# ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ ПЕРВЫЙ МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ И.М. СЕЧЕНОВА МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ (СЕЧЕНОВСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ)

На правах рукописи

Терехов Роман Петрович

Влияние фазового состояния

на физико-химические, технологические и биофармацевтические параметры

# дигидрокверцетина

14.04.02 – Фармацевтическая химия, фармакогнозия

Диссертация

на соискание ученой степени

кандидата фармацевтических наук

Научный руководитель:

доктор фармацевтических наук, профессор Селиванова Ирина Анатольевна

# оглавление

введение	6
ГЛАВА 1.	
Фазовые модификации флавоноидов (обзор литературы)	13
1.1. Стратегия литературного поиска и общая характеристика статей	15
1.2. Изменение фазовых состояний флавоноидов	19
1.2.1. Дизайн и способы получения	19
1.2.2. Методы анализа	24
1.2.3. Фармакологические исследования	<u>     3</u> 4
1.3. Оптимизация фазового состояния дигидрокверцетина	36
Выводы по главе	38
ГЛАВА 2.	
Дизайн и синтез фазовых модификаций дигидрокверцетина	39
2.1. Компьютерное моделирование фазовых состояний дигидрокверцетина	39
2.1.1. Роль молекул растворителя	40
2.1.2. Влияние значения pH среды	44
2.2. Разработка способов получения фазовых модификаций	45
2.2.1. Кристаллогидрат дигидрокверцетина	45
2.2.2. Аморфные формы дигидрокверцетина	48
Выводы по главе	51
ГЛАВА 3.	
Разработка системного подхода к исследованию фазовых модификаци	й <u>.</u> 52
3.1. Химическое строение фазовых модификаций дигидрокверцетина	52
3.1.1. Хромофорная система	52
3.1.2. Функциональные группы и фрагменты	53
3.1.3. Молекулярная структура дигидрокверцетина	55
3.1.4. Родственные примеси и остаточные растворители	56
3.2. Структура твердой фазы модификаций дигидрокверцетина	62
3.2.1. Описание	62

3.2.2. Морфология	63
3.2.3. Кристаллическое и аморфное состояния	67
3.3. Физико-химические свойства фазовых модификаций дигидрокверцетина	76
3.3.1. Растворимость	77
3.3.2. Сорбционные свойства	78
Выводы по главе	
ГЛАВА 4.	
Фрактальный анализ лиофилизатов дигидрокверцетина	84
4.1. Взаимосвязь морфологии и свойств лиофилизатов	
4.1.1. Фракталы	
4.1.2. Физико-химическая характеристика	88
4.2. Разработка и валидация методики фрактального анализа	89
Выводы по главе	91
ГЛАВА 5.	
Биофармацевтические свойства фазовых модификаций в условиях <i>ех vivo</i>	92
5.1. Дизайн эксперимента	94
5.1.1. Разработка методики количественного определения	94
5.1.2. Цитотоксические свойства	95
5.1.3. Оценка конфлюентности культуры клеток	99
5.2. Определение проницаемости фазовых модификаций дигидрокверцетина	100
Выводы по главе	102
ГЛАВА 6.	
Функциональные свойства фазовых модификаций дигидрокверцетина	104
6.1. Фармацевтико-технологические свойства	104
6.1.1. Таблетируемые массы на базе фазовых модификаций	105
6.1.2. Характеристики таблеток для рассасывания	108
6.2. Ранозаживляющие свойства в эксперименте <i>in vivo</i>	112
Выводы по главе	119

# ГЛАВА 7.

Материалы и методы исследования	
7.1. Материалы	
7.1.1. Объекты исследования	
7.1.2. Реактивы, стандартные образцы, растворители	
7.2. Оборудование	
7.3. Методы эксперимента <i>in silico</i>	126
7.3.1. Построение виртуальных наночастиц	
7.3.2. Расчет деформации наночастиц	126
7.3.3. Моделирование ионизации молекул дигидрокверцетина	
7.3.4. Поля молекулярных взаимодействий	
7.4. Методы морфологического анализа	
7.4.1. Внешний вид	127
7.4.2. Микроскопия	
7.4.3. Лазерная дифракция света	
7.5. Методы физико-химического анализа	128
7.5.1. Спектрофотомерия в ультрафиолетовой области	128
7.5.2. Спектроскопия в инфракрасной области	128
7.5.3. Масс-спектрометрия	
7.5.4. Спектроскопия ядерного магнитного резонанса	129
7.5.5. Хромато-масс-спектрометрия	129
7.5.6. Рентгеноструктурный анализ	131
7.5.7. Рентгеновская порошковая дифрактометрия	131
7.5.8. Термические методы анализа	132
7.5.9. Растворимость	133
7.5.10. Определение сорбционных свойств	134
7.6. Методы фрактального анализа	135
7.6.1. Синтез объектов исследования	135
7.6.2. Оптическая микроскопия	135
7.6.3. Расчет фрактальной размерности	136

7.7. Методы биофармацевтического анализа	136
7.7.1. Методика количественного определения дигидрокверцетина	136
7.7.2. Условия культивирования клеток	137
7.7.3. Оценка цитотоксичности	137
7.7.4. Оценка проницаемости	138
7.8. Методы фармацевтико-технологического анализа	140
7.8.1. Сыпучесть и прессуемость	140
7.8.2. Прочность на раздавливание	
7.8.3. Прочность на истирание	141
7.8.4. Распадаемость	141
7.8.5. Тест «Растворение»	142
7.9. Методы фармакологического анализа	143
7.9.1. Условия содержания животных	143
7.9.2. Моделирование ожога ША степени	144
7.9.3. Методы лечения	144
7.9.4. Определение размеров ожога	144
7.9.5. Прочие физиологические тесты	
7.10. Статистическая обработка данных	145
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	148
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ	150
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	152
ПРИЛОЖЕНИЯ	169
Приложение А. Патент	169
Приложение Б. Акт внедрения (Сеченовский университет)	170
Приложение В. Акт внедрения (РНИМУ имени Н.И. Пирогова)	
Приложение Г. Акт внедрения (АО «Аметис»)	
Приложение Д. Выписка из протокола заседания ЛЭК	173

#### введение

Актуальность темы исследования. В XIV издание Государственной РΦ фармакопеи Российской Федерации (ΓΦ XIV) впервые включена ОФС.1.1.0017.15 «Полиморфизм», в которой прописана обязательная оценка полиморфизма фармацевтических субстанций в тех случаях, когда он влияет на их терапевтическую эффективность и безопасность. В статье предусматривается фазового состояния действующего вещества разработке контроль при лекарственного препарата регламентируются И методы исследования полиморфных модификаций.

Дигидрокверцетин (ДКВ) – флаванонол, производимый в промышленных масштабах в качестве фармацевтической субстанции из древесины Лиственницы сибирской (*Larix sibirica* Ledeb.) и Лиственницы даурской (*Larix gmelinii* (Rupr.) Rupr., синоним *Larix dahurica* Turcz.). Несмотря на ограниченную биодоступность, это соединение обладает потенциалом в качестве основы для новых фитопрепаратов благодаря выраженным антиоксидантным свойствам и аффинности к различным биологическим мишеням.

Таким образом, актуальность обусловлена возможностью улучшения характеристик ДКВ путем оптимизации его фазового состояния.

Степень разработанности темы исследования. Комплексное изучение ДКВ было проведено в ИрИХ СО РАН под руководством Н.А. Тюкавкиной. В результате совместных исследований сотрудников Сеченовского университета (Н.А. Тюкавкина, Ю.А. Колесник, И.А. Селиванова), ВИЛАР (В.А. Быков, В.К. Колхир, Т.А. Сокольская), РНИМУ имени Н.И. Пирогова (Ю.О. Теселкин, И.В. Бабенкова) на базе ДКВ был создан препарат «Диквертин» антиоксидантного действия. В настоящее время изучается возможность использования ДКВ в качестве субстанции для разработки комбинированных лекарственных препаратов (М.Б. Плотников, В.Л. Белобородов, И.Р. Ильясов). Несмотря на общемировую тенденцию по оптимизации свойств флавоноидов путем изменения строения твердой фазы, отраженную в работах M.J. Zaworotko, M. Sowa и D. Setyawan, вопрос влияния фазового состояния на свойства ДКВ ранее не рассматривался.

**Цель исследования** – разработать способы получения фазовых модификаций ДКВ с улучшенными биофармацевтическими характеристиками, изучить природу твердой фазы и провести сопоставительный анализ их свойств.

### Задачи исследования:

1. Проанализировать современные тенденции в области модификации свойств флавоноидов посредством изменения их фазового состояния.

2. Сформулировать принципы, позволяющие направленно синтезировать фазовые модификации ДКВ.

3. Получить модификации ДКВ путем изменения его фазового состояния.

4. Разработать системный подход к исследованию фазовых модификаций ДКВ, охарактеризовать их с позиции полиморфизма, разработать и валидировать методики анализа.

5. Изучить биофармацевтические характеристики фазовых модификаций на модели *ex vivo*.

6. Сравнить профили высвобождения действующего вещества и прочностные характеристики таблеток на основе различных фазовых модификаций дигидрокверцетина.

7. Оценить взаимосвязь между фазовым состоянием ДКВ и его ранозаживляющими свойствами на модели ожога ША степени в эксперименте *in vivo*.

Научная новизна. В результате проведенных исследований автором впервые:

– использованы методы молекулярного моделирования *in silico* для поиска и предсказания свойств фазовых модификаций дигидрокверцетина;

– синтезированы фазовые модификации ДКВ с повышенной растворимостью в воде при комнатной температуре: микротрубчатая (ДКВ<sub>т</sub>), микросфероидная (ДКВ<sub>с</sub>) и микроволокнистая (ДКВ<sub>в</sub>);

– расшифрована структура кристаллической ячейки ДКВ<sub>т</sub>, которая депонирована в международной базе кристаллографических данных Cambridge Structural Database (Deposition Number: 1892198);

– описана микроскопическая морфология фазовых модификаций ДКВ;

 – установлена псевдополиморфная природа двух фазовых модификаций ДКВ;

– применены принципы фрактальной геометрии для разработки неразрушающей аналитической методики контроля качества лиофилизатов;

 продемонстрирована корреляция между биофармацевтическими и фармакологическими свойствами фазовых модификаций ДКВ.

Научная новизна исследования подтверждена патентом Российской Федерации № 2640413 от 09 января 2018 г.

**Теоретическая и практическая значимость работы**. Доказана важность изменения фазового состояния действующего вещества как современного подхода к оптимизации свойств фармацевтических субстанций.

способность таблеток Выявлена ДКB<sub>с</sub> высвобождаться ИЗ в пролонгированном режиме, что позволяет рассматривать фазовую эту модификацию в качестве перспективного объекта для разработки таблеток для рассасывания. Установлено повышение ранозаживляющего фармакологического эффекта ДКВ<sub>т</sub> на 14,3% в сравнении с ДКВ<sub>фс</sub>, что определяет целесообразность их дальнейшего изучения и последующего внедрения в качестве действующего вещества противоожоговых и ранозаживляющих лекарственных препаратов местного действия. Разработана методика автоматизированного неразрушающего контроля качества лиофилизатов посредством фрактального анализа, которая может послужить основой для реализации концепции Индустрии 4.0 в отечественном фармацевтическом производстве.

Теоретическая база		Эксперимент		Этап
Свойства ДКВ		Дизайн		
Химическая природа модификации фазового состояния	Анализ межмолекулярных Моделирование фазовых м	с синтонов флавоноидов аодификаций <i>in silico</i>		In silico
Метоли молификации	Синт	ез фазовых модифин	каций	
фазового состояния	Осаждение антирастворителем	Распылительная сушка	Лиофилизация	
	Физ	ико-химический ан	ализ	
Системный подход к анализу фазовых модификаций	Спектральный Морфологический Хромато-масс-спектромет Рентгеноструктурный Рентгенофазовый	Термически Фрактальны Растворимос Сорбционнь	й Й сть це свойства	In vitro
	Фармацевти	ико-технологические	е испытания	
	Прочность таблеток на раз Истираемость таблеток	здавливание Распадаемос Тест «Раство	сть таблеток эрение»	
Впияние				
фазового состояния на свойства соединений	Оценка опо Оценка опо Оценка	офармацетических 1 Оценка пров	параметров ницаемости	Ex vivo
	Оценка	ранозаживляющих	свойств	
	Контактный метод Попово	ой Бесконтактный мето	од с внутренним стандартом	OVIV NL

Рисунок 1 – Дизайн исследования фазовых модификаций ДКВ в трансляционном формате

**Методология и методы исследования**. Методологической основой данной работы является трансляционная модель исследования (Рисунок 1), включающая этапы молекулярного дизайна *in silico*, синтеза, отбора объектов-лидеров по ключевым характеристикам и дальнейшего сопоставительного анализа их свойств в условиях *in vitro*, *ex vivo* и *in vivo*.

### Основные положения, выносимые на защиту:

 Способ получения микротрубчатой кристаллической модификации ДКВ с заданным размером частиц методом осаждения антирастворителем в присутствии мочевины.

 Системный подход к проблеме идентификации фазового состояния ДКВ с позиции полиморфизма с помощью микроскопических, спектральных, рентгенографических и термических методов анализа.

– Результаты комплексного трансляционного исследования фазовых модификаций ДКВ, включающие расчеты их свойств методом молекулярного моделирования *in silico*, анализ биофармацевтических параметров *in vitro*, и изучение фармако-токсикологических характеристик *ex vivo* и *in vivo*.

 Методика фрактального анализа лиофилизатов на базе интеллектуальных технологий в тандеме с оптической микроскопией.

– Валидационные характеристики неразрушающей методики определения предела содержания посторонних примесей в лиофилизированных субстанциях: специфичность, предел обнаружения, правильность, сходимость и устойчивость.

Достоверность научных положений Достоверность И выводов. экспериментальных сформулированных определяется данных выводов И комплексным характером работы, использованием современных инструментальных методов анализа, многократными измерениями, выполненными сертифицированном поверенном оборудовании, на статистической обработкой данных и валидацией разработанных методик.

Апробация результатов исследования. Основные результаты диссертационной работы были доложены и обсуждены на 11<sup>th</sup> World Congress on Polyphenols Applications (Вена, 2017), XI International Conference on Chemistry for

Young Scientists «Mendeleev-2019» (Санкт-Петербург, 2019), XXI Менделеевском съезде по общей и прикладной химии (Санкт-Петербург, 2019), Международном симпозиуме «Фенольные соединения: фундаментальные и прикладные аспекты» (Москва; 2015, 2018), Международном молодежном научном медицинском форуме «Белые цветы» (Казань; 2016, 2019), XIX Международной конференции студентов и молодых ученых «Студенческая медицинская наука XXI века (Витебск; 2019), Ежегодном Саммите молодых ученых и инженеров «Большие вызовы для общества, государства и науки» (Сочи; 2019), IV Всероссийской научно-практической конференции с международным участием "Инновации в здоровье нации" (Санкт-Петербург; 2016), Всероссийской научной конференции студентов и аспирантов с международным участием «Молодая фармация – потенциал будущего» (Санкт-Петербург; 2018, 2019, 2020), Российском национальном конгрессе "Человек и лекарство" (Москва; 2018, 2019, 2020).

Апробация диссертационной работы состоялась «29» января 2021 г. на совместном заседании кафедр химии, фармацевтической и токсикологической химии имени А.П. Арзамасцева, фармацевтического естествознания и фармакологии Института фармации имени А.П. Нелюбина ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский университет).

**Личный вклад автора.** Автору принадлежит ведущая роль в выполнении информационно-поисковых и экспериментальных исследований, в анализе, интерпретации и обобщении полученных данных. При активном участии соискателя сформулированы положения и выводы диссертационной работы, подготовлены публикации по теме исследования.

Внедрение результатов исследования. Результаты диссертационной работы внедрены в учебный процесс кафедры химии ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России, в производственный процесс АО «Аметис», и используются в научно-исследовательской деятельности Отдела медицинской биофизики НИИ трансляционной медицины ФГБОУ ВО РНИМУ имени Н.И. Пирогова Минздрава России.

11

Соответствие диссертации паспорту научной специальности. Научные положения, изложенные в диссертационной работе, соответствуют формуле паспорта специальности 14.04.02 «Фармацевтическая химия, фармакогнозия», а именно пунктам 1, 2, 3 области исследования.

Связь задач исследования с проблемным планом фармацевтической науки. Диссертационная работа выполнена в рамках плана и в соответствии с тематикой научно-исследовательской работы на кафедре химии ФГАОУ ВО Первого МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский университет) по теме «Разработка подходов к анализу, стандартизации, оценке качества, и сертификации биологически активных соединений синтетического и природного происхождения, лекарственных препаратов, медицинских изделий (технологические и экологические аспекты)».

Публикации. По теме диссертационной работы опубликована 31 печатная работа, в том числе 5 статей в журналах Перечня рецензируемых изданий Университета, 7 статей в журналах, индексируемых в международных базах данных, и 1 патент РФ.

Объем и структура диссертации. Диссертация изложена на 173 страницах машинописного текста, содержит 27 таблиц и иллюстрирована 63 рисунками. Текст диссертации состоит из введения, обзора литературы, пяти глав, посвященных обсуждению результатов исследования, экспериментальной части, заключения, списка сокращений и условных обозначений, списка литературы и приложения. Библиография включает 186 источников, в том числе 148 на иностранном языке.

ГЛАВА 1. Фазовые модификации флавоноидов (обзор литературы)

В 1948 году Ј.С. Реw впервые описал получение из древесины Дугласовой пихты (*Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco, более известной как *Pseudotsuga taxifolia* Britton) природного флаванонола ДКВ – 2,3-дигидро-3,5,7-тригидрокси-2-(3,4-дигидроксифенил)-4*H*-1-бензопиранона-4 (Рисунок 1.1). По названию растительного сырья Н. Erdtman предложил именовать новое соединение таксифолин, и именно под таким названием оно, преимущественно, известно в англоязычной научной литературе [134].



Рисунок 1.1 – Молекулярная структура ДКВ

Результаты научно-исследовательских многолетних И опытноконструкторских изысканий, выполненных советскими и российскими учеными, были успешно коммерциализированы и послужили основой для формирования рентабельного наукоемкого промышленного производства [1; 2; 10; 25; 31; 98; надежной ресурсно-сырьевой базе В виде 166]. Благодаря древесины Лиственницы сибирской (Larix sibirica Ledeb.) и Лиственницы даурской (Larix gmelinii (Rupr.) Rupr., синоним Larix dahurica Turcz.), Россия является крупнейшим в мире экспортёром данного природного соединения [158].

ДКВ характеризуется широким спектром биологической активности в сочетании с высоким профилем безопасности и поэтому давно привлекает внимание научного сообщества как объект разработки лекарственных средств [18; 45; 124; 144; 157]. Вместе с тем многие исследователи отмечают, что низкая биологическая доступность ДКВ является одним из основных затруднений, ограничивающих разработку новых фитопрепаратов на его основе, что в целом характерно для флавоноидов [43; 163; 182; 184]. В связи с этим, представляло интерес проанализировать тенденции в области модификации биофармацевтических свойств флавоноидов.

Как известно, в основе структуры этих природных полифенолов лежит дифенилпропан [12; 102; 103]. С химической точки зрения, они представляют собой конденсированную систему бензольного и гетероциклического колец, и связанный с ней боковой фенильный радикал [33]. Базовые структуры групп флавоноидов представлены на Рисунке 1.2.



Рисунок 1.2 – Базовые структуры флавоноидов [33]

Несмотря на неослабевающий интерес научного и медицинского сообщества к флавоноидам, обусловленный их выраженными антиоксидантными свойствами, широким спектром фармакологической активности, а также экологичностью и благоприятным соотношением «затраты-эффективность» при

промышленном производстве [140], создание новых фитопрепаратов на основе этих соединений затрудняется необходимостью оптимизации их биодоступности. Данная задача решается путем разработки более совершенных лекарственных форм [54; 181], получения твердых дисперсий [89; 174] и полусинтетических субстанций [44; 106]. Модификация физико-химических и биофармацевтических параметров флавоноидов посредством изменения фазового состояния И образования аморфных и коаморфных форм, полиморфов и кокристаллов молодым направлением является сравнительно исследований, которым занимается прикладной раздел супрамолекулярной химии, получивший название «инженерия кристаллов» [63].

Цель данного обзора – анализ тенденций в области модификации свойств флавоноидов через изменение их фазового состояния.

### 1.1. Стратегия литературного поиска и общая характеристика статей

Аналитический обзор литературы выполнен в соответствии с руководством Preferred Reporting Items for Systematic reviews and Meta-Analyses (PRISMA) [121].

Исследование проведено на базе агрегаторов научных публикаций eLibrary, Google Scholar, PubMed. Анализировали литературные источники на русском и английском языках, опубликованные за период с 2000 по 2019 год. Стратегия поиска заключалась в сочетании ключевого слова «флавоноид» с одним из следующих терминов: «инженерия кристаллов», «полиморфизм», «кокристалл». На формализованном языке математической логики данный запрос был сформулирован следующим образом: "flavonoid" AND ("crystal engineering" OR "polymorphism" OR "cocrystal").

Обнаруженные статьи подвергали скринингу, основанному на резюме публикаций, в ходе которого из дальнейшего исследования исключали работы обзорного характера, результаты исследований, опубликованные не на русском или английском языках, а также публикации, непосредственно не связанные с фазовой модификацией флавоноидов. Во избежание пропуска значимых источников, учитывали список литературы из обзоров. Содержание отобранных статей тщательно изучали.

Из 1239 статей, найденных в ходе первичного сбора данных с последующим удалением повторов, 1193 публикации были исключены из дальнейшего анализа при ознакомлении с их резюме. После изучения полных текстов оставшихся 43 статей были отброшены еще 2 публикации по причине воспроизведения ранее описанных методик супрамолекулярных синтезов. Алгоритм отбора статей из информационных ресурсов представлен на Рисунке 1.3



Рисунок 1.3 – Блок-схема процесса отбора статей согласно рекомендациям PRISMA

Начиная с 2009 года наблюдается экспоненциальный рост числа статей по модификации физико-химических свойств флавоноидов путем их фазовой

модификации (Рисунок 1.4), что подчеркивает актуальность данного направления для фармацевтической науки. Крупнейшие научные центры, работающие в этой области, расположены в Индонезии (Университет Аирлангта, Сурабая) [50; 142; 143], США (Университет Южной Флориды, Тампа) [94; 95; 147-149] и Польше (Вроцлавский Технологический Университет) [150-154]. Это обусловлено исторически сложившимся интересом перечисленных организаций к разработке лекарственных препаратов на базе флавоноидов.



Рисунок 1.4 — Кумулятивный рост числа публикаций, посвященных фазовым модификациям флавоноидов

Структуры и названия по заместительной номенклатуре флавоноидов, используемых в качестве основы для синтеза новых фазовых модификаций, представлены на Рисунке 1.5.



Рисунок 1.5 – Структуры флавоноидов, подвергнутых фазовой модификации

#### 1.2. Изменение фазовых состояний флавоноидов

### 1.2.1. Дизайн и способы получения

<u>Дизайн</u>. В ходе рационального дизайна фазовых модификаций флавоноидов фундаментальное значение имеет поиск потенциальных сайтов связывания между компонентами твердой фазы – межмолекулярных синтонов. Таким образом, одной из классических концепций поиска новых фазовых модификаций является контент-анализ международной базы кристаллографических данных Cambridge Structural Database, peanusoванный в программном обеспечении, типа Mercury [76; 118]. В структуре флавоноидов присутствуют фенольные и вторичные спиртовые гидроксильные группы, выступающие в качестве кислотных центров, а также карбонильные функциональные группы, являющиеся основными центрами, что обуславливает склонность данных молекул к образованию водородных связей и, как следствие, межмолекулярных синтонов (Рисунок 1.6).



Рисунок 1.6 – Частотность межмолекулярных синтонов в кристаллах флавоноидов

На основании наличия функциональных групп в молекулах, можно рассчитать вероятность образования супрамолекулярных комплексов. Эта идея осуществляется посредством различных дискрипторов, аналогичных моделям quantitative structure–activity relationship (QSAR) и quantitative structure–property relationship (QSPR) [11; 38; 73]. Таким образом был успешно оптимизирован дизайн синтеза ряда кокристаллов кверцетина, гесперетина, галлата эпигаллокатехина [94; 147] и байкалеина [154].

Альтернативный подход к рациональному дизайну фазовых модификаций предполагает расчет энергии образования новой твердой фазы. Он реализуется в программе COSMO-RS [113; 126], в основе алгоритмов которой лежит уравнение:

$$\Delta G^{\circ} = \Delta G_{mix} + \Delta G_{fus}, \qquad (1.1)$$

где  $\Delta G^{\circ}$  – изменение стандартной энергии Гиббса формирования твердой фазы,  $\Delta G_{mix}$  – изменение энергии Гиббса образования супрамолекулярного комплекса,  $\Delta G_{fus}$  – изменение энергии Гиббса при растворении компонентов твердой фазы. Поскольку в процессе получения фазовых модификаций система переходит из одного упорядоченного состояния в другое, то  $\Delta G_{fus}$  стремится к нулю. В то же время, энтропией в кристаллах также можно пренебречь, поэтому расчет  $\Delta G^{\circ}$ сводится к формуле:

$$\Delta G^{\circ} = \Delta H_{mix},\tag{1.2}$$

где  $\Delta H_{mix}$  – изменение энтальпии образования супрамолекулярного комплекса. Данное методологической уравнение основой является для скрининга потенциальных компонентов новых фазовых модификаций, как посредством расчета *ab initio*, так и методами молекулярной динамики, реализованными, в частности в пакете программ Shrödinger. Подобным образом были предсказаны И успешно синтезированы кокристаллы кверцетина структуры И нарингенина [100].

Применение молекулярного моделирования позволяет оптимизировать экономические и временные затраты для поиска новых фазовых модификаций. Тем не менее, согласно литературным данным, методы *in silico* в оптимизации свойств флавоноидов пока применяются редко. <u>Способы получения</u>. Подходы к получению новых фазовых модификаций в лабораторных условиях [90; 101], в зависимости от использования растворителя, можно классифицировать на твердофазный и жидкофазный супрамолекулярный синтез.

*Методы твердофазного синтеза* включают гриндинг и его модификацию дроп-гриндинг, а также экструзию горячего плава.

- Гриндинг. От английского «grinding» «измельчение», «дробление», «перемалывание». Данный метод твердофазного супрамолекулярного синтеза является базовым подходом механохимии [79], суть которого заключается в повышении удельной энергии поверхности вещества, достигаемой за счет перетирания субстанции. Это приводит к увеличению реакционной способности молекул, находящихся на внешнем слое твердой фазы и, как следствие, к спонтанному фазовому переходу.
- Дроп-гриндинг. От английского «drop» «капля». Данная модификация предыдущего метода супрамолекулярного синтеза отличается постепенным добавлением по каплям небольшого количества растворителя. При этом жидкая фаза, выступая в качестве вспомогательного компонента, проникает за счет капиллярных сил в микротрещены на поверхности твердых частиц перетираемого вещества и воздействует изнутри расклинивающими силами.
- Экструзия горячего плава. Метод широко применяется в химии полимеров и предполагает расплавление основного компонента будущей новой твердой фазы и смешивание его с остальными компонентами. Этот процесс осуществляется в шнековом экструдере [91].

Данные технологические подходы объединяет простота исполнения и потенциальная масштабируемость процесса. В то же время твердофазные методы характеризуются достаточно высокими энергетическими затратами и проблемами с очисткой продукта супрамолекулярного синтеза. Тем не менее, таким образом, были успешно получены кокристаллы кверцетина [50; 171; 173], гесперетина [58] и физетина [153], мирицетина [125; 152] и генистеина [150], а также коаморфная форма нарингина [123].

*Методы жидкофазного супрамолекулярного синтеза*, в зависимости от действий, приводящих к формированию осадка, можно классифицировать на подходы, связанные с уменьшением количества растворителя, и технологические приемы, основанные на изменении растворимости будущих компонентов твердой фазы. К первой подгруппе относятся медленное выпаривание и выпаривание на роторном испарителе.

- Медленное выпаривание. Сущность жидкофазного ЭТОГО метода супрамолекулярного синтеза заключается постепенном переходе В легколетучего растворителя из жидкой фазы в окружающую газообразную среду при комнатной температуре. Это приводит К образованию пересыщенного раствора и, как следствие, к выпадению осадка. Данный метод очень прост в исполнении, не требует дополнительных затрат и поэтому находит широкое применение в синтезе фазовых модификаций флавоноидов. Таким образом были получены кокристаллы кверцетина [80; 100; 111; 143; 149] кемпферола, лютеолина [114; 153], хризина, байкалеина [83; 154], генистеина [150; 180], физетина [151], гесперетина, мирицетина [82; 152], аромадендрина [175] и псевдополиморфы мирицетина [72]. К недостаткам описанного способа можно отнести длительность процесса – вплоть до недели и более.
- Выпаривание на роторном испарителе. Данная методика призвана решить недостаток предыдущего способа жидкофазного синтеза и ускорить процесс концентрирования. К сожалению, часто это приводит к образованию плавов и, как следствие, вновь к длительным ожиданиям. Тем не менее, так были синтезированы кокристаллы кемпферола [156], кверцетина [142] и лютеолина [114], а также аморфная модификация кверцетина [170] и коаморфная форма мирицетина [177].
- Электрораспыление. Одной из тенденций последних лет становится постепенный отказ от классических методов супрамолекулярной химии в сторону более высокотехнологичных подходов, например, электрораспыление. В 2018 году этим способом были получены

кокристаллы кверцетина с кофеином, растворимость которых в 14,44 раза превышала характеристики исходной субстанции [130].

Во второй подгруппе жидкофазных методов супрамолекулярного синтеза можно выделить вымораживание, осаждение, и сонокристаллизацию.

- Вымораживание. Данный метод базируется на способности веществ снижать растворимость параллельно с уменьшением температуры окружающей среды. Несмотря на ощутимые энергетические затраты, вымораживание было успешно применено при синтезе кокристаллов кверцетина, гесперетина и галлата эпигаллокатехина [94; 147].
- Осаждение. Этот подход основан на свойстве веществ растворяться в различных соотношениях в зависимости от растворителя [91]. Таким в процессе изменения состава жидкой фазы образом, происходит постепенное образование пересыщенного раствора, что, в итоге, приводит к выпадению осадка. Данный метод имеет множество модификаций в зависимости от природы используемого антирастворителя. Для этой цели применяют как широко используемые растворители, например, диметилсульфоксид (ДМСО) [27], так и суперкритические, такие как жидкий диоксид углерода [186].
- Сонокристаллизация. Как и электрораспыление, эта методика применяется сравнительно недавно и основана на воздействии ультразвуковыми волнами на насыщенный раствор вещества [139]. Искривления пространства, обусловленные прохождением звука сквозь жидкую фазу, приводят к образованию твердой фазы. Таким способом были получены кокристаллы мирицетина [109; 137] и байкалеина [107].

Интересно отметить, что более чем в половине исследований в качестве исходных объектов использовали флавонолы и флавоны, в то время как на долю флаванонолов приходилось только 15,0% (Рисунок 1.7).





В итоге, можно утверждать, что, несмотря на широкий набор методов супрамолекулярного синтеза фазовых модификаций, флаванонолы и, в частности, ДКВ редко применяли в поисковых исследованиях, и поэтому данное соединение является перспективным объектом для изучения.

## 1.2.2. Методы анализа

Установление фармацевтической новой синтезированной природы субстанции разработки является одним ИЗ критически важных этапов лекарственных препаратов, поскольку исходя из свойств вещества формируется комплекс качественных и количественных методов анализа для подтверждения его подлинности и соответствия нормативной документации. Полиморфизм как случай фазовой модификации подлежит контролю со стороны частный регуляторных органов в фармацевтической области, поскольку фазовые переходы могут приводить к изменению фармакологических параметров действующего вещества. Указания на возможность наличия полиморфов у фармацевтических субстанций и соответствующие статьи имеются в государственных фармакопеях Европы [68], США [162]. Рекомендации Food and Drug Японии [161], Administration (FDA) включают более широкий спектр объектов, указывая на методы контроля качества аморфных, сольватных и гидратных форм [78]. На данный момент наиболее полный список фазовых модификаций представлен в

24

проекте фармакопейной статьи международной фармакопеи, в котором, помимо прочего, указаны кокристаллы и псевдополиморфные модификации [65].

Интересно отметить, что в ГФ РФ XIV для гидратов, являющихся частным случаем псевдополиморфов, имеются отдельные фармакопейные статьи. Кроме того, в данном своде регуляторных норм впервые вводится ОФС.1.1.0017.15 «Полиморфизм». В ней приведены методы, позволяющие проводить качественный количественный анализ субстанций, И фармацевтических обладающих одинаковым молекулярным строением вещества, но различающихся формой твердой фазы [8]. Согласно данному документу, для этих целей можно рентгенодифракционные, использовать спектральные, термоаналитические, микроскопические, биологические методы анализа и оценку растворимости.

*Рентгенодифракционный анализ* для фазовых модификаций флавоноидов использовали в формате рентгеноструктурного анализа (РСА) и рентгеновской порошковой дифрактометрии (РПД).

РСА. Метод позволяет получить наиболее полную и достоверную информацию строении твердой фазы, 0 включая компоненты кристаллической ячейки, их взаимное пространственное расположение и конфигурацию центров хиральности. Данный метод использовали в анализе 53,7% фазовых модификаций флавоноидов [56; 58; 59; 80; 94; 95; 111; 137; 148-153; 156; 171; 180]. Тем не менее, ОФС на РСА в РФ пока не разработана. Важно отметить, что качество результатов РСА сильно зависит от параметров исследуемого монокристалла, так как не всегда удается обеспечить требуемый размер и степень кристалличности вещества. Часто подобные кристаллы выращивают в среде перенасыщенного раствора, в связи с чем полученная структура кристаллической ячейки принадлежит не индивидуальным флавоноидам, а их сольватам. Так, в ходе PCA Kavuru продемонстрировала, что при выращивании кристаллов кверцетина в получаются псевдополиморфные формы различных растворителях флавонола, характеризующиеся специфичным строением твердой фазы [94]. Дигидрат кверцетина состоял из множества плоских слоев димеров

(Рисунок 1.8А), сольват с пиридином образовывал последовательные цепочки димеров (Рисунок 1.8В), а кокристалл с ацетоном формировался за счет сложной трехмерной структуры с молекулами растворителя, включенного в полости флавоноида (Рисунок 1.8С).



Рисунок 1.8 – Структуры кристаллических ячеек псеводполиморфных модификаций кверцетина: А – дигидрат, В – пиридиновый сольват, С – ацетоновый сольват [94]

*РПД.* Данным методом исследуют порошок вещества. Эту информацию можно использовать в качестве «отпечатков пальцев» для идентификации твердой фазы (допустимое отклонение пиков составляет ±0,2°). Кроме того, согласно ОФС.1.2.1.1.0011.15 «Рентгеновская порошковая дифрактометрия», метод пригоден для количественного анализа и оценки степени кристалличности вещества [8]. Часто РПД позволяет судить об успешности супрамолекулярного синтеза в процессе инженерии кристаллов флавоноидов, что показано, например, работе Мuresan-Pop и соавт. Появление новых пиков в профиле дифрактограммы доказывало успешное образование новой фазовой модификации мирицетина (Рисунок 1.9) [125]. Благодаря экспрессной методике и простоте исполнения, РПД использовали в анализе более 80% фазовых модификаций флавоноидов.



Рисунок 1.9 – Дифрактограммы ацетамида (черный), мирицетина (красный) и их кокристалла (синий) [125]

Несмотря на то, что методы дифракции рентгеновских лучей являются «золотым стандартом» в физике твердого тела, известны случаи, когда результаты анализа не позволяли корректно интерпретировать имеющиеся данные в отсутствии более комплексного подхода к исследованию вещества [92].

*Термоаналитические методы* занимают второе место по частотности применения в исследованиях фазовых модификаций флавоноидов. Эта группа методов включает дифференциальную сканирующую калориметрию (ДСК) и термогравиметрический анализ (ТГА).

• ДСК. Метод предполагает нагрев и охлаждение анализируемой субстанции. В ходе этих операций происходит измерение энергетических явлений в сравнении с пустой кюветой. Наличие экзо- и эндотермических эффектов позволяет судить о существовании фазовых переходов между различными формами вещества и тем самым установить природу вещества [138]. Для этих целей, согласно ОФС.1.2.1.0027.18 «Термический анализ», рекомендуется использовать ДСК [8]. Как и РПД, данный метод широко применяется в анализе фазовых модификаций флавоноидов – в 68,2% случаев. Этим методом Borghetti и соавт. доказали, что на рынке фармацевтических субстанций в 2012 году находились в обращении по крайней мере три фазовые модификации кверцетина [56]. По положению и числу экзотермических пиков на термограммах анализируемых образцов флавонола можно сделать вывод, что они относятся к кристаллогидратам с различным строением кристаллической ячейки (Рисунок 1.10).



Рисунок 1.10 – Термограммы трех псеводополиморфных модификаций кверцетина: форма а (черный), форма b (красный), форма с (синий) [56]

ТГА. В случае ТГА анализу подвергаются не тепловые явления, а масса. Метод дополняет ДСК и позволяет выстраивать более обоснованные суждения о природе обнаруженных фазовых переходов. Например, в публикации Zhang и соавт. [180] на основании ΤΓΑ результатов кокристаллов генистеина с бипиридином было установлено, что выраженный эндотермический эффект при 273,9 °С на термограмме продукта супрамолекулярного синтеза связан с разложением фазовой модификации, что подтверждается последующим уменьшением массы анализируемого образца (Рисунок 1.11). Кроме того, ОФС.1.2.1.0027.18 «Термический анализ» рекомендует использовать ТГА для контроля чистоты вещества [8]. Однако, в силу ограниченности, для количественного

анализа он не подходит [135]. Этот метод использовали в ходе исследований 31,7% фазовых модификаций флавоноидов [56; 72; 80; 83; 109; 125; 150-152; 173; 175; 180].



Рисунок 1.11 – Результаты ТГА (синий) и ДСК (красный) кокристаллов генистеина с бипиридином [180]

Интересно отметить, что термоаналитические приборы в последнее время все чаще используют в тандеме с другими методами исследования, такими как РПД и масс-спектрометрия, с целью получения информации о структуре и свойствах не только твердой фазы, но и продуктов фазового перехода, однако для анализа фазовых модификаций флавоноидов подобные комбинации не были описаны.

Спектральные методы включают спектроскопию в инфракрасной области (ИК-спектроскопия), рамановскую спектроскопию и спектроскопию ядерного магнитного резонанса (ЯМР) в твердой фазе.

 ИК-спектроскопия. Как и РПД, данный метод позволяет идентифицировать фазовое состояние вещества по «отпечаткам пальцев» и рекомендован ОФС.1.2.1.1.0002.15 «Спектрометрия в инфракрасной области» [8]. Таким образом, были описаны 48,7% фазовых модификаций флавоноидов [50; 80; 82; 114; 115; 123; 130; 142; 156; 164; 171; 173; 175; 180]. Очень часто этот метод используют в качестве экспресс теста для подтверждения успешности образования новой фазовой модификации, сравнивая спектры продукта с исходными реагентами и их физической смесью (Рисунок 1.12). Например, в работе Athiyah был доказан успешный синтез кокристалла кверцетина с янтарной кислотой [50]. Кроме того, с помощью ИК-спектроскопии можно установить наличие водородных связей, участвующих в формировании твердой фазы [138].



Рисунок 1.12 – ИК-спектры кверцетина (А), янтарной кислоты (В), их механической смеси (С) и кокристаллов (D) [50]

Рамановская спектроскопия. Данный аналитический подход является неразрушающим методом и, в отличии от ИК-спектроскопии, основан на отражении рамановского излучения молекулами вещества. Полученный спектр также позволяет идентифицировать фазовое состояние вещества по «отпечаткам пальцев». Например, в работе Sowa и соавт. [150] рамановский спектр кокристалла генистеина и кофеина имел качественные отличия от исходных реагентов (Рисунок 1.13). Тем не менее, несмотря на ряд ОФС.1.2.1.1.0009.15 преимуществ И рекомендации «Рамановская спектрометрия», ввиду меньшей распространенности приборного оборудования в химических лабораториях, этот метод используется не часто [8].



• ЯМР в твердой фазе. Этот метод является одним из самых современных, чувствительных и информативных и обеспечивает проведение качественного и количественного анализа фазовых модификаций [8]. Согласно нашим данным, в центрах коллективного пользования России отсутствует возможность проведения подобных исследований. Несмотря на дороговизну оборудования, данный метод был использован в анализе каждой пятой новой твердой формы флавоноидов, синтезированных за рубежом, как например, для кокристаллов гесперетина с никотинамидом (Рисунок 1.14) в работе Vasisht и соавт [171].



Рисунок 1.14 — Спектры ЯМР <sup>13</sup>С в твердой фазе: А — гесперетин, В — никотинамид, С — кокристалл гесперетина с никотинамидом [171]

*Морфологический анализ*, выполненный посредством различных микроскопических методов, предоставляет информацию о геометрическом

31

строении твердой фазы, что может быть использовано для идентификации фазовых модификаций. Оптическая микроскопия, условия выполнения которой регулируются ОФС.1.2.1.0009.15 «Оптическая микроскопия», является наименее ресурсозатратным аналитическим методом [8]. Помимо этого, известны случаи успешного использования поляризационной оптической микроскопии, флуоресцентной микроскопии и сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) для идентификации и описания фазовых модификаций флавоноидов [69; 80; 132]. Так, в работе Liu и соавт. при помощи СЭМ было установлено, что в ходе сонокристаллизации образуются нанокристаллы мирицетина (Рисунок 1.15) [109].





Рисунок 1.15 – Микрофотографии фазовых модификаций мирицетина: А – исходная субстанция, В – нанокристаллы [109]

Растворимость используется в фармацевтическом анализе как критерий подлинности и чистоты фармацевтических субстанций. Однако, фазовые модификации характеризуются различной растворимостью. Наблюдаемое противоречие объясняет теория «эффекта потока и парашюта» ("spring and parachute" effect) [53]. Согласно данной концепции, в процессе растворения образуется пересыщенный раствор за счет формирования метастабильных супрамолекулярных ассоциатов между молекулами компонентов твердой фазы и растворителя (эффект «потока»). В свою очередь, в соответствии с законом Оствальда, кинетика перехода из пересыщенного раствора в насыщенный с выпадением осадка может быть замедлена – эффект «парашюта». Поэтому фазовые модификации идентифицируют по скорости и полноте растворения твердой фазы, что наглядно подтверждает частотность подобных методик в

анализе новых форм флавоноидов – 63,6% случаев [50; 58; 59; 72; 82; 107; 109; 111; 115; 125; 130; 142; 143; 151; 171; 175]. Так, например, в публикации Franklin и соавт. указано, что растворимость двух кристаллогидратов мирицетина различалась более чем в 5 раз [72]. При этом на профиле растворения для более высоко растворимой модификации отчетливо виден резкий пик, обусловленный эффектом «потока» с последующим постепенным уменьшением концентрации вещества в растворе – эффект «парашюта» (Рисунок 1.16).



Рисунок 1.16 – Профили растворения двух кристаллогидратов мирицетина [72]

физико-химические свойства Другие также могут служить для идентификации фазовых модификаций. Так, Государственная фармакопея Японии допускает идентификацию полиморфов посредством анализа адсорбционнодесорбционного гистерезиса [161]. Известны случаи, когда кокристаллы обладали свойствами способностью различными люминесцентными И к таблетированию [62; 160].

Таким образом, научная литература нормативная И документация предоставляет широкий спектр аналитических подходов для исследования строения твердой фазы фармацевтических субстанций. Важно понимать, что использование метода повышает риск неверной одного интерпретации результатов анализа [55; 92]. Поэтому при исследовании фазовых модификаций необходимо использовать комплексный подход.

#### 1.2.3. Фармакологические исследования

В ходе фазовой модификации химическая структура действующего вещества не изменяется, поэтому с точки зрения фармакодинамики фазовые модификации, как правило, идентичны. Однако данные объекты представляют интерес для другого раздела фармакологии – фармакокинетики, поскольку можно ожидать различий в биологической доступности фазовых модификаций.

В последнее время исследователи фокусируют внимание на оценке биологической доступности фазовых модификаций флавоноидов в условиях *in vivo* на экспериментальных животных. Результаты контент-анализа публикаций, посвященных данной теме, представлены в Таблице 1.1. В статье 2011 года Smith и соавт. описали повышение биологической доступности флавоноида более чем в 10 раз, используя кокристаллизацию кверцетина с теобромином [149]. Важно отметить, что иногда повышение биодоступности может быть достигнуто посредством снижения растворимости флавоноида в воде. Этот факт был продемонстрирован Smith и соавт. в работе 2013 года на примере кокристаллов эпикатехина с изоникотиновой кислотой [147].

	Площадь под кр	ивой, мкг•ч/мл	Увеличение	
Объект	исходный	фазовая	биологической	
исследования	флавоноид	модификация	доступности	Ссылка
		флавоноида	флавоноида, × раз	
Байкалеин	23,94	147,59	6,16	[107]
	74,96	209,67	2,80	[83]
Гесперетин	2,11	3,39	1,60	[58]
Кверцетин	7,79	13,63	1,75	[171]
	0,12	1,24	10,33	[149]
Кемпферол	39,55	178,68	4,52	[80]
Лютеолин	3,06	4,42	1,44	[114]
Мирицетин	3,88	11,51	2,97	[109]
Эпикатехин	0,66	0,91	1,37	[147]

Таблица 1.1 – Повышение биодоступности флавоноидов путем их фазовой модификации

Вместе с тем, не стоит забывать, что целью проведения подобных научноисследовательских работ является не столько повышение биологической доступности флавоноидов, сколько достижение ими терапевтических эффектов за счет потенциальных фармакологических свойств. Подобных исследований, на данный момент, проведено значительно меньше. Так Zhang и соавт. получили кокристаллы генистеина с бипиридином [180]. В ходе эксперимента *in vitro* на основании расширения зоны задержки роста условно патогенной микрофлоры выявлено увеличение антибактериальной активности кокристалла до 39% в сравнении с исходным флавоноидом. Другой пример подобных исследований публикации Chadha [58]. результате описан В И соавт. В оценки противовоспалительных свойств кокристаллов гесперетина с кофеином на модели экспериментальных установлено, животных что выраженность фармакологического эффекта повысилась на 43,4% по сравнению с исходной субстанцией. Также интересно упомянуть работу Liu и соавт. В результате кокристаллизации кверцетина с пиразинамидом, применяемым в качестве противотуберкулезного средства, на модели экспериментальных животных наблюдали значительное снижение гепатотоксического эффекта не флавоноидного компонента твердой фазы [111]. Важно подчеркнуть, что все вышеописанные исследования относятся к доклинической фазе разработки лекарственных препаратов.

В базах данных клинических исследований ВОЗ и FDA на данный момент отсутствует информация о проведении испытаний фазовых модификаций флавоноидов с привлечением пациентов [60; 84]. Однако следует отметить, что научное сообщество вплотную приблизилось к этому критическому шагу, успешное прохождение которого позволит внедрить результаты фундаментальных исследований в реальную клиническую практику. Так, 18 февраля 2020 года группа ученых из Рейнского Боннского университета имени Фридриха Вильгельма объявила о старте пилотного рандомизированного плацебоконтролируемого исследования E-Pip-Pilot, целью которого является возможности повышения биодоступности опенка эпикатехина и галлата эпигаллокатехина при совместном приеме с пиперином [66]. Успех немецких ученых может послужить прецедентом, способствующим более активному изучению кокристаллов флавоноидов и их фазовых модификаций в целом.

35

Можно констатировать, что В результате научных исследований сравнительно отработаны недавно химические методы, позволяющие синтезировать фазовые модификации флавоноидов. На данный момент начаты работы проведению потенциальных фармакологических ПО оценки ИХ преимуществ в сравнении с исходными субстанциями.

#### 1.3. Оптимизация фазового состояния дигидрокверцетина

Первые работы, посвященные изучению фазового строения ДКВ, были осуществлены на государственном стандартном образце (ГСО) ДКВ под руководством проф. Тюкавкиной Н.А. [4; 24]. При помощи комплекса методов, включающих РСА и термические методы анализа, было установлено, что данный объект является кристаллогидратом. Полученные результаты послужили теоретической базой для направленных исследований по модификации свойств ДКВ путем изменения его фазового состояния.

Исторически наиболее ранним способом повышения биологической доступности ДКВ через увеличение его растворимости в воде был синтез хелатных комплексов. В научных публикациях описаны соли флавоноида с катионами железа(II), меди(II), кальция и цинка [14; 29; 30]. Однако дальнейшие исследования данных объектов не проводились, что связано, по-видимому, с неустойчивостью хелатных комплексов в биологических жидкостях организма и с токсическим действием тяжелых металлов.

Для преодоления обозначенной проблемы И сохранения исходной молекулярной структуры природного вещества в течение последнего десятилетия велись разработки твердых дисперсий на базе ДКВ. Суть данной технологии заключается в растворении кристаллического вещества в полимере, что должно приводить к увеличению растворимости и биодоступности флавоноида. В качестве вспомогательного вещества по отношению к ДКВ были опробованы [26], полисахариды, как арабиногалактан хитозан [51]. такие циклодекстрины [179; 185] и некоторые полимеры другой химической природы, например, поливинилпирролидон [146]. Во всех приведенных публикациях
исследователи отмечали улучшение профиля растворимости. Однако эксперимент *in vivo* по оценке изменения биологической доступности был проведен только для твердой дисперсии ДКВ c у-циклодекстрином ходе которого В V супрамолекулярного увеличение комплекса отмечено площади под фармакокинетической кривой в 7 раз по сравнению с исходной субстанцией [179].

Наряду с изучением твердых дисперсий изменение физико-химических свойств флавоноидов осуществляли путем модификации их фазового состояния без использования полимеров. Часто новые субстанции характеризовались специфической морфологией. Так, в 2008 году Тараховским и соавт. был опубликован способ получения микроволокон ДКВ путем осаждения антирастворителем [27]. Исходную фармацевтическую субстанцию растворяли в ДМСО, а затем в полученный маточный раствор добавляли избыток воды при интенсивном перемешивании. Новая фазовая модификаций ДКВ получена в форме суспензии. В ходе оптической и электронной микроскопии было установлено, что в составе гетерогенной системы присутствовали: прямоугольные кристаллы шириной 10 – 15 мкм и длиной до 100 мкм, волокна, размеры которых составляли 1 мкм и 40 мкм и нанотрубки с диаметром 50 – 80 нм.

В 2012 году Zu и соавт. сообщили о получении микронизированного ДКВ [184]. Спиртовой раствор флаванонола впрыскивали в сжиженный углекислый газ, который вытеснял ДКВ из раствора-носителя, что позволило отфильтровать биофлавоноид в виде осадка. Примечательно, что снижение температуры антирастворителя и повышение давления его подачи, уменьшение концентрации ДКВ в спиртовом растворе и снижении скорости смешивания двух жидкостей приводили к уменьшению размера частиц флаванонола. В ходе анализа микронизированного ДКВ методом ИК-спектроскопии было установлено наличие небольших различий в диапазоне от 3600 до 2400 см<sup>-1</sup>, а также увеличение интенсивности поглощения этой области полос в для новой фазовой модификации. Согласно данным РПД и ДСК новая форма ДКВ являлась безводной аморфной субстанцией. Микронизированный ДКВ обладал в 4 раза большей растворимостью в сравнении с исходной формой. Однако результаты дальнейших исследований этих объектов в научной литературе обнаружены не были.

Таким образом, ДКВ мало изучен с позиций инженерии кристаллов и представляет интерес в качестве объекта для получения фазовых модификаций.

#### Выводы по главе

- Описана успешная мировая практика улучшения физико-химических параметров флавоноидов посредством оптимизации их фазового состояния.
- Продемонстрирована эффективность современных компьютерных методов in silico при проведении поисковых исследований по разработке новых фазовых модификаций флавоноидов.
- Установлены методы синтеза фазовых модификаций, различающиеся технологическим уровнем и успешно апробированные на флавоноидах.
- Отмечена необходимость комплексного изучения фазовых модификаций фармакопейными И не фармакопейными методами анализа лля всестороннего описания продуктов супрамолекулярного синтеза с позиций строения кристаллической ячейки. фазовых переходов между модификациями, морфологии твердой фазы и физико-химических свойств.
- Доказана оптимизация биофармацевтических параметров и установлено повышение фармакологической эффективности и безопасности фазовых модификаций флавоноидов в сравнении с исходными фармацевтическими субстанциями в экспериментах *in vivo*.
- Выявлена малая частотность фазовых модификаций по отношению к флаванонолам в сравнении с другими группами флавоноидов, что делает ДКВ перспективным объектом для оптимизации его физико-химических, технологических и биофармацевтических свойств путем изменения фазового состояния.

### ГЛАВА 2. Дизайн и синтез фазовых модификаций дигидрокверцетина

# 2.1. Компьютерное моделирование фазовых состояний дигидрокверцетина

По результатам анализа международной библиографической базы данных PubMed, выполненного на момент начала данной научной работы, было установлено, что в период с 2005 по 2015 год наблюдалась тенденция к ежегодному экспоненциальному росту числа статей, посвященных изучению флавоноидов методом математического моделирования (Рисунок 2.1). Так, в 2005 году было опубликовано 20 статей по данной тематике, в то время как в 2015 году этот показатель вырос до 147. Этот тренд сохраняется и в настоящее время: в 2019 году результаты изучения флавоноидов методами *in silico* описаны в 290 работах. Как правило, целью исследователей был поиск соединений, характеризующихся высоким аффинитетом по отношению к биологическим мишеням [38]. Также компьютерно-вычислительные инструменты применяли для объяснения наблюдаемых фармакологических эффектов на молекулярном уровне [73].



Рисунок 2.1 – Экспоненциальный рост числа публикаций по компьютерному моделированию флавоноидов за десятилетний период

Согласно этим литературным данным, различные представители семейства флавоноидов, такие как кверцетин, лютеолин, гесперетин, могут проявлять противовирусное [112], антибактериальное [67], противодиабетическое [129], иммуномодулирующее [105], противоопухолевое [172] действие. Среди флавоноидов выделяется ДКВ. Было показано, что он может связываться с биологическими мишенями вируса SARS-CoV-2 [74]. В ходе исследования активности 4500 флавоноидов против четырех жизненно важных белков вируса Эболы ДКВ оказался одним из соединений-лидеров [136]. Кроме того, ДКВ способен ингибировать эпителиальные факторы роста [128], что может найти применение при лечении онкологических заболеваний. Биологическая активность этого биофлавоноида, во многом, объясняется его молекулярной структурой. В составе ДКВ содержатся четыре фенольных гидроксильных группы и одна вторичная спиртовая гидроксильная группа, а также карбонильная группа. Такой набор функциональных групп обуславливает возможность кислотно-основных взаимодействий, что в сочетании с неплоским углеродным скелетом И сравнительно малыми размерами молекулы обеспечивает склонность к плейотропному фармакологическому действию.

Результаты компьютерных расчетов использовали в рациональном дизайне биологически активных молекул. Важно отметить, что изучение виртуальных объектов *in silico* часто является первым этапом разработки лекарственных средств, и способствует оптимизации исследовательского процесса. Тем не менее, повышенный интерес научного сообщества к природным несмотря на флавоноидам и все большее внедрение методов компьютерной химии в исследовательскую практику, до настояшего момента молекулярное моделирование не применялось для изучения фазового состояния ДКВ и поиска его новых фазовых модификаций.

### 2.1.1. Роль молекул растворителя

Трансляционный формат данного исследования предполагал использование методов *in silico* для проведения поисковых исследований и осуществления направленного синтеза новых фазовых модификаций ДКВ. В ходе

вычислительных работ в виртуальном пространстве оценивали влияние молекул растворителей на супрамолекулярное строение твердой фазы исследуемого биофлавоноида.

Было получено 15 вариантов моделей наночастиц ДКВ с различной степенью насыщения водой кристаллических ячеек и положением молекул растворителя в них (см. условия 7.3.1). Внешне частицы характеризуются похожим строением: они представляют собой кубы с вогнутыми гранями (Рисунок 2.2). Согласно данным литературных источников [34], подобная форма довольно распространена в мире нанообъектов и ее образование обусловлено давлением внешней среды на стенки наночастиц. Длина сторон кубов составляла, приблизительно, 17 нм.



Рисунок 2.2 – Внешний вид модели наночастицы ДКВ

С химической точки зрения, между гранями различных кубических наночастиц ДКВ наблюдались определенные различия. Некоторые грани моделей, за счет увеличения числа фенольных гидроксильных групп на поверхности, имели склонность к взаимодействиям с соединениями, большую обладающими основным характером. Другие стороны виртуальных объектов характеризовались карбонильных функциональных повышенным содержанием групп π-И насыщенных ароматических колец, что приводило к увеличению основных свойств. Также отмечена различная степень ионизации химических центров на поверхности моделей ДКВ. Введение в структуру твердой фазы молекул растворителей приводило к потенцированию реакционной способности.

Гораздо более выраженные различия между строением твердой фазы ДКВ наблюдали на поперечном срезе моделей наночастиц. Для сопоставительного анализа виртуальных объектов наиболее показательными были безводная форма и частица, в которой на две молекулы ДКВ приходится пять молекул воды. В отсутствии кристаллизационной воды формируется однородная твердая фаза (Рисунок 2.3А). Кристаллогидрат ДКВ характеризуется образованием полости внутри частицы в форме креста (Рисунок 2.3В). Расстояние между стенками полости варьирует от 4 до 11 нм для различных сечений. Таким образом, до 78,6% внутреннего объема твердой фазы кристаллогидрата ДКВ занимает пустое пространство. По материаловедческой классификации данные модели наночастиц можно охарактеризовать как мезопористый объект [119], поскольку диаметр внутренней полости (или канала) укладывается в диапазон от 2 до 50 нм.





Рисунок 2.3 – Поперечный срез моделей фазовых модификаций ДКВ: А – в отсутствии молекул воды, В – при наличии кристаллизационной воды

Виртуальные модели частиц, которые были построены из кристаллических ячеек, обладающих другой степенью насыщения водой и положением ее молекул в пространстве, также характеризовались наличием полости внутри твердой фазы. Однако они не обладали такой выраженной симметрией, как в случае молярного соотношения ДКВ к воде 2:5.

Различия между твердой фазой ДКВ было отмечено не только в морфологических параметрах, но и физических характеристиках, в частности – в

упругих свойствах, изученных в процессе моделирования деформации (см. условия 7.3.2). Существенных различий в результатах 161 вычислительного алгоритма для отдельных моделей не выявлено, что позволяет характеризовать виртуальные наночастицы как изотропные объекты. То есть, вне зависимости от направления вектора приложения деформирующей силы наблюдали одинаковые процессы нарушения структуры частиц ДКВ, что говорит о постоянстве физических параметров твердой фазы.



Рисунок 2.4 – Симуляция деформации фазовых модификаций ДКВ: А – безводная форма, В – кристаллогидратная форма

В процессе деформации модель безводной фазы ДКВ сплющило, и она утратила исходную форму (Рисунок 2.4А). Такое поведение, наравне с аморфных субстанций. Твердая изотропностью, характерно для фаза кристаллогидрата характеризуется более выраженной жесткостью. В ходе моделирования происходит разрыв наиболее тонких стенок фазы, толщина которых в некоторых местах не превышает 2 нм. На Рисунке 2.4В хорошо видны форм. Следовательно, осколки различных размеров И данная модель характеризуется более выраженными кристаллическими свойствами.

Следует отметить, что для кристаллических материалов более характерны анизотропные свойства, чем изотропные. Однако при моделировании деформации наночастиц ДКВ наблюдалась изотропность. Этот эффект можно объяснить созданием идеальных условий *in silico*, поскольку сформированные виртуальные объекты обладали высокой степенью симметрии и не имели дефектов структуры.

Таким образом, в структуре твердой фазы ДКВ молекулы воды выполняют не только структурную функцию, способствуя образованию внутренней полости, но и конструкционную, придавая системе кристаллическую структуру и жесткость.

### 2.1.2. Влияние значения рН среды

Компьютерное моделирование позволяет оценивать влияние окружающей среды на степень ионизации молекул ДКВ (см. условия 7.3.3). Для формирования межмолекулярных синтонов между ДКВ и водой требовалось увеличить число частично ионизированных молекул флаванонола. Из Таблицы 2.1 следует, что оптимальное значение рН находится около 7, поскольку именно в этом случае примерное соотношение неионизированных и частично ионизированных молекул ДКВ приближается к равенству, что и способствует формированию стабильной твердой фазы.

	Соотношение молекул ДКВ различной степени ионизации, %				
Значение рН	Неионизированная форма ДКВ	Форма ДКВ с ионизированной 7 ОН-группой	Другие ионизированные формы ДКВ		
1	100,00	0,00	0,00		
2	100,00	0,00	0,00		
3	99,99	0,01	0,00		
4	99,93	0,07	0,00		
5	99,32	0,67	0,01		
6	93,59	6,34	0,07		
7	59,22	40,09	0,69		
8	12,09	77,82	10,09		
9	0,89	60,22	38,89		
10	0,02	12,85	87,13		
11	0,00	0,88	99,12		
12	0,00	0,01	99,99		
13	0,00	0,00	100,00		
14	0.00	0.00	100.00		

Таблица 2.1 – Соотношение молекул ДКВ с различной степенью ионизации в зависимости от значения pH среды

Результаты молекулярного моделирования послужили теоретической базой для рационального дизайна фазовых модификаций ДКВ.

#### 2.2. Разработка способа получения фазовых модификаций

# 2.2.1. Кристаллогидрат дигидрокверцетина

По результатам исследований *in silico*, кристаллогидрат ДКВ представляет интерес для получения и дальнейшего изучения ввиду необычной пористой морфологии. Согласно данным литературного анализа, одним из наиболее простых и распространенных методов включения молекул растворителей в структуру кристалла является осаждение из гомогенной жидкой фазы.

Супрамолекулярный синтез осуществляли в спиртовом растворе ДКВ. Дистиллированная вода выступала в качестве антирастворителя. Для регулирования кислотности среды, созданной этанолом и флаванонолом, использовали мочевину, проявляющую слабые основные свойства. Согласно данным оптической микроскопии, полученный осадок представлял собой микротрубки различных размеров.

Соотношение	Значение рН	Выход		
ДКВ: мочевина	маточного	продукта,	тазмеры частиц,	Стабильность
(масс.%)	раствора	(масс.%)	IVI K IVI	
100:0	6	0,0	-	-
85:15	6	2,3	215,29 x 12,89	+
70:30	7	67,1	234,40 x 22,84	+
65:35	8	0,1	218,61 x 13,09	+
55:45	8	0,0	-	-

Таблица 2.2 – Влияние значения рН на выход ДКВ<sub>т</sub>

Технологию получения ДКВ<sub>т</sub> оптимизировали по следующим параметрам: температурный режим, значение pH исходного маточного раствора и продолжительность процесса. В Таблице 2.2 продемонстрировано влияние соотношения ДКВ и мочевины на выход продукта супрамолекулярного синтеза. Представленные данные хорошо согласуются с результатами молекулярного моделирования: нейтральная среда (значение pH=7) является оптимальной для получения ДКВ<sub>т</sub> и достигается при соотношении компонентов 7:3.

В ходе изучения влияния температуры (Таблица 2.3), при которой происходит осаждение ДКВ<sub>т</sub>, установлено наличие прямой зависимости между окружающей образующихся параметрами среды размерами И частиц (Рисунок 2.5). Данное наблюдение можно объяснить тем, что в условиях пониженной температуры происходит снижение растворимости флавоноида. Это приводит к перенасыщению маточного раствора и увеличению количества точек кристаллизации. Поскольку осаждение происходит на большее количество частиц, фазовое равновесие достигается раньше, чем микротрубки успевают достаточно вырасти. Однако при низкой температуре (- 5 °C) происходит слишком быстрое образование осадка, что не позволяет сформироваться правильным колоновидным частицам. Таким образом, была установлена нижняя граница оптимума температурного режима для проведения супрамолекулярного синтеза ДКВ<sub>т</sub>, равная + 5 °C. В то же время, на фоне повышения температуры среды происходит увеличение растворимости ДКВ, что приводит к снижению выхода целевого продукта, поэтому верхняя температурная граница осаждения ДКВ<sub>т</sub> находится на уровне 35 °C.



Рисунок 2.5 – Различные уровни организации ДКВ<sub>т</sub>: А – микротрубки; В – нанотрубки (условия см. 7.4.2)

Температурный режим, °С	Выход продукта, (масс.%)	Средние размеры трубок, мкм
- 5	0,0	-
+ 5	66,5	20,70 x 2,24
+ 15	66,8	40,99 x 3,77
+ 25	67,1	234,40 x 22,84
+ 35	66,2	1998,70 x 64,20
+ 45	42,3	679,49 x 66,21

Таблица 2.3 – Влияние температуры на размер частиц ДКВ<sub>т</sub>

Оптимизацию продолжительности супрамолекулярного синтеза осуществляли по данным, отражающим зависимость между массой образовавшегося осадка ДКВ<sub>т</sub> и временем, в течение которого происходило выдерживание маточного раствора. При температуре 25 °C и соотношении масс ДКВ и мочевины 7:3, кривая выходит на плато через 36 ч (Рисунок 2.6).



Рисунок 2.6 – Зависимость массы ДКВ<sub>т</sub> от времени выдерживания маточного раствора

Основываясь на результатах исследований *in silico* и *in vitro* можно описать процесс самосборки микротрубок следующим образом.

1. Медленное добавление воды в исходный спиртовой раствор ДКВ при интенсивном перемешивании приводит к изменению растворимости биофлавоноида и происходит формирование точек кристаллизации.

2. Взаимное расположение молекул ДКВ в кристаллической ячейке способствует образованию тетрагональных наночастиц на основе точек кристаллизации.

3. Частичная ионизация наночастиц ДКВ в совокупности с медленным переходом молекул флавоноида из раствора в твердую фазу позволяет добиться неравномерного роста с разных сторон нанообъектов, благодаря чему наблюдается самосборка микротрубок флаванонола.

4. После достижения фазового равновесия между твердой фазой осажденных микротрубок и водно-спиртовым раствором рост частиц постепенно замедляется и, в конечном итоге, выходит на плато.

Разработанный способ получения ДКВ<sub>т</sub> защищен патентом Российской Федерации RU 2 640 413 C1 (Приложение А).

# 2.2.2. Аморфные формы дигидрокверцетина

Стратегия синтеза аморфных модификаций ДКВ строилась на процессе удаления молекул любых растворителей из твердой фазы флавоноида. Согласно данным молекулярного моделирования, этот процесс приводит к снижению жесткости структуры и повышению изотропных свойств.

В качестве основного метода получения аморфных форм ДКВ использовали лиофилизацию – тип мягкой сушки субстанции в условиях пониженной температуры и давления. В качестве маточного раствора использовали гомогенную систему, включающую этанол и воду очищенную. Выбор данных растворителей обусловлен их низкой токсичностью (этанол – III класс токсичности, согласно ОФС.1.1.0008.15 «Остаточные органические растворители» [8]).

Подбор концентрации ДКВ и соотношения этанола и воды базировался на двух принципах: достижения максимального выхода продукта за один синтез и соблюдения технологического регламента процесса лиофилизации. Ввиду высокой летучести этанола, даже при малых количествах органического растворителя сушка протекала с образованием жидкой фазы, что не допустимо при проведении лиофилизации. Таким образом, было установлено, что соотношение этанола и воды 5:95 является оптимальным решением. Концентрация ДКВ выбрана не выше 5,0%, поскольку при более высоком содержании происходило осаждение флавоноида в процессе предварительной глубокой заморозки.

Продукт лиофильной сушки **ДКВ**<sub>в</sub> представляет собой \_ микроволокнистую субстанцию со свойством статистического самоподобия обладает есть морфология твердой фазы структуры, то элементами, повторяющимися на различных уровнях организации, что хорошо видно при различных увеличениях (Рисунок 2.7).



Рисунок 2.7 – Морфология ДКВ<sub>в</sub> при увеличении: А – x400 раз, В – x1200 раз (условия см. 7.4.2)

Одним из недостатков ДКВ<sub>в</sub> следует признать нестабильность при длительном хранении (более 1 часа) на открытом воздухе, которая, очевидно, связана с высокой гигроскопичностью лиофилизата. В результате деградации образуется исходная форма ДКВ.

В качестве альтернативного метода удаления кристаллизационной воды из структуры твердой фазы ДКВ использовали метод распылительной сушки, реализованный в промышленных условиях (см. условия 7.1.1). Вещество, полученное таким способом, имеет сфероидные частицы (Рисунок 2.8) и обозначено нами как ДКВ<sub>с</sub>. В отличии от ДКВ<sub>в</sub>, данная форма может храниться на открытом воздухе.



Рисунок 2.8 – Морфология частиц ДКВ<sub>с</sub> (условия см. 7.4.2)

Таким образом, путем изменения условий супрамолекулярного синтеза можно добиться образования целевой фазовой модификации ДКВ. Высокие температуры в сочетании с высоким давлением, равно как и экстремально низкие температуры в условиях разряженной атмосферы способствуют выведению молекул растворителя из твердой фазы исследуемого биофлавоноида и приводят к его аморфизации. В то же время, формирование кристаллогидрата в водноспиртовой среде происходит при нормальных условиях, однако при этом необходимо контролировать значение pH смеси.

Полученные теоретические результаты внедрены в образовательный процесс на кафедре химии Института фармации имени А.П. Нелюбина ФГАОУ ВО Первого МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Приложение Б). Результаты поисковых исследований по синтезу фазовых модификаций ДКВ с улучшенной растворимостью используются в научно-исследовательской деятельности Отдела медицинской биофизики НИИ трансляционной медицины ФГБОУ ВО РНИМУ имени Н.И. Пирогова Минздрава России (Приложение В) и внедрены в производственный процесс АО «Аметис» (Приложение Г).

# Выводы по главе

- Использованы методы молекулярного моделирования *in silico* для поиска новых фазовых модификаций ДКВ и предсказания их свойств.
- Впервые получена виртуальная модель фазового состояния природного биофлавоноида на примере наночастицы ДКВ.
- Сформулированы следующие принципы направленного синтеза фазовых модификаций ДКВ:

- наличие кислотных и основных центров в структуре ДКВ способствует формированию межмолекулярных синтонов;

- введение молекул растворителей в твердую фазу ДКВ приводит к увеличению степени его кристалличности;

- изменение условий формирования твердой фазы ДКВ (температура, давление, степень ионизации молекул) приводит к смещению равновесия в сторону образования определенных фазовых модификаций.

- Синтезированы новые фазовые модификации ДКВ: микротрубчатая, микросфероидная и микроволокнистая.
- Описаны стадии самосборки микротрубчатых частиц одной из форм ДКВ.
- Запатентован способ получения стабильной микротрубчатой кристаллической модификации ДКВ с заданным размером частиц методом осаждения антирастворителем из спиртового раствора в присутствии мочевины.

#### ГЛАВА 3.

# Разработка системного подхода к исследованию фазовых модификаций

Объекты, дизайн и синтез которых был реализован и описан в предыдущей главе, представляли интерес для более углубленного изучения. Требовалось подтвердить сохранение исходной структуры биофлавоноида. Оставалась неопределенность в отношении природы полученных фазовых модификаций ДКВ: собой могли представлять полиморфы, псевдополиморфы, они кокристаллы, аморфные и коаморфные формы по отношению к исходной фармацевтической субстанции. Кроме того, следовало выявить различия в физико-химических свойствах ДКВ<sub>фс</sub>, ДКВ<sub>т</sub>, ДКВ<sub>с</sub> и ДКВ<sub>в</sub>, что послужило бы фундаментальной научной базой для их внедрения в практическую деятельность. Для ответа на обозначенный круг вопросов было необходимо разработать заключаюшийся В системный подход, последовательном использовании комплекса адекватных современных методов, в том числе спектральных, хроматографических, хемоинформатических, микроскопических, рентгенографических, термических и физико-химических.

# 3.1. Химическое строение фазовых модификаций дигидрокверцетина

Для подтверждения состава и структуры продуктов химического синтеза использовали комплекс спектральных методов анализа, таких как спектроскопия в ультрафиолетовой и видимой областях (УФ/ВИД-спектроскопия), ИК-спектроскопия, спектроскопия ЯМР <sup>1</sup>Н и масс-спектрометрия.

### 3.1.1. Хромофорная система

Молекула ДКВ характеризуется наличием двух сопряженных систем (кольца A и B), являющихся хромофорами и способных к избирательному поглощению света. Оба этих структурных фрагмента находятся в *р*,*π*-сопряжении с фенольными гидроксильными группами, а кольцо A, кроме того, с

карбонильной группой и атомом кислорода пиранового гетероцикла. Таким образом, особенности строения данного биофлавоноида обуславливают электронной спектроскопии возможность использования метода для анализа ДКВ. УФ-спектры качественного И количественного этанольных растворов полученных фазовых модификаций характеризуются максимумом поглощения при длине волны  $\lambda = 288,31 \pm 0,27$  нм (Рисунок 3.1).



Рисунок 3.1 – УФ-спектры фазовых модификаций ДКВ в этаноле (условия см. 7.5.1): ДКВ<sub>фс</sub> (черный, концентрация – 0,030 ммоль/л), ДКВ<sub>т</sub> (синий, концентрация – 0,028 ммоль/л), ДКВ<sub>с</sub> (красный, концентрация – 0,034 ммоль/л), ДКВ<sub>в</sub> (зеленый, концентрация – 0,036 ммоль/л)

Исходя из результатов УФ-спектрального анализа можно сделать вывод, что в ходе супрамолекулярного синтеза структура хромофоров не претерпела изменений.

# 3.1.2. Функциональные группы и фрагменты

Отсутствие формирования новых ковалентных связей при образовании ДКВ<sub>т</sub>, ДКВ<sub>с</sub> и ДКВ<sub>в</sub> было подтверждено методом ИК-спектроскопии в таблетках калия бромида (Рисунок 3.2).



Рисунок 3.2 – ИК-спектры фазовых модификаций ДКВ в таблетках калия бромида (условия см. 7.5.2): ДКВ<sub>фс</sub> (черный), ДКВ<sub>т</sub> (синий), ДКВ<sub>с</sub> (красный), ДКВ<sub>в</sub> (зеленый)

Спектры всех полученных образцов, так же как и исходной субстанции ДКВ<sub>фс</sub>, характеризуются широкой интенсивной полосой поглощения, соответствующей валентным колебаниям О-Н фенольных гидроксильных групп (Таблица 3.1). Кроме того, в спектрах наблюдается полоса поглощения валентных колебаний С=О карбонильной группы. Наличие ароматического структурного фрагмента подтверждается полосами поглощения валентных Сар-Сар и деформационных Сар-Н колебаний.

	1 10 01	
Тип колебания	Волновое число, см $^{-1}$	Интенсивность, %
Валентные О-Н	3437,47	79
Валентные симметричные С-Н	2877,62	38
Валентные С=О	1635,67	97
	1613,41	53
Валентные С <sub>ар</sub> -С <sub>ар</sub>	1524,36	51
	1473,65	77
Деформационные симметричные С-Н	1359,91	46
Деформационные О-Н	1362,20	70
Валентные асимметричные С-О-С	1264,13	80
Валентные С-О	1166.24	89
Валентные симметричные С-О-С	1086.19	74
Деформационные C <sub>ар</sub> -Н	997.70	65

Таблица 3.1 – Соотнесение полос поглощения в ИК-спектре со структурой ДКВ

Вместе с тем, следует отметить, что, несмотря на совпадение максимумов полос поглощения, ИК-спектры исследуемых образцов различаются поглощения фенольных интенсивностью полос гидроксильных групп И карбонильных групп. В области отпечатков пальцев спектры также не идентичны, что указывает на различия в структуре твердой фазы.

### 3.1.3. Молекулярная структура дигидрокверцетина

Более подробную информацию о структуре исследуемых образцов можно получить исходя из результатов масс-спектрального анализа (Рисунок 3.3), проведенного при отрицательной ионизации электроспреем. Заметных различий в масс-спектрах не наблюдали.



Рисунок 3.3 – Масс-спектры фазовых модификаций ДКВ (условия см. 7.5.3): А – ДКВ<sub>фс</sub>, В – ДКВ<sub>т</sub>, С – ДКВ<sub>с</sub>, D – ДКВ<sub>в</sub>

Все спектры характеризуются тремя пиками со значением m/z 607, 417 и 303. Последний, очевидно, соответствует квазимолекулярному иону ДКВ. Поскольку электроспрей ионизация относится к «мягким методам», то появление пиков со значениями m/z большими, чем у молекулярного иона, объясняется за счет образования вторичных ионов путем присоединения ионизированных частиц Сигнал к молекулам биофлавоноида. co значением m/z607 можно интерпетировать как продукт димеризации флаванонола, что распространено при масс-спектральном анализе флавоноидов [39]. В то же время формирование иона с массой 417 может быть объяснено образованием ассоциата [М-1] с компонентом подвижной фазы, муравьиной кислотой, и ее натриевой солью. Таким образом, структура ДКВ позволяет полностью объяснить пики, наблюдаемые на массспектрах.

# 3.1.4. Родственные примеси и остаточные растворители

*ЯМР*<sup>1</sup>*Н*. Спектроскопия ЯМР <sup>1</sup>Н была использована как для доказательства молекулярной структуры ДКВ в фазовых модификациях, так и для идентификации родственных примесей и остаточных растворителей.

Спектры ЯМР <sup>1</sup>Н для всех анализируемых образцов приведены на Рисунке 3.4, а их расшифровка – в Таблице 3.2.

Источник сигнала		S N T		
Молекула	Протон	о, м.д.		
ДКВ	-H 3	4,465	триплет	
	-H 2	4,944	дублет	
	-OH 3	5,730	дублет	
	-H 8	5,827	дублет	
	-H 6	5,874	дублет	
	-H 5'	6 700		
	-H 6'	0,709	мультиплет	
	-H 2'	6,842	синглет	
	-OH 3'	8,961	синглет	
	-OH 4'	9,012	синглет	
	-OH 7	10,798	синглет	
	-OH 5	11,872	синглет	
Вода	-H	3,330	синглет	
Этанол	-H 2	1,226	триплет	
	-H 1	3,687	квадруплет	
Мочевина	-H	5,410	синглет	

Таблица 3.2 – Соотнесение сигналов в спектре ЯМР <sup>1</sup>Н со структурой компонентов



Рисунок 3.4 – Спектры ЯМР <sup>1</sup>Н фазовых модификаций ДКВ (условия см. 7.5.4): А – ДКВ<sub>фс</sub>, В – ДКВ<sub>т</sub>, С – ДКВ<sub>с</sub>, D – ДКВ<sub>в</sub>

Полученные спектральные данные позволяют охарактеризовать все образцы как 2*R*,3*R*-стереоизомер ДКВ в соответствии с литературными данными [116; 165]. Заметное отличие в спектре ЯМР <sup>1</sup>Н наблюдается для ДКВ<sub>т</sub>. Сигнал атома водорода фенольной гидроксильной группы в положении 7, имеющий химический сдвиг 10,798 м.д., на спектре ДКВ<sub>т</sub> сильно размыт, что можно объяснить частичной ионизацией молекулы биофлавоноида.

Во всех спектрах четко виден синглет 2,540 м.д., соответствующий ДМСО, в котором снимали спектры, и сигнал воды. Ее присутствие может быть объяснено высокой гигроскопичностью используемого органического растворителя.

Используя метод ЯМР <sup>1</sup>Н, была получена информация не только о структуре анализируемых образцов, но и о примесях, имеющихся в составе твердой фазы модификаций ДКВ. Так в спектре ДКВ<sub>т</sub> наблюдаются сигналы, указывающие на присутствие следовых количеств этанола (триплет и квадруплет с химическими сдвигами 1,226 м.д. и 3,687 м.д., соответственно) и мочевины (синглет при 5,410 м.д.), применяемых в супрамолекулярном синтезе. Также этанол обнаружен на спектре ДКВ<sub>в</sub>.

В спектре ЯМР <sup>1</sup>Н ДКВ<sub>с</sub> выявлены триплет, дублет, дублет и мультиплет с величинами химического сдвига 3,991 м.д., 5,313 м.д., 6,172 м.д. и 6,909 м.д., соответственно. Структуру соединения, которому принадлежат эти сигналы, устанавливали методом хромато-масс-спектрометрии.

Хроматография. Согласно литературным данным [28; 39; 40; 61; 168], разделение флавоноидных композиций осуществляется в обращенно-фазовом режиме с октадецильными привитыми фазами. В качестве элюентов используют ацетонитрил, метанол с добавлением муравьиной, уксусной воду, И трифторуксусной кислот как модификаторов для подавления диссоциации фенольных гидроксильных групп. Учитывая, что ДКВ<sub>с</sub> был получен методом распылительной сушки при температуре 250 °C, этот процесс мог сопровождаться окислением флаванонола или его изомеризацией. Поэтому целесообразным аналитическим методом для идентификации примесного компонента является

ультра высокоэффективная жидкостная хроматография (УВЭЖХ) в сочетании со спектрофотометрическим и масс-спектрометрическим способами детектирования. В качестве неподвижной фазы использовали сорбент с привитыми фенильными группами. В ходе оптимизации условий хроматографирования рассматривали различные соотношения растворителей. Разделение компонентов проводили в режиме ступенчатого градиента (условия см. 7.5.5):



Рисунок 3.5 – УВЭЖХ фазовых модификаций ДКВ: А – ГСО ДКВ, В – ДКВ $_{\phi c}$ , С – ДКВ $_{c}$ 

гаолица 5.5 Данные по разделению компонентов							
Стереоизомеры	Хроматографические данные						
ДКВ	ВУ, мин	$W_{0,5}$ , мин	$W_{0,05}$ , мин	<i>f</i> , мин	$A_s$	N	$R_s$
2 <i>R</i> ,3 <i>R</i>	$10,83 \pm 0,06$	$0,09 \pm 0,01$	$0,\!15 \pm 0,\!01$	$0,05 \pm 0,01$	1,5	81111	1 70
2 <i>R</i> ,3 <i>S</i>	$11,12 \pm 0,05$	$0,07 \pm 0,01$	$0,\!14 \pm 0,\!01$	$0,05 \pm 0,01$	1,4	139805	1,70

Таблица 3.3 – Данные по разделению компонентов

Полученные хроматограммы приведены на Рисунке 3.5, а идентифицированные компоненты – в Таблице 3.3. В качестве внешнего стандарта использовали ГСО ДКВ, являющийся 2*R*,3*R*-стереоизомером [166] с

временем удерживания (ВУ)  $10,83 \pm 0,06$  мин. Примесный компонент оказался более гидрофобным с большим ВУ ( $11,12 \pm 0,05$  мин). Несмотря на то, что у обоих пиков растянут задний фронт ( $A_s > 1$ ), разрешение между пиками составило 1,70, что можно рассматривать как приемлемое разделении двух веществ. Поскольку УФ- и масс-спектры компонентов с временами удерживания 10,83 мин и 11,12 мин идентичны (Рисунок 3.6), эти компоненты являются стереоизомерами ДКВ.



Рисунок 3.6 – УФ- и масс-спектры компонентов с временем удерживания: A – 10,83 мин, B – 11,12 мин

*In silico*. Процесс распылительной сушки был смоделирован в виртуальном пространстве программы MarvinView. Методом молекулярной динамики подтверждена потенциальная возможность преодоления энергетических барьеров при изомеризации ДКВ.

Для установления структуры стереоизомера методом молекулярного моделирования оценивали внутреннюю энергию молекул ДКВ, отличающихся строением центров хиральности в положениях 2 и 3. Для 2*R*,3*R*-, 2*R*,3*S*-, 2*S*,3*R*- и 2*S*,3*S*-стереоизомеров данный параметр составил 14,21, 18,43, 21,32 и 32,06 кДж/моль, соответственно. Модели молекул 2*R*,3*R*- и 2*R*,3*S*-ДКВ обладали наименьшей внутренней энергией и, следовательно, эти стереоизомеры могут рассматриваться как наиболее стабильные структуры, что обусловлено оптимальным экваториальным положением более объемного заместителя – кольца В – в положении 2.



А

В

Рисунок 3.7 – Поля молекулярных взаимодействий (оранжевый – по липофильному типу, голубой – по гидрофильному типу) диастереоизомеров ДКВ: А - 2*R*,3*R*-ДКВ, В - 2*R*,3*S*-ДКВ

При изучении свойств полученных структур диастереомеров на поверхности молекул были сгенерированы поля молекулярных взаимодействий по гидрофильному и липофильному типу (условия см. 7.3.4). Их соотношение

составляло 6:1 и 5:1 для 2*R*,3*R*-ДКВ и 2*R*,3*S*-ДКВ, соответственно (Рисунок 3.7). На основании результатов компьютерных расчетов было сделано предположение, что 2*R*,3*S*-ДКВ должен быть более гидрофобным, чем 2*R*,3*R*-стереоизомер. Полученные данные хорошо согласуются с результатами хроматографического анализа, в котором минорный компонент характеризуется большим ВУ в сравнении мажорным.

По данным УВЭЖХ фракция 2R,3R-диастереомера в ДКВ<sub>фс</sub>, составляла 98,8% (в молекулярном соотношении), в то время как в ДКВ<sub>с</sub> его содержание уменьшилось до 87,2%. То есть, в ходе распылительной сушки доля 2R,3S-ДКВ увеличилась в 10,67 раза.

Таким образом, комплексом спектральных методов анализа подтверждено сохранение исходной молекулярной структуры ДКВ во всех исследуемых образцах и уточнен их примесный состав. Для установления природы полученных фазовых модификаций и выявления различий между ними были использованы более специфичные физико-химические методы анализа.

#### 3.2. Структура твердой фазы модификаций дигидрокверцетина

### 3.2.1. Описание

Все полученные фазовые модификации ДКВ представляют собой порошки различных оттенков желтого цвета (Рисунок 3.8). ДКВ<sub>фс</sub> можно охарактеризовать как мелкодисперсную субстанцию бледно-желтого цвета. Порошок ДКВ<sub>т</sub> состоял из множества блестящих на свету продолговатых частиц, хорошо различимых глазом. ДКВ<sub>с</sub> был наиболее темным и обладал выраженной склонностью к комкованию, обусловленной, очевидно, электростатическим взаимодействием между частицами. ДКВ<sub>в</sub> представлял собой пушистую массу бледно-желтого цвета. Все объекты имели слабый смолистый запах и горьковатый вкус.



Рисунок 3.8 – Внешний вид фазовых модификаций: А – ДКВ<sub>фс</sub>, В – ДКВ<sub>т</sub>, С – ДКВ<sub>с</sub>, D – ДКВ<sub>в</sub>

# 3.2.2. Морфология

Морфологическое описание фазовых модификаций ДКВ заключалось в качественном и количественном анализе. Этап качественного исследования осуществляли методом СЭМ (условия см. 7.4.2). Количественная характеристика распределения частиц по размеру выполнена методом лазерной дифракции света.

Исходная субстанция (Рисунок 3.9А) представляет собой мелкодисперсный порошок с частицами иррегулярной формы. При большем увеличении хорошо видно, что эти микрообъекты не являются монолитными. Можно выделить отдельные пластинчатые частицы, которые формируют единый агрегат.



Рисунок 3.9 – Микрофотографии фазовых модификаций ДКВ (левый столбец – увеличение x250, правый столбец – x2000): А – ДКВ<sub>фс</sub>, В – ДКВ<sub>т</sub>, С – ДКВ<sub>с</sub>, D – ДКВ<sub>в</sub>

В отличие от  $\text{ДKB}_{\phi c}$ , частицы  $\text{ДKB}_{T}$  образуют сложные звездчатые структуры, лучи которых имеют колоновидную форму (Рисунок 3.9В). При увеличении в ×2000 раз видно, что игольчатые кристаллы, формирующие сферолиты, обладают тетрагональном или, реже, гексагональным сечением и внутренней полостью, занимающей до 78,6% объема частицы. Соответственно, эти микрообъекты являются трубчатыми структурами. Поверхность игольчатых кристаллов гладкая и имеет продольные борозды. Таким образом, морфология частиц ДКВ<sub>т</sub> во многом повторяет строение виртуальных частиц, полученных в ходе молекулярного моделирования.

Частицы ДКВ<sub>с</sub> представляют собой сферы (Рисунок 3.9С). Данные микрообъекты полые, поскольку при небольшом увеличении видны тонкие стенки разрушенных частиц. Также это подтверждается вогнутым характером деформации некоторых частиц ДКВ<sub>с</sub> (Рисунок 3.10). На микрофотографии при высоком увеличении на поверхности сфер можно различить отдельные частицы, внешне аналогичные тем, что были видны в образце ДКВ<sub>фс</sub> (см. Рисунок 3.8С). Очевидно, при прохождении субстанции через распылительную сушилку происходит сплавление твердой фазы с образованием сфер как наиболее энергетически выгодной геометрической фигуры с точки зрения поверхностного натяжения. В результате быстрого охлаждения частицы ДКВ<sub>с</sub> сохраняют полученную форму.



Рисунок 3.10 – Деформации частиц ДКВс

Образец ДКВ<sub>в</sub> характеризуется волокнистой структурой с гладкой поверхностью (Рисунок 3.9D). При этом более мелкие нити переплетаются и образуют более крупные волокна, тем самым реализовывая принцип самоподобия – ключевой элемент фрактальной геометрии.

Для предоставления объективных данных о размерах частиц полученных образцов использовали фармакопейный метод анализа – лазерную дифракцию света (Рисунок 3.11). Измерение проводили в водной среде, поскольку порошок ДКВ<sub>с</sub> имел склонность к комкованию из-за электростатических взаимодействий между частицами. Кроме того, для частиц, не обладающих сферической формой, «получают соответствующее распределение эквивалентных сфер по размеру», о чем имеется указание в ОФС.1.2.1.0008.15 «Определение распределения частиц по размеру методом лазерной дифракции света» [8] (условия см. 7.4.3).



Рисунок 3.11 – Интегральное объемное распределение частиц по размеру

Иссловини оброзон	Размер частиц, мкм			
исследуемый образец	$X_{10}^{*}$	$X_{50}*$	$X_{90}*$	
ДК $\mathbf{B}_{\mathbf{\phi}\mathbf{c}}$	2,16	11,73	46,90	
ДКВт	4,18	23,80	214,00	
ДКВ <sub>с</sub>	2,22	49,00	190,60	
ДКВ <sub>в</sub>	14,64	110,40	122,40	

Таблица 3.4 – Распределение частиц фазовых модификаций ДКВ по размеру

\* объемные доли 10%, 50% и 90%, соответственно

Во всех исследуемых образцах можно выделить несколько фракций частиц. Так, наиболее гомогенно выглядят порошки ДКВ<sub>фс</sub> и ДКВ<sub>в</sub>: первый имеет размер

частиц до 66,8 мкм, а второй – до 142,0 мкм. В образцах ДКВ<sub>с</sub> наблюдается две фракции частиц: более мелкая - в диапазоне до 87,3 мкм, и более крупная – от 174,4 до 242,0 мкм. В образцах порошка ДКВ<sub>т</sub> обнаружено три фракции: до 51,3 мкм, от 179,6 до 248,0 мкм и от 306,0 до 658,0 мкм. Таким образом, трубчатая форма ДКВ характеризуется наибольшим размером частиц. Статистическая обработка полученных данных, выполненная в соответствии с требованиями ГФ РФ XIV, представлена в Таблице 3.4.

Ha молекулярного моделирования, основании данных а также спектрального и морфологического анализа высказан ряд предположений в отношении природы полученных фазовых модификаций ДКВ. Синтезированные объекты ΜΟΓΥΤ представлять собой полиморфные, псевдополиморфные модификации, кокристаллы, амофрные и коаморфные формы. Для установления структуры твердой фазы использовали рентгенографические методы анализа: РПД и РСА; термические методы анализа: ДСК, ТГА и синхронный термический анализ и масс-спектрометрию (СТА МС).

# 3.2.3. Кристаллическое и аморфное состояния

Метод РСА позволяет однозначно установить строение твердой фазы кристаллических соединений. Благодаря возможности варьировать условия супрамолекулярного синтеза в зависимости от размера желаемых частиц был выращен бесцветный монокристалл ДКВ<sub>т</sub>, имеющий призматическую форму (условия см. 7.5.6). Его размеры составляли 0,40 мм × 0,37 мм × 0,32 мм.

Кристаллическая ячейка ДКВ<sub>т</sub> характеризуется моноклинной сингонией и кристаллизуется в хиральной пространственной группе C2. Ее грани обладали следующими размерами: а = 23,2416 Å, b = 5,2305 Å, c = 25,4061 Å. Величины углов  $\alpha$ ,  $\beta$  и  $\gamma$  соответствовали 90,000°, 102,634° и 90,000°, а плотность кристаллической ячейки ДКВ<sub>т</sub> составляла 1,517 г/см<sup>3</sup>. Установлено, что данная фазовая модификация биофлавоноида представляет собой сестергидрат: на две молекулы флаванонола приходится пять молекул воды (Рисунок 3.12). Информация по длинам связей и валентным углам в молекулах представлена в Таблице 3.5 и Таблице 3.6, соответственно. Эти данные приближены к

результатам РСА, полученным в ходе разработки нормативной документации на ГСО ДКВ [24] и ГОСТа на ДКВ [16]. Однако, в ранее опубликованных статьях данные образцы не изучались с позиции фазовых модификаций.



Рисунок 3.12 – Структура кристаллической ячейки ДКВ<sub>т</sub>

Молеку	ула 1	Моле	кула 2
Связь	Длина, Å	Связь	Длина, Å
01—С9	1,372 (8)	01A—C9A	1,359 (8)
01—C2	1,452 (7)	O1A—C2A	1,471 (7)
O3—C3	1,412 (7)	O3A—C3A	1,410 (7)
O4—C4	1,247 (8)	O4A—C4A	1,233 (8)
05—C5	1,353 (8)	O5A—C5A	1,351 (8)
07—C7	1,357 (7)	07A—C7A	1,359 (7)
03'—C3'	1,366 (7)	O3'A—C3'A	1,382 (8)
O4'—C4'	1,408 (8)	O4'A—C4'A	1,374 (8)
C2—C1'	1,505 (9)	C2A—C1'A	1,498 (10)
C2—C3	1,534 (8)	C2A—C3A	1,514 (9)
C3—C4	1,504 (9)	C3A—C4A	1,528 (10)
C4—C10	1,434 (9)	C4A—C1OA	1,437 (9)
С5—С6	1,390 (9)	C5A—C6A	1,367 (9)
C5—C10	1,403 (9)	C5A—C10A	1,427 (9)
С6—С7	1,396 (9)	С6А—С7А	1,372 (9)
С7—С8	1,371 (9)	C7A—C8A	1,398 (10)
С8—С9	1,401 (9)	C8A—C9A	1,379 (9)
C9—C10	1,427 (9)	C9A—C1OA	1,403 (9)
C1'—C6'	1,388 (9)	C1'A—C6'A	1,380 (9)
C1'—C2'	1,397 (9)	C1'A—C2'A	1,390 (10)
C2'—C3'	1,376 (9)	C2'A—C3'A	1,389 (10)
C3'—C4'	1,389 (10)	C3'A—C4'A	1,397 (9)
C4'—C5'	1,360 (9)	C4'A—C5'A	1,377 (10)
C5'—C6'	1,400 (9)	C5'A—C6'A	1,397 (10)

Таблица 3.5 – Длины связей в молекулах ДКВ

Молекула 1		Молекула 2			
Атомы, образующие угол	Размер угла, °	Атомы, образующие угол	Размер угла, °		
C9—O1—C2	115,4 (5)	C9A—O1A—C2A	116,6 (5)		
O1—C2—C1'	108,5 (5)	O1A—C2A—C1'A	106,1 (5)		
O1—C2—C3	108,2 (5)	O1A—C2A—C3A	109,3 (5)		
C1'—C2—C3	112,4 (5)	C1'A—C2A—C3A	116,3 (6)		
O3—C3—C4	113,9 (6)	O3A—C3A—C2A	109,1 (5)		
O3—C3—C2	109,3 (5)	O3A—C3A—C4A	112,1 (6)		
C4—C3—C2	110,1 (5)	C2A—C3A—C4A	111,0 (5)		
O4—C4—C10	124,3 (7)	04A—C4A—C10A	124,2 (7)		
O4—C4—C3	120,3 (6)	O4A—C4A—C3A	118,7 (6)		
C10—C4—C3	115,3 (6)	C1OA—C4A—C3A	117,1 (6)		
O5—C5—C6	117,4 (6)	O5A—C5A—C6A	119,7 (6)		
O5-C5-C10	120,7 (6)	05A—C5A—C10A	120,3 (6)		
C6-C5-C10	121,8 (6)	C6A—C5A—C1OA	120,0 (6)		
C5—C6—C7	118,1 (6)	C5A—C6A—C7A	120,6 (7)		
O7—C7—C8	118,4 (6)	07A—C7A—C6A	119,3 (6)		
O7—C7—C6	119,0 (6)	07A—C7A—C8A	119,5 (6)		
C8—C7—C6	122,6 (6)	C6A—C7A—C8A	121,2 (6)		
C7—C8—C9	119,2 (6)	C9A—C8A—C7A	118,8 (6)		
01—C9—C8	117,2 (6)	O1A—C9A—C8A	117,2 (6)		
O1—C9—C10	122,6 (6)	01A—C9A—C10A	121,6 (6)		
C8—C9—C10	120,2 (6)	C8A—C9A—C1OA	121,2 (6)		
C5-C10-C9	118,0 (6)	C9A—C1OA—C5A	118,2 (6)		
C5-C10-C4	122,4 (6)	C9A—C1OA—C4A	120,2 (6)		
C9—C10—C4	119,4 (7)	C5A—C1OA—C4A	121,6 (6)		
C6'—C1'—C2'	119,9 (6)	C6'A—C1'A—C2'A	119,2 (7)		
C6'—C1'—C2	119,5 (6)	C6'A—C1'A—C2A	118,5 (6)		
C2'—C1'—C2	120,5 (6)	C2'A—C1'A—C2A	122,2 (6)		
C3'—C2'—C1'	120,8 (7)	C3'A—C2'A—C1'A	121,0 (7)		
O3'—C3'—C2'	124,4 (6)	O3'A—C3'A—C4'A	121,9 (6)		
O3'—C3'—C4'	117,4 (6)	O3'A—C3'A—C2'A	118,8 (6)		
C2'—C3'—C4'	118,1 (6)	C4'A—C3'A—C2'A	119,3 (6)		
C5'—C4'—C3'	122,3 (7)	04'A—C4'A—C5'A	124,0 (6)		
C5'—C4'—O4'	121,1 (6)	O4'A—C4'A—C3'A	115,9 (6)		
C3'—C4'—O4'	116,6 (6)	C5'A—C4'A—C3'A	120,0 (7)		
C4'—C5'—C6'	119,5 (7)	C4'A—C5'A—C6'A	120,1 (7)		
C1'—C6'—C5'	119,2 (7)	C1'A—C6'A—C5'A	120,4 (6)		

Таблица 3.6 – Значения валентных углов в молекулах ДКВ

Расшифрованная структура кристаллической ячейки ДКВ<sub>т</sub> депонирована в международной базе кристаллографических данных Cambridge Structural Database (Deposition Number: 1892198).



Рисунок 3.13 – Дифрактограммы фазовых модификаций ДКВ (условия см. 7.5.7): А – ДКВ $_{\rm dc},$ В – ДКВ $_{\rm t},$ С – ДКВ $_{\rm c},$ D – ДКВ $_{\rm B}$ 

Учитывая возможную аморфную природу исследуемых объектов, провести сопоставительный анализ при помощи РСА не представлялось возможным. Поэтому был использован метод РПД, который является одним из наиболее распространенных для исследования фазового состояния фармацевтических субстанций и рекомендован ГФ РФ XIV [8]. Для всех анализируемых модификаций ДКВ были получены дифрактограммы (Рисунок 3.13).

Результаты РПД подтверждают данные молекулярного моделирования, согласно которым ДКВ<sub>с</sub> и ДКВ<sub>в</sub> обладают аморфной природой, на что указывает характерное гало на спектрах. Однако первый максимум отражения сфероидной формы приходится на 20 24,92°, в то время как для волокнистой модификации максимум выявлен при  $2\theta$  8,94°. На основании этих спектральных данных можно ДКВ<sub>с</sub> и ДКВ<sub>в</sub> являются различными сделать вывол. что аморфными модификациями исследуемого природного флавоноида [34]. В ходе анализа профиля дифрактограмм ДКВ<sub>фс</sub> и ДКВ<sub>т</sub> подтверждено, что данные образцы представляют собой кристаллические твердые фазы. Их спектры РПД характеризуются наличием одинакового набора пиков с  $2\theta$  7,2°, 7,7°, 14,3°, 15,0°, 15,5°, 21,0°, 25,6°, 26,3°, 27,4°, 31,7°, 34,6°, 37,9°, 39,3° и 46,3°.

Более детальное изучение спектров РПД исследуемых кристаллических форм ДКВ позволяет выявить различия в интенсивности дифрационных пиков (Рисунок 3.14). Прежде всего, на дифрактограмме ДКВ<sub>фс</sub> наблюдается большее число пиков, превышающих уровень шума, а на спектре ДКВ<sub>т</sub> присутствует несколько новых пиков с  $2\theta$  9,2°, 10,8°, 11,6°, 33,9°, 42,5° и 44,7°. Данные различия можно объяснить изменением строения твердой фазы ДКВ в процессе супрамолекулярного синтеза.

В результате сопоставительного анализа установлено, что в дифрактограмме ДКВ<sub>т</sub> наблюдается перераспределение интенсивностей сигналов и имеется ряд отражений, не характерных для пространственной группы C2 (27,6°, 31,0°, 39,6° и 41,2°). Отсутствие отражений при 28,2°, 33,8° и 44,5° доказывает, что в структуре кристаллов ДКВ<sub>т</sub> нет свободной мочевины [183]. С помощью программы MOLSV выявлено, что Ван-дер-Ваальсов объем молекул

мочевины и воды составили 40,4 Å и 13,1 Å, соответственно. Согласно данным РСА, в твердой фазе микротрубок ДКВ имеются каналы диаметром 45,0 Å. Таким образом, можно предположить, что ДКВ<sub>т</sub> представляет собой клатрат, в котором мочевина выступает в качестве молекулы-гостя в кристаллической решетке сестергидрата ДКВ. Однако положение интенсивность И пиков на позволили сделать однозначный дифрактограммах не вывод 0 наличии полиморфизма у данного биофлавоноида, поэтому для дальнейших исследований использовали термические методы анализа (ДСК и ТГА), рекомендуемые фармакопеей [8].



Рисунок 3.14 – Штрихрентгенограммы: А – ДКВ<sub>фс</sub>, В – ДКВ<sub>т</sub>

Для образцов ДКВ<sub>фс</sub>, ДКВ<sub>т</sub> и ДКВ<sub>с</sub> были получены термограммы (Рисунок 3.15). Все анализируемые порошки начинают плавиться при 228±1 °C с последующим разложением, на что указывает характерный волнистый профиль кривой ДСК и постепенное снижение массы на ТГА. Также во всех образцах обнаружена сорбционная вода (от 2,00 до 5,00% по массе), поскольку на их термограммах присутствует пологий экзотермический эффект в области от 30 до 100 °C. Эти данные количественно не согласуются с результатами РСА, что вполне объяснимо, в силу ограничений метода ТГА [135].


Рисунок 3.15 – Термограммы фазовых модификаций ДКВ (условия см. 7.5.8): А – ДКВ<sub>ф</sub>с, В – ДКВ<sub>т</sub>, С – ДКВ<sub>с</sub>

Результаты термического анализа ДКВ<sub>т</sub> и ДКВ<sub>с</sub> содержат принципиальные различия, позволяющие отнести их к фазовым модификациям. Так, термограмма ДКВ<sub>с</sub> характеризуется наличием эндотермического эффекта в диапазоне от 147,0 до 157,9 °C. Это можно интерпретировать как монотропный фазовый переход из одного твердого состояния в другое, в процессе которого аморфная модификация преобразуется в стабильную кристаллическую форму.

На ДСК ДКВ<sub>т</sub> присутствует экзотермический эффект с максимумом при 181,5 °С, который может быть связан с разложением мочевины, находящейся в порах трубчатой формы. Для подтверждения этого предположения, было проведено дополнительное исследование методом СТА МС (Рисунок 3.16). Наличие комплекса характеристических пиков [87], выявленных на спектре: m/z 14 (N<sup>+</sup>), 15 (NH<sup>+</sup>, CH<sub>3</sub><sup>+</sup>), 16 (NH<sub>2</sub><sup>+</sup>), 17 (NH<sub>3</sub><sup>+</sup>, OH<sup>+</sup>), 28 (CO<sup>+</sup>, N<sub>2</sub><sup>+</sup>), 29 (HCO<sup>+</sup>), 42 (NCO<sup>+</sup>), 43 (HNCO<sup>+</sup>), 44 (CO<sub>2</sub><sup>+</sup>) – указывает на присутствие мочевины.



Рисунок 3.16 – Спектры СТА МС ДКВ<sub>т</sub> (условия см. 7.5.8)

Для формирования полной картины природы ДКВ<sub>фс</sub> и ДКВ<sub>т</sub> был привлечен высокотехнологичный метод – РПД выполненная *in situ* при различных температурах (Рисунок 3.17).



Рисунок 3.17 – Дифрактограммы фазовых модификаций ДКВ при нагревании до 170 °С (условия см. 7.5.7): А – ДКВ<sub>фс</sub>, В – ДКВ<sub>т</sub>, С – ДКВ<sub>с</sub>

75

А

В

С

В ходе нагревания для образца ДКВ<sub>фс</sub>, не выявлено существенных изменений на дифрактограмме, за исключением исчезновения пика при 20 15,3° (что может быть связано с удалением сорбционной воды). Следовательно, данная форма биофлавоноида является наиболее термодинамически стабильной и именно ее плавление наблюдается на термограммах при температуре 228±1 °C. Однако спектр РПД ДКВ<sub>т</sub> существенно изменился в процессе термической обработки: появился ряд новых пиков при 2*θ* 10,9°, 12,1°, 18,2°, 23,4°, 24,8°, 28,4°, 29,8°, 30,9° и 32,6°, в то время как сигналы при 20 11,6°, 15,3°, 23,0°, 24,0° и 25,9° погасли. Произошел фазовый переход из одного кристаллического состояния в другое. В результате анализа ДКВ<sub>с</sub> на дифрактограмме отмечено преобразование аморфного гало в спектр, имеющий профиль, характерный для кристаллической твердой фазы. Важно отметить, что спектры РПД фазовых модификаций, полученные после нагревания до 170 °C, имеют одинаковые положения и интенсивности пиков для всех исследованных образцов. Следовательно, образовалась одна и та же фаза ДКВ, которая, согласно полученным данным, идентична исходной фармацевтической субстанции. Результаты исследования позволяют однозначно утверждать, что все изучаемые объекты принадлежат к различным фазовым модификациям ДКВ.

Таким образом, в ходе комплексного анализа физико-химическими методами выявлено, что ДКВ<sub>фс</sub>, ДКВ<sub>т</sub>, ДКВ<sub>с</sub> и ДКВ<sub>в</sub> представляют собой отдельные фазовые модификации: ДКВ<sub>с</sub> и ДКВ<sub>в</sub> – аморфные формы, а ДКВ<sub>фс</sub> и ДКВ<sub>т</sub> – кристаллические порошки. Причем ДКВ<sub>т</sub> является кристаллогидратом, поэтому его можно считать псевдополиморфной модификацией по отношению к ДКВ<sub>фс</sub>, которая, в свою очередь, оказалось наиболее термодинамически стабильной формой биофлавоноида.

## 3.3. Физико-химические свойства фазовых модификаций дигидрокверцетина

Смена фазового состояния не приводит к появлению новых химических свойств вещества или к изменению аффинности по отношению к биологическим

мишеням. Однако различное строение фаз отражается на их физико-химических свойствах.

### 3.3.1. Растворимость

Растворимость в терминах ГФ РФ XIV. Одной из основных целей, преследуемых в ходе модификации фазового состояния ДКВ, было улучшение его биологической доступности. Косвенным параметром, позволяющим судить об изменении биофармацевтических характеристик вещества, является при комнатной температуре. В соответствии растворимость В воде С терминологией ГФ РФ XIV ДКВ<sub>фс</sub>, ДКВ<sub>т</sub>, ДКВ<sub>с</sub> и ДКВ<sub>в</sub> можно отнести к очень мало растворим, мало растворим, мало растворим и категориям растворим, соответственно. Следовательно, можно ожидать, что все новые ЛКВ фазовые модификации будут обладать улучшенными биофармацевтическими свойствами по сравнению с исходной субстанцией.

Седиментационный метод. Для количественного выражения растворимости ДКВ в воде при комнатной температуре использовали седиментационный метод с последующим спектрофотометрическим определением ДКВ (условия см. 7.5.9). Для этого строили калибровочный график зависимости оптической плотности водного раствора от концентрации ДКВ (Рисунок 3.18).



Рисунок 3.18 – Калибровочный график для определения концентрации ДКВ в воде при комнатной температуре

Установлена линейная зависимость между этими величинами в диапазоне концентраций от 0,5 до 2,5 мг/мл ( $r^2 = 0,9960$ ). Данный интервал был выбран на основании литературных данных о растворимости ДКВ [185; 186] и результатов оценки растворимости фазовых модификаций в воде по методике ГФ РФ XIV.

По прошествии 6 ч кривая концентраций выходила на плато, и устанавливалось равновесие между твердой фазой и растворенными молекулами флавоноида (Таблица 3.7). Значения растворимости, полученные для ДКВ<sub>фс</sub> хорошо согласуются с литературными источниками, согласно которым данный параметр варьирует от 0,87 мг/мл до 0,96 мг/мл [185; 186]. В результате проведенного анализа было рассчитано, что равновесная концентрация ДКВ<sub>с</sub> в воде при комнатной температуре в 2,225 раза выше аналогичного показателя для ДКВ<sub>фс</sub>.

Таблица 3.7 – Зависимость концентрации ДКВ от времени растворения

Ofnanou		Коні	центрация ДКВ, м	иг/мл	
Образец	0ч	1ч	2ч	4 ч	6 ч
ДКВ <sub>фс</sub>	0,7004±0,0159	0,7640±0,0174	0,7846±0,0179	0,8837±0,0201	0,9557±0,0230
ДКВ <sub>с</sub>	1,6421±0,1767	1,7637±0,1898	1,8217±0,1961	2,0994±0,2260	2,1265±0,2289

#### 3.3.2. Сорбционные свойства

Поглощение иода. Трубчатая структура ДКВ<sub>т</sub> позволяет ожидать у этой фазовой модификации наличие сорбционных свойств. Данное предположение было подтверждено на модели сублимированного иода (условия см. 7.5.10), который заполнял внутренние полости ДКВ<sub>т</sub> (Рисунок 3.19).



Рисунок 3.19 — Микроскопия частиц ДКВ<sub>т</sub>: А — микротрубка, В — микротрубка после поглощения сублимированного иода

В ходе микроскопического исследования было обнаружено изменение цвета и прозрачности микротрубок, в то время как для ДКВ<sub>фс</sub> в этих условиях видимых изменений не наблюдали.

В процессе десорбции галогена пробирка типа Эппендорф наполнилась парами розового цвета. В пробирке с ДКВ<sub>фс</sub> данный процесс не происходил (Рисунок 3.20). Установленные различия позволяют утверждать, что молекулы иода не адсорбируются на поверхности субстанции а заполняют внутренние полости трубок за счет капиллярных эффектов.



Рисунок 3.20 – Десорбция иода: слева – ДКВ<sub>фс</sub>, справа – ДКВ<sub>т</sub>

Метод Киплинга. Для количественной характеристики сорбционных свойств ДКВ<sub>т</sub> и их сопоставительного анализа в сравнении с ДКВ<sub>фс</sub> была построена изотерма Ленгмюра (условия см. 7.5.10) на базе метода Киплинга [97]. Для разработки модельной системы, подобрали растворитель, сорбируемое вещество и способ определения его концентрации в растворе. В качестве растворителя выбрали циклогексан, который характеризуется приемлемым профилем безопасности и является неполярным растворителем, что позволяет избежать растворения частиц ДКВ в ходе эксперимента. Для количественной оценки наиболее оптимальным вариантом является спектрофотометрический метод анализа ввиду простоты пробоподготовки. В связи с этим, сорбируемый агент должен удовлетворять следующим критериям:

 обладать лиофильными свойствами для того, чтобы сорбция осуществлялась не за счет меньшего сродства вещества к растворителю, а за счет капиллярных свойств сорбента;

- иметь длинную цепь сопряжения чтобы была возможность осуществить спектрофотометрический анализ;
- характеризоваться хотя бы одним максимумом поглощения, не пересекающимся со спектром ДКВ, чтобы исключить возможные погрешности.



Рисунок 3.21 – Структурная формула Судана III

Этим критериям соответствует Судан III (Рисунок 3.21), широко используемый в гистохимическом анализе эфирных масел при проведении фармакогностических исследований. Спектр данного красителя содержит несколько максимумов поглощения, но один из них приходится на длину волны 505 нм, что позволяет использовать данный краситель без внесения поправок на ДКВ (Рисунок 3.22).



Рисунок 3.22 – УФ/ВИД-спектр Судана III в циклогексане при концентрациях от 0,0016 ммоль/л до 0,0500 ммоль/л

Калибровочный график для осуществления количественного анализа строили в координатах оптическая плотность : концентрация Судана III (Рисунок 3.23). Выбор диапазона концентраций обусловлен оптимальными значениями оптической плотности при высоких концентрациях (0,0500 ммоль/л) и возможностью отличить сигнал от шума при низких концентрациях (0,0016 ммоль/л). При этом сохраняется линейная зависимость между концентрацией и оптической плотностью циклогексанового раствора Судана III ( $r^2 = 0,9996$ ).



Рисунок 3.23 – Калибровочный график для определения концентрации Судана III в циклогексане

Результаты количественного анализа сорбционных свойств ДКВ<sub>фс</sub> и ДКВ<sub>т</sub> представлены в Таблице 3.8. Поскольку значение константы Ленгмюра для обоих объектов исследования меньше 1, можно сделать вывод, что процесс десорбции Судана III с поверхности ДКВ превалировал над сорбцией. В то же время сорбционная способность для ДКВ<sub>фс</sub> и ДКВ<sub>т</sub> составила 84,80 мг/мг и 218,75 мг/мг, соответственно. Таким образом, сорбционные свойства трубчатой формы в 2,6 раза выше по сравнению с исходной фармацевтической субстанцией.

The must be a set of the many the set of the								
Образец	Доля поглощенного красителя (%) при различных массах сорбента			Параметры изотермы Ленгмюра				
	10,0	25,0	50,0	75,0	100,0	Сорбционная	Константа	$\mathbf{P}^2$
	МΓ	МΓ	МΓ	МΓ	МΓ	способность, мг/мг	Ленгмюра	К
ДК $B_{\phi c}$	0,9	1,2	3,4	4,6	5,3	84,80	0,027	0,9674
ДВКт	1,6	2,8	5,6	11,5	15,6	218,75	0,101	0,9818

Таблица 3.8 – Сорбционные свойства фазовых модификаций ДКВ

Таким образом, был разработан и реализован системный подход к исследованию фазовых модификаций (Рисунок 3.24).



Рисунок 3.24 – Концепция системного подхода к исследованию фазовых модификаций ДКВ

По результатам проведенного анализа физико-химических свойств изучаемых объектов установлены существенные различия между формами ДКВ. Полученные данные могут послужить фундаментальной базой для внедрения синтезированных модификаций биофлавоноида в реальную клиническую практику.

#### Выводы по главе

- Разработан системный подход к анализу фазовых модификаций ДКВ, сочетающий рентгенографические, термические, спектральные и микроскопические методы анализа:
  - подтверждено отсутствие образования новых ковалентных связей в молекуле ДКВ в составе фазовых модификаций;
  - установлено, что ДКВ<sub>т</sub> является псевдополиморфной модификацией ДКВ<sub>фс</sub>, а ДКВ<sub>с</sub> и ДКВ<sub>в</sub> – различными аморфными формами ДКВ<sub>фс</sub>.
- Описана микроскопическая морфология фазовых модификаций ДКВ: трубчатая, сферическая, волокнистая.
- Расшифрована структура кристаллической ячейки ДКВ<sub>т</sub>, в которой на 2 молекулы биофлавоноида приходится 5 молекул воды – полученные данные депонированы в международной базе кристаллографических данных Cambridge Structural Database (Deposition Number: 1892198).
- Обнаружено повышение растворимости в воде при комнатной температуре для ДКВ<sub>т</sub>, ДКВ<sub>с</sub> и ДКВ<sub>в</sub> по сравнению с ДКВ<sub>фс</sub>: согласно терминологии ГФ РФ XIV они отнесены к категориям *мало растворим*, *мало растворим*, *растворим* и *очень мало растворим*, соответственно.
- Разработана методика количественной оценки сорбционных свойств ДКВ на базе спектрофотометрического метода анализа в неполярном растворителе с использованием Судана III в качестве сорбируемого вещества.
- Выявлено улучшение сорбционных свойств ДКВ<sub>т</sub> в 2,6 раза по сравнению с ДКВ<sub>фс</sub>.

#### ГЛАВА 4. Фрактальный анализ лиофилизатов дигидрокверцетина

Наличие фрактальной морфологии образцов ДКВ<sub>в</sub>, выявленной в ходе микроскопического анализа, позволило предположить возможную взаимосвязь между геометрическими характеристиками лиофилизатов, такими как фрактальная размерность, и их физико-химическими свойствами.

Фрактальная геометрия является сравнительно молодой математической концепцией, которая, тем не менее, уже нашла свое прикладное применение в различных областях науки [52; 131] и отраслях хозяйства, в частности, в пищевой промышленности [57; 75]. Известно, что фрактальные структуры часто образуются в результате хаотических процессов. Такие процессы очень условиям. Поэтому чувствительны изначальным результат действия К хаотических сил может изменяться непредсказуемым образом, однако он не является случайным (не стохастическим). Также важно оговорить, что в природе объекты не полностью удовлетворяют критерию фрактальности. Данную геометрическую особенность называют статистическим самоподобием [71].

### 4.1. Взаимосвязь морфологии и свойств лиофилизатов

#### 4.1.1. Фракталы

Чтобы проверить гипотезу о наличии взаимосвязи между фрактальной размерностью лиофилизатов и их физико-химическими свойствами, были синтезированы новые объекты ДКВ с различными коформерами в молярном соотношении 1:1 (условия см. 7.6.1). Полученные объекты были подвергнуты морфологическому анализу методом оптической микроскопии (Рисунок 4.1). Все они обладали гомогенной структурой, а большинство из них можно отнести к хоппер-формам – твердая фаза образовывала только внешние грани микрообъектов, не заполняя внутренний объем.

84



Рисунок 4.1 – Микрофотографии лиофилизатов ДКВ с различными коформерами (условия см. 7.6.2): А – без коформера, В – с бензальдегидом, С – с ванилином, D – с коричным альдегидом, Е – с мочевиной, F – с никотиновой кислотой

Несмотря на кажущуюся морфологическую однородность полученных лиофилизатов, при использовании программного обеспечения, были установлены различия фрактальной размерности их структурных элементов (условия см. 7.6.3). Для этих целей применяли программы FDim и Gwyddion от двух разработчиков, чтобы исключить искажение результатов исследования, вызванные возможными ошибками компьютерного кода. В обоих инструментах реализован алгоритм boxcounting, в ходе которого расчет фрактальной размерности ( $D_c$ ) осуществляется по формуле:

85

$$D_c = \lim_{\lambda \to \infty} \frac{-\log N(\lambda)}{\log \lambda}$$
(4.1)

где *λ* – диаметр области, подвергнутой исследованию,

*N* – число темных пикселей, обнаруженных внутри исследуемой области.

Путем математического преобразования из этой формулы можно получить уравнение прямой зависимости количества темных пикселей от логарифма диаметра исследуемой области:

$$Dc \cdot \log \frac{1}{\lambda} - \log N(\lambda) = 0$$
(4.2)

В процессе реализации алгоритма box-counting в виртуальном пространстве программного обеспечения происходит поэтапное уменьшение площади исследуемой области. На основании проведенных расчетов осуществляется построение графика, на котором по оси абсцисс указан диаметр анализируемой области, а по оси ординат – количество темных пикселей. Полученные точки аппроксимируются в прямую линию, для которой известны значения  $\lambda$  и  $N(\lambda)$ . Это, в свою очередь, дает возможность рассчитать искомое значение фрактальной размерности.

Результаты проведенного математического анализа представлены в Таблице 4.1. Относительное среднеквадратическое отклонение всех анализируемых объектов не превышало 5%, что является приемлемым значением для фармацевтического анализа.

*U*-критерий Манна-Уитни использовали для оценки степени однородности значений фрактальной размерности, полученных независимо в программах FDim и Gwyddion. Этот параметр был применён, поскольку изучаемые величины не являются ни бинарными, ни дискретными, а размер выборки не позволяет оценить принадлежность данного ряда значений к нормальному распределению. Статистически значимые различия достигались при *U*-критерии меньше 7. Таким образом, был сделан вывод, что рассчитанные значения фрактальной размерности не зависят от используемого программного обеспечения.

ДKB
систем
бинарных
монофазных
твердых в
размерность
Фрактальная ]
Таблица 4.1 – <u>6</u>

Коформер	Программное	Фракта	льная размо	ерность	Метрологичес	кие характеристики	<i>U</i> -критерий
	обеспечение	Серия 1	Серия 2	Серия 3	Среднее значение	Стандартное отклонение	Манна-Уитни
Без коформера	FDim	2,441	2,427	2,423		C10 0	
		2,455	2,435	2,424	2,404	0,012	
	Gwvddion	2,316	2,392	2,457			1/,0
		2,422	2,451	2,499	2,425	0,004	
Бензальдегид	FDim	2,307	2,999	2,307	002 0	0.011	
-		2,322	2,309	2,322	600,2	0,011	201
	Gwyddion	2,383	2,331	2,383	0 <i>CC</i> C	200 0	C,U1
	,	2,331	2,338	2,331	000,7	0,020	
Ванилин	FDim	2,456	2,469	2,486		100	
		2,463	2,506	2,494	2,494	0,014	00
	Gwyddion	2,482	2,507	2,500		100.0	8,0
	,	2,456	2,469	2,486	2,4/4	0,021	
Коричный	FDim	2,406	2,412	2,410			
альдегид		2,400	2,421	2,498	2,410	0,000	0.01
	Gwyddion	2,367	2,411	2,309	002 0		10,0
	,	2,406	2,412	2,410	666,2	CZU,U	
Мочевина	FDim	2,580	2,601	2,594	00 <i>2</i> C	0.011	
		2,621	2,590	2,568	40C,2	0,011	0.01
_	Gwyddion	2,588	2,580	2,591	LU3 C		0,61
	•	2,580	2,601	2,594	140,2	0,017	
Никотиновая	FDim	2,364	2,415	2,396	376 C		
кислота		2,333	2,368	2,351	CUC,2	0,042	0.71
_	Gwyddion	2,388	2,294	2,366	0200		11,0
	,	2,364	2,415	2,396	۲0C,2	0,020	

#### 4.1.2. Физико-химическая характеристика

Растворимость всех полученных объектов была оценена в соответствии с методологией ГФ РФ XIV (Таблица 4.2).

Таблица 4.2 – Растворимость твердых монофазных бинарных систем с ДКВ\*

Vahanyan	Растворимость в воде			
коформер	в терминологии ГФ РФ XIV	в числовом эквиваленте, г/мл		
бензальдегид	умеренно растворим	0,01 - 0,03		
ванилин	хорошо растворим	0,10 - 1,00		
коричный альдегид	растворим	0,03 - 0,10		
мочевина	очень хорошо растворим	> 1,00		
никотиновая кислота	умеренно растворим	0,01 - 0,03		
* 1 TICD C		(0, 0, 2) $(0, 10, 1, 1)$		

\*лиофилизат ДКВ без коформеров по ГФ РФ XIV – растворим (0,03 – 0,10 г/мл)

В ходе сопоставительного анализа значений фрактальных размерностей морфологических элементов твердых монофазных бинарных систем ДКВ и их растворимости в воде при комнатной температуре установлено наличие логарифмической зависимости (Рисунок 4.2).



Рисунок 4.2 – Логарифмическая зависимость растворимости лиофилизатов ДКВ от фрактальной размерности их морфологических элементов

Обнаруженная взаимосвязь (r<sup>2</sup> = 0,9417) может быть объяснена физическим смыслом фрактальной геометрии. Скорость и полнота растворения субстанции

зависит от площади поверхности соприкосновения твердой фазы и растворителя. Рост значения фрактальной размерности взаимосвязан с увеличением площади взаимодействия с молекулами воды – поверхность лиофилизатов занимает промежуточное состояние между 2D и 3D объектами.

Поскольку аналитический метод должен не только описывать состояние хорошо известных объектов, но и предсказывать свойства еще не изученных объектов, к полученным значениям фрактальной размерности была применена перекрестная кросс-валидация (Таблица 4.3). Рассчитанные величины не имели статистически значимого отличия от экспериментальных данных. Таким образом, была подтверждена возможность использования фрактального анализа в контроле качества лиофилизатов.

		Decoustors of a		Сполияя
Коформер	фрактальная фрактальная размерность*	рактальная фрактальная размерность	Относительная ошибка, %	средняя относительная ошибка, %
Без коформера	2,434	2,400	1,40	
Бензальдегид	2,309	2,359	2,18	
Ванилин	2,494	2,530	1,45	1 17
Коричный альдегид	2,410	2,405	0,22	1,17
Мочевина	2,589	2,603	0,22	
Никотиновая кислота	2,365	2,328	1,55	

Таблица 4.3 – Перекрестная кросс-валидация (условия см. 7.10)

\* получена в программе FDim

# 4.2. Разработка и валидация методики фрактального анализа

В фармацевтическом анализе различают методы, предназначенные для качественной и количественной оценки чистоты фармацевтической субстанции, что закреплено в ОФС.1.1.0012.15 «Валидация аналитической методики» [8]. Фрактальную размерность можно отнести к показателям чистоты субстанции. По требованию ГФ РФ XIV пригодность аналитических методик, предлагаемых к

применению в контроле качества фармацевтических субстанций, должна быть подтверждена экспериментально. В связи с этим были рассчитаны валидационные фрактального анализа для лиофилизатов характеристики методики ДКВ (Таблица 4.4). Результаты позволяют признать потенциал данного подхода в качестве количественной методики контроля чистоты субстанций. Поскольку фракталы тесно сопряжены с хаотическими процессами, в которых небольшое изменение условий приводит к существенным переменам в результате, была устойчивости проведена оценка методики. В целом валидационные характеристики фрактального анализа соответствуют требованиям ГФ РФ XIV. Однако, ввиду высокой чувствительности результата к таким параметрам, как степень увеличения объекта, положение и размер анализируемой области, данный метол может реализовываться исключительно с применением интеллектуальных технологий.

Валида	ционная характеристика	Фрактальный анализ	Нормы по ГФ РФ XIV
Специфичност	Ь	+	+/-
Предел обнару	жения	0,3927	Должна быть оценена
Правильность		0,0384	< 0.0500
Сходимость		0,0400	< 0.0500
Устойчивость	на увеличение в х10 раз	± 0,0200	
	на изменение размера области анализа на 100 пикс <sup>2</sup>	± 0,0002	Должна быть оценена
	на смещение положения области анализа на 1 пикс	± 0,0007	

Таблица 4.4 – Валидационные характеристики метода фрактального анализа (условия см. 7.10)

Помимо объектов на базе малых молекул (ДКВ), данная методика была апробирована на лиофилизатах пробиотика бифидобактерий бифидум монокомпонентного (ФС.3.3.1.0061.18 «Пробиотик бифидобактерий бифидум монокомпонентный, лиофилизат для приготовления суспензии для приема внутрь и местного применения» [8]). Дальнейшая автоматизация этой методики позволит разработать инновационный неразрушающий метод контроля качества фармацевтических субстанций. Полученные результаты будут способствовать реализации концепции Индустрии 4.0 в отечественном фармацевтическом производстве.

### Выводы по главе

- Установлена взаимосвязь между морфологией лиофилизатов ДКВ и их физико-химическими свойствами.
- Применены принципы фрактальной геометрии для разработки аналитической методики неразрушающего контроля качества лиофилизатов ДКВ на базе интеллектуальных технологий.
- Валидирована методика фрактального анализа для лиофилизатов ДКВ.

### Биофармацевтические свойства фазовых модификаций в условиях ex vivo

Научное сообщество и регуляторные органы отмечают необходимость и важность проведения сопоставительного анализа биофармацевтических свойств полиморфных модификаций фармацевтических субстанций [3; 8; 78; 99]. В соответствии с Биофармацевтической классификацией соединений (БКС), в зависимости от растворимости и проницаемости, изучаемые объекты относят к одной из четырех групп [19]. По первому параметру фармацевтические соединения с «высокой» субстанции подразделяют на И С «низкой» растворимостью в зависимости от способности раствориться в 250 мл воды при температуре 37 °С в количестве, равном высшей разовой дозе [17, 77]. По территории Российской Федерации был литературным данным, на зарегистрирован один препарат на базе ДКВ<sub>фс</sub> – «Диквертин», высшая разовая доза (ВРД) которого в остром периоде заболевания может составлять от 40 до 60 мг [9]. Учитывая, что по классификации ГФ РФ XIV ДКВ<sub>фс</sub>, ДКВ<sub>т</sub> и ДКВ<sub>с</sub> относятся к категориям очень мало растворим (от 0,1 до 1,0 мг/мл), мало растворим и мало растворим (от 1,0 до 10 мг/мл), соответственно, все фазовые модификации ДКВ исследуемые характеризуются высокой растворимостью по БКС.

действующего Под «проницаемостью» подразумевают способность вещества всасываться в желудочно-кишечном тракте [19]. Современный позволяет осуществлять технологический уровень исследование данной характеристики фармацевтической субстанции на моделях in vivo и ex vivo. Последний более широкое распространение метод находит все В биофармацевтических исследованиях благодаря сочетанию хорошей воспроизводимости и достоверности результатов со сравнительно низкими затратами на проведение анализа [35]. При изучении проницаемости ex vivo можно использовать эпителиальные клетки аденокарциномы толстого кишечника человека (Caco-2) и клетки Мадин-Дарби почек собаки (MDCK). Культура клеток Сасо-2 характеризуется более адекватной экспрессией генов, ответственных за синтез АТФ-зависимых эффлюксных насосов. В то же время клетки MDCK быстрее формируют монослой (достигают конфлюентности), что позволяет интенсифицировать проведение биофармацевтических исследований [85; 99]. В литературе имеются сведения об изучении проницаемости ДКВ на модели Сасо-2 [70; 124], однако отсутствуют данные об использовании клеток MDCK для этих целей, в связи с чем, для проведения наших исследований была выбрана именно эта культура.

Проведение анализа проницаемости соединения на модели *ex vivo* предполагает использование планшетов с лунками, позволяющими установить полупроницаемую мембрану, на которой осуществляется выращивание клеточной культуры (Рисунок 5.1).



Рисунок 5.1 – Схема лунки планшета для оценки проницаемости соединения

Исследуемый образец помещается с апикальной стороны монослоя клеток в донорный раствор, после чего система культивируется некоторое время. Через осуществляется забор определенные промежутки аликвотных долей из базолатеральной стороны принимающего раствора с монослоя, которые количественному анализу. В для подвергают связи изучения С этим, проницаемости фазовых модификаций ДКВ требовалось разработать метод для ЛКВ определения концентрации В принимающем растворе оценить И цитотоксические свойства флаванонола по отношению к клеткам MDCK.

### 5.1. Дизайн эксперимента ex vivo

### 5.1.1. Разработка методики количественного определения

Количественный анализ в ходе исследования проницаемости биологически активных веществ предполагает использование максимально чувствительного подхода, поскольку на начальных этапах эксперимента концентрация соединения в принимающем растворе очень мала и выражается в нмолях. Наиболее подходящим методом для этой цели является высокопрецизионный метод ВЭЖХ со спектрофотометрическим способом детектирования, учитывая наличие хромофорной системы в ДКВ.



Рисунок 5.2 – Хроматограмма раствора ГСО ДКВ, концентрация – 0,01 мг/мл (условия см. 7.7.1)

С целью повышения чувствительности метода был использован изократический режим, позволяющий повысить соотношение сигнал-шум. В ходе анализа различных соотношений растворителей и модификаторов в качестве подвижной фазы был выбран состав, включающий 2% раствор муравьиной кислоты в воде (70%) и ацетонитрил (30%). Хроматографирование осуществляли в обращенно-фазовом режиме на привитой октадецильной неподвижной фазе. Скорость потока подвижной фазы – 1,0 мл/мин. Детектирование проводили

спектрофотометрически в максимуме поглощения ДКВ при длине волны 290 нм. В этих условиях ВУ ДКВ составило 5,453 мин (Рисунок 5.2).

Используя описанные условия хроматографирования, был построен калибровочный график зависимости площади пика от концентрации ДКВ, в интервале измеряемых значений (Рисунок 5.3). Установлена линейная зависимость между этими величинами в диапазоне концентраций от 0,00001 до 0,50000 мг/мл ( $r^2 = 0,9999$ ). На основании полученных данных было рассчитано, что минимальная определяемая концентрация ДКВ данным методом составляет 0,00018 мг/мл.



Рисунок 5.3 – Калибровочный график для определения концентрации ДКВ в принимающем растворе

Таким образом, на базе метода ВЭЖХ была разработана методика количественного определения ДКВ, приемлемая для оценки содержания биофлавоноида в эксперименте по изучению проницаемости его фазовых модификаций.

#### 5.1.2. Цитотоксические свойства

Согласно международной нормативной документации, если лекарственное средство имеет длительную историю использования (более 30 лет для традиционных средств и более 10 лет для остальных), то его безопасность считается доказанной [22]. Однако для проведения эксперимента по

исследованию проницаемости на культуре клеток сначала необходимо оценить специфические цитотоксические свойства ДКВ. В основе определения цитотоксичности молекул лежит реакция окисления никотинамидадениндинуклеотида восстановленного (NADH до NAD<sup>+</sup>). Для традиционно используют 3-(4,5-диметил-2визуализации процесса ЭТОГО тиазолил)-2,5-дифенил-2*H*-тетразолия бромид (MTT-тест). Посредством медиаторов восстановления бесцветная форма тетразола трансформируется в формазан, характеризующийся длинной цепью сопряжения, раствор которого окрашен в оранжевый цвет. По интенсивности окраски растворов, оцененной спектрофотометрическим методом в максимуме поглощения при длине волны 450 нм, можно судить о выживаемости культуры клеток [122; 169].

Однако данный метод очень чувствителен к условиям проведения МТТтеста, при не соблюдении которых происходит кристаллизация красителя, что негативно сказывается на релевантности полученных результатов. В связи с этим в качестве аналогичного индикатора выживаемости клеток применяют 2-(2метокси-4-нитрофенил)-3-(4-нитрофенил)-5-(2,4-дисульфофенил)-2*H*-тетразола мононатриевую соль (ССК-8), отличающуюся лучшей растворимостью [167; 176]. Методика определения цитотоксичности субстанций при помощи ССК-8 аналогична вышеописанному методу. Химическая основа модифицированного МТТ-теста с помощью ССК-8, использованного в нашей работе, представлена на Рисунке 5.4.



Рисунок 5.4 – Химическая основа модифицированного МТТ-теста определения цитотоксичности субстанции

96

В ходе разработки дизайна эксперимента по оценке проницаемости исследуемых модификаций ДКВ принимали во внимание необходимость сохранения их твёрдого состояния. В связи с этим более предпочтительными объектами для проведения испытаний были не истинные растворы ДКВ, а суспензии его различных форм. Эксперимент с использованием суспензий принято называть исследованием «бесконечной проницаемости» (infinity permeability test). Поэтому в ходе цитотоксических испытаний оценивали свойства образцов с достаточно высокой концентрацией биофлавоноида (Таблица 5.1). Оптические плотности для «контроля +» и «контроля –» составляли 0,64899 ± 0,04651 и 0,13942 ± 0,01207, соответственно.

Исследуемый образец		Оптическая плотность при $\lambda = 450$ нм				
		ДК $\mathbf{B}_{\mathbf{\phi}\mathbf{c}}$	ДКВт	ДКВ <sub>с</sub>		
	2,0000	$0,512 \pm 0,020$	$0,\!490 \pm 0,\!016$	$0,\!494 \pm 0,\!020$		
Концентрация ДКВ, мг/мл	1,0000	$0,534 \pm 0,015$	$0,513 \pm 0,023$	$0,508 \pm 0,036$		
	0,5000	$0,\!536\pm0,\!008$	$0,543 \pm 0,026$	$0,531 \pm 0,040$		
	0,2500	$0,577 \pm 0,046$	$0,547 \pm 0,022$	$0,547 \pm 0,029$		
	0,1250	$0,594 \pm 0,032$	$0,552 \pm 0,019$	$0,547 \pm 0,039$		
	0,0625	$0,592 \pm 0,028$	$0,584 \pm 0,031$	$0,568 \pm 0,040$		
	0,0313	$0,609 \pm 0,013$	$0,592 \pm 0,023$	$0,572 \pm 0,041$		
	0,0156	$0,626 \pm 0,010$	$0,600 \pm 0,032$	$0,582 \pm 0,031$		

Таблица 5.1 – Оптическая плотность клеточных суспензий с ССК-8 (условия см. 7.7.3)

После математической обработки полученных спектрофотометрических данных была установлена обратная логарифмическая зависимость между концентрацией ДКВ и выживаемостью клеток MDCK (Рисунок 5.5). В результате проведенного исследования был подтвержден высокий профиль безопасности ДКВ<sub>фс</sub>, что хорошо согласуется с литературными данными [70; 144], и выявлена низкая цитотоксичность его синтезированных фазовых модификаций. Выживаемость клеток MDCK на фоне использования различных форм и концентраций флаванонола превышала или статистически не отличалась от 70%. Обнаруженный логарифмический характер зависимости можно объяснить тем, что, с повышением концентрации биофлавоноида, вклад токсического действия

молекул на выживаемость культуры клеток ослабевает, и наблюдаемые изменения обусловлены скорее физическим воздействием частиц твердой фазы.



Рисунок 5.5 – Логарифмическая зависимость выживаемости клеток от концентрации ДКВ

Можно отметить, что статистически значимая разница в цитотоксических свойствах ДКВ<sub>фс</sub>, ДКВ<sub>т</sub> и ДКВ<sub>с</sub> по отношению к клеткам MDCK отсутствовала. Однако, исходя из наклонов прямых на графике выживаемости, можно сделать вывод, что у аморфной формы наблюдается тенденция к более приемлемому профилю безопасности (3,29 ± 0,10) в сравнении с кристаллическими модификациями (4,36 ± 0,18 и 4,59 ± 0,21 для ДКВ<sub>т</sub> и ДКВ<sub>фс</sub>, соответственно).

На основании полученных результатов модифицированного МТТ-теста суспензии с концентрацией 1 мг/мл были выбраны для осуществления сопоставительной оценки в формате бесконечной проницаемости.

### 5.1.3. Оценка конфлюентности культуры клеток

Одним из важных этапов исследования проницаемости фармацевтических субстанций *ex vivo* является окончательное формирование монослоя модельной культуры клеток, что позволяет достигать более воспроизводимых и релевантных результатов эксперимента. В ходе описываемого исследования конфлюентность клеток MDCK контролировали путем микроскопического анализа и измерения трансэпителиального электрического сопротивления.

При изучении поверхности полупроницаемой мембраны под микроскопом (Рисунок 5.6) было установлено, что на первый день культуральная среда представляет собой суспензию отдельных клеток MDCK и их агломератов. По прошествии девяти суток наблюдали формирование гомогенного монослоя.



Рисунок 5.6 – Микроскопический контроль конфлюентности клеток MDCK (условия см. 7.7.4): А – день 1, В – день 9

Согласно рекомендациям [35; 104], мониторинг достижения конфлюентности клеточной культуры должен осуществляться путем измерения трансэпителиального электрического сопротивления (Таблица 5.2). В ходе проведенного анализа выявлено, что, начиная с седьмого дня, вольтметр регистрировал величины, не имеющие статистически значимых отличий от последующих измерений. Это позволяет говорить о выходе на плато. В то же время, полученные значения трансэпителиального электрического сопротивленого электрического сопротивления превышали 260 Ом/см<sup>2</sup>, что соответствует минимальной величине монослоя.

	1	1	
Поти	Трансэпителиа	льное электрическое сопроти	вление, Ом/см <sup>2</sup>
день	ДК $\mathbf{B}_{\mathbf{\phi}\mathbf{c}}$	ДКВт	ДКВ <sub>с</sub>
1	$169,50 \pm 42,11$	$180,50 \pm 23,56$	$181,25 \pm 22,38$
3	$174,25 \pm 19,81$	$200,25 \pm 22,10$	$205,25 \pm 20,61$
5	$220,50 \pm 6,66$	$245,25 \pm 13,82$	$233,50 \pm 15,80$
7	$261,00 \pm 14,76$	$270,00 \pm 19,13$	$261,50 \pm 6,56$
9	$266,00 \pm 5,60$	$277,25 \pm 14,24$	$273,75 \pm 9,60$

Таблица 5.2 – Мониторинг достижения конфлюентности

Таким образом, используя два независимых метода анализа, было подтверждено формирование монослоя клеток MDCK, и готовность системы для сопоставительного анализа проницаемости фазовых модификаций ДКВ.

## 5.2. Определение проницаемости фазовых модификаций дигидрокверцетина

Оценку биофармацевтических свойств полученных фазовых модификаций ДКВ методом бесконечной проницаемости на модели ex vivo осуществляли в течение двух часов (Рисунок 5.7). В первой измерительной точке (15 мин) различия между кристаллическими формами ДКВ имели статистически значимые различия: концентрация флавоноида в лунках с ДКВ<sub>фс</sub> была в два раза выше, чем с ДКВ<sub>т</sub> – 0,12465  $\pm$  0,01870 мг/мл и 0,06384  $\pm$  0,02711 мг/мл, соответственно. В дальнейшем разница между исследуемыми образцами нивелировалась. После математической обработки полученных профилей изменения концентрации ДКВ принимающем растворе не выявлено существенных различий между В кристаллическими формами биофлавоноида. В то же время профиль изменения концентрации ДКВ<sub>с</sub> характеризовался более выраженными статистически значимыми различиями в сравнении с ДКВ<sub>фс</sub> и ДКВ<sub>т</sub>. В первой измерительной точке средняя концентрация биофлавоноида в лунках с аморфной формой была выше остальных (0,13503 ± 0,01961 мг/мл). Однако дальнейшее увеличение количества ДКВ в принимающем растворе происходило не настолько интенсивно, как с кристаллическими образцами. В конечной измерительной точке (120 мин) концентрация флаванонола в лунках со сфероидной модификацией была

статистически значимо ниже, чем с ДКВ<sub>фс</sub> и ДКВ<sub>т</sub> – 0,29974 ± 0,01230 мг/мл, 0,35887 ± 0,04191 мг/мл и 0,36019 ± 0,03562 мг/мл, соответственно. Наблюдаемые различия можно объяснить общей термодинамической неустойчивостью аморфной твердой фазы. Изначальная улучшенная растворимость позволила достигнуть высоких концентраций. Вероятно, в процессе пребывания в испытуемой системе происходит фазовый переход, который сопровождается снижением растворимости, достижением насыщенного раствора и, как следствие, уменьшением проницаемости.



Рисунок 5.7 – Изменение концентрации ДКВ в принимающем растворе (условия см. 7.7.4)

Для количественной интерпретации результатов исследований проницаемости фармацевтических субстанций *ex vivo* используют значение кажушейся проницаемости (Papp), которое рассчитывают на основании изменения концентрации соединения в принимающей ячейке с течением времени (Таблица 5.3). Выявлены статистически значимые различия в значениях кажущейся проницаемости для всех изученных фазовых модификаций ДКВ. Трубчатая форма характеризовалась самым высоким значением *Papp*, в то время как у аморфной модификации наблюдали более пролонгированный режим.

Исследуемый		Измеренные параметры	
образец	dC/dT	$Papp$ , см/с $\cdot 10^6$	Выживаемость, %
ДК $B_{\phi c}$	$0,00225 \pm 0,00002$	$14,8 \pm 0,3$	$70,75 \pm 9,86$
ДКВт	$0,00295 \pm 0,00001$	$19,4 \pm 0,2$	$71,33 \pm 4,31$
ДКВ <sub>с</sub>	$0,00162 \pm 0,00002$	$10,7 \pm 0,3$	$86,82 \pm 5,55$

Таблица 5.3 – Результаты оценки кажущейся проницаемости и выживаемости клеток

Интересно отметить, что в ходе последующего измерения трансэпителиального электрического сопротивления были получены данные по выживаемости клеток MDCK, сопоставимые с результатами модифицированного MTT-теста (см. 5.1.2). У ДКВ<sub>с</sub> выявлен наиболее высокий профиль безопасности, и на этот раз данный параметр достиг статистически значимых различий. Однако, в целом, выживаемость всех клеток MDCK была более 70% во всех случаях.

Для классификации фазовых модификаций ДКВ по БКС полученные значения Рарр нужно сравнить с кажущейся проницаемостью соединения, Одним высокой биологической доступностью. известного ИЗ «золотых стандартов» в подобных исследованиях является метопролол [35]. Значение *Рарр* зависит от величины рН среды и, согласно литературным данным, в слабокислой среде для метопролола данное значение установлено на уровне 7,8 см/с • 10<sup>6</sup> [110; 178]. Следовательно, все исследованные фазовые модификации ДКВ обладают высокой проницаемостью. Сочетание высокой растворимости и высокой проницаемости позволяет отнести ДКВ<sub>фс</sub>, ДКВ<sub>т</sub> и ДКВ<sub>с</sub> к I классу БКС. Вместе с внимание активную разработку новых лекарственных тем. принимая BO препаратов на базе ДКВ, следует учитывать, что в перспективе возможно установление более высокой ВРД для данного биофлавоноида, что может привести к переходу ДКВ<sub>фс</sub> во II класс БКС.

#### Выводы по главе

• Разработана методика количественного определения ДКВ на основе метода ВЭЖХ с УФ-спектрофотометрическим детектированием для проведения исследований *ex vivo*.

- Продемонстрирован высокий профиль безопасности у ДКВ<sub>фс</sub> и его фазовых модификаций в эксперименте *ex vivo* на модели клеток MDCK.
- Обнаружена повышенная проницаемость у ДКВ<sub>т</sub> в сравнении с исходной фармацевтической субстанцией.
- Выявлен пролонгированный режим всасывания для ДКВ<sub>с</sub>.
- Установлено, что синтезированные фазовые модификации ДКВ относятся к І классу БКС.

#### ГЛАВА 6.

# Функциональные свойства фазовых модификаций дигидрокверцетина

Неоднородность в физико-химических свойствах фазовых модификаций ДКВ, описанная в главе 3, обуславливает возможность их различного применения. Новые формы ДКВ могут обладать специфичными функциональными свойствами, подтверждающими целесообразность их использования.

# 6.1. Фармацевтико-технологические свойства

Многие лекарственные препараты, зарегистрированные к применению на территории РФ, находятся в форме таблеток. В последнее время все больше внимания уделяют таблеткам, диспергируемым и растворяемым в ротовой полости, что обусловлено высокой биологической доступностью данной лекарственной формы. Особенно часто таблетки для рассасывания применяют при оториноларингологических заболеваниях. Целесообразность использования именно такой формы при лечении воспалительных заболеваний объясняется их эффективностью [20]. Кроме того, данная лекарственная форма может быть особенно привлекательна для тех пациентов, которые испытывают трудности при глотании таблеток: старики, дети, а также пациенты, страдающие от тошноты и психических заболеваний [15].

ДКВ характеризуется наличием противовоспалительного, противовирусного и антибактериального фармакологических эффектов [18]. Поэтому разработка таблеток для рассасывания с целью проведения комплексной терапии воспалительных заболеваний полости рта и горла представляется одним из перспективных направлений исследования ДКВ. Подобные лекарственные препараты должны обладать пролонгированным режимом высвобождения. Следовательно, исходя из результатов анализа биофармацевтических параметров, ДКВ<sub>с</sub> является наиболее подходящим объектом для создания таблеток для рассасывания на основе данного биофлавоноида.

В результате совместных работ с кафедрой фармацевтической технологии Института фармации имени А.П. Нелюбина Сеченовского университета был состав таблеток разработан оптимальный для рассасывания. Дозировка действующего вещества была установлена В соответствии с ранее зарегистрированным лекарственным препаратом «Диквертин» - 20 мг [9]. Спектр вспомогательных веществ, вошедших в исследуемые составы, базировался на данных литературных источников с особым вниманием к наиболее используемым компонентам таблеток для рассасывания [15]. В качестве наполнителей и, отчасти, коррегентов вкуса рассматривали дисахарид сахарозу, а также альдиты моносахаридов маннозы (маннитол) и глюкозы (сорбитол). Полимеры натрия крахмала гликолят, кросповидон и натрия кроскармилоза выполняли роль разрыхляющих агентов. В соответствии с требованиями ГФ РФ XIV доля антифрикционного компонента, в качестве которого использовали кальция стеарат, не превышала 1% от общей массы таблеток [8]. Учитывая горький вкус, которым обладает ДКВ, в состав некоторых рецептур таблеток для рассасывания были добавлены коррегенты вкуса аспартам и ментол. В итоге, был разработан следующий оптимальный состав: ДКВ : сахароза : кросповидон : кальция стеарат : ментол – 20 : 265 : 8 : 2 : 5. Общая масса таблетки – 300 мг. Представляло интерес исследовать фармацетико-технологические параметры таблетируемых масс и таблеток, изготовленных на основе ДКB<sub>c</sub>, В сравнении исходной с фармацевтической субстанцией.

### 6.1.1. Таблетируемые массы на базе фазовых модификаций

Нами был осуществлен сопоставительный анализ сыпучести ДКВ<sub>фс</sub> и ДКВ<sub>с</sub>, а так же таблетируемых масс на их основе тремя различными методами: по скорости протекания порошка через стандартизованное отверстие, по углу естественного откоса и по насыпному объему (условия см. 7.8.1). Также была изучена прессуемость субстанций.

При определении степени сыпучести по скорости протекания порошка установлено, что подвижных свойств ДКВ<sub>фс</sub> и таблетируемой массы на ее основе недостаточно для прохождения ни через одно из трех стандартных отверстий. Для образцов на базе ДКВ<sub>с</sub> показатель сыпучести определен при диаметре отверстия 25 мм ( $\mathbb{N}$  3) — данные измерения представлены в Таблице 6.1. Поскольку отдельные значения отклоняются от среднего более чем на 10%, поэтому целесообразно отметить, что показатели сыпучести аморфной формы и смеси на ее основе укладывались в диапазон от 19,4 г/с до 23,2 г/с и от 11,2 г/с до 18,8 г/с, соответственно.

		Скорость протекания порошка, г/с					
Обт	ьект исследования	Ot)	дельные измере	ния	Сполнос		
		Ι	II	III	Среднее		
ЛКВс	субстанция	20,5	23,2	19,4	21,0		
	таблетируемая масса	11,2	18,8	14,7	14,9		

Таблица 6.1 - Сравнение порошков по показателю «Скорость протекания порошка»

Исходя из результатов определения степени сыпучести по скорости протекания порошка через стандартизованное отверстие, определение степени сыпучести по углу естественного откоса осуществлялось с насадкой № 3. Материал базы, на которую проводилось формирование конуса, представлял собой бумагу. Результаты измерений углов естественных откосов позволяют утверждать, что введение вспомогательных веществ способствовало повышению степени сыпучести исследуемых образцов (Таблица 6.2). При этом углы откосов сформированных базе сфероидной конусов, порошками на формы, характеризовались меньшими значениями, то есть степень их сыпучести, согласно ОФС.1.4.2.0016.15 «Степень сыпучести порошков» – «очень хорошая». В то же время фармацевтическая субстанция демонстрировала «неудовлетворительную» сыпучесть, а в составе таблетируемой массы этот показатель был меньше 45°, что свидетельствовало об «удовлетворительной» сыпучести.

			Угол естественного откоса, °			
Обт	ьект исследования	Проба	Отде	G		
			Ι	II	III	Среднее
		1	59	45	41	
	субстанция	2	47	42	60	46,8
ДКВ <sub>фс</sub>		3	45	43	39	
		1	49	42	39	
	таблетируемая масса	2	51	44	43	44,7
		3	50	46	38	
		1	30	33	25	
ПКВ	субстанция	2	45	30	27	29,6
		3	24	17	35	
ДЮс		1	27	25	20	
	таблетируемая масса	2	17	25	30	24,4
		3	30	27	19	

Таблица 6.2 – Сравнение порошков по показателю «Угол естественного откоса»

В ходе анализа степени прессуемости фазовых модификаций ДКВ по насыпному объему было выявлено преимущество аморфной формы для технологического процесса в сравнении с исходной субстанцией (Таблица 6.3).

Объект исследования		Коэффициент	Индекс Hausner	Индекс Carr, %
		прессуемости		
ДК $\mathbf{B}_{\mathbf{\varphi}\mathbf{c}}$	субстанция	28,85	1,421	29,63
		20.57	1 (12	20.00
	таблетируемая масса	28,57	1,642	39,08
ДКВ <sub>с</sub>	субстанция	13,73	1,235	19,00
	таблетируемая масса	14,58	1,219	17,99

Таблица 6.3 – Сравнение порошков по показателям прессуемости

Анализируя результаты измерений, можно сделать вывод, что ДКВ<sub>с</sub> характеризуется «очень хорошей» сыпучестью и «приемлемой» прессуемостью.

ДКВ<sub>фс</sub> обладает «неудовлетворительной» сыпучестью и «высокой» прессуемостью. При этом коэффициент уплотнения фармацевтической субстанции вдвое выше по сравнению с аморфной формой.

Полученные данные свидетельствуют о том, что при разработке таблеток на базе аморфной формы потребуется меньшее количество вспомогательных веществ, что является более предпочтительным вариантом как с экономической, так и фармакологической точек зрения.

# 6.1.2. Характеристики таблеток для рассасывания

Проанализированные таблетируемые массы на базе фазовых модификаций ДКВ послужили основой таблеток для рассасывания, полученных прямым прессованием (условия см. 7.1.1).

В результате сопоставительного анализа (условия см. 7.8.2-7.8.4) установлено статистически значимое различие по показателю «Распадаемость» (Таблица 6.4). Распадаемость для таблеток на базе ДКВ<sub>с</sub> более чем в 5 раз превышала аналогичный показатель таблеток с ДКВ<sub>фс</sub>. При этом лекарственная форма на основе ДКВ<sub>фс</sub> не укладывались в обозначенное нами референтное время. Однако по характеристикам прочности оба состава соответствовали требованиям ГФ РФ XIV: прочность на сжатие превышала 40 H, а прочность на истирание была меньше 3%.

Действующее вещество таблеток для рассасывания	Распадаемость, мин	Прочность на раздавливание, Н	Прочность на истирание, %		
$ДКВ_{ m \varphic}$	7,1 ± 1,8	74,9 ± 33,6	1,3		
ДКВ <sub>с</sub>	36,4±2,3	81,0 ± 23,4	0,3		

Таблица 6.4 – Фармацевтико-технологические параметры таблеток на базе ДКВ

Для осуществления исследования таблеток для рассасывания по показателю «Растворение» требовалось определить условия проведения испытания, поскольку в нормативной документации России отсутствуют соответствующие указания. Дизайн анализа основывался на данных базы FDA [64] и был
максимально приближен к физиологическим условиям полости рта [108]. Поэтому растворение (условия см. 7.8.5) осуществляли при температуре 37,0 °С в среде, характеризующейся значением pH = 6,8.

Для проведения оценки профилей высвобождения действующего вещества из таблеток на базе различных фазовых модификаций ДКВ было необходимо разработать методику количественного анализа биофлавоноида в обозначенных условиях методом спектрофотометрии. В водном растворе со значением pH=6,8 максимум поглощения ДКВ наблюдали при длине волны 324 нм (Рисунок 6.1).



Рисунок 6.1 – УФ-спектр ДКВ в фосфатном буфере (pH=6,8), концентрация – 0,03 ммоль/л (условия см. 7.8.5)

Для осуществления количественного анализа был построен калибровочный график зависимости оптической плотности ДКВ от его концентрации в растворе (Рисунок 6.2). Выявлена линейная зависимость между этими величинами в интервале от 10 до 50 мг/л ( $r^2 = 0,9966$ ), что соответствовало диапазону измеряемых концентраций ДКВ.



Рисунок 6.2 – Калибровочный график для определения концентрации ДКВ при рН=6,8

На основе полученного калибровочного графика была оценена скорость высвобождения ДКВ из таблеток для рассасывания с различными полиморфными формами (Рисунок 6.3). Установлено, что оба исследуемых объекта соответствуют требованиям ГФ РФ XIV: в течение 45 мин происходит высвобождение 75% действующего вещества.



Рисунок 6.3 – Профили высвобождения ДКВ из таблеток для рассасывания

Следует отметить, что таблетки для рассасывания на базе ДКВ<sub>с</sub> характеризуются более интенсивным высвобождением биофлавоноида на протяжении первых 5 мин испытания по сравнению с таблетками с ДКВ<sub>фс</sub> (33,37% и 16,25%, соответственно).

Однако, в целом, таблетки на основе аморфной формы имеют более пролонгированный режим высвобождения, чем на базе ДКВ<sub>фс</sub>. Это наблюдение путем расчета константы скорости высвобождения было подтверждено действующего вещества и периода полурастворения таблетки (Таблица 6.5). При этом нельзя считать данные образцы эквивалентными, поскольку их коэффициент различия превышал 15%, а коэффициент подобия был менее 50%. Выявленные различия в профилях высвобождения могут быть объяснены природой фазовых модификаций ДКВ, вошедших в состав таблеток для рассасывания. Поскольку аморфные тела характеризуется изотропностью свойств, то ДКВ<sub>с</sub> выполняла не только функцию действующего вещества, но и служила связывающим агентом. Тем самым обеспечивались дополнительные прочностные характеристики и становился возможным более пролонгированный режим высвобождения.

Действующее вещество	Показатель					
	Константа	Период				
	скорости высвобождения	полураспада	Коэффициент	Коэффициент подобия, %		
	действующего вещества,	таблетки,	различия, %			
	мин <sup>-1</sup> мин					
ДК $B_{\Phi c}$	$0,034 \pm 0,002$	$20,63 \pm 1,13$				
			$23,0 \pm 1,7$	$42,8 \pm 6,0$		
ДКВ <sub>с</sub>	$0,048 \pm 0,002$	$14,56 \pm 0,48$				

Таблица 6.5 – Сравнение профилей высвобождения ДКВ из таблеток для рассасывания

Таким образом, таблетки для рассасывания на основе ДКВ<sub>с</sub> обладают более пролонгированным режимом высвобождения. Это делает их перспективным объектом для дальнейших фармакологических исследований с целью внедрения в клиническую практику в качестве местного антисептика для действия в полости рта при заболеваниях стоматологического и оториноларингологического профиля.

### 6.2. Ранозаживляющие свойства в эксперименте in vivo

По литературным данным, ДКВ характеризуется противовоспалительным, антибактериальным и выраженным антиоксидантным фармакологическими эффектами [18]. Поэтому не удивительно, что одной из приоритетных областей медицинской науки, в которой ведется активное исследование терапевтического потенциала данного биофлавоноида, является комбустиология – направление травматологии, изучающее методы врачевания ожогов и связанных с ними патологических состояний. В настоящее время имеется несколько публикаций, в которых, используя различные лекарственные формы ДКВ, удавалось добиться выраженного фармакологического эффекта при лечении ожогов II и III степени [36; 127]. В сравнении с традиционными методами терапии использование ДКВ характеризовалось более физиологичными процессами восстановления поврежденной ткани.

Однако к настоящему моменту не было проведено исследований, позволяющих изучить влияние фазового состояния на регенеративное действие ДКВ. Благодаря капиллярным свойствам и более высоким биофармацевтическим характеристикам ДКВ<sub>т</sub> представляется перспективным объектом для проведения подобных исследований.

Для получения достоверной информации о фармакологической эффективности биологически активного соединения одним из ключевых этапов исследования является разработка протокола эксперимента, соответствующего современному технологическому уровню и критериям биоэтики. Для этого необходимо подобрать экспериментальных животных, условия моделирования патологического состояния, методы лечения в исследуемых и контрольных группах, а также способы оценки терапевтического эффекта

Согласно литературным источникам [37], с точки зрения морфологии собаки покровных тканей наиболее родственные И кошки человеку экспериментальные животные, но их содержание сопряжено с высокими материальными затратами травматологическим И высоким риском при

моделировании патологического состояния. Кролики и крысы так же достаточно близки к sapiens. хотя ожоговая болезнь Homo у данных животных сопровождается менее выраженными проявлениями воспалительного процесса, нагноения и грануляции. Имеются сведения, что мыши не подходят для оценки терапевтического эффекта соединений при лечении ожоговых ран. Учитывая пласт работ, посвященных исследованию регенеративных свойств на фоне ожоговой травмы на модели крыс [41; 96; 120; 141], были отобраны именно эти подопытные животные, с целью сравнения результатов эксперимента с аналогичными исследованиями.

Наиболее высокотехнологичным методом моделирования ожоговой болезни использование лазерных установок [96]. Ввиду ограниченной является доступности к подобному оборудованию, для формирования ожогов V экспериментальных животных часто используют более традиционный способ, предполагающий выдерживание металлической пластинки, разогретой ЛО определенной температуры, в течение конкретного временного промежутка на выбритой спине [41; 141]. В нашем эксперименте для стандартизации ожоговой раны использовали металлический брусок массой 200 г, разогретый до 105 °С и закрепляемый на коже крыс в течение 20 с. В описанных условиях у модельных IIIA степени. животных формируется ожог Для снижения дистресса, оказываемого на подопытных животных, все манипуляции проводили под общим наркозом.

Для получения релевантной информации относительно регенеративных свойств исследуемых фазовых модификаций ДКВ генеральная совокупность подопытных особей была разделена на 4 равные группы в зависимости от метода лечения. Группа I выступала в качестве отрицательного контроля без лечения. Группы II и III лечили водными суспензиями ДКВ<sub>фс</sub> и ДКВ<sub>т</sub>, соответственно, с концентрацией 50 мг/мл. Данная дозировка сопоставима с ранее проведенным исследованием [36] фазового И позволяет оценить влияние состояния флаванонола на его фармакологическую эффективность. Группу IV использовали как положительный контроль, в котором терапию осуществляли традиционным

113

методом лечения. В качестве препарата сравнения использовали облепиховое масло, известное своими регенеративными свойствами [13; 23].

Современные методы оценки ранозаживляющих эффектов можно подразделить на контактные, требующие непосредственного взаимодействия экспериментатора с подопытным животным, и бесконтактные, позволяющие оценивать изменение размера раны с помощью аналоговых и цифровых технологий. Для повышения достоверности полученных результатов, в нашем эксперименте реализованы обе концепции: в качестве контактного метода анализа использовали способ Л.Н. Поповой, а среди бесконтактных был выбран метод цифрового фотографирования с эталоном площади [21]. Кроме того, для оценки дистресс-синдрома и развития воспалительных процессов измеряли массу и температуру подопытных животных.

Общая схема дизайна эксперимента *in vivo*, составленная в соответствии с международными биоэтическими нормами [6; 7], представлена на Рисунке 6.4. Данный дизайн эксперимента был одобрен Локальным этическим комитетом Сеченовского университета (Приложение Д).



Рисунок 6.4 – Дизайн эксперимента in vivo на модели ожога ША степени у крыс

К моменту начала эксперимента средняя масса тела в группах I, II, III и IV составляла 279,4 ± 11,2 г, 276,1 ± 7,1 г, 268,2 ± 10,4 г и 277,1 ± 7,8 г, соответственно (Таблица 6.6). Температура тела также не имела статистически значимых отличий и колебалась на уровне 38,0 ± 0,9 °C (Таблица 6.7). Таким образом, изначально группы были гомогенны и однородны. После моделирования ожога IIIA степени во всех группах наблюдали уменьшение веса от 0,3 до 3,4%, что, очевидно, связано с дистрессом от нанесения раны. Тем не менее, в дальнейшем масса тела достигла исходных значений во всех группах. В ходе измерения температуры тела не выявлено значимых различий в исследуемых Однако расхождения скорости были группах. В заживления ожогов существенными.

Группа	Средняя масса крыс в группе, г						
	День 0	День 1	День 8	День 14	День 24		
Ι	279,4±11,5	273,9±11,9	279,7±14,6	337,6±18,5	369,9±22,2		
II	276,1± 7,1	266,8± 7,6	272,2± 9,5	314,1±12,9	357,1±15,2		
III	268,2±10,4	263,1±10,3	278,1± 9,6	306,2±12,9	349,1±17,4		
IV	277,1± 7,8	276,4±10,3	314,4±17,2	325,6±14,3	369,2±17,6		

Таблица 6.6 – Изменения массы крыс на фоне различных методов терапии

Таблица 6.7 – Изменения температуры тела крыс на фоне различных методов терапии

		1 /1	1 1 1		1		
Группа	Средняя температура тела у крыс в группе, °С						
	День 0	День 1	День 8	День 14	День 24		
Ι	38,3±0,6	37,3±0,8	38,1±0,9	38,3±0,8	38,9±1,0		
II	38,1±0,4	38,5±0,8	38,2±0,8	37,7±0,4	38,1±0,5		
III	37,3±0,4	38,8±0,7	38,2±0,3	38,2±0,7	37,9±0,5		
IV	38,3±0,9	37,9±0,3	38,0±0,8	38,2±0,2	37,7±0,9		

На первые сутки после моделирования ожога ША степени на поврежденной коже у крыс отмечено формирование волдырей (Рисунок 6.5). Поскольку рану

наносили при стандартизированных условиях, то средняя площадь ожога не имела статистически значимых (p < 0,05) различий между исследуемыми группам и составляла  $7,8 \pm 1,0 \text{ см}^2$ ,  $8,7 \pm 0,5 \text{ см}^2$ ,  $9,0 \pm 0,5 \text{ см}^2$  и  $8,9 \pm 0,7 \text{ см}^2$  для группы I, группы II и группы IV, соответственно, при измерении по способу Л.Н. Поповой (Таблица 6.8). В ходе измерения бесконтактным методом были получены сопоставимые результаты, хотя доверительный интервал оказался шире.

К восьмым суткам во всех группах наблюдали формирование струпа на раневой поверхности (Рисунок 6.4). При этом было отмечено уменьшение площади ожога, однако скорость заживления раны отличалась. Наименьший уровень ранозаживления выявлен в группе I (19,2  $\pm$  7,7%), а самый высокий – в группе III (43,3  $\pm$  5,6%). В группе II и в группе IV данный параметр составил 34,5  $\pm$  3,4% и 36,0  $\pm$  2,4%, соответственно. Таким образом, в течение первой недели эксперимента наблюдалось статистически значимое (p < 0,05) различие в скорости заживления ожога между крысами, получавшими лечение, и группой отрицательного контроля.

На четырнадцатые сутки во всех группах отмечено наращивание скорости заживления раны (Рисунок 6.4). В то же время, статистически значимых различий в уровнях ранозаживления не выявлено: для группы I, группы II, группы III и группы IV этот параметр составил 59,0  $\pm$  6,4%, 66,7  $\pm$  5,7%, 72,2  $\pm$  5,6% и 66,3%  $\pm$  7,1%, соответственно.

К двадцать четвертым суткам после моделирования ожога во всех группах наблюдали практически полное заживление раны (Рисунок 6.5). У всех крыс, кроме группы IV, отмечено интенсивное зарастание шерстью здоровой кожи. В группе III установлено увеличение уровня ранозаживления до 97,8  $\pm$  2,2%. В остальных группах данный параметр изменился не настолько выраженно: в группах I, II, IV он составил 92,3  $\pm$  10,3%, 93,1  $\pm$  8,0% и 93,3  $\pm$  7,1%, соответственно.



Рисунок 6.5 – Процесс заживления ожога у крыс по дням в зависимости от группы лечения: А – группа I, В – группа II, С – группа III, D – группа IV

	Площадь раны, см <sup>2</sup>							
Группа	(уровень ранозаживления, %)							
	Контактный метод				Бесконтактный метод			
	День 1	День 8	День 14	День 24	День 1	День 8	День 14	День 24
Ι	7,8±1,0	6,3±0,6	3,2±0,5	0,6±0,8	8,7±1,3	5,8±1,3	3,1±0,9	0,7±0,8
		(19,2%)	(59,0%)	(92,3%)		(33,4%)	(64,1%)	(92,3%)
II	8,7±0,5	5,7±0,3	2,9±0,5	0,6±0,7	8,4±1,2	5,5±1,6	2,5±0,8	0,7±0,6
		(34,5%)	(66,7%)	(93,1%)		(34,4%)	(70,0%)	(92,0%)
III	9,0±0,5	5,1±0,5	2,5±0,5	0,2±0,2	8,9±1,4	7,0±1,2	2,7±1,0	0,6±0,3
		(43,3%)	(72,2%)	(97,8%)		(21,0%)	(70,2%)	(93,4%)
IV	8,4±0,7	5,7±0,2	3,0±0,6	0,6±0,6	8,9±1,3	7,5±1,7	3,2±1,1	0,6±0,7
		(36,0%)	(66,3%)	(93,3%)		(15,3%)	(64,1%)	(92,7%)

Таблица 6.8 – Ранозаживление на фоне различных методов терапии (условия см. 7.9.4)

В итоге, общая скорость заживления (Рисунок 6.6) ожога IIIA степени на фоне лечения суспензией ДКВ<sub>т</sub> была наиболее высокой (4,8 ± 0,1%) и статистически значимо отличалась от терапевтического эффекта в других группах (p < 0.05). В то же время, на фоне отсутствия лечения наблюдали наименьшую скорость заживления ран (4,1 ± 0,1%), также значимо отличающуюся от других групп (p < 0.05). Согласно литературным данным [36], скорость заживления ожогов на фоне лечения мазью с ДКВ<sub>фс</sub> сопоставима с терапией облепиховым маслом. Наши результаты согласуются с этими данными: скорость заживления ран в группах II и IV составила 4,2 ± 0,1% и 4,3 ± 0,1%, соответственно. Наблюдаемые терапевтическом эффекте различия В между группами, получавшими лечение различными фазовыми модификациями ДКВ, могут быть обусловлены более высокой проницаемостью трубчатой формы биофлавоноида. Иными словами, в группе крыс, проходивших лечение с суспензией ДКВ<sub>т</sub>, выздоровление, в среднем, наступало на 21 день. В обеих группах, в которых осуществляли лечение суспензией ДКВ<sub>фс</sub> или облепиховым маслом, ожоговая

рана затягивалась к 24 дню. В отсутствии лечения, к моменту окончания эксперимента, раны большинства крыс из группы I так и не зажили.



Рисунок 6.6 – График средней скорости ранозаживления

На основании полученных результатов эксперимента *in vivo* можно утверждать, что ДКВ<sub>т</sub> представляет интерес для клинических исследований в качестве противоожогового препарата с целью дальнейшей трансляции в реальную травматологическую практику.

#### Выводы по главе

- Таблетируемая масса с ДКВ<sub>с</sub> нуждается в меньшем количестве вспомогательных компонентов для оптимизации показателей прессуемости и сыпучести.
- Установлено, что таблетки для рассасывания на базе ДКВ<sub>с</sub> характеризуются улучшенными прочностными свойствами и пролонгированным профилем высвобождения действующего вещества в сравнении с ДКВ<sub>фс</sub>.

- Продемонстрирована корреляция между биофармацевтическими характеристиками фазовых модификаций ДКВ и их фармакологической эффективностью.
- Установлена значимая разница в скорости затягивания раны на фоне лечения ДКВ<sub>т</sub> в сравнении с облепиховым маслом и исходной фармацевтической субстанцией – на 11,6% и 14,3%, соответственно.

#### ГЛАВА 7. Материалы и методы исследования

### 7.1. Материалы

#### 7.1.1. Объекты исследования

Объектами исследования служили фазовые модификации ДКВ, полученные путем супрамолекулярного синтеза из ДКВ<sub>фс</sub> – ФС 000388-270812, «Лавитол», АО «Аметис», Благовещенск, Россия.

 $\mathcal{L}KB_T$ . Для приготовления маточного раствора 1 г  $\mathcal{L}KB_{\phi c}$  смешивали с мочевиной в мольном соотношении 1:1. Полученную смесь растворяли в 50 мл этанола денатурированного, после чего к спиртовому раствору добавляли по каплям воду очищенную при постоянном интенсивном перемешивании на магнитной мешалке. Маточный раствор выдерживали при комнатной температуре в течение 48 ч, после чего твердую фазу отфильтровывали. Полученный продукт высушивали на открытом воздухе на протяжении 24 ч.

*ДКВ<sub>с</sub>*. Для приготовления маточного раствора 1 кг ДКВ<sub>фс</sub> растворяли в 40 л воды деионизированной, нагретой до 60 °C, при постоянном интенсивном перемешивании. Полученный раствор подавали через резервуар на высокоскоростное центрифужное сушильное оборудование распылительного типа, оснащенное механическими форсунками высокого давления. Температурный режим на входе был установлен на уровне 250 °C, на выходе – на уровне 80 °С.

 $QKB_{6}$ . Для приготовления маточного раствора 1 г  $QKB_{\phi c}$  растворяли в 50 мл этанола денатурированного и добавляли 950 мл воды очищенной. Полученную смесь немедленно подвергали глубокой заморозке путем выдерживания маточного раствора в сухом льду при температуре –78 °C в течение 24 ч. Колбу с замороженным образцом подсоединяли к лиофильной сушилке и высушивали при температуре –55 °C и атмосферном давлении 0,35 атм на протяжении 36 ч. В качестве образца сравнения использовали фармацевтическую субстанцию ДКВ<sub>фс</sub>.

Таблетки на базе ДКВ<sub>фс</sub> и ДКВ<sub>с</sub> получали прямым прессованим на лабораторном механическом прессе для таблетирования при давлении около 7 атм.

# 7.1.2. Реактивы, стандартные образцы, растворители

Ацетонитрил – для хроматографии, Merck KGaA, Дармштадт, Германия. Бензальдегид – 98,0%, Геел, Бельгия.

Ванилин – 99,0%, Carl Roth GmbH, Карлсруэ, Германия.

ГСО ДКВ – 99,99%, АО «Аметис», Благовещенск, Россия; ГСО 10766-2016, свидетельство об утверждении типа стандартного образца № 4777.

ДМСО – 99,5%, XiLonh Scienitific, Гуанчжоу, Китай.

Иод – 99,8%, Merck KGaA, Дармштадт, Германия.

Калия бромид – чда, АО «ЛенРеактив», Санкт-Петербург, Россия.

Калия гидрофосфат – хч, ООО «Компонент-Реактив», Москва, Россия.

Калия дигидрофосфат – хч, ООО «Компонент-Реактив», Москва, Россия.

Кальция стеарат – хч, ЛДХим, Старая Купавна, Россия.

Коричный альдегид – 99,0%, Acros Organics, Геел, Бельгия.

Кросповидон – ISP Inc., Вейн, США.

Ментол – Carl Roth GmbH, Карлсруэ, Германия.

Метанол – для хроматографии, Merck KGaA, Дармштадт, Германия.

Мочевина – 99,6%, Carl Roth GmbH, Карлсруэ, Германия.

Муравьиная кислота – для хроматографии, DikmaPure, Пекин, Китай.

Никотиновая кислота – 99,5%, Honeywell, Моррис Плейнс, США.

Облепиховое масло – Wulumuqi Huajinshan Shipin Co. Ltd., Урумчи, Китай.

Раствор пенициллин/стрептомицин – Р/S, 1X, Gibco, Уолтем, США.

Раствор трипсина с этилендиаминтетраацетатом (ЭДТА) – Trypsin-EDTA

(0.25%), 1X, Gibco, Уолтем, США.

Раствор соли Хэнкса – HBSS, 1X, Gibco, Уолтем, США.

Caxaposa – Südzucker AG, Мангейм, Германия.

Среда Дульбекко модифицированная по Иглу – DMEM/F-12 50/50 with L-glutamine & 15mM HEPES, 1X, Corning, Корнинг, США.

ССК-8 – Beijing Bio Dee Biotechnologies, Пекин, Китай.

Судан III – чда, АО «Вектон», Санкт-Петербург, Россия.

Циклогексан – 99,5%, Merck KGaA, Дармштадт, Германия.

Эмбриональная телячья сыворотка – FBS, 1X, Gibco, Уолтем, США.

Этанол денатурированный – 99,8%, Carl Roth GmbH, Карлсруэ, Германия.

## 7.2. Оборудование

Лиофильная сушилка Alpha 1–2 (Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH, Остероде-на-Гарце, Германия) – для супрамолекулярного синтеза ДКВ<sub>в</sub>.

Инвертированный оптический микроскоп Axiovert S 100 (Zeiss AG, Оберкохен, Германия), оборудованный камерой AxioCam MRc (Zeiss AG, Оберкохен, Германия) – для морфологического анализа, в том числе, фрактального.

Установка магнетронного распыления IB-3 (Eiko Engineering Co., Токио, Япония) – для пробоподготовки к СЭМ.

Сканирующий электронный микроскоп JSM-6380LA (JEOL Technics LTD, Акишима, Япония) – для морфологического анализа.

Лазерный анализатор Analysette 22 (Fritsch GmbH, Идар-Оберштайн, Германия) – для определения размера частиц.

Спектрофотометр Cary 100 (Varian, Пало Альто, США) – для качественного и количественного УФ-спектрофотометрического анализа, в том числе, при установлении растворимости седиментационным методом и при проведении теста «Растворимость».

ИК-Фурье спектрометр ФСМ-1201 (ООО «Инфраспек», Санкт-Петербург, Россия) – для качественного ИК-спектроскопического анализа.

Спектрометр ЯМР Varian VNMRS-400 (Agilent, Санта Клара, США) – для качественного ЯМР <sup>1</sup>Н спектроскопического анализа.

Масс-спектрометр LC-MS (Advion, Итака, США) – для качественного массспектрометрического анализа.

Хроматограф ACQUITY UPLC (Waters, Милфорд, США) – для качественного и количественного хромато-масс-спектрометрического анализа.

Масс-спектрометр Xevo TQD (Waters, Милфорд, США) – для детектирования в ходе хромато-масс-спектрометрического анализа.

Дифрактометр Xcalibur Eos (Agilent, Санта Клара, США) – для РСА.

Дифрактометр ARL X'TRA (Thermo Electron Corporation, Волтем, США) – для РПД в изотермических условиях и при нагревании.

Высокотемпературная камера HTK2000 (Anton Paar GmbH, Грац, Австрия) – для проведения нагревания при РПД.

Дискретный контроллер Eurotherm 2604 (Eurotherm Ltd., Уэртинг, Великобритания) с термопарой ВР5\20 – для контроля температуры в ходе РПД при нагревании.

Аналитические весы GH-202 (A&D COMPANY, Токио, Япония) – для взвешивания точной навески при проведении термического анализа.

Дифференциальный сканирующий калориметр DSC 204 F1 Phoenix (NETZSCH Group, Зельб, Германия) – для ДСК.

Термовесы TG 209 F1 Iris (NETZSCH Group, Зельб, Германия) – для ТГА.

Синхронный термический анализатор STA 409 PC Luxx (NETZSCH Group, Зельб, Германия) – для СТА-МС.

Масс-спектрометр QMS 403С Aëolos (NETZSCH Group, Зельб, Германия) – для масс-спектрометрического анализа в ходе СТА-МС.

Центрифуга Centrifuge 5413 (Eppedorf, Гамбург, Германия) – для пробоподготовки в ходе седиментационного анализа растворимости.

Шейкер Mixer 5432 (Eppedorf, Гамбург, Германия) – для пробоподготовки в ходе седиментационного анализа растворимости.

Хроматограф Waters 600 HPLC (Waters Corporation, Милфорд, США) – для количественного анализа в ходе определения проницаемости.

УФ-детектор Waters 2489 (Waters Corporation, Милфорд, США) – для регистрации хроматограммы в ходе количественного анализа при определении проницаемости.

Центрифуга Remi PRP Centrifuge (Remi Laboratory Instruments, Мумбаи, Индия) – для пробоподготовки в ходе эксперимента *ex vivo*.

Камера Горяева XB.К.25 (Qiujing, Чжуншань, Китай) – для расчета концентрации клеточных суспензий в ходе эксперимента *ex vivo*.

УФ-спектрофотометр SPARK (Tecan Group Ltd., Цюрих, Швейцария) – для проведения УФ-спектрофотометрического анализа в ходе оценки цитотоксичности.

Инвертированный оптический микроскоп CKX31 (Olympus, Токио, Япония) – для контроля конфлюентности монослоя клеток и проведения расчета концентрации клеточных суспензий в ходе эксперимента *ex vivo*.

Вольтметр MILLICELL-ERS (Millipore Corporation, Берлингтон, США) – для контроля конфлюентности монослоя клеток в ходе эксперимента *ex vivo*.

Тестер типа «бункер» GTL (Erweka GmbH, Ланген, Германия) – для оценки сыпучести.

Тестер SVM 121 (Erweka GmbH, Ланген, Германия) – для оценки насыпного объема.

Тестер типа качающаяся корзинка ZT 121 light (Erweka GmbH, Ланген, Германия) – для оценки распадаемости.

Тестер ТВН 100 (Erweka GmbH, Ланген, Германия) – для оценки прочности на раздавливание.

Тестер TAR 220 (Erweka GmbH, Ланген, Германия) – для оценки прочности на истирание.

Тестер типа лопастная мешалка DT 600 (Erweka GmbH, Ланген, Германия) – для проведения теста «Растворение».

## 7.3. Методы эксперимента *in silico*

## 7.3.1. Построение виртуальных наночастиц

Исходная 3D-модель ДКВ для проведения эксперимента *in silico* была выгружена из базы данных Cambridge Structural Database [76]. Графический редактор BIOVIA Discovery Studio Visualizer (версия 4.5, Dassault Systèmes BIOVIA, Сан-Диего, США) [81] использовали для регулирования количества молекул воды, участвующих в формировании кристаллической ячейки.

фазовых модификаций Построение моделей ДКВ осуществляли в виртуальном пространстве модуля Disordered System Builder, являющегося частью пакета программ Materials Science Suite (версия 2018-2, Schrödinger LLC, Нью-Йорк, США) [42]. Компьютерные симуляции осуществляли для объектов, включающих 32, 64, 128, 512 и 1024 кристаллические ячейки. Метод силового OPLS поля 2005 использовали для минимизации энергии полученных виртуальных структур [88; 155]. Все компьютерные расчеты проводили в трехкратной повторности. Результаты молекулярного моделирования визуализировали при помощи программы BIOVIA Discovery Studio Visualizer.

## 7.3.2. Расчет деформации наночастиц

Компьютерную симуляцию деформации наночастиц фазовых модификаций ДКВ осуществляли методом молекулярной динамики в виртуальном пространстве модуля Elastic Constants, также интегрированного в пакет программ Materials Science Suite. Компьютерный расчет включал стандартное восьмикратное моделирование процессов общего сжатия, общего растяжения, двухстороннего растяжения и деформации чистого сдвига. Учитывая направления векторов приложения силы при осуществлении деформации, всего были получены данные для 161 расчета на каждую исследованную модель наночастицы фазовой модификации ДКВ. Для минимизации энергии полученных виртуальных структур также использовали метод силового поля OPLS 2005. Снятие напряжения с деформированной структуры моделировали в течение 100 пс компьютерного времени при температуре 300 К. Результаты молекулярного моделирования визуализировали при помощи программы BIOVIA Discovery Studio Visualizer.

## 7.3.3. Моделирование ионизации молекул дигидрокверцетина

Исходная 3D-модель ДКВ для проведения эксперимента *in silico* была выгружена из базы данных ZINC [86]. Взаимосвязь между значением pH раствора и степенью ионизации молекул ДКВ рассчитывали в виртуальном пространстве программы Marvin View (версия 5.2.4, ChemAxon, Будапешт, Венгрия) [93]. Компьютерную симуляцию проводили в диапазоне значений pH от 0 до 14 с шагом 0,2 при температуре 298 К.

### 7.3.4. Поля молекулярных взаимодействий

Исходные структуры ДКВ для проведения эксперимента *in silico* были выгружены из базы данных ZINC и Cambridge Structural Database. Построение полей молекулярных взаимодействий по липофильному и гидрофильному типу осуществляли в виртуальном пространстве программы Maestro (версия 10.3, Schrodinger, Нью-Йорк, США) [38].

## 7.4. Методы морфологического анализа

# 7.4.1. Внешний вид

Анализируемый объект помещали на белую матовую поверхность и описывали в соответствии с ОФС.1.1.0006.15 «Фармацевтические субстанции» при дневном освещении [8].

#### 7.4.2. Микроскопия

Оптическая микроскопия. Использовали инвертированный микроскоп при увеличении в ×400 раз без применения покровного стекла и иммерсионной жидкости. Описание микроскопических объектов проводили в соответствии с ОФС.1.2.1.0009.15 «Оптическая микроскопия» [8].

Сканирующая электронная микроскопия. Анализируемые объекты закрепляли на фиксаторе образца при помощи двухсторонней клейкой ленты на углеродной основе и покрывали золотом в атмосфере аргона при давлении 0,1 торр. Толщина металлического слоя составляла, приблизительно, 20 нм, что позволяло пренебречь влиянием золотого напыления на морфологию анализируемых объектов.

СЭМ осуществляли при увеличении в ×250, ×2000 и ×10000 раз на сканирующем микроскопе, который работал при ускоряющем напряжении 20 кВ в режиме визуализации вторичных электронов (SEI-mode).

#### 7.4.3. Лазерная дифракции света

Небольшую аликвоту анализируемого объекта добавляли в воду до образования суспензии. Размер частиц определяли в диапазоне от 0,1 мкм до 1250 мкм. Математическую обработку полученных данных осуществляли при помощи программы Fritsch Analysette software (Fritsch GmbH, Идар-Оберштайн, Германия). Результаты были обработаны и представлены в соответствии с ОФС.1.2.1.0008.15 «Определение распределения частиц по размеру методом лазерной дифракции света» [8].

# 7.5. Методы физико-химического анализа

## 7.5.1. Спектрофотомерия в ультрафиолетовой области

Анализируемые объекты растворяли в этаноле денатурированном до концентрации 0,03 ммоль/л. В кювету сравнения помещали этанол. УФ/ВИДспектроскопию осуществляли со скоростью 100 нм/мин в диапазоне длин волн от 600 до 200 нм в соответствии с ОФС.1.2.1.1.0003.15 «Спектрофотометрия в УФ и видимой областях» [8].

## 7.5.2. Спектроскопия в инфракрасной области

Точную навеску анализируемых образцов (0,001 г) запрессовывали в таблетки с заранее высушенным калия бромидом. ИК-спектроскопию осуществляли в диапазоне частот от 350 см<sup>-1</sup> до 4000 см<sup>-1</sup> с шагом 1 см<sup>-1</sup> в соответствии с ОФС.1.2.1.1.0002.15 «Спектрометрия в инфракрасной области» [8]. В качестве образца сравнения использовали таблетки калия бромида без анализируемого вещества.

#### 7.5.3. Масс-спектрометрия

Анализируемые объекты растворяли в смеси метанола и воды (в соотношении 80:20 по объему), содержащем 0,1% муравьиной кислоты. Массспектрометрию осуществляли на масс-спектрометре, работающем в режиме регистрации анионов. Ионизацию проводили путем распыления в электрическом поле (ESI). Напряжение на капилляре и на конусе устанавливали на уровне 3 кВ и 30 В, соответственно. Температура газа-осушителя составляла 350 °C, а скорость потока – 700 л/ч. Температура источника – 150 °C. Данные регистрировали в диапазоне значений *m/z* от 10 до 700. Образцы анализировали в соответствии с ОФС.1.2.1.1.0008.15 «Масс-спектрометрия» [8].

## 7.5.4. Спектроскопия ядерного магнитного резонанса

Анализируемые объекты растворяли в ДМСО-*d*<sub>6</sub>. Спектроскопию ЯМР <sup>1</sup>Н осуществляли на спектрометре, работающем при частоте 399.82 МГц и при температуре 25 °C. Величину химического сдвига определяли по внешнему стандарту, в качестве которого использовали тетраметилсилан. Образцы анализировали в соответствии с ОФС.1.2.1.1.0007.15 «Спектроскопия ядерного магнитного резонанса» [8].

## 7.5.5. Хромато-масс-спектрометрия

Исследуемые объекты растворяли в водно-спиртовом растворе. Анализ осуществляли методом тандемной высокоэффективной жидкостной хромато-масс-спектрометрии (ВЭЖХ-МС/МС) на хроматографе с диодно-матричным детектором и тандемным квадрупольным масс-спектрометром. Разделение проводили на колонке ACQUITY UPLC BEH Phenyl 1,7мкм (2,1x100 мм) (Waters, Милфорд, США). Режим элюирования:

- 0-2 мин изократический. Состав элюента: 90% 0,1% водный раствор муравьиной кислоты, 10% 0,1% раствор муравьиной кислоты в смеси метанол:ацетонитрил (1:1, об.);
- 2-15 мин градиентный, при котором доля водного раствора муравьиной кислоты снижается до 25%;

 15-16 мин – изократический. Состав элюента: 25% - 0,1% водный раствор муравьиной кислоты, 75% - 0,1% раствор муравьиной кислоты в смеси метанол:ацетонитрил (1:1, об.).

Скорость потока составляла 0,2 мл/мин.

Масс-спектрометр работал в режиме отрицательной электроспрей ионизации. Напряжение на капилляре и на конусе устанавливали на уровне 3 кВ и 30 В, соответственно. Температура газа-осушителя составляла 350 °C, а скорость потока – 700 л/ч. Температура источника – 150 °C. Ввод пробы в масс-спектрометр проводили как после хроматографического разделения, так и непосредственно в ионизационную камеру.

Математическую обработку результатов хроматографии осуществляли в соответствии с ОФС.1.2.1.2.0001.15 «Хроматография» [8]. Эффективность хроматографической системы оценивали по числу теоретических тарелок (*N*):

$$N = 16 \cdot \left(\frac{t_R}{W}\right)^2 \tag{7.1}$$

где *t*<sub>*R*</sub> – время удерживания пика,

*W* – ширина пика у основания.

Также учитывали фактор асимметрии пика (*A<sub>s</sub>*), который рассчитывали по формуле:

$$A_s = \frac{W_{0,05}}{2f}$$
(7.2)

где f – расстояние между перпендикуляром, опущенным из вершины пика, и 5% восходящей стороной пика на от его высоты, 5%  $W_{0.05}$ ширина уровне пика на ОТ его высоты. Кром того, было оценено разрешение ( $R_s$ ) между пиками диастереомеров ДКВ по формуле:

$$R_s = \frac{2(t_{R_2} - t_{R_1})}{W_1 + W_2} \tag{7.3}$$

#### 7.5.6. Рентгеноструктурный анализ

Монокристалл ДКВ выращивали путем осаждения водой из спиртового раствора в присутствии мочевины, после чего маточный раствор выдерживали при температуре 4 °C в течение 1 месяца.

Рентгеноструктурный анализ осуществляли на дифрактометре в режиме  $\omega$ сканирования ( $\theta_{max} = 28,73^{\circ}$ ). В качестве источника излучения использовали молибденовый катод ( $\lambda = 0,71$  Å). Структуру расшифровывали прямым методом при помощи комплекса программ SHELXTL (версия 6.14, Brucker AXS, Мэдисон, США) [145]. Позиции и температурные параметры неводородных атомов уточняли в анизотропном приближении полноматричным методом наименьших квадратов. Атомы водорода гидроксильных функциональных групп локализовывали геометрически. Позиции остальных атомов водорода двух независимых молекул ДКВ выявляли из разностных синтезов и в дальнейшем уточняли с наложением ограничений по модели «всадника».

## 7.5.7. Рентгеновская порошковая дифрактометрия

*РПД*. Осуществляли на дифрактометре, оборудованном вертикальным широкоугольным гониометром и полупроводниковым детектором Пельтье. В качестве источника излучения использовали медный катод ( $\lambda = 1,54$  Å), работающий при силе тока 25 мА и под напряжением 45 кВ. Сбор данных осуществляли при 295 К в диапазоне  $2\theta$  от 5° до 50° с шагом 0,04° и временем накопления заряда 1 с. Образцы анализировали в соответствии с ОФС.1.2.1.1.0011.15 «Рентгеновская порошковая дифрактометрия» [8].

РПД при нагревании. Анализируемые объекты закрепляли на вольфрамовом бруске, используемом в качестве фиксатора образца и вакуумировали. Толщина слоя составляла, приблизительно, 50 мкм.

РПД при различных температурах осуществляли на дифрактометре, оборудованном высокотемпературной камерой. В качестве источника излучения использовали медный катод ( $\lambda = 1,54$  Å), работающий при силе тока 40 мА и под напряжением 45 кВ. Дифрактограммы записывали при 295 К в диапазоне  $2\theta$  от 10° до 35° с шагом 0,05° и временем накопления заряда 4 с. Систему нагревали со

скоростью 300 К/мин. Температуру мониторировали при помощи дискретного контроллера с термопарой. Данные РПД регистрировали при температуре 25 °C, 130 °C и 170 °C.

### 7.5.8. Термические методы анализа

Анализируемые объекты взвешивали на аналитических весах с точностью до 0,01 мг и помещали в стандартные алюминиевые кюветы (для ДСК) или кюветы из оксида алюминия (для ТГА и СТА-МС), закупоренные крышкой с отверстием. Объём кюветы составлял 56 мм<sup>3</sup>, диаметр – 6 мм, площадь дна и отверстия соотносились на уровне 40:1.

ДСК. ДСК осуществляли на приборе, оборудованном термопарой Е-типа. Предварительную калибровку системы проводили по точно установленным фазовым переходам веществ (циклогексан, ртуть, галий, бензойная кислота, нитрат калия, индий, олово, висмут, свинец, цинк, хлорид цезия) с чистотой более 99,999% в соответствии с международными стандартами ASTM E967 и ASTM E2253 [46; 49]. Средняя ошибка калибровки составила 5% по теплоте и 0,2 К по температуре. В качестве объекта сравнения использовали пустую алюминиевую кювету. Систему нагревали в токе осушенного азота, подаваемого со скоростью 40 мл/мин, в диапазоне от 25 °C до 300 °C со скоростью 10 К/мин. Полученные экспериментальные данные подвергали математической обработке в программе NETZSCH Proteus Thermal Analysis (NETZSCH Group, Зельб, Германия). Результаты представляли в соответствии с ОФС.1.2.1.0027.18 «Термический анализ» [8].

*ТГА*. ТГА осуществляли на термовесах. Предварительную калибровку системы проводили по точно установленным фазовым переходам веществ (индий, олово, висмут, цинк, алюминий, серебро, золото) с чистотой более 99,999% в соответствии с международными стандартами ASTM E968 и ASTM E1582 [47; 48]. Средняя ошибка калибровки составляла 0,2% по теплоте и 0,3 К по температуре. В качестве объекта сравнения использовали пустую кювету из оксида алюминия. Систему нагревали в диапазоне от 25 °C до 300 °C со скоростью 10 К/мин в токе осушенного азота, подаваемого со скоростью

70 мл/мин. Полученные экспериментальные данные подвергали математической обработке в программе NETZSCH Proteus Thermal Analysis (NETZSCH Group, Зельб, Германия). Результаты представляли в соответствии с ОФС.1.2.1.0027.18 «Термический анализ» [8].

*СТА МС*. СТА МС осуществляли на приборе, оборудованном квадрупольным масс-спектрометром. Предварительную калибровку и нагрев системы проводили в условиях, описанных для ТГА. Сигналы в масс-спектре регистрировали по следующим величинам *m/z*: 14, 15, 16, 17, 28, 29, 42, 43, 44. Полученные экспериментальные данные подвергали математической обработке в программе NETZSCH Proteus Thermal Analysis (NETZSCH Group, Зельб, Германия).

#### 7.5.9. Растворимость

*Растворимость по ГФ*. Растворимость определяли в соответствии с ОФС.1.2.1.0005.15 «Растворимость» [8].

Седиментационный метод. Для осуществления количественной оценки растворимости ДКВ седиментационным методом строили градуировочный график. Для этого точную навеску ГСО ДКВ (20 мг) растворяли в 10 мл этанола денатурированного, после чего из полученного раствора отбирали аликвотную долю объемом 0,025, 0,050, 0,075, 0,100 и 0,125 мкл и доводили водой очищенной до 10,0 мл. Полученные растворы подвергали спектрофотометрическому анализу на приборе, работающем в диапазоне длин волн от 200 до 400 нм со скоростью 100 нм/мин. На основании полученных данных был построен график зависимости оптической плотности раствора при длине волны 290 нм от концентрации ДКВ.

Точную навеску анализируемого объекта (40 мг) помещали в 10 мл воды очищенной и интенсивно встряхивали руками в течение 5 мин, после чего суспензию равномерно распределяли по 5 пробиркам Эппендорфа объемом 2,0 мл. Одну из пробирок использовали в качестве нулевой точки. Оставшиеся 4 пробирки подвергали интенсивному перемешиванию на шейкере, работающем в режиме встряхивания со скоростью 1450 об/мин в течение 1, 2, 4 и 6 ч. Все пробирки центрифугировали со скоростью 15000 об/мин в течение 5 мин. Из надосадочной жидкости отбирали аликвоту 0,05 мл и растворяли в 9,95 мл воды очищенной. Полученный раствор подвергали спектрофотометрическому количественному анализу по градировочному графику.

Эксперимент проводили в трехкратной повторности. Полученные данные подвергали статистической обработке. Было рассчитано среднее значение для каждой величины и стандартное отклонение.

## 7.5.10. Определение сорбционных свойств

Поглощение иода. Кристаллический иод массой 5 г помещали на дно стакана химического термостойкого объемом 1 л. Перфорированную фарфоровую вставку использовали в качестве штатива для микропробирок объемом 1,5 мл, содержащих по 10 мг анализируемого объекта. Систему изолировали и нагревали при температуре 50 °C в течение 1 ч. Перед извлечением микропробирки закрывали и подвергали макроскопическому анализу. Часть образца микроскопировали на инвертированном микроскопе, при увеличении в ×400 раз.

Поглощение Судана III. Для построения калибровочного графика точную навеску красителя (1,7 мг) растворяли в 100 мл циклогексана (раствор 1). Готовили серию растворов с концентрациями 0,0500, 0,0333, 0,0250, 0,0125, 0,0063 и 0,0016 ммоль/л. Растворы подвергли спектрофотометрическому анализу на приборе, работающем в диапазоне длин волн от 400 до 600 нм со скоростью 100 нм/мин. На основании полученных данных был построен график зависимости оптической плотности раствора в максимуме поглощения при длине волны 505 нм от концентрации Судана III.

Сорбционную способность фазовых модификаций оценивали методом Киплинга [97]. В микропробирки вместимостью 1,5 мл помещали различное количество анализируемых объектов (точные навески): 10 мг, 20 мг, 50 мг, 100 мг. Добавляли 1,5 мл раствора Судана III в циклогексане (раствор 1) и интенсивно перемешивали в течение 24 ч на шейкере, работающем в режиме встряхивания со скоростью 1450 об/мин. Затем жидкая и твердая фазы полученной суспензии были разделены центрифугированием со скоростью 15000 об/мин в течение 15 мин. Надосадочную жидкость подвергли количественному спектрофотометрическому анализу по градуировочному графику. Эксперимент осуществляли в трехкратной повторности.

Полученные данные использовали для построения изотермы Ленгмюра в координатах зависимости 1/A от 1/c, где A – величина сорбции красителя на ДКВ (мг/мг), а c – равновесная концентрация Судана III (мг/л). На основании угла наклона графика ( $\alpha$ ) рассчитывали сорбционную способность ( $A_{\infty}$ ) анализируемого объекта по формуле:

$$A_{\infty} = 1/tg(\alpha). \tag{7.4}$$

Константу Ленгмюра (К<sub>L</sub>) находили по формуле:

$$K_L = 1/(h A_\infty), \tag{7.5}$$

где h – значение l/A в точке пересечения линии зависимости с осью ординат.

## 7.6. Методы фрактального анализа

## 7.6.1. Синтез объектов исследования

Для приготовления маточного раствора 1 г ДКВ<sub>фс</sub> смешивали с эквимолярным количеством коформера, в качестве которого выступали бензальдегид, ванилин, коричный альдегид, мочевина и никотиновая кислота. Полученную смесь растворяли в 50 мл этанола денатурированного, добавляли 950 мл воды очищенной. Раствор подвергали немедленной глубокой заморозке путем выдерживания маточного раствора в сухом льду при температуре -78 °C в течение 24 ч. Колбу с замороженным образцом подсоединяли к лиофильной сушилке, работающей в режиме разряженной атмосферы (0,35 атм) и пониженной температуры (-55 °C) на протяжении 36 ч.

## 7.6.2. Оптическая микроскопия

Оптическую микроскопию осуществляли на инвертированном микроскопе при увеличении в ×100 раз, ×400 раз и ×1000 раз без применения покровного стекла и иммерсионной жидкости. Всего для каждого анализируемого объекта получали по 5 микрофотографий.

## 7.6.3. Расчет фрактальной размерности

Полученные микрофотографии монохроматизировали. Участки для фрактального анализа выбирали вручную по показателям осветлённости изображения и его разрешения.

Фрактальную размерность рассчитывали независимо в виртуальном пространстве двух программ: FDim (Harvard Medical School, Гарвард, США) и Gwyddion (Czech Metrology Institute, Брно, Чехия).

Компьютерной обработке на каждой микрофотографии подвергали по две области, максимальный размер которых ограничивался рабочим полем программы (950 пикселей на 1900 пикселей). При выборе минимального размера соблюдали условие, чтобы число пикселей в анализируемой области в два раза превышало число черных пикселей.

# 7.7. Методы биофармацевтического анализа

#### 7.7.1. Методика количественного определения дигидрокверцетина

Для построения калибровочного графика точную навеску ГСО ДКВ (1,0 мг) растворяли в 10,0 мл воды очищенной. Готовили серию из 6 растворов с концентрациями от 0,00001 до 0,50000 мг/мл.

Анализируемые растворы в количестве 0,02 мл вводили в хроматограф через автосамплер. Разделение проводили на колонке Phenomenex Luna C-18 5 мкм (2,1×250 мм) (Danaher Corporation, Вашингтон, США). В качестве подвижной фазы использовали смесь, содержащую 30% ацетонитрила и 70% 2%-го водного раствора муравьиной кислоты. Элюирование осуществляли в изократическом режиме, скорость потока составляла 1,0 мл/мин. Детектировали спектрофотометрическим методом при длине волны 290 нм.

На основании полученных данных был построен график зависимости площади пика под хроматографической кривой от концентрации ДКВ.

136

# 7.7.2. Условия культивирования клеток

B эксперименте клетки линии MDCK (p=25-28),использовали предоставленные Cell Culture Center of Chinese Academy of Medical Sciences (Пекин, Китай). Клетки культивировали в среде Дульбекко, модифицированной по Иглу, с добавлением эмбриональной телячьей сыворотки и раствора пенициллин/стрептомицин в соотношении 89:10:1. Культуру клеток накапливали во флаконах объемом 50 мл в инкубаторе при температуре 37 °C в атмосфере с 5% углекислого газа и относительной содержанием влажности 95%. Культуральную среду обновляли каждые 48 ч.

## 7.7.3. Оценка цитотоксичности

Для расчёта концентрации клеток во флакон, используемый для культивирования, добавляли 3,0 мл раствора трипсина с ЭДТА, который заранее подогревали до 37 °C, и выдерживали в течение 10 мин. Ферментативную реакцию останавливали, добавляя 6,0 мл среды Дульбекко, модифицированной по Иглу, с последующей промывкой внутренней поверхности флакона этой же клеточной суспензией. Полученную клеточную суспензию центрифугировали со скоростью 1000 об/мин в течение 5 мин. Надосадочную жидкость удаляли, а осадок разводили путем добавления 1,0 мл среды Дульбекко, модифицированной по Иглу. Контроль концентрации суспензии проводили путем подсчета клеток в камере Горяева, используя инвертированный оптический микроскоп при увеличении в ×300 раз. Расчет концентрации клеток (*C*) осуществляли по формуле:

$$C = (N/4) \bullet V \bullet 10^4, \tag{7.6}$$

где *N* – число клеток, обнаруженных в счетном поле камеры Горяева,

*V*-разведение раствора.

Концентрацию клеток доводили до 4•10<sup>4</sup> клеток/мл, путем добавления культуральной среды, и суспензию равномерно распределяли между 54 лунками в центре планшета, имеющего 96 лунок.

После 36 часов инкубирования, культуральную среду удаляли. В первый ряд лунок с клетками добавляли свежий раствор культуральной среды (контроль

+), в последний ряд – раствор ДМСО (контроль -). В оставшиеся семь рядов по 6 лунок приливали растворы или суспензии различных форм ДКВ в культуральной среде с концентрациями 2,00 мг/мл, 1,00 мг/мл, 0,50 мг/мл, 0,25 мг/мл, 0,13 мг/мл, 0,06 мг/мл, 0,03 мг/мл и 0,02 мг/мл. Смеси инкубировали при температуре 37 °C в атмосфере с содержанием 5% углекислого газа и относительной влажности 95% в течение 2 ч. По истечении указанного срока среды удаляли и добавляли ССК-8, клетки инкубировали при аналогичных условиях еще 2 ч.

Полученные растворы анализировали на спектрофотометре при длине волны 450 нм. Значения оптической плотности использовали для расчета выживаемости клеток (V) по формуле:

$$V = (A_n - A_0) / (A_{100} - A_0) \bullet 100, \tag{7.7}$$

где  $A_n$  – средняя оптическая плотность раствора ССК-8 после инкубирования клеток с раствором фазовой модификации ДКВ при определенной концентрации,

*A*<sub>0</sub> – средняя оптическая плотность раствора ССК-8 после инкубирования клеток с раствором ДМСО,

*А*<sub>100</sub> – средняя оптическая плотность раствора ССК-8 после инкубирования клеток с чистой средой Дульбекко, модифицированной по Иглу.

Рассчитывали среднее значение для каждой величины выживаемости и стандартное отклонение.

## 7.7.4. Оценка проницаемости

Для установления различий в проницаемости между полиморфными формами ДКВ использовали метод бесконеченой проницаемости (infinity permeability), характеристикой которого является кажущаяся проницаемость. Во флакон, используемый для культивирования, добавляли 3,0 мл заранее подогретого до 37 °C раствора трипсина с ЭДТА и выдерживали в течение 10 мин. Ферментативную реакцию останавливали путем добавления 6,0 мл среды Дульбекко, модифицированной по Иглу, с последующей промывкой внутренней поверхности флакона этой же клеточной суспензией. Полученную клеточную суспензию центрифугировали со скоростью 1000 об/мин в течение 5 мин. Надосадочную жидкость удаляли, а осадок разводили путем добавления 1,0 мл среды Дульбекко, модифицированной по Иглу. Контроль концентрации суспензии проводили путем подсчета клеток в камере Горяева, используя инвертированный оптический микроскоп при увеличении в х300 раз. Расчет концентрации клеток (C) осуществляли по формуле (7.6). Концентрацию клеток доводили до 2•10<sup>6</sup> клеток/мл, путем добавления культуральной среды, и суспензию равномерно распределяли между 12 лунками планшета по 0,5 мл в каждую. Клетки помещали на полупрозрачные мембраны площадью 4,7 см<sup>2</sup>. Во внутреннюю часть лунок заливали по 1,5 мл культуральной среды.

Культуральную среду обновляли каждые 2 дня до достижения клетками конфлюентности. Формирование монослоя контролировали путем измерения трансэпителиального электрического сопротивления на вольтметре и микроскопически на инвертированном оптическом микроскопе.

После выхода значения трансэпителиального электрического сопротивления на плато культуральную среду удаляли, а лунки планшета трижды промывали раствором соли Хэнкса, температуру которого поддерживали на уровне 37 °C. Затем в каждую из 4 лунок ряда планшета добавляли суспензию одной из фазовых модификаций ДКВ в культуральной среде по 0,5 мл (донорный раствор). Во внутреннюю часть лунки помещали 1,5 мл раствора соли Хэнкса, который выполнял роль принимающего раствора. По истечении 15 мин, 30 мин, 60 мин, 90 мин и 120 мин из принимающего раствора каждой лунки отбирали аликвоту объемом 0,2 мл с последующим замещением эквивалентным объемом чистого раствора соли Хэнкса. По окончании сбора аликвотных долей значения трансэпителиального электрического сопротивления измеряли повторно.

В аликвоты добавляли 0,2 мл ацетонитрила, смесь интенсивно перемешивали в течение 3 мин, полученную суспензию центрифугировали в течение 5 мин со скоростью 12500 об/мин. От надосадочной жидкости отбирали аликвоту объемом 0,250 мл и анализировали методом ВЭЖХ, в условиях, описанных выше.

На основании полученных результатов анализа строили графики зависимости концентрации фазовых модификаций ДКВ в принимающем растворе

139

от времени культивирования с клетками MDCK. Эти графические данные использовали для расчета кажущейся проницаемости (*P*<sub>*app*</sub>) по формуле:

$$P_{app} = \frac{\frac{dc}{dT} \times V}{A \times C},\tag{7.8}$$

где dC/dT – изменение концентрации ДКВ в принимающей ячейке во времени,

*V*-объем принимающего раствора,

А – площадь полупроницаемой мембраны,

С – исходная концентрация ДКВ в культуральной среде.

Для каждой исследуемой фазовой модификации рассчитывали среднее значение кажущейся проницаемости и стандартное отклонение.

#### 7.8. Методы фармацевтико-технологического анализа

### 7.8.1. Сыпучесть и прессуемость

Скорость Определение протекания порошков через отверстие. соответствии с ОФС.1.4.2.0016.15 «Степень осуществляли В сыпучести порошков» [8]. Анализ проводили при помощи тестера типа «бункер» с насадками 1, 2 и 3, характеризующимися диаметром выходного отверстия 10 мм, 15мм и 25 мм, соответственно. Точную навеску (100 г) анализируемого образца помещали в закрытый бункер, после чего открывали отверстие и замеряли время, за которое высыпается порошок. При необходимости размер отверстия регулировали при помощи насадок. Испытание проводили в трехкратной повторности.

Угол естественного откоса. Угол естественного откоса определяли в соответствии с ОФС.1.4.2.0016.15 «Степень сыпучести порошков» [8]. Анализ проводили при помощи тестера типа «бункер» с насадками 1, 2 и 3, характеризующимися диаметром выходного отверстия 10 мм, 15мм и 25 мм, соответственно. В качестве основания использовали бумажную подложку. Углы у основания конуса в трех плоскостях переносили на бумажный носитель при помощи тени от направленного света и затем измеряли транспортиром. Испытание проводили в трехкратной повторности.

Насыпной объем. Определение насыпного объема определяли в соответствии с ОФС.1.4.2.0016.15 «Степень сыпучести порошков» [8]. Анализ проводили при помощи тестера, снабженного мерным цилиндром объемом 250 мл, в который помещали заранее взвешенный (m) анализируемый образец в количестве 100 мл ( $V_0$ ). После 10, 500 и 1250 соскоков фиксировали изменение объема образца -  $V_{10}$ ,  $V_{500}$ ,  $V_{1250}$ , соответственно. Испытание проводили в трехкратной повторности. На основании полученных данных рассчитывали коэффициент прессуемости ( $K_n$ ) по формуле:

$$K_n = 100 \bullet (V_0 - V_{1250}) / V_0. \tag{7.9}$$

Кроме того, данные по насыпной плотности использовали при расчете индекса Hausner (H) и индекса Carr (C):

$$H = (V_{1250} / m) / (V_0 / m), \tag{7.10}$$

$$C = 100 \bullet (1 - (V_0 / m) / (V_{1250} / m)).$$
(7.11)

### 7.8.2. Прочность на раздавливание

Прочность таблеток на раздавливание определяли в соответствии с ОФС.1.4.2.0011.15 «Прочность таблеток на раздавливание» [8]. Испытание проводили на 10 таблетках, изготовленных на основе определенной фазовой модификации ДКВ.

## 7.8.3. Прочность на истирание

Прочность таблеток на истирание определяли в соответствии с ОФС.1.4.2.0004.15 «Истираемость таблеток» [8]. Испытание проводили на 10 заранее взвешенных таблетках, изготовленных на основе определенной фазовой модификации ДКВ, в течение 5 мин, массу таблеток измеряли повторно (с точностью до 0,0001 г).

#### 7.8.4. Распадаемость

Распадаемость таблеток определяли в соответствии с ОФС.1.4.2.0013.15 «Распадаемость таблеток и капсул» [8]. Анализ проводили при помощи тестера типа качающаяся корзинка в среде воды очищенной. Объем жидкости – 1 л, температуру поддерживали на уровне (37 ± 2) °С. Испытанию подвергали по 6 таблеток, изготовленных на основе определенной фазовой модификации ДКВ. Каждую таблетку помещали в трубку качающейся корзинки и анализировали в течение 45 мин.

## 7.8.5. Тест «Растворение»

Точную навеску ГСО ДКВ (20 мг) растворяли в 10 мл этанола денатурированного, из полученного раствора отбирали аликвотные доли объемом 0,025, 0,050, 0,075, 0,100 и 0,125 мкл и доводили фосфатным буфером (pH = 6,8) до 10,0 мл. Полученные растворы подвергали спектрофотометрическому анализу на приборе, работающем в диапазоне длин волн от 200 до 400 нм со скоростью сканирования 100 нм/мин. Строили график зависимости оптической плотности раствора при длине волны 324 нм от концентрации ДКВ.

Тест «Растворение» осуществляли в соответствии с ОФС.1.4.2.0014.15 «Растворение для твердых дозированных лекарственных форм» [8]. Анализ проводили при помощи тестера типа лопастная мешалка в среде фосфатного буфера. Объем жидкости – 0,5 л, температуру поддерживали на уровне  $37 \pm 0.5$  °C. Скорость вращения лопастей – 50 об/мин. Испытание проводили на 6 таблетках, изготовленных на основе определенной фазовой модификации ДКВ, в течение 45 мин. Аликвотные доли объемом 5 мл для количественного анализа высвободившегося ДКВ отбирали через 5, 10, 20, 30 и 45 мин с последующим объемом эквивалентным фосфатного буфера. замешением Определяли оптическую плотность полученных растворов в максимуме поглощения при ллине волны 324 нм.

Сопоставительный анализ профилей высвобождения действующего вещества из таблеток осуществляли по коэффициентам различия  $(f_1)$  и подобия  $(f_2)$ , рекомендованным нормативной документацией [32], которые рассчитывали по формулам:

$$f_1 = \frac{\sum_{j=1}^n |R_j - T_j|}{\sum_{j=1}^n R_j},$$
(7.12)

где *n* – число точек отбора пробы,

 $R_j$  и  $T_j$  – доля высвободившегося действующего вещества из референтного и испытуемого препарата, соответственно, в момент времени *j*.

$$f_2 = 50 \times \log_{10} \{ \left[ 1 + \left(\frac{1}{n}\right) \sum_{j=1}^n \left| R_j - T_j \right|^2 \right]^{-0.5} \times 100 \},$$
(7.12)

где *n* – число точек отбора пробы,

*R<sub>j</sub>* и *T<sub>j</sub>* – доля высвободившегося действующего вещества из референтного и испытуемого препарата в момент времени *j*, соответственно.

Кроме того, для описания кинетики высвобождения ДКВ из таблеток использовали константу скорости высвобождения действующего вещества ( $K_{высв}$ ) и период полураспада таблетки ( $t_{50\%}$ ) [5], которые рассчитывали по формулам:

$$K_{\rm BLICB} = \frac{2.303}{t} \times \lg(\frac{C_0}{C_0 - C_t}),\tag{7.13}$$

где С<sub>0</sub> – исходное содержание действующего вещества в таблетке,

*С*<sub>*t*</sub> –содержание действующего вещества в таблетке в момент *t*;

$$t_{50\%} = \frac{0.693}{K_{\text{BLICE}}}.$$
(7.14)

## 7.9. Методы фармакологического анализа

## 7.9.1. Условия содержания животных

Исследование проводили на 48 крысах-самцах линии Sprague Dawley возрастом 3 мес и со средним весом 270 г, предоставленных виварием Institute of Medical Plant Development (г. Пекин, Китай). Крыс содержали при температуре 23 ± 2 °C и при относительной влажности 50 – 60% отдельно от других животных в клетках по 5 особей со свободным доступом к еде и воде. В лаборатории поддерживали 12-часовой режим сменяемости дневного и ночного освещения. Вновь прибывших животных выдерживали на карантине в течение 7 дней. Данные условия соответствуют требованиям ГОСТ №33215-2014 от 09 ноября 2015 г. «Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила оборудования помещений и организации процедур» [6] и ГОСТ №33216-2014 от 09 ноября 2015 г. «Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила содержания и ухода за лабораторными грызунами и кроликами» [7].

#### 7.9.2. Моделирование ожога IIIА степени

Модель ожога ША степени формировали при стандартизованных условиях. На выбритую спину крысы, введенной в глубокий наркоз хлоралгидратом внутрибрюшинно в дозировке 430 мг/кг и разведении 100 мг/мл, помещали предварительно разогретую до  $105 \pm 5$  °C металлическую пластинку массой 200 г с диаметром площади соприкосновения 8 см<sup>2</sup> и выдерживали в течение 20 с.

### 7.9.3. Методы лечения

Всех экспериментальных животных разделили на четыре равные группы по 12 особей в каждой в зависимости от метода лечения:

- Группа I. Отрицательный контроль лечение отсутствовало.
- Группа II. Лечение осуществляли нанесением на рану 1 мл суспензии ДКВ<sub>фс</sub>
   с концентрацией 50 мг/мл.
- Группа III. Лечение осуществляли нанесением на рану 1 мл суспензии ДКВ<sub>т</sub>
   с концентрацией 50 мг/мл.
- Группа IV. Положительный контроль лечение осуществляли нанесением на рану 1 мл облепихового масла.

Лечение проводили ежедневно через 24 ч после нанесения ожогов. Размеры групп рассчитывали по формуле:

$$N = (\sigma^2 \cdot (Z_\alpha - Z_\beta)^2) / \delta^2, \qquad (7.15)$$

где  $Z_{\alpha}$  и  $Z_{\beta}$  – критические значения нормального распределения, соответствующие заданным уровням ошибок I и II рода (для мощности теста в 80% и уровня достоверности 0,05 эти значения равны 1,96 и 0,84, соответственно),

σ и δ – разница измеряемых величин и стандартное отклонение,
 соответственно, основанные на результатах оценки фармакологической
 эффективности ранозаживляющей мази на базе дигидрокверцетина [36].

## 7.9.4. Определение размеров ожога

Контактный метод Поповой. На 1, 3, 5, 8, 11, 14, 17, 20 и 24 дни после формирования ожога на поверхность раны зафиксированной крысы накладывали прозрачную пленку, и ее края отмечали маркером. Площадь ожога высчитывали путем наложения пленки на масштабно-координатную чертёжную бумагу [21].
Бесконтактный метод. На 1, 3, 5, 8, 11, 14, 17, 20 и 24 дни после формирования ожога осуществляли фотографирование раны таким образом, чтобы в кадр попадала линейка, выступающая в качестве внутреннего стандарта длины. Фотоаппарат устанавливали на расстоянии 33,0-35,0 см от поврежденной поверхности. Полученное изображение анализировали при помощи программы GNU Image Manipulation Program (версия 2.10.18, GNOME Foundation, Пало Альто, США), в которой размер раневой поверхности (в пикселях) сравнивали со стандартом длины (в пикселях) и на основе полученных данных находили текущую площадь ожога [21].

В обоих случаях уровень ранозаживления (*W*) рассчитывали по формуле:

$$W = ((S_0 - S_t) / S_0) \bullet 100\%, \tag{7.16}$$

где *S*<sub>0</sub> – площадь раны в день 1,

 $S_t$  – площадь раны в день t.

## 7.9.5. Прочие физиологические тесты

На 1, 3, 5, 8, 11, 14, 17, 20 и 24 дни после формирования ожога у крыс измеряли вес и температуру.

### 7.10. Статистическая обработка данных

Статистическую обработку экспериментальных данных, построение графиков, калибровочных выведение уравнений зависимости И расчет коэффициентов корреляции осуществляли в программе LibreOffice Calc (версия Document Foundation, Берлин, Германия) в 6.2, The соответствии с ОФС.1.1.0013.15 «Статистическая обработка результатов эксперимента» [8].

Размер выборок варьировал в зависимости от используемого метода исследования. Физико-химический анализ и фармацевтико-технологические испытания проводили в трехкратной повторности. Исследование цитотоксичности осуществляли на выборке из 6 лунок, а проницаемости – из 4. При разработке метода фрактального анализа каждый объект подвергали

компьютерной обработке в шестикратной повторности. В эксперименте *in vivo* каждая группа лечения включала по 12 особей крыс.

Среднее выборки ( $\overline{x}$ ) рассчитывали по формуле:

$$\overline{x} = \frac{\sum_{i=1}^{n} x_i}{n},\tag{7.17}$$

где *x*<sub>*i*</sub> – результат однократного измерения,

*n* – размер выборки.

Стандартное отклонение определяли по формуле:

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{n} x_i - n \times \overline{x}}{n-1}}.$$
(7.18)

Граничные значения доверительного интервала в эксперименте *in vivo* определяли по критерию Стьюдента (t(P,f)) при уровне значимости p = 0,05:

$$(\overline{x} \pm \Delta \overline{x}) = \overline{x} \pm \frac{t(p, f) \times s}{\sqrt{n}}.$$
(7.19)

Отсутствие статистически значимой разницы между фрактальными размерностями, рассчитанными при помощи программ FDim и Gwyddion, подтвердили посредством *U*-критерия Манн-Уитни [117; 132]. Данный непараметрический статистический тест основан на суммировании рангов значений двух анализируемых выборок и базируется на использовании формулы:

$$U = n_1 n_2 + \frac{n_x (n_x + 1)}{2} - T_x , \qquad (7.20)$$

где  $n_1$  и  $n_2$  – размеры выборок 1 и 2, соответственно,

*n*<sub>x</sub> – размер более высокоранговой выборки,

*T<sub>x</sub>* – сумма рангов более высокоранговой выборки.

Оценку проводили для уровня значимости p = 0.05.

Предсказательные возможности метода оценивали при помощи поэлементной кросс-валидации [133]. Суть метода заключается В последовательном удалении данных, полученных от одного из анализируемых объектов, из общей выборки, что приводило к изменению математической зависимости между растворимостью и фрактальной размерностью. В дальнейшем проводили расчет фрактальной размерности по новым уравнениям зависимости логарифма растворимости от фрактальной размерности, что позволяло найти величину относительной ошибки при сравнении рассчитанной величины с результатами обработки микрофотографий при помощи программы FDim.

Валидацию разработанного метода фрактального анализа осуществляли в соответствии с ОФС.1.1.0012.15 «Валидация аналитических методик» [8] по следующим характеристикам: специфичность, предел обнаружения, правильность, сходимость и устойчивость.

Специфичность подтверждали путем анализа модельных смесей известного состава, выступавших в качестве анализируемых объектов.

Предел обнаружения (ПО) рассчитывали по формуле:

$$\Pi O = 3,3 \cdot S/b,\tag{7.21}$$

где *S* – свободный член уравнения линейного калибровочного графика, *b* – тангенс угла наклона калибровочной кривой.

Правильность оценивали путем рассмотрения результатов линейности валидируемой методики.

Сходимость и внутрилабораторную прецизионность результатов измерения фрактальной размерности оценивали в рамках работы одной лаборатории в течение 3 месяцев с применением различных оптических микроскопов и программного обеспечения.

Устойчивость валидируемой методики оценивали при изменении следующих условий проведения анализа:

- степень увеличения в ходе микроскопического анализа;
- изменение размера области, подверженной компьютерной обработке;
- смещение области, подверженной компьютерной обработке.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

### Общие выводы.

1. Описана успешная мировая практика улучшения физико-химических и биофармацевтических параметров флавоноидов посредством оптимизации их фазового состояния.

2. Сформулированы следующие принципы направленного синтеза фазовых модификаций ДКВ:

– наличие кислотных и основных центров в структуре ДКВ способствует образованию межмолекулярных синтонов;

 – участие молекул воды при формировании твердой фазы ДКВ приводит к увеличению степени его кристалличности и пористости;

 изменение условий синтеза твердой фазы ДКВ (температура, давление, степень ионизации молекул) способствует получению новых фазовых модификаций.

3. Синтезированы новые фазовые модификации ДКВ: микротрубчатая, микросфероидная и микроволокнистая.

4. Разработан системный подход к анализу фазовых модификаций ДКВ, сочетающий рентгенографические, термические, спектральные и микроскопические методы анализа:

 подтверждено отсутствие образования новых ковалентных связей в молекуле ДКВ в составе фазовых модификаций;

 выявлено, что ДКВ<sub>с</sub> и ДКВ<sub>в</sub> представляют различные аморфные формы, а ДКВ<sub>фс</sub> и ДКВ<sub>т</sub> – кристаллические;

– установлено, что ДКВ<sub>т</sub> является псевдополиморфной модификацией ДКВ<sub>фс</sub>.

 – обнаружена взаимосвязь между морфологией лиофилизатов ДКВ и их физико-химическими свойствами, которая послужила основой для разработки и валидации аналитической методики фрактального анализа на базе интеллектуальных технологий. 5. Установлено, что новые формы ДКВ характеризуются улучшенной растворимостью и модифицированной проницаемостью и относятся к I классу БКС.

6. Установлено влияние фазового состояния на показатели качества таблеток для рассасывания и таблетируемых масс на базе ДКВ. Таблетки на основе ДКВ<sub>с</sub> характеризуется улучшенными прочностными характеристиками и пролонгированным профилем высвобождения действующего вещества в сравнении с ДКВ<sub>фс</sub>.

7. Выявлено наличие корреляционных связей между улучшением биофармацевтических показателей фазовой модификации ДКВ и повышением ранозаживляющего эффекта ДКВ<sub>т</sub> в сравнении с ДКВ<sub>фс</sub>. По показателю средней скорости заживления раны новая модификация ДКВ значимо превосходила препарат сравнения на 11,6%.

Практические рекомендации. Полученные результаты могут быть использованы в разработке фитопрепаратов с улучшенными биофармацевтическими и фармакологическими параметрами и для создания нормативной документации в сфере контроля качества фармацевтических субстанций.

Перспективы дальнейшей разработки темы. В качестве актуального направления развития данной работы можно рассматривать проведение доклинических и клинических испытаний с целью трансляции результатов фундаментальных исследований в реальную клиническую практику.

# СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

БКС	биофармацевтическая классификация соединений		
ВРД	высшая разовая доза		
ВУ	время удерживания		
ВЭЖХ	высокоэффективная жидкостная хроматография		
ГСО	государственный стандартный образец		
ΓΦ ΡΦ ΧΙν	Государственная фармакопея Российской Федерации		
	XIV издания		
ДКВ	дигидрокверцетин		
ДКВ <sub>в</sub>	микроволокнистая форма дигидрокверцетина		
ДКВ <sub>с</sub>	микросфероидная форма дигидрокверцетина		
ДКВ <sub>т</sub>	микротрубчатая форма дигидрокверцетина		
ДК $\mathbf{B}_{\mathbf{\varphi}\mathbf{c}}$	фармацевтическая субстанция дигидрокверцетина		
ДМСО	диметилсульфоксид		
ДСК	дифференциальная сканирующая калориметрия		
ИК-спектроскопия	спектроскопия в инфракрасной области		
РПД	рентгеновская порошковая дифрактометрия		
PCA	рентгеноструктурный анализ		
CTA-MC	синхронный термический анализ с масс-спектрометрией		
СЭМ	сканирующая электронная микроскопия		
ΤΓΑ	термогравиметрический анализ		
УВЭЖХ	ультра высокоэффективная жидкостная хроматография		
УФ/ВИД-	спектроскопия в ультрафиолетовой и видимой областях		
спектроскопия			
УФ-спектроскопия	спектроскопия в ультрафиолетовой области		
Caco-2	эпителиальные клетки аденокарциномы толстого кишечника		
	человека		

CCK-8	2-(2-метокси-4-нитрофенил)-3-(4-нитрофенил)-5-
	(2,4-дисульфофенил)-2Н-тетразола мононатриевая соль
FDA	Food and Drug Administration
MDCK	клетки Мадин-Дарби почек собаки
MTT	3-(4,5-диметил-2-тиазолил)-2,5-дифенил-2 <i>Н</i> -тетразолия
	бромид
$A_s$	фактор асимметрии
f	расстояние между перпендикуляром, опущенным из
	вершины пика, и восходящей стороной пика на 5 % его
	ВЫСОТЫ
Ν	число теоретических тарелок
<b>P</b> <sub>app</sub>	кажущаяся проницаемость
$R_s$	разрешение между пиками
W <sub>0,05</sub>	ширина пика на 5% его высоты
<i>W</i> <sub>0,5</sub>	ширина пика на 50% его высоты

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

 Антиоксидантное, капилляропротекторное, противовоспалительное и антигистаминное средство : пат. 2014841 Рос. Федерации : МПК А 61 К 35/78 / С. Я. Соколов, Н. А. Тюкавкина, В. К. Колхир [и др.]; заявитель и патентообладатель Международная ассоциация фитотерапии и традиционной медицины «Фитосан-Интер». – № 5048842/14; заявл. 23.06.1992; опубл. 30.06.1994.

 Антонова, Г. Ф. Водорастворимые вещества лиственницы и возможности их использования / Г. Ф. Антонова, Н. А. Тюкавкина // Химия древесины. – 1983. – N 2. – С. 89–96.

 Василькин, Д. А. Получение и изучение полиморфных модификаций некоторых лекарственных веществ и из биофармацевтических свойств : дис. ... канд. фарм. наук : 14.04.01
 / Дмитрий Александрович Василькин. – СПб., 2012. – 117 с.

4. Вязникова, М. Ю. Исследование состояния воды в стандартном образце дигидрокверцетина и в новом фитопрепарате диквертине / М. Ю. Вязникова, С. С. Николаева, В. А. Быков [и др.] // Химико-фармацевтический журнал. – 1997. – Т. 31 – N 2. – С. 42–45.

5. Гладышев, В. В. Биофармация : учебник для студентов высших учебных заведений / В. В. Гладышев, Л. Л. Давтян, А. Л. Дроздов [и др.] ; под ред. В. В. Гладышева. – 2-е изд. – Днипро. : ЧМП «Экономика», 2018. – 250 с.

 ГОСТ 33215-2014 Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила оборудования помещений и организации процедур (Переиздание). – М.: Стандартинформ, 2019 – 23 с.

 ГОСТ 33216-2014 Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила содержания и ухода за лабораторными грызунами и кроликами (Переиздание). – М.: Стандартинформ, 2019 – 24 с.

8. Государственная фармакопея Российской Федерации : в 4 т. – 14-е изд. – М., 2018.
 – URL: http://femb.ru/femb/pharmacopea.php (дата обращения: 14.05.2018).

 9.
 Диквертина таблетки 0.02 (Diquertin tablets 0.02).
 - М. : Справочник Видаль

 «Лекарственные препараты в России», 2020 – URL:
 https://www.vidal.ru/drugs/diquertin\_tablets\_0\_02\_28013 (дата обращения: 05.02.2020).

10. Колхир, В. К. Диквертин – новое антиоксидантное и капилляропротекторное средство / В. К. Колхир, Н. А. Тюкавкина, В. А. Быков // Химико-фармацевтический журнал – 1995. – N 9. – C. 61–64.

11. Куркин, В. А. Флавоноиды лекартсвенных растений: прогноз антиоксидантной активности / В. А. Куркин, В. В. Поройков, А. В. Куркина [и др.] // Современные проблемы науки и образования. – 2015. – N 2-2. – С. 517–524.

12. Куркин, В. А. Флавоноиды как биологически активные соединения лекарственных растений / В. А. Куркин, А. В. Куркина, Е. В. Авдеева // Фундаментальные исследования. – 2013. – N 11. – С. 1897–1901.

13. Куркин, В. А. Основы фитотерапии : учебное пособие для студентов, обучающихся по специальности 060108 (040500) - Фармация / В. А. Куркин –Самара : Офорт, 2009. - 963 с.

14. Мельникова, Н. Б. Взаимодействие дигидрокверцетина с ионами металлов в водных растворах их солей и в изотонических медицинских средах / Н. Б. Мельникова, И. Д. Иоффе // Химия растительного сырья. – 2001. – N 4. – С. 25–33.

15. Мизина П. Г. Таблетки для рассасывания: достижения и перспективы / П. Г. Мизина, А. С. Гуленков // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. – 2018. – Т. 21 – N 2. – С. 3–11.

16. Нифантьев, Э. Е. К вопросу об идентификации флавоноида дигидрокверцетина /
Э. Е. Нифантьев, М. П. Коротеев, Г. З. Казиев [и др.] // Журнал общей химии. – 2006. – Т. 76 – N 1. – С. 164–166.

17. Правил проведения исследований биоэквивалентности лекарственных препаратов в рамках Евразийского экономического союза : утв. Решением Совета Еразийской экономической комиссии от 3 ноября 2016 N 85 : в ред. Решения Совета Еразийской экономической комиссии от 4 сентября 2020 N 67 // Официальный сайт Евразийского экономического союза. – URL: http://docs.cntd.ru/document/565704480 (дата обращения: 25.12.2020).

18. Плотников, М. Б. Лекарственные препараты на основе диквертина / М. Б. Плотников, Н. А. Тюкавкина, Т. М. Плотникова. – Томск : Издательство Томского университета, 2005. – 228 с.

19. Раменская, Г. В. Классификация лекарственных веществ по их биофармацевтическим свойствам - БКС и BDDCS / Г. В. Раменская, И. Е. Шохин, Ю. И. Кулинич // Вестник ВГУ, серия: химия, биология, фармация. – 2012. – N 1. – C. 212–215.

20. Рязанова, Т. К. Исследование номенклатуры лекарственных средств для местного лечения инфекционно-воспалительных заболеваний полости рта и горла, представленных на фармацевтическом рынке Российской Федерации / Т. К. Рязанова, Н. Р. Варина, В. А. Куркин [и др.] // Медицинский альманах. – 2016. – Т. 45 – N 5. – С. 207–210.

21. Савченко, Ю. П., Методы определения размеров раневой поверхности /
Ю. П. Савченко, С. Р. Федосов // Вестник хирургии имени И. И. Грекова. – 2007. – Т. 166, N 1. –
С. 102-105.

22. Саканян, Е. И. Современные подходы к оценке эффективности и безопасности лекарственных средств растительного происхождения в России и за рубежом / Е. И. Саканян, Т. Б. Шемерякина, Ю. К. Малкина [и др.] // Ведомости научного центра экспертизы средств медицинского применения. – 2015. – N 1. – С. 35–39.

23. Самылина, И. А. Фармакогнозия / И. А. Самылина, Г. П. Яковлев – М. : ГЭОТАР-Медиа, 2014. - 976 с.

Селиванова, И. А. Исследование кристаллической структуры дигидрокверцетина /
И. А. Селиванова, Н. А. Тюкавкина, Ю. А. Колесник [и др.] // Химико-фармацевтический журнал. – 1999. – Т. 33 – N 3. – С. 51–53.

25. Способ выделения дигидрокверцетина : пат 2114631 Рос. Федерации : МПК А 61 К 35/78, С 07 D 311/32 / Н. А. Тюкавкина, В. А. Хуторянский, Б. Н. Баженов [и др.]; заявители Н. А. Тюкавкина, В. А. Хуторянский, Б. Н. Баженов [и др.]; патентообладатели Н. А. Тюкавкина, В. А. Хуторянский, Б. Н. Баженов, М.Ю. Сайботалов. – № 97111748/14; заявл. 22.07.1997; опубл. 10.07.1998.

26. Сунцова, Л. П. Механохимическое получение и исследование водорастворимых композиций на основе флавоноидов – генистеина, дигидрокверцетина, рутина / Л. П. Сунцова, Е. С. Метелева, А. В. Душкин // Фундаментальные исследования. – 2014. – N 11. – С. 2174–2179.

27. Тараховский, Ю. С. Фибриллы из таксифолина как основа наноизделий для биомедицины / Ю. С. Тараховский, Ю. А. Ким, Г. Р. Иваницкий // Доклады академии наук. – 2008. – Т. 422 – N 2. – С. 262–264.

28. Тринеева, О. В. Исследование состава флавоноидов плодов облепихи крушиновидной / О. В. Тринеева, И. Б. Перова, А. И. Сливкин, К. И. Эллер // Сорбционные и хроматографические процессы. – 2017. – Т. 17 – N 1. – С. 87-93.

29. Трофимова, Н. Н. Строение и электрохимические свойства комплексных соединений металлов с дигидрокверцетином / Н. Н. Трофимова, Е. В. Столповская, В. А. Бабкин [и др.] // Химия растительного сырья. – 2014. – N 3. – С. 121–131.

30. Теселкин, Ю. О. Взаимодействие дигидрокверцетина с ионами двухвалентного железа / Ю. О. Теселкин, И. В. Бабенкова, И. А. Руленко // Научный вестник Тюменской медицинской академии. – 1997. – С. 22–24.

31. Теселкин, Ю. О. Антиоксидантные свойства дигидрокверцетина / Ю. О. Теселкин,
Б. А. Жамбалова, И. В. Бабенкова [и др.] // Биофизика. – 1996. – Т. 41 – N 3. – С. 620–624.

32. Тест «Растворение» в разработке и регистрации лекарственных средств. Научнопрактическое руководство для фармацевтической отрасли / под ред. И. Е. Шохина. – М. : Изд-во Перо, 2015. – 320 с.

33. Тюкавкина, Н. А. Органическая химия : учебник для вузов : в 2 кн. Кн. 2 : Специальный курс / Н. А. Тюкавкина, С. Э. Зурабян, В. Л. Белобородов [и др.]; под ред. Н. А. Тюкавкиной. – 2-е изд., стереотип. – М. : Дрофа, 2009. – 592 с.

34. Цао, Г. Наноструктуры и наноматериалы: синтез, свойства и применение / Г. Цао,
И. Ван : пер. с англ. – 2-е изд. – М. : Научный мир, 2012. – 520 с.

35. Шохин, И. Е. Применение биологической модели для оценки кишечной проницаемости *in vitro* – монослоя эпителиальных клеток Сасо-2 / И. Е. Шохин, Ю. И. Кулинич, Г. В. Раменская, В. Г. Кукес // Биомедицина. – 2012. – N 3. – С. 91–97.

36. Щукина, О. Г. Экспериментальное исследование ранозаживляющих свойств дигидрокверцетина при термической травме кожи : дис. ... канд. биол. наук : 14.03.06 / Ольга Геннадьевна Щукина. – СПб., 2014. – 147 с.

37. Щукин, О. Г. Ожоговая болезнь, её моделирование на лабораторных животных для испытания новых лекарственных средств / О. Г. Щукина, Г. Г. Юшков, В. В. Игуменьщева, Н. А. Малышкина // Вестник Ангарской государственной технической академии. – 2009. – Т. 3 – N 1. – С. 143–146.

38. Хёльтье, Х.-Д. Молеккулярное моделирование: теория и практика / Х.-Д. Хёльтье,
В. Зиппль, Д. Роньян, Г. Фолькерс ; пер. с англ. – 2-е изд. – М. : БИНОМ. Лаборатория знаний,
2015. – 319 с.

39. Abad-Garcia, B. A fragmentation study of dihydroquercetin using triple quadrupole mass spectrometry and its application for identification of dihydroflavonols in *Citrus* juices /
B. Abad-Garcia, S. Garmon-Lobato, L. A. Beruetta [et al.] // Rapid communications in mass spectrometry. – 2009. – Vol. 23 – P. 2785–2792.

40. Abdel-Hameed, E.-S. S. Characterization of the Phytochemical Constituents of Taif Rose and Its Antioxidant and Anticancer Activities / E.-S. S. Abdel-Hameed, S. A. Bazaid, M. S. Salman // BioMed Research International. – 2013. – Vol. 2013, N 345465 – URL: https://www.hindawi.com/journals/bmri/2013/345465/ (дата обращения: 12.04.2015).

41. Alemzadeh, E. Hyaluronic acid hydrogel loaded by adipose stem cells enhances wound healing by modulating IL-1 $\beta$ , TGF- $\beta$ 1, and bFGF in burn wound model in rat / E. Alemzadeh, A. Oryan, A. A. Mohammadi // Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials. – 2020. – Vol. 108, N 2. – P. 555–567.

42. Aithal, G. C. Localized In Situ Nanoemulgel Drug Delivery System of Quercetin for Periodontitis: Development and Computational Simulations / G. C. Aithal, U. Y. Nayak, C. Mehta

[et al.] // Molecules. – 2018. – Vol. 23, N 1363 – URL: https://www.mdpi.com/1420-3049/23/6/1363 (дата обращения: 18.09.2018)

43. Akhlaghi, M. Bioavailability and Metabolism of Flavonoids: A Review / M. Akhlaghi,
S. Foshati // International Journal of Nutrition Sciences. – 2017. – Vol. 2, N 4. – P. 180–184.

44. An, H. Physical and Chemical Stability of Formulations Loaded with Taxifolin Tetraoctanoate / H. An, Y. Lee, L. Liu [et al.] // Chemical and Pharmaceutical Bulletin. – 2019. – Vol. 67 – P. 985–991.

45. Asmi, K. S. Theraputic aspects of taxifolin – An update / K. S. Asmi, T. Lakshmi, S. R. Balusamy, R. Parameswari // Journal of Advanced Pharmacy Education and Research. – 2017. – Vol. 7, N 3. – P. 187–189.

46. ASTM E967 Standard Test Method for Temperature Calibration of Differential Scanning Calorimeters and Differential Thermal Analyzers. – West Conshohocken : American Society for Testing and Materials, 2018 – 4 p.

47. ASTM E968 Standard Practice for Heat Flow Calibration of Differential Scanning Calorimeters. – West Conshohocken : American Society for Testing and Materials, 2017 – 5 p.

48. ASTM E1582 Standard Test Method for Temperature Calibration of Thermogravimetric
 Analyzers. – West Conshohocken : American Society for Testing and Materials, 2017 – 6 p.

49. ASTM E2253 Standard Test Method for Temperature and Enthalpy Measurement Validation of Differential Scanning Calorimeters. – West Conshohocken : American Society for Testing and Materials, 2016 – 8 p.

50. Athiyah, U. Crystal engineering of quercetin by liquid assisted grinding method /
U. Athiyah, P. A. Kusuma, T. Tutik [et al.] // Jurnal Teknologi. – 2019. – Vol. 81, N 1. – P. 39–45.

51. Baranov, I. A. Long-Acting Bioactive Composition Based on Chitosan and Taxifolin /
I. A. Baranov, D. Yu. Dzhons, A. V. Budruev [et al.] // Inorganic Materials: Applied Research. – 2015.
– Vol. 6, N 5. – P. 479–484.

52. Basak, U. K. Fractal dimension and complexity in the longterm dynamics of a monomolecular layer / U. K. Basak, A. Datta // Chaos, Solitons & Fractals. – 2015. – Vol. 81 – P. 534–541.

53. Bavishi, D. D. Spring and parachute: How cocrystals enhance solubility / D. D. Bavishi,
C. H. Borkhataria // Progress in Crystal Growth and Characterization of Materials. – 2016. – Vol. 63,
N 3. – P. 1–8.

54. Bilia, A. R. Flavonoids Loaded in Nanocarriers: An Opportunity to Increase Oral Bioavailability and Bioefficacy / A. N. Bilia, B. Isacchi, C. Rihgeschi [et al.] // Food and Nutrition Sciences. – 2014. – Vol. 5 – P. 1212–1227.

55. Boldyreva, E. V. Isoenergetic Polymorphism: The Puzzle of Tolazamide as a Case Study / E. V. Boldyreva, S. G. Arkhipov, T. N. Drebushchak [et al.] // Chemistry – A European Journal. – 2015. – Vol. 21 – P. 15395–15404.

56. Borghetti, G. S. Physicochemical properties and thermal stability of quercetin hydrates in thesolid state / G. S. Borghetti, J. P. Carini, S. B. Honorato [et al.] // Thermochimica Acta. – 2012. – Vol. 539 – P. 109–114.

57. Campos-Dominguez, A. Indirect Monitoring Cane Sugar Crystallization via Image Fractal Analysis / A. Campos-Dominguez, Y. I. Ceballos-Ceballos, S. A. Zamora-Castro [et al.] // Computación y Sistemas. – 2018. – Vol. 22, N 4. – P. 1147–1155.

58. Chadha, K. Co-crystals of Hesperetin: Structural, Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Evaluation / K. Chadha, M. Karan, Y. Bhalla [et al.] // Crystal Growth & Design. – 2017. – Vol. 17, N 5. – P. 2386–2405.

59. Chadha, R. Chrysin cocrystals: Characterization and evaluation / R. Chadha, Y. Bhalla,
A. Nandan [et al.] // Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. – 2017. – Vol. 134 –
P. 361–371.

60. ClinicalTrails : database. – Bethesda : U.S. National Library of Medicine, 2020 – URL: https://clinicaltrials.gov/ct2/home (дата обращения: 25.12.2020).

61. Cretu, E. *In Vitro* Study on the Antioxidant Activity of a Polyphenol-Rich Extract from *Pinus brutia* Bark and Its Fractions / E. Cretu, M. Karonen, J.-P. Salminen [et al.] // Journal of Medicinal food. – 2013. – Vol. 16, N 11. – P. 984–991.

62. Dai, X.-L. Pharmaceutical cocrystallization: an effective approach to modulate the physicochemical properties of solid-state drugs / X.-L. Dai, J.-M. Chen, T.-B. Lu // CrystEngComm. – 2018. – Vol. 20 – P. 5292–5316.

63. Desiraju, G. R. Crystal Engineering: From Molecule to Crystal / G. R. Desiraju // Journal of the American Chemical Society. – 2013. – Vol. 135, N 27. – P. 9952–9967.

64.Dissolution Methods : database. – Silver Spring : Food and Drug Administration, 2019–URL:https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/dissolution/index.cfm(дата обращения: 25.12.2019).

65. Draft chapter for The International Pharmacopoeia. Polymorphism. – December 2018. – Geneva : World Health Organization, 2018 – 12 p.

66. Einfluss von Piperin auf die Bioverfügbarkeit von Epicatechin und Epigallocatechingallat (E-Pip-Pilot) : Probandeninformation. – Bohn : Institut für Ernährungs- und Lebensmittelwissenschaften, 2020 – URL: https://www.lwf.uni-bonn.de/institute/iel/institut/lmw/e-pip/probandeninformation\_einwilligung\_e-pip-pilot (дата обращения: 25.12.2020).

67. Emran, T. B. Molecular docking and inhibition studies on the interactions of *Bacopa monnieri*'s potent phytochemicals against pathogenic *Staphylococcus aureus* / T. B. Emran, M. A. Rahman, M. M. N. Uddin [et al.] // DARU Journal of Pharmaceutical Sciences. – Vol. 23, N 26 – URL: https://link.springer.com/article/10.1186/s40199-015-0106-9 (дата обращения: 13.01.2016).

68. European Pharmacopoeia. – 8<sup>th</sup> ed. – Strasbourg : Council of Europe, 2013. – 3655 p.

69. Fan, G. Molecular cocrystals of diphenyloxazole with tunable fluorescence, upconversion emission and dielectric properties / G. Fan, X. Yang, R. Liang [et al.] // CrystEngComm. – 2016. – Vol. 18 – P. 240–249.

70. Fang, Y. Study of Structure and Permeability Relationship of Flavonoids in Caco-2 Cells / Y. Fang, W. Cao, M. Xia [et al.] // Nutrients. – 2017. – Vol. 9, N 1301. – URL: https://www.mdpi.com/2072-6643/9/12/1301/htm (дата обращения: 03.08.2019).

71. Feldman, D. P. Chaos and fractals: an elementary introduction / D. P. Feldman. – Oxford : University Press, 2012 – 408 p.

Franklin, S. J. Solid-State and Solution Characterization of Myricetin / S. J. Franklin,
P. B. Myrdal // AAPS PharmSciTech. – 2015. – Vol. 16, N 6. – P. 1400–1408.

73. Filimonov, D. A. Prediction of the Biological Activity Spectra of Organic Compounds Using the Pass Online Web Resource / D. A. Filimonov, A. A. Lagunin, T. A. Gloriozova [et al.] // Chemistry of Heterocyclic Compounds. – 2014. – Vol. 50, N 3. – P. 444–457.

74. Fischer, A. Potential Inhibitors for Novel Coronavirus Protease Identified by Virtual Screening of 606 Million Compounds / A. Fischer, M. Sellner, S. Neranjan [et al.] // International Journal of Molecular Sciences. – 2020. – Vol. 21, N 3626. – URL: https://www.mdpi.com/1422-0067/21/10/3626 (дата обращения: 10.10.2020).

75. Gabriel-Guzmán, M. Chaos and Fractality in coffee bean surface for roasting process.
Chaos Solitons Fractals: an elementary introduction / M. Gabriel-Guzmán, V. M. Rivera,
Y. Cocotle-Ronzón [et al.] // Chaos, Solitons & Fractals. – 2017. – Vol. 99 – P. 79–84.

76. Groom, C. R. The Cambridge Structural Database / C. R. Groom, I. J. Bruno,
M. P. Lightfoot, S. C. Ward // Acta Crystallographica Section B: Structural Science, Crystal
Engineering and Materials. – 2016. – Vol. 72 – P. 171–179.

Guidance for Industry. Waiver of in vivo Bioavailability and Bioequivalence Studies for
 Immediate Release Solid Oral Dosage Forms Based on a Biopharmaceutics Classification. – December
 2017. – Silver Spring : Food and Drug Administration, 2017. – 19 p.

78. Guidance for Industry. ANDAs: Pharmaceutical Solid Polymorphism. – July 2007. – Rockville : Food and Drug Administration, 2007. – 10 p.

79. Hasa, D. Screening for new pharmaceutical solid forms using mechanochemistry: a practical guide / D. Hasa, W. Jones // Advanced Drug Delivery Reviews. – 2017. – Vol. 117 – P. 147–161.

80. He, H. Zwitterionic Cocrystals of Flavonoids and Proline: Solid-State Characterization, Pharmaceutical Properties, and Pharmacokinetic Performance / H. He, Y. Huang, Q. Zhang [et al.] // Crystal Growth & Design. – 2016. – Vol. 16, N 4. – P. 2348–2356.

81. Hodis, E. An encyclopedic effort to make 3D structures easier tounderstand / E. Hodis,
J. L. Sussman // Trends in Biochemical Sciences. - 2009. - Vol. 34, N 3. - P. 100-101.

82. Hong, C. A Novel Strategy for Pharmaceutical Cocrystal Generation Without Knowledge of Stoichiometric Ratio: Myricetin Cocrystals and a Ternary Phase Diagram / C. Hong, Y. Xie, Y. Yao [et al.] // Pharmaceutical Research. – 2015. – Vol. 32 – P. 47–60.

83. Huang, Y. Baicalein–Nicotinamide Cocrystal with Enhanced Solubility, Dissolution, and Oral Bioavailability / Y. Huang, B. Zhang, Y. Gao [et al.] // Journal of Pharmaceutical Sciences. – 2014. – Vol. 103, N 8. – P. 2330–2337.

84. International Clinical Trials Registry Platform : Search Portal. – Geneva : World Health Organization, 2017 – URL: https://apps.who.int/trialsearch/ (дата обращения: 25.12.2020).

85. Irvine, J. D. MDCK (Madin–Darby Canine Kidney) Cells: A Tool for Membrane Permeability Screening / J. D. Irvine, L. Takahashi, K. Lockhart [ et al.] // Journal of Pharmaceutical Sciences. – 1999. – Vol. 88, N 1. – P. 28–33.

86. Irwin, J. J. ZINC: A Free Tool to Discover Chemistry for Biology / J. J. Irwin, T. Sterling, M. M. Mysinger [et al.] // Journal of Chemical Information and Modeling. – 2012. – Vol. 52, N 7. – P. 1757–1768.

87. Jones, J. M. Thermogravimetric evolved gas analysis of urea and urea solutions with nickel alumina catalyst / J. M. Jones, A. N. Pollinson // Thermochimica Acta. – 2013. – Vol. 565 – P. 39–45.

88. Jorgenson, W. L. Development and Testing of the OPLS All-Atom Force Field on Conformational Energetics and Properties of Organic Liquids / W. L. Jorgenson, D. S. Maxwell, J. Tirado-Rivers // Journal of the American Chemical Society. – 1996. – Vol. 118, N 45. – P. 11225–11236.

89. Kanaze, F. I. Dissolution Enhancement of Flavonoids by Solid Dispersion in PVP and PEG Matrixes: A Comparative Study / F. I. Kanaze, E. Kokkalou, I. Niopas [et al.] // Journal of Applied Polymer Science. – 2006. – Vol. 102, N 1. – P. 460–471.

90. Karagianni, A. Pharmaceutical Cocrystals: New Solid PhaseModification Approaches for the Formulation of APIs / A. Karagianni, M. Malamatari, K. Kachrimanis // Pharmaceutics. – 2018. – Vol. 10, N 18. - URL: https://www.mdpi.com/1999-4923/10/1/18 (дата обращения: 02.02.2019).

91. Karimi-Jafari, M. Creating Cocrystals: A Review of Pharmaceutical Cocrystal Preparation Routes and Applications / M. Karimi-Jafari, L. Padrela, G. M. Walker, D. M. Croker // Crystal Growth & Design. – 2018. – Vol. 18, N 10. – P. 6370–6387.

92. Karpinski, P. H. Polymorphism of Active Pharmaceutical Ingridients / P. H. Karpinski // Chemical Engineering & Technology. – 2006. – Vol. 29, N 2. – P. 233–237.

93. Karthikeyan, M. Chemoinformatics Approach for the Design and Screening of Focused Virtual Libraries / M. Karthikeyan, R. Vyas. – New Delhi : Springer India, 2014 – 533 p.

94. Kavuru, P. Crystal engineering of flavonoids : dis. ... Master of Science / Padmini Kavuru. – Tampa, 2008. – 101 p.

95. Kesani, S. Crystallization studies of epigallocatechin gallate : dis. ... Master of Science / Sheshanka Kesani. – Tampa, 2007. – 94 p.

96. Khedir, S. B. The healing effect of Pistacia lentiscusfruit oil on laser burn / S. B. Khedir, S. Bardaa, N. Chabchoub [et al.] // Pharmaceutical biology. – 2017. – Vol. 55, N 1. – P. 1407–1414.

97. Kipling, J. J. Adsorption from Solutions of Non-Electrolytes / J. J. Kipling. – London : Academic press, 1965 – 328 p.

98. Kolhir, V. K. Antioxidant activity of a dihydroguercetin isolated from *Larix gmelinii* (Rupr). Rupr. wood / V. K. Kolhir, N. A. Tjukavkina, Yl. A. Kolesnik, I. A. Rulenko // Phytotherapy Research. – 1996. – Vol. 10, N 6. – P. 478–482.

99. Ku, M. S. Use of the Biopharmaceutical Classification System in Early Drug Development / M. S. Ku // The AAPS Journal. – 2005. – Vol. 10, N 1. – P. 208–212.

100. Kuleshova, L. N. Lattice energy calculation – A quick tool for screening of cocrystalsand estimation of relative solubility. Case of flavonoids / L. N. Kuleshova, D. W. M. Hofmann, R. Boese // Chemical Physics Letters. – 2013. – Vol. 564 – P. 26–32.

 101. Kumar, A. A Review about Regulatory Status and Recent Patent of Pharmaceutical Co-Crystals / A. Kumar, S. Kumar, A. Nanda // Advanced Pharmaceutical Bulletin. – 2018. – Vol. 8, N 3.
 – P. 355–363.

102. Kurkin, V. A. Phenylpropanoids as the biologically active compounds of the medicinal plants and phytopharmaceuticals / V. A. Kurkin // Advances in Biological Chemistry. – 2013. – N 3. – P. 26–28.

103. Kurkin, V. A. Phenylpropanoids from medicinal plants: distribution, classification, structuralanalysis, and biological activity / V. A. Kurkin // Chemistry of Natural Compounds. – 2003.
– Vol. 39, N 3. – P. 123–153.

104. Le Ferrec, E. In Vitro Models of the Intestinal Barrier: The Report and Recommendations of ECVAM Workshop 46 / E. Le Ferrec, C. Chesne, P. Artusson [ et al.] // Alternatives to Laboratory Animals. – 2001. – Vol. 29 – P. 649–668.

105. Lee, W.-Y. Treatment of Rheumatoid Arthritis with Traditional Chinese Medicine / W.-Y. Lee, H.-Y. Chen, K.-C. Chen, C. Y.-C. Chen // BioMed Research International. – 2014. – Vol. 2014, N 528018 – URL: https://www.hindawi.com/journals/bmri/2014/528018/ (дата обращения: 13.01.2016).

106. Li, J. Synthesis, characterization, solubilization, cytotoxicity and antioxidant activity of aminomethylated dihydroquercetin / J. Li, J. Dong, J. Ouyang [et al.] // MedChemComm. – 2017. – Vol. 8, N 2. – P. 353–363.

107. Li, W. A strategy to improve the oral availability of baicalein: The baicaleintheophylline cocrystal / W. Li, J. Pi, Y. Zhang [et al.] // Fitoterapia. – 2018. – Vol. 129 – P. 85–93.

108. Lilienthal, B. Buffering systems in the mouth / B. Lilienthal // Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology. – 1955. – Vol. 8, N 8. – P. 828–841.

109. Liu, M. The generation of myricetin-nicotinamide nanococrystals by top down and bottom up technologies / M. Liu, C. Hong, G. Li [et al.] // Nanotechnology. – 2016. – Vol. 27, N 395601 – URL: https://iopscience.iop.org/article/10.1088/0957-4484/27/39/395601/meta (дата обращения: 01.08.2019).

Liu, W. Sotalol permeability in cultured-cell, rat intestine and PAMPA system / W. Liu,
H. Okochi, L. Z. Benet, S.-D. Zhai // Pharmaceutical research. – 2012. – Vol. 29, N 7. – P. 1768–1774.

111. Liu, F. Protective Effects of Quercetin against Pyrazinamide Induced Hepatotoxicity via a Cocrystallization Strategy of Complementary Advantages / F. Liu, L.-Y. Wang, Y.-T. Li [et al.] // Crystal Growth & Design. – 2018. – Vol. 18, N 7. – P. 3729–3733.

Liu, Z. Molecular Docking of Potential Inhibitors for Influenza H7N9 / Z. Liu, J. Zhao,
W. Li [et al.] // BioMed Research International. – 2015. – Vol. 2015, N 480764 – URL: https://www.hindawi.com/journals/cmmm/2015/480764/ (дата обращения: 13.01.2016).

113. Loschen, C. Solubility prediction, solvate and cocrystal screening astools for rational crystal engineering / C. Loschen, A. Klamt // Journal of Pharmacy and Pharmacology. – 2015. – Vol. 67, N 6. – P. 803–811.

114. Luo, Y. Luteolin cocrystals: Characterization, evaluation of solubility, oral bioavailability and theoretical calculation / Y. Luo, S. Chen, J. Zhou [et al.] // Journal of Drug Delivery Science and Technology. – 2019. – Vol. 50 – P. 248–254.

115. Luo, C. Pharmaceutical cocrystals of naringenin with improved dissolution performance // C. Luo, W. Liang, X. Chen [et al.] // CrystEngComm. – 2018. – Vol. 20 – P. 3025–3033.

116. Mabry, T. J. The Systematic Identification of Flavonoids / T. J. Mabry, K. R. Markham,M. B. Thomas. – New York : Springer-Verlag, 1970. – 350 p.

117. MacFarland, T. W. Introduction to Nonparametric Statistics for the Biological SciencesUsing R / T. W. MacFarland, J. M. Yates. – Cham : Springer, 2016. – 329 p.

118. Macrea, C. F. Mercury 4.0: from visualization to analysis, design and prediction /
C. F. Macrea, I. Sovago, S. J. Cottrell [et al.] // Journal of Applied Crystallography. – 2020. – Vol. 53 – P. 226–235.

119. McCusker, L. B. Nomenclature of structural and compositional characteristics of ordered microporous and mesoporous materials with inorganic hosts (IUPAC Recommendations 2001)
/ L. B. McCusker, F. Liebau, G. Engelhardt // Pure and Applied Chemistry. – 2001. – Vol. 73, N 2. – P. 381–394.

Mehrabani, D. The Healing Effect of Curcumin on Burn Wounds in Rat / D. Mehrabani,
M. Farjam, B. Geramizadeh [et al.] // World journal of plastic surgery. – 2015. – Vol. 4, N 1. –
P. 29–35.

121. Moher, D. Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses: The PRISMA Statement / D. Moher, A. Liberati, D. G. Altman [ et al.] // PLos Medicine. – 2009. – Vol. 6, N 7 – e1000097.

Mosmann, T. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays / T. Mosmann // Journal of Immunological Methods. – 1983.
Vol. 65 – P. 55–63.

123. Muddukrishna, B. S. Preparation, Solid state Characterisation of Paclitaxel and Naringen Cocrystals with Improved Solubility / B. S. Muddukrishna, S. J. Dengale, G. G. Shenoy, K. Bhat // International Journal of Applied Pharmaceutics. – 2016. – Vol. 8, N 4. – P. 32–37.

124. Muramatsu, D. Cell cytotoxity and anti-glycation activity of taxifolin-rich extract from Japanese larch, *Larix kaempferi* / D. Muramatsu, H. Uchiyama, H. Kida, A. Iwai // Helyion. – 2019. – Vol. 5, N e02047. - URL: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S240584401935707X (дата обращения: 01.08.2019).

125. Mureşan-Pop, M. Novel nutraceutical Myricetin composite of enhanced dissolution obtained by co-crystallization with acetamide / M. Mureşan-Pop, L. B. Chiras, F. Martin, S. Simon // Composites Part B: Engineering. – 2016. – Vol. 89 – P. 60–66.

126. Musumeci, D. Virtual cocrystal screening / D. Musumeci, C. A. Hunter, R. Prohens [et al.] // Chemical Science. – 2011. – Vol. 2 – P. 883–890.

127. Naumov, A. A. Liposomal form of dihydroquercetin contributes to skin regeneration after thermal burns / A. A. Numov, M. M. Potselueva // Cell and Tissue Biology. – 2010. – Vol. 4 – P. 240–244.

128. Oi, N. Taxifolin Suppresses UV-Induced Skin Carcinogenesis by Targeting EGFR and PI3K / N. Oi., M. O. Kim, R. A. Lubet [et al.] // Cancer Prevention Research. – 2012. – Vol. 5, N 9. – P. 1103–1114.

129. Paramaguru, R. Antidiabetic Activity of Pterospermum acerifolium Flowers and Glucose Uptake Potential of Bioactive Fraction in L6 Muscle Cell Lines with Its HPLC Fingerprint / R. Paramaguru, P. M. Mazumder, D. Sasmal, V. Jayaprakash // BioMed Research International. – 2014. – Vol. 2014, N 459376 – URL: https://www.hindawi.com/journals/bmri/2014/459376/ (дата обращения: 13.01.2016).

130. Patil, S. Electrospray technique for cocrystallization of phytomolecules / S. Patil,
K. Chaudhari, R. Kamble // Journal of King Saud University – Science. – 2018. – Vol. 30 –
P. 138–141.

131. Peng, X. Describing some characters of serine proteinase using fractal analysis /
X. Peng, W. Qi, R. Su, Z. He // Chaos, Solitons & Fractals. – 2012. – Vol. 45, N 7. – P. 1017–1023.

132. Pessoa, A. S. Precipitation of resveratrol-isoniazid and resveratrol-nicotinamide cocrystals by gas antisolvent / A. S. Pessoa, G. P. S. Aduiar, J. V. Oliveira [et al.] // The Journal of Supercritical Fluids – 2019. – Vol. 145 – P. 93–102.

133. Petrie, A. Medical statistics at a glance / A. Petrie, C. Sabin. – 4th ed. – London : Wiley Blackwell, 2019. – 187 p.

134. Pew, J. C. A Flavonone from Douglas-Fir Hearwood / J. C. Pew // Journal of the American Chemical Society. – 1948. – Vol. 70, N 9. – P. 3031–3034.

135. Pindelska, E. Pharmaceutical cocrystals, salts and polymorphs: Advanced characterization techniques / E. Pindelska, A. Sokal, W. Kolodziejski // Advanced Drug Delivery Reviews. – 2017. – Vol. 117 – P. 111–146.

136. Raj, U. Flavonoids as Multi-target Inhibitors for Proteins Associated with Ebola Virus:
In Silico Discovery Using Virtual Screening and Molecular Docking Studies / U. Raj, P. K. Varadwaj
// Interdisciplinary Sciences: Computational Life Sciences. – 2016. – Vol. 8 – P. 132–141.

137. Ren, S. The effects of pH, surfactant, ion concentration, coformer, and molecular arrangement on the solubility behavior of myricetin cocrystals / S. Ren, M. Liu, C. Hong // Acta Pharmaceutica Sinica B. – 2019. – Vol. 9, N 1. – P. 59–73.

138. Reutzel-Edens, S. M. Analytical Techniques and Strategies for Salt/Co-crystal Characterization / S. M. Reutzel-Edens // Pharmaceutical Salts and Co-crystals / ed. by J. Wouters, L. Quéré. – Cambridge : RCS Publishing, 2012. – P. 212–246.

139. Sander, J. R. G. Sonocrystallization and sonofragmentation / J. R. G. Sander,
B. W. Zeiger, K. S. Suslick // Ultrasonics Sonochemistry. – 2014. – Vol. 21, N 6. – P. 1908–1915.

140. Sathishkumar, P. Flavonoids mediated 'Green' nanomaterials: A novel nanomedicine system to treat various diseases – Current trends and future perspective / P. Sathishkumar, F. L. Gu, Q. Zhan [et al.] // Materials Letters. – 2018. – Vol. 210 – P. 26–30.

141. Sayer, H. Comparison of efficacy of topical phenytoin with hypericin in second-degree burn wound healing: An experimental study in rats / H. Sayer, N. Gergerlioglu, N. Seringec [et al.] // Medical science monitor basic research. -2014. -Vol. 20 - P. 36-46.

142. Setyawan, D. Improvement *in vitro* Dissolution Rate of Quercetin Using Cocrystallization of Quercetin-Malonic Acid / D. Setyawan, S. A. Permata, A. Zainul, M. L. A. D. Lestari // Indonesian Journal of Chemistry. – 2018. – Vol. 18, N 3. – P. 531–536.

143. Setyawan, D. Physicochemical Characterization and In Vitro Dissolution Test of Quercetin-Succinic Acid Co-crystals Prepared Using Solvent Evaporation / D. Setyawan, I. P. Oktavia, R. Farizka, R. Sari // Turkish journal of pharmaceutical sciences. – 2017. – Vol. 14, N 3. – P. 280–284.

144. Schauss, A. G. Toxicological and Genotoxicity Assessment of a Dihydroquercetin-Rich Dahurian Larch Tree (*Larix gmelinii* Rupr) Extract (Lavitol) / A. G. Schauss, S. S. Tselyico, V. A. Kuznetsova, I. Yegorova // International Journal of Toxicology. – 2015. – Vol. 34, N 2. – P. 162–181.

145. Sheldrick, G. M. A short history of SHELX / G. M. Sheldrick // Acta Crystallographica Section A: Foundations and Advances. – 2008. – Vol. 64 – P. 112–122.

146. Shykov, A. N. Nanodispersions of taxifolin: Impact of solid-state properties on dissolution behavior / A. N. Shykov, O. N. Pozharitskaya, I. Miroshnyk [et al.] // International Journal of Pharmaceutics. – 2009. – Vol. 377 – P. 148–152.

147. Smith, A. J. Crystal Engineering of Green Tea Epigallocatechin-3-gallate (EGCg)Cocrystals and Pharmacokinetic Modulation in Rats / A. J. Smith, P. Kavuru, K. K. Arora [et al.] // Molecular Pharmaceutics. – 2013. – Vol. 10, N 8. – P. 2948–2961.

148. Smith, A. J. Modulating the Pharmacokinetics of Bioflavonoids : dis. ... Doctor of Philosophy / Adam John Smith. – Tampa, 2012. – 120 p.

149. Smith, A. J. Cocrystals of Quercetin with Improved Solubility and Oral Bioavailability /
A. J. Smith, P. Kavuru, L. Wojtas [et al.] // Molecular Pharmaceutics. – 2011. – Vol. 8, N 5. –
P. 1867–1876.

150. Sowa, M. Solid-state characterization and solubility of a genistein–caffeinecocrystal /
M. Sowa, K. Ślepokurab, E. Matczak-Jona // Journal of Molecular Structure. – 2014. – Vol. 1176 –
P. 80–88.

151. Sowa, M. Improving solubility of fisetin by cocrystallization / M. Sowa, K. Ślepokurab,
E. Matczak-Jona // CrystEngComm. – 2014. – Vol. 16 – P. 10592–10601.

152. Sowa, M. A 1:1 pharmaceutical cocrystal of myricetin in combination with uncommon piracetam conformer: X-ray single crystal analysis and mechanochemical synthesis / M. Sowa, K. Ślepokurab, E. Matczak-Jona // Journal of Molecular Structure. – 2014. – Vol. 1058 – P. 114–121.

153. Sowa, M. Cocrystals of fisetin, luteolin and genistein with pyridinecarboxamide coformers: crystal structures, analysis of intermolecular interactions, spectral and thermal characterization / M. Sowa, K. Ślepokurab, E. Matczak-Jona // CrystEngComm. – 2013. – Vol. 15 – P. 7696–7708.

154. Sowa, M. A 1:1 cocrystal of baicalein with nicotinamide / M. Sowa, K. Ślepokurab, E. Matczak-Jona // Acta Crystallographica Section C: Structural Chemistry. – 2012. – Vol. 68 – P. 262–265.

155. Stortz, C. A. Comparison of different force fields for the study of disaccharides / C. A.
Stortz, G. P. Johnson, A. D. French, G. I. Csonka // Carbohydrate Research. – 2009. – Vol. 344, N 16. – P. 2217–2228.

156. Su, X. Preparation of a 1:1.5 cocrystal of kaempferol with 4,4'-bipyridine based on analyzing intermolecular interaction of building units / X. Su, H. Yin, L. Liu [et al.] // Journal of Molecular Structure. – 2019. – Vol. 1177 – P. 107–116.

157. Sunil, C. An insight into the health-promoting effects of taxifolin (dihydroquercetin) / C. Sunil, B. Xu // Phytochemistry. – 2019. – Vol. 166, N 112066. – URL: https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0031942219304005?via%3Dihub (дата обращения: 01.08.2019).

158. Taxifolin Market - Global Industry Analysis, Size, Share, Growth, Trends and Forecast 2018 – 2028 // TMR Research : [сайт]. – 2018. – URL: https://www.tmrresearch.com/taxifolin-market (дата обращения: 07.01.2021).

159. Teja, A. Simultaneous improvement of solubility and permeability by fabricating binary glassy materials of Talinolol with Naringin: Solid state characterization, *In-vivo In-situ* evaluation / A. Teja, P. B. Musmade, A. B. Khade, S. J. Dengale // European Journal of Pharmaceutical Sciences. – 2015. – Vol. 78 – P. 234–244.

160. Thakuria, R. Cocrystal Dissociation under Controlled Humidity: A Case Study of Caffeine–Glutaric Acid Cocrystal Polymorphs / R. Thakuria, M. Arhangelskis, M. D. Eddelston // Organic Process Research & Development. – 2019. – Vol. 23 – P. 845–851.

161. The Japanese Pharmacopeia. English Version. – 17<sup>th</sup> ed. – Tokyo : Ministry of Health, Labour, and Welfare, 2016. – 2643 p.

162. The United States Pharmacopeia. The National Formulary.  $-41^{st}$  ed. - Rockvill : The United States Pharmacopeial Convention, 2018. -2143 p.

163. Thilakarathna, S. H. Flavonoid Bioavailability and Attempts for Bioavailability Enhancement / S. H. Thilakarathna, H. P. V. Rupasinghe // Nutrients. – 2013. – Vol. 5 – P. 3367–3387.

164. Timmons, D. J. Assembling Extended Structures with Flavonoids / D. J. Timmons, M.
R. Pacheco, K. A. Fricke, C. Slebodnick // Crystal Growth & Design. – 2008. – Vol. 8, N 8. –
P. 2765–2769.

165. Tjukavkina, N. A. Diquertin – a new bioflavonoid product obtained from plant raw materials / N. A. Tyukavkina, V. V. Naumov, Yu. A. Kolesnik, I. A. Rulenko // Polyphenols Communications 96 / ed. by J. Vercauteren, C. Chéze, M. C. Dumon, J. F. Weber. – Bordeaux : Groupe Polyphénols, 1996. – P. 101–102.

166. Tjukavkina, N. A. Dihydroquercetin - a new antioxidant and biologically active food supplement / N. A. Tjukavkina, I. A. Rulenko, Y. A. Kolesnik // Problems of Nutrition. – 1997. – Vol. 66, N 6. – P. 12–15.

167. Tominaga, H. A water-soluble tetrazolium salt useful for colorimetric cellviability assay
/ H. Tominaga, M. Ishiyama, F. Ohseto [et al.] // Analytical Communications. – 1999. – Vol. 36, N 2.
– P. 47–50.

168. Tsimogiannis, D. Characterization of Flavonoid Subgroups and Hydroxy Substitution by HPLC-MS/MS / D. Tsimogiannis, M. Samiotaki, G. Panayotou, V. Oreopoulou // Molecules. – 2007. – Vol. 12, N 3. – P. 593–606.

169. Twarużek, M. The use of *in vitro* assays for the assessment of cytotoxicity on the example of MTT test / M. Twarużek, E. Zastempowska, E. Soszczyńska, I. Ałtyn // Folia Biologica et Oecologica. – 2018. – Vol. 14 – P. 23–32.

170. Uchiyama, H. Improved Solubility of Quercetin by Preparing Amorphous Solid with Transglycosylated Rutin and Isoquercitrin / H. Uchiyama, Y. Wada, M. Takamatsu [et al.] // Environmental Control in Biology. – 2018. – Vol. 56, N 4. – P. 161–165.

171. Vasisht, K. Enhancing biopharmaceutical parameters of bioflavonoid quercetin by cocrystallization / K. Vasisht, K. Chadha, M. Karan [et al.] // CrystEngComm. – 2016. – Vol. 18 – P. 1403–1415.

172. Verma, S. Molecular construction of NADH-cytochrome b5 reductase inhibition by flavonoids and chemical basis of difference in inhibition potential: Molecular dynamics simulation study / S. Verma, A. Singh, A. Mishra // Journal of Applied Pharmaceutical Science. – 2012. – Vol. 2, N 8. – P. 33–39.

173. Veverka, M. Cocrystals of quercetin: synthesis, characterization, and screening of biological activity / M. Veverka, T. Dubaj, J. Gallovič [ et al.] // Monatshefte für Chemie. – 2015. – Vol. 146, N 1. – P. 99–109.

174. Wang, W. Enhanced dissolution rate and oral bioavailability of *Ginkgo biloba* extract by preparing solid dispersion via hot-melt extrusion / W. Wang, Q. Kang, N. Liu [et al.] // Fitoterapia. - 2015. - Vol. 102 - P. 189–197.

175. Wang, C. Enhancing Bioavailability of Dihydromyricetin through Inhibiting Precipitation of Soluble Cocrystals by a Crystallization Inhibitor / C. Wang, Q. Tong, X. Hou [et al.] // Crystal Growth & Design. – 2016. – Vol. 16, N 9. – P. 5030–5039.

176. Wang, Y.-J. Interference of Phenylethanoid Glycosides from *Cistanche tubulosa* with the MTT Assay / Y.-J. Wang, S.-M. Zhou, G. Xu, Y.-Q. Gao // Molecules. – 2015. – Vol. 20, N 5. – P. 8060–8071.

177. Wei, Y. Further enhanced dissolution and oral bioavailability of docetaxel by coamorphization with a natural P-gp inhibitor myricetin / Y. Wei, S. Zhou, T. Hao [et al.] // European Journal of Pharmaceutical Sciences. – 2019. – Vol. 129 – P. 21–30.

178. Wong, M. Lead Identification/Optimization / M. Wong, M. McAllister // Oral Formulation Roadmap from Early Drug Discovery to Development / ed. by E. Kwong. – Hoboken : John Wiley & Sons Inc., 2017. – P. 9–38.

179. Zhang. Q.-F. Structure selective complexation of cyclodextrins with five polyphenols investigated by capillary electrokinetic chromatography / Q.-F. Zhang, H.-Y. Cheung, X. Shangguan, G. Zheng // Journal of Separation Science. – 2012. – Vol. 35 – P. 3347–3353.

180. Zhang, Y.-N. Preparation of a 1:1 cocrystal of genistein with 4,4'-bipyridine / Y.-N. Zhang, H.-M. Yin, Y. Zhang [et al.] // Journal of Crystal Growth. – 2017. – Vol. 458 – P. 103–109.

181. Zhao, J. Improvement strategies for the oral bioavailability of poorly water-solubleflavonoids: An overview / J. Zhao, J. Yang, Y. Xie // International Journal of Pharmaceutics. - 2019. -Vol.570,N118642.-URL:https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0378517319306878(дата обращения: 02.04.2020).

182. Zaragozá, C. Potential Therapeutic Anti-Inflammatory and Immunomodulatory Effects of Dihydroflavones, Flavones, and Flavonols / C. Zaragozá, L. Villaescusa, J. Monserrat [et al.] // Molecules. – 2020. – Vol. 25, N 1017. – URL: https://www.mdpi.com/1420-3049/25/4/1017 (дата обращения: 31.12.2020).

183. Zavodnik, V. Electron density study of urea using TDS-corrected X-ray diffraction data: quantitative comparison of experimental and theoretical results / V. Zavodnik, A. Stash, V. Tsirelson [et al.] // Acta Crystallographica Section B: Structural Science, Crystal Engineering and Materials. – 1999. – Vol. 55 – P. 45–54. 184. Zu, Y. Enhancement of solubility, antioxidant ability and bioavailability of taxifolin nanoparticles by liquid antisolvent precipitation technique / Y. Zu, W. Wu, X. Zhao [et al.] // International Journal of Pharmaceutics. – 2014. – Vol. 471 – P. 366–376.

185. Zu, Y. The high water solubility of inclusion complex of taxifolin- $\gamma$ -CD prepared and characterized by the emulsion solvent evaporation and the freeze drying combination method / Y. Zu, W. Wu, X. Zhao [et al.] // International Journal of Pharmaceutics. – 2014. – Vol. 477 – P. 148–158.

186. Zu, S. Micronization of Taxifolin by Supercritical Antisolvent Processand Evaluation of Radical Scavenging Activity / S. Zu, L. Yang, J. Huang // International Journal of Molecular Sciences. - 2012. - Vol. 13, N 7. - P. 8869–8881.

# ПРИЛОЖЕНИЯ

# Приложение А

### (рекомендуемое)

# Рисунок А.1 – Патент



169

### Приложение Б

### (рекомендуемое)

### Рисунок Б.1 – Акт внедрения (Сеченовский университет)

УТВЕРЖДАЮ	
Проректор по учебной деятельности	
ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова	
Минзарава России (Сеченовский университет)	
доц. Литвинова Т.М.	

#### АКТ

Внедрения в практику федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации результатов диссертационной работы Терехова Романа Петровича

Предмет внедрения:положения и выводы диссертационного исследования Терехов Р.П. «Влияние фазового состояния на физико-химические, технологические и биофармацевтические параметры дигидрокверцетина».

Кем предложен: Терехов Р.П., аспирант кафедры химии Института фармации им. А.П. Нелюбина ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский университет).

Кем и где выдано: ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский университет), 119991, г. Москва, ул. Трубецкая, дом 8, строение. 2.

Цель внедрения: обеспечение надлежащего уровня знаний студентов, обучающихся по специальности «Фармация», в области контроля фазового состояния флавоноидов, а так же влияния полиморфизма на их физико-химические, технологические и биофармацевтические параметры.

Результаты внедрения: основные положения и выводы диссертационного исследования Терехов Р.П. используются в образовательном процессе на кафедре химии в рамках дисциплины «Методы фармакопейного анализа» и дисциплины по выбору «Физикохимические методы исследования органических соединений».

Заведующий кафедрой химии Института фармации им. А.П. Нелюбина ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский университет), профессор Ольга

Ольга Владимировна Нестерова

# Приложение В

### (рекомендуемое)

# Рисунок В.1 – Акт внедрения (РНИМУ имени Н.И. Пирогова)



МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ **"РОССИЙСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Н.И. ПИРОГОВА"** 

МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

(ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России)

ул. Островитянова, дом 1, г. Москва, 117997 ИНН 7728095113 | КПП 772801001 | ОГРН 1027739054420 Тел./факс +7 495 434 0329, +7 495 434 6129 | E-mail: rsmu@rsmu.ru



AKT

внедрения в научно-исследовательскую деятельность Отдела медицинской биофизики НИИ трансляционной медицины ФГБОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России результатов диссертационного исследования Терехова Романа Петровича на тему «Влияние фазового состояния на физико-химические, технологические и биофармацевтические параметры дигидрокверцетина»

Мы, нижеподписавшиеся, члены комиссии в составе:

заведующего отделом, д-р биол. наук, член-корр. РАН, профессора Осипова Анатолия Николаевича (звание, должность, ФИО)

главного научного сотрудника отдела, д-р биол. наук Теселкина Юрия Олеговича

(звание, должность, ФИО)

старшего научного сотрудника отдела, канд. мед. наук Бабенковой Ирины Владимировны

(звание, должность, ФИО)

удостоверяем, что полученные диссертантом результаты исследований по разработке фазовых модификаций дигидрокверцетина с улучшенной растворимостью внедрены в практику работы Отдела медицинской биофизики НИИ трансляционной медицины ФГБОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России.

Материалы исследования используются в доклинических исследованиях природных соединений с антиоксидантной активностью.

. д-р биол. наук, член-корр. РАН, проф. А.Н.Осипов

д-р биол. наук, Ю.О.Теселкин

канд. мед. наук И.В. Бабенкова

# Приложение Г

### (рекомендуемое)

# Рисунок Г.1 – Акт внедрения (АО «Аметис»)

Акционерное Общество "Аметис" 675000, Амурская область, г. Благовещенск, ул. Набережная, 68 Тел/факс: +7(4162) 33-11-99 AMETHC E-mail: office@ametis.ru www.ametis.ru

УТВЕРЖДАЮ: енеральный директор АО Аметис» Остронков В. С. «02» декабря 2020 г.

AKT

Внедрения результатов диссертационной работы Терехова Романа Петровича

Предмет внедрения: способ получения микросфероидной формы дигидрокверцетина.

Кем предложен: Терехов Р.П., аспирант кафедры химии Института фармации им. А.П. Нелюбина ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский университет).

Кем и где выдано: АО «Аметис», 675020, Амурская область, г. Благовещенск, ул. Набережная, д. 68.

Цель внедрения: улучшение потребительских свойств дигидрокверцетина производимого АО «Аметис».

**Результаты внедрения:** микросфероидная форма дигидрокверцетина обладает улучшенной растворимостью в воде при комнатной температуре, модифицированными фармацетикотехнологическими характеристиками, пролонгированным режимом всасывания.

Главный технолог АО «Аметис» Татьяна Геннадьевна Каблучко

Tasf-

# Приложение Д

### (рекомендуемое)

# Рисунок Д.1 – Выписка из протокола заседания ЛЭК

федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования Первый Московский государственный медицинский упиверситет имени И.М. Сеченова Министерство здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет)



# ЛОКАЛЬНЫЙ ЭТИЧЕСКИЙ КОМИТЕТ

119991, г. Москва, ул. Трубецкая, д. 8

тел.: 8(495)622-97-06, факс: 8(495)622-97-56, iec@1msmu.ru; iec@sechenov.ru

Выписка из протокола № 02-20 заседания Локального этического Комитета от 05.02.2020

Присутствовали:

Председатель Комитета - Николенко В.Н. Заместитель председателя Комитета – Реброва Е.Л. Члены Комитета: Ермолаева И.И., Бердникова Н.Г., Борисова Н.И., Дубограй Е.В., Смолярчук Е.А.

Кворум есть, заседание считается правомочным.

Слушали: рассмотрение исследования в рамках диссертационной работы «Влияние фазового состояния на физико-химические, технологические и биофармацевтические параметры дигидрокверцетина» (исполнитель – Терехов Роман Петрович).

Постановили: одобрить исследование в рамках диссертационной работы «Влияние фазового состояния на физико-химические, технологические и биофармацевтические параметры дигидрокверцетина» (исполнитель – Терехов Роман Петрович).

Выписка верна.

Ответственный секретарь

07.02.2020

1180	и.и.
Локальный	
KOMUTET ПО ЭТИКЕ	
ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сече Мипдарава России (Сеченовский Универси	нова
T. 8(495)622-97-06	

Ермолаева

173