

## Физико–химическая характеристика и биологическая активность супрамолекулярного комплекса глицирама с $\beta$ –циклодекстрином

Л. А. Яковичин,<sup>a@</sup> В. И. Гришковец,<sup>b</sup> Е. Н. Корж,<sup>a</sup> Е. В. Ветрова,<sup>c</sup>  
Н. И. Борисенко<sup>c</sup>

<sup>a</sup>Севастопольский национальный технический университет, 299053 Севастополь, Россия

<sup>b</sup>Таврический национальный университет имени В.И. Вернадского, 295007 Симферополь, Россия

<sup>c</sup>НИИ физической и органической химии Южного федерального университета, 344090 Ростов-на-Дону, Россия

@E-mail: chemsevntu@rambler.ru

*Методом спектрофотометрии и масс-спектрометрии с ионизацией электрораспылением исследовано комплексообразование лекарственного вещества глицирама (моноаммонийной соли глицирризиновой кислоты, GC) с  $\beta$ –циклодекстрином ( $\beta$ -CD). Показано, что в водном растворе при pH 7.2 GC образует с  $\beta$ -CD комплекс состава 1:1. Рассчитана константа устойчивости комплекса и свободная энергия Гиббса процесса комплексообразования.  $\beta$ -CD может быть перспективным стабилизатором GC. Установлено, что комплекс не обладает ихтиотоксичностью.*

**Ключевые слова:** Глицирам,  $\beta$ –циклодекстрин, молекулярный комплекс, спектрофотометрия, масс-спектрометрия, ихтиотоксичность.

## Physico–Chemical Characteristic and Biological Activity of the Supramolecular Complex of Glycyram with $\beta$ –Cyclodextrin

Leonid A. Yakovishin,<sup>a@</sup> Vladimir I. Grishkovets,<sup>b</sup> Elena N. Korzh,<sup>a</sup> Elena V. Vetrova,<sup>c</sup>  
and Nikolay I. Borisenko<sup>c</sup>

<sup>a</sup>Sevastopol National Technical University, 299053 Sevastopol, Russia

<sup>b</sup>V.I. Vernadsky Taurida National University, 295007 Simferopol, Russia

<sup>c</sup>Institute of Physical and Organic Chemistry, Southern Federal University, 344090 Rostov-on-Don, Russia

@Corresponding author E-mail: chemsevntu@rambler.ru

*Glycyram (monoammonium glycyrrhizinate, GC) is an anti-inflammatory and antiallergic drug, and is used in medical practice. GC over time is exposed to epimerization and decay. The possibility of complexation with  $\beta$ -cyclodextrin ( $\beta$ -CD) was examined to improve the stability of GC. The complexation of GC with  $\beta$ -CD in aqueous solution at pH 7.2 was investigated by method of spectrophotometry. The composition of the complex was determined by the isomolar series method (Job-Ostromyslenskii method). GC forms 1:1 complex with  $\beta$ -CD. Stability constant for complex  $K_s$  (GC– $\beta$ -CD) =  $2.61 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$ . Gibbs's free energy of complexation process was calculated. Thus,  $\beta$ -CD can be a promising stabilizer of GC. Using a method of electrospray ionization mass spectrometry, the complexation of GC with  $\beta$ -CD was investigated for the first time. In negative-ion mode, the ion peaks of complexes with 1:1 and 1:2 molar ratio were recorded. The complex with a 1:1 molar ratio was the most stable. In positive-ion mode, complexation of GC and  $\beta$ -CD was not observed. The influence of the GC– $\beta$ -CD complex against *Poecilia sphenops* (Poeciliidae) was studied. GC,  $\beta$ -CD, and their 1:1 complex are not ichthyotoxic.*

**Keywords:** Glycyram,  $\beta$ -cyclodextrin, molecular complex, spectrophotometry, electrospray ionization mass spectrometry, ichthyotoxicity.

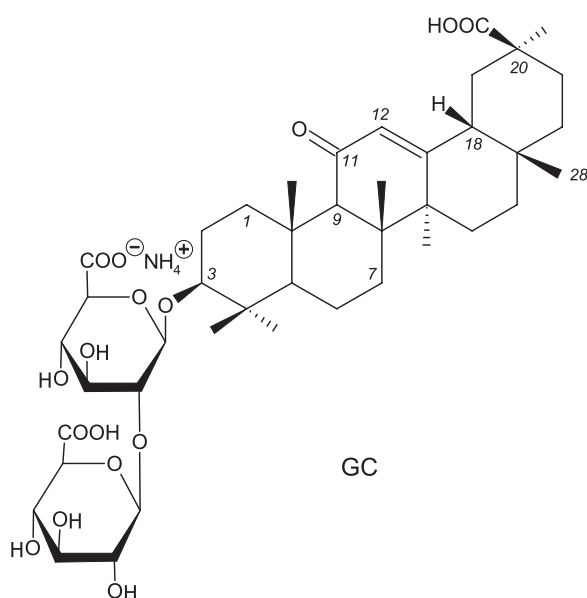
## Введение

Циклодекстрины (CD) и их производные широко используют для молекулярного капсулирования лекарственных веществ.<sup>[1–5]</sup> Получены молекулярные комплексы CD с рядом терпенов и терпеноидов. При этом основное внимание было уделено комплексам моно- и сесквитерпенов и их производных.<sup>[6]</sup>

Фрагментарно исследовано комплексообразование некоторых тритерпеноидов и их гликозидов с различными CD. В частности, получены комплексы бетулиной кислоты с диметил- $\beta$ -CD,<sup>[7]</sup>  $\gamma$ -CD<sup>[8]</sup> и гидроксипропил- $\gamma$ -CD,<sup>[7, 9]</sup> бетулина с гидроксипропил- $\gamma$ -CD,<sup>[9]</sup> олеаноловой и урсоловой кислот с диметил- $\beta$ -CD,<sup>[7]</sup>  $\gamma$ -CD,<sup>[8]</sup> гидроксипропил- $\gamma$ -CD,<sup>[7]</sup> гидроксипропил- $\beta$ - и  $\gamma$ -CD<sup>[10, 11]</sup> и олеаноловой кислоты с  $\alpha$ -,  $\beta$ - и  $\gamma$ -CD.<sup>[12]</sup>

Описаны комплексы даммаранового тритерпенового гликозида 20-*O*-( $\beta$ -D-глюкопиранозил)-20(*S*)-протопанаксадиола с  $\beta$ -CD и его гидроксипропилным производным.<sup>[13]</sup> Установлено, что дикалиевая соль глицирризиновой кислоты образует клатраты с  $\beta$ -CD и его ди- и триметильными производными.<sup>[14]</sup> Глицирризиновая кислота (3-*O*- $\beta$ -D-глюкуронопиранозил-(1 $\rightarrow$ 2)-*O*- $\beta$ -D-глюкуронопиранозид глицирретиновой кислоты) – преобладающий тритерпеновый гликозид различных видов солодки *Glycyrrhiza* L.

Наиболее важным производным глицирризиновой кислоты является ее моноаммонийная соль (глицирам, GC, Рисунок 1). GC относится к противовоспалительным и антиаллергическим средствам и широко применяется в медицинской практике.<sup>[15]</sup>



**Рисунок 1.** Глицирам (моноаммонийная соль глицирризиновой кислоты, GC).

Известно, что в водных растворах глицирризиновая кислота и GC подвергаются эимеризации.<sup>[16]</sup> Глицирризиновая кислота не устойчива к нагреванию.<sup>[17]</sup> Установлено, что при хранении некоторых лекарственных форм с GC в них быстро уменьшается его содер-

жание даже при комнатной температуре.<sup>[18]</sup> Глицирризиновая кислота и GC подвергаются деструкции из-за взаимодействия со свободными радикалами и кислородсодержащими частицами, проявляя при этом антиоксидантную активность.<sup>[19]</sup>

CD традиционно используют для повышения устойчивости лекарственных веществ путем комплексообразования с ними.<sup>[2]</sup> Поэтому с целью поиска перспективных стабилизаторов GC и расширения сведений о комплексах CD с сапонинами нами рассмотрена возможность образования комплекса GC с  $\beta$ -CD, одного из наиболее коммерчески доступных CD. Комплексообразование может увеличить срок хранения лекарственных препаратов, содержащих GC.

Установлено, что CD нетоксичны,<sup>[1]</sup> но их токсический профиль может отличаться в зависимости от способа введения в организм.<sup>[20]</sup> Тритерпеновые гликозиды проявляют разнообразное биологическое действие, в частности они могут быть токсичны для рыб и моллюсков.<sup>[21, 22]</sup> При этом их токсические свойства могут коррелировать с другими видами активности.<sup>[21]</sup> Кроме того, степень активности комплекса и индивидуальных веществ, которые его образуют, может существенно отличаться.<sup>[23, 24]</sup> Поэтому для предварительной оценки биологической активности комплекса  $\beta$ -CD с GC нами исследованы его ихтиотоксические свойства.

## Экспериментальная часть

Использовали образцы GC фирмы Calbiochem (США) и  $\beta$ -CD фирмы Acros Organics (США).  $\beta$ -CD предварительно сушили до постоянного веса при 50-80 °C в течение 3 ч.

Изомольярную серию готовили из  $10^{-4}$  М водных растворов  $\beta$ -CD и GC с pH 7.2 (фосфатный буфер  $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{--NaH}_2\text{PO}_4$ ), которые смешивали в антибатных соотношениях (от 1:9 до 9:1) при неизменном общем объеме. Смеси выдерживали при температуре 28 °C в течение 40 мин при постоянном перемешивании. Для определения состава комплекса и константы его устойчивости  $K_s$  было проведено 5 независимых экспериментов. При этом погрешность определения  $K_s$  не превышала 10%. Расчет  $K_s$  выполнен при  $\lambda=258$  нм. УФ-спектры получены при температуре 28 °C на спектрофотометре Unicо UV-Vis 4802 (США) в кварцевых кюветах ( $l=1$  см).

Комплекс получали препаративно путем смешивания по 0.1 ммоль компонентов с 25 мл 40 % этанола при 40-50 °C в течение 1.5 ч при постоянном перемешивании. Растворитель отгоняли в вакууме.

Масс-спектральные измерения проведены на спектрометре Bruker Daltonics micrOTOF-Q с ионизацией электрораспылением. Использовали программное обеспечение micrOTOFcontrol<sup>TM</sup>2.2. Калибровка масс-спектрометра выполнена с использованием калибровочного раствора для электрораспыления (Electrospray Calibrant Solution) фирмы Fluka. Детектирование отрицательных и положительных ионов выполнено в интервале  $m/z$  от 50 до 3000. Согласно характеристикам прибора точность измерений на micrOTOF-Q II достигает выше 1–2 ppm, точность определения масс 2 мДа. Напряжение на капилляре распылителя  $\pm 4200$  В, параметры газа-осушителя (азот квалификации «ос.ч.», 5 л/мин, 200 °C) оптимизированы для детектирования пиков ионов ассоциатов. Для прямого ввода использованы растворы веществ в метаноле (фирма Merck, квалификация HPLC/MS) в концентрации 0.2 мг/мл ( $10^{-7}$ – $10^{-6}$  М). Соотношения  $m/z$  и относительные

интенсивности пиков ионов ( $I$ , %) приведены в Таблице 1.

**Таблица 1.** Масс-спектры смеси GC и  $\beta$ -CD.

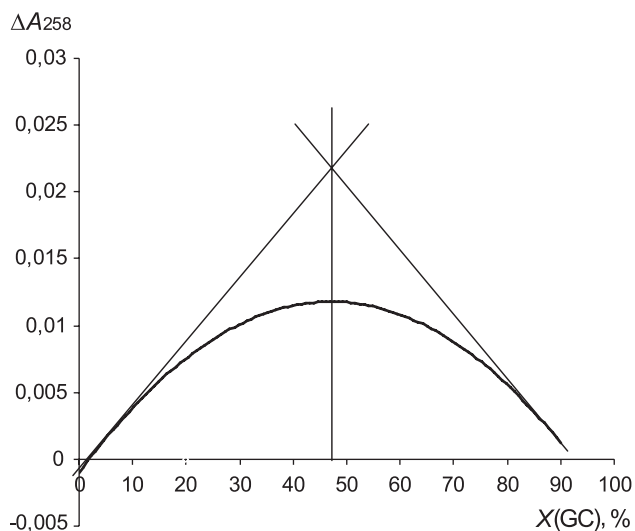
Ион	Соотношение $m/z$	$I_{\text{отн}}$ , %
$[M^{\beta\text{-CD}+2K+H}]^{3+}$	404.54	8.13
$[M^{\beta\text{-CD}+Na+H}]^{2+}$	579.34	16.6
$[M^{\beta\text{-CD}+K+H}]^{2+}$	587.33	100.0
$[M^{\beta\text{-CD}+Na}]^{+}$	1157.68	1.0
$[M^{\text{GC}-3H}]^{3-}$	273.12	20.8
$[M^{\text{GC}-2H}]^{2-}$	410.18	100.0
$[M^{\beta\text{-CD}-2H}]^{2-}$	566.16	1.7
$[M^{\beta\text{-CD}+M^{\text{GC}-3H}]^{3-}$	651.23	1.7
$[M^{\text{GC}-H}]^{-}$	821.37	2.4
$[M^{\beta\text{-CD}+M^{\text{GC}-2H}]^{2-}$	977.35	0.9
$[2M^{\beta\text{-CD}+M^{\text{GC}-3H}]^{3-}$	1029.68	0.2
$[M^{\beta\text{-CD}-H}]^{-}$	1133.33	0.1
$[2M^{\beta\text{-CD}+M^{\text{GC}-2H}]^{2-}$	1544.53	0.01

Ихтиотоксичность проверяли на рыбах *Poecilia sphenops* (Poeciliidae) по известной методике.<sup>[25]</sup> Рыб (по 10 штук) помещали в  $10^{-4}$  М растворы GC и  $\beta$ -CD, а также в их комплекс, содержащий по  $10^{-4}$  М каждого из компонентов. Определяли время инкубации, в течение которого происходил бы 100 % летальный исход.

## Результаты и обсуждение

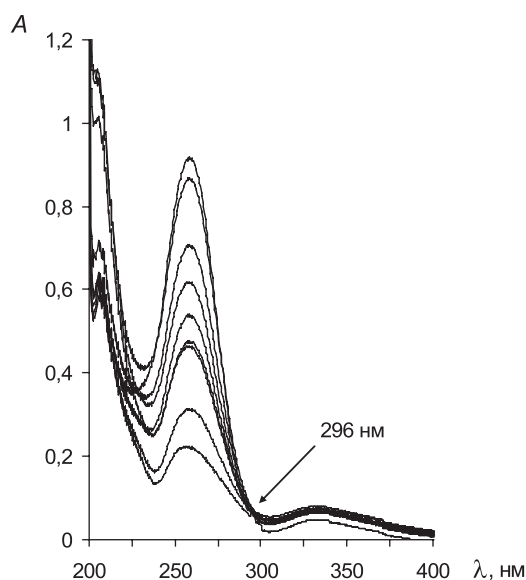
### Спектральные исследования

Состав комплекса  $\beta$ -CD с GC определен методом изомольярных серий (методом Остромысленского-Жоба).<sup>[26]</sup> На Рисунке 2 показана изомольярная кривая, полученная для смеси  $\beta$ -CD и GC. При этом для компонентов установлено молярное отношение, соответствующее комплексу состава 1:1. Клатраты такого со-

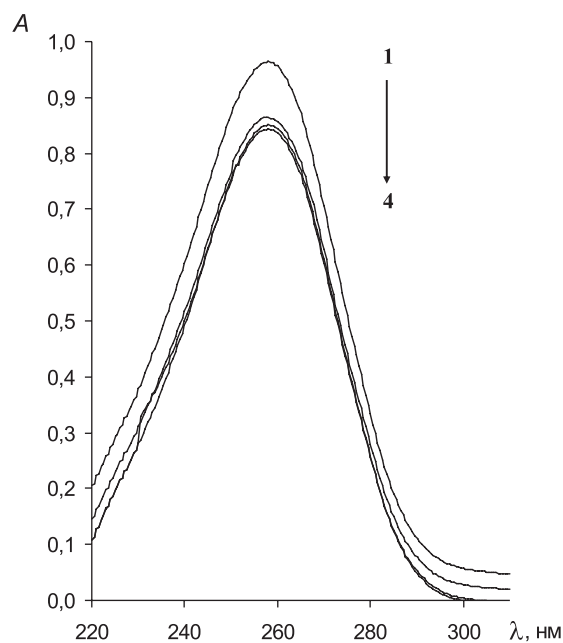


**Рисунок 2.** Зависимость изменения оптической плотности  $\Delta A$  от соотношения компонентов изомольярной серии при  $\lambda=258$  нм:  $c(\beta\text{-CD})=10^{-4}$  М,  $c(\text{GC})=10^{-4}$  М (pH 7.2, 28 °C).

става наиболее характерны для CD.<sup>[1]</sup> Спектр поглощения изомольярной серии обладает изобестической точкой при 296 нм (Рисунок 3). Наличие изобестической точки указывает на формирование лишь одного типа комплекса между  $\beta$ -CD и GC.<sup>[26]</sup> Кроме того, с увеличением концентрации  $\beta$ -CD и постоянной концентрации GC максимум поглощения их смесей (258 нм) существенно не сдвигается, но уменьшается их оптическая плотность  $A$  (Рисунок 4). Наблюдается гипохромный эффект, который обычно обнаруживается при образовании комплексов CD.<sup>[3]</sup>

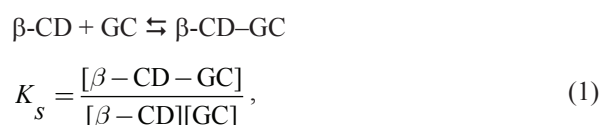


**Рисунок 3.** Спектры поглощения изомольярной серии растворов:  $c(\beta\text{-CD})=10^{-4}$  М,  $c(\text{GC})=10^{-4}$  М (pH 7.2, 28 °C).



**Рисунок 4.** УФ-спектры растворов GC ( $c=10^{-4}$  М=const) при различных концентрациях  $\beta$ -CD (pH 7.2, 28 °C): 0 М (кривая 1),  $1,25 \cdot 10^{-4}$  М (кривая 2),  $2,5 \cdot 10^{-4}$  М (кривая 3) и  $5,0 \cdot 10^{-4}$  М (кривая 4).

Таким образом, в водном растворе устанавливается равновесие между  $\beta$ -CD и GC следующего вида:



где  $K_s$  – константа устойчивости комплекса.

На основе изомольной кривой по формуле (2) была рассчитана константа устойчивости комплекса  $K_s$  при  $\lambda=258$  нм по методу,<sup>[27]</sup> применимому для комплексов состава 1:1.

$$K_s = \frac{\Delta A_0 \Delta A_1}{c(\Delta A_0 - \Delta A_1)^2}, \quad (2)$$

где  $c$  – общая концентрация, равная  $10^{-4}$  М,  $\Delta A_0$  – изменение оптической плотности, соответствующее комплексу при полном отсутствии диссоциации, а  $\Delta A_1$  – изменение оптической плотности, соответствующее значению на фактической кривой.

Свободная энергия Гиббса  $\Delta G$  для процесса комплексообразования определена по формуле (3).

$$\Delta G = -2.3RT \lg K_s. \quad (3)$$

Таким образом, для комплекса GC и  $\beta$ -CD  $K_s = 2.61 \cdot 10^4 \text{ М}^{-1}$ .  $\Delta G = -2.54 \cdot 10^4$  Дж/моль. У ряда комплексов глицирризиновой кислоты и GC с лекарственными веществами  $K_s = 10^3 - 10^5 \text{ М}^{-1}$ .<sup>[23,28]</sup>

Среди комплексов тритерпеновых гликозидов с  $\beta$ -CD  $K_s$  были определены только для комплексов 20-*O*-( $\beta$ -D-глюкопиранозил)-20(*S*)-протопанаксадиола с  $\beta$ -CD и гидроксипропил- $\beta$ -CD,<sup>[13]</sup> а также для комплексов дикалиевой соли глицирризиновой кислоты с  $\beta$ -CD и диметил- и триметил- $\beta$ -CD.<sup>[14]</sup> Для комплексов гликозида протопанаксадиола они равны  $4.52 \cdot 10^{-3}$  и  $0.68 \cdot 10^{-3} \text{ М}^{-1}$ , соответственно, а для комплексов дикалий глицирризината – 470,  $2.3 \cdot 10^3$  и  $9.2 \text{ М}^{-1}$ . Существенные различия величин  $K_s$  комплексов GC и гликозида протопанаксадиола возможно связаны с особенностями структуры их агликонных частей. У GC пентациклический агликон (олеанановый тип), а протопанаксадиол – это тетрациклический даммарановый агликон. В отличие от GC, у дикалий глицирризината нет свободных карбоксильных групп в углеводной части. Также ранее были установлены  $K_s$  для комплексов индивидуальных пентациклических агликонов. Так, в водной среде  $K_s$  комплекса  $\beta$ -CD с олеаноловой кислотой составила только  $57.6 \text{ М}^{-1}$ .<sup>[12]</sup>

Высокое значение  $K_s$  комплекса GC с  $\beta$ -CD позволяет рассматривать  $\beta$ -CD как перспективный стабилизатор GC в водных растворах, а также в составе его лекарственных форм.

Наличие комплексообразования между GC и  $\beta$ -CD также подтверждали методом масс-спектрометрии с ионизацией электрораспылением. В масс-спектре отрицательных ионов, полученном для смеси GC и  $\beta$ -CD, наибольшую интенсивность имеет пик иона  $[\text{M}^{\text{GC}}\text{-2H}]^{2-}$ . Также найдены пики ионов  $[\text{M}^{\beta\text{-CD}} + \text{M}^{\text{GC}}\text{-2H}]^{2-}$  ( $m/z=977.35$ )

и  $[\text{M}^{\beta\text{-CD}} + \text{M}^{\text{GC}}\text{-3H}]^{3-}$  ( $m/z=651.23$ ), соответствующие комплексам состава 1:1. Кроме того, идентифицированы малоинтенсивные пики ионов комплексов  $[\text{2M}^{\beta\text{-CD}} + \text{M}^{\text{GC}}\text{-3H}]^{3-}$  с  $m/z=1029.68$  и  $[\text{2M}^{\beta\text{-CD}} + \text{M}^{\text{GC}}\text{-2H}]^{2-}$  с  $m/z=1544.53$ , в которых соотношение компонентов равно 2:1. Комплексы состава 1:1 существенно преобладают в масс-спектре, т.к. интенсивности пиков их ионов больше в 8.5 раз (для трехзарядных ионов) и в 90 раз (для двухзарядных ионов).

В режиме регистрации положительных ионов преобладает пик иона  $[\text{M}^{\beta\text{-CD}} + \text{K} + \text{H}]^{2+}$ . При этом ионов, отвечающих образованию комплекса  $\beta$ -CD с GC, не зафиксировано.

### Биологическая активность

Установлено, что индивидуальные  $\beta$ -CD и GC, а также их комплекс состава 1:1, не проявили токсического действия на рыб *Poecilia sphenops* (Poeciliidae) при экспозиции в течение 24 ч. Гликозиды олеананового типа с высокой токсичностью обычно имеют свободную карбоксильную группу у атома C-17 их агликонов.<sup>[22]</sup> У GC в агликонной части присутствует свободная карбоксильная группа, но она расположена у атома C-20. Таким образом, активность комплекса и образующих его компонентов не отличается.

### Выводы

1. Спектрофотометрически исследовано взаимодействие  $\beta$ -CD с GC в водных растворах при pH 7.2. Методом изомольных серий установлено, что комплекс  $\beta$ -CD-GC имеет состав 1:1. Рассчитана константа устойчивости комплекса  $K_s = 2.61 \cdot 10^4 \text{ М}^{-1}$ .  $\beta$ -CD может быть перспективным стабилизатором GC.
2. В масс-спектре преобладают пики ионов комплекса  $\beta$ -CD с GC состава 1:1.
3. Комплекс  $\beta$ -CD с GC не оказал токсического действия на рыб *Poecilia sphenops*.

**Благодарность.** Работа проведена при финансовой поддержке РФФИ (проект 14-43-01031 p\_юг\_a). Масс-спектроскопические исследования выполнены Е.В. Ветровой и Н.И. Борисенко при финансовой поддержке Министерства образования и науки РФ в рамках государственного задания по проекту №1895.

### Список литературы

### References

1. Steed J.W., Atwood J.L. *Supramolecular Chemistry* Chichester: John Wiley & Sons, Ltd, **2000**. 745 p.
2. Challa R., Ahuja A., Ali J., Khar R.K. *AAPS Pharm. Sci. Tech.* **2005**, 6, E329-E357.
3. Li S., Purdy W.C. *Chem. Rev.* **1992**, 92, 1457-1470.
4. Singh R., Bharti N., Madan J., Hiremath S.N. *J. Pharm. Sci. Tech.* **2010**, 2, 171-183.

5. Brewster M.E., Loftsson T. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2007**, 59, 645-666.
6. Yakovishin L., Grishkovets V., Schroeder G., Rybachenko V. Supramolecular Complexes of Terpenes and Their Derivatives with Cyclodextrins. In: *Molecular Receptors* (Rybachenko V.I., Ed.) Donetsk: East Publisher House, **2011**. p. 285-316.
7. Claude B., Morin Ph., Lafosse M., Andre P. *J. Chromatogr. A.* **2004**, 1049, 37-42.
8. Fontanay S., Kedzierewicz F., Duval R.E., Clarot I. *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.* **2012**, 73, 341-347.
9. Soica C.M., Dehelean C.A., Peev C.I., Coneac G., Gruia A.T. *Farmacia* **2008**, 56, 182-190.
10. Cerga O., Borcan F., Ambrus R., Popovici I. *J. Agroalim. Proces. Technol.* **2011**, 17, 405-409.
11. Cerga (Vlaston) O., Borcan F., Bernad E., Popovici I. *J. Agroalim. Proces. Technol.* **2012**, 18, 130-135.
12. Guo M., Zhang S., Song F., Wang D., Liu Z., Liu S. *J. Mass Spectrom.* **2003**, 38, 723-731.
13. Lee P.S., Han J.-Y., Song T.W., Sung J.H., Kwon O.-S., Song S., Chung Y.B. *Int. J. Pharm.* **2006**, 316, 29-36.
14. Tamagaki S., Koide M., Takahashi M., Mizushima T., Ukawa J., Tagaki W. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* **1996**, 1257-1260.
15. Mashkovskii M.D. *Drugs*. Vol. 1, Kharkov: Torsing, **1997**. 560 p. (in Russ.) [Машковский М.Д. *Лекарственные средства*. Т. 1, Харьков: Торсинг, **1997**. 560 с.]
16. Baltina L.A., Serdyuk N.G., Flekhter O.B., Krasnova L.V., Davydovva V.A., Ismagilova A.F., Zarudii F.S., Tolstikov G.A. *Pharm. Chem. J.* **1996**, 30, 613-616.
17. Zapesochnaya G.G., Zvonkova E.N., Kurkin V.A., Kazakova E.V., Pervykh L.N., Sheichenko B.I., Bykov V.A. *Chem. Nat. Compd.* **1994**, 30, 720-726.
18. Abramovich R.A. Author's abstract Cand. Diss. Pharm. Sci., Moscow, **1994**. 23 p. (in Russ.).
19. Tolstikov G.A., Baltina L.A., Grankina V.P., Kondratenko R.M., Tolstikova T.G. *Licorice: Biodiversity, Chemistry, Application in Medicine*. Novosibirsk: Geo, **2007**. 311 p. (in Russ.) [Толстиков Г.А., Балтина Л.А., Гранкина В.П., Кондратенко Р.М., Толстикова Т.Г. *Солодка: биоразнообразие, химия, применение в медицине*. Новосибирск: Академическое издательство «Гео», **2007**. 311 с.]
20. Gould S., Scott R.C. *Food Chem. Toxicol.* **2005**, 43, 1451-1459.
21. Hostettmann K., Marston A. *Saponins*. Cambridge: Cambridge University Press, **1995**. 548 p.
22. Podolak I., Galanty A., Sobolewska D. *Phytochem. Rev.* **2010**, 9, 425-474.
23. Tolstikova T.G., Khvostov M.V., Bryzgalov A.O. *Mini Rev. Med. Chem.* **2009**, 9, 1317-1328.
24. Yakovishin L.A., Lekar A.V., Vetrova E.V., Borisenko N.I., Borisenko S.N., Grishkovets V.I. *Biopolym. Cell.* **2012**, 28(1), 62-67.
25. Yakovishin L.A., Borisenko N.I., Rudnev M.I., Vetrova E.V., Grishkovets V.I. *Chem. Nat. Compd.* **2010**, 46, 49-52.
26. Bulatov M.I., Kalinkin I.P. *Practical Guide of Photometric Methods of Analysis*. Leningrad: Khimiya, **1986**. 432 p. (in Russ.) [Булатов М.И., Калинин И.П. *Практическое руководство по фотометрическим методам анализа*. Л.: Химия, **1986**. 432 с.]
27. Babko A.K. *Physico-Chemical Analysis of Complex Compounds in Solutions*. Kiev: Izd-vo AN USSR, **1955**. 328 p. (in Russ.) [Бабко А.К. *Физико-химический анализ комплексных соединений в растворах (Оптический метод)*. Киев, **1955**. 328 с.]
28. Yakovishin L.A., Grishkovets V.I., Klimenko A.V., Degtyar A.D., Kuchmenko O.B. *Pharm. Chem. J.* **2014**, 48, 391-394.

Received 20.11.2014

Accepted 27.12.2014