взаимодействия катиона металла с лигандом.

После определения соотношения компонентов в комплексе и количества депротонирующего агента приступают к оценке оптимальных условий синтеза (температура и время нагрева реакционной смеси), а затем подбирают методы фильтрации и сушки. Суммируя данные литературных источников, можно представить унифицированный подход синтеза выбранных нами комплексов в виде схемы (рисунок 2).



Рисунок 2 – Унифицированный алгоритм синтеза металло-фенольных комплексов по данным литературы

### 1.2.2 Методы оценки структуры металло-фенольных комплексов

Для оценки структурных характеристик металло-фенольных комплексов используют различные методы, среди которых самым информативным является рентгеноструктурный анализ (РСА). Но в виду того, что для комплексов не всегда удаётся получить подходящий по размеру кристалл, изучить его структуру удалось лишь для немногих молекул. Например, для соединений  $[\text{Cu}^{\text{I}}(\text{3HF})(\text{PPh}_3)_2]$ ,  $[\text{Cu}^{\text{II}}(\text{3HF})_2]$ ,  $[\text{Zn}(\text{MSA})(\text{H}_2\text{O})_2]_n$ ,  $\text{Na}_2[\text{Zn}(\text{MSA})_2(\text{H}_2\text{O})]$ ,  $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{3HF})_2\text{Cl}(\text{CH}_3\text{OH})]$ ,  $[\text{Fe}^{\text{III}}(4'\text{OMeFla})_3]$ , где 3HF = 3-гидроксифлавонол; MSA = морин-5-сульфоокислота; 4'OMeFla = 4'-метоксифлавонол, были подтверждены структура и геометрия [82-85]. Также с помощью метода РСА удалось доказать структуру для комплекса 3-гидроксифлавонона с  $\text{Ru}^{\text{II}}(\eta^6\text{-p-цимола})$ , обладающего цитотоксическим действием [86]. В виду того, что не для всех комплексов можно реализовать рентгеноструктурный анализ, то для оценки строения используют другие методы.

*Инфракрасная спектроскопия (ИК).* На ИК спектрах фенольных соединений имеются полосы поглощения с характерными значениями волновых чисел тех группировок, которые потенциально могут вовлекаться в процесс комплексообразования и подвергаться различным девиациям (таблица 5).

Таблица 5 – Характеристические частоты связей, участвующих в комплексообразовании [87].

Класс соединений	Группировка	Диапазон частот, $\text{cm}^{-1}$	Интенсивность
1	2	3	4
<b>Флавоноиды</b>	$\nu(\text{OH})$	3400-3250	Сильная
	$\nu(\text{C-O-C})$	1275-1200	Средняя
	$\nu(\text{C=O})_{\text{keto}}$	1690	Сильная
	$\nu(\text{CC})_{\text{arom}}$	1525-1475	Переменная
	$\nu(\text{Ar-OH})$	1230-1140 1410-1310	Сильная
<b>Фенольные кислоты</b>	$\nu(\text{C=O})_{\text{соон}}$	1680-1650	Сильная
	$\nu(\text{CC})_{\text{arom}}$	1525-1475	Переменная

1	2	3	4
	$\nu(\text{Ar-OH})$	1230-1140 1410-1310	Сильная
	$\nu(-\text{CH}=\text{CHCOOR})$	1655-1635	Средняя
	$\nu(\text{C}=\text{C})$	3100-3010	Средняя
	$\nu(\text{OH})$	3400-3250	Сильная
<b>Таннины</b>	$\nu(\text{C}=\text{O})_{\text{keto}}$	1690	Сильная
	$\nu(\text{CC})_{\text{arom}}$	1525-1475	Переменная
	$\nu(\text{Ar-OH})$	1230-1140 1410-1310	Сильная
	$\nu(6\text{-memb.lact.})$	1720, 1760	Средняя
<b>Стильбены</b>	$\nu(\text{C}=\text{C})$	3100-3010	Средняя
	$\nu(\text{OH})$	3400-3250	Сильная
	$\nu(\text{CC})_{\text{arom}}$	1525-1475	Переменная
	$\nu(\text{Ar-OH})$	1230-1140 1410-1310	Сильная
<b>Лигнаны</b>	$\nu(\text{OH})$	3400-3250	Сильная
	$\nu(\text{C}=\text{O})_{\text{keto}}$	1690	Сильная
	$\nu(\text{Ar-OH})$	1230-1140 1410-1310	Сильная
	$\nu(5\text{-memb.lact.})$	1770	Средняя
	$\nu(\text{CC})_{\text{arom}}$	1525-1475	Переменная

**Пояснение:**  $\nu(\text{OH})$  – валентные колебания связи O-H;  $\nu(\text{C-O-C})$  – валентные колебания связи C-O-C пиранового ядра;  $\nu(\text{C}=\text{O})_{\text{keto}}$  – валентные колебания кетогруппы;  $\nu(\text{CC})_{\text{arom}}$  – валентные колебания углеродных связей ароматического ядра;  $\nu(\text{Ar-OH})$  – валентные колебания фенольных гидроксидов;  $\nu(\text{C}=\text{O})_{\text{соон}}$  – валентные колебания непредельных C=C-COOH кислот;  $\nu(-\text{CH}=\text{CHCOOR})$  – валентные колебания, характерные для сопряжённой системы хлорогеновой кислоты;  $\nu(6\text{-memb.lact.})$  – валентные колебания шестичленного лактонного кольца;  $\nu(5\text{-memb.lact.})$  – валентные колебания пятичленного лактонного ядра.

Исчезновение или девиация характерных полос поглощения  $\nu(\text{OH})$  и  $\nu(\text{Ar-OH})$  может свидетельствовать о связывании металла с гидроксилами молекулы фенольного соединения. Однако с помощью ИК-спектроскопии невозможно точно сказать по какой из OH-групп протекает комплексообразование. Если условия синтеза подобраны неверно, то возможно раскрытие пиранового, лактонного колец и на спектрах будут отсутствовать полосы  $\nu(\text{C-O-C})$ ,  $\nu(5\text{-memb.lact.})$ ,  $\nu(6\text{-memb.lact.})$ .

Комплексообразование, затрагивающее карбонильную группу, будет сопровождаться сдвигом или исчезновением полосы  $\nu(\text{C}=\text{O})$ , а появление новой полосы  $\nu(\text{Me}-\text{O})$  в длинноволновой области спектра от 40 до 700  $\text{cm}^{-1}$  будет доказывать наличие связи металла с гидроксигруппами. Девиация полос  $\nu(\text{CC})_{\text{arom}}$ ,  $\nu(\text{C}=\text{C})$  может свидетельствовать о перераспределении электронной плотности и образовании более устойчивой хиноидной структуры под действием катиона металла.

*Спектроскопия в видимой и ультрафиолетовой (УФ) областях.* Фенольные соединения растительного происхождения способны поглощать в УФ-свете за счёт наличия в своей структуре бензольных колец и систем сопряжения двойных связей. УФ-спектр каждой группы фенольных соединений имеет свои собственные характеристики, которые определяются хромофорами и ауксохромами (ОН-группы), входящих в состав молекулы. Например, флавоноиды имеют коричный и бензоильный фрагменты, которые поглощают в определённом диапазоне длин волн (рисунок 3). На спектре это находит отражение в виде двух характерных максимумов [88].

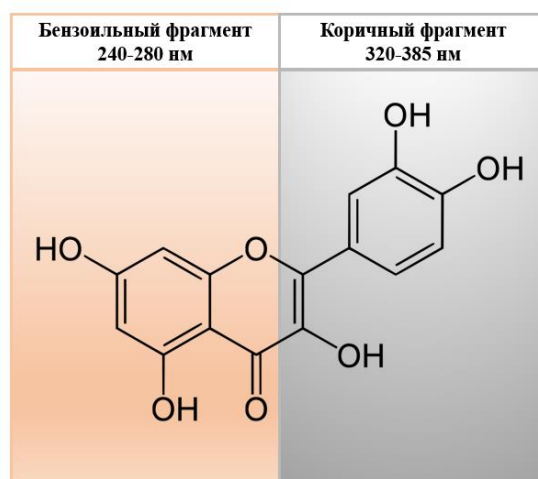


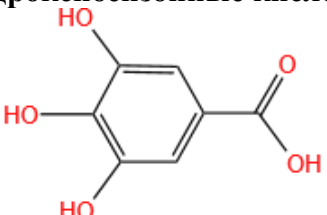
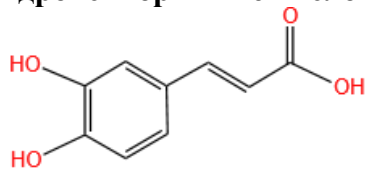
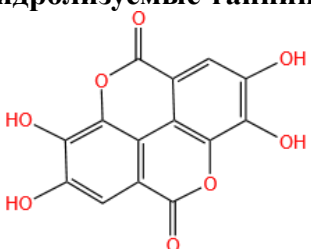
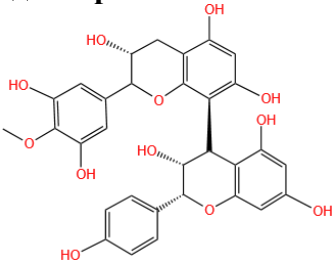
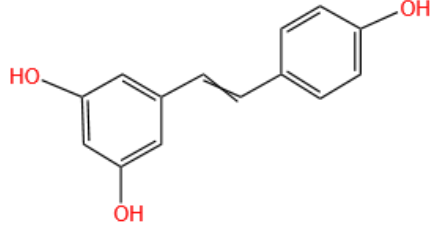
Рисунок 3 – Характерные диапазоны длин волн для максимумов бензоильного и коричневого фрагментов молекулы кверцетина

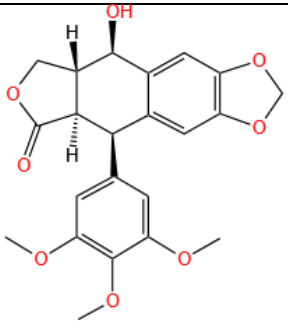
Системы сопряжения и характеристические диапазоны максимумов поглощения других классов фенольных соединений представлены в таблице 6. Стоит отметить, что для фенолов характерно как  $\pi, \pi$  – сопряжение, так и  $n, \pi$



– сопряжение. Однако, с точки зрения оценки структуры, в данном случае наибольшую значимость имеет  $\pi, \pi$  – сопряжение.

Таблица 6 – Характеристические диапазоны максимумов поглощения классов фенольных соединений в УФ-области [89].

Класс	Представители	Система сопряжения	Диапазон максимумов поглощения, нм
1	2	3	4
Фенольные кислоты	<p><b>Гидроксibenзойные кислоты</b></p>  <p>Галловая кислота</p>	$Ph-C=O$ $\pi, \pi$ – сопряжение бензольного ядра и двойной связи карбоксильной группы.	250-280
	<p><b>Гидроксикоричные кислоты</b></p>  <p>Кофейная кислота</p>	$Ph-CH=CH-C=O$ $\pi, \pi$ – сопряжение бензольного ядра, двойной связи и карбоксильной группы.	330-360
Таннины	<p><b>Гидролизуемые таннины</b></p>  <p>Эллаговая кислота</p>	$\pi, \pi$ – сопряжение бензольных ядер и двойной связи карбонильной группы лактонного кольца	350-380
	<p><b>Конденсированные таннины</b></p>  <p>Проантоцианидин</p>	$\pi$ -система сопряжения бензольного ядра	260-280
Стильбены	 <p>Ресвератрол</p>	$Ph-CH=CH-Ph$ $\pi, \pi$ – сопряжение бензольных ядер и двойных связей	280-320

1	2	3	4
Лигнаны	 <p data-bbox="518 616 774 658">Подофиллотоксин</p>	$\pi$ -система сопряжения бензольного ядра	200-240

Комплексы металлов с фенольными соединениями могут иметь характерные спектральные отличия от нативных молекул, которые выражаются в наличии батохромных или гипсохромных сдвигов. В ходе связывания металла с фенольными гидроксилами происходит перераспределение электронной плотности и, как следствие, смещение максимумов поглощения в длинноволновую или коротковолновую области. Соответственно данным методом можно доказать факт взаимодействия катиона металла с фенольными гидроксилами, связанными с хромофорами. Однако метод малоинформативен для соединений, имеющих только один характерный максимум поглощения. В связи с этим нельзя достоверно сказать, какие сайты связывания задействованы в комплексообразовании. Но, стоит отметить, что для флавоноидов, смещение одного или двух максимумов абсорбции может свидетельствовать о взаимодействии металла с гидроксилами коричневого и/или бензоильного фрагментов.

*Спектроскопия ядерного магнитного резонанса (ЯМР).* На  $^1\text{H}$  ЯМР-спектрах фенольные соединения имеют характерную область (от 8 до 12 ppm), в которой находятся сигналы протонов фенольных гидроксильных групп. В более слабом поле (от 12 до 13 ppm) также могут располагаться пики протонов карбоксильной группы. Исходя из этого, при связывании лиганда с катионом металла на спектре можно обнаружить смещение или исчезновение пиков протонов, задействованных в комплексообразовании. Девиациям также могут подвергнуться протоны ароматического ядра в области от 6,5 до 8 ppm в связи

с перераспределением электронной плотности. Если условия синтеза подобраны неверно, то возможно разрушение пиранового или лактонного колец, что приводит к появлению дополнительных сигналов на протонном спектре. Для оценки сигналов протонов фенольных гидроксильных и карбоксильной группы необходимо использовать апротонные растворители (дейтерированные диметилсульфоксид, диоксан, диметилформамид и др.) [22, 25].

*Масс-спектрометрия.* С помощью метода масс-спектрометрии можно дополнительно оценить структурные характеристики комплексов металлов с фенольными соединениями путём оценки сигналов  $m/z$  базовых пиков и пика молекулярного иона (при его наличии). Комплексообразование также подтверждается наличием пиков с близким значением  $m/z$ , соответствующие изотопному распределению металла-комплексообразователя. По масс-спектрам комплексов подтверждают связь металла с лигандом, предполагают образование димерных форм, координационных связей с молекулами растворителей, прогнозируют состав внешней сферы комплексов и формирование аддуктов.

В качестве примера использования масс-спектрометрии можно привести исследование австралийских учёных [90], в котором проводилась оценка структуры комплекса никеля с рутином. Изначально авторы сняли спектр нативной молекулы лиганда и отметили характерный сигнал  $[\text{M}_{\text{рутин}} - \text{H}]^+$  611,33  $m/z$ . На масс-спектре комплекса обнаружили интенсивный сигнал димерной формы  $[\text{Ni}_{(\text{рутин})_2} - \text{H}]^+$  1277,72  $m/z$ , который подтверждает строение анализируемого соединения.

*Рентгенофлуоресцентный анализ (РФА).* Методом РФА можно получить информацию о химическом составе пробы. Он основан на регистрации и последующем анализе спектра, который был получен путём воздействия на исследуемый образец рентгеновским излучением. При облучении образца возникает возбуждение и характеристическое флуоресцентное излучение

атомов, которое появляется вследствие электронных переходов между внутренними электронными уровнями атома. Влияние химической связи на эти уровни мало [91], поэтому атомизация пробы не требуется, в отличие от методов оптической спектроскопии, в которых аналитический сигнал формируется вследствие переходов между валентными уровнями и существенно отличается для связанных и свободных атомов [91, 92]. Поэтому РФА позволяет проводить анализ без разрушения пробы, что повышает экспрессность проводимого испытания. Число внутренних электронных уровней и разрешённых переходов между ними невелико [93], что обуславливает небольшое число линий в спектре. Это существенно облегчает интерпретацию: для надёжной идентификации металла достаточно обнаружения двух характеристических линий [92], а проблема спектральных наложений стоит не столь остро, как в атомно-эмиссионной спектроскопии. Связь положения линии характеристического излучения в спектре и атомного номера элемента описывается законом Мозли:

$$\sqrt{\frac{k}{R}} = (Z - \sigma) \sqrt{\frac{1}{n_0^2} - \frac{1}{n_1^2}} \quad (1),$$

где  $k$  – волновое число рентгеновской линии;  $R$  – постоянная Ридберга;  $Z$  – атомный номер элемента;  $\sigma$  – постоянная экранирования;  $n_0$  и  $n_1$  – главные квантовые числа начального и конечного состояний.

С помощью способа фундаментальных параметров можно полуколичественно определить содержание металлов в образцах комплексов без стандарта. В его основе лежит преобразование измеренной интенсивности флуоресцентного излучения определяемого элемента в его массовую долю с использованием теоретического выражения для интенсивности рентгеновской флуоресценции по уравнению Шермана [94]:

$$I_i(\lambda_i) = g_i C_i \frac{\mu_i(\lambda_k) I_0(\lambda_k) \Delta \lambda_k}{\mu'_s(\lambda_k) + \mu''_s(\lambda_s)} [1 + \sum_j \delta_{ij} C_j] \quad (2),$$

где  $I_i(\lambda_i)$  – интенсивность на длине волны  $\lambda_i$ ,  $g_i$  – константа пропорциональности, которая зависит от используемой аппаратуры,  $C_i$  –

содержание  $i$ -го элемента,  $\mu'_s(\lambda_k)$  и  $\mu''_s(\lambda_s)$  – массовые коэффициенты поглощения,  $I_0(\lambda_k)\Delta\lambda_k$  – интенсивность первичного излучения на длине волны  $\lambda_k$ ,  $\delta_{ij}$  – вклад усиления для каждого матричного элемента  $j$  в содержание  $C_j$ ,  $\mu_i(\lambda_k)$  – массовый коэффициент ослабления излучения с длиной волны  $\lambda_k$  элементом  $i$  (коэффициент абсорбции).

Данные, полученные описанными выше методами, используются для доказательства структуры металло-фенольных комплексов. Однако для получения более полной информации об их строении прибегают также к *термогравиметрии, элементному анализу, компьютерному моделированию*. [22, 25].

### **1.3. Применение металло-фенольных комплексов**

#### **1.3.1. Биологическая активность комплексов**

Интерес учёных к металло-фенольным комплексам, как показывает анализ литературы, сфокусирован на соединениях, где в качестве лигандов выступают флавоноиды.

Как уже было отмечено ранее, самая значимая биологическая активность флавоноидов – антиоксидантная. Способность флавоноидов к «гашению» свободных радикалов связана с диссоциацией ОН-групп кольца В (рисунок 4) и формированием устойчивой хиноидной структуры, которая объясняется наличием системы сопряжения двойных связей в бензольном кольце и пириновом фрагменте. В ходе перераспределения электронной плотности повышается стабильность образовавшегося радикала. Другие виды активностей опосредованы через антиоксидантную. Например, снижение оксидативного стресса уменьшает резистентность тканей к инсулину, что в свою очередь обуславливает противодиабетический эффект [95, 96]. Противоопухолевое действие флавоноидов, как показывает анализ литературы, обусловлено индуцированием апоптоза через каспазный путь [97].

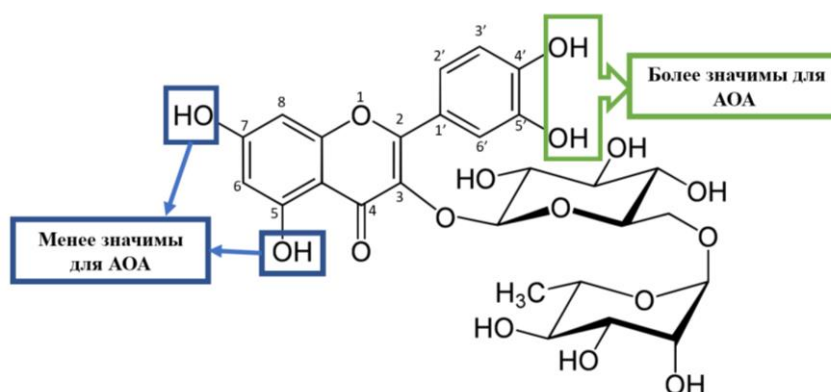


Рисунок 4 – Функциональные группы, участвующие в реализации антиоксидантной активности на примере молекулы рутина

Наибольший интерес с точки зрения комплексообразователей имеют макро- и микроэлементы (цинк, марганец, кобальт, железо и др.), а также ряд металлов, обладающих цитотоксическим (рутений, серебро, золото, платина, молибден, иридий) и противодиабетическим (ванадий) действием [98, 99].

Синергизм ряда металлов и флавоноидов в одной молекуле может приводить к появлению новых фармакологических эффектов, а также к усилению уже имеющихся. Например, антиоксидантная активность (АОА) может возрастать у димерных форм металл-флавоноидных комплексов, в связи с увеличением количества эссенциальных для антиоксидантной активности группировок (рисунок 4). Также наличие в молекуле катиона металла повышает стабильность хиноидной структуры. Сочетанное действие двух компонентов комплекса (металла и флавоноида) приводит к увеличению АОА, что благоприятно сказывается на течении ряда социально-значимых заболеваний, например, сахарного диабета 2-го типа.

Тезис о том, что металло-фенольные комплексы обладают повышенной АОА, подтверждается экспериментальными данными. Например, методами DPPH (1,1-дифенил-2-пикрилгидразил) и ABTS<sup>+</sup> (диаммониевая соль 2,2'-азино-бис[3-этилбензотиазолин-6-сульфоукислоты]) было выяснено, что комплексы кверцетина с цинком, никелем, лантаном, гадолинием, европием показывают рост антиоксидантной активности в сравнении с нативным флавоноидом при концентрации 120 мкмоль. Наивысшую активность

продемонстрировал комплекс с гадолинием – 97 %, что почти в два раза больше, чем у кверцетина (42 %) [100]. Соединения ванадия с хризинном, морином, гесперидином также демонстрируют рост активности [7, 71, 84]. Однако у комплекса ванадия с лютеолином АОА снижается за счёт связывания металла с эссенциальными для антиоксидантной активности группировками ( $IC_{50}(\text{лютеолин}) = 384 \text{ мкмоль}$ ,  $IC_{50}(V\text{-лютеолин}) = 417 \text{ мкмоль}$ ) [7].

Анализ литературных источников показывает, что, металл-флавоноидные комплексы кверцетина, лютеолина, хризина, силибинина в исследованиях 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 (Hsp62) в сравнении с цисплатином [25, 26-28]. Пути реализации противоопухолевых эффектов комплексов металлов с флавоноидами, описанные в различных литературных источниках, интегрированы в авторской схеме, представленной на рисунке 5.

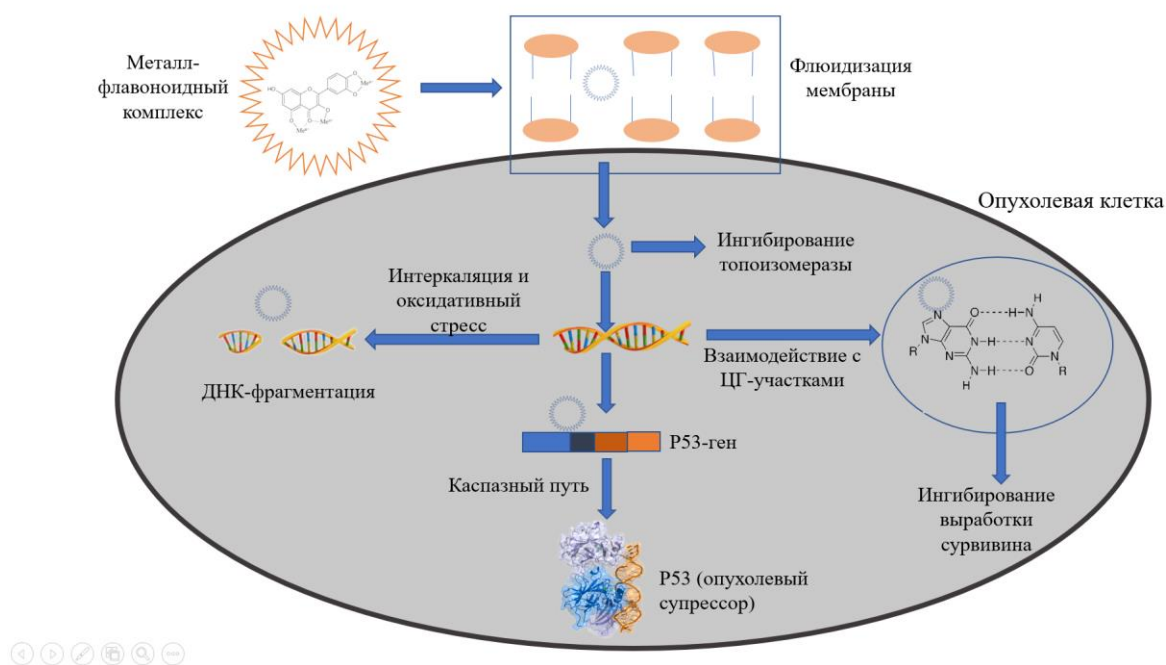


Рисунок 5 – Пути реализации противоопухолевых эффектов металл-флавоноидных комплексов

Один из механизмов реализации противоопухолевого эффекта – это выработка факторов, индуцирующих апоптоз раковых клеток по каспазному пути, который способствует выработке протеина p53. Данный белок является опухолевым супрессором, ингибирующим клеточную пролиферацию.

Также комплексы способны связываться с ДНК опухолевых клеток и вызывать её гибель посредством оксидативного стресса. Эффективное связывание молекулы комплекса с ДНК возникает за счёт сил электростатического притяжения. Сначала комплекс взаимодействует с фосфатной группой нуклеотида, а затем ковалентно связывается с нуклеиновым основанием. Аутоокисление флавоноида вблизи молекулы ДНК провоцирует выработку активных форм кислорода и свободных радикалов, что вызывает её фрагментацию и гибель.

Методами флуоресцентной эмиссии и молекулярного моделирования удалось доказать, что комплекс никеля с кверцетином взаимодействует с участками ДНК, богатыми гуанином и цитозином. Взаимодействие с данными участками введёт к снижению активности сурвивина (ингибитор апоптоза) через вмешательство в ЦГ-участок ДНК – промотора выработки белка сурвивина [101].

Некоторые уникальные биметаллические гетероатомные комплексы металлов с флавоноидами (кверцетин- $\text{Cu}^{\text{II}}-\text{Sn}_2^{\text{IV}}$  и кверцетин- $\text{Zn}^{\text{II}}-\text{Sn}_2^{\text{IV}}$ ) являются ингибиторами топоизомеразы. Их цитотоксичность связана с тем, что они тормозят процесс раскручивания ДНК во время репликации (релаксация ДНК), провоцируя смерть клетки [102].

Информации по биологической активности комплексов металлов с другими классами фенольных соединений на сегодняшний день недостаточно. Однако стоит отметить, что для комплексов ресвератрола с алюминием (III) и цинком (II) проводился расчёт полумаксимальных эффективных концентраций ( $\text{EC}_{50}$ ) методом DPPH. Данные соединения также демонстрируют рост АОА в сравнении с нативным лигандом (Zn-ресвератрол – 0,17%, Al-ресвератрол –



0,05%, ресвератрол – 0,25%) [79]. Хлорогенаты меди (II) и железа (III) показывают близкие с хлорогеновой кислотой результаты определения АОА методом DPPH ( $IC_{50}$ (хлорогенат меди) – 11,03 мкмоль,  $IC_{50}$ (хлорогенат железа) – 14,31 мкмоль,  $IC_{50}$ (хлорогеновая кислота) – 9,87 мкмоль) [78]. Комплексы хлорогеновой кислоты с медью (II), никелем (II), марганцем (II) исследовались на предмет активности, связанной с расщеплением молекул ДНК (pBR322 DNA) и антимикробной активности. Хлорогенаты никеля и марганца показали более выраженный антибактериальный эффект нежели лиганд-предшественник [78].

### **1.3.2. Альтернативные варианты применения металло-фенольных комплексов**

Комплексы металлов с фенольными соединениями могут выступать не только как перспективные лекарственные кандидаты, но и как красители в текстильной промышленности.

Например, если просто наносить на шерсть растительные экстракты, содержащие флавоноиды, то они очень легко вымываются. Было предложено использовать в качестве протравы катионы металлов ( $Al^{3+}$ ,  $Fe^{3+}$ ,  $Cu^{2+}$ ), которые образуют прочные связи с карбонильными, сульфгидрильными, аминогруппами кератина. При обработке волокна красителем, содержащим флавоноиды, протекает процесс комплексообразования с ионом металла, что приводит к интенсификации окраски и повышению водостойких свойств (рисунок 6) [103].

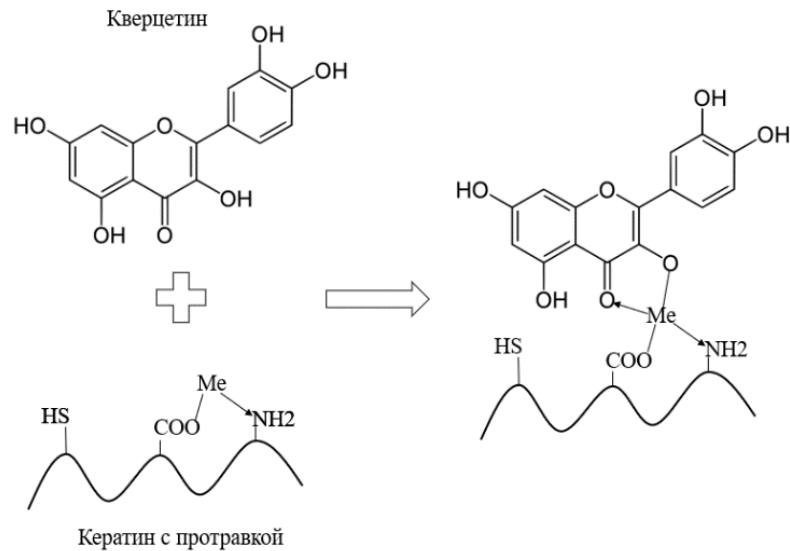


Рисунок 6 – Схема взаимодействия кверцетина с протравленным кератином

Опосредованно комплексы металлов с фенольными соединениями используются в контроле качества лекарственного растительного сырья (ЛРС). Определение суммы содержания, например, флавоноидов проводят спектрофотометрически после добавления к извлечению соли алюминия. В результате комплексообразования на спектре отмечается смещение в длинноволновую область максимума поглощения флавоноидов. Оценивают сумму БАВ по оптической плотности при максимуме батохромного сдвига [29, 104].

Интересным направлением является оценка содержания примесей в лекарственных субстанциях и пищевых продуктах с помощью фенольных соединений. Фенольные соединения могут образовывать флюоресцирующие комплексы с элементными примесями [67, 105, 106], которые имеют характерную длину волны возбуждения и эмиссии. Следовательно, используя селективный и чувствительный метод спектрофлуориметрии, можно качественно и количественно определять содержание примесей, что является очень важным аспектом в подтверждении безопасности и эффективности продукта.

## Выводы к главе 1

1. Фенольные соединения растительного происхождения обладают широким спектром биологических активностей и выступают в качестве потенциальных лигандов, вступающих в реакцию комплексообразования с катионами металлов. Комплексы металлов с фенольными соединениями в перспективе могут обладать новыми или более выраженными фармакологическими эффектами в сравнении с лигандом-предшественником.

2. Нативным источником минеральных комплексов с биологически активными веществами являются растения, которые накапливают как фенольные соединения, так и металлы. Считается, что в ходе водной экстракции из растительного сырья металлы могут связываться с фенолами, повышая тем самым их растворимость и биодоступность.

3. Синтез металло-фенольных комплексов представляет из себя нетривиальную задачу и носит неунифицированный характер. Следовательно, очень важно создать определённый алгоритм синтеза комплексов, который можно будет трансферировать на разные классы фенольных соединений и металлы. Также единый подход позволит снизить экономические издержки и увеличить выход продукта.

4. Для получения интересующих нас соединений необходимо рассчитать оптимальное соотношение компонентов и количество депротонирующего реактива, а также температуру и время нагрева реакционной смеси.

5. Оценку структуры комплексов проводят с помощью различных физико-химических методов, среди которых самым информативным является рентгеноструктурный анализ. Однако если его невозможно реализовать прибегают к спектроскопии в видимой и УФ областях, ИК-спектроскопии, ЯМР-спектроскопии, масс-спектрометрии, рентгенофлуоресцентному анализу, термогравиметрии, элементному анализу и компьютерному моделированию.

6. Комплексы металлов с фенольными соединениями (в частности металл-флавоноидные комплексы) имеют широкий спектр фармакологических

эффектов. Они в основном превосходят нативную молекулу фенольного соединения по антиоксидантной, противоопухолевой, антимикробной, противодиабетической активности.

7. Металло-фенольные комплексы можно опосредованно использовать для определения суммы БАВ в ЛРС, контроля содержания примесей металлов. Также они находят свой применения в качестве красителей в текстильной промышленности.

## ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### **2.1. Фитохимический скрининг лекарственного растительного сырья - потенциального источника минеральных комплексов**

Объектами исследования являлись побеги черники обыкновенной и стручки фасоли обыкновенной, имеющие доказанную эффективность в сопутствующей терапии сахарного диабета 2-го типа [107-109]. Данное 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 край (г. Барнаул) в 2020 г.

#### **2.1.1. Изучение компонентного состава фенольных соединений в лекарственном растительном сырье, которое обладает противодиабетической активностью**

Получение извлечений из лекарственного растительного сырья (ЛРС) проводили следующим образом: 0,5 г сырья экстрагировали 30 мл спирта 70 % при нагревании на водяной бане с обратным холодильником в течение 30 минут. Полученное извлечение фильтровали через бумажный фильтр. Водное извлечение получали путём настаивания 0,4 г сырья 60 мл воды очищенной (100 °C). После настаивания в течение 30 минут извлечение отфильтровывали через бумажный фильтр.

Качественную оценку содержания основных групп БАВ проводили с использованием метода высокоэффективной тонкослойной хроматографии (ВЭТСХ). Анализ проводился на приборе SAMAG с использованием пластин MERCK HPTLC silica gel 60 F154, 20x10 см. Нанесение образцов осуществлялось с помощью полуавтоматического аппликатора Linomat 5 (4 мкл). Элюирование пластин проводилось с применением автоматической камеры SAMAG TLC Visualiser 2. Установка параметров и обработка результатов проводилась в программе VisionCATS.

Идентификацию веществ проводили путём оценки хроматограмм в видимом и фильтрованном УФ-свете (при 254 нм и 366 нм) в сравнении со значениями факторов удерживания ( $R_f$ ) соответствующих стандартных образцов (СО) В качестве СО использовали спиртовые растворы флавоноидов (рутин, лютеолин, кверцетин, апигенин, гиперозид, мирицетин, цинарозид, кемпферол), фенилпропаноидов (в т.ч. гидроксикоричных кислот (ГГК)) (хлорогеновая, п-кумаровая, феруловая, вератровая, синаповая, кофейная, протокатеховая, коричная, розмариновая, сиреневая, ванилиновая кислоты) ЕР CRS (Sigma Aldrich) с концентрацией 0,1 мг/мл и водные растворы органических кислот (яблочная, щавелевая, лимонная, янтарная, аскорбиновая) (вторичные СО) с концентрацией 0,1 мг/мл.

Растворители для приготовления хроматографических систем использовали квалификации «ч.д.а.» или «х.ч.». Для хроматографирования использовали следующие системы растворителей: №1 - толуол – этилацетат – муравьиная кислота – вода (10:20:5:2); №2 – этилацетат – уксусная кислота – муравьиная кислота – вода (100:11:11:25). Хроматографирование фенольных соединений осуществлялось в системе №1, а органических кислот – в системе №2. Для детектирования органических кислот был использован 0,1% раствор бромкрезолового зелёного.

### **2.1.2. Количественное определение потенциальных лигандов в лекарственном растительном сырье**

Количественное определение **суммы флавоноидов** в пересчёте на рутин в сырье черники обыкновенной и фасоли обыкновенной проводили спектральным методом на приборе СФ-2000 (Россия). Измеряли оптическую плотность раствора Б, полученного по методике, представленной в таблице 7 при аналитической длине волны 420 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм. В качестве раствора сравнения использовали 2 мл раствора А, помещенного в мерную колбу на 25 мл и доведенного до метки 95 % этиловым спиртом [110].

Таблица 7 – Методика получения извлечений из сырья черники и фасоли для определения суммы флавоноидов

Приготовление раствора А	Приготовление раствора Б
Около 1 г измельченного сырья (точная навеска) помещали в колбу со шлифом на 100 мл и добавляли 50 мл 70 % этилового спирта. Нагревали в течение 30 минут на кипящей водяной бане с обратным холодильником. Извлечение фильтровали в мерную колбу на 50 мл, охлаждали в течение 30 минут и доводили до метки 70 % этиловым спиртом.	2 мл раствора А помещали в мерную колбу на 25 мл, прибавляли 2 мл 3 % спиртового раствора алюминия хлорида и объем доводили до метки 95 % этиловым спиртом

Параллельно измеряли оптическую плотность СО рутина (раствор Б рутина), в качестве раствора сравнения использовали раствор, состоящий из 1 мл раствора А стандартного образца рутина, доведенного в мерной колбе на 25 мл до метки 95 % этиловым спиртом (таблица 8).

Таблица 8 – Методика получения раствора СО рутина

Приготовление раствора А рутина	Приготовление раствора Б рутина
Около 0,025 г (точная навеска) СО рутина (Sigma Aldrich, США) помещали в мерную колбу на 50 мл, прибавляли 30 мл 70 % этилового спирта и нагревали на водяной бане до полного растворения. После охлаждения объем содержимого колбы доводили до метки 70 % этиловым спиртом.	1 мл раствора А рутина переносили в мерную колбу на 25 мл, прибавляли 1 мл 3 % спиртового раствора алюминия хлорида и объем доводили до метки 95% этиловым спиртом.

Рассчитывали содержание суммы флавоноидов (X, %) в пересчете на рутин по формуле:

$$x = \frac{A * m_0 * 50 * 25 * 1 * P * 100 * 100}{A_0 * m * 2 * 50 * 25 * 100 * (100 - W)} \quad (3)$$

где А – оптическая плотность испытуемого раствора; А<sub>0</sub> – оптическая плотность раствора СО рутина; m<sub>0</sub> – масса СО рутина, г; m – масса сырья, г; W – влажность сырья, %. P – содержание рутина в СО, %.

Количественное определение суммы гидроксикоричных кислот, содержащихся в побегах черники обыкновенной и створках фасоли обыкновенной, проводили методом УФ-спектрофотометрии по методике, приведенной в ГФ РФ XIV ОФС 2.5.0019 [29], в пересчете на хлорогеновую кислоту.

Для проведения анализа использовали спектрофотометр СФ-2000 (Россия). Измеряли оптическую плотность раствора Б (таблица 9) при длине волны 330 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм. В качестве раствора сравнения использовали 96 % этиловый спирт.

Таблица 9 – Методика получения извлечений из ЛРС для определения суммы гидроксикоричных кислот

Приготовление раствора А	Приготовление раствора Б
Около 0,5 г измельченного сырья (точная навеска) помещали в круглодонную колбу на 250 мл, прибавляли 50 мл 70 % этилового спирта и нагревали на кипящей водяной бане с обратным холодильником в течение 30 мин. Содержимое охлаждали и фильтровали в мерную колбу на 100 мл. Экстрагирование повторяли. Извлечения объединяли и объем доводили до метки 70 % этиловым спиртом.	2 мл раствора А помещали в мерную колбу на 25 мл, и объем доводили до метки 96 % этиловым спиртом.

Сумму гидроксикоричных кислот (X, %) в пересчете на хлорогеновую рассчитывали по формуле:

$$x = \frac{A * 100 * 25 * 100}{A_{1\text{см}}^{1\%} * a * 2 * (100 - W)} \quad (4)$$

где А – оптическая плотность испытуемого раствора;  $A_{1\text{см}}^{1\%}$  – удельный показатель поглощения хлорогеновой кислоты при длине волны 330 нм, равный 507; а – масса сырья, г; W – влажность сырья, %.



Количественное **содержание органических кислот** в ЛРС проводили методом кислотно-основного титрования по методике, описанной в ГФ РФ XIV ОФС 2.5.0093.18 [29].

Около 5 г измельченного сырья (точная навеска) помещали в колбу на 200 мл, прибавляли 200 мл воды очищенной и нагревали в течение 2 часов на кипящей водяной бане. Извлечение охлаждали, фильтровали в мерную колбу вместимостью 250 мл, и объем доводили до метки водой очищенной. 1 мл полученного раствора переносили в коническую колбу на 50 мл, прибавляли 20 мл воды, 1 мл 1 % спиртового раствора фенолфталеина и 2 мл 0,1 % спиртового раствора метиленового синего. Титровали 0,1 М раствором натрия гидроксида до лилово-синего окрашивания.

Содержание органических кислот (X, %) в пересчете на яблочную рассчитывали по формуле:

$$x = \frac{V * 0.0067 * 250 * 100 * 100}{a * 1 * (100 - W)} \quad (5)$$

где V – объем 0,1 М натрия гидроксида, пошедшего на титрование, мл;

0,0067 – количество яблочной кислоты, соответствующее 1 мл 0,1 М раствора натрия гидроксида; a – навеска сырья, г; W – влажность сырья, %.

### **2.1.3. Установление элементного профиля лекарственного растительного сырья, обладающего противодиабетической активностью**

Элементный анализ проводили с помощью атомно – эмиссионной спектрометрии (АЭС) с индуктивно связанной плазмой 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 [29].

*Пробоподготовка:* Навеску образца массой 0,4 г (точная навеска) для минерализации помещали в реактор, добавляли 5 мл 65% раствора азотной кислоты (Honeywell Fluka, German) и 3 мл 30 % перекиси водорода (ООО «НПФ Химмедсервис», Россия), осторожно перемешивали и оставляли на 10 минут для удаления паров. Реактор помещали в микроволновую систему BERGHOF SpeedWave Entry Two и устанавливали температурный режим,

необходимый для минерализации объектов растительного происхождения (190 °С). После охлаждения минерализат переносили в полимерные мерные колбы объемом 50 мл и доводили до метки деионизированной водой. В полученном растворе проводили количественное определение макро- и микроэлементов.

В качестве стандартного образца применяли Multi-Element Calibration Standard 3 (Perkin Elmer, США) с установленным содержанием элементов (Ag, Al, As, Ba, Be, Bi, Ca, Cd, Co, Cr, Cs, Cu, Fe, Ga, Hg, In, K, Li, Mg, Mn, Na, Ni, Pb, Rb, Se, Sr, Tl, Zn, U, V) – 10 мкг/мл. Последовательно проводили анализ растворителя, стандартного раствора (по которому строили градуировочные графики) и испытуемого раствора (в 6 повторностях по 2 параллельных определения для каждого объекта).

*Условия проведения анализа* устанавливали по рекомендациям ПО спектрометра и предварительно верифицировали по отдельным валидационным критериям.

Настройка прибора: скорость потока плазмообразующего газа – 10 л/мин, скорость дополнительного потока – 0,2 л/мин, скорость потока газа для распыления пробы – 0,7 л/мин; мощность плазмы – 1300 Вт, положение обзора эмиссии – аксиальное; скорость подачи образца (перистальтического насоса) – 1,5 мл/мин, для промывки ускоренная подача растворителя 2,5 мл/мин, время задержки – 25 сек, время интегрирования – 1-2 сек, число повторов интегрирования (реплик) – 3.

Выбор аналитических волн для конкретного элемента из рекомендованных ПО оборудования осуществлялся по минимальному значению чувствительности и максимальной интенсивности. Оценку сходимости полученных результатов проводили по RSD (критерий приемлемости – 2%, для микроконцентраций – до 30%). Содержание элементов (X, мг/кг) в образце рассчитывали по формуле:

$$X, \frac{\text{мг}}{\text{кг}} = \frac{C_x * V_1 * 1000 * 1000}{m * 1000} \quad (6)$$

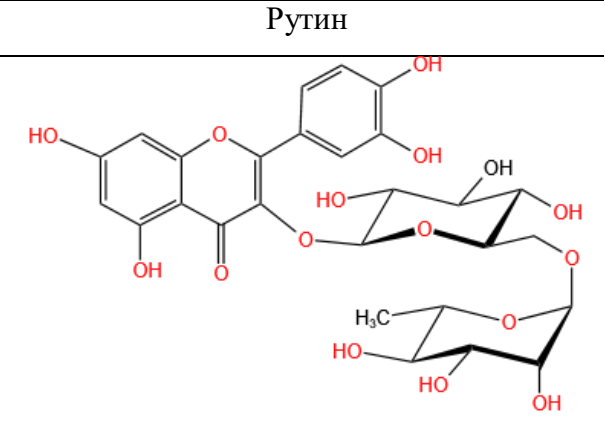
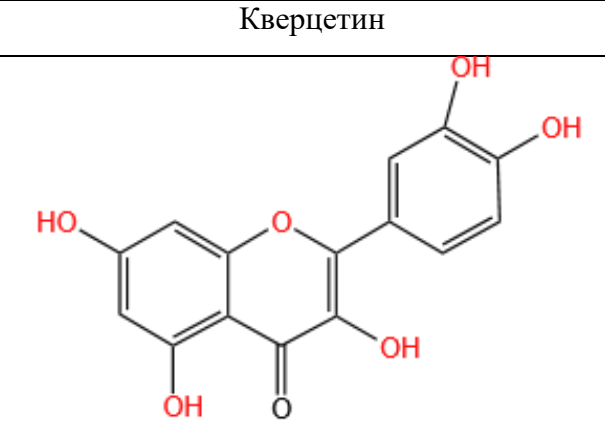
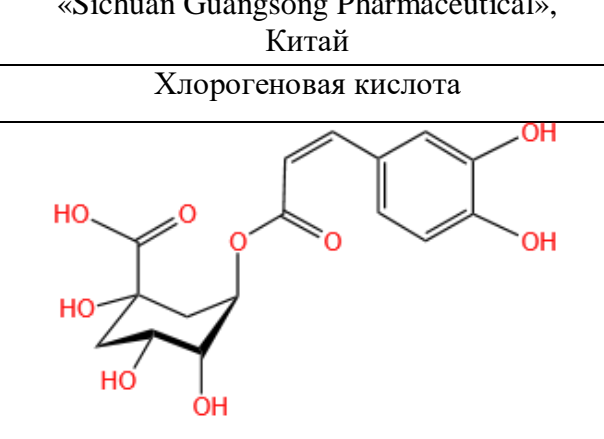
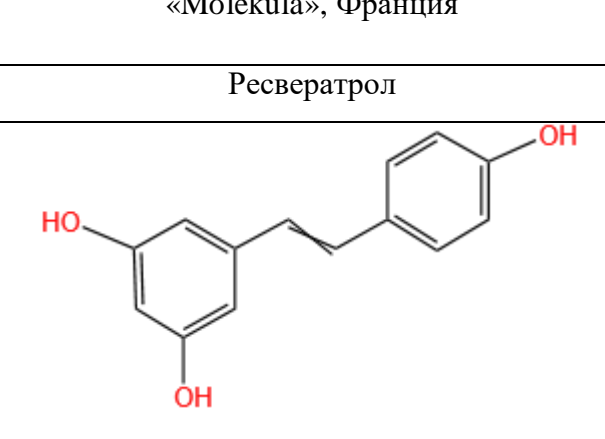
где  $C_x$  – концентрация элемента по градуировочной кривой, мг/л;  $V_1$  – объём раствора, мл;  $m$  – масса навески, мг;  $1000 \times 1000$  – перевод мг в кг.

## 2.2. Синтез и оценка структуры металло-фенольных комплексов

### 2.2.1. Определение оптимальных соотношений компонентов в комплексах и констант устойчивости

В качестве лигандов были использованы следующие фенольные соединения, представленные в таблице 10.

Таблица 10 – Фенольные соединения - объекты исследования

Рутин	Кверцетин
	
«Sichuan Guangsong Pharmaceutical», Китай	«Molekula», Франция
Хлорогеновая кислота	Ресвератрол
	
«Carl Roth», Швейцария	«Evolva Inc», США

В ходе выполнения работы также были использованы субстанции и растворители: натрия гидроксид (АО «Каустик», Россия), цинка ацетат двухводный (ООО «Донецк-Реактив», Украина), марганца ацетат (Alfa Aesar,

США), кобальта ацетат (АО «Реахим, Россия), метанол (АО «Вектон», Россия), метоксид натрия 25 % раствор в метаноле (Sigma Aldrich, США), d-ДМСО (Sigma Aldrich, США), дейтерированная вода (D<sub>2</sub>O) (Sigma Aldrich, США)

Оценка стехиометрии компонентов в комплексах проводилась с помощью метода множественных вариаций (*метод Джобса*). В ходе анализа готовили серию этанольных (70 %) растворов с разным числом моль компонентов, но суммарно число моль соли и фенольного соединения в каждом растворе было постоянно. Определяли оптическую плотность растворов на приборе UV 1800 (Shimadzu, Япония), строили график зависимости оптической плотности от отношения числа моль лиганда к общему числу моль. К графику проводили аппроксимированные касательные и на их пересечении определяли оптимальное соотношение компонентов в комплексах. рН каждого из растворов доводили до оптимального значения с помощью 0,01 М раствора натрия гидроксида (ОФС.1.3.0002 Титрованные растворы) на рН-метре (Mettler Toledo, Швейцария).

Расчёт констант комплексообразования проводился потенциометрическим *методом Бьеррума* [55]. Лиганд в количестве 0,05 г растворяли в мерной колбе на 100 мл в 50% спирте этиловом, переносили в плоскодонную колбу, добавляли 0,05 г соли-комплексообразователя и титровали по бюретке полученную смесь 0,01 М раствором натрия гидроксида. Значения рН фиксировали с помощью рН-метра. Для расчёта константы устойчивости пользовались уравнениями (1 и 2), представленными в пункте 1.2 (таблица 4). Предположим, что

$$C_H = [H^+] + [HL^+] \quad (7),$$

$$C_L = [L] + [ML^+] + [HL^+] \quad (8),$$

$$C_M = [M^+] + [ML^+] \quad (9),$$

где  $C_H$ ,  $C_M$ ,  $C_L$  – молярные концентрации кислоты, катиона металла и лиганда, соответственно. Подставляя (7), (8) и (9) в уравнение для расчёта

константы кислотности лиганда  $K_a$ , получаем следующее суммарное уравнение:

$$[ML^+] = C_L - C_H + [H^+] - \frac{K_a(C_H - [H^+])}{[H^+]} \quad (10),$$

$$[M^+] = C_M - [ML^+] \quad (11),$$

$$[L] = \frac{K_a(C_H - [H^+])}{[H^+]} \quad (12).$$

Зная  $C_H$ ,  $C_M$ ,  $C_L$ ,  $K_a$  и  $[H^+]$ , рассчитываем константу комплексообразования  $K_f$ , подставив значения, полученные из уравнений (10), (11) и (12).

### 2.2.2. Синтез и оценка структуры металло-фенольных комплексов

Общая для всех комплексов методика синтеза представлена ниже.

В круглодонную колбу помещали  $n_1$  ммоль лиганда и растворяли в метаноле. К метанольному раствору прибавляли метоксид натрия 25% 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 11 приведены данные об оптимальных переменных условиях синтеза исследуемых комплексов.

Таблица 11 –Оптимальные переменные 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. Концентрация 30 % спиртовых растворов образцов составила 0,1 мг/мл. Инфракрасную (ИК) спектроскопию проводили на ИК-спектрометре Spectrum 3 (Perkin Elmer, США) с применением приставки НПВО в диапазоне длин волн от 4000  $\text{см}^{-1}$  до 400  $\text{см}^{-1}$  (MIR) и в диапазоне от 700  $\text{см}^{-1}$  до 110  $\text{см}^{-1}$  (FIR).

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 –  $\text{DMSO-d}_6$  и  $\text{D}_2\text{O}$ . 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).

### **2.3. Исследование биологической активности металло-фенольных комплексов**

#### **2.3.1. Оценка антиоксидантной активности комплексов**

Для оценки антиоксидантной активности комплексов использовали следующие субстанции и реактивы: калия гидрофосфат (PanReac, США), калия дигидрофосфат (ООО «Уфахимпроект», Россия), люминол (Sigma-Aldrich, США), 2,2'-азо-бис(2-амидинопропана) дигидрохлорид (АБАП) (Sigma-Aldrich, США), диметилсульфоксид (Scharlau, Испания), метанол (Scharlau, Испания), рутин (Sichuan Guangsong Pharmaceutical, Китай), кверцетин (Molekula, Франция), хлорогеновая кислота (Carl Roth, Швейцария).

*Приготовление калий-фосфатного буфера (pH = 7,4).* Раствор А (1 М раствор калия гидрофосфата). 4,8 г (точная навеска) калия гидрофосфата растворяли в воде очищенной в мерной колбе вместимостью 25 мл, доводили объём до метки, перемешивали. Раствор Б (1 М раствор калия дигидрофосфата). 4,75 г (точная навеска) калия дигидрофосфата растворяли в воде очищенной в мерной колбе вместимостью 25 мл, доводили объём до метки, перемешивали. В колбу вместимостью 100 мл помещали 8 мл раствора А и 2 мл раствора Б, перемешивали, доводили водой очищенной до метки, рН измеряли потенциометрически. Раствор использовали в день приготовления.

*Приготовление рабочего раствора люминола.* 0,04 г (точная навеска) люминола (5-амино-1,2,3,4-тетрагидро-1,4-фталазиндион гидразид 3-аминофталевой кислоты) растворяли в 1 мл диметилсульфоксида, получали раствор люминола 0,02 М. Отбирали 50 мкл раствора, доводили до 10 мл калий-фосфатным буферным раствором, перемешивали.

*Приготовление рабочего раствора АБАП.* 0,068 г (точная навеска) АБАП растворяли в 5 мл калий-фосфатного буфера, тщательно перемешивали. Раствор АБАП пригоден в течение суток.

*Приготовление рабочих растворов комплексов и лигандов.* 0,01 г (точная навеска) девяти комплексов (Zn-Rut, Zn-Querc, Zn-CA, Co-Rut, Co-Querc, Co-CA, Mn-Rut, Mn-Querc, Mn-CA) растворяли в 10 мл калий-фосфатного буфера. 0,01 г (точная навеска) трёх лигандов (рутин, кверцетин, хлорогеновая кислота) растворяли в 10 мл метанола. Концентрация рабочих растворов комплексов и лигандов составила 1 мг/мл.

*Методика определения АОА.* В кювету помещали 465 мкл калий-фосфатного буферного раствора, 10 мкл раствора люминола, 60 мкл рабочего раствора комплекса или лиганда, перемешивали. В течение пяти минут инкубировали в термостате (ТВ-20-ПЗ-«К», Россия) при температуре 37 °С, после чего добавляли 60 мкл рабочего раствора АБАП. Регистрировали площадь под спектром эмиссии в диапазоне от 310 до 570 нм при длине волны возбуждения 293 нм с использованием спектрофлуориметра FL 6500 (Perkin Elmer, США). Параллельно снимали показания контрольного опыта.

Для оценки выраженности АОА образцов при одних и тех же концентрациях (1 мг/мл) рассчитывали процент ингибирования хемиллюминесценции (ПИХ) по следующей формуле:

$$\text{ПИХ (\%)} = \frac{S_1 - S_2}{S_1} * 100 \quad (13),$$

где  $S_1$  – площадь под спектром флуоресценции без добавления образца (контрольный опыт),  $S_2$  – площадь под спектром флуоресценции при добавлении образца.

Результаты расчёта ПИХ обрабатывали статистически с применением ОФС.1.1.0013 «Статистическая обработка результатов химического эксперимента» и программы Microsoft Excel [29].

### **2.3.2. Предварительный скрининг противодиабетической активности модельного комплекса в сравнительном аспекте**

Для предварительной оценки наличия и степени выраженности противодиабетической активности проводили изучение модельного комплекса рутина с цинком в сравнении с водным извлечением из побегов



черники (с / без добавки цинка хлорида), которые по данным литературы проявляют гипогликемическое действие и позиционируются как средство для комплексной терапии сахарного диабета II типа [111]. Кроме того, данный растительный объект содержит фенольные соединения (флавоноиды, антоцианы, гидроксикоричные кислоты, танины) и элементы (Zn, Mn, Ca, Mg), что может характеризовать их как нативный источник металло-фенольных комплексов.

Объектами исследования были водный раствор ( $C = 0,18$  мг/мл) модельного комплекса рутин с цинком с соотношением числа моль компонентов 1:1 и побеги черники обыкновенной, приобретенные в аптечной сети г. Санкт-Петербурга.

Оценка профилактического и лечебного действия комплекса проводилась *in vivo* на дексаметазон-индуцированной модели сахарного диабета II типа.

Работа проводилась с соблюдением требований Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях [112] и была согласована биоэтической комиссией ФГБОУ ВО СПбХФУ Минздрава России.

Гипогликемическое действие комплекса рутин с цинком изучалось на крысах-самцах массой от 270 до 290 г, количество животных – 30, количество групп – 5 (таблица 12).

В течение 8 недель животные находились на высокожировой диете, которая состояла из 21% жира, 41% фруктозы, 1,25% холестерина, 36,75% стандартного корма для лабораторных крыс.

На 7 и 8 неделе моделировали сахарный диабет 2 типа с помощью дексаметазона: 1 мл препарата, содержащего 4 мг действующего вещества, разводили в 10 мл раствора натрия хлорида и ежедневно вводили крысам подкожно в дозе 0,4 мг/кг массы тела животного.

Таблица 12 – Экспериментальные группы лабораторных животных

№ группы	Название группы/ исследуемый препарат
1	Водное извлечение из побегов черники обыкновенной
2	Водное извлечение из побегов черники обыкновенной с добавлением цинка хлорида
3	Водный раствор цинка хлорида
4	Водный раствор комплекса рутина с цинком
5	Контрольная группа

На 7 и 8 неделе моделировали сахарный диабет 2 типа с помощью дексаметазона: 1 мл препарата, содержащего 4 мг действующего вещества, разводили в 10 мл раствора натрия хлорида и ежедневно вводили крысам подкожно в дозе 0,4 мг/кг массы тела животного.

На протяжении всего периода проведения исследования крысам интрагастрально через зонд вводились препараты в объеме 1,7 мл на 1 животное с целью оценки их профилактического действия на 1-6 неделях и лечебного – на 7-8 неделях. Определение дозировки извлечения, вводимой животным, было произведено в перерасчете с дозировки, рекомендованной инструкцией лекарственного средства «Черники обыкновенной побегов» для человека. Массу цинка хлорида, которую необходимо добавить к извлечению, и массу комплекса для приготовления его водного раствора рассчитывали на основании количественного содержания БАВ в побегах черники и определенного спектральным методом мольного соотношения компонентов, участвующих в образовании комплексного соединения. Расчеты приведены в Приложении В.

Динамику развития патологического процесса контролировали по показателям: масса тела, уровень глюкозы в крови, содержание глюкозы и кетонов в моче (Таблица 13).

Таблица 13 – Точки измерения исследуемых показателей в ходе эксперимента

Параметр	Начало эксперимента	ВЖД (профилактика)	Введение дексаметазона (лечение)		Окончание эксперимента
			6 неделя	7 неделя	
Масса тела	+	+			+
Глюкоза в крови	+	+	+	+	+
Глюкоза в моче		+			+
Кетоны в моче		+			+

Определение концентрации глюкозы в крови проводили при помощи портативного глюкометра «AccuChek Active». Объем крови менее 1 мкл, отобранный путем прокола десны, наносили на электрохимическую полоску, помещенную в прибор. Результаты фиксировались с точностью до 0,1 ммоль/л.

Наличие глюкозурии и кетонурии устанавливали через 24 часа после начала сбора мочи у крыс с помощью тест-полосок «Кетоглюк-1» (Биосенсор АН, Россия). Концентрацию глюкозы и кетонов определяли методом сравнения окраски сенсорного элемента с цветной шкалой, нанесенной на упаковку.

### 2.3.3. Оценка противодиабетической активности комплексов цинка с кверцетином и рутином

Скрининговая оценка противодиабетической активности комплексов Zn-Rut, Zn-Querc также проводилась на чёрных инбредных мышах *C57BL/KsJ-db/db*, страдающих сахарным диабетом 2-го типа и ожирением. Животные были разделены на 4 группы по 8 особей: контроль, испытываемые группы (Zn-Rut, Zn-Querc), которым зондировали 0,5 мл водного раствора комплексов в концентрации 1,5 мг/мл. Дозировка комплексов была выбрана, исходя из данных литературных источников, в которых оценивалось противоопухолевое

действие изучаемых соединений [20, 113]. Схематично модель эксперимента представлена на рисунке 7.



Рисунок 7 – Дизайн биологического эксперимента по оценке противодиабетической активности комплексов

Один раз в неделю проводили измерение массы тела мышей. Через четыре недели после начала эксперимента был проведён забор крови из ретроорбитального синуса для последующего биохимического исследования с использованием наборов для иммуноферментного анализа (ИФА): адипонектин (набор ELISA мышинный, Швейцария), С-пептид (набор ELISA мышинный, Швейцария), лептин (набор ELISA мышинный, Швейцария). В качестве оборудования были задействованы термостат типа "Драй-блок" TDB-120 (Biosan, Латвия) и планшетный ридер Multiskan FC (Thermo Fisher, США).

#### 2.3.4. Методы статистической обработки результатов

Результаты количественного определения суммы БАВ, элементов в растительных объектах, а также выходы полученных комплексов и константы устойчивости обрабатывали статистически с учетом рекомендаций ОФС.1.1.0013 «Статистическая обработка результатов химического эксперимента» и программы Microsoft Excel [29].

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.

#### **2.4. Спектрофлуориметрическое определение примеси алюминий с помощью рутина**

ГСО алюминий-иона 1 мг/мл (ООО «Экротхим», Россия), ГСО железа-иона (II) 1 мг/мл (ООО «Экротхим», Россия), ГСО цинка-иона 1 мг/мл (ООО «Экротхим», Россия), ГСО свинца-иона 1 мг/мл (ООО «Экротхим», Россия), ГСО никеля-иона 1 мг/мл (ООО «Экротхим», Россия), ГСО меди-иона 1 мг/мл (ООО «Экротхим», Россия), стандарт катиона хрома (III) 1 мг/мл (имп., Sigma Aldrich, USA), рутин (имп., Sichuan Guangsong Pharmaceutical Co., Китай), аммоний уксуснокислый (имп., Molekula, Германия), уксусная кислота ледяная (хч., АО «База №1 Химреактивов», Россия), калия хлорид (фс., ООО «МЗХР», Россия).

Подбор оптимальных условий с целью создания альтернативной методики определения содержания примеси алюминия в лекарственных средствах с дальнейшей её апробацией опирался на уже имеющиеся подходы и нормирование, представленные в ГФ РФ ОФС.1.2.2.2.0001 «Алюминий» и ФС.2.2.0009 «Калия хлорид» (субстанция калия хлорида была использована для разработки и апробации методики) [29].

Определение оптимальной длины волны возбуждения и эмиссии комплекса алюминия с рутином проводилось с использованием спектрофлуориметра FL 6500 (PerkinElmer, США) в режиме синхронизированного сканирования. Раствор комплекса готовили следующим образом: в мерную колбу на 50 мл помещали 10 мл стандартного раствора

алюминий-иона (1 мкг/мл) (ОФС.1.2.2.2.0001 «Алюминий») и 10 мл раствора рутина в 70% спирте с концентрацией 0,5 мг/мл, перемешивали, доводили до метки ацетатным буферным раствором (рН 6,0), приготовленным с использованием рН-метра (Mettler Toledo, Швейцария) по методике, приведённой в ОФС.1.3.0003 «Буферные растворы». Предварительно определяли интенсивность флуоресценции рутина с концентрацией 0,1 мг/мл при длине волны возбуждения и эмиссии комплекса [29].

Построение градуировочной зависимости интенсивности флуоресценции комплекса от содержания алюминия (в мкг) осуществлялось для оценки валидационных параметров «Предел обнаружения» и «Линейность» (ОФС.1.1.0012 «Валидация аналитических методик») [29]. В мерные колбы вместимостью 50 мл добавляли стандартный раствор алюминий-иона 1 мкг/мл - 2 мл, 3 мл, 4 мл, 5 мл и 6 мл соответственно. В каждую из пяти колб добавляли 10 мл раствора рутина с концентрацией 0,5 мг/мл, доводили до метки ацетатным буфером рН 6,0. Измеряли интенсивность флуоресценции комплекса рутина с алюминием при его характерной длине волны возбуждения (445 нм) и длине волны эмиссии (565 нм). Исходя из этого линейный диапазон включал в себя пять точек, среди которых две (2 мкг, 3 мкг) были ниже, а две другие (5 мкг, 6 мкг) – выше предельной (4 мкг), установленной для субстанции калия хлорида (ФС.2.2.0009 «Калия хлорид»).

Для определения конкретного цифрового значения алюминия в образце испытуемой субстанции калия хлорида, а также для подтверждения правильности предложенной методики, параллельно проводили определение содержания алюминия методом АЭС-ИСП.

*Растворитель* – 1% раствор азотной кислоты, для приготовления использована концентрированная азотная кислота (ООО «НПФ Химмедсервис»), свежеперегнанная. Стандартный образец Multi-Element Solution (растворитель – 5%  $\text{HNO}_3$ , концентрация алюминия – 10 мг/л, производитель – PerkinElmer, США). Градуировочные растворы готовили

путём разбавления мульти-элементного стандартного раствора (концентрацией 10 мг/л) до концентраций 0,1; 0,5; 1,0 мг/л.

*Испытуемые растворы.* Навеску субстанции калия хлорида массой 1 г (точная навеска) помещали в мерную колбу вместимостью 10 мл, растворяли и доводили до метки растворителем. При норме содержания алюминия в образце не более 0,0001%, значение интенсивности эмиссии в испытуемом растворе не должно превышать нижней точки градуировки.

*Раствор для проверки правильности.* Образец калия хлорида массой 1 г (точная навеска) помещали в мерную колбу вместимостью 10 мл, растворяли в 5 мл растворителя, добавляли 1,0 мл градуировочного раствора с концентрацией 1,0 мг/л и доводили до метки растворителем.

Измерения проводили в условиях, представленных в таблице 14.

Таблица 14 – Условия анализа методом АЭС-ИСП

Длины волн	237,313 нм 394,401 нм 396,153 нм
Время интегрирования	1 сек
Число повторов интегрирования	5
Скорость потока плазмообразующего газа	10 л/мин
Скорость потока дополнительного газа	0,2 л/мин
Скорость потока газа для распыления пробы	0,7 л/мин
Мощность плазмы	1300 Вт
Положение обзора эмиссии	Аксиальный
Скорость подачи образца	1,5 мл/мин

## Выводы к главе 2

1. В качестве метода скрининговой оценки содержания фенольных соединений и органических кислот в створках фасоли и побегах черники, обладающих противодиабетической активностью, был предложен метод ВЭТСХ. Количественное содержание суммы флавоноидов и гидроксикоричных кислот оценивалось спектрофотометрически; сумму органических кислот – титриметрически. Макро и микроэлементный профиль растений определялся методом АЭС-ИСП.

2. Оценка стехиометрии компонентов в комплексах проводилась методом множественных вариаций. Константы устойчивости рассчитывались методом Бьеррума.

3. С помощью спектроскопии в видимой и УФ областях, ИК-спектроскопии, ЯМР-спектроскопии, масс-спектрометрии оценивались структурные характеристики комплексов. Наличие металлов в образцах подтверждалось методом РФА.

4. Предварительный скрининг гипогликемического действия комплекса цинка с рутином проводился *in vivo* на алиментарной модели сахарного диабета II типа. Также противодиабетическая активность комплексов цинка с рутином и кверцетином определялась в эксперименте *in vivo* на мышах *C57BL/KsJ-db/db* с последующей оценкой содержания в крови гормонов методом ИФА (С-пептид, адипонектин, лептин). Антиоксидантная активность оценивалась спектрофлуориметрически с последующим расчётом процента ингибирования хемилюминесценции (ПИХ).

5. Определение примести алюминия с использованием в качестве лиганда рутина проводилось спектрофлуориметрическим методом на примере субстанции калия хлорида. Предварительно были определены длины волн возбуждения и эмиссии комплекса алюминия с рутином.



### ГЛАВА 3. ФИТОХИМИЧЕСКИЙ СКРИНИНГ ЛЕКАРСТВЕННОГО РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ, ОБЛАДАЮЩЕГО ПРОТИВОДИАБЕТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТЬЮ

#### 3.1. ВЭТСХ-скрининг створок фасоли обыкновенной и побегов черники обыкновенной

В ходе исследования побегов черники и створок фасоли методом высокоэффективной тонкослойной хроматографии (ВЭТСХ) были получены хроматограммы, представленные на рисунках 8 и 9.

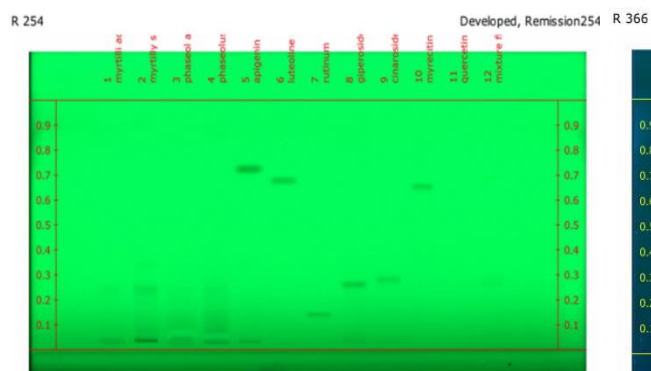


Рисунок 8 – Хроматограмма флавоноидов черники и фасоли при 254 нм

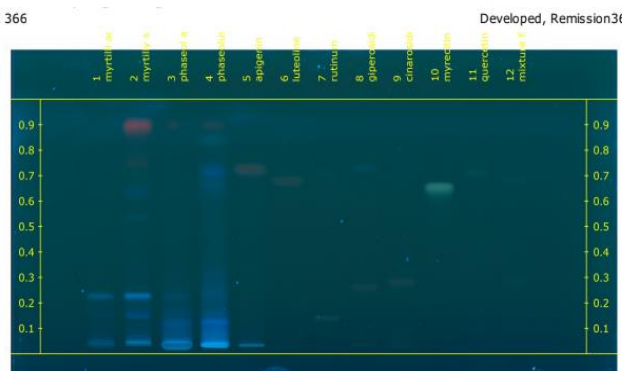


Рисунок 9 – Хроматограмма флавоноидов черники и фасоли при 366 нм

Исходя из данных ВЭТСХ анализа (таблица 15) в исследуемом ЛРС в качестве потенциальных лигандов содержатся гиперозид и рутин.

Таблица 15 – ВЭТСХ-скрининг флавоноидов в сырье черники обыкновенной и фасоли обыкновенной

Исследуемый раствор/пятна	Окраска зон адсорбции			Rf
	Видимый свет	УФ-свет (366 нм)	УФ-свет (254 нм)	
1	2	3	4	5
Апигенин	Светло-желтая	Коричневая	Серая	0,73
Лютеолин	Желтая	Коричневая	Серая	0,68
<b>Рутин</b>	<b>Светло-желтая</b>	<b>Коричневая</b>	<b>Серая</b>	<b>0,15</b>
<b>Гиперозид</b>	<b>Желтая</b>	<b>Коричневая</b>	<b>Серая</b>	<b>0,26</b>
Цинарозид	Светло-желтая	Коричневая	Серая	0,28
Мирицетин	Желто-коричневая	Зеленая	Серая	0,66
Кверцетин	-	Коричневая	-	0,70
Водное извлечение из побегов черники обыкновенной				
<b>Пятно 1</b>	<b>Светло-желтая</b>	<b>Коричневая</b>	<b>Светло-серая</b>	<b>0,16</b>
<b>Пятно 2</b>	<b>Светло-желтая</b>	<b>Коричневая</b>	<b>Светло-серая</b>	<b>0,25</b>

1	2	3	4	5
Пятно 3	Светло-желтая	Светло-коричневая	Светло-серая	0,73
Спиртовое извлечение из побегов черники обыкновенной				
Пятно 1	Светло-желтая	Коричневая	Светло-серая	0,14
Пятно 2	Светло-желтая	Синяя	Серая	0,25
Пятно 3	-	Светло-коричневая	-	0,72
Водное извлечение из створок фасоли обыкновенной				
Пятно 1	Светло-желтая	Синяя	Светло-серая	0,14
Пятно 2	Желтая	Коричневая	Светло-серая	0,25
Пятно 3	Светло-желтая	Светло-коричневая	Светло-серая	0,72
Спиртовое извлечение из побегов фасоли обыкновенной				
Пятно 1	Светло-желтая	Синяя	Светло-серая	0,15
Пятно 2	Светло-желтая	Синяя	Серая	0,25
Пятно 3	-	Синяя	-	0,72

Анализ фенолпропаноидов в исследуемом ЛРС показал наличие у побегов черники обыкновенной хлорогеновой, п-кумаровой, протокатеховой, коричной, синаповой кислот; у фасоли – хлорогеновой и п-кумаровой кислот. На рисунках 10 и 11 представлены хроматограммы извлечений из ЛРС и стандартов гидроксикоричных кислот.

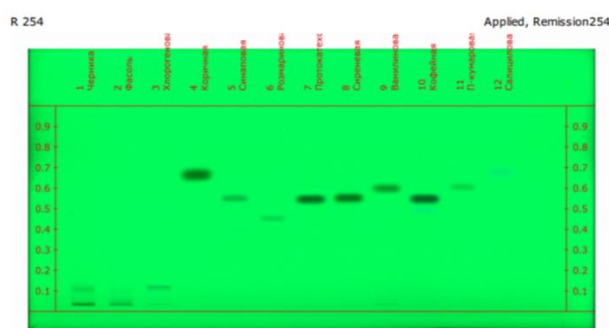


Рисунок 10 – Хроматограмма фенолпропаноидов черники и фасоли при 254 нм

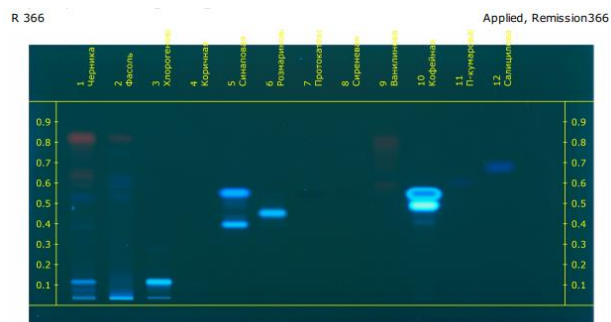


Рисунок 11 – Хроматограмма фенолпропаноидов черники и фасоли при 366 нм

В таблице 16 представлены результаты хроматографического исследования фенолпропаноидов в изучаемых растениях.

Таблица 16 – ВЭТСХ-скрининг фенилпропаноидов в сырье черники обыкновенной и фасоли обыкновенной

Исследуемый раствор/пятна	Окраска зон адсорбции		Rf
	УФ-свет (366 нм)	УФ-свет (254 нм)	
<b>Хлорогеновая кислота</b>	<b>Серая</b>	<b>Голубая</b>	<b>0,12</b>
<b>Коричная кислота</b>	<b>Серая</b>	-	<b>0,67</b>
<b>Синаповая кислота</b>	<b>Серая</b>	<b>Голубая</b>	<b>0,40</b>
	-	<b>Голубая</b>	<b>0,55</b>
Розмариновая кислота	Серая	Голубая	0,46
<b>Протокатеховая кислота</b>	<b>Серая</b>	-	<b>0,55</b>
Сиреневая кислота	Серая	-	0,56
Ванилиновая кислота	Серая	-	0,61
Кофейная кислота	Серая	Голубая	0,50
	Серая	Голубая	0,56
<b>п-кумаровая кислота</b>	<b>Серая</b>	<b>Фиолетовая</b>	<b>0,62</b>
Салициловая кислота	Серая	Фиолетовая	0,70
Спиртовое извлечение из побегов черники обыкновенной			
<b>Пятно 1</b>	-	<b>Голубая</b>	<b>0,10</b>
Пятно 2	Серая	Голубая	0,16
Пятно 3	-	Фиолетовая	0,18
<b>Пятно 4</b>	-	<b>Фиолетовая</b>	<b>0,41</b>
<b>Пятно 5</b>	-	<b>Фиолетовая</b>	<b>0,54</b>
<b>Пятно 6</b>	-	<b>Фиолетовая</b>	<b>0,61</b>
<b>Пятно 7</b>	-	<b>Фиолетовая</b>	<b>0,69</b>
Спиртовое извлечение из створок фасоли обыкновенной			
<b>Пятно 1</b>	<b>Серая</b>	<b>Голубая</b>	<b>0,10</b>
Пятно 2	-	Фиолетовая	0,35
Пятно 3	-	Фиолетовая	0,50
Пятно 4	-	Фиолетовая	0,57
<b>Пятно 5</b>	-	<b>Фиолетовая</b>	<b>0,62</b>
Пятно 6	-	Фиолетовая	0,76

Оценка содержания органических кислот в анализируемых растениях показала наличие у обоих объектов яблочной кислоты. Кроме того, побеги черники накапливают винную и янтарную кислоты. На рисунке 12 представлена хроматограмма анализа органических кислот.

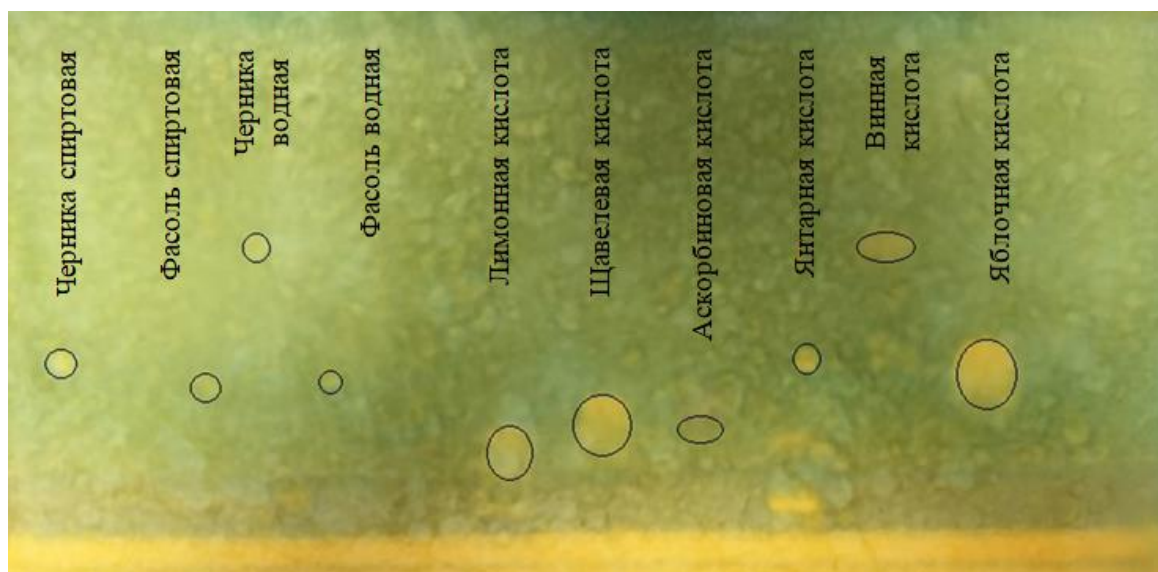


Рисунок 12 – Хроматограмма органических кислот черники и фасоли  
 В таблице 17 приведены сводные результаты оценки наличия органических кислот.

Таблица 17 – Хроматографическая оценка органических кислот в сырье черники обыкновенной и фасоли обыкновенной

Исследуемый раствор/пятна	Окраска зон адсорбции	Rf
Лимонная кислота	Желтая	0,20
Щавелевая кислота	Желтая	0,24
<b>Янтарная кислота</b>	<b>Желтая</b>	<b>0,39</b>
<b>Винная кислота</b>	<b>Желтая</b>	<b>0,62</b>
<b>Яблочная кислота</b>	<b>Желтая</b>	<b>0,36</b>
Аскорбиновая кислота	Жёлтая	0,23
Спиртовое извлечение из побегов черники обыкновенной		
<b>Пятно 1</b>	<b>Желтая</b>	<b>0,39</b>
Спиртовое извлечение из створок фасоли обыкновенной		
<b>Пятно 1</b>	<b>Желтая</b>	<b>0,34</b>
Водное извлечение из побегов черники обыкновенной		
<b>Пятно 1</b>	<b>Желтая</b>	<b>0,63</b>
Водное извлечение из створок фасоли обыкновенной		
<b>Пятно 1</b>	<b>Желтая</b>	<b>0,34</b>

### 3.2. Количественное определение суммы основных групп БАВ- потенциальных лигандов в створках фасоли обыкновенной и побегах черники обыкновенной

Оценка содержания суммы флавоноидов в пересчете на рутин и суммы гидроксикоричных кислот в пересчете на хлорогеновую кислоту проводилась по методикам, приведенным в п. 2.1.2. методом спектрофотометрии.

Предварительно были сняты спектры для определения флавоноидов и гидроксикоричных кислот на основании данных которых (экстремумы) были выбраны аналитические длины волн - 420 нм для флавоноидов и 330 нм для гидроксикоричных кислот, что совпадает с данными литературы [29]. Результаты количественного определения представлены в таблице 18.

Таблица 18 – Результаты количественного определения БАВ-потенциальных лигандов методом УФ-спектрофотометрии.

Группа БАВ	Результаты содержания БАВ (n = 3)		
Побеги черники обыкновенной			
	%	$x_{cp}, \%$	$x_{cp} \pm \Delta x, \%$
Сумма флавоноидов в пересчете на рутин	1,38	1,35	1,35 ± 0,04
	1,35		
	1,33		
Сумма гидроксикоричных кислот в пересчете на хлорогеновую кислоту	1,38	1,39	1,39 ± 0,05
	1,42		
	1,36		
Створки фасоли обыкновенной			
	%	$x_{cp}, \%$	$x_{cp} \pm \Delta x, \%$
Сумма флавоноидов в пересчете на рутин	0,08	0,08	0,08 ± 0,01
	0,08		
	0,07		
Сумма гидроксикоричных кислот в пересчете на хлорогеновую кислоту	0,50	0,48	0,48 ± 0,03
	0,46		
	0,47		

Согласно данным таблицы 18 содержание фенольных соединений (особенно флавоноидов) превалирует в побегах черники. Следовательно, это потенцирует возможность образования комплексных (хелатных) соединений в ЛРС, поэтому в качестве объекта для предварительной оценки наличия и степени выраженности противодиабетического действия были выбраны побеги черники.

Содержание суммы органических кислот в пересчете на яблочную кислоту определяли методом кислотно-основного титрования по методике, приведенной в п. 2.1.2. Результаты количественного определения представлены в таблице 19.

Таблица 19 – Результаты количественного определения органических кислот в сырье черники обыкновенной и фасоли обыкновенной.

Группа БАВ	Результаты содержания (n=3)		
Побеги черники обыкновенной			
	%	$x_{cp}, \%$	$x_{cp} \pm \Delta x, \%$
Сумма органических кислот в пересчете на яблочную кислоту	2,16	2,11	2,11 ± 0,08
	2,06		
	2,12		
Створки фасоли обыкновенной			
	%	$x_{cp}, \%$	
Сумма органических кислот в пересчете на яблочную кислоту	1,29	1,24	1,24 ± 0,07
	1,23		
	1,21		

Количество органических кислот в побегах черники в 1,5 раза превышает их содержание в створках фасоли, что подтверждает тезис о том, что черника обыкновенная в большей степени является потенциальным источником минеральных комплексов с БАВ и выбор ее в качестве объекта дальнейших исследований обоснован.

### **3.3. Элементный профиль створок фасоли обыкновенной и побегов черники обыкновенной**

По результатам исследования в сырье фасоли обыкновенной и черники обыкновенной было установлено наличие 14 элементов (таблица 20). Содержание кадмия и свинца в исследуемом ЛРС находится ниже предельно допустимых концентраций (ПДК), установленных ГФ РФ XV OFC 1.5.3.0009 [29]. Содержание ртути и мышьяка не анализировали, так как предел количественного определения (ПКО) данных элементов методом АЭС выше,

чем ПДК (7,5 мг/кг против 0,1 мг/кг для ртути и 6,3 мг/кг против 0,5 мг/кг для мышьяка соответственно).

Таблица 20 – Результаты изучения макро- и микроэлементного состава побегов черники обыкновенной и створок фасоли обыкновенной

Элемент	Побеги черники обыкновенной $x_{cp} \pm SD$ , мг/кг,	Створки фасоли обыкновенной $x_{cp} \pm \Delta x$ , мг/кг
Макроэлементы*		
Mg	$625 \pm 4$	$2724 \pm 10$
Ca	$3868 \pm 2$	$6551 \pm 20$
Микроэлементы		
Ba	$57 \pm 2$	$6,8 \pm 0,7$
Al	$213 \pm 2$	$71 \pm 1$
Cd (ПДК = 1,0)	$0,24 \pm 0,01$	$0,090 \pm 0,001$
Co	$0,080 \pm 0,001$	$0,110 \pm 0,001$
Cr	$0,18 \pm 0,01$	$0,060 \pm 0,001$
Cu	$11 \pm 1$	$4,3 \pm 0,6$
Fe	$17,7 \pm 0,7$	$39,3 \pm 1,5$
Mn	$1152 \pm 7$	$18,4 \pm 1,4$
Ni	$0,260 \pm 0,002$	$0,070 \pm 0,001$
Pb (ПДК = 6,0)	$0,67 \pm 0,01$	$1,14 \pm 0,14$
Se	$15,4 \pm 0,6$	$12,8 \pm 0,7$
Sr	$19,2 \pm 0,7$	$22 \pm 1$
Zn	$21,2 \pm 0,7$	$5,3 \pm 0,1$
Примечание: Примечание: * - натрий и калий не определяли намеренно, т.к. они являются физиологическими элементами живой клетки и всегда накапливаются в мажоритарных количествах, а их влияние на течение сахарного диабета не отмечено.		

Из микроэлементов в побегах черники обыкновенной преобладают алюминий и марганец. В створках фасоли содержание микроэлементов в целом меньше, чем у побегов черники, но для этого сырья характерно большее накопление макроэлементов (в 2 раза больше кальция, в 4,9 раз больше магния).

Микроэлементный состав створок фасоли менее выражен по количественному составу в сравнении с побегами черники, следовательно хелатирование фенольных соединений с возможным образованием комплексов происходит менее интенсивно.

### **Выводы к главе 3**

1. Был проведён ВЭТСХ-скрининг ЛРС (побеги черники обыкновенной и створки фасоли обыкновенной) с целью обнаружения маркерных соединений, потенциальных лигандов, которые способны в ходе экстракции связываться с микро- и макроэлементами, входящими в состав растений. Установлено 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).

2. Спектральными и титриметрическим 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 %). Это позволяет предположить различные количественные характеристики образования комплексных соединений в ЛРС.

3. Изучен элементный профиль побегов черники обыкновенной и створок фасоли обыкновенной. 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.

4. На основе полученных результатов в совокупности с данными литературы [107, 108, 111] о значении элементов в терапии сахарного диабета



можно предположить, что для побегов черники в большей степени характерно антиоксидантное и, как следствие, опосредованно 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

В литературных источниках представлено большое количество методик по синтезу металло-фенольных комплексов. Однако они носят не унифицированный характер. Некоторые варианты получения комплексов оказываются нецелесообразными в виду подбора тех или иных условий. Так, в литературе [22, 25, 114] приведены методики синтеза комплексов, где в качестве растворителя используется вода, однако лиганд (например, флавоноид) в ней очень мало растворим. В виду этого предлагается использовать раствор аммиака в качестве депротонирующего агента. Однако это может привести к образованию халкона и связыванию металла с гидроксил-анионами молекулы аммиака. В некоторых исследованиях [115] компоненты в комплексах растворяют в разных растворителях, например, фенольное соединение в метаноле, а соль металла в воде. В ходе смешивания компонентов выход комплекса может снижаться в виду того, что в метаноле он не растворяется, но легко растворяется в воде. Определение оптимального соотношения металла и фенольного соединения в комплексах предлагают реализовывать методами Джоба, молярного соотношения, углового коэффициента. Однако ряд исследователей не рассчитывают стехиометрическое соотношение компонентов, добавляя избыток соли металла к раствору, содержащему лиганд. В результате чего возможно взаимодействие катиона с большим числом гидроксогрупп лиганда, которые могут отвечать и за антиоксидантную активность, что приведёт к её снижению [20]. В статьях [21-24] приводится разнообразное количество используемых в синтезе депротонирующих агентов (например, раствор аммиака, триэтиламин, метоксид натрия, этоксид натрия, пиридин), однако в большинстве случаев их добавляют без расчёта концентрации в раствор, содержащий лиганд. В других исследованиях не используют депротонирующий реактив вовсе. Выделение комплексов из реакционной смеси также протекает в различных методиках по-

разному. Например, прозрачный раствор, содержащий комплекс, после нагревания предлагают выпаривать и сухой остаток исследовать, однако в реакционной смеси может быть избыток лиганда, что приведёт к искажению данных, полученных в ходе изучения структуры [84, 85]. Другой вариант - добавить прозрачный раствор, содержащий комплекс в большое количество растворителя (вода), в котором комплекс не будет растворяться и выпадет в осадок [116]. Но в ходе гидролиза в осадок может выпасть фенольное соединение, которое мало растворимо в воде. Чаще всего в статьях приводятся методы, которые позволяют выделить соединения в виде осадка уже на этапе нагревания в колбе с обратным холодильником, а затем его отфильтровать и высушить. Стоит отметить и то, что условия синтеза (температура, время нагрева), лабораторное оснащение в разных методиках не унифицировано.

Следовательно, в виду отсутствия единых подходов к синтезу металло-фенольных комплексов, а также с учетом принятого Руководством ICH Q9(R1) «Управление рисками для качества» [117] риск-ориентированного подхода нами было разработано Дерево принятия решений (Приложение Г) – модель, которая алгоритмизирует возможность получения комплекса, дает возможность проанализировать основные процессы, переменные участки, оценить последствия принятия серии связанных между собой решений. Также этот алгоритм можно трансферировать на разные классы фенольных соединений и металлы.

Состоятельность дерева принятия решений подтверждалась на четырёх лигандах (ресвератрол, хлорогеновая кислота, кверцетин, рутин) и трёх солях металлов (ацетаты цинка, марганца и кобальта). 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 [37-41, 118].

В первую очередь проводилась оценка сайтов связывания лигандов исходя из констант диссоциации, представленных в литературе. В таблице 21

показаны места возможного взаимодействия металла с фенольными соединениями и их  $pK_a$ .

Таблица 21 – Возможные сайты связывания и  $pK_a$  рутина, кверцетина, ресвератрола и хлорогеновой кислоты

Лиганд	$pK_a$ [119-122]	Возможные сайты связывания	Пояснение
Рутин	$pK_a=7,21$ (4'-OH) $pK_a=7,52$ (3'-OH) $pK_a=7,82$ (5-OH) $pK_a=11,52$ (7-OH)		3'-4' – сайт (ОН-группы кольца В); 4-5 – сайт (кето- и ОН-группы).
Кверцетин	$pK_a=5,81$ (3-OH) $pK_a=6,62$ (3'-OH) $pK_a=7,12$ (4'-OH) $pK_a=9,7$		3'-4' – сайт (ОН-группы кольца В); 3-4 – сайт (кето- и ОН-группы); 4-5 – сайт (кето- и ОН-группы).
Хлорогеновая кислота	$pK_a=3,59$ (7-COOH) $pK_a=8,60$ $pK_a=12,50$		3'-4' – сайт (ОН-группы); Карбокси-группа по 7 положению
Ресвератрол	$pK_a=8,8$ $pK_a=9,8$ $pK_a=11,4$		Металл <i>не связывается</i> с лигандом (высокие значения $pK_a$ )

Пояснение:  $pK_a$  –  $-\log(K_a)$ ,  $K_a$  – константа кислотности,  $M^{n+} = Zn, Co, Mn$

Из таблицы 21 видно, что ресвератрол, в виду малых значений констант диссоциации, не способен связывать катионы металлов в прочные комплексы, что также подтверждается экспериментально. Следовательно, в ходе

дальнейшей работы в качестве лигандов будут задействованы три фенольных соединения: рутин, кверцетин и хлорогеновая кислота.

#### 4.1. Расчёт оптимальных соотношений компонентов и констант устойчивости комплексов

Перед тем как приступить к синтезу комплексов необходимо с помощью метода Джоба установить молярное соотношение компонентов. Результаты измерения оптической плотности для девяти комплексов приведены в таблице 22.

Таблица 22 – Результаты спектрофотометрического анализа растворов комплексов по методу Джоба

$N = \frac{n(\text{лиганд})}{n(\text{общ})}$	Оптическая плотность комплекса Zn-Rut ( $\lambda = 394$ нм)	Оптическая плотность комплекса Zn-Querc ( $\lambda = 450$ нм)	Оптическая плотность комплекса Zn-CA ( $\lambda = 374$ нм)
0	0,120	0,056	0
0,2	0,405	0,275	0,176
0,4	0,769	0,493	0,230
0,5	0,901	0,601	0,220
0,6	0,754	0,701	0,186
0,8	0,444	0,536	0,086
1	0	0	0
$N = \frac{n(\text{лиганд})}{n(\text{общ})}$	Оптическая плотность комплекса Co-Rut ( $\lambda = 393$ нм)	Оптическая плотность комплекса Co-Querc ( $\lambda = 435$ нм)	Оптическая плотность комплекса Co-CA ( $\lambda = 375$ нм)
0	0,069	0	0
0,1	0,179	0,080	0,374
0,5	0,362	0,196	0,505
0,6	0,437	0,227	0,483
0,7	0,427	0,254	0,398
0,8	0,301	0,210	0,228
1	0	0	0,0134
$N = \frac{n(\text{лиганд})}{n(\text{общ})}$	Оптическая плотность комплекса Mn-Rut ( $\lambda = 395$ нм)	Оптическая плотность комплекса Mn-Querc ( $\lambda = 400$ нм)	Оптическая плотность комплекса Mn-CA ( $\lambda = 374$ нм)
0	0	0	0
0,1	0,124	0,165	0,484
0,5	0,269	0,333	0,513
0,6	0,346	0,410	0,393
0,7	0,326	0,510	0,281
0,8	0,203	0,467	0,150
1	0,016	0,105	0,045

По результатам измерений были построены графики зависимости оптической плотности от  $N$ , проведены касательные (Приложение Д). С помощью проецирования точки пересечения полученных линий на ось абсцисс установили значение оптимального для комплексообразования

отношения количества вещества лиганда к общему числу моль компонентов. Для комплексов с рутином  $N=0,50$ ; кверцетином –  $N=0,67$ ; хлорогеновой кислотой –  $0,33$ . Это значит, что рутин образует устойчивые комплексы с металлами в соотношении 1:1 (0,5:0,5), кверцетин – 1:2 (0,33:0,67), хлорогеновая кислота – 2:1 (0,67:0,33).

Расчёт констант комплексообразования проводили с помощью метода Бьеррума. В ходе титрования смеси лиганда и соли комплексообразователя гидроксидом натрия 0,01 М с шагом 0,1 мл измеряли значения рН. По закону эквивалентов рассчитывали концентрацию свободной кислоты ( $C_H$ ) при разных рН. Другие параметры необходимые для определения констант устойчивости выводили из уравнений (2), (7), (8) и (9) (п. 2.2.1). В таблице 23 представлены стехиометрия комплексов и их константы устойчивости.

Таблица 23 – Стехиометрия и константы устойчивости комплексов

Комплекс	Катион: Лиганд	$\log\beta$ $x_{cp} \pm \Delta x$
1	2	3
Zn-Rut	1:1	$5,18 \pm 0,11$
Zn-Querc	1:2	$5,37 \pm 0,08$
Zn-CA	2:1	$8,50 \pm 0,06$
Co-Rut	1:1	$4,42 \pm 0,07$
Co-Querc	1:2	$5,01 \pm 0,17$
Co-CA	2:1	$8,92 \pm 0,06$
Mn-Rut	1:1	$3,64 \pm 0,06$
Mn-Querc	1:2	$5,91 \pm 0,06$
Mn-CA	2:1	$7,67 \pm 0,05$

Анализируя таблицу, можно сделать заключение, что комплексы металлов с хлорогеновой кислотой более стабильны в сравнении с комплексами других лигандов. Это объясняется высокими значениями констант диссоциации хлорогеновой кислоты. Наименее устойчивые комплексы образует рутин, так как он является самой слабой из представленных кислот.

## 4.2. Синтез и оценка структуры комплексов

В качестве растворителя нами был выбран метанол, в котором легко растворимы как лиганды, так и ацетатные соли комплексообразователей. Применение ацетатов обусловлено тем, что в ходе метанолиза образуются отрицательно заряженные частицы  $\text{CH}_3\text{O}^-$ , которые способны дополнительно открывать сайты связывания. Это приводит к снижению расхода депротонирующего агента и способствует повышению выхода продукта. Депротонирующий реактив – метоксид натрия. Синтез комплексов проводили по методике, приведённой в п. 2.2.2.

Описание, растворимость и выходы комплексов, полученных по методике п. 2.2.2, представлены в таблице 24.

Таблица 24 – Описание, растворимость и выходы комплексов

Комплекс	Описание и растворимость	Выход, % $x_{\text{ср}} \pm \Delta x$
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 комплексов подтверждали методами спектроскопии в видимой и УФ областях, ИК-спектроскопии, спектроскопии ЯМР, масс-спектрометрии и РФА.

В таблице 25 показаны максимумы поглощения УФ-спектров комплексов и нативных лигандов. Спектры приведены в Приложение Е.

Таблица 25 – Максимумы поглощения комплексов и нативных лигандов

Лиганд	Максимумы, нм	Комплекс	Максимумы, нм
Рутин	268, 353	Zn-Rut	275, 394
		Co-Rut	275, 393
		Mn-Rut	274, 395
Кверцетин	263, 363	Zn-Querc	260, 425
		Co-Querc	259, 400
		Mn-Querc	253, 359
Хлорогеновая кислота	216, 324	Zn-CA	260, 374
		Co-CA	263, 374
		Mn-CA	261, 374

Исходя из анализа таблицы 25 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.

Структурное различие флавоноидов (рутин, кверцетин) и их комплексов подтверждается ИК-спектрами, представленными в Приложении Ж. Исходя из оценки потенциальных сайтов связывания металла с лигандами, были исследованы области валентных колебаний -ОН, С-О-С и С=О групп. Как видно из данных спектров, 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 сказать 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  $\nu(\text{Me}-\text{O})$ , значения которых представлены в таблице 26.

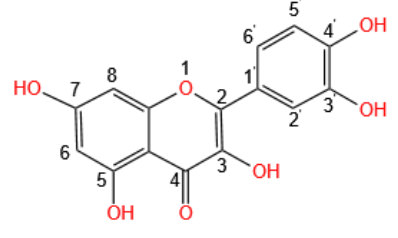
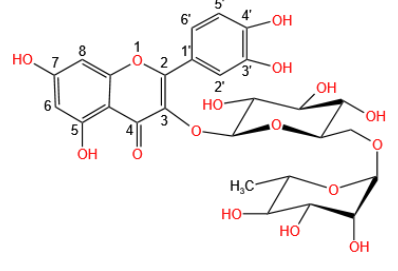
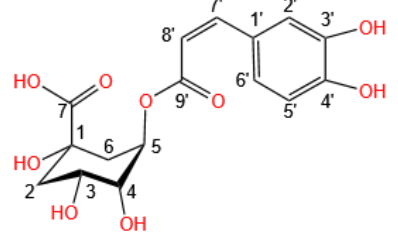
Таблица 26 – Валентные колебания связи «металл-кислород»

Me-O	$\nu(\text{Me}-\text{O}), \text{cm}^{-1}$
Zn-O	610
Co-O	614
Mn-O	646

На ИК-спектрах комплексов металлов с хлорогеновой кислотой 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.

В связи с тем, что только комплексы с цинком (Zn-Rut, Zn-Querc, Zn-CA) растворимы в ДМСО, только для них удалось снять спектры и проанализировать область фенольных гидроксильных групп. Интерпретация спектров  $^1\text{H}$  ЯМР (приведены в Приложение И) в области фенольных гидроксильных групп приведена в таблице 27.

Таблица 27 – Сигналы протонов ОН- и СООН – групп лигандов и их ЦИНКОВЫХ КОМПЛЕКСОВ

Лиганд	$\delta$ , ppm	5-ОН	7-ОН	3-ОН	3'-ОН	4'-ОН	7-СООН
	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 гидроксидов характеризуется отсутствием сигнала протона ОН-группы по 3 положению ( $\delta = 9.58$  м.д.). Это может говорить о депротонировании С-3ОН группы и ее участии в хелатировании с катионом цинка (таблица 27). 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-ОН группы, а наименьший отрицательный заряд на атоме кислорода карбонильной группы. Исходя из этого, можно предположить, что предпочтительная атака металла-комплексообразователя осуществляется по 3-4 сайту связывания.

На  $^1\text{H}$  ЯМР-спектрах (область фенольных гидроксидов) 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 ОН-групп по 3' и 4' положениям, а также сигнала протона СООН-группы. Это подтверждает возможность связывания металла по данным группировкам.

Способность комплексов растворяться в воде, позволяет снимать  $^1\text{H}$ -ЯМР-спектры в  $\text{D}_2\text{O}$ . Однако полученные спектры малоинформативны с точки зрения оценки сайтов связывания, так как на них отсутствует область фенольных гидроксильных протонов в виду обмена протонов на дейтерий. Стоит отметить и то, что кобальт и марганец проявляют парамагнитные свойства. В связи с этим на ЯМР-спектре наблюдаются уширенные сигналы протонов, которые накладываются друг на друга. Следовательно, провести интерпретацию спектров комплексов, содержащих марганец и кобальт, не представляется возможным.

Масс-спектрометрия даёт возможность оценить молекулярную массу исследуемых комплексов и тех фрагментов, которые образуются в ходе ионизации. Однако в виду малой стабильности комплексов Co-Rut, Mn-Rut, Mn-Querc на масс-спектрах отмечались лишь пики осколочных и молекулярных ионов лигандов. Для остальных соединений интерпретация спектров (Приложение К) представлена в таблице 28.

Таблица 28 – Интерпретация интенсивных пиков на масс-спектрах КОМПЛЕКСОВ

Комплекс	Структура	<i>m/z</i>
Zn-Rut	$[\text{Rut-H}]^+$	610,72
	$[\text{Rut}\times 3\text{H}_2\text{O-H}]^+$	659,67
	$[\text{Zn}(\text{Rut})\times 3\text{H}_2\text{O-H}]^+$	723,20
	$[\text{Zn}(\text{Rut})(\text{CH}_3\text{COO})\text{-H}]^+$	735,94
Zn-Querc	$[\text{Querc-H}]^+$	301,25
	$[\text{Zn}(\text{Querc})_2(\text{CH}_3\text{COO})\text{-}2\text{H}]^{2+}$	365,40
	$[\text{Zn}(\text{Querc})_2\times\text{H}_2\text{O}\text{-}2\text{H}]^{2+}$	341,21
	$[\text{Zn}(\text{Querc})_2(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{-}2\text{H}]^{2+}$	393,42
Zn-CA	$[\text{CA-H}]^+$	355,24
	$[\text{Zn}_2(\text{CA})\text{-H}]^+$	487,38
	$[\text{Zn}(\text{CA})\text{-Na}]^+$	443,22
Co-Querc	$[\text{Querc-H}]^+$	301,23
	$[\text{Co}(\text{Querc})_2\times 2\text{H}_2\text{O}\text{-}2\text{H}]^{2+}$	341,29
	$[\text{Co}(\text{Querc})(\text{CH}_3\text{COO})\text{-Na}]^+$	443,27
Co-CA	$[\text{CA-H}]^+$	354,19
	$[\text{Co}(\text{CA})\text{-H}]^+$	413,33
	$[\text{Co}_2(\text{CA})\text{-H}]^+$	473,43
Mn-CA	$[\text{CA-H}]^+$	355,24
	$[\text{Mn}(\text{CA})\text{-H}]^+$	407,64
	$[\text{Mn}_2(\text{CA})\text{-Na}]^+$	487,35

Анализ данных таблицы 28 показывает, что для комплексов кверцетина характерно образование димерных форм, что подтверждается методом Джоба. Хлорогенаты имеют соотношение лиганд: металл = 1:2. Комплекс цинка с рутином имеет соотношение лиганд: металл = 1:1.

Подтверждение наличия в полученных образцах комплексов соответствующих металлов проводилось с помощью метода РФА путём регистрации и интерпретации спектров, представленных в Приложении Л. Содержание элементов в пробах оценивалось полуколичественно методом

фундаментальных параметров (таблица 29). Элементы детектировались, начиная с атомной массы алюминия.

Как видно из данной таблицы, 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, или в результате случайного попадания элементов в ходе пробоподготовки. Исходя из этого, содержание основных металлов-комплексообразователей не равно 100%.

Таблица 29 – Определение содержания элементов в образцах методом РФА

Образец	Элемент	Содержание, %
1	2	3
Zn-Rut	Zn	<b>99,538</b>
Zn-Querc		<b>99,805</b>
Zn-CA		<b>99,704</b>
Co-Rut	Co	<b>99,623</b>
Co-Querc		<b>99,232</b>
Co-CA		<b>99,804</b>
Mn-Rut	Mn	<b>99,067</b>
Mn-Querc		<b>98,177</b>
Mn-CA		<b>98,325</b>

#### Выводы к главе 4

1. 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.

2. 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  $\text{COOH}$ -группы. Комплексы с рутином менее стабильны в связи с тем, что рутин самая слабая из представленных кислот. Ресвератрол, как самая слабая из изучаемых лигандов, не образует устойчивых комплексов с Zn, Co, Mn.

3. С помощью 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  $\text{COOH}$ -группе (рисунок 13).

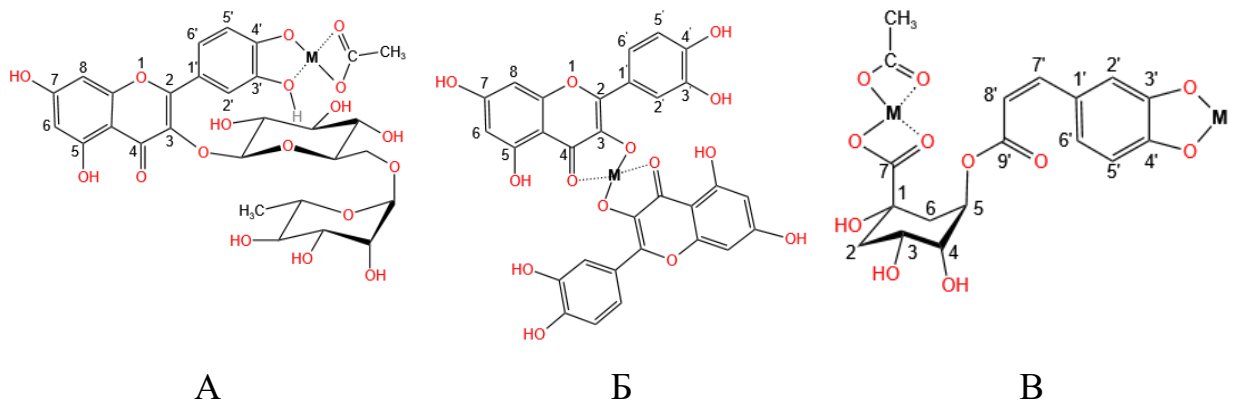


Рисунок 13 – Паттерны комплексообразования для А – рутина; Б – кверцетина; В – хлорогеновой кислоты (M=Zn, Co, Mn).

## ГЛАВА 5. ВОЗМОЖНЫЕ НАПРАВЛЕНИЯ ПРИМЕНЕНИЯ МЕТАЛЛО-ФЕНОЛЬНЫХ КОМПЛЕКСОВ

### 5.1. Оценка антиоксидантной активности комплексов

В ходе оценки АОА определяли ПИХ (%) девяти комплексов и трёх лигандов при одинаковой концентрации. Данные, полученные в результате исследования представлены в таблице 30.

Таблица 30 – Результаты определения процента ингибирования хемиллюминесценции (%) комплексов и лигандов.

Образец комплекса	ПИХ (%) $x_{\text{ср}} \pm \Delta x$ (n=3)
<b>Рутин</b>	<b>84,6 ± 0,5</b>
Zn-Rut	74,0 ± 0,3
Co-Rut	82,5 ± 0,3
Mn-Rut	74,8 ± 0,4
<b>Кверцетин</b>	<b>96,8 ± 0,6</b>
Zn-Querc	97,0 ± 0,2
Co-Querc	92,5 ± 0,4
Mn-Querc	92,4 ± 0,5
<b>Хлорогеновая кислота</b>	<b>92,0 ± 0,5</b>
Zn-CA	79,9 ± 0,6
Co-CA	74,6 ± 0,4
Mn-CA	74,6 ± 0,3

Исходя из приведённой выше таблицы, 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.

## **5.2. Оценка влияния металло-фенольных комплексов на степень выраженности противодиабетической активности**

Впервые была проведена оценка противодиабетической активности металло-фенольных комплексов *in vivo*. Изначально осуществляли скрининг гипогликемического действия комплекса цинка с рутином (Zn-Rut) на крысах с дексаметазон-индуцированной моделью сахарного диабета. Вели мониторинг массы тела, оценивали содержание глюкозы в крови и моче, а также кетонов (моча).

Противодиабетическое действие комплексов (Zn-Rut, Zn-Querc) подтверждалось в эксперименте с участием мышей *C57BL/KsJ-db/db*, склонных к ожирению и сахарному диабету II типа. 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.

### **5.2.1. Предварительный скрининг противодиабетической активности модельного комплекса в сравнительном аспекте**

Изучение фармакологического действия комплексов рутина с цинком (как модельных, так и в извлечениях из ЛРС) изначально осуществлялось на лабораторных животных (крысах) на фоне моделирования дексаметазон-индуцированного диабета по методике, приведенной в п. 2.3.1. Результаты эксперимента представлены в Приложении М.

При периодическом измерении массы тела крыс (рисунок 14) во всех группах обнаружилось увеличение веса, обусловленное потреблением



большого количества жиров. После начала ежедневного введения дексаметазона и по окончании эксперимента наблюдалось снижение массы. Это дает возможность предположить о протекании патологических изменений в поджелудочной железе, в связи с которыми уменьшилось поступление глюкозы в ткани организма и началась мобилизация запасов жиров для синтеза АТФ.

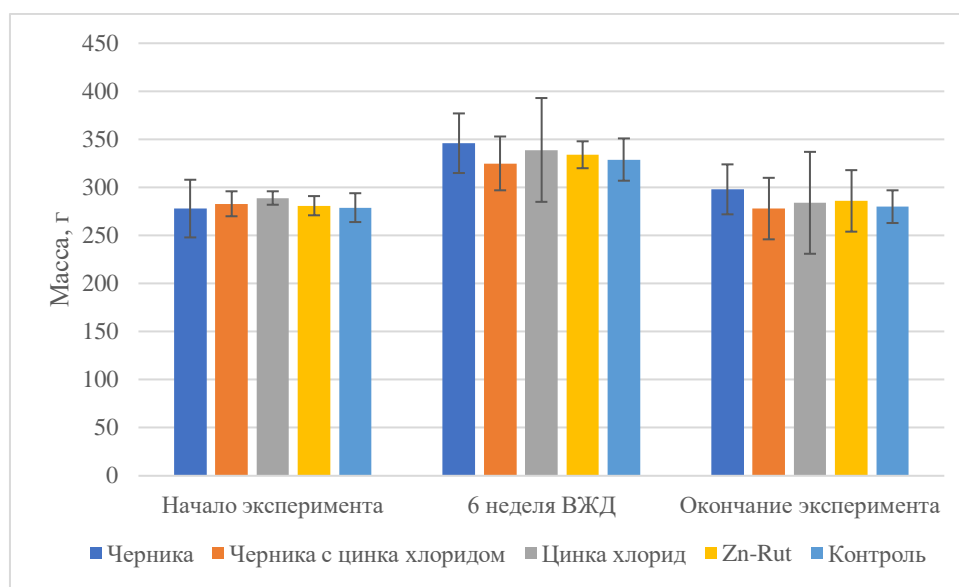


Рисунок 14 – Динамика массы тела лабораторных животных на разных этапах исследования ( $p < 0,05$ )

При анализе полученных данных по содержанию глюкозы в крови выявлено, что комплексное соединение рутин с цинком оказывает наиболее эффективное гипогликемическое действие, а водное извлечение из побегов черники обыкновенной и водный раствор цинка хлорида обладают наименьшей противодиабетической активностью. При этом стоит отметить, что при смешивании данных растворов наблюдается менее выраженное нарушение гликемии, нежели при их индивидуальном применении. Это может быть обусловлено как незначительной концентрацией металло-фенольных комплексов в извлечениях из побегов черники, так и их полным отсутствием в экстрактах ввиду их низкой стабильности.

Изменение концентрации глюкозы в крови на протяжении всего периода исследования представлено на рисунке 15.

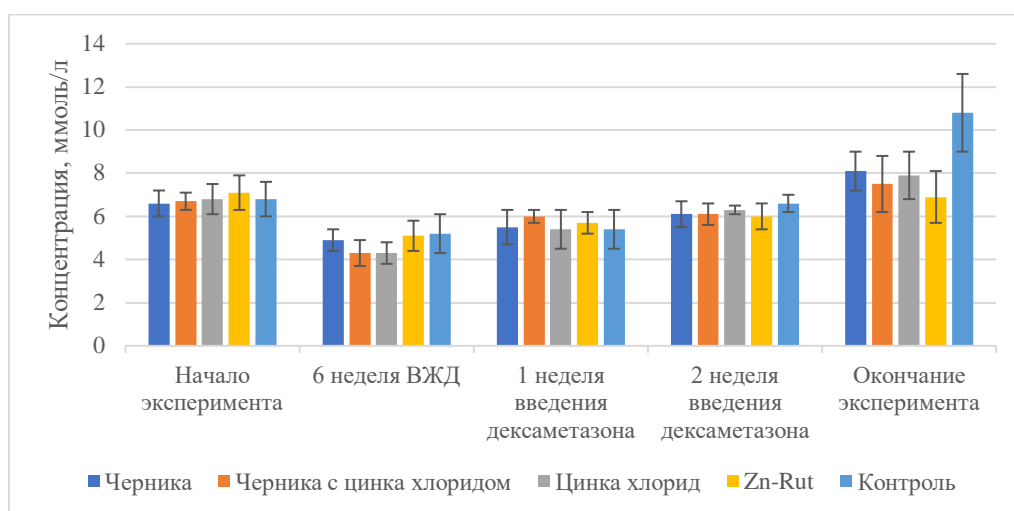


Рисунок 15 – Динамика содержания глюкозы в крови у лабораторных животных ( $p < 0,05$ )

Анализ содержания глюкозы и кетонов в моче (рисунок 16) показал, что в процессе моделирования сахарного диабета для всех групп животных характерна глюкозурия и кетонурия, что подтверждает протекание патологического процесса у крыс. Комплекс рутина с цинком продемонстрировал наибольшую эффективность при нарушениях гликемии, так как у группы, получающей данный комплекс, меньшие показатели содержания глюкозы и кетонов в моче.

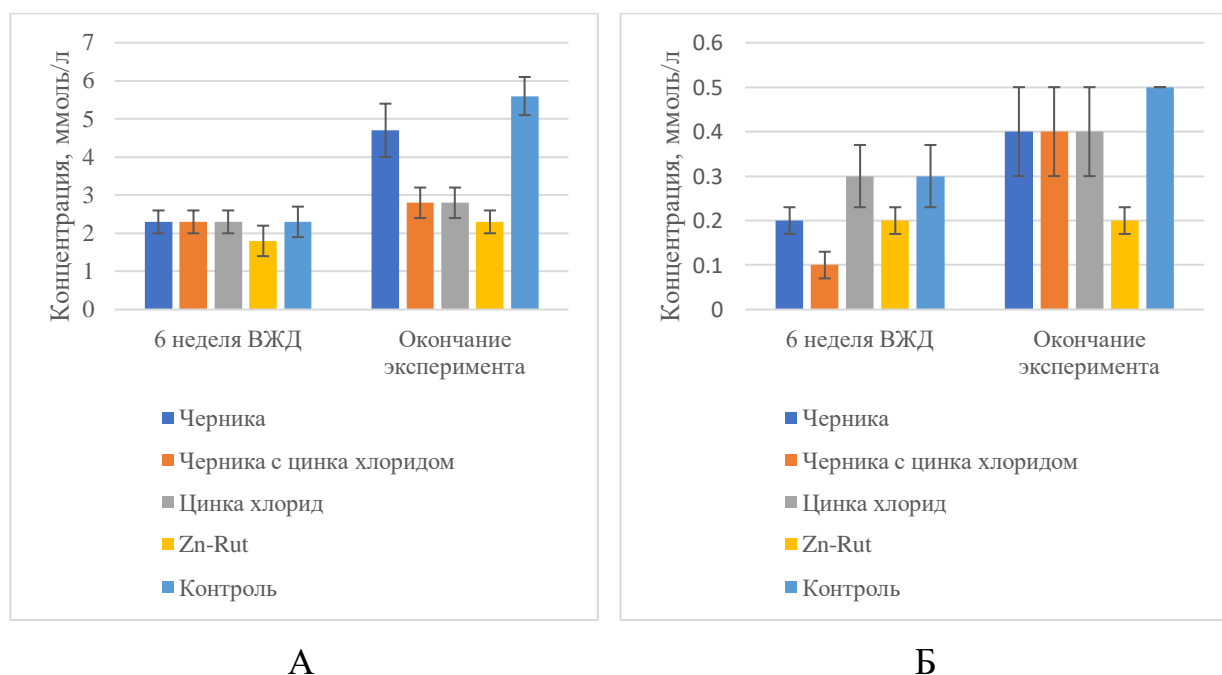


Рисунок 16 – Динамика содержания в моче: А – глюкозы, Б – кетонов ( $p < 0,05$ )

## 5.2.2 Оценка противодиабетической активности комплексов цинка с кверцетином и рутином

Мониторинг массы тела мышей в испытуемых группах и контроле представлен на рисунке 17. Исходя из анализа диаграммы, можно проследить тенденцию к снижению массы тела животных в испытуемых группах относительно контроля.

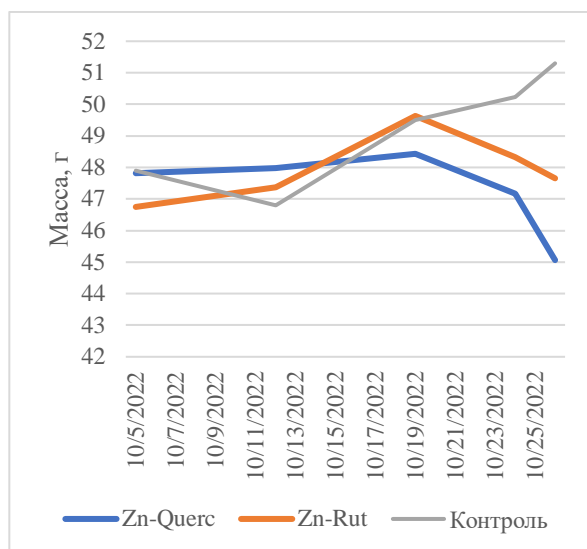


Рисунок 17 – Динамика массы тела мышей на протяжении эксперимента ( $p < 0,05$ ). Контроль [123]

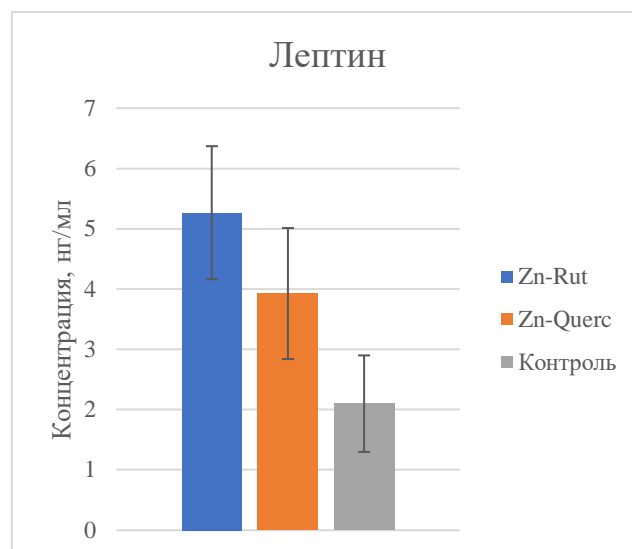


Рисунок 18 – Содержание лептина в контрольной и испытуемых группах на конец эксперимента ( $p < 0,05$ ). Контроль [124]

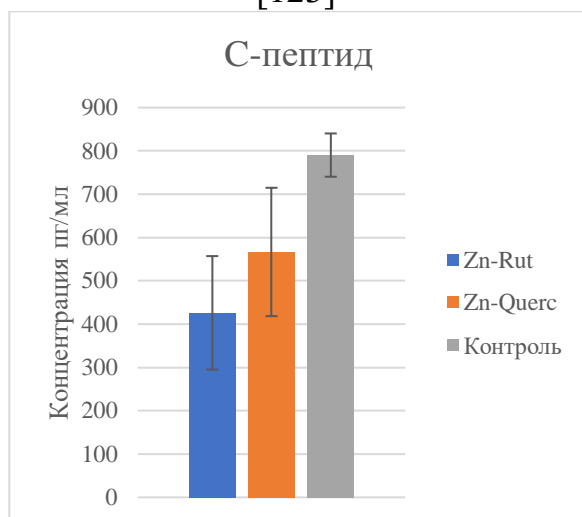


Рисунок 19 – Содержание С-пептида в контрольной и испытуемых группах на конец эксперимента ( $p < 0,05$ ). Контроль [125]

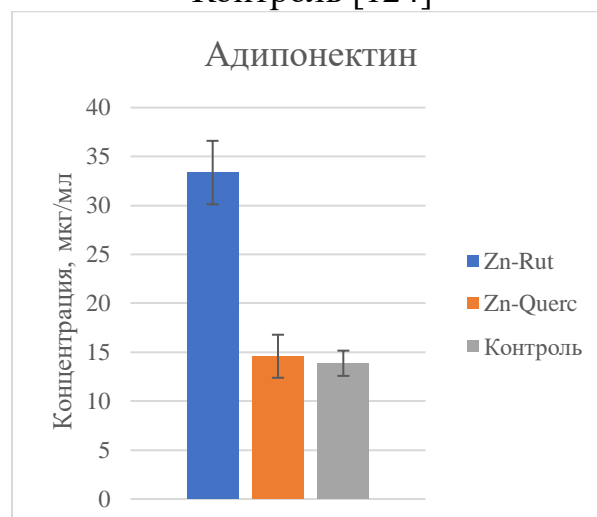


Рисунок 20 – Содержание адипонектина в контрольной и испытуемых группах на конец эксперимента ( $p < 0,05$ ). Контроль [126]

Содержание лептина в испытуемых группах возросло по сравнению с контролем для Zn-Rut в 2,5 раза, Zn-Querc – в 1,9 раз (рисунок 18). Лептин – гормон жировой ткани, регулирующий аппетит и обмен веществ. Его дефицит характеризуется снижением чувства сытости, что приводит к чрезмерному потреблению пищи и развитию ожирения [127]. Следовательно, комплексные соединения цинка с кверцетином и рутином способствуют выработке лептина, что приводит к снижению инсулинорезистентности.

На диаграмме (рисунок 19) можно отметить уменьшение концентрации С-пептида для обеих испытуемых групп. С-пептид – биологически неактивный маркер углеводного обмена, показатель секреции эндогенного инсулина. Увеличение его концентрации может наблюдаться при инсулиноме, почечной недостаточности, повышенной резистентности к инсулину, при эндокринных нарушениях, связанных с усиленной секрецией гормонов, обладающих противоположным инсулину действием. Однако снижение уровня С-пептида, 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 [128].

Наибольший рост уровня адипонектина отмечен у Zn-Rut (в 2,4 раза) относительно контроля (рисунок 20). Комплекс Zn-Querc не показал существенного влияния на рост исследуемого показателя. Адипонектин также является гормоном жировой ткани. Низкое содержание адипонектина в сыворотке является независимым фактором прогноза развития сахарного диабета II типа. Риск развития сахарного диабета II типа снижается при высоком уровне адипонектина в крови [129]. Следовательно, суммируя вышесказанное, комплекс Zn-Rut в сравнении с Zn-Querc обладает более выраженным противодиабетическим эффектом. Сводная информация по

оценке содержания трёх гормонов в крови испытуемых и контрольной групп животных приведена в таблице 31.

Таблица 31 – Содержание лептина, С-пептида и адипонектина в образцах крови экспериментальных животных

Гормон	Контроль (n=8) $x_{cp} \pm \Delta x$	Zn-Rut (n=8) $x_{cp} \pm \Delta x$	Zn-Querc (n=8) $x_{cp} \pm \Delta x$
Лептин (нг/мл)	2,1±0,8	5,3±1,1	3,9±1,0
С-пептид (пг/мл)	790±50	426±131	566±148
Адипонектин (мкг/мл)	13,9±1,3	33,3±3,3	14,6±2,2

### 5.3. Разработка альтернативной методики спектрофлуориметрического определения примеси алюминия с помощью рутина

Прежде чем приступить к созданию альтернативной методики спектрофлуориметрического определения примеси алюминия с помощью рутина, необходимо было снять спектры возбуждения и эмиссии комплекса. Интерпретируя полученные спектры, представленные на рисунке 21, можно сделать вывод о том, что наибольшая интенсивность флуоресценции при 565 нм возникает при длине волны возбуждения в 445 нм.

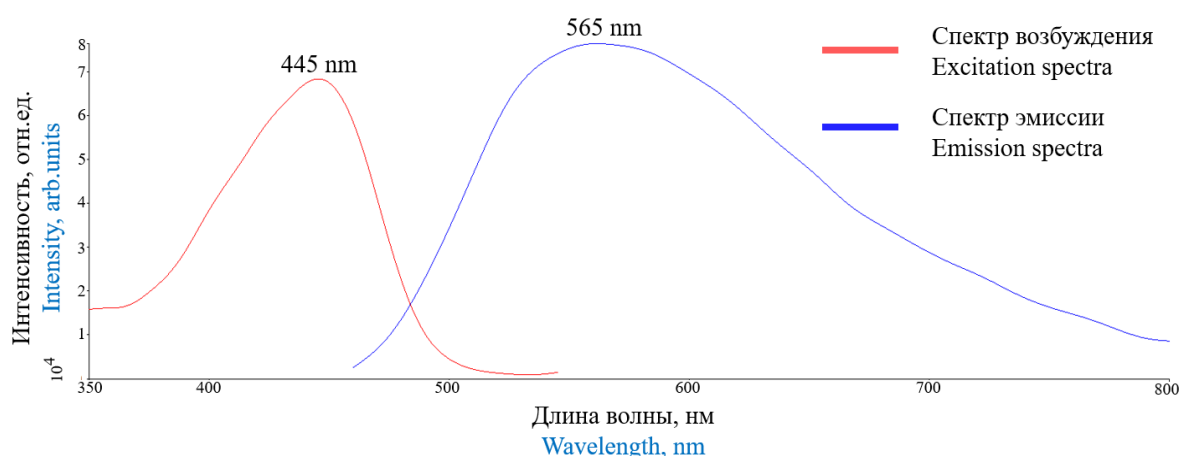


Рисунок 21 – Спектры возбуждения и эмиссии комплекса рутина с алюминием

Альтернативный подход определения алюминия спектрофлуориметрическим методом был нами реализован на примере субстанции калия хлорида (ГФ РФ ФС.2.2.0009 «Калия хлорид») (показатель

«Алюминий») и опирался на нормирование содержания примеси и общие условия пробоподготовки. В предложенном варианте методики предлагается заменить комплексообразователь 8-гидроксихинолин в хлороформе на рутин в 70 % спирте. Таким образом, в альтернативном подходе исключается использование токсичного растворителя (хлороформа), а также происходит замена дорогостоящего лиганда (8-гидроксихинолина) на более дешевый (рутин). Стоит отметить и экспрессность альтернативной методики по сравнению с предусмотренной в ГФ РФ в связи с отсутствием этапа проведения экстракции комплекса алюминия из водной фазы в хлороформ. Кроме того, процесс экстракции не всегда сопровождается полным количественным переходом, следовательно, фармакопейная методика не может отличаться требуемым уровнем воспроизводимости и достоверности результатов.

Было отмечено, что оптимальным значением рН для связывания металла с лигандом является 6,0. При более высоких значениях водородного показателя увеличивается вероятность связывания катиона алюминия с ОН-группами, что приводит к образованию осадка и искажению получаемых данных. Объём рутина (0,5 мг/мл), который необходимо добавить к навеске, содержащей алюминий-ион, составил 10 мл, что оптимально с точки зрения избытка лиганда и чувствительности методики.

Исходя из вышесказанного, нами предложена следующая альтернативная методика определения примеси алюминия в субстанции калия хлорида. В мерную колбу на 50 мл к испытуемому раствору (4,0 г субстанции калия хлорида в 10 мл ацетатного буферного раствора с рН 6,0) добавляют 10,0 мл раствора рутина в 70% спирте ( $C = 0,5$  г/мл), доводят до метки ацетатным буферным раствором рН 6,0. В мерную колбу на 50 мл к эталонному раствору (4,0 мл стандартного раствора алюминий-иона 1 мкг/мл) и контрольному раствору (10 мл ацетатного буферного раствора рН 6) добавляли 10,0 мл раствора рутина в 70% спирте ( $C = 0,5$  мг/мл), доводили до метки ацетатным

буферным раствором 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. 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 оценено влияние сопутствующих ионов ( $Zn^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$ ,  $Pb^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Cr^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$ ) на определение примеси алюминия при возможном совместном присутствии (таблица 32).

Таблица 32 – Оценка возможного влияния катионов  $Zn^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$ ,  $Pb^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Cr^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$  на количественное определение примеси алюминия при совместном присутствии.

Добавки сопутствующих ионов (мкг) в раствор с $Al^{3+}$ (4 мкг)	Интенсивность флуоресценции, отн. ед.	Измеренное содержание Al, мкг	Доверительный интервал $x \pm \Delta x$
1	2	3	4
$Zn^{2+}$ 4 мкг	50062	4,23	4,21 ± 0,04
	49783	4,20	
	49876	4,21	
$Fe^{2+}$ 4 мкг	49783	4,20	4,19 ± 0,03
	49597	4,18	
	49689	4,19	
$Pb^{2+}$ 4 мкг	49410	4,16	4,16 ± 0,04
	49597	4,18	
	49318	4,15	
$Cr^{3+}$ 4 мкг	49465	4,17	4,16 ± 0,02
	49603	4,18	
	49201	4,14	
$Ni^{2+}$ 4 мкг	49803	4,20	4,19 ± 0,02
	49744	4,20	
	49500	4,17	

1	2	3	4
Cu <sup>2+</sup> 4 мкг	49404	4,16	4,14 ± 0,02
	49186	4,14	
	49005	4,12	
Zn <sup>2+</sup> , Fe <sup>2+</sup> , Pb <sup>2+</sup> , Cu <sup>2+</sup> , Cr <sup>2+</sup> , Ni <sup>2+</sup> по 4 мкг	48504	4,06	4,04 ± 0,03
	48333	4,04	
	48015	4,01	

Данные таблицы 32 дают возможность экспериментально подтвердить отсутствие влияния других катионов (Zn<sup>2+</sup>, Fe<sup>2+</sup>, Pb<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Cr<sup>2+</sup>, Ni<sup>2+</sup>) при заданных условиях на результат определения примеси алюминия. Однако необходимо отметить, что при совместном присутствии всех анализируемых катионов возможно частичное уменьшение интенсивности флуоресценции комплекса алюминия, что приводит к незначительному снижению количественных характеристик результатов анализа.

Исходя из данных таблицы 33 также показано, что матрица субстанции калия хлорида не мешает обнаружению катиона алюминия после добавления стандартной добавки алюминия (4 мкг).

Таблица 33 – Оценка влияния матрицы субстанции калия хлорида на количественное определение примеси алюминия

№	Интенсивность флуоресценции, отн. ед.	Содержание, мкг	Доверительный интервал x ± Δx
KCl 4,0 г + Al <sup>3+</sup> 4 мкг			
I	48201	4,03	4,03 ± 0,05
II	48387	4,05	
III	48015	4,01	

*Линейность.* Построение градуировочной зависимости проводилось на 5 пробах с различным содержанием алюминий-иона (2 мкг, 3 мкг, 4 мкг, 5 мкг, 6 мкг). Линейная зависимость интенсивности эмиссии от содержания алюминия представлена на рисунке 22.



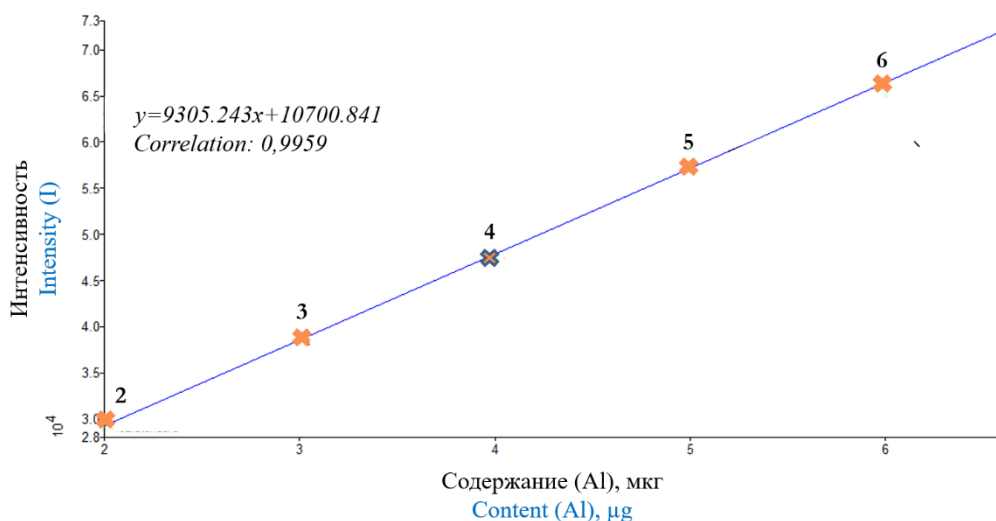


Рисунок 22 – Калибровочная зависимость интенсивности флуоресценции комплекса алюминия с рутином от концентрации алюминий-иона

Как видно из рисунка 22 зависимость интенсивности флуоресценции от концентрации имеет линейный характер. Коэффициент корреляции составил  $0,9959 > 0,99$ .

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

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

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

Стандартное отклонение аналитического сигнала оценивалось путём определения интенсивности флуоресценции раствора рутина с концентрацией  $0,1 \text{ мг/мл}$  (контрольный раствор) в 5 повторностях.

В таблице 34 представлены значения интенсивностей эталонного, контрольного и испытуемых растворов.

Таблица 34 – Значения интенсивностей эталонного, контрольного и испытуемых растворов

№	Интенсивность эталонного раствора ( $I_2$ ) (0,0001%)	Интенсивность контрольного раствора ( $I_3$ )	Интенсивность испытуемого раствора ( $I_1$ )	Заключение
1	47720,18	1785,23	6353,78	$I_2-I_3 > I_1-I_3$
2			7324,28	$I_2-I_3 > I_1-I_3$
3			7208,78	$I_2-I_3 > I_1-I_3$

Исходя из данных, представленных в таблице 30, можно сделать заключение о том, что содержание алюминия в субстанции калия хлорида не превышает содержание алюминия в эталонном растворе (*не более 0,0001%*) и предложенная альтернативная методика дает сходимые результаты.

Достоверность полученных данных проводили путем сравнения с результатами, полученными известным методом АЭС-ИСП. Для анализа использовали несколько длин волн, для которых характерны разные значения пределов обнаружения, величины шумов и мешающего влияния других компонентов пробы. На каждой длине волны были записаны спектры эмиссии и измерены интенсивности эмиссии растворителя и градуировочных растворов, рассчитаны метрологические характеристики. Результаты расчётов представлены в таблице 35.

Таблица 35 – Валидационные характеристики измерений содержания примеси алюминия при разных длинах волн

Длина волны, нм	Коэффициент корреляции, r	Предел обнаружения, мкг/л	Предел обнаружения, %
237,313	0,9984	10	$1 \times 10^{-5}$
308,215	0,9960	400	$4 \times 10^{-4}$
309,271	0,9996	90	$1 \times 10^{-4}$
394,401	0,9999	5	$5 \times 10^{-6}$
396,153	0,9999	1,3	$1.3 \times 10^{-6}$

Следует отметить, что несмотря на приемлемые результаты коэффициента корреляции на всех длинах волн, измерения при 308,215 и 309,271 нм отличаются высокими пределами обнаружения, высоким сигналом

шума, наложением спектральных линий марганца и железа соответственно (указанные элементы могут содержаться в следовых количествах в растворителе и перекрывать спектр эмиссии стандартного образца алюминия в низких концентрациях). При этом длина волны 396,153 нм характеризуется наибольшей чувствительностью и выбрана как основная для дальнейших исследований.

Анализ испытуемых образцов показал отсутствие максимума на спектре эмиссии на трёх аналитических длинах волн, то есть содержание алюминия не превышает нормируемого значения. При этом при анализе раствора для проверки правильности полученных результатов спектр имел максимум эмиссии на установленных длинах волн, следовательно, очень высокий сигнал фона основного вещества не мешает определению примеси алюминия в образцах калия хлорида.

### **Выводы к главе 5**

1. 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.

2. Смесь водного раствора цинка хлорида и водного извлечения из ЛРС обладает более выраженным 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 их низкой стабильности.

3. 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 и лептина в 2,5 раза относительно контроля. Комплекс цинка с кверцетином демонстрирует рост уровня лептина в 1,9 раза, однако концентрация адипонектина возросла незначительно в сравнении с контролем.

4. Была предложена 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.

5. 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 и 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 варьируются 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 СОКРАЩЕНИЙ

- АОА – антиоксидантная активность
- АЭС-ИСП – атомно-эмиссионная спектроскопия с индуктивно связанной плазмой
- БАВ – биологически активные вещества
- ВЖД – высокожировая диета
- ВЭТСХ – высокоэффективная тонкослойная хроматография
- ГКК – гидроксикоричная кислота
- ГСО – государственный стандартный образец
- ГФ РФ XIV – Государственная фармакопея Российской Федерации XIV
- ГФ РФ XV – Государственная фармакопея Российской Федерации XV
- ИК-спектроскопия – инфракрасная спектроскопия
- ЛРС - лекарственное растительное сырье
- НПВО – нарушенное полное внутреннее отражение
- ПДК – предельно допустимая концентрация
- ПИХ – процент ингибирования хемилюминесценции
- РСА – рентгеноструктурный анализ
- РФА – рентгенофлуоресцентный анализ
- СО – стандартный образец
- УФ-спектроскопия – ультрафиолетовая спектроскопия
- х.ч. – химически чистый
- ч.д.а – чистый для анализа
- 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

**СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ**

1. Zhang, Y. A Brief Review of Phenolic Compounds Identified from Plants: Their Extraction, Analysis, and Biological Activity / Y. Zhang, P. Cai, G. Cheng, Y.A. Zhang // *Natural Product Communications*. – 2022. – Vol. 17. – No. 1. DOI:10.1177/1934578X211069721.
2. Lin, D. An Overview of Plant Phenolic Compounds and Their Importance in Human Nutrition and Management of Type 2 Diabetes / D. Lin, M. Xiao, J. Zhao, Z. Li, B. Xing // *Molecules*. – 2016. – Vol. 21. – No. 10. – P. 1374. DOI: 10.3390/molecules21101374.
3. Roleira, F. M. Plant derived and dietary phenolic antioxidants: anticancer properties / F. M. Roleira, E. J. Tavares-da-Silva // *Food chemistry*. – 2015. – No. 183. – P. 235-258. DOI: 10.1016/j.foodchem.2015.03.039.
4. Bajpai, M. Phenolic contents and antioxidant activity of some food and medicinal plants / M. Bajpai, A. Pande, S. K. Tewari, D. Prakash // *International journal of food sciences and nutrition*. – 2005. – Vol. 56. – No. 4. – P. 287-291. DOI: 10.1080/09637480500146606.
5. Tan, J. DNA binding and cleavage activity of quercetin nickel (II) complex / J. Tan, L. Zhu, B. Wang, B. // *Dalton Trans*. – 2009. – No. 24. – P. 4722-4728. DOI: 10.1039/B901353A.
6. Monserrat, J-P. Ferrocenyl flavonoid-induced morphological modifications of endothelial cells and cytotoxicity against B16 murine melanoma cells / J-P. Monserrat, K. N. Tiwari, L. Quentin et al // *J. Organomet. Chem*. – 2013. – Vol. 734. – P. 78-85. DOI: 10.1016/j.jorganchem.2012.12.031.
7. Naso, L. G. Bovine serum albumin binding, antioxidant and anticancer properties of an oxidovanadium (IV) complex with luteolin / L. G. Naso, L. Lezama, M. Valcarcel // *J. Inorg. Biochem*. – 2016. – Vol. 157. – P. 80-93. DOI: 10.1016/j.jinorgbio.2016.01.021.
8. Kostova, I. Synthesis, physicochemical characterization, and cytotoxic screening of new zirconium complexes with coumarin derivatives / I. Kostova, I. Manolov, M.

- Karaivanova // Arch. Pharm. – 2001. Vol. 334. – No. 5. – P. 157–162. DOI: 10.1002/15214184(200105)334:5%3C157::aidardp157%3E3.0.co;2-s.
9. Malacaria, L. Review on Coordination Properties of Al(III) and Fe(III) toward Natural Antioxidant Molecules: Experimental and Theoretical Insights / L. Malacaria, G. A. Corrente, A. Beneduci, E. Furia, T. A. Marino // *Molecules*. – 2021. – Vol. 26. – No. 9. – P. 2603. DOI: 10.3390/molecules26092603.
  10. Li, T.-R. Synthesis, characterization, antioxidant activity and DNA-binding studies of two rare earth (III) complexes with naringenin-2-hydroxy benzoyl hydrazone ligand / T.-R. Li, Z.-Y. Yang // *Eur. J. Med. Chem.* – 2008. – No. 43. – P. 1688-1695. DOI: 10.1016/j.ejmech.2007.10.006.
  11. Zhou, J. Antioxidative and anti-tumour activities of solid quercetin metal(II) complexes / J. Zhou, L. Wang, J. Wang et al // *Transition Metal Chemistry*. – 2001. – No. 26. – P. 57-63. DOI: 10.1023/A:1007152927167.
  12. Prajapati, R. Structural characterization and cytotoxicity studies of ruthenium(II)–dmsO–chloro complexes of chalcone and flavone derivatives / R. Prajapati, S. K. Dubey, R. Gaur, R. K. Koiri et al. // *Polyhedron*. – 2010. – Vol. 29. – No. 3. – P. 1055–1061. DOI: 10.1016/j.poly.2009.11.012.
  13. De Souza, R. F. V. Antioxidant properties of complexes of flavonoids with metal ions / R. F. V. De Souza, W. F. De Giovani // *Redox Rep.* – 2004. – No. 9. – P. 97-104. DOI: 10.1179/135100004225003897.
  14. Zeng, Y.-B. Synthesis, characterization and DNA-binding properties of La (III) complex of chrysin / Y.-B. Zeng, N. Yang, W.-S. Liu, N. Tang // *J. Inorg. Biochem.* – 2003. – Vol. 97. – No. 3. – P. 258-264. DOI: 10.1016/s0162-0134(03)00313-1.
  15. Roy, S. Synthesis, characterisation and antioxidant activity of luteolin–vanadium (II) complex / S. Roy, S. Mallick, T. Chakraborty et al. // *Food Chem.* – 2015. – No. 173. – P. 1172-1178. DOI: 10.1016/j.foodchem.2014.10.141.
  16. Pastuszko, A. The synthesis, lipophilicity and cytotoxic effects of new ruthenium (II) arene complexes with chromone derivatives / A. Pastuszko, K. Majchrzak, M.

- Czyz, B. Kupcewicz, E. Budzisz // *J. Inorg. Biochem.* – 2016. – No. 159. – P. 133-141. DOI: 10.1016/j.jinorgbio.2016.02.020.
17. Жевлакова, А. А. Вопросы накопления БАВ лекарственных растений в зависимости от внешних факторов. Современные Тенденции Развития Технологий Здоровьесбережения / А. А. Жевлакова, А. М. Гареева, А. Ю. Булатова, Л. Д. Карпова // Сборник Научных Трудов Международной Научной Конференции. – 2020. – С. 20-28.
18. Andresen, E. Trace metal metabolism in plants / E. Andresen // *Journal of Experimental Botany.* – 2018. – Vol. 69. – No. 5. – P. 909-954. DOI:10.1093/jxb/erx465.
19. Che, J. Efficient and flexible uptake system for mineral elements in plants / J. Che // *New Phytol.* – 2018. – Vol. 219. – No. 2. – P.513-517. DOI: 10.1111/nph.15140.
20. Ikeda, N. E. A. Synthesis, characterization and biological evaluation of Rutin–zinc(II) flavonoid-metal complex / N. E. A. Ikeda, E. M. Novak, D. A. Maria, A. S. Velosa, R. M. S. Pereira // *Chem.-Biol. Interact.* – 2015. – No. 239. – P. 184–191. DOI: 10.1016/j.cbi.2015.06.011.
21. Wei, Y. Zinc-Binding Sites on Selected Flavonoids / Y. Wei, M. Guo // *Biological Trace Element Research.* – 2014. – Vol. 161. – No. 2. – P. 223-230. DOI: 10.1007/s12011-014-0099-0.
22. Kasprzak, M. M. Properties and applications of flavonoid metal complexes / M. M. Kasprzak, A. Erxleben, J. Ochocki // *RSC Adv.* – 2015. – No. 57. – c5ra05069c. DOI: 10.1039/C5RA05069C.
23. Yao, Y. Evaluation of General Synthesis Procedures for Bioflavonoid–Metal Complexes in Air-Saturated Alkaline Solutions / Y. Yao, M. Zhang, L. He, Y. Wang, S. Chen // *Frontiers in Chemistry.* – 2020. – Vol.8. – fchem.2020.00589. DOI: 10.3389/fchem.2020.00589.
24. Shastrala, K. Synthesis, characterization, and pharmacological evaluation of some metal complexes of quercetin as P-gp inhibitors / K. Shastrala, S. Kalam, K.

- Damerakonda et al. // *Futur. J. Pharm. Sci.* – 2021. Vol. 7. – No. 99. DOI: 10.1186/s43094-021-00252-0.
25. Khater, M. Metal complexes of flavonoids: their synthesis, characterization and enhanced antioxidant and anticancer activities / M. Khater, D. Ravishankar, F. Greco // *Future Medicinal Chemistry.* – 2019. – No 21. – P. 2845-2868. DOI: 10.4155/fmc-2019-0237.
26. Leon, I. Oxidovanadium (IV) complexes with chrysin and silibinin: anticancer activity and mechanisms of action in a human colon adenocarcinoma model / I. Leon, J. Cadavid-Vargas, I. Tiscornia et al. // *J. Biol. Inorg. Chem.* – 2015. – Vol. 20. – No. 7. – P. 1175-1191. DOI: 10.1007/s00775-015-1298-7.
27. Janka, V. Some ferrocenyl chalcones as useful candidates for cancer treatment / V. Janka, D. Zlatko, M. Ladislav, Gabriela // *In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim* – 2015. – Vol. 51. – No. 9. – P. 964-974. DOI: 10.1007/s11626-015-9919-6.
28. Naruse, T. Synergistic effects of meloxicam and conventional cytotoxic drugs in human MG-63 osteosarcoma cells / T. Naruse, Y. Nishida, N. Ishiguro // *Biomed. Pharmacother.* – 2007. – Vol. 61. – No. 6. – P. 338–346. DOI: 10.1016/j.biopha.2007.02.011.
29. Государственная фармакопея Российской Федерации XV изд. [Электронный ресурс] / МЗ РФ. – 2023. Т. 1. [Электронный ресурс]. – URL: <https://pharmacopeia.regmed.ru/> (дата обращения 10.09.2023).
30. Tsimogiannis, D. Classification of Phenolic Compounds in Plants / D. Tsimogiannis, V. Oreopoulou // *Polyphenols in Plants.* – 2019. – No. 16. – P. 263-284. DOI: 10.1016/B978-0-12-813768-0.00026-8.
31. Cosme, P. Cosme, P., Rodríguez, A. B., Espino, J., Garrido, M / P. Cosme, A. B. Rodríguez, J. Espino, M. Garrido // *In Antioxidants.* – 2020. – Vol. 9. – No. 12. – P. 1263. DOI: 10.3390/antiox9121263.
32. Caroch, M. The role of phenolic compounds in the fight against cancer—A review / M. Caroch, I. Ferreira // *Anticancer Agents Med. Chem.* – 2013. – Vol. 13. – No. 8. – P. 1236-1258. DOI: 10.2174/18715206113139990301.

33. Reis Giada, M. L. Food phenolic compounds: Main classes, sources and their antioxidant power / M. L. Reis Giada // In *Oxidative Stress and Chronic Degenerative Diseases—A Role for Antioxidants*. – 2013. – P. 87-112. DOI: 10.5772/51687.
34. Теплова, В. В. Природные полифенолы: биологическая активность, фармакологический потенциал, пути метаболической инженерии (обзор) / В. В. Теплова, Е. П. Исакова, О. И. Кляйн // *Прикладная биохимия и микробиология*. – 2018. – Т. 54. – № 23. – С. 215-235. DOI: 10.7868/S0555109918030017.
35. Kim, J. Metal-polyphenol Complexes as Versatile Building Blocks for Functional Biomaterial / J. Kim, K. Lee, Y. S. Nam // *Biotechnol. Bioproc.* – 2021. – Vol. 26. – P. 689-707. DOI: 10.1007/s12257-021-0022-4.
36. Xie, W. Metal-phenolic networks: facile assembled complexes for cancer theranostics / W. Xie, Z. Guo, L. Zhao, Y. Wei // *Theranostics*. – 2021. – Vol. 11. – No. 13. – P. 6407-6426. DOI: 10.7150/thno.58711.
37. Dias, M. C. Plant Flavonoids: Chemical Characteristics and Biological Activity / M. C. Dias, D. C. G. A. Pinto // *Molecules*. – 2021. – Vol. 26. – No.17. – P. 5377. DOI: 10.3390/molecules26175377.
38. Khoo, H. E. Anthocyanidins and anthocyanins: colored pigments as food, pharmaceutical ingredients, and the potential health benefits / H. E. Khoo, A. Azlan, S. T. Tang, S. M. Lim // *Food and nutrition research*. – 2017. – Vol. 61. – No. 1., 1361779. DOI: 10.1080/16546628.2017.1361779.
39. Запрометов, М. Н. Фенольные соединения растений и их биогенез / М. Н. Запрометов // *Итоги науки и техники*. – 1988. – Т. 27. – С. 4-186.
40. El-Seedi, H. R. Hydroxycinnamic Acids: Natural Sources, Biosynthesis, Possible Biological Activities, and Roles in Islamic Medicine / H. R. El-Seedi, E. A. Taher, B. Y. Sheikh et al. // *Studies in Natural Products Chemistry*. – 2018. – P. 269-292. DOI: 10.1016/B978-0-444-64068-0.00008-5.

41. Sova, M. Natural Sources, Pharmacokinetics, Biological Activities and Health Benefits of Hydroxycinnamic Acids and Their Metabolites / M. Sova, L. Saso // *Nutrients*. – 2020. – Vol. 12. – No. 8. – P. 2190. DOI: 10.3390/nu12082190.
42. Sasov, S. A. Hydrolyzable gallo-ellagi-tannins of *Chamaenerion angustifolium* (L.) are prospecting cytotoxic sources for use in oncology / S. A. Sasov, N. N. Totoeva, V. N. Tolkachev et al // *Problems Of Biological, Medical And Pharmaceutical Chemistry*. – 2019. – No. 22. – P. 28-34. DOI: 10.29296/25877313-2019-01-04.
43. Okuda, T. Tannins of Constant Structure in Medicinal and Food Plants—Hydrolyzable Tannins and Polyphenols Related to Tannins / T. Okuda, H. Ito // *Molecules*. – 2011. – Vol.16. – No. 3. – P. 2191-2217. DOI: 10.3390/molecules16032191.
44. Kovacic, P. Multifaceted approach to resveratrol bioactivity: Focus on antioxidant action, cell signaling and safety / P. Kovacic, R. Somanathan // *Oxidative medicine and cellular longevity*. – 2010. – Vol.3. – No. 2. – P. 86-100. DOI: 10.4161/oxim.3.2.3.
45. Gambini, J. Resveratrol: distribución, propiedades y perspectivas / J. Gambini, R. López-Grueso, G. Olaso-González et al // *Revista española de geriatría y gerontología*. – 2013. – Vol.48. – No. 2. – P. 79–88. DOI: 10.1016/j.regg.2012.04.007.
46. Osmakov, D. I. Lignans as Pharmacological Agents in Disorders Related to Oxidative Stress and Inflammation: Chemical Synthesis Approaches and Biological Activities / D. I. Osmakov, A. P. Kalinovskii, O.A. Belozerova // *International journal of molecular sciences*. – 2022. – No.23. – P. 6031. DOI: 10.3390/ijms23116031.
47. Teponno, R. B. Recent advances in research on lignans and neolignans / R. B. Teponno, S. Kusari, M. Spiteller // *Natural product reports*. – 2016. – No. 33. – P. 1044-1092. DOI: 10.1039/c6np00021e.



48. Michalak, A. Phenolic compounds and their antioxidant activity in plants growing under heavy metal stress / A. Michalak // Polish Journal of Environmental Studies. – 2006. – No. 15. – P. 523-530.
49. Jańczak-Pieniżek, M. Effect of Heavy Metal Stress on Phenolic Compounds Accumulation in Winter Wheat Plants / M. Jańczak-Pieniżek, J. Cichoński, P. Michalik, G. Chrzanowski // *Molecules*. – 2022. – Vo. 28. – No. 1. – P. 241. DOI: 10.3390/molecules28010241.
50. Selvaraj, S. Flavonoid-Metal Ion Complexes: A Novel Class of Therapeutic Agents / S. Selvaraj et al // *Medicinal Research Reviews*. – 2013. – No. 4. – P. 677-702. DOI: 10.1002/med.21301.
51. Hill, Z. D. Novel approach to Job's method: An undergraduate experiment / Z. D. Hill, P. MacCarthy // *J. of Chem. Education*. – 1986. – No. 63. – P. 162. DOI: 10.1021/ed063p162 .
52. Marcus, Y. On the Use of the Molar Ratio Method for Determining Association Stoichiometry / Y. Marcus // *Israel Journal of Chemistry*. – 1967. – Vol. 5. – No. 4. – P. 143-149. DOI: 10.1002/ijch.196700028.
53. Mabrouk, M. Ligand exchange method for determination of mole ratios of relatively weak metal complexes: a comparative study / M. Mabrouk, S. F. Hammad, M. A. Abdelaziz et al // *Chemistry Central Journal*. – 2018. – Vol. 12. – No. 143. – s13065. DOI: 10.1186/s13065-018-0512-4.
54. Wang, R. Validity and Reliability of Benesi-Hildebrand Method / R. Wang, Z. Yu // *Acta Physico-Chimica Sinica*. – 2007. – Vol. 23. – No. 9. – P. 1353-1359. DOI: 10.1016/S1872-1508(07)60071-0.
55. Buddhadev, Sen. Computation techniques of Bjerrum's method of determination of successive formation constants / Sen. Buddhadev // *Analytica Chimica Acta*. – 1962. – Vol. 27. – P. 515-527. DOI: 10.1016/S0003-2670(00)88547-5.
56. Erdogan, G. Potentiometric and Spectrophotometric Determination of the Stability Constants of Quercetin Complexes with Aluminium(III) and Iron(II) / G. Erdogan,

- R. Karadag, E. Dolen // *Reviews in Analytical Chemistry*. – 2015. – Vol. 24. – No. 4. – P. 247-261. DOI: 10.1515/REVAC.2005.24.4.247.
57. Malešev, D. Investigation of Molybdate(II)-Rutin Complex and the Determination of the Dissociation Constant of Rutin in Water-Ethanol Mixture / D. Malešev, Z. Radović, M. Jelikić-Stankov, M. Bogavac // *Anal. Lett.* – 1994. – No. 24. – P. 1159–1171. DOI: 10.1080/00032719108052961.
58. Rajendran, M. Molecular Modeling Study of Quercetin and their Metal Complexes / M. Rajendran, R. Ravichandran // *International Journal of Computer Applications*. – 2012. – Vol. 50. – No. 22. – P. 30–34. DOI: 10.5120/7937-1266.
59. Escandar, G. M. Complexing behavior of rutin and quercetin / G. M. Escandar, L. F. Sala // *Canadian Journal of Chemistry*. – 1991. – No. 69. – P. 1994-2001. DOI: 10.1139/v91-288.
60. Dimitrić Marković, J. M. Iron complexes of dietary flavonoids: Combined spectroscopic and mechanistic study of their free radical scavenging activity / J. M. Dimitrić Marković, Z. S. Marković, T. P. Brdarić, V. M. Pavelkić. // *Food Chemistry*. – 2011. – Vol. 129. – No. 4. – P. 1567-1577. DOI: 10.1016/j.foodchem.2011.06.008.
61. Guo, M. Iron-binding properties of plant phenolics and cranberry's bio-effects / M. Guo, C. Perez, Y. Wei, E. Rapoza, G. Su // *Dalton transactions*. – 2007. – No. 43. – P. 4951-4961. DOI: 10.1039%2Fb705136k.
62. Cornard, J. P. Computational and spectroscopic characterization of the molecular and electronic structure of the Pb(II)-quercetin complex / J. P. Cornard, L. Dangleterre, C. Lapouge // *The journal of physical chemistry*. – 2005. – Vol. 109. – No. 44. – P. 10044-10051. DOI: 10.1021/jp053506i.
63. Perez, C. A. Iron-binding and anti-Fenton properties of baicalein and baicalin / C. A. Perez, Y. Wei // *Journal of Inorganic Biochemistry*. – 2009. – Vol. 103. – No. 3. – P. 326-332. DOI: 10.1016/j.jinorgbio.2008.11.003.
64. Yang, A.-H. Spectroscopic and electrochemical studies on the evaluation of the radical scavenging activities of luteolin by chelating iron / A.-H. Yang, X.-Y. Shi, X.

- Li, F.-F. Li, Q.-Q. Zhang et al // RSC Advances. – 2014. – Vol. 4. – No. 48. – P. 25227-25233. DOI: 10.1039/C4RA01396D.
65. Dong, H. Enhanced antioxidant activity, antibacterial activity and hypoglycemic effect of luteolin by complexation with manganese and its inhibition kinetics on xanthine oxidase / H. Dong, X. Yang, J. He et al // RSC Advances. – 2017. – Vol. 7. – No. 84. – P. 53385-53395. DOI: 10.1039/C7RA11036G.
66. Engelmann, M. D. Stability of Ferric Complexes with 3-Hydroxyflavone (Flavonol), 5,7-Dihydroxyflavone (Chrysin), and 3',4'-Dihydroxyflavone / M. D. Engelmann, R. Hutcheson, I. F. Cheng // Journal of Agricultural and Food Chemistry. – 2005. – Vol. 53. – No. 8. – P. 2953-2960. DOI: 10.1021/jf048298q.
67. Al-Kindy, S. M. Z. Development of a selective fluorimetric technique for rapid trace determination of zinc using 3-hydroxyflavone / S. M. Z. Al-Kindy, K. H. Al-Hinai, F. E. O. Suliman // Arabian Journal of Chemistry. – 2011. – Vol. 4. – No. 2. – P. 147-152. DOI: 10.1016/j.arabjc.2010.06.029.
68. Dangleterre, L. Interaction of lead (II) chloride with hydroxyflavones in methanol: A spectroscopic study / L. Dangleterre, J.-P. Cornard // Polyhedron. – 2005. – Vol. 24. – No. 12. – P. 1593-1598. DOI: 10.1016/j.poly.2005.04.019.
69. Dimitrić Marković, J. M. Oxidation of kaempferol and its iron(III) complex by DPPH radicals: spectroscopic and theoretical study / J. M. Dimitrić Marković, D. Amić, B. Lučić // Monatshefte Für Chemie - Chemical Monthly. – 2014. Vol. 145. – No. 4. – P. 557-563. DOI: 10.1007/s00706-013-1135-z.
70. Xu, Y. Kaempferol Binding to Zinc(II), Efficient Radical Scavenging through Increased Phenol Acidity / Y. Xu, L.-L. Qian, J. Yang, R.-M. Han, J.-P. Zhang, L. H. Skibsted // The Journal of Physical Chemistry B. – 2018. – Vol. 122. – No. 44. – P. 10108–10117. DOI: 10.1021/acs.jpcc.8b08284.
71. Tan, M. Synthesis, cytotoxic activity, and DNA binding properties of copper (II) complexes with hesperetin, naringenin, and apigenin / M. Tan, J. Zhu, Y. Pan et al // Bioinorg. Chem. Appl. – 2009. – 347872. DOI: 10.1155/2009/347872.

72. Yang, A.-H. Spectroscopic and electrochemical studies on the evaluation of the radical scavenging activities of luteolin by chelating iron / A.-H. Yang, X.-Y. Shi, X. Li, F.-F. Li, Q.-Q. Zhang et al // RSC Advances. – 2014. – Vol. 4. – No. 48. – P. 25227-25233. DOI: 10.1039/C4RA01396D.
73. Lapouge, C. Spectroscopic and Theoretical Studies of the Zn(II) Chelation with Hydroxyflavones / C. Lapouge, L. Dangleterre // The Journal of Physical Chemistry A. – 2006. Vol. 110. – No. 45. – P. 12494–12500. DOI: 10.1021/jp064362q.
74. Brodowska, K. Naringenin complexes with copper ions: potentiometric studies / K. Brodowska // Biotechnol. Food Sci. – 2013. – Vol. 77. – No. 1. – P. 45-53. DOI: 10.34658/bfs.2013.77.1.45-53
75. Dimitrić Marković, J. M. Comparative spectroscopic and mechanistic study of chelation properties of fisetin with iron in aqueous buffered solutions. Implications on in vitro antioxidant activity / J. M. Dimitrić Marković, Z. S. Marković, T. P. Brdarić // Dalton Transactions. – 2011. – Vol. 40. – No. 17. – P. 4560-4571. DOI: 10.1039/C0DT01834A.
76. Dimitrić Marković, J. M. Study on fisetin–aluminium(III) interaction in aqueous buffered solutions by spectroscopy and molecular modeling / J. M. Dimitrić Marković, Z. S. Marković et al. // Journal of Inorganic Biochemistry. – 2009. – Vol. 103. – No. 5. – P. 723-730. DOI: 10.1016/j.jinorgbio.2009.01.005.
77. Dimitrić Marković, J. M. A joint application of spectroscopic, electrochemical and theoretical approaches in evaluation of the radical scavenging activity of 3-OH flavones and their iron complexes towards different radical species / J. M. Dimitrić Marković, Z. S. Marković, I. A. Pašti et al // Dalton Transactions. – 2012. – Vol. 41. – No. 24. – P. 7295. DOI: 10.1039/c2dt30220a.
78. Zheng, K. Structural characterization of chlorogenic acid-metal complexes derived from the aqueous extracts of medicinal plants and their DNA cleavage and antibacterial activities / K. Zheng, Y. Liu, L. Peng, Z. Li, W. Xu // Arabian Journal of Chemistry. – 2023. – Vol. 16. – No. 7. – P. 104835. DOI: 10.1016/j.arabjc.2023.104835.

79. Dias, K. Does the Combination of Resveratrol with Al (III) and Zn (II) Improve its Antioxidant Activity? / K. Dias, S. Nikolaou // *Natural Product Communications*. – 2011. – Vol. 6. – No. 11. – 1934578X1100601.
80. Fucassi, F. Metal chelation by a plant lignan, secoisolariciresinol diglucoside / F. Fucassi, A. Heikal, L. I. Mikhalovska, G. Standen et al. // *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*. – 2014. – Vol. 80. – No. 3. – P. 345-351. DOI: 10.1007/s10847-014-0411-9.
81. Tahara, K. Identification of a hydrolyzable tannin, oenothetin B, as an aluminum-detoxifying ligand in a highly aluminum-resistant tree, *Eucalyptus camaldulensis* / K. Tahara, K. Hashida, Y. Otsuka, S. Ohara, K. Kojima, K. Shinohara // *Plant physiology*. – 2014. – Vol. 164. – No. 2. – P. 683-693. DOI: 10.1104/pp.113.222885.
82. Balogh-Hergovich, É. Quercetin 2,3-Dioxygenase Mimicking Ring Cleavage of the Flavonolate Ligand Assisted by Copper. Synthesis and Characterization of Copper(I) Complexes [Cu(PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub>(fla)] (fla = Flavonolate) and [Cu(PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub>(O-bs)] (O-bs = O-Benzoylsalicylate) / É. Balogh-Hergovich, J. Kaizer, G. Speier, V. Fülöp, L. Párkányi // *Inorganic Chemistry*. – 1999. – Vol. 38. – No. 17. – P. 3787-3795. DOI: 10.1021/ic990175d.
83. Speier, G. The oxygenation of flavonol by copper(I) and copper(II) flavonolate complexes. The crystal and molecular structure of bis(flavonolato)copper(II) / G. Speier, G. Argay // *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications*. – 1991. – Vol. 8. – P. 551. DOI: 10.1039/C39910000551.
84. Pieniżek, E. Syntheses, crystal structures and antioxidant study of Zn(II) complexes with morin-5'-sulfonic acid (MSA) / E. Pieniżek, J. Kalembkiewicz, M. Dranka // *Journal of Inorganic Biochemistry*. – 2014. – No. 141. – P. 180-187. DOI: 10.1016/j.jinorgbio.2014.09.005.
85. Sorenson, S. A bipyridine-ligated zinc(II) complex with bridging flavonolate ligation: synthesis, characterization, and visible-light-induced CO release reactivity / S. Sorenson, M. Popova, A. M. Arif, L. M. Berreau // *Acta Crystallographica*

- Section C Structural Chemistry. – 2017. – Vol. 73. – No. 9. – P. 703-709. DOI: 10.1107/S2053229617011366.
86. Akhter, S. Synthesis, structural insights, and biological screening of DNA targeted Akhter(II)( $\eta^6$ -p-cymene) complexes containing bioactive amino-benzothiazole ligand scaffolds / S. Akhter, A. Rehman, S. M. A. Abidi, F. Arjmand, S. Tabassum // N. J. of Chem. – 2022. – No. 46. – 00883a. DOI: 10.1039/D2NJ00883A.
87. Тарасевич, Б. Н. ИК спектры основных классов органических соединений. Справочные материалы / Б. Н. Тарасевич // МГУ имени М.В. Ломоносова, химический факультет, кафедра органической химии (Москва). – 2012.
88. Souza, M. Exploratory and discriminant analysis of plant phenolic profiles obtained by UV–vis scanning spectroscopy / M. Souza, J. José Comin, R. Moresco et al // Journal of Integrative Bioinformatics. – 2021. – Vol. 18. – No. 3. – P. 56. DOI: 10.1515/jib-2019-0056.
89. Luis Alexandre-Tudo, J. The Role of UV-Visible Spectroscopy for Phenolic Compounds Quantification in Winemaking / J. Luis Alexandre-Tudo, W. du Toit // Frontiers and New Trends in the Science of Fermented Food and Beverages. – 2019. – intechopen.79550. DOI: 10.5772/intechopen.79550.
90. Raza, A. Rutin–Nickel Complex: Synthesis, Characterization, Antioxidant, DNA Binding, and DNA Cleavage Activities / A. Raza, S. Bano, X. Xu, R. X. Zhang et al // Biological Trace Element Research. – 2016. – Vol. 178. – No. 1. – P. 160-169. DOI: 10.1007/s12011-016-0909-7.
91. Блохин, М. А. Физика рентгеновских лучей / М. А. Блохин. – Изд. 2-е, перераб. – М.: Гос. изд-во технико-теорет. лит. – 1957. – 518 с.
92. Блохин, М. А. Методы рентгеноспектральных исследований / М. А. Блохин. – М.: Гос. Изд-во физико-математической лит. – 1959. – 388 с.
93. Баринский, Р. Л., Нефёдов В. И. Рентгеноспектральное определение заряда атомов в молекулах / Р. Л. Баринский, В. И. Нефёдов. – М.: Наука. – 1966. – 247 с.

94. Беккер, Ю. Спектроскопия / Ю. Беккер; пер. с нем. Л. Н. Казанцевой; под ред. А. А. Пупышева, М. В. Поляковой. – М.: Техносфера. – 2009. – 527 с.
95. Бондаренко, А. В. Применение метода фундаментальных параметров при рентгенофлуоресцентном анализе пульповых продуктов обогащения руд / А. В. Бондаренко, А. В. Белоновский Я. М. Кацман // Горная промышленность. – 2021. – No. 5-2.
96. Al-Ishaq, R. K. Flavonoids and Their Anti-Diabetic Effects: Cellular Mechanisms and Effects to Improve Blood Sugar Levels / R. K. Al-Ishaq, M. Abotaleb, P. Kubatka, K. Kajo, D. Büsselberg // Biomolecules. – 2019. – Vol. 9. – No. 9. – P. 430. DOI: 10.3390%2Fbiom9090430.
97. Kopustinskiene, D. M. Flavonoids as Anticancer Agents / D. M. Kopustinskiene, V. Jakstas, A. Savickas, J. Bernatoniene // Nutrients. – 2020. – Vol. 12. – No. 2. – P. 457. DOI: 10.3390%2Fnu12020457.
98. Ndagi, U., Mhlongo, N., & Soliman, M. E. Metal complexes in cancer therapy - an update from drug design perspective / U. Ndagi, N. Mhlongo, M. E. Soliman // Drug design, development and therapy. – 2017. – Vol. 11. – P. 599-616. DOI: 10.2147/dddt.s119488.
99. Srivastava, A. Insulino-mimetic and anti-diabetic effects of vanadium compounds / A. K. Srivastava, M. Z. Mehdi // Diabetic medicine: a journal of the British Diabetic Association. – 2005. – Vol. 22. – No. 1. – P. 2-13. DOI: 10.1111/j.1464-5491.2004.01381.x.
100. Zhou, J. Synthesis, characterization, antioxidative and antitumor activities of solid quercetin rare earth (III) complexes / J. Zhou, L.-F. Wang, J.-Y. Wang, N. Tang // J. Inorg. Biochem. – 2001. – Vol. 83. – No. 1. – P. 41-48. DOI: 10.1016/s0162-0134(00)00128-8.
101. Tan, J. From GC-rich DNA binding to the repression of survivin gene for quercetin nickel(II) complex: implications for cancer therapy / J. Tan, L. C. Zhu, B. Wang // BioMetals. – 2010. – Vol. 23. – P. 1075-1084. DOI: 10.1007/s10534-010-9353-x.

102. Tabassum, S. New modulated design and synthesis of quercetin–CuII/ZnII–Sn2IV scaffold as anticancer agents: in vitro DNA binding profile, DNA cleavage pathway and Topo-I activity / S. Tabassum, M. Zaki, Mohd. Afzal, F. Arjmand, F. // Dalton Transactions. – 2013. – No. 42. – P. 10029-10041. DOI: 10.1039/C3DT50646K.
103. Manhita, A. Extracting natural dyes from wool—an evaluation of extraction methods / A. Manhita, T. Ferreira, A. Candeias et al. // Anal Bioanal Chem. – No. 400. – P. 1501-1514. DOI: 10.1007/s00216-011-4858-x.
104. Лупанова, И. А. Методы первичного скрининга БАВ растительного происхождения (обзор) / И. А. Лупанова // Биофармацевтический Журнал. – 2022. – Т.14. - № 2. – С. 26-32. DOI: 10.30906/2073-8099-2022-14-2-26-32.
105. Mondal, P. Spectroscopic overview of quercetin and its Cu(II) complex interaction with serum albumins / P. Mondal, A. Bose // BioImpacts. – 2019. – Vol. 9. = No. 2. – P. 115-121. DOI: 10.15171/bi.2019.15.
106. Xu, H. Determination of Rutin with UV-Vis Spectrophotometric and Laser-Induced Fluorimetric Detections Using a Non-Scanning Spectrometer / H. Xu, Y. Li et al // Analytical Letters. – 2010. – No. 43. – P. 893-904. DOI: 10.1080/00032710903488795.
107. Bljajić, K. Chemical Composition, Antioxidant and  $\alpha$ -Glucosidase-Inhibiting Activities of the Aqueous and Hydroethanolic Extracts of *Vaccinium myrtillus* Leaves / K. Bljajić // Molecules. – 2017. – No. 703. DOI: 10.3390/molecules22050703.
108. Brasanac-Vukanovic, S. Wild Bilberry (*Vaccinium myrtillus* L., Ericaceae) from Montenegro as a Source of Antioxidants for Use in the Production of Nutraceuticals / S. Brasanac-Vukanovic // Molecules. – 2018. – No. 1864. DOI: 10.3390/molecules23081864.
109. Ganesan, K. Polyphenol-Rich Dry Common Beans (*Phaseolus vulgaris* L.) and Their Health Benefits / K. Ganesan // International Journal of Molecular Sciences. – 2017. – No. 2331. DOI: 10.3390/ijms18112331.



110. Куркин, В. А. Количественное определение суммы флавоноидов в побегах черники обыкновенной / В. А. Куркин // Химико-фармацевтический журнал. – 2013. – Т. 47. – № 4. – С.34-37. DOI: 10.30906/0023-1134-2013-47-4-34-37.
111. Chan, S. W. Effects of Bilberry Supplementation on Metabolic and Cardiovascular Disease Risk / S. W. Chan, B. Tomlinson // *Molecules*. – 2020. – Vol. 25. – No. 7. – P. 1653. DOI: 10.3390/molecules25071653.
112. Европейская Конвенция о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях (Страсбург, 18 марта 1986 г.). [Электронный ресурс]. – URL: <http://docs.cntd.ru/document/901909691> (дата обращения: 15.03.2023)ю
113. Reyes-Farias, M. The Anti-Cancer Effect of Quercetin: Molecular Implications in Cancer Metabolism / M. Reyes-Farias, C. Carrasco-Pozo // *International Journal of Molecular Sciences* – 2019. – Vol. 20. – No. 13. – P. 3177. DOI: 10.3390/ijms20133177.
114. Vimalraj, S. Kaempferol-zinc(II) complex synthesis and evaluation of bone formation using zebrafish model / S. Vimalraj, S. Saravanan, G. Hariprabu et al // *Life Sciences*. – 2020. – 117993. DOI: 10.1016/j.lfs.2020.117993.
115. da Silva, W. M. B. Synthesis of Quercetin-Metal Complexes, In Vitro and In Silico Anticholinesterase and Antioxidant Evaluation, and In Vivo Toxicological and Anxiolytic Activities / W. M. B. da Silva, S. de Oliveira Pinheiro et al // *Neurotoxicity Research*. – 2019. – Vol. 37. – No. 4. – P. 893-903. DOI: 10.1007/s12640-019-00142-7.
116. Zhou, J. Antioxidative and anti-tumour activities of solid quercetin metal(II) complexes / J. Zhou, L. Wang, J. Wang et al // *Transition Metal Chemistry*. – 2001. – Vol. 26. – P. 57-63. DOI: 10.1023/A:1007152927167.
117. Elder, D. ICH Q9 Quality Risk Management / D. Elder, A. Teasdale // *ICH Quality Guidelines*. – 2017. – P. 579-610.

118. Hänsch, R. Physiological functions of mineral micronutrients (Cu, Zn, Mn, Fe, Ni, Mo, B, Cl) / R. Hänsch, R. R. Mendel, R. R // *Current Opinion in Plant Biology*. – 2009. – Vol. 12. – No. 3. – P. 259-266. DOI: 10.1016/j.pbi.2009.05.006.
119. Xiao, Z., He, L., Hou, X., Wei, J., Ma, X., et al. Relationships between Structure and Antioxidant Capacity and Activity of Glycosylated Flavonols / Z. Xiao, L. He, X. Hou, J. Wei, X. Ma et al. // *Foods*. – 2021. – Vol. 10. – No. 4. – P. 849. DOI: 10.3390/foods10040849.
120. Sancineto, L. l-Arginine Improves Solubility and ANTI SARS-CoV-2 Mpro Activity of Rutin but Not the Antiviral Activity in Cells / L. Sancineto, C. Ostacolo, D. Ortega-Alarcon et al // *Molecules*. – 2021. – Vol. 26. – No. 19. – P. 6062. DOI: 10.3390/molecules26196062.
121. Navarro-Orcajada, S. Study of the fluorescence and interaction between cyclodextrins and neochlorogenic acid, in comparison with chlorogenic acid / S. Navarro-Orcajada, A. Matencio, C. Vicente-Herrero et al // *Scientific Reports*. – 2021. – Vol. 11. – No. 3275. DOI: 10.1038/s41598-021-82915-9.
122. Piyaratne, P. S. Extraction and Purification of (E)-Resveratrol from the Bark of Conifer Species / P. S. Piyaratne, R. LeBlanc, A. D. Myracle, et al // *Processes*. – 2022. – Vol. 10. – No. 4. – P. – 647. DOI: 10.3390/pr10040647.
123. Burke, S. J. db/db Mice Exhibit Features of Human Type 2 Diabetes That Are Not Present in Weight-Matched C57BL/6J Mice Fed a Western Diet / S. J. Burke, H. M. Batdorf et al // *Journal of Diabetes Research*. – 2017. – P. 1–17. DOI: 10.1155/2017/8503754.
124. Shapiro, N. I. Leptin Exacerbates Sepsis-Mediated Morbidity and Mortality / N. I. Shapiro, E. V. Khankin, M. Van Meurs et al // *The Journal of Immunology*. – 2010. – Vol. 185. – No. 1. – P. 517-524. DOI: 10.4049/jimmunol.0903975.
125. Jeon, H.-J. Seapolynol and Dieckol Improve Insulin Sensitivity through the Regulation of the PI3K Pathway in C57BL/KsJ-db/db Mice / H.-J. Jeon, K.-Y. Yoon, E.-J. Koh, J. Choi et al // *Journal of Food and Nutrition Research*. – 2015. – Vol. 3. – No. 10. – P. 648-652. DOI: 10.12691/jfnr-3-10-5.

126. Leung, J. C. K. The role of leptin and its short-form receptor in inflammation in db/db mice infused with peritoneal dialysis fluid / J. C. K. Leung, L. Y. Y. Chan, M. F. Lam et al // *Nephrology Dialysis Transplantation*. – 2012. – Vol. 27. – No. 8. – P. 3119-3129. DOI: 10.1093/ndt/gfr774.
127. Obradovic, M. Leptin and Obesity: Role and Clinical Implication / M. Obradovic, E. Sudar-Milovanovic, S. Soskic, M. Essack, S. Arya et al // *Frontiers in Endocrinology*. – 2021. – No. 12. DOI: 10.3389/fendo.2021.585887.
128. Poteryaeva, O. N. The role of C-peptide in regulation of the insulin signaling system (systematic review) / O. N. Poteryaeva, I. F. Usynin // *Сибирский Научный Медицинский Журнал*. – 2021. – Vol. 41. – No. 1. – P. 33-43. DOI: 10.18699/SSMJ20210103.
129. Tanyanskiy, D. A. The influence of adiponectin on carbohydrates, lipids, and lipoproteins metabolism: analysis of signaling mechanisms / D. A. Tanyanskiy, A. D. Denisenko // *Obesity and Metabolism*. – 2021. – Vol. 18. – No. 2. – P. 103-111. DOI: 10.14341/omet12754.

## ПРИЛОЖЕНИЕ А

Акты апробации и внедрения результатов диссертационной работы

### ПРИЛОЖЕНИЕ А.1

«С.Ж.Асфендияров атындағы  
Қазақ ұлттық медицина  
университеті» коммерциялық  
емес акционерлік  
қоғамы



Некоммерческое  
акционерное общество  
«Казанский национальный  
медицинский университет  
имени С.Д.Асфендиярова»

050012, Алматы қаласы, Төле би көшесі, 94 үй  
телефон: +7727/292-78-85, 292-79-37, 338-70-30  
факс: +7727/292-13-88, e-mail: info@kaznmu.kz

050012, город Алматы, улица Төле би, д.94  
телефон: +7727/292-78-85, 292-79-37, 338-70-30  
факс: +7727/292-13-88, e-mail: info@kaznmu.kz

УТВЕРЖДАЮ

Декан Школы фармации  
КазНМУ им. С.Д.Асфендиярова  
д.фарм-н., профессор

З.Б. Сакипова  
«16» декабря 2023 г.



#### Акт внедрения результатов научно-исследовательской работы в учебный и научный процесс

**Наименование предложений для внедрения:** подходы к синтезу комплексов металлов с фенольными соединениями растительного происхождения, обладающих широким спектром биологической активности, полученных при выполнении диссертационной работы «*Синтез, установление структуры и скрининговая оценка биологической активности комплексов металлов с фенольными соединениями растительного происхождения*». Результаты представлены в следующих публикациях:

- Тернинко, И.И., Вишняков, Е.В., Топоркова, В.И., Узйли, А.К. Изучение структуры комплекса рутина с цинком методами ЯМР и спектрофотометрии // Сборник материалов международной научной конференции «90 лет – от растения до лекарственного препарата: достижения и перспективы». – 2021. – С. 379-384/
- Вишняков, Е.В., Тернинко, И.И., Топоркова, В.И. Сборник VII Междисциплинарной конференции «Молекулярные и Биологические аспекты Химии, Фармацевтики и Фармакологии» МОБИ-ХимФарма2021. – 2021. – С. 12.
- Топоркова, В.И., Вишняков, Е.В., Сидоров, К.О., Тернинко, И.И., Ивкин Д.Ю. Оценка влияния минерального комплекса рутина на степень выраженности противодиабетической активности // Разработка и регистрация лекарственных средств. – 2021. – Т.10. – №4. – С. 197-205.
- Вишняков, Е.В., Орлова, К.В. Подходы к получению комплекса цинка с кверцетином в сравнительном аспекте // Сборник материалов XII Всероссийской научной конференции студентов и аспирантов с международным участием «Молодая фармация – потенциал будущего». – 2022. – Т.1. – С. 99-101.

## ПРИЛОЖЕНИЕ А.1

- Вишняков, Е.В., Тернинко, И.И., Орлова, К.В. Оценка структурных характеристик комплекса цинка с кверцетином // Сборник материалов международной научной конференции «От биохимии растений к биохимии человека». – 2022. – С.143-148.

**Автор разработки:** *Вишняков Евгений Владимирович*, ассистент кафедры фармацевтической химии, химик-аналитик ИЛ (ЦККЛС) ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет», *Тернинко Инна Ивановна*, профессор кафедры фармацевтической химии ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет».

**Где и куда внедрено:** использовано в образовательной деятельности кафедры фармацевтической, токсикологической химии, фармакогнозии и ботаники Школы фармации КазНМУ при изучении подходов к получению металло-фенольных комплексов, оценке их структурных характеристик в курсе лекций и практических занятий дисциплин «Получение и исследование лекарственных средств» (специальность 5В110300-«Фармация» (бакалавриат)), «Современные направления создания новых лекарственных веществ» (специальность 6М074800-«Технология фармацевтического производства» (магистратура)) и в научной деятельности кафедры.

**Результаты внедрения:** алгоритм синтеза металло-фенольных комплексов, предложенный авторами, позволяет получать изучаемые соединения с высоким выходом, а также с минимальными экономическими и временными издержками. Данный унифицированный подход можно использовать для создания новых перспективных лекарственных кандидатов с возможностью трансфера методологии на различные классы фенолов и металлы.

И.О., Заведующей кафедры  
«Фармацевтической и токсикологической химии, фармакогнозии и ботаники»  
Школы Фармации  
КазНМУ им. С.Д. Асфендифрова  
К.х.н., доцент

 А.Л. Ахелова

## ПРИЛОЖЕНИЕ А.2


**УТВЕРЖДАЮ**  
**Ректор ФГБОУ ВО СПХФУ**  
**Минздрава России,**  
**д.фарм.н., профессор**  

И.А. Наркевич  
12 марта 2024 г.




### Акт внедрения результатов научно-практической работы в научно-исследовательский процесс

Комиссия в составе:

Председателя	проректора по научной работе, д-р. фармацевт. наук	Е.В. Флисюк
и членов комиссии	научного сотрудника департамента науки и подготовки научно-педагогических кадров, канд. фармацевт. наук директора департамента науки и подготовки научно- педагогических кадров, канд. биол. наук	К.О. Сидорова  И.А. Титович

назначенная приказом ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России от «12» марта 2021 г. № 100, составила акт о нижеследующем:

Результаты диссертационного исследования Вишнякова Евгения Владимировича на тему «Синтез, установление структуры и скрининговая оценка биологической активности комплексов металлов с фенольными соединениями растительного происхождения», представленного на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук, а именно: «Синтез и оценка структуры металло-фенольных комплексов», использованы в научно-исследовательской деятельности кафедры химической технологии лекарственных веществ ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России в рамках получения новых биологически активных веществ на основе металлов и фенольных соединений растительного происхождения.

Председатель	проректор по научной работе, д-р. фармацевт. наук	 Е.В. Флисюк
члены комиссии	научный сотрудник департамента науки и подготовки научно- педагогических кадров, канд. фармацевт. наук директор департамента науки и подготовки научно- педагогических кадров, канд. биол. наук	 К.О. Сидоров   И.А. Титович



## ПРИЛОЖЕНИЕ А.3

**УТВЕРЖДАЮ**  
**Ректор ФГБОУ ВО СПХФУ**  
**Минздрава России,**  
**д.фарм.н., профессор**

И.А. Наркевич

«12» ~~Мая~~ 2024 г.




**Акт внедрения  
 результатов научно-практической работы  
 в учебный процесс**

Комиссия в составе:

Председателя	проректора по учебной работе, канд. фармацевт. наук.	Ю.Г. Ильиновой
и членов комиссии	начальника учебно-методического отдела директора департамента науки и подготовки научно-педагогических кадров, канд. биол. наук	Д.С. Сиссе И.А. Титович


назначенная приказом ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России от «12» марта 2021 г. № 100, составила акт о нижеследующем.

Результаты диссертационного исследования Вишнякова Евгения Владимировича на тему «Синтез, установление структуры и скрининговая оценка биологической активности комплексов металлов с фенольными соединениями растительного происхождения», представленного на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук, а именно: «Синтез и оценка структуры комплексов металлов с фенольными соединениями растительного происхождения» внедрены в учебный процесс на факультете промышленной технологии лекарств по учебной дисциплине «Химическая технология лекарственных субстанций и витаминов» в рамках программы высшего образования – программы бакалавриата 18.03.01 Химическая технология и дисциплине Химическая технология лекарственных субстанций программы магистратуры по специальности 18.04.01 Химическая технология очной формы обучения.

Председатель	проректор по учебной работе, канд. фармацевт. наук, доцент	 Ю.Г. Ильинова
члены комиссии	начальник учебно-методического отдела директор департамента науки и подготовки научно-педагогических кадров, канд. биол. наук	 Д.С. Сиссе  И.А. Титович

## ПРИЛОЖЕНИЕ А.4

УТВЕРЖДАЮ  
 Проректор по науке, инновациям и  
 цифровизации ФГБОУ ВО «ВГУ»,  
 д-р физ.-мат. наук, доц.



\_\_\_\_\_ Д.В. Костин  
 «08» декабря 2023 г.

### Акт внедрения результатов научно-исследовательской работы в учебный и научный процесс

**Наименование предложений для внедрения:** подходы к синтезу комплексов металлов с фенольными соединениями растительного происхождения, обладающих широким спектром биологической активности, полученных при выполнении диссертационной работы *«Синтез, установление структуры и скрининговая оценка биологической активности комплексов металлов с фенольными соединениями растительного происхождения»*. Результаты представлены в следующих публикациях:

- Тернинко, И.И., Вишняков, Е.В., Топоркова, В.И., Уэйли, А.К. Изучение структуры комплекса рутина с цинком методами ЯМР и спектрофотометрии // Сборник материалов международной научной конференции «90 лет – от растения до лекарственного препарата: достижения и перспективы». – 2021. – С. 379-384/
- Вишняков, Е.В., Тернинко, И.И., Топоркова, В.И. Сборник VII Междисциплинарной конференции «Молекулярные и Биологические аспекты Химии, Фармацевтики и Фармакологии» МОБИ-ХимФарма2021. – 2021. – С. 12.
- Топоркова, В.И., Вишняков, Е.В., Сидоров, К.О., Тернинко, И.И., Ивкин Д.Ю. Оценка влияния минерального комплекса рутина на степень выраженности противодиабетической активности // Разработка и регистрация лекарственных средств. – 2021. – Т.10. – №4. – С. 197-205.
- Вишняков, Е.В., Орлова, К.В. Подходы к получению комплекса цинка с кверцетином в сравнительном аспекте // Сборник материалов XII Всероссийской научной конференции студентов и аспирантов с международным участием «Молодая фармация – потенциал будущего». – 2022. – Т.1. – С. 99-101.
- Вишняков, Е.В., Тернинко, И.И., Орлова, К.В. Оценка структурных характеристик комплекса цинка с кверцетином // Сборник материалов международной научной конференции «От биохимии растений к биохимии человека». – 2022. – С.143-148.
- Орлова К.В., Вишняков Е.В., Тернинко И.И. Синтез и оценка структуры комплекса цинка с хлорогеновой кислотой // Сборник материалов XIII Всероссийской научной конференции студентов и аспирантов с международным участием «Молодая фармация – потенциал будущего». Том 1. – Санкт-Петербург: Издательство СПХФУ. – 2023. – С.289-293.

**Автор разработки:** *Вишняков Евгений Владимирович*, химик-аналитик ИЛ (ЦКЛС) ФГБОУ ВО СПХФУ, ассистент кафедры фармацевтической ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет», *Тернинко*



**ПРИЛОЖЕНИЕ А.4**

*Инна Ивановна*, профессор кафедры фармацевтической химии ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет».

**Где и куда внедрено:** использовано в образовательной деятельности кафедры фармацевтической химии и фармацевтической технологии фармацевтического факультета федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Воронежский государственный университет» при изучении синтеза комплексов металлов с фенольными соединениями растительного происхождения, подбора условий получения и анализа структуры в курсе лекций и лабораторных занятий дисциплины «Фармацевтическая химия» (специальность 33.05.01 «Фармация») и в научной деятельности кафедры.

**Результаты внедрения:** алгоритм синтеза металло-фенольных комплексов, предложенный авторами, позволяет получать изучаемые соединения с высоким выходом, а также с минимальными экономическими и временными издержками. Данный унифицированный подход можно использовать для создания новых перспективных лекарственных кандидатов с возможностью трансфера методологии на различные классы фенолов и металлы.

Заведующий кафедрой фармацевтической химии и  
фармацевтической технологии фармацевтического факультета  
федерального государственного бюджетного образовательного  
учреждения высшего образования  
«Воронежский государственный университет»,  
д-р.фарм.наук, проф.

А.И. Сливкин

## ПРИЛОЖЕНИЕ А.5

**ЦФА** | центр  
фармацевтической  
аналитики

Общество с ограниченной ответственностью  
«ЦЕНТР ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОЙ АНАЛИТИКИ»

Юр./факт. адрес: 117149, Россия, г. Москва, Симферопольский бульвар, д.8, пом.1/1.  
ИНН 9701010444, КПП 772701001, ОГРН 1157746853780, ОКПО 49285758,  
Р/с 40702810838000271503 в ПАО СБЕРБАНК г. Москва, к/с 30101810400000000225,  
Тел. +7 (499) 281-81-11 website: cpha.ru



«УТВЕРЖДАЮ»

Директор исследовательского центра  
«Центр фармацевтической аналитики»  
к.фарм.н. Комаров Т.Н.

М.П.

2023 г.

### АКТ О ВНЕДРЕНИИ РЕЗУЛЬТАТОВ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОЙ РАБОТЫ

**Наименование предложений для внедрения:** Методика спектрофлуориметрического определения элементной примеси алюминия с помощью рутин в субстанции калия хлорида, разработанная в процессе выполнения диссертационной работы «Синтез, установление структуры и скрининговая оценка биологической активности комплексов металлов с фенольными соединениями растительного происхождения». Результаты представлены на XIII Всероссийской научной конференции студентов и аспирантов с международным участием «Молодая фармация – потенциал будущего» (г. Санкт-Петербург, 2023).

Толстикова А.А., Вишняков Е.В. Альтернативный способ спектрофлуориметрического определения примеси алюминия / А.А. Толстикова, Е.В. Вишняков // Сборник материалов XII Всероссийской научной конференции студентов и аспирантов с международным участием «Молодая фармация – потенциал будущего» (г. Санкт-Петербург, 01.03 – 11.04. 2023). Том 1. – Санкт-Петербург: Издательство СПбХФУ. – 2023. – С.340-344.

**Авторы разработки:** Вишняков Евгений Владимирович, аспирант кафедры фармацевтической химии ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет», Тернико Инна Ивановна, д.фарм.н., профессор кафедры фармацевтической химии ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет».

**Где и куда внедрено:** использовано в практической деятельности ООО "Центр фармацевтической аналитики" при разработке методик для фармацевтических субстанций и лекарственных средств, в которых нормируется содержание примеси алюминия.

**Результаты внедрения:** методика контроля содержания элементной примеси алюминия, предложенная авторами, воспроизводима, проста, экспрессна и прошла процедуру валидации по параметрам «Специфичность», «Линейность», «Предел обнаружения». Апробация осуществлялась на субстанции калия хлорида.

Заведующая лабораторией биотехнологических исследований



Арчакова Ольга Александровна

*Archakova*

10 июня 2023 г.

## ПРИЛОЖЕНИЕ А.6



ПРАВИТЕЛЬСТВО САНКТ-ПЕТЕРБУРГА

КОМИТЕТ ПО ЗДРАВООХРАНЕНИЮ

**Санкт-Петербургское государственное  
бюджетное учреждение здравоохранения**

**«Северо-Западный центр по контролю  
качества лекарственных средств»**

Ленинский пр., д. 140, Санкт-Петербург, 198216

Тел./факс: (812) 376-97-89

E-mail: szckkls@zdrav.spb.ru

ОКПО 27530269 ОКОГУ 2300229 ОГРН 1037811001513

ИНН/КПП 7805063359/780501001

5/н № 29.11.2023

на № \_\_\_\_\_ от \_\_\_\_\_

### АКТ О ВНЕДРЕНИИ РЕЗУЛЬТАТОВ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОЙ РАБОТЫ

**Наименование предложений для внедрения:** «Методика спектрофлуориметрического определения элементной примеси алюминия с помощью рутина в субстанции калия хлорида», разработанная в процессе выполнения диссертационной работы «Синтез, установление структуры и скрининговая оценка биологической активности комплексов металлов с фенольными соединениями растительного происхождения». Результаты представлены на XIII Всероссийской научной конференции студентов и аспирантов с международным участием «Молодая фармация – потенциал будущего» (г. Санкт-Петербург, 2023).

Толстикова А.А., Вишняков Е.В. Альтернативный способ спектрофлуориметрического определения примеси алюминия / А.А. Толстикова, Е.В. Вишняков // Сборник материалов XII Всероссийской научной конференции студентов и аспирантов с международным участием «Молодая фармация – потенциал будущего» (г. Санкт-Петербург, 01.03 – 11.04. 2023). Том 1. – Санкт-Петербург: Издательство СПХФУ, – 2023. – С.340-344.

**Автор разработки:** Вишняков Евгений Владимирович, аспирант кафедры фармацевтической химии ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет», Тернинко Инна Ивановна, д.фарм.н., профессор кафедры фармацевтической химии ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет».

**Где и куда внедрено:** использовано в практической деятельности СПб ГБУЗ «СЗЦККЛС» при проведении контроля качества фармацевтических субстанций и лекарственных средств, в которых нормируется содержание примеси алюминия.

**Результаты внедрения:** методика контроля содержания элементной примеси алюминия, предложенная авторами, воспроизводима, проста, экспрессна и прошла процедуру валидации по параметрам «Специфичность», «Линейность», «Предел обнаружения». Апробация осуществлялась на субстанции калия хлорида.

Начальник ИЛ СПб ГБУЗ «СЗЦККЛС»



Сергеева А.В.



## ПРИЛОЖЕНИЕ А.7



АКЦИОНЕРНОЕ ОБЩЕСТВО «ФИРМА МЕДПОЛИМЕР»  
АО «ФИРМА МЕДПОЛИМЕР»

г. Санкт-Петербург, Муниципальный округ Ржевка,  
Индустриальный пр., д.86, литера А, 195279  
e-mail: medpolymer@medp.spb.ru, www.medp.spb.ru  
тел./факс: +7 (812) 240-05-75  
КПП 780601001, ИНН 7806008745  
ОГРН 1027804177961, ОКПО 00480230



№ \_\_\_\_\_  
на № \_\_\_\_\_ от \_\_\_\_\_

### АКТ О ВНЕДРЕНИИ РЕЗУЛЬТАТОВ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОЙ РАБОТЫ

**Наименование предложений для внедрения:** Методика спектрофлуориметрического определения элементной примеси алюминия с помощью рутина в субстанции калия хлорида, разработанная в процессе выполнения диссертационной работы «Синтез, установление структуры и скрининговая оценка биологической активности комплексов металлов с фенольными соединениями растительного происхождения». Результаты представлены на XIII Всероссийской научной конференции студентов и аспирантов с международным участием «Молодая фармация – потенциал будущего» (г. Санкт-Петербург, 2023).

Толстикова А.А., Вишняков Е.В. Альтернативный способ спектрофлуориметрического определения примеси алюминия / А.А. Толстикова, Е.В. Вишняков // Сборник материалов XII Всероссийской научной конференции студентов и аспирантов с международным участием «Молодая фармация – потенциал будущего» (г. Санкт-Петербург, 01.03 – 11.04. 2023). Том 1. – Санкт-Петербург: Издательство СПХФУ. – 2023. – С.340-344.

**Автор разработки:** *Вишняков Евгений Владимирович*, аспирант кафедры фармацевтической химии ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет», *Гершичко Инна Ивановна*, д.фарм.н., профессор кафедры фармацевтической химии ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет».

**Где и куда внедрено:** использовано в практической деятельности отдела контроля качества АО «Фирма «Медполимер» при разработке аналитических методик для контроля следовых количеств примесей в фармацевтических субстанциях и лекарственных средствах, в которых нормируется содержание примеси алюминия.

**Результаты внедрения:** методика контроля содержания элементной примеси алюминия, предложенная авторами, воспроизводима, проста, экспрессна и прошла процедуру валидации по параметрам «Специфичность», «Линейность», «Предел обнаружения». Апробация осуществлялась на субстанции калия хлорида.

Начальник ОКК

К.А.Сергеева  
«29» декабря 2023 г.

## ПРИЛОЖЕНИЕ Б

Таблица Б – Соотношение компонентов и константы устойчивости ряда металл-фенольных комплексов

Катион	pH/ среда	Катион: Лиганд	logβ	Ссылка
<b>Кверцетин</b>				
Al <sup>3+</sup>	этанол	1:2	24,1	56
Co <sup>2+</sup>	Вода, pH 5,0	1:1	4,87	57
Cd <sup>2+</sup>	Вода, pH 4,4	1:1	6,35	58
Fe <sup>3+</sup>	Ацетатный буфер	1:1	44,2	59
Fe <sup>3+</sup>	Вода, pH 8	1:1	5,50	60
Fe <sup>2+</sup>	Вода, pH 8	1:1	6,30	61
Fe <sup>2+</sup>	Фосфатный буфер, pH 4	1:2	10,70	61
Fe <sup>2+</sup>	Вода, pH 7,2	1:1	6,65	61
Fe <sup>3+</sup>	Ацетатный буфер, pH 4	1:2	9,56	60
Ni <sup>2+</sup>	Вода, pH 5,0	1:1	5,57	57
Pb <sup>2+</sup>	Метанол	1:1	4,87	62
Pb <sup>2+</sup>	Метанол	1:2	7,71	62
Pb <sup>2+</sup>	Метанол	2:1	8,23	62
<b>Байкалеин</b>				
Fe <sup>3+</sup>	Вода, pH 6,0	1:1	4,43	60
Fe <sup>3+</sup>	Вода, pH 6,0 Фосфатный буфер	1:1	6,47	63
<b>Лютеолин</b>				
Fe <sup>3+</sup>	Этанол	1:1	8,4	64
Mn <sup>2+</sup>	Этанол	1:1	-*	65
<b>Рутин</b>				
Co <sup>2+</sup>	Вода, pH 5,0	1:1	6,04	57
Cu <sup>2+</sup>	Вода, pH 6,1	1:2	10,76	57
Zn <sup>2+</sup>	Вода, pH 6,2	1:1	4,68	57
Zn <sup>2+</sup>	Метанол	1:2	-*	20

Катион	pH/ среда	Катион: Лиганд	log $\beta$	Ссылка
		1:1	-*	21
Ni <sup>2+</sup>	Вода, pH 6,2	1:2	8,95	57
Fe <sup>3+</sup>	Ацетатный буфер	1:1	44,1	59
Fe <sup>2+</sup>	Вода, pH 7,2	1:2	11,85	61
Pb <sup>2+</sup>	Вода, pH 4,5	1:2	13,81	57
<b>3-гидроксифлавон</b>				
Cd <sup>2+</sup>	Вода, pH 6,2	1:1	5,90	57
Co <sup>2+</sup>	Вода, pH 6,2	1:1	10,87	57
Ni <sup>2+</sup>	Вода, pH 6,1	1:1	7,63	57
Fe <sup>3+</sup>	Этанол/Вода	1:1	13,29	66
Fe <sup>2+</sup>	Вода, pH 7,2	1:2	11,30	61
Al <sup>3+</sup>	Метанол/Вода, pH 6,0	1:1	5,17	67
Al <sup>3+</sup>	Метанол/Вода, pH 6,0	1:2	9,91	67
Zn <sup>2+</sup>	Вода, pH 5,8	1:1	8,51	57
Pb <sup>2+</sup>	Вода, pH 6,1	1:1	7,74	57
Pb <sup>2+</sup>	Метанол	1:1	4,97	68
<b>Кемпферол</b>				
Fe <sup>2+</sup>	Вода, pH 8,0	1:1	4,10	69
Fe <sup>3+</sup>	Вода, pH 4,0	1:1	3,35	69
Zn <sup>2+</sup>	Этанол	1:2	5,39	70
<b>Апигенин</b>				
Al <sup>3+</sup>	Диоксан/Вода	1:1	8,24	71
Fe <sup>2+</sup>	Диоксан/Вода	1:1	7,52	71
Cu <sup>2+</sup>	Этанол/Вода	1:2	-*	71
<b>Лютеолин</b>				
Fe <sup>3+</sup>	Этанол	1:1	8,40	72
<b>3'4'-дигидроксифлавон</b>				
Al <sup>3+</sup>	Метанол	1:1	6,7	68
Al <sup>3+</sup>	Метанол/Вода, pH 6,0	1:1	4,85	67

Катион	pH/ среда	Катион: Лиганд	logβ	Ссылка
Al <sup>3+</sup>	Метанол/Вода, pH 6,0	1:2	9,24	67
Zn <sup>2+</sup>	Метанол	1:1	5,19	73
Fe <sup>3+</sup>	Этанол/Вода	1:1	20,87	66
Fe <sup>2+</sup>	Вода, pH 7,2	1:2	11,08	61
Pb <sup>2+</sup>	Метанол	1:1	5,09	68
Pb <sup>2+</sup>	Метанол	1:2	8,82	68
<b>Нарингенин</b>				
Cu <sup>2+</sup>	ДМСО/Вода	1:1	25,3	74
<b>Физетин</b>				
Fe <sup>3+</sup>	Вода, pH 7,0	1:1	4,78	75
Fe <sup>3+</sup>	Вода, pH 9,0	1:1	4,95	75
Fe <sup>3+</sup>	Вода, pH 4,0	1:2	9,85	75
Al <sup>3+</sup>	Вода, pH 5,0	1:1	5,05	76
Al <sup>3+</sup>	Вода, pH 2,0	1:1	4,32	76
Al <sup>3+</sup>	Вода, pH 8,0	1:1	7,13	76
Al <sup>3+</sup>	Вода, pH 5,0	1:2	6,52	76
Al <sup>3+</sup>	Вода, pH 8,0	1:2	10,41	76
<b>Морин</b>				
Cu <sup>2+</sup>	Вода, pH 5,8	1:2	4,94	57
Fe <sup>3+</sup>	Этанол/Вода	2:1	8,22	77
Zn <sup>2+</sup>	Вода, pH 5,5	1:2	6,74	57
<b>Хлорогеновая кислота</b>				
Cu <sup>2+</sup>	Вода, pH <5	1:1	4,23	78
	Вода, pH 5–6.5	1:2	-*	
Fe <sup>3+</sup>	Вода, pH <5	1:1	5,20	78
	Вода, pH 5–6.5	1:2	4,56	
<b>Ресвератрол (стильбен)</b>				
Al <sup>3+</sup>	Вода	1:2	-*	79
Zn <sup>2+</sup>	Вода	3:1	-*	79
<b>Секоизоларициресинол (лигнан)</b>				
Ca <sup>2+</sup>	-*	1:1	20,34	80

Катион	pH/ среда	Катион: Лиганд	log $\beta$	Ссылка
Cu <sup>2+</sup>	-*	1:1	5,99	80
Pb <sup>2+</sup>	-*	1:1	4,26	80
Ni <sup>2+</sup>	-*	1:1	2,77	80
Fe <sup>2+</sup>	-*	1:1	2,46	80
Ag <sup>+</sup>	-*	1:1	1,90	80
<b>Оэнотеин Б (таннин)</b>				
Al <sup>3+</sup>	Вода, pH 6	2:1	-*	81
Примечание: «-*» – данные отсутствуют, log $\beta$ - константа устойчивости				



## ПРИЛОЖЕНИЕ В

Расчет дозировок объектов исследования для изучения противодиабетической активности комплекса рутина с цинком у лабораторных животных.

1. Согласно информации на упаковке для приготовления настоя из побегов черники обыкновенной необходимо взять 1,25 г ЛРС и 100 мл экстрагента (свежекипяченая вода).

2. Расчет объема препарата для внутрижелудочного введения на 1 крысу:

$$\text{Доза} = \frac{\text{ТД} * \text{КП} * m}{70}$$

Где: ТД – терапевтическая доза для человека средней массой тела 70 кг;

КП – коэффициент пересчета доз для лабораторных животных (для крыс КП = 6,2);

m – масса тела лабораторного животного, кг.

$$\text{Доза} = \frac{100 * 6,2 * 0,28}{70} = 2,5 \text{ мл}$$

3. Исходя из данных таблиц 20, 21 производили расчет массы (а) и количества вещества (б) БАВ в 1,25 г ЛРС с помощью формул:

$$\text{а) } m_{\text{БАВ}} = \frac{C_{\text{БАВ}} * 1,25}{100}$$

$$\text{б) } n_{\text{БАВ}} = \frac{x}{M}$$

где:  $C_{\text{БАВ}}$  – содержание БАВ в 100 г ЛРС, %;

M – молярная масса БАВ

4. Оптимальное соотношение компонентов для проведения процесса комплексообразования – 1:1. Количество вещества цинка хлорида, необходимое для получения комплекса, рассчитывается по формуле:

$$n_{\text{ZnCl}_2} = n_{\text{БАВ}}$$

Результаты расчета пунктов 3 и 4 представлены в виде таблицы:

Таблица – Содержание БАВ в 1,25 г побегов черники обыкновенной.

№	Определяемые БАВ	С <sub>БАВ</sub> , %	m <sub>БАВ</sub> , г	M <sub>БАВ</sub> , г/моль	n <sub>БАВ</sub> = n(ZnCl <sub>2</sub> ), моль
1	Сумма флавоноидов в пересчете на рутин	1,35	0,017	664,6	2,6*10 <sup>-5</sup>
2	Сумма фенолкарбоновых кислот в пересчете на хлорогеновую кислоту	1,39	0,017	354,3	4,8*10 <sup>-5</sup>
3	Сумма органических кислот в пересчете на яблочную кислоту	2,11	0,026	134,1	19*10 <sup>-5</sup>

5. Масса цинка хлорида (ZnCl<sub>2</sub>), необходимая для добавления к извлечению из побегов черники и для приготовления водного раствора, находится по формуле:

$$m_{ZnCl_2} = (n_{1(ZnCl_2)} + n_{2(ZnCl_2)} + n_{3(ZnCl_2)}) * M_{(ZnCl_2)}$$

$$= (2,6 * 10^{-5} + 4,8 * 10^{-5} + 19 * 10^{-5}) * 136,3 = 0,036\text{г}$$

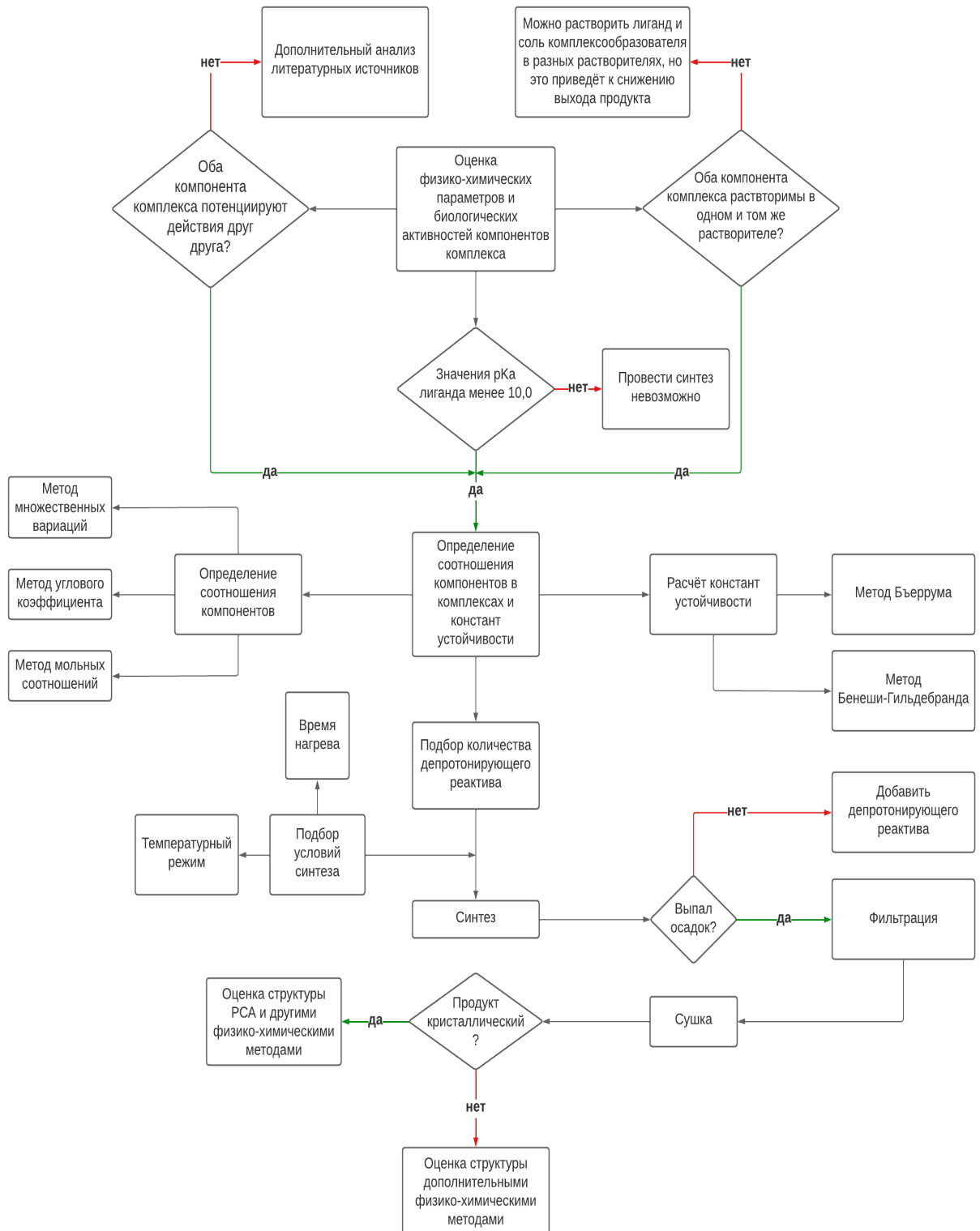
6. Масса комплекса рутина с цинком для приготовления водного раствора рассчитывается по формуле:

$$m_{\text{комплекса}} = (M_{\text{рутина безв.}} + M_{Zn}) * n_{\text{флав}} = (608,5 + 65,4) * 2,6 * 10^{-5}$$

$$= 0,018$$

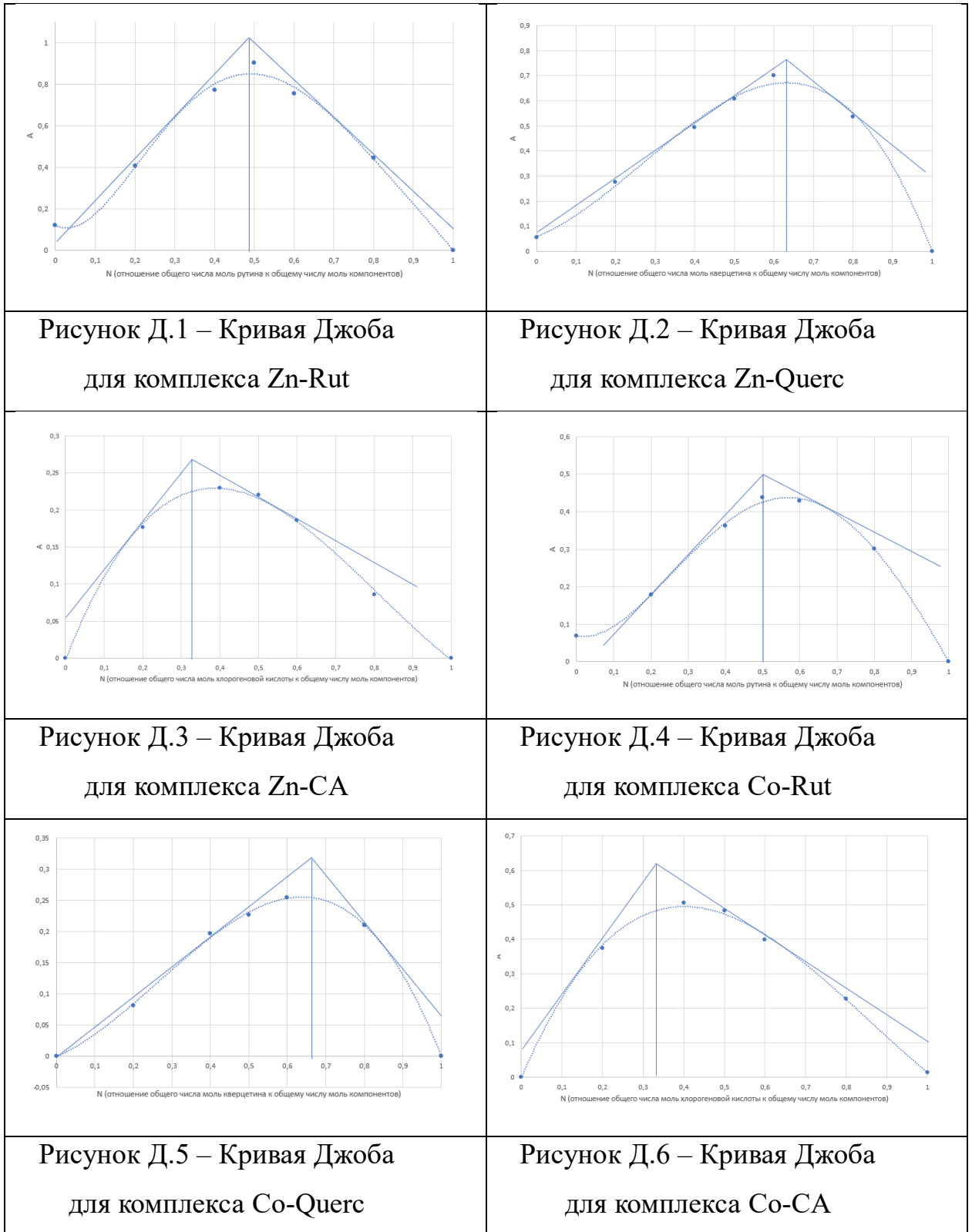
## ПРИЛОЖЕНИЕ Г

### Дерево решений «Синтез металло-фенольных комплексов»



## ПРИЛОЖЕНИЕ Д

### Диаграммы метода множественных вариаций (метода Джоба)



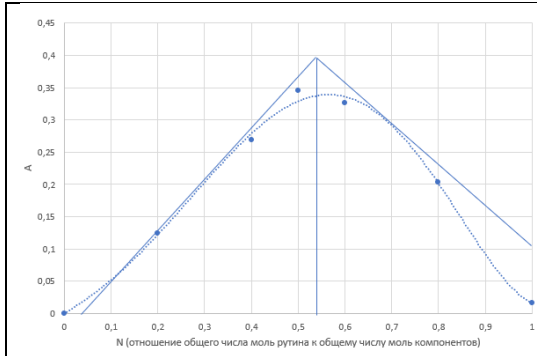


Рисунок Д.7 – Кривая Джоба  
для комплекса Mn-Rut

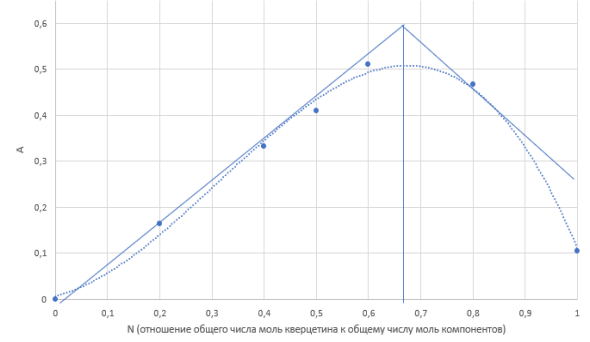


Рисунок Д.8 – Кривая Джоба  
для комплекса Mn-Querc

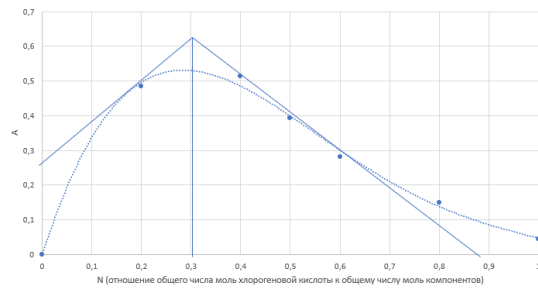


Рисунок Д.9 – Кривая Джоба  
для комплекса Mn-SA

## ПРИЛОЖЕНИЕ Е

### УФ-спектры комплексов и лигандов

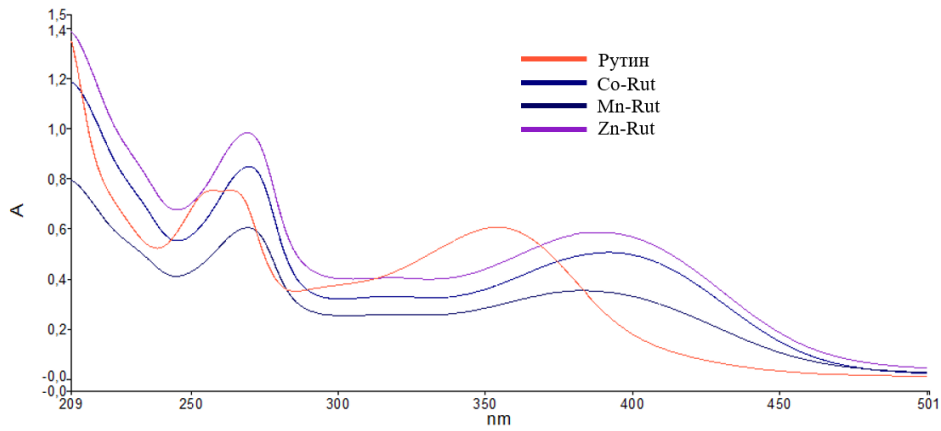


Рисунок Е.1 – УФ-спектры рутина и его комплексов

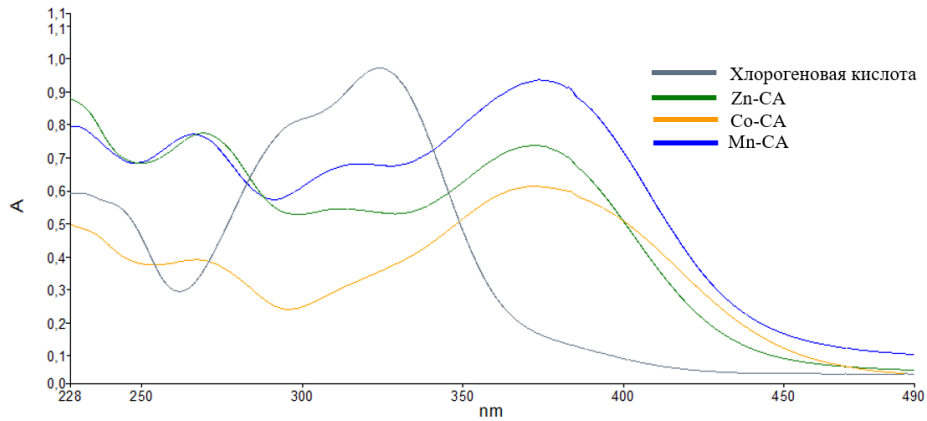


Рисунок Е.2 – УФ-спектры хлорогеновой кислоты и её комплексов

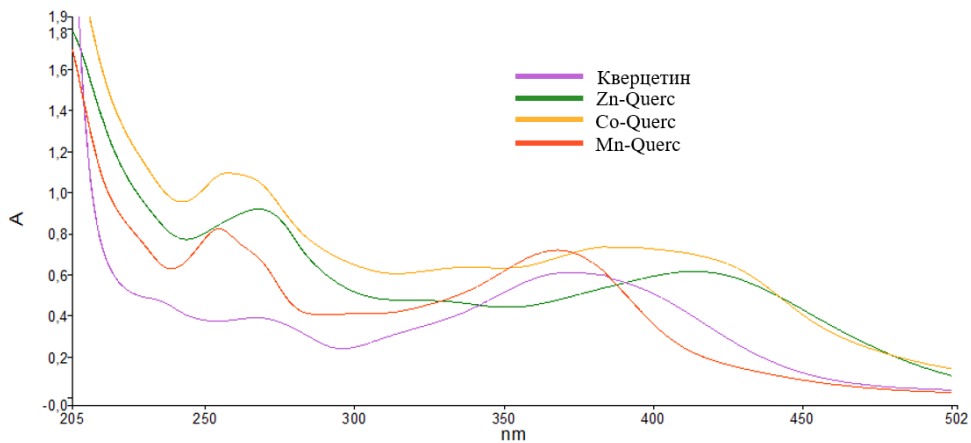


Рисунок Е.3 – УФ-спектры кверцетина и его комплексов

## ПРИЛОЖЕНИЕ Ж

### ИК-спектры комплексов и лигандов

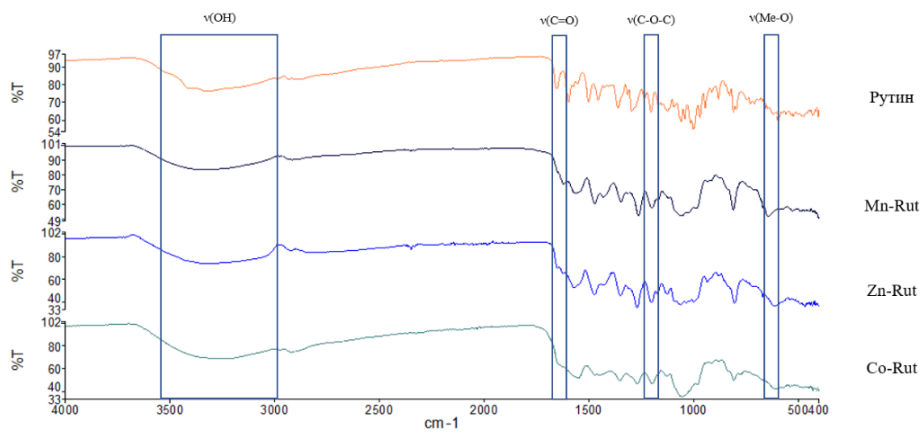


Рисунок Ж.1 – ИК-спектры рутина и его комплексов

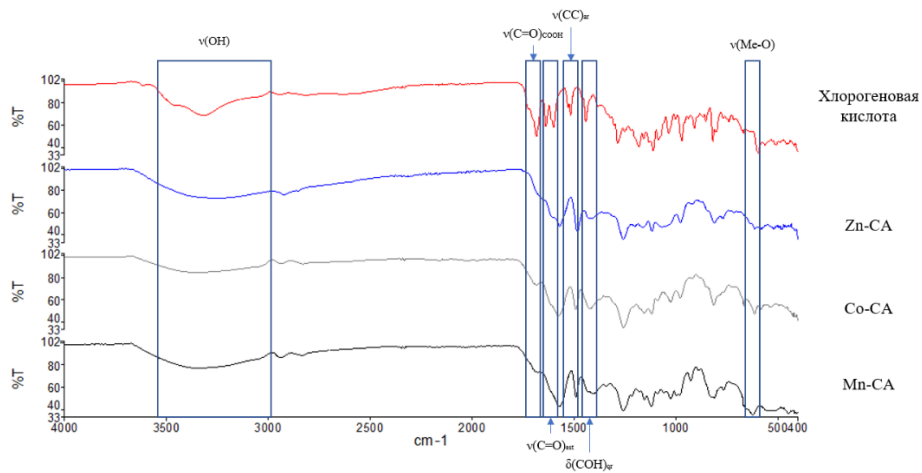


Рисунок Ж.2 – ИК-спектры хлорогеновой кислоты и её комплексов

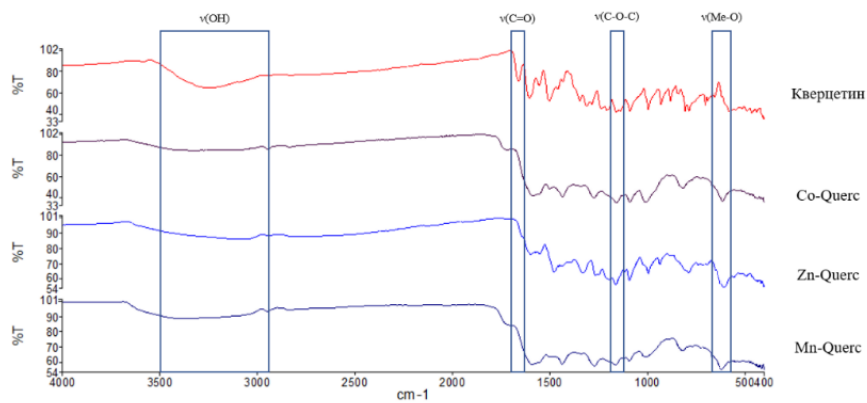


Рисунок Ж.3 – ИК-спектры кверцетина и его комплексов

## ПРИЛОЖЕНИЕ И

$^1\text{H}$  ЯМР спектры (область фенольных гидроксиллов) рутина, кверцетина, хлорогеновой кислоты и их комплексов с цинком

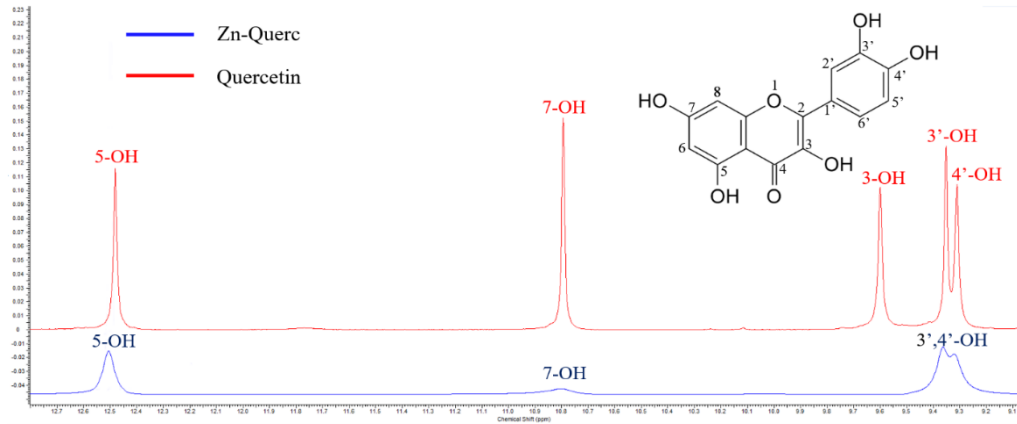


Рисунок И.1 –  $^1\text{H}$  ЯМР спектр кверцетина и Zn-Querc (DMSO, 400 MHz)

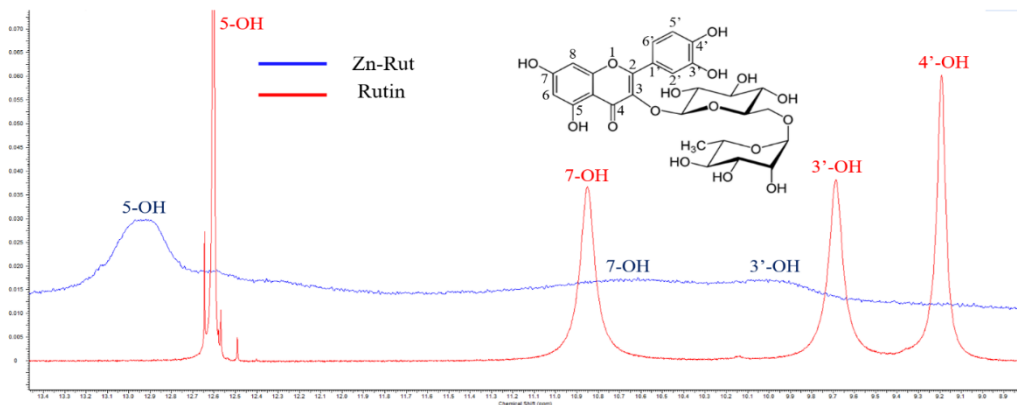


Рисунок И.2 –  $^1\text{H}$  ЯМР спектр рутина и Zn-Rut (DMSO, 400 MHz)

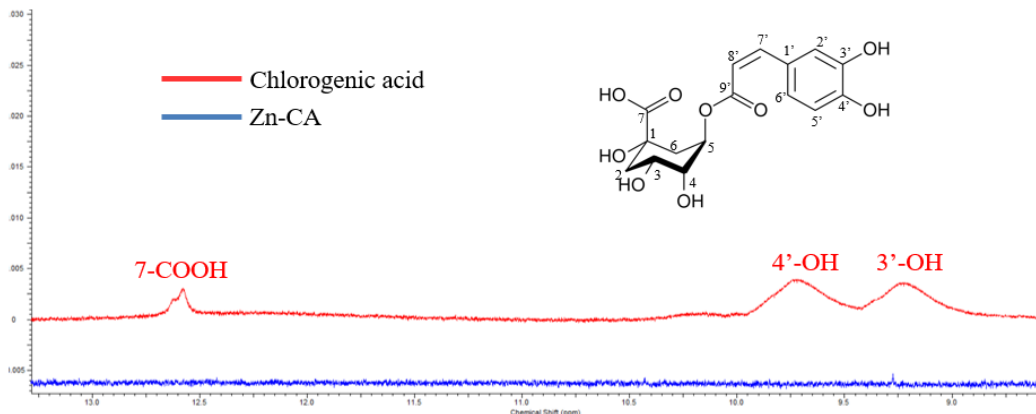


Рисунок И.3 –  $^1\text{H}$  ЯМР спектр хлорогеновой кислоты и Zn-CA (DMSO, 400 MHz)



## ПРИЛОЖЕНИЕ К

### Масс-спектры комплексов

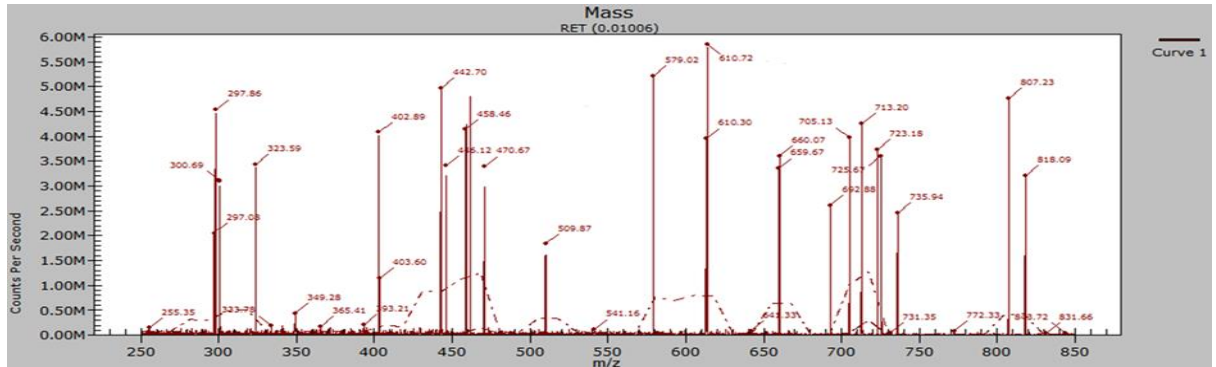


Рисунок К.1 – Масс-спектр Zn-Rut

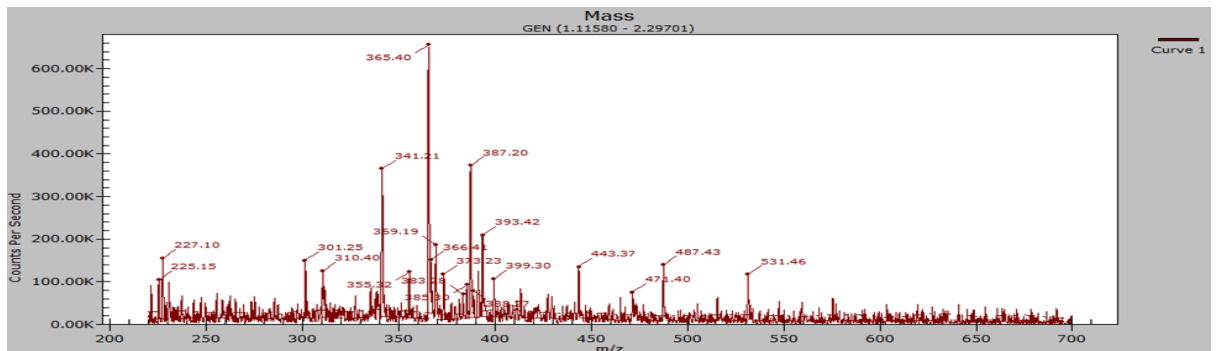


Рисунок К.2 – Масс-спектр Zn-Querc

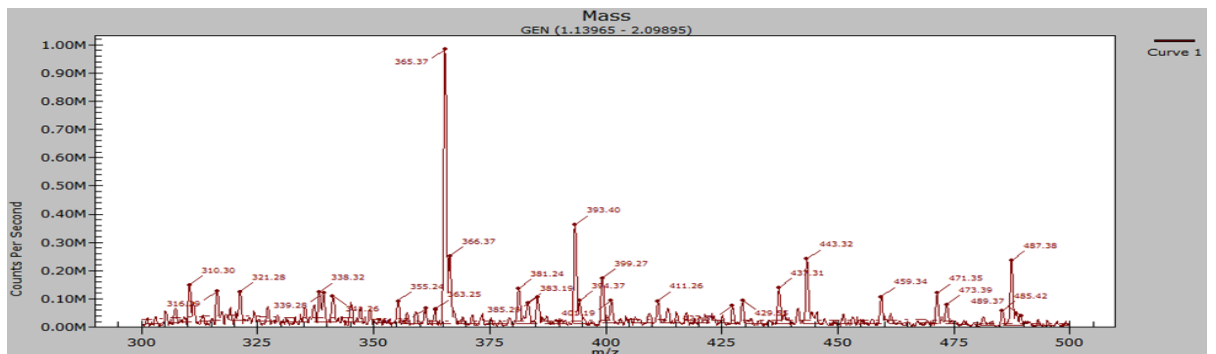


Рисунок К.3 – Масс-спектр Zn-SA

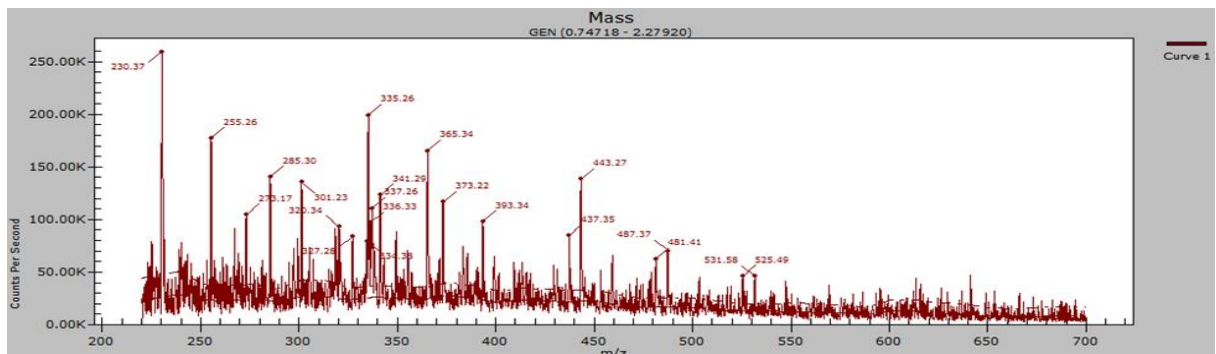


Рисунок К.4 – Масс-спектр Co-Querc

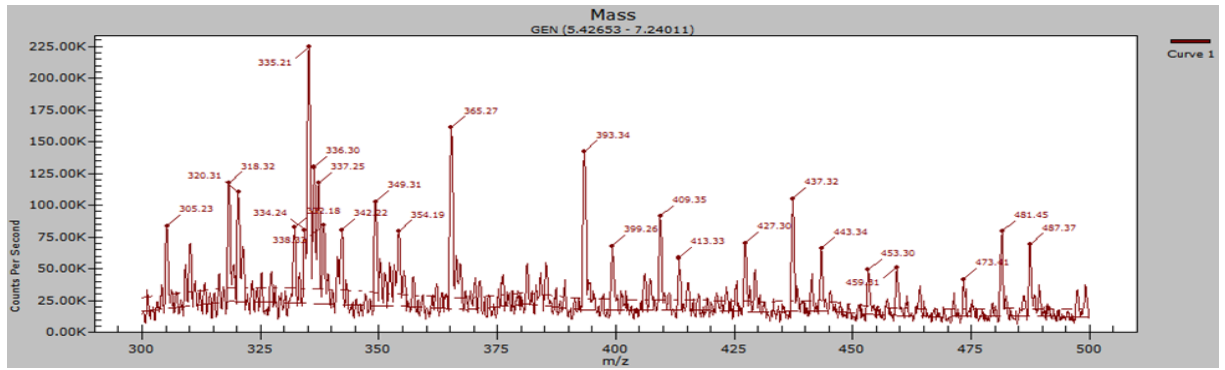


Рисунок К.5 – Масс-спектр Со-СА

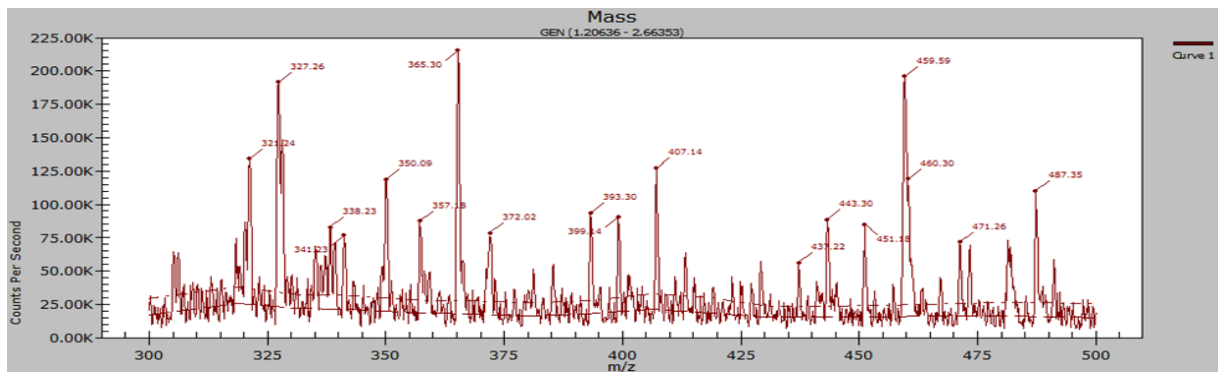


Рисунок К.6 – Масс-спектр Mn-СА

## ПРИЛОЖЕНИЕ Л

### Спектры РФА комплексов

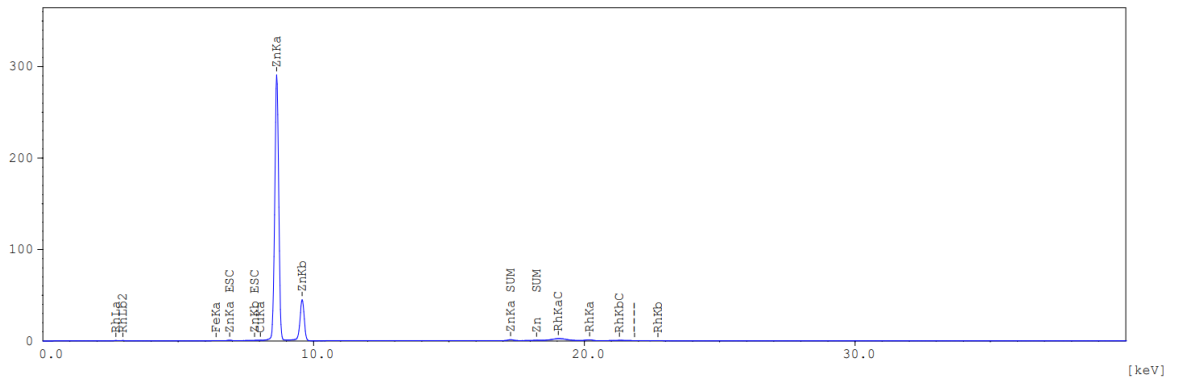


Рисунок Л.1 – РФА комплекса Zn-Rut

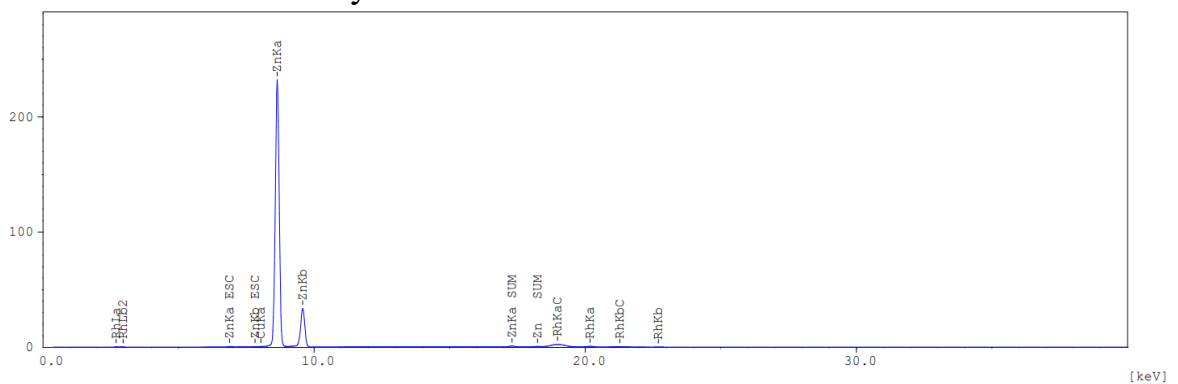


Рисунок Л.2 – РФА комплекса Zn-Querc

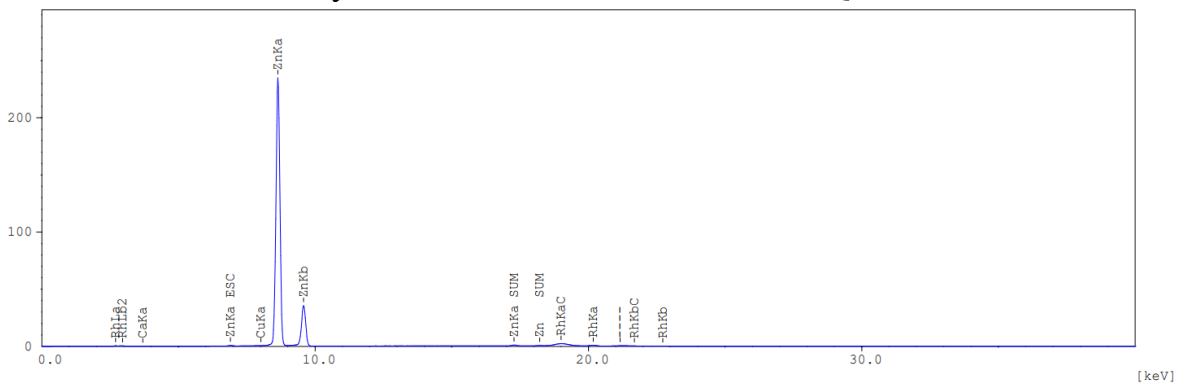


Рисунок Л.3 – РФА комплекса Zn-SA

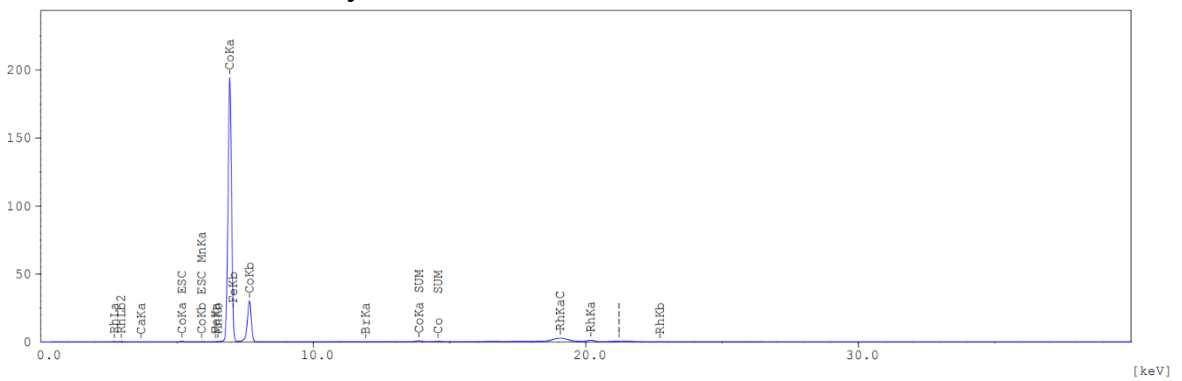


Рисунок Л.4 – РФА комплекса Co-Rut

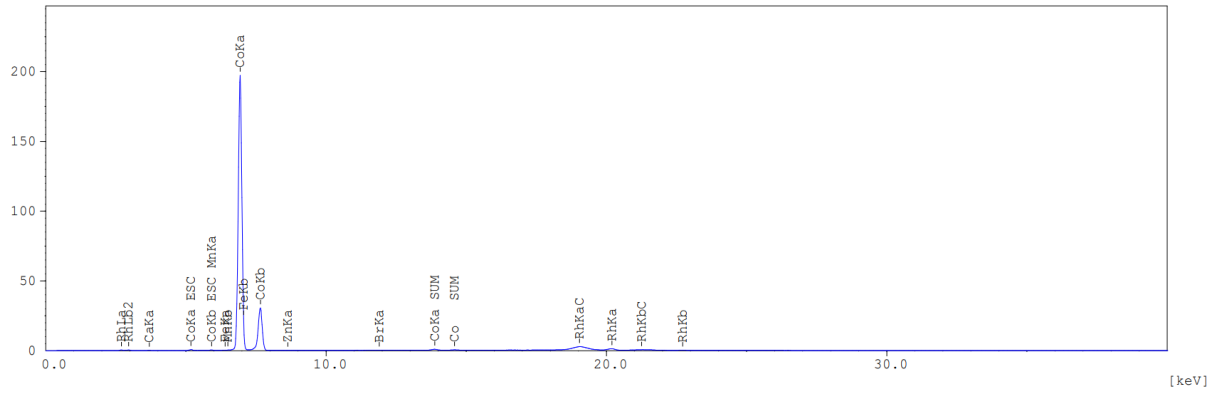


Рисунок Л.5 – РФА комплекса Co-Querc

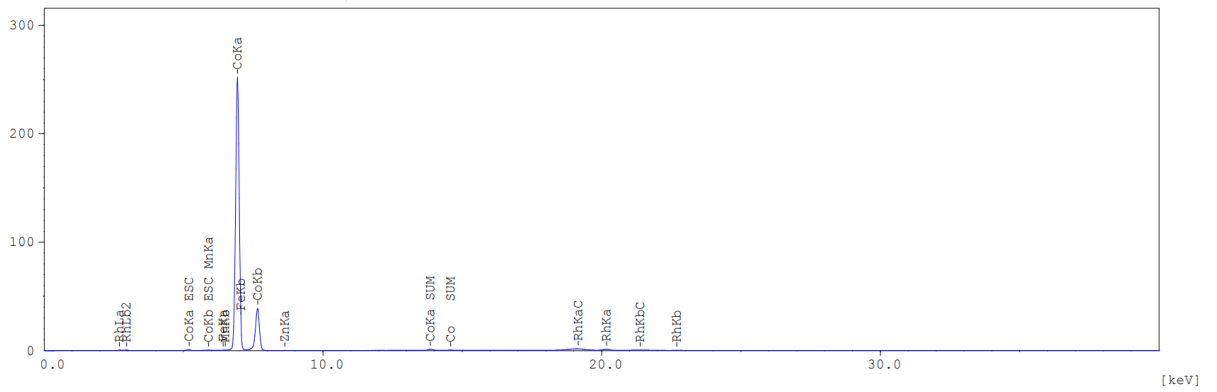


Рисунок Л.6 – РФА комплекса Co-SA

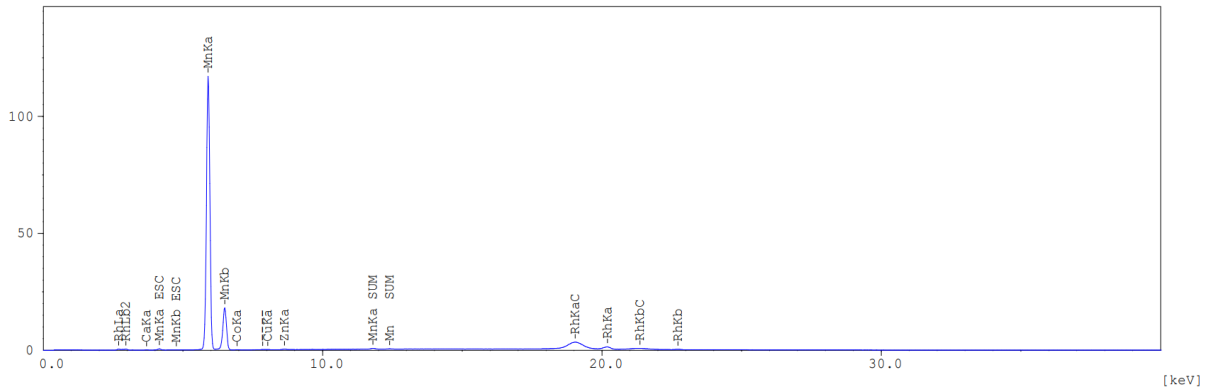


Рисунок Л.7 – РФА комплекса Mn-Rut

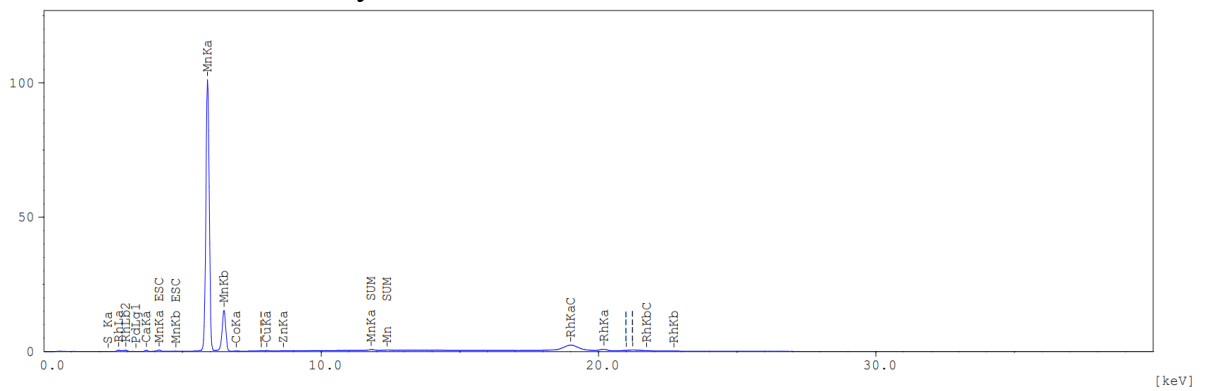


Рисунок Л.8 – РФА комплекса Mn-Querc

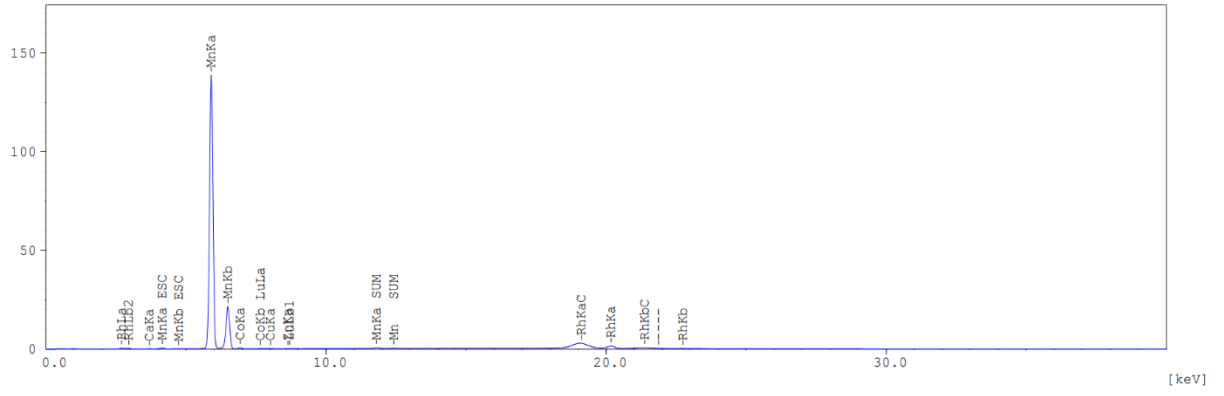


Рисунок Л.9 – РФА комплекса Mn-SA

## ПРИЛОЖЕНИЕ М

Результаты предварительного исследования противодиабетического действия комплекса рутина с цинком

Таблица М.1 – Результаты измерения концентрации глюкозы в крови

Точки измерения	Результаты	
	$x_{ср}$ , ммоль/л (n=6)	$x_{ср} \pm \Delta x$ , ммоль/л
<i>Водное извлечение из побегов черники обыкновенной</i>		
Начало эксперимента	6,6	6,6 ± 0,6
6 неделя ВЖД	4,9	4,9 ± 0,5
1 неделя введения дексаметазона	5,5	5,5 ± 0,8
2 неделя введения дексаметазона	6,1	6,1 ± 0,6
Окончание эксперимента	8,1	8,1 ± 0,9
<i>Водное извлечение из побегов черники обыкновенной с цинком</i>		
Начало эксперимента	6,7	6,7 ± 0,4
6 неделя ВЖД	4,3	4,3 ± 0,6
1 неделя введения дексаметазона	6,0	6,0 ± 0,3
2 неделя введения дексаметазона	6,1	6,1 ± 0,5
Окончание эксперимента	7,5	7,5 ± 1,3
<i>Водный раствор цинка хлорида</i>		
Начало эксперимента	6,8	6,8 ± 0,7
6 неделя ВЖД	4,3	4,3 ± 0,5
1 неделя введения дексаметазона	5,4	5,4 ± 0,9
2 неделя введения дексаметазона	6,3	6,3 ± 0,2
Окончание эксперимента	7,9	7,9 ± 1,1
<i>Водный раствор комплекса рутина с цинком</i>		
Начало эксперимента	7,1	7,1 ± 0,8
6 неделя ВЖД	5,1	5,1 ± 0,7
1 неделя введения дексаметазона	5,7	5,7 ± 0,5
2 неделя введения дексаметазона	6,0	6,0 ± 0,6
Окончание эксперимента	6,9	6,9 ± 1,2
<i>Контрольная группа</i>		
Начало эксперимента	6,8	6,8 ± 0,8

Точки измерения	Результаты	
	$x_{cp}$ , ммоль/л (n=6)	$x_{cp} \pm \Delta x$ , ммоль/л
6 неделя	5,2	5,2 ± 0,9
1 неделя введения дексаметазона	5,4	5,4 ± 0,9
2 неделя введения дексаметазона	6,6	6,6 ± 0,4
Окончание эксперимента	10,8	10,8 ± 1,8

Таблица М.2 – Результаты измерения концентрации глюкозы в моче

Точки измерения	Результаты	
	$x_{cp}$ , ммоль/л (n=6)	$x_{cp} \pm \Delta x$ , ммоль/л
<i>Водное извлечение из побегов черники обыкновенной</i>		
Начало эксперимента	Вариант нормы	
6 неделя ВЖД	2,3	2,3 ± 0,3
Окончание эксперимента	4,7	4,7 ± 0,7
<i>Водное извлечение из побегов черники обыкновенной с цинком</i>		
Начало эксперимента	Вариант нормы	
6 неделя ВЖД	2,3	2,3 ± 0,3
Окончание эксперимента	2,8	2,8 ± 0,4
<i>Водный раствор цинка хлорида</i>		
Начало эксперимента	Вариант нормы	
6 неделя ВЖД	2,3	2,3 ± 0,3
Окончание эксперимента	2,8	2,8 ± 0,4
<i>Водный раствор комплекса рутина с цинком</i>		
Начало эксперимента	Вариант нормы	
6 неделя ВЖД	1,8	1,8 ± 0,4
Окончание эксперимента	2,3	2,3 ± 0,3
<i>Контрольная группа</i>		
Начало эксперимента	Вариант нормы	
6 неделя	2,3	2,3 ± 0,4
Окончание эксперимента	5,6	5,6 ± 0,5

Таблица М.3 – Результаты измерения концентрации кетонов в моче

Точки измерения	Результаты	
	$x_{cp}, \text{ммоль/л}$ (n=6)	$x_{cp} \pm \Delta x, \text{ммоль/л}$
<i>Водное извлечение из побегов черники обыкновенной</i>		
Начало эксперимента	Вариант нормы	
6 неделя ВЖД	0,2	$0,2 \pm 0,03$
Окончание эксперимента	0,4	$0,4 \pm 0,10$
<i>Водное извлечение из побегов черники обыкновенной с цинком</i>		
Начало эксперимента	Вариант нормы	
6 неделя ВЖД	0,1	$0,1 \pm 0,03$
Окончание эксперимента	0,4	$0,4 \pm 0,10$
<i>Водный раствор цинка хлорида</i>		
Начало эксперимента	Вариант нормы	
6 неделя ВЖД	0,3	$0,3 \pm 0,07$
Окончание эксперимента	0,4	$0,4 \pm 0,10$
<i>Водный раствор комплекса рутина с цинком</i>		
Начало эксперимента	Вариант нормы	
6 неделя ВЖД	0,2	$0,2 \pm 0,03$
Окончание эксперимента	0,2	$0,2 \pm 0,03$
<i>Контрольная группа</i>		
Начало эксперимента	Вариант нормы	
6 неделя	0,3	$0,3 \pm 0,07$
Окончание эксперимента	0,5	$0,5 \pm 0,00$

Таблица М.4 – Результаты измерения массы тела лабораторных животных

Точки измерения	Результаты	
	$x_{cp}, \text{г}$ (n=6)	$x_{cp} \pm \Delta x, \text{г}$
<i>Водное извлечение из побегов черники обыкновенной</i>		
Начало эксперимента	278	$278 \pm 30$
6 неделя ВЖД	346	$346 \pm 31$
Окончание эксперимента	298	$298 \pm 26$



Точки измерения	Результаты	
	$x_{cp}, z$ ( $n=6$ )	$x_{cp} \pm \Delta x, z$
<i>Водное извлечение из побегов черники обыкновенной с цинком</i>		
Начало эксперимента	283	283 ± 13
6 неделя ВЖД	325	325 ± 28
Окончание эксперимента	278	278 ± 32
<i>Водный раствор цинка хлорида</i>		
Начало эксперимента	289	289 ± 7
6 неделя ВЖД	339	339 ± 54
Окончание эксперимента	284	284 ± 53
<i>Водный раствор комплекса рутина с цинком</i>		
Начало эксперимента	281	281 ± 10
6 неделя ВЖД	334	334 ± 14
Окончание эксперимента	286	286 ± 32
<i>Контрольная группа</i>		
Начало эксперимента	279	279 ± 15
6 неделя	329	329 ± 22
Окончание эксперимента	280	280 ± 17