

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*



Панков Денис Игоревич

**Разработка состава и методик контроля качества  
композиции на основе дигидрокверцетина и глицина**

3.4.2. Фармацевтическая химия, фармакогнозия

Диссертация  
на соискание ученой степени  
кандидата фармацевтических наук

**Научный руководитель:**  
доктор фармацевтических наук, профессор  
Селиванова Ирина Анатольевна

## ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	5
ГЛАВА 1. КОМПОЗИЦИИ ФЛАВОНОИДОВ И АМИНОКИСЛОТ: СИНТЕЗ, БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ И АНАЛИТИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ (обзор литературы) ..	12
1.1. Флавоноиды .....	13
1.1.1. Структура и стереоизомерия .....	13
1.1.2. Биофлавоноиды высших растений .....	15
1.1.3. Биологическая активность.....	17
1.1.4. Лекарственные средства флавоноидной природы .....	23
1.1.5. Биофармацевтические аспекты.....	24
1.2. Аминокислоты.....	26
1.2.1. Строение и стереохимия.....	26
1.2.2. Биологическая роль.....	28
1.2.3. Аминокислоты как лекарственные средства .....	28
1.3. Композиции флавоноидов с аминокислотами.....	29
1.3.1. Концепция поиска статей .....	30
1.3.2. Общая характеристика композиций .....	37
1.3.3. Способы получения.....	41
1.3.4. Анализ физико-химическими методами .....	44
1.3.5. Биофармацевтические характеристики.....	51
1.3.6. Биологическая активность и фармакокинетика .....	52
1.4. Выводы по главе 1 .....	53
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ .....	55
2.1. Объекты исследования .....	55
2.2. Реагенты, растворители, среды, стандартные образцы .....	55
2.3. Оборудование .....	57
2.4. Посуда и вспомогательные материалы .....	58
2.5. Клеточные линии и условия культивирования .....	59
2.6. Способы получения композиции дигидрокверцетин-глицин.....	59
2.6.1. Кристаллизация на границе раздела фаз.....	59
2.6.2. Лиофилизация.....	60
2.6.3. Распылительная сушка .....	60
2.6.4. Суспендирование .....	60
2.6.5. Сухой гриндинг .....	60
2.7. Методы анализа.....	61

2.7.1. Дифракционные методы анализа.....	61
2.7.2. Методы органолептической оценки.....	61
2.7.3. Микроскопия.....	62
2.7.4. Потеря в массе при высушивании.....	62
2.7.5. Спектральные методы анализа.....	62
2.7.6. Термический анализ.....	65
2.7.7. Хироптические методы анализа.....	65
2.7.8. Хроматографические методы анализа.....	65
2.8. Стерилизация потоком быстрых электронов.....	66
2.9. Методы анализа <i>in silico</i> .....	66
2.10. Методы анализа <i>ex vivo</i> .....	67
2.11. Расчеты, статистическая обработка результатов и программное обеспечение.....	68
ГЛАВА 3. СУПРАМОЛЕКУЛЯРНЫЙ СИНТЕЗ КОМПОЗИЦИИ ДИГИДРОКВЕРЦЕТИН-ГЛИЦИН НА ОСНОВЕ ХИРАЛЬНЫХ ТВЕРДЫХ ФАЗ.....	72
3.1. Разработка состава композиции.....	72
3.2. Получение композиции методами инженерии кристаллов.....	73
3.3. Выводы по главе 3.....	77
ГЛАВА 4. СТЕРЕОХИМИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ КОМПОНЕНТОВ КОМПОЗИЦИИ.....	79
4.1. $\sigma$ -Диастереомерия дигидрокверцетина.....	79
4.1.1. Оптимизация разделения $\sigma$ -диастереомеров дигидрокверцетина.....	80
4.1.2. Идентификация пиков на хроматограмме.....	85
4.1.3. Стереизомерный состав дигидрокверцетина в промышленных образцах.....	89
4.1.4. Самопроизвольная $\sigma$ -диастереомеризация дигидрокверцетина.....	93
4.1.5. Влияние различных факторов на $\sigma$ -диастереомеризацию дигидрокверцетина.....	94
4.1.6. $\sigma$ -Диастереомеризация и лиофилизация.....	99
4.1.7. Диастереомерный состав стерилизованных образцов дигидрокверцетина.....	101
4.2. Хиральный полиморфизм глицина.....	104
4.2.1. Фазовое состояние глицина.....	104
4.2.2. Воздействие лиофилизации на полиморфизм.....	107
4.3. Выводы по главе 4.....	109
ГЛАВА 5. ХАРАКТЕРИСТИКА КОМПОЗИЦИИ ДИГИДРОКВЕРЦЕТИН-ГЛИЦИН.....	111
5.1. Органолептические свойства.....	111
5.2. Физические параметры.....	111
5.3. Морфология композиции.....	113
5.4. Дифракционная картина.....	115

5.5. Термическое поведение .....	116
5.6. Спектральные свойства .....	118
5.6.1. Характеристические полосы поглощения в инфракрасной области.....	118
5.6.2. Спектральные данные в ультрафиолетовой и видимой областях .....	120
5.6.3. Химические сдвиги на спектре ядерного магнитного резонанса .....	121
5.7. Выводы по главе 5.....	123
ГЛАВА 6. РАЗРАБОТКА МЕТОДИК КОНТРОЛЯ КАЧЕСТВА.....	124
6.1. Количественное определение дигидрокверцетина .....	124
6.1.1. Валидация методики .....	124
6.1.2. Установление норматива качества .....	127
6.2. Количественное определение глицина.....	128
6.2.1. Способы дериватизации .....	128
6.2.2. Валидация методики .....	132
6.2.3. Установление норматива качества .....	135
6.3. Тяжелые металлы и мышьяк .....	135
6.4. Проект спецификации на субстанцию дигидрокверцетин-глицин .....	136
6.5. Выводы по главе 6.....	138
ГЛАВА 7. НЕЙРОПРОТЕКТОРНАЯ АКТИВНОСТЬ И ЦИТОТОКСИЧНОСТЬ .....	139
7.1. Скрининг мишеней нейропротекторного действия .....	139
7.2. Цитотоксичность .....	142
7.3. Выводы по главе 7.....	147
ЗАКЛЮЧЕНИЕ .....	148
ОБЩИЕ ВЫВОДЫ .....	149
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	151
ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ.....	152
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ .....	153
СЛОВАРЬ ТЕРМИНОВ.....	154
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	155
Приложение А. Акт внедрения в учебный процесс .....	178
Приложение Б. Акт внедрения в производственный процесс .....	179
Приложение В. Способы получения дигидрокверцетина .....	180

## ВВЕДЕНИЕ

### Актуальность темы исследования

В соответствии со Стратегией действий в интересах граждан старшего поколения в Российской Федерации до 2030 года, утвержденной Распоряжением Правительства России от 07 апреля 2025 г. №830-р, одной из ключевых задач является создание условий для здорового долголетия, в том числе за счет улучшения лекарственного обеспечения. Однако, увеличение продолжительности жизни населения сопряжено с ростом заболеваний у лиц пожилого возраста, в том числе нейродегенеративных, в частности, болезни Альцгеймера (БА), которая проявляется прогрессирующим снижением памяти и других когнитивных функций на фоне постепенной гибели нейронов коры больших полушарий головного мозга. По прогнозам ВОЗ, к 2050 году число пациентов с БА в мире увеличится до 106,8 миллионов человек, из которых 16,51 млн будет приходиться на европейский регион. Этиология БА до конца не выяснена: причинами заболевания в настоящее время считают накопление внеклеточных  $\beta$ -амилоидных бляшек, возникновение внутриклеточных агрегатов гиперфосфорилированного tau-белка, глубокий оксидативный стресс и потерю синаптических связей в определенных областях мозга. Разработка лекарственных средств (ЛС) для терапии БА является актуальной задачей. Поиск новых соединений ведется среди субстанций синтетического, биотехнологического и растительного происхождения.

Дигидрокверцетин (ДКВ), по литературным данным, ингибирует образование фибрилл  $\beta$ -амилоида, защищает нейроны, улучшает мозговой кровоток и когнитивные способности. ДКВ производится в промышленных масштабах и зарегистрирован в качестве фармацевтической субстанции (ФС 000388-270812). Как и многие биофлавоноиды, ДКВ очень мало растворим в воде при комнатной температуре, что является биофармацевтическим ограничением при разработке ЛС на его основе. Специалистами по инженерии кристаллов предпринимаются попытки повысить растворимость флавоноидов путем получения кокристаллических и коаморфных композиций с различными коформерами. В последнее десятилетие арсенал коформеров пополняется за счет  $\alpha$ -аминокислот. Аминокислота глицин (ФС 001825-280125) так же, как и ДКВ, способна воздействовать на звенья биохимических механизмов нейродегенеративных заболеваний. Глицин регулирует активность c-Jun N-терминальных киназ и тем самым предотвращает дегенерацию нервной ткани. Учитывая мультитаргетное нейропротекторное действие ДКВ и глицина, от их композиции можно ожидать сочетанную биологическую активность.

### **Степень разработанности темы исследования**

Скрининг фармакологической активности ДКВ был проведен научной группой Московской медицинской академии им. И.М. Сеченова под руководством профессора Н.А. Тюкавкиной совместно с РНИМУ им. Н.И. Пирогова (Теселкин Ю.О., Бабенкова И.В.) и ВИЛАР (Сокольская Т.А., Колхир В.К., Быков В.А.).

Пероральный прием ДКВ связан с улучшением когнитивных функций и отсутствием побочных эффектов у пациентов с легкой деменцией. В 2025 году Национальный церебральный и сердечно-сосудистый центр (Суйта, Осака, Япония) и компания Towa Pharmaceutical Co., Ltd анонсировали рандомизированное, двойное слепое, плацебо-контролируемое клиническое исследование под названием “Taxifolin for prevention of COGnitive impairment (T-COG trial)”, что свидетельствует о заинтересованности зарубежных исследователей в разработке нейропротекторных средств на основе ДКВ.

### **Цель и задачи исследования**

Целью диссертационного исследования является научно-обоснованная разработка состава, способа получения и аналитических подходов для характеристики и контроля качества композиции дигидрокверцетина и глицина как основы создания нейропротекторного лекарственного средства.

Для достижения цели поставлены следующие задачи:

1. Изучить литературные источники по синтезу композиций флавоноидов с аминокислотами, методам их анализа и исследованию биологической активности;
2. Обосновать состав композиции ДКВ с глицином и разработать оптимальный способ ее получения путем инженерии кристаллов;
3. Предложить комплексный подход к характеристике композиции ДКВ-глицин и ее компонентов с учетом стереохимических особенностей твердой фазы;
4. Разработать и валидировать методики количественного определения компонентов композиции;
5. Составить проект спецификации на субстанцию ДКВ-глицин;
6. Провести скрининг молекулярных мишеней нейропротекторной активности ДКВ;
7. Исследовать цитотоксичность композиции ДКВ-глицин.

### **Научная новизна**

Впервые получена монофазная композиция ДКВ-глицин, в которой аминокислота является не только кофактором, но и действующим веществом.

Впервые в процессе выбора объекта для супрамолекулярного синтеза композиции установлен стереоизомерный состав ДКВ в промышленных образцах.

В ходе фундаментальных исследований продукта, полученного путем распылительной сушки, разделены и идентифицированы методом ВЭЖХ-МС  $\sigma$ -диастереомеры дигидрокемпферола.

Разработаны и валидированы методики количественного анализа ДКВ и глицина в композиции.

Установлен пониженный уровень цитотоксичности композиции по сравнению с фармацевтической субстанцией Дигидрокверцетин на культурах клеток эпителия пупочной вены человека (HUVEC) и эмбриональных почек человека (НЕК293).

### **Теоретическая и практическая значимость работы**

Теоретическая значимость работы заключается в исследовании стереохимических особенностей компонентов композиции:  $\sigma$ -диастереомеризации ДКВ и хирального полиморфизма глицина. Установлен факт самопроизвольного перехода *транс*-ДКВ в *цис*-изомер при хранении водных растворов при комнатной температуре, а также в процессе получения композиции путем лиофилизации. Фундаментальной частью работы по разработке методики количественного определения  $\sigma$ -диастереомеров ДКВ является изучение кинетики реакции изомеризации *транс*-ДКВ в *цис*-изомер.

Практическая значимость работы обеспечивается использованием легко поддающегося масштабированию способа получения композиции. Сублимационная сушка, выбранная для супрамолекулярного синтеза композиции ДКВ-глицин, пригодна к дальнейшей разработке лекарственных форм для парентерального применения.

Для стерилизации композиции предложен метод облучения потоком быстрых электронов, который не влияет на  $\sigma$ -диастереомерный состав флавоноида.

### **Методология и методы исследования**

Методология базировалась на изучении и сравнительной оценке литературных данных по синтезу композиций флавоноидов и аминокислот, методам их анализа и биологической активности. Композицию ДКВ-глицин получали путем инженерии кристаллов под контролем электронной микроскопии и характеризовали следующими физико-химическими методами: сканирующая электронная микроскопия (СЭМ), рентгеновская порошковая дифрактометрия (РПД), дифференциальная сканирующая калориметрия (ДСК), термогравиметрия (ТГ), поляриметрия (ПМ), спектрометрия в инфракрасной области (ИК-спектрометрия),

спектроскопия ядерного магнитного резонанса (спектроскопия ЯМР). Методики количественного определения компонентов композиции разрабатывали на основе высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) и спектрофотометрии (СФМ). Прогнозирование значений  $P_a$  и  $P_i$  осуществляли в программе PASS (Prediction of Activity Spectra for Substances, версия 2.0, Way2Drug.com). Цитотоксичность композиции определяли на четырех линиях культуры клеток при помощи ССК-8 (Cell Counting Kit - 8). Статистическую обработку результатов экспериментов проводили с помощью программного обеспечения Microsoft® Excel® в соответствии с ОФС.1.1.0013 ГФ РФ XV издания и ОФС 2.3.13.0. Фармакопеи ЕАЭС. В обобщенном виде объекты и дизайн исследования приведены на рисунке 1.

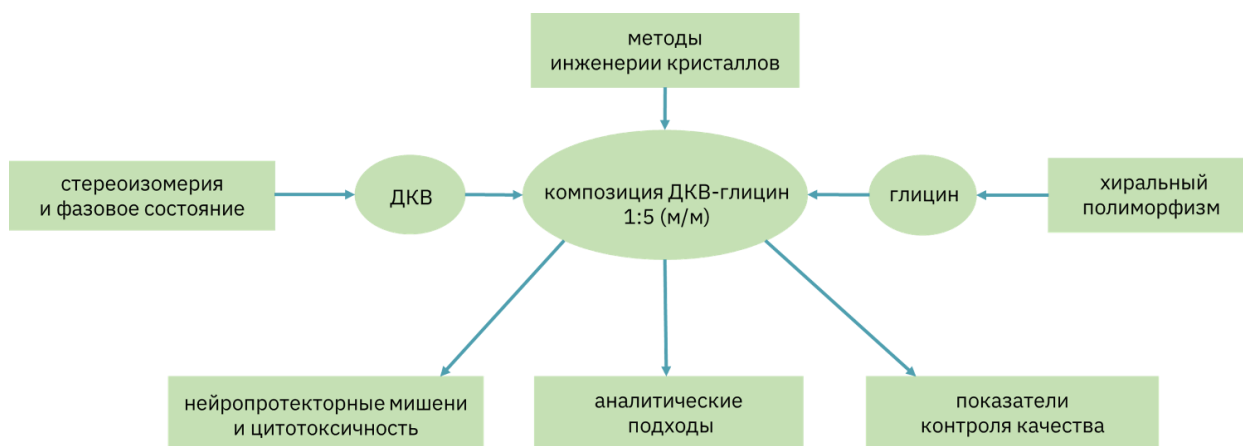


Рисунок 1 – Объекты и дизайн исследования

### Личный вклад автора

Основная часть работы была выполнена лично автором и состояла: в сборе, анализе и обобщении данных из литературных источников по получению композиций флавоноидов с аминокислотами; определении направления диссертационной работы, формулировании цели и задач, выборе объектов и построении дизайна исследования; обнаружении самопроизвольной  $\sigma$ -диастереомеризации ДКВ в водном растворе и изучении кинетики реакции перехода *транс*-ДКВ в *цис*-изомер; получении композиции ДКВ-глицин методом супрамолекулярного синтеза; характеристике композиции ДКВ-глицин комплексом физико-химических методов в сочетании с экспериментами *in silico* и *ex vivo*; разработке аналитических методик идентификации и количественного определения компонентов в составе композиции ДКВ-глицин; проведении статистико-математической обработки и обобщении полученных результатов на каждом этапе исследования.

### Положения, выносимые на защиту

1. Способ получения композиции ДКВ-глицин методом лиофилизации.
2. Оптимизированная методика хроматографического разделения  $\sigma$ -диастереомеров ДКВ и аромандрина методом ВЭЖХ-МС на *цис*-обогащенном образце ДКВ.
3. Данные сравнительного анализа стереоизомерного состава ДКВ в лиофилизате композиции методами ВЭЖХ и ЯМР  $^1\text{H}$ .
4. Комплексный подход к характеристике морфологии, фазового состояния и физико-химических параметров на основе микроскопических, дифракционных, термических, спектральных и хироптических методов анализа.
5. Разработанная и валидированная методика количественного определения ДКВ и глицина в составе композиции.
6. Прогноз биологической активности и цитотоксичности полученной композиции в экспериментах *in silico* и *ex vivo*.
7. Показатели и методы контроля качества в спецификации на ДКВ-глицин.

### Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Научные положения диссертации соответствуют паспорту научной специальности 3.4.2. Фармацевтическая химия, фармакогнозия, конкретно направлениям исследований 1, 2 и 3.

### Степень достоверности и апробация результатов

Полученные результаты и выводы являются достоверными, поскольку основаны на проработке более 100 литературных источников по получению и анализу коаморфных и кокристаллических композиций флавоноидов с аминокислотами, на многократном повторении измерений (3- или 6-кратном в зависимости от эксперимента), выполненных на сертифицированном оборудовании, внесенном в Государственный реестр средств измерений; на значительном числе обобщенного табличного материала, спектров и хроматограмм по разделению  $\sigma$ -диастереомеров дигидрокверцетина, представленных в диссертации. Разработанные методики валидированы, полученные результаты статистически обработаны согласно требованиям ОФС.1.1.0012 ГФ РФ XV и статьи 2.3.14.0. Фармакопеи ЕАЭС.

Результаты диссертационной работы были обсуждены на 17 конференциях, в том числе «Студенческая медицинская наука XXI века» (Витебск, 26–27 октября 2022 г.), «Неделя фармации», диплом II степени (Москва, 13–17 ноября 2023 г.), «Молодая фармация – потенциал будущего» (Санкт-Петербург, 28 марта – 02 апреля 2024 г.), "МЕДХИМ 2024" (Нижний Новгород, 01–04 июля 2024 г.), "MENDELEEV 2024" (Санкт-Петербург, 02–06 сентября 2024 г.),

Менделеевский съезд по общей и прикладной химии (ФТ «Сириус», 07–12 октября 2024 г.), «Современные достижения фармацевтических наук» (Рязань, 03 июня 2024 г.), Интеграционные связи фармацевтической экологии (Москва, 30 октября – 1 ноября 2024 г.), XVIII конгресс «Разработка и регистрация лекарственных средств» (Москва, 26–27 февраля 2025 г.), Международный съезд Фитофарм (Санкт-Петербург, 08–10 октября 2025 г.), «Фенольные соединения: фундаментальные и прикладные аспекты» (Москва, 13–17 октября 2025 г.).

Апробация диссертации состоялась на межкафедральной конференции в Институте фармации им. А.П. Нелюбина ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), протокол № 10 от «05» марта 2026 года.

### **Внедрение результатов в практику**

Основные научные положения, выводы и рекомендации диссертации внедрены в образовательный процесс на кафедре химии Института фармации им. А.П. Нелюбина ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) (акт внедрения №704 от «08» июля 2025 г., Приложение А). Аналитическая методика, позволяющая определять диастереомерный состав дигидрокверцетина в составе лиофилизата дигидрокверцетин-глицин, внедрена в работу отдела контроля качества ООО «Робиос» (акт внедрения от «20» октября 2025 г., Приложение Б).

### **Связь исследования с проблемным планом фармацевтической науки**

Диссертация выполнена в рамках темы научно-исследовательской работы, закрепленной за кафедрой химии Института фармации им. А.П. Нелюбина ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), «Разработка подходов к анализу, стандартизации, оценке качества, и сертификации биологически активных соединений синтетического и природного происхождения, лекарственных препаратов, медицинских изделий (технологические и экологические аспекты)», номер государственной регистрации 01.200.118796. проводили при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 23-75-01130).

### **Публикации по теме диссертации**

По результатам исследования автором опубликовано 27 работ, в том числе 4 научные статьи в журналах, включенных в Перечень рецензируемых научных изданий Сеченовского Университета / Перечень ВАК при Минобрнауки России, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук; 5

статей в изданиях, индексируемых в международных базах Web of Science, Scopus; 2 иные публикации по результатам исследования; 16 публикаций в сборниках материалов международных и всероссийских научных конференций (из них 2 зарубежные конференции).

### **Структура и объем диссертации**

Диссертационная работа имеет следующую структуру: введение, 7 глав основной части, заключение, список сокращений и условных обозначений, словарь терминов и 3 приложения. Диссертация напечатана на 182 страницах машинописного текста, содержит 35 таблиц и 97 рисунков. Список литературы включает 257 источников, из них 212 зарубежных.

## **ГЛАВА 1. КОМПОЗИЦИИ ФЛАВОНОИДОВ И АМИНОКИСЛОТ: СИНТЕЗ, БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ И АНАЛИТИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ (обзор литературы)**

Лекарственные средства (ЛС), получаемые из растительного сырья, многие годы применяются в медицине, но при этом не потеряли своей актуальности и в наши дни. По прогнозам аналитического агентства Data Bridge Market Research совокупный среднегодовой темп роста мирового рынка лекарственного растительного сырья до 2032 года составит 11,16 % [1]. Основными причинами постоянно растущего спроса на фитопрепараты (ФП) и благосклонного отношения потребителей к ним считают: относительную безопасность действия, ограниченное число побочных эффектов, ценовую доступность, возможность рационального сочетания ФП как между собой, так и с синтетическими ЛС. В настоящее время в Российской Федерации зарегистрировано 533 наименования препаратов, полученных из лекарственного растительного сырья, что составляет 40% от общего числа лекарственных средств [2], в более чем половине из них основной группой действующих веществ являются флавоноиды, в связи с широким спектром биологической активности, в том числе, нейропротекторной [3]. Антиамилоидогенные свойства были обнаружены у нобилетина [4], лютеолина [5], эпигаллокатехин-3-галлата [6], мирицетина [7, 8] и дигидрохверцетина [9]. Способность снижать фосфорилирование тау-белка проявили эпигаллокатехин-3-галлат [10], морин [11], цианидин-3-О-глюкозид [12] и лютеолин [5].

Биофлавоноиды зачастую очень мало растворимы в воде при комнатной температуре, что вызывает биофармацевтические ограничения при разработке лекарственных препаратов на их основе, особенно жидких лекарственных форм. Для преодоления этого препятствия специалистами по инженерии кристаллов предпринимаются попытки повысить растворимость флавоноидов путем получения кокристаллических и коаморфных композиций с различными коформерами. Учитывая кислотный характер фенольных гидроксильных групп флавоноидов в качестве коформеров выбирают органические соединения, содержащие основные центры такие как, никотиновая, изоникотиновая кислоты и их производные [13, 14]. В последнее время арсенал коформеров пополняется за счет  $\alpha$ -аминокислот.

## 1.1. Флавоноиды

Флавоноиды – это крупный класс полифенольных соединений природного происхождения, которые содержат ядро флавана в своей структуре (Рисунок 1.1).

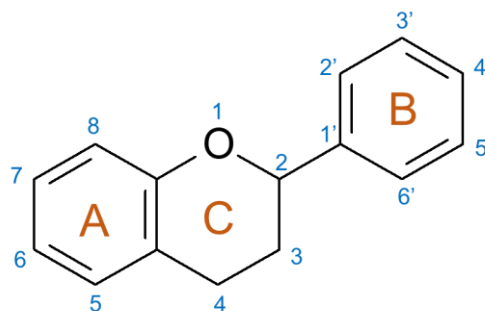


Рисунок 1.1 – Структура флавана

Польский химик-органик, профессор Берлинского университета Станислав Костанецкий (Stanisław Kostanecki) в 1895 году установил, что известные желтые пигменты растений, такие как галангин и кемпферид, являются производными гипотетического на тот момент вещества, которое он назвал «флаван» [15]. В начале 50-х годов XX века сотрудник лаборатории биосинтеза Института биохимии имени А.Н. Баха Академии наук СССР Михаил Николаевич Запрометов предложил все соединения, содержащие ядро флавана, вне зависимости от их окраски, называть флавоноидами [16]. По существу, большинство групп флавоноидов представляют собой производные 1,3-дифенилпропана: пропановым «мостиком» пиранового фрагмента (кольцо С) соединены два фенильных остатка (кольца А и В).

### 1.1.1. Структура и стереоизомерия

Несмотря на общую схему построения, флавоноиды характеризуются значительным структурным разнообразием. Производные 1,3-дифенилпропана, содержащие кольцо В у С-2, называют флавоноидами. Производные 1,2-дифенилпропана, у которых кольцо В находится у С-3 – изофлавоноидами, а производные 1,1-дифенилпропана – неофлавоноидами. К флавоноидам также относят и халконы, в структуре которых отсутствует кольцо С (Рисунок 1.2). Халконы являются биогенетическими предшественниками флавоноидов. Наличие кратной связи между С-2 и С-3 определяет принадлежность к группе флавонов, а ее отсутствие – к группе флаванов. Большинство флавоноидов и изофлавоноидов содержит карбонильную группу у С-4: флавоны,

изофлавоны, флаваноны, флавонолы и флаванолы. Представители последних двух групп характеризуются еще одним классификационным критерием – наличием гидроксильной группы у С-3.

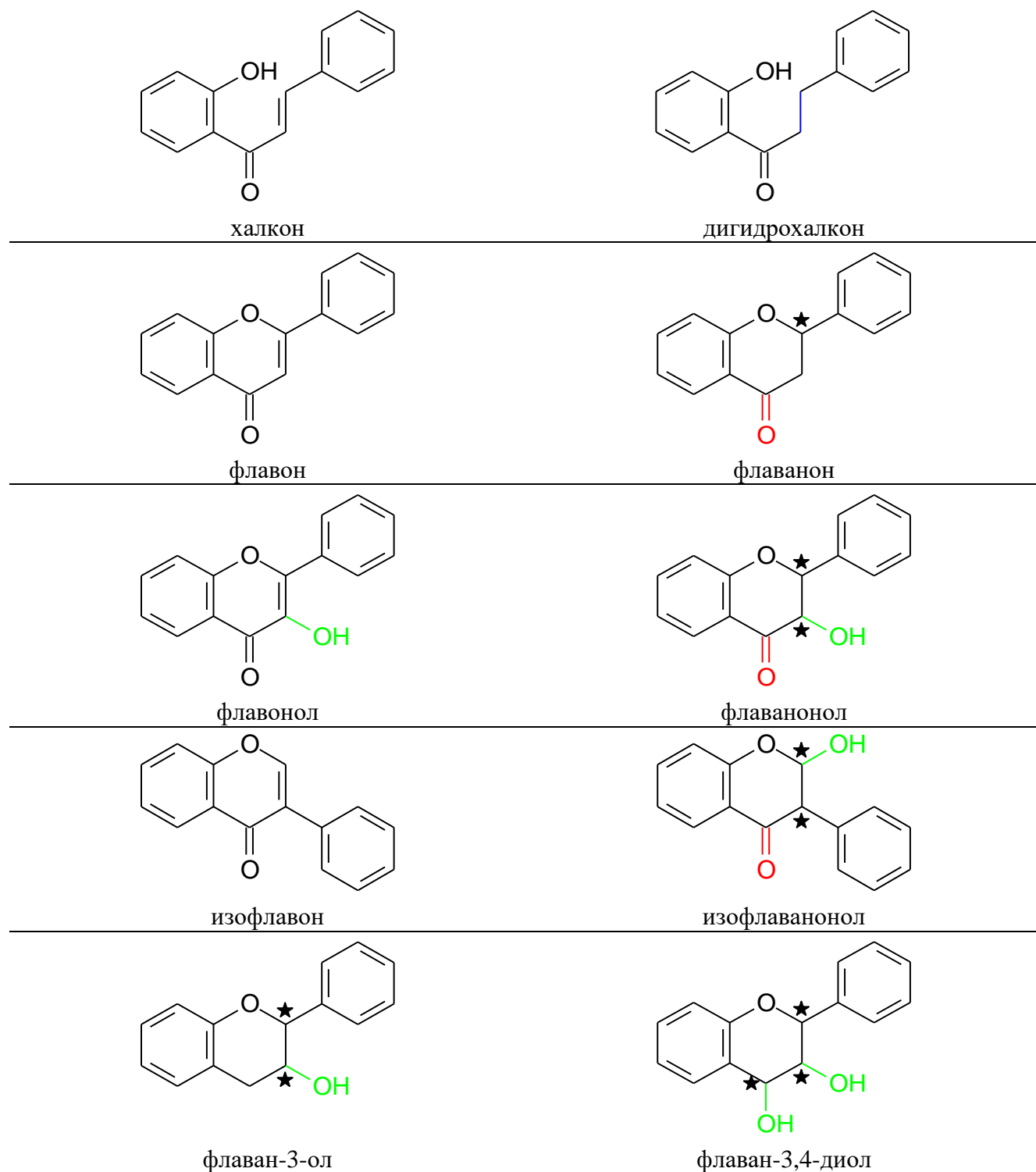


Рисунок 1.2 – Базовые структуры групп флавоноидов, представители которых исследованы в композициях с аминокислотами

Для флаванонов и флаванолов характерно явление стереоизомерии. Атом С-2 подавляющего большинства флаванонов имеет (*S*)-конфигурацию, так как в процессе биогенеза фермент халкон-изомераза (ЕС 5.5.1.6) катализирует нуклеофильное присоединение ОН-группы у С-2' с *si*-стороны двойной связи [17]. У флаванолов появляется второй центр хиральности – атом С-3, находящийся преимущественно в (*R*)-конфигурации, что также связано со стереоспецифичностью действия фермента, в данном случае, флаванон-3-гидроксилазы, которая по современной классификации называется флаванон-3-диоксигеназа (ЕС 1.14.11.9) [18]. Природные *cis*-флаванолы обнаруживаются в качестве полупродуктов биосинтеза антоцианов [19].

Стереоизомерия также характерна и для флаван-3-олов (катехин, эпикатехин, галлокатехин, эпигаллокатехин), у которых отсутствует карбонильная группа у С-4. В растениях значительная часть флавоноидов существует в гликозилированной форме, в основном в виде *O*-гликозидов, но встречаются и «*C*-гликозиды». Углеводные фрагменты обычно содержат 1-3 остатка моносахарида, в роли которых выступают D-глюкоза, D-галактоза, D-ксилоза, L-рамноза, L-арабиноза и их ацилированные формы [20].

### 1.1.2. Биофлавоноиды высших растений

Флавоноиды, насчитывающие около 40 000 соединений, широко распространены в растительном мире и являются вторичными метаболитами растений [21, 22]. Так, по данным ресурса LOTUS (*2R,3R*)-дигидрокверцетин был обнаружен в 178 видах растений [23]. Флавоноиды выполняют роль антиоксидантов в клетках растений, фильтруют ультрафиолетовое излучение, симбиотически фиксируют азот, защищают от патогенов и вредителей, а также действуют как химические посредники в растениях, физиологические регуляторы и ингибиторы клеточного цикла [24].

Флавоноиды постоянно поступают в организм человека с растительной пищей. Среднее потребление общего количества флавоноидов жителями европейского региона составляет 428 мг/сут [25]. Например, пищевыми источниками дигидрокверцетина служат плоды винограда (*Vitis vinifera* L.), семена арахиса (*Arachis hypogaea* L.), плоды фасоли угловатой (*Vigna angularis* (WILLD.) ONWI & N. OHASHI) и трава душицы мексиканской (*Lippia graveolens* KUNTH) [26, 27].

Сырьем для промышленного получения ФП, содержащих флавоноиды, служат ткани и органы высших растений. Так, рутин выделяют из цветочных бутонов софоры японской (*Styphnolobium japonicum* (L.) SCHOTT) и вегетативной массы гречихи посевной (*Fagopyrum*

*esculentum* MOENCH) [28]. Комплекс флаволигнанов Силимарин экстрагируют из плодов расторопши пятнистой (*Silybum marianum* (L.) GAERTN) [29]. Флавоноидный экстракт, входящий в состав препарата Хелепин-Д, получают из травы десмодиума канадского (*Desmodium canadense* (L.) DC.) [30]. Гесперидин для производства препарата Детралекс® получают из незрелых плодов апельсина (*Citrus × sinensis* (L.) OSBECK) [31].

Особое внимание обращает на себя важный источник выделения дигидрокверцетина – древесина лиственницы сибирской (*Larix sibirica* LEDEB.) и лиственницы Гмелина (*Larix gmelinii* (RUPR.) GÖPP.), которой богаты леса Восточной Сибири и Дальнего Востока России, что обеспечивает стабильную сырьевую базу. Древесина лиственницы ценна для деревообрабатывающей и целлюлозно-бумажной отраслей, а оставшаяся после спила дерева комлевая часть ствола является сырьем для промышленного производства дигидрокверцетина. Научной группой под руководством профессора Н.А. Тюкавкиной было предложено использовать в качестве сырья опилки из комлевой зоны древесины лиственницы. Такой подход сделал эту технологию безотходной и стал примером рационального использования природных ресурсов для получения лекарственных средств.

Впервые в СССР способ выделения дигидрокверцетина был запатентован в 1970 году, однако оптимизация способов получения ДКВ вызывает большой интерес и продолжается до настоящего времени. Поскольку используемые подходы могут влиять на компонентный состав экстрактов, нами проведена систематизация патентов, которых к 2025 году насчитывается более 30. Запатентованные в СССР и РФ способы выделения ДКВ приведены в таблице (Приложение В). В зависимости от используемого экстрагента все известные способы можно разделить на четыре группы:

- 1) экстракция водой и водно-органическими смесями;
- 2) экстракция водно-органическими смесями;
- 3) экстракция органическими растворителями;
- 4) экстракция сверхкритическими растворителями.

Важно отметить, что производители биологически активных добавок к пище ЗАО «Эвалар», АО «Аметис», ООО «Робиос», ООО Сибирский Кедр, ООО «ФарХимТек», ООО «Кахор-Продукт», ООО «СибПрибор», ООО «Фитовит», ПАО «ДИОД» и многие другие включают данный флавоноид, получаемый различными запатентованными способами, в состав своих продуктов.

Внимание исследователей к оптимизации способов получения ДКВ связано не только со стремлением повысить выход целевого продукта, но и сопряжено с желанием сохранить нативную конфигурацию центров хиральности этого флаванолола.

### 1.1.3. Биологическая активность

Было замечено, что люди, рацион которых насыщен фруктами и красным вином, меньше страдают от сердечно-сосудистых [32], воспалительных [33], онкологических [34] и нейродегенеративных [35] заболеваний. Это явление обычно объясняют особенностями питания, так называемой средиземноморской диетой, а именно регулярным поступлением в организм человека полифенольных соединений, содержащихся в пищевых продуктах, для которых были установлены антирадикальные и антиоксидантные свойства, на протяжении долгих лет считающиеся многими исследователями причиной широкого спектра биологической активности [36, 37, 38].

*Антирадикальная активность.* В соответствии с общепринятой точкой зрения, флавоноиды проявляют антирадикальную активность, основанную на следующих механизмах: переноса атома водорода (Hydrogen Atom Transfer, HAT), переноса одного электрона с последующим присоединением протона (Single Electron Transfer via Proton Transfer, SET-PT), последовательной потери протона и переноса электрона (Sequential Proton Loss Electron Transfer, SPLET) и хелатирования переходных металлов (Transition Metal Chelation, TMC) [39, 40, 41].

Перенос атома водорода включает перенос двух элементарных частиц: протона и электрона [42]. Антиоксиданты-флавоноиды передают атомы водорода молекулам радикалов, что приводит к образованию устойчивых нерадикальных соединений и флавоноидных радикалов, стабилизированных за счет *p,π*-сопряжения неспаренного электрона с ароматическим кольцом [43]. В результате проведения многочисленных исследований взаимосвязи между структурой флавоноидов и антиоксидантной активностью было показано, что гидроксильные группы кольца В являются наиболее эффективными скэвенджерами активных форм кислорода и азота (Рисунок 1.3) [44, 45].

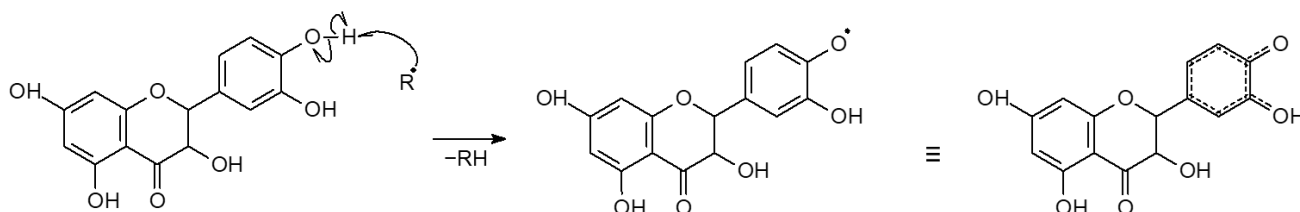


Рисунок 1.3 – Механизм антирадикального действия за счет переноса атома водорода

Другой механизм антирадикального действия флавоноидов связан с переносом одного электрона, в результате чего радикал переходит в свою менее реакционноспособную анионную форму. После этого анион присоединяет протон, образуя стабильное соединение (Рисунок 1.4) [46]. Получающиеся из флавоноидов катион-радикалы относительно стабильны и с трудом

вступают в реакцию с другими химическими соединениями, что связано с эффективной делокализацией положительного заряда в ароматическом кольце фенольного соединения.

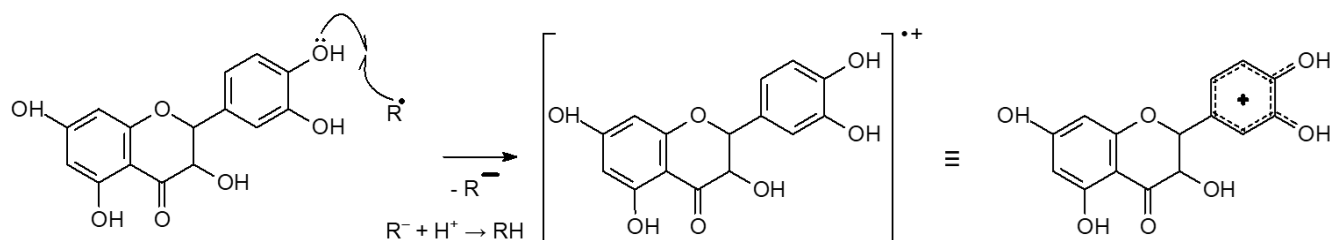
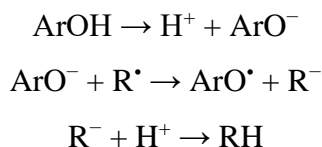
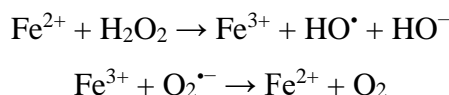


Рисунок 1.4 – Механизм антирадикального действия за счет переноса одного электрона с последующим присоединением протона

По механизму SPLET фенольный гидроксил, проявляющий кислотные свойства, на первом этапе диссоциирует на протон и феноксид-ион, а последний отдает электрон радикалу, что приводит к образованию стабильного феноксильного радикала:



Хелатирование ионов переходных металлов является важным вкладом в механизм именно антиоксидантного действия флавоноидов [47]. При исследовании обнаруженного в 1894 г. Генри Джоном Хорстманом Фентоном (Henry John Horstman Fenton) взаимодействия пероксида водорода с ионами железа выяснилось, что ионы металлов переменной валентности способны восстанавливать пероксид водорода до гидроксильного радикала [48]. Катион железа(III) окисляет супероксид-радикал до кислорода:



Образующийся гидроксильный радикал обладает самой высокой активностью по сравнению с другими эндогенными прооксидантами и участвует во многих процессах окисления органических веществ, главным образом пероксидного окисления липидов [49]. Поскольку катионы переходных металлов способствуют образованию радикалов и тем самым являются инициаторами пероксидного окисления, связывание ионов этих металлов является важным вкладом флавоноидов в защиту организма от оксидативного стресса [50, 51, 52]. Более того, при образовании комплексов с катионами переходных металлов, например,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Cu}^+$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ , способность флавоноидов нейтрализовать радикалы возрастает (Рисунок 1.5).

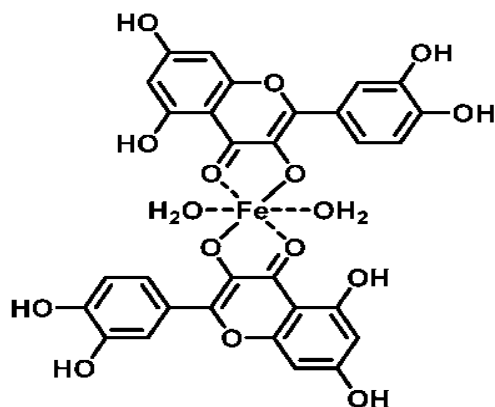


Рисунок 1.5 – Пример комплекса кверцетина с катионом железа [50]

Этот эффект достигается благодаря супероксиддисмутазной активности комплексов, то есть они способствуют диспропорционированию супероксид-радикала в менее реакционноспособные кислород и пероксид водорода (Рисунок 1.6) [53, 54, 55].

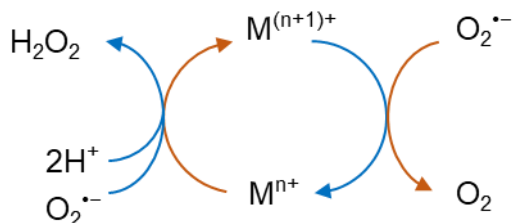


Рисунок 1.6 – Супероксиддисмутазная активность комплексов флавоноидов с катионами переходных металлов. М – переходный металл: Cu (n=1), Mn (n=2), Fe (n=2), Ni (n=2).

Красная стрелка – окисление, синяя стрелка – восстановление

Следует отметить, что в последнее время к флавоноидам повышается интерес как к веществам, биологический эффект которых не ограничивается исключительно антиоксидантной активностью, а является результатом специфических взаимодействий с белками [56].

*Взаимодействие с белковыми мишенями.* Многие фармакологические свойства ЛП обусловлены взаимодействием молекулы лекарственного вещества (лиганда) с белковой мишенью. Флавоноиды, транспортируясь альбуминами и липопротеинами, могут попадать в область липидных рафтов или кавеол и влиять на функционирование регуляторных систем, находящихся в этих мембранах. Снижая экспрессию кавеолина-1 и циклооксигеназы 2, галлат эпигаллокатехина (EpiGalloCatechin Gallate, EGCG) подавляет воспалительные процессы в клетках эндотелия [57]. Кроме того, снижение экспрессии кавеолина-1 полифенолами зеленого чая является причиной повышения проницаемости гематоэнцефалического барьера в области ишемии мозга [58]. Противовоспалительное действие кверцетина связано со способностью подавлять регуляторные функции различных киназ, среди которых можно назвать c-Jun, p38, Akt, Src, янус-киназу 1 (Janus Kinase 1, JAK1), тирозин-протеинкиназу 2 (Tyrosine-protein Kinase 2,

ТҮК2), ядерный фактор κВ (Nuclear Factor κВ, NF-κВ [59]. Среди флавоноидов имеется большое число веществ, способных ингибировать активность медиаторов воспаления: фосфолипазы А2, липоксигеназы и циклооксигеназы [72].

Противоопухолевый эффект EGCG реализуется, в том числе, через блокирование связывания фактора роста эпителия (Epidermal Growth Factor, EGF) с рецептором этого белка (Epidermal Growth Factor Receptor, EGFR). Кроме того, EGCG может вызывать апоптоз раковых клеток благодаря взаимодействию с рецептором ламинина 67RL (67 kDa Receptor Laminin). Кверцетин способен перемещать в рафты рецепторы клеточной смерти (Death Receptor) DR4 и DR5, что способствует их взаимодействию с цитокином TRAIL (Tumor necrosis factor-Related Apoptosis-Inducing Ligand) и активирует апоптоз клеток рака [60]. На сигнальную систему TRAIL флавоноиды могут действовать и через каспазы, Bcl-2, Dcl-XL, Akt [61]. Кверцетин подавляет продуцирование фактора некроза опухолей α (Tumor Necrosis Factor α, TNF-α) и интерлейкина-1 β (Interleukin-1 β, IL-1β) [62]. Благодаря подавлению сигналов рецептора тирозинкиназ катехины зеленого чая могут оказывать терапевтическое действие на многие типы опухолевых клеток [63].

Гипохолестеринемический эффект EGCG связан с нарушением функционирования апикального транспортёра натрия и желчных кислот (Apical Sodium–Bile acid Transporter, ASBT), ответственного за реабсорбцию холестерина в кишечнике [64].

EGCG ингибирует активность интегрин β1, что приводит к снижению провоспалительного ответа моноцитов [65]. Апигенин [66], кемпферол [67], глабридин [68] блокируют интегрин, что препятствует росту и метастазированию опухолей.

Противовоспалительное, нейропротекторное, антидиабетическое и противовирусное действие некоторых флавоноидов реализуется через взаимодействие с рецепторами, активирующими пролиферацию пероксисом (Peroxisome Proliferator-Activated Receptors, PPAR) [69, 70, 71].

Флавоноиды также могут быть эффективны в борьбе с ожирением. Так, кверцетин снижает секрецию адипокина висфатина, но не влияет на секрецию лептина и адипонектина [72]. Иной механизм влияния на метаболический синдром был обнаружен у нарингина, который способен активировать АМФ-зависимую протеинкиназу α посредством инициации фосфорилирования этого белка, что приводило к снижению инсулинорезистентности [73]. Генистеин оказался эффективным в предотвращении развития неалкогольного стеатогепатита. Под действием генистеина в тканях печени и плазме крови наблюдалось снижение концентрации TNF-α и IL-6, ингибирование фосфорилирования IκBα (nuclear factor of κ light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor α) и активация киназы JNK (c-Jun N-terminal Kinases) [74]. EGCG обладает выраженным действием против ожирения. Он подавляет адипогенез путем приостановки клеточного деления адипоцитов. Наблюдается ингибирование экспрессии генов, ответственных

за превращение фибробластов в адипоциты: C/EBP $\alpha$  (Cytosine-cytosine-adenosine-adenosine-thymidine-Enhancer-Binding Protein  $\alpha$ ) и PPAR $\gamma$  [75]. Полифенолы зеленого чая увеличивают концентрации супероксиддисмутазы и других ферментов антиоксидантной системы, поэтому могут быть эффективны в нормализации уровня глюкозы, триглицеридов и холестерина в крови. [76]. У животных, находящихся на диете, богатой жирами и углеводами, проантоцианидины виноградных косточек снижают уровень TNF- $\alpha$ , IL-6, маркеров макрофагов, повышают экспрессию адипонектина [77]. При этом наблюдается снижение процессов липогенеза в печени, экспрессируется ряд генов, участвующих в гликогенезе, гликолизе и липидном обмене в печени [78]. При приеме полифенольных соединений из кожуры красного винограда наблюдается снижение содержания триглицеридов в мышцах, повышается экспрессия инсулин-зависимого транспортера глюкозы GLUT4 (GLUcose Transporter 4) и ферментов окисления жиров в митохондриях. Снижается транспорт жирных кислот и накопление жиров в мышцах [79].

Было показано, что байкалеин [80, 81], кверцетин [82], мирицетин [83], процианидин [84] являются эффективными ингибиторами Р-гликопротеина, который принадлежит к семейству ABC-транспортеров и участвует в удалении лекарственных веществ из цитоплазмы.

Способность некоторых флавоноидов подавлять экспрессию ЦОГ-2 может лежать в основе механизмов защиты этих веществ против УФ-радиации, как это было показано на примере байкалеина и вогонина [85, 86], гесперетина, и тангеритина [87]. Флавоноид хризин защищает кератиноциты эпидермиса от повреждения облучением УФ-А и УФ-В, прежде всего, восстанавливая экспрессию аквапорина. В исследовании защитного действия эриодиктиола в отношении кератиноцитов было обнаружено, что этот флаванон действует через фосфатазо-зависимую модуляцию сигнальных путей p38 MAPK и Akt. Антоцианины ежевики защищают кератиноциты от УФ-радиации благодаря существенному повышению экспрессии антиоксидантных ферментов [88]. Процианидины винограда также предотвращают продуцирование активных форм кислорода в клетках, но используя иной механизм – подавление экспрессии p38 (MAPK14) и JNK1/2 (MAPK8) [89]. 5,7-Диметоксифлавонол защищает эпидермис, индуцируя меланогенез [90]. 7,3',4'-тригидроксиизофлавонол предотвращает развитие рака кожи, индуцированного ультрафиолетом, посредством действия на АТФ-связывающие сайты протеинкиназ Cot и MKK4 [91].

Была показана антимикробная активность катехинов в отношении штаммов актиномицетов и кандиды, связанная с продукцией пероксида водорода [92]. Нарушения в структуре мембран бактериальной стенки наблюдались при действии эпикатехина галлата (EpiCatechin Gallate, ECG) и галангина [93, 94]. Кверцетин, катехин, таксифолин инициируют агрегацию бактериальных клеток и повреждение мембран [95]. ECG способен нарушать функционирование пенициллин-связывающего белка [96]. Галангин, кверцетин и байкалеин способствуют преодолению  $\beta$ -

лактамазной антибиотикорезистентности [97]. Катехины, особенно EGCG, способны ингибировать активность гиразы бактериальной ДНК [98]. Антибактериальная активность кверцетина и апигенина связана со способностью этих флавоноидов ингибировать D-аланил:D-аланин-лигазу [99]. Флавоноиды морин, байкалеин и эпикатехин способны ингибировать АТФ-синтазу мембраны *E. coli*, нарушая таким образом энергетику клетки [100]. Флавоноиды способны нарушать функционирование различных ферментов, участвующих в синтезе мембранных липидов бактерий. Кверцетин, апигенин и (S)-сакуранетин способны подавлять активность  $\beta$ -гидроксиацил-переносящего белка [101]. Бутеин, изоликвиритигенин и физетин ингибируют синтазу жирных кислот [102]. Нарингенин, эриодиктиол и таксифолин способны подавлять активность  $\beta$ -кетоацил-переносящей синтазы [103].

Апигенин [104], 6-метилапигенин [105], динатин, скрофулеин [106], хризин [107], байкалин [108] проявляют нейротропное действие благодаря способности связываться с рецепторами  $\gamma$ -аминомасляной кислоты ( $\gamma$ -AminoButiric Acid, GABA). EGCG, кверцетин, морин, байкалеин способны влиять на функционирование глутаматных рецепторов. Существенной ингибирующей активностью в отношении ацетилхолинэстеразы обладает EGCG, кверцетин и ДКВ [109]. Флавоноиды перспективны в терапии нейродегенеративных заболеваний [110], в том числе против болезни Альцгеймера [3, 111]. Нобилетин [4], лютеолин [5], EGCG [6] и мирецетин [7, 8] препятствуют образованию бляшек  $\beta$ -амилоида – пептида, играющего одну из ключевых ролей в механизме развития болезни Альцгеймера.

Исследования *in vitro* показали, что (+)-ДКВ ингибирует образование фибрилл  $\beta$ -амилоида [112, 113]. Постулируемый механизм действия объясняет нарушение агрегации  $\beta$ -амилоида за счет ковалентного связывания боковой аминогруппы Lys<sup>16</sup> окисленным до *o*-хинона кольцом В (+)-ДКВ по типу аза-реакции Михаэля [114].

Masafumi Ihara с соавторами обнаружили, что ДКВ, введенный мышам с церебральной амилоидной ангиопатией, может ингибировать образование  $\beta$ -амилоидных олигомеров из мономера [115].

Наблюдательное когортное ретроспективное клиническое исследование, проведенное сотрудниками Национального церебрального и сердечно-сосудистого центра (Суйта, Осака, Япония) совместно с компанией Towa Pharmaceutical Co., Ltd, показало, что пероральный прием ДКВ был связан с улучшением когнитивных функций и отсутствием побочных эффектов у пациентов с умеренными когнитивными нарушениями или легкой деменцией [9]. Та же научная группа в 2025 году анонсировала рандомизированное, двойное слепое, плацебо-контролируемое клиническое исследование под названием “Taxifolin for prevention of COGnitive impairment (T-COG trial)” [116].

Учитывая биологическую, в особенности антиамилоидогенную, активность ДКВ, и принимая во внимание его безопасность, это соединение представляет интерес для разработки нейропротекторного лекарственного средства для терапии когнитивных нарушений.

#### 1.1.4. Лекарственные средства флавоноидной природы

Ввиду широкого спектра биологической активности флавоноиды являются неисчерпаемой кладовой для разработки лекарственных средств на их основе. В последний выпуск Государственной фармакопеи Российской Федерации (XV издание) включено 50 видов лекарственного растительного сырья (ЛРС), а в 22 из них нормируется количественное содержание флавоноидов [117].

В результате анализа содержания Государственного реестра лекарственных средств можно выделить четыре основных группы ФП, в составе которых имеются флавоноиды.

*Суммарные фитопрепараты.* Флавоноиды выступают действующими веществами в суммарных ФП, содержащих смесь представителей различных групп флавоноидов. Таковым является, например, желчегонный препарат Фламин, который получают из цветков Бессмертника песчаного (*Helichrysum arenarium* L. (MOENCH)). На Российском рынке представлен широкий ассортимент венотонизирующих препаратов, содержащих очищенную микронизированную флавоноидную фракцию (диосмин + флавоноиды в пересчете на гесперидин). Среди них, например, Детравенол<sup>®</sup>, Детралекс<sup>®</sup>, Флебавен<sup>®</sup>, Венолайф Дуо, Венарус<sup>®</sup>, Дуодивен Форте.

*Полусинтетические флавоноидные препараты.* Кроме ЛС, полученных из природного сырья выделением и очисткой, иногда проводят модификацию флавоноидов путем химического синтеза. Так, например, действующим веществом Венорутонa заявлена смесь *O*-( $\beta$ -гидроксиэтил)рутозидов. Основной компонент этой смеси, три-*O*-( $\beta$ -гидроксиэтил)рутозид, получил название Троксерутин и стал самостоятельной фармацевтической субстанцией, которая входит в состав одно- и многокомпонентных ангиопротекторных ЛС.

*Комбинированные лекарственные средства.* Существуют также комбинированные ЛС, содержащие флавоноиды. Представителем этой группы ФП является Аскорутин (Аскорбиновая кислота + Рутозид). Рутозид входит в препараты для лечения простудных заболеваний (Инфлюнет<sup>®</sup>, Пентафлуцин<sup>®</sup>, АнвиМакс<sup>®</sup>, Антигриппин, Дуоколд<sup>®</sup>). Антисептическое кишечное и вяжущее средство для лечения язвенной болезни желудка и двенадцатиперстной кишки и гастроэзофагеальной рефлюксной болезни Викалин также содержит рутозид.

*Индивидуальные природные флавоноиды.* К этой немногочисленной группе ФП можно отнести глюкопиранозидметилбутенилтригидроксифлаванол, выделяемый из листьев Бархата амурского (*Phellodendron amurense* RUPR.) и его разновидности бархата амурского Лавалея (*Phellodendron amurense var. lavalleyi* (DODE) SPRAGUE), который служит основным компонентом фармацевтической субстанции Флакозид.

Единственным хиральным монофлавоноидным ФП с установленной энантиомерной чистотой был Диквертин<sup>®</sup>, действующим веществом которого является дигидрокверцетин, получаемый из древесины лиственницы сибирской (*Larix sibirica* LEDEV.) или лиственницы Гмелина (*Larix gmelinii* (RUPR.) KUZEN. [syn. *Larix dahurica* TURCZ.]). Разработка препарата Диквертин<sup>®</sup> велась сотрудниками кафедры органической химии фармацевтического факультета Московской медицинской академии имени И.М. Сеченова под руководством профессора Тюкавкиной Н.А., Российского национального исследовательского медицинского университета им. Н.И. Пирогова (Теселкин Ю.О., Бабенкова И.В.) и Всероссийского научно-исследовательского института лекарственных и ароматических растений (Колхир В.К., Быков В.А., Сокольская Т.А.) [118, 119]. Методами рентгеноструктурного анализа и спектроскопии кругового дихроизма установлено, что дигидрокверцетин, входящий в Диквертин<sup>®</sup>, имеет (2*R*,3*R*)-конфигурацию [120, 121].

### 1.1.5. Биофармацевтические аспекты

Одной из проблем создания новых лекарственных средств на базе флавоноидов является низкая биодоступность, причинами которой многие исследователи считают ограниченную растворимость в воде при комнатной температуре и малую проницаемость сквозь клеточную мембрану. В связи с этим предпринимаются попытки использования различных технологических приемов для улучшения этих параметров.

*Микронизация.* Улучшить растворимость удается за счет увеличения площади поверхности вещества (микронизация), которое достигается осаждением антирастворителем или путем экстракции сверхкритическим растворителем [122, 123, 124]. Иногда с этой целью применяют лиофилизацию [125]. Микронизированные формы в виде наночастиц были получены для физетина [126], кверцетина [127], лютеолина [128], апигенина [129], морины [130] и нарингенина [131].

*Твердые дисперсии.* Повышенную растворимость также демонстрируют твердые дисперсии с водорастворимыми полимерами, такими как поливинилпирролидон или полиэтиленоксид-

полипропиленоксид [127, 132]. Qiu et al. добился увеличения растворимости генистеина более чем в 2000 раз для дисперсии 1:9 (м/м) [132].

*Комплексы включения.* Наибольшее распространение получили комплексы включения с циклодекстринами:  $\beta$ -циклодекстрином [127, 133, 134, 135, 136], гидроксипропил- $\beta$ -циклодекстрином [133, 136, 137, 138, 139, 140], амино- $\beta$ -циклодекстрином [141], сульфобутилэфир- $\beta$ -циклодекстрином [133, 137], метил- $\beta$ -циклодекстрином [133] и  $\gamma$ -циклодекстрином [142].

*Фитосомы.* Некоторые исследования направлены на получение комплексов флавоноидов с фосфолипидами, которые иначе называют фитосомами. Как правило, используются лецитин [134, 143, 144] и первый открытый представитель этой группы веществ – фосфатидилхолин [145, 146, 147, 148]. Наиболее заметное увеличение растворимости (в 216,70 раз) наблюдалось у кемпферола [148].

Помимо фосфолипидов используются и другие поверхностно-активные вещества. Guangjiao You с соавторами описал получение мицелл байкалеина с глицирризиновой кислотой [149]. Полученные частицы продемонстрировали увеличение растворимости в 4606 раз.

Также применяются комбинированные подходы. Zhang et al. получил комплекс даидзеин–фосфолипид, загруженный в липидные наноносители [150]. Zafar A. et al. предложили повысить растворимость генистеина путем включения его в комплекс гидроксипропил- $\beta$ -циклодекстрин–полоксамер 188 [151]. Нагруженные мирицетином нановолокна на основе гидроксипропил- $\beta$ -циклодекстрина и поливинилпирролидона, увеличившие растворимость флавоноида в воде более чем в 2600 раз, были получены с использованием технологии электропрядения [152]. Матричная дисперсия байкалеин-фосфолипид в поливинилпирролидоне была приготовлена методом прерывистого испарения растворителя [153].

*Кокристаллические и коаморфные композиции.* Немало работ посвящено получению кокристаллических и коаморфных композиций. Прибегая к использованию инженерии кристаллов, необходимо учитывать кислотный характер фенольных гидроксильных групп флавоноидов, поэтому самыми популярными коформерами являются соединения, содержащие амидную группу и/или пиридиновый атом азота, например, пиперазин [154, 155], никотинамид [156, 157], изоникотинамид [157, 158], теобромин [158], цитозин [158, 159], кофеин [156, 157, 160], пиперин [161], изониазид [160] и тиамин [159]. Некоторые кокристаллы были получены с аминокислотами, такими как лизин [162], аргинин [162] и пролин [157]. Наибольшее повышение растворимости наблюдалось у коаморфных систем генистеина с лизином и аргинином [162].

В целом, в разделе 1.1. литературного обзора основное внимание было уделено тем флавоноидам, которые уже использовались для получения композиций с аминокислотами.

## 1.2. Аминокислоты

В последнее десятилетие на роль коформеров к флавоноидам в инженерии кристаллов исследователи выбирают  $\alpha$ -аминокислоты, так как в их структуре содержатся кислотно-основные функциональные группы, которые являются потенциальными донорами и акцепторами водородных связей.

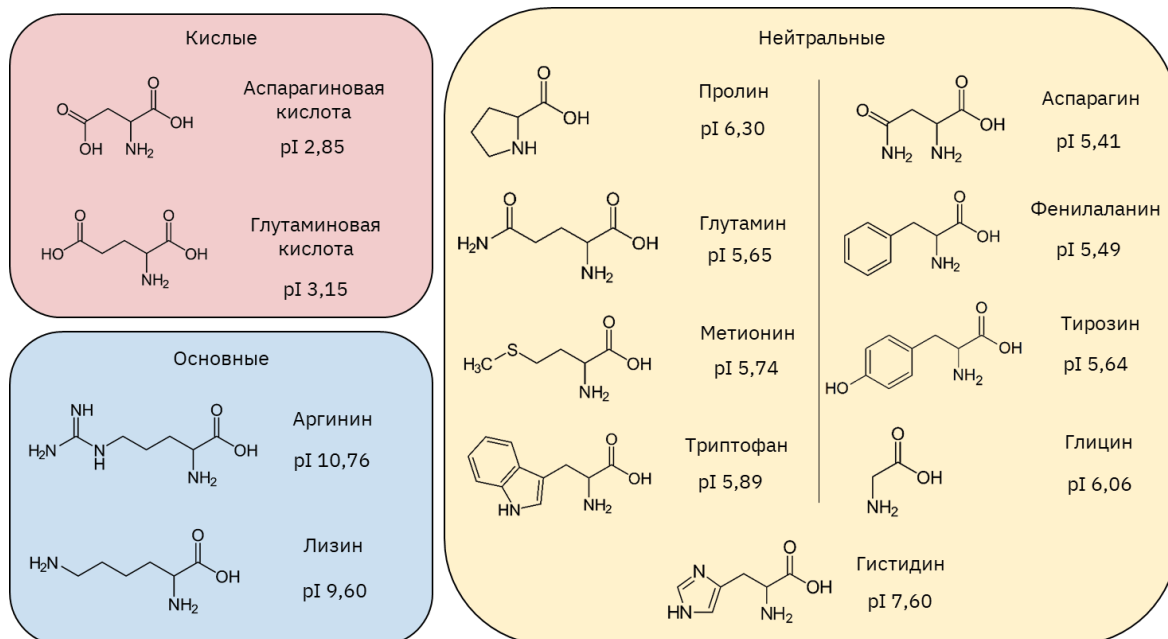
### 1.2.1. Строение и стереохимия

Аминокислоты – гетерофункциональные соединения, содержащие одновременно аминогруппу и карбоксильную группу, в случае  $\alpha$ -аминокислот – у одного углеродного атома. Большинство аминокислот имеет первичную аминогруппу, исключением является пролин, характеризующийся вторичной аминогруппой в пирролидиновом кольце. Однако среди коформеров встречаются и  $\beta$ -аминокислоты, например  $\beta$ -аланин, а также  $N,N,N$ -триметильные производные, такие как бетаин и карнитин, содержащие кватернизованный атом азота (Рисунок 1.7).

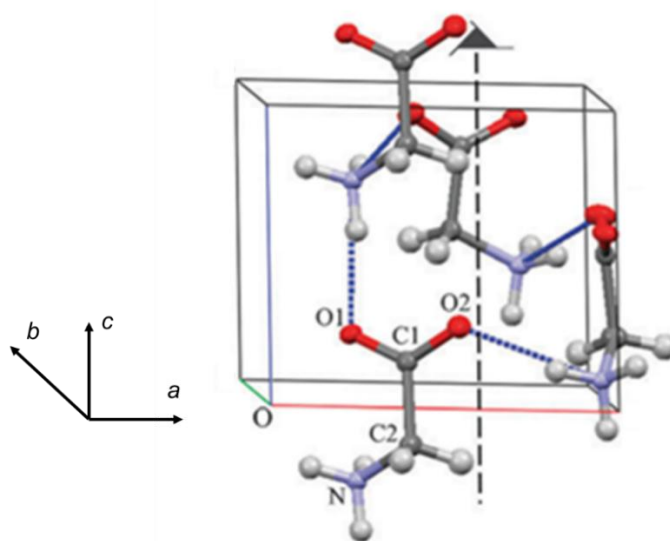


Рисунок 1.7 – Непротеиногенные аминокислоты как коформеры в композициях с флавоноидами

Наиболее важной с точки зрения инженерии кристаллов является кислотно-основная классификация, основанная на наличии в боковом радикале дополнительных карбоксильных групп или групп основного характера, потому что эти функциональные группы являются донорами и акцепторами водородных связей, а значит могут быть задействованы в образовании гетеросинтонов (Рисунок 1.8).

Рисунок 1.8 – Кислотно-основная классификация протеиногенных  $\alpha$ -аминокислот

Все входящие в состав живых организмов  $\alpha$ -аминокислоты, кроме глицина, содержат как минимум один асимметрический атом углерода. Протеиногенные аминокислоты гомохиральны и принадлежат к L-ряду. Глицин, который не содержит центров хиральности, тем не менее проявляет свойство хиральности в твердом агрегатном состоянии. Он кристаллизуется в виде 5 полиморфных модификаций, из которых  $\alpha$ -,  $\beta$ - и  $\gamma$ -формы проявляют наибольшую стабильность при стандартных условиях. В то время как  $\alpha$ -полиморфная модификация представляет собой ахиральный кристалл,  $\beta$ - и  $\gamma$ -формы имеют энантиоморфное строение (Рисунок 1.9). Таким образом, стереохимическое строение аминокислот имеет большое значение не только в контексте биологического действия, но и при использовании их как коформеров в инженерии кристаллов.

Рисунок 1.9 – Трехмерное изображение кристалла  $\gamma$ -глицина с указанием оси хиральности [163]

### 1.2.2. Биологическая роль

Будучи мономерами белков, аминокислоты являются неотъемлемыми компонентами как растительной, так и животной пищи человека. Основная биологическая роль аминокислот заключается в том, что они представляют собой строительный материал при синтезе белка *de novo*. Помимо протеиногенной функции аминокислоты играют важную роль в процессах биосинтеза низкомолекулярных биологически активных соединений.

Фенилаланин и тирозин являются предшественниками катехоламинов. Триптофан метаболизируется до серотонина. Глицин принимает участие в первой стадии синтеза гема. Из аспарагиновой кислоты, глицина и глутамина синтезируются нуклеотиды. Метионин, цистеин и  $\beta$ -аланин входят в состав коферментов метилирования и ацетилирования. При участии карнитина жирные кислоты транспортируются через мембрану митохондрий, где подвергаются  $\beta$ -окислению.

Каноническая аминокислота глицин является ингибирующим нейротрансмиттером. Связываясь со своими рецепторами, глицин вызывает тормозящее воздействие на нейроны, повышает выделение  $\gamma$ -аминомасляной кислоты (ГАМК) и уменьшает выделение возбуждающего нейромедиатора – глутаминовой кислоты. С другой стороны, глицин связывается со специфическими участками рецептора *N*-метил-D-аспартата (NMDA) и, таким образом, способствует передаче сигнала от глутаминовой и аспарагиновой кислот. Кроме того, глицин регулирует активность *c-Jun N*-терминальных киназ и тем самым предотвращает дегенерацию нервной ткани [164]. Таким образом, глицин представляет интерес в качестве компонента разрабатываемого лекарственного средства нейропротекторного действия.

### 1.2.3. Аминокислоты как лекарственные средства

*Смеси  $\alpha$ -аминокислот.* Водные растворы смесей  $\alpha$ -аминокислот используют для парентерального питания. Например, один из таких препаратов, Инфезол<sup>®</sup>, выпускаемый в форме раствора для внутривенных инфузий, содержит следующие аминокислоты: L-аланин, глицин, L-аргинин, L-аспарагиновая кислота, L-глутаминовая кислота, L-гистидин, L-изолейцин, L-лизина гидрохлорид или моноацетат, L-метионин, L-лейцин, L-фенилаланин, L-треонин, L-триптофан, L-валин, L-ацетилцистеин, L-ацетилтирозин, L-орнитина гидрохлорид, L-пролин и L-серин.

*Однокомпонентные ЛС на основе  $\alpha$ -аминокислот.* Эта группа ЛС представлена аминокислотами и их производными. Так, например, ацетилцистеин является муколитическим средством и используется при инфекционных заболеваниях для разжижения мокроты.  $\beta$ -Аланин рекомендован для улучшения состояния в противоклиматический период. Глутатион проявляет антиоксидантное действие. Левотироксин используется для нормализации работы щитовидной железы при гипотиреозе. Метионин проявляет гепатопротекторное действие. Глутаминовая кислота стимулирует передачу возбуждения в синапсах центральной нервной системы. Глутаргин (МНН: Аргинина глутамат) оказывает гепатопротекторное действие, обладая антиоксидантной, антигипоксической и мембраностабилизирующей активностью, позитивно влияет на процессы энергообеспечения в гепатоцитах. Нейромедиаторная аминокислота глицин оказывает нейропротективное, антиоксидантное и нейрометаболическое действие и применяется при стрессовых состояниях, психоэмоциональном напряжении, повышенной возбудимости и неврозах.

### **1.3. Композиции флавоноидов с аминокислотами**

Используя подходы инженерии кристаллов удастся получить кокристаллические и коаморфные композиции флавоноидов с аминокислотами, обладающие лучшей растворимостью в воде. Термин «кокристалл» обычно относится к кристаллическому материалу, состоящему из двух или более различных видов молекул, объединенных в одну кристаллическую решетку. Эти твердые вещества можно описать как высокоупорядоченные трехмерные структуры, в которых расположение молекул определяется как кристаллографической симметрией, так и специфическими межмолекулярными взаимодействиями, которые, в свою очередь, определяют их физико-химические свойства. Сцепление внутри кокристаллов обеспечивается различными нековалентными силами, включая водородные связи,  $\pi$ - $\pi$  укладку, ван дер Ваальсовы силы и электростатические взаимодействия [165]. В случае, когда твердая монофазная композиция не обладает упорядоченностью, ее называют коаморфной.

Для обобщения имеющихся данных по методам получения и свойствам композиций флавоноидов с аминокислотами был проведен систематический обзор по публикациям в периодических изданиях.

### 1.3.1. Концепция поиска статей

Систематический обзор по композициям флавоноидов и аминокислот был проведен в соответствии с рекомендациями PRISMA (Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses). Поиск литературы проводился в системах Google Академия и Lens по запросу: flavonoid AND "amino acid" AND (cocrystals OR coamorphous). В Google Академия было обнаружено 1590 публикаций, в Lens – 250 статей.

Проанализировав взаимосвязи совпадений по использованию ключевых слов, оказалось, что наиболее крупные кластеры связаны с использованием терминов «флавоноиды», «антиоксиданты», «биодоступность», «растворимость», что вполне ожидаемо для области исследований по оптимизации биофармацевтических свойств флавоноидов (Рисунок 1.10). Например, крупный синий кружок в правой части рисунка, суммирующий все статьи по биодоступности, связан с кружками «флавоноиды» и «растворимость», поскольку зачастую исследователи напрямую увязывают повышение биодоступности с увеличением растворимости. Фиолетовый кружок в левой части рисунка, объединяющий статьи по антиоксидантам, связан с кружками «флавоноиды» и «биодоступность», так как многие биологические эффекты флавоноидов до настоящего времени объясняют именно способностью связывать свободные радикалы, а также другими механизмами антиоксидантного действия. О развивающемся в последние годы направлении повышения биодоступности фармацевтических субстанций путем получения композиций лекарство-аминокислота свидетельствует каскад взаимосвязанных ключевых слов: bioavailability – solubility – cocrystallization – zwitterionic – drug-amino acids (биодоступность – растворимость – кокристаллизация – цвиттер-ион – лекарство-аминокислоты), отраженный в правой нижней части рисунка 1.10, на котором все ключевые слова изображены синим цветом, за исключением «лекарство-аминокислоты» – бирюзовым. При этом самым большим по размеру кружком является кружок «биодоступность», отражающий максимальное число публикаций по данной тематике по сравнению с другими ключевыми словами.



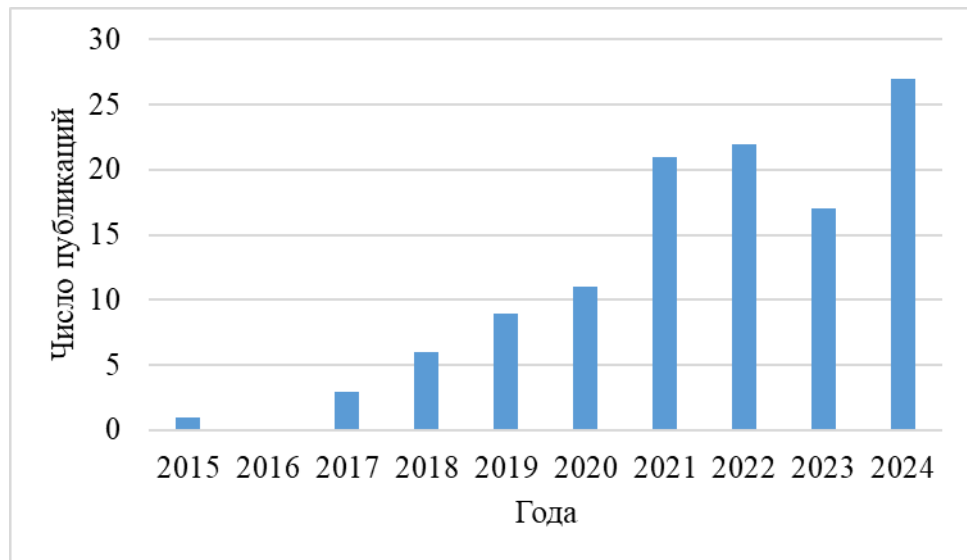


Рисунок 1.11 – Динамика роста числа публикаций за последнее десятилетие

После исключения статей, не удовлетворяющих критериям включения, в выборке осталось 28 литературных источников, которые были собраны в общедоступную коллекцию «Flavonoids and amino acids» в личном аккаунте автора на сайте <https://www.lens.org>. Отобранные статьи подверглись полнотекстовому обзору (Рисунок 1.12).

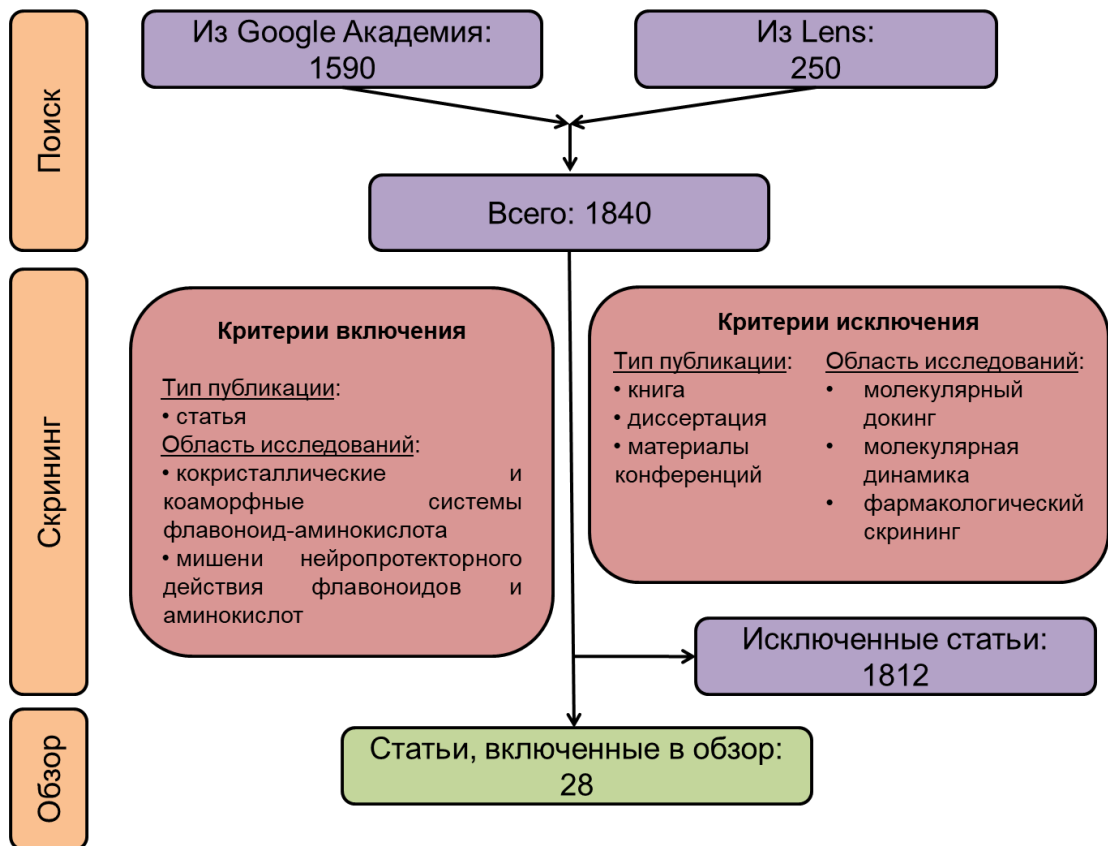


Рисунок 1.12 – Блок-схема PRISMA, описывающая процесс поиска и отбора статей

В ходе анализа научного ландшафта было обнаружено, что исследования по получению композиций флавоноидов с аминокислотами привлекают внимание ученых всего мира и ими занимаются 22 группы научных работников. Из них самая крупная включает 17 человек (Рисунок 1.13).

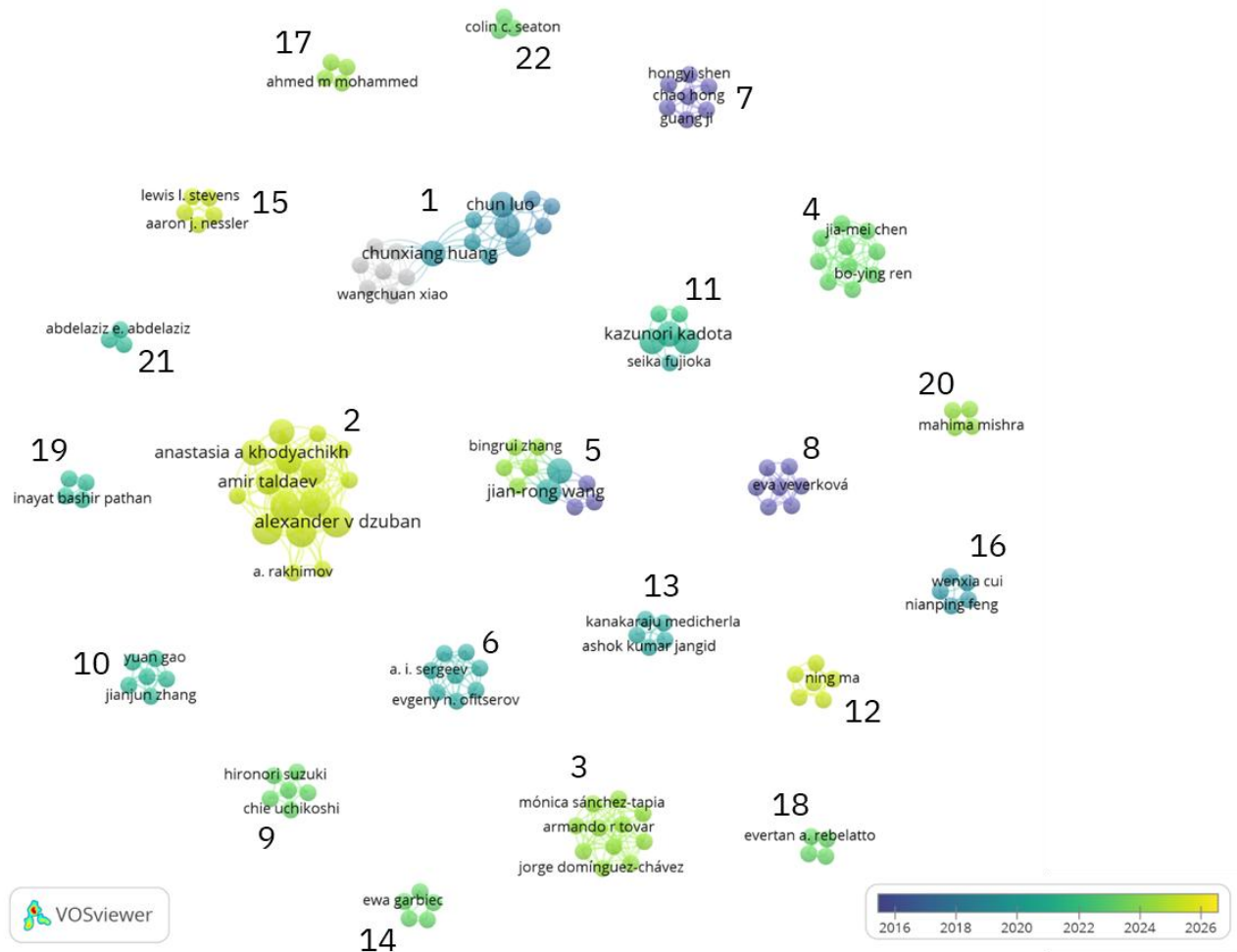


Рисунок 1.13 – Библиометрические сети, основанные на отношениях совместного авторства.

Цветом показаны годы опубликования самой поздней статьи данной научной группой в соответствии со шкалой в правой нижней части. Серым цветом отмечены авторы препринтов. Размер кружков пропорционален числу опубликованных статей

Состав исследовательских коллективов, научные учреждения, с которыми аффилированы авторы, и страны, в которых они работают, приведены в таблице 1.1. Лидирующие позиции по количеству публикаций (8) занимают группы из университетов Тяньцзиня, Гуанчжоу, Нанкина, Циндао и Шанхая в Китае. В том же Циндао работает самая многочисленная научная группа, состоящая из 17 человек.

Таблица 1.1 – Научные группы, занимающиеся композициями флавоноидов с аминокислотами

Номер группы на рисунке 1.13	Количество участников	Коллектив	Научное учреждение или организация	Страна
1	17	Chun Luo, Duanxiu Li, Hailu Zhang, Jianming Wang, Ruchen Qiu, Wendong Liang, Xin Chen, Zhijie Zhang, Zongwu Deng, Chunxiang Huang, Fenghua Chen, Rongrong Xue, Sheng Lin, Wangchuan Xiao, Yongming Liu, Yu Niu, Yuting Wang	Qingdao University of Science and Technology, Crystal Pharmaceutical (Suzhou) Co., Ltd.	Китай
2	16	A. Rakhimov, Alexander V Dzuban, Amir Taldaev, Anastasia A Khodyachikh, Andrey N Utenyshev, Artem A Svoitin, Bo Li, D. Pankov, Diana R Kolesnikova, E. Krivosheeva, Eduard V Bocharov, Gennadii V Shilov, Irina A Selivanova, Maria D Korochkina, Roman P Terekhov, Youyan Zeng	Moscow State University, Institute of Bioorganic Chemistry named after academicians M.M. Shemyakin and Yu.A. Ovchinnikov, Sechenov University, Research Institute of Biomedical Chemistry named after V.N. Orekhovich, Federal Research Center of Problems of Chemical Physics and Medicinal Chemistry	Россия
			Guangdong Pharmaceutical University	Китай
3	11	Armando R Tovar, Diana Coutiño-Hernández, Guillermo Ordaz, Jorge Domínguez-Chávez, Karina Mondragón-Vásquez, Miranda Bernal-Gámez, Mónica Sánchez-Tapia, Nimbe Torres, Omar Granados-Portillo, Paulina Barrera-Gómez, Sarai Vásquez-Reyes	Universidad Veracruzana, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán	Мексика

Продолжение Таблицы 1.1

4	10	Bo-Ying Ren, Jia-Mei Chen, Michael J Zaworotko, Molly M Haskins, Oisín N Kavanagh, Rana Sanii, Sanaz Khorasani, Tong-Bu Lu, Xia-Lin Dai, Zhi-Yuan Zhang	Tianjin University of Technology, Sun Yat-sen University	Китай
			Newcastle University	Соединенное Королевство
			University of Limerick	Ирландия
5	10	Bingrui Zhang, Fanyu Tian, Hongyan He, Jian-Rong Wang, Lei Tang, Qi Zhang, Qiaoce Ding, Xuefeng Mei, Ying Huang, Ziyi Hu	Nanjing University of Chinese Medicine, Shanghai Institute of Materia Medica	Китай
6	8	A. I. Sergeev, A. M. Koroteev, Anna F. Stepnova, Anton O. Pozdeev, Evgeny N. Ofitserov, G. Z. Kaziev, Mikhail P. Koroteev, Valery P. Zinchenko	Moscow Pedagogical State University, Pushchino Scientific Center for Biological Research, Russian University of Chemical Technology D.I. Mendeleev	Россия
7	7	Chao Hong, Guang Ji, Guowen Li, Hongyi Shen, Mingyu Liu, Yan Xie, Yashu Yao	Shanghai University	Китай
8	7	Eva Veverková, Ján Gallovič, Martina Danihelová, Miroslav Veverka, Peter Šimon, Tibor Dubaj, Vladimír Jorík	Slovak University of Technology, EUROFINS BEL/NOVAMANN Ltd., Comenius University in Bratislava	Словакия
9	6	Chie Uchikoshi, Hironori Suzuki, Kyu Hayashi, Masataka Ito, Shota Tokunaga, Shuji Noguchi	Toho University	Япония
10	6	Jianjun Zhang, Shuai Qian, Weng Xingye, Yuan Gao, Yuanfeng Wei, Zunting Pang	China Pharmaceutical University	Китай
11	6	Daichi Kawabata, Kazunori Kadota, Mikio Yoshida, Momoka Minode, Seika Fujioka, Yoshiyuki Shirakawa	Osaka University of Pharmaceutical Sciences, Osaka University, Doshisha University	Япония
12	6	Ning Ma, Tiantian Wang, Xin He, Xinghua Zhao, Yanling Sun, Yu Zhang	Hebei agricultural university	Китай

Продолжение Таблицы 1.1

13	5	Ashok Kumar Jangid, Deep Pooja, Hitesh Kulhari	Royal Melbourne Institute of Technology	Австралия
			Central University of Gujarat, Andhra University	Индия
14	5	Ewa Garbiec, Judyta Cielecka-Piontek, Lidia Tajber, Natalia Rosiak, Przemysław Zalewski	Trinity College Dublin	Ирландия
			Poznan University of Medical Sciences	Польша
15	5	Aaron J. Nessler, Lewis L. Stevens, Matthew J. Speranza, Michael J. Schnieders, Sanika Jadhav	University of Iowa	США
16	5	Nianping Feng, Qiangyuan Fan, Wenxia Cui, Yongtai Zhang, Zehui He	Shanghai University	Китай
17	4	Ahmed M Mohammed, Gamal Zayed, Mahmoud Elshaer, Shaaban K Osman	Al-Azhar University	Египет
18	4	Evertan A. Rebelatto, Jônatas L. Dias, Marcelo Lanza, Sandra R.S. Ferreira	Universidade Federal de Santa Catarina	Бразилия
19	4	Inayat Bashir Pathan, Nahid Anjum Hafizuddin Chishti, Pranali Hatwar, Wahid Ambekar	Y. B. Chavan College of Pharmacy, Dr.VVPF's College of Pharmacy	Индия
20	4	Mahima Mishra, Pratap Bahadur, Sanjay Tiwari, Shivanshu Agrawal	National Institute of Pharmaceutical Education and Research (NIPER) – Raebareli, Veer Narmad South Gujarat University	Индия
21	3	Abdelaziz E. Abdelaziz, Fatma A. Kassem, Gamal M. el Maghraby	Tanta University, Kafrelsheikh University	Египет
22	3	Colin C. Seaton, Jay Makadia, Mingzhong Li	De Montfort University, University of Bradford	Соединенное Королевство

Сотрудники, аспиранты и студенты Института фармации им. А.П. Нелюбина Сеченовского Университета совместно с Московским государственным университетом имени М.В. Ломоносова, институтами Российской академии наук и Фармацевтическим Университетом Гуанчжоу занимают вторую строчку ранжированного списка. Третий по численности коллектив представляют сотрудники Университета Веракрусана и Национального института медицинских

наук и питания им. Сальвадора Зубирана в Мексике. Наибольшее число работ по обозначенной тематике опубликовано в журналах *Crystal Growth & Design* Американского химического общества (5 статей) и *CrystEngComm* Королевского химического общества (3 статьи). В среднем, каждый коллектив опубликовал по одной статье, что свидетельствует о начальном этапе исследований по получению композиций флавоноидов с аминокислотами. Работа в этой области инженерии кристаллов для нужд фармации продолжается и планируемые к выходу в 2026 году статьи уже доступны для предварительного просмотра на сайтах журналов в виде препринтов [166].

### 1.3.2. Общая характеристика композиций

В опубликованных статьях особое внимание специалистов по инженерии кристаллов привлекают представители групп флавонолов, флавонов и флаванонов как наиболее изученные с точки зрения биологической активности (Рисунок 1.14). Так, на кверцетин приходится 35% полученных композиций, поэтому его можно отнести к самым часто используемым флавоноидам для получения композиций с аминокислотами. Флаванолы, за исключением ДКВ, в композициях не представлены.

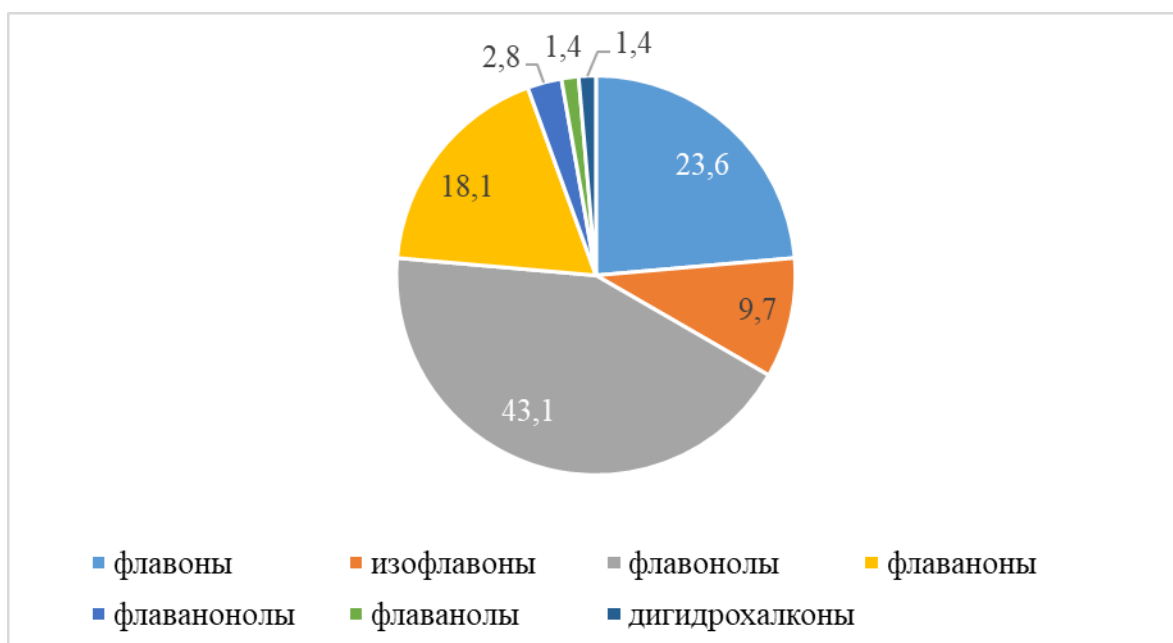


Рисунок 1.14 – Сравнительный анализ распределения представителей групп флавоноидов, разрабатываемых в композициях с аминокислотами (%)

Формулы флавоноидов, задействованных в получении композиций с аминокислотами, в виде R-структур приведены на рисунке 1.15.

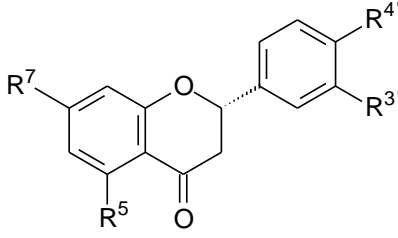
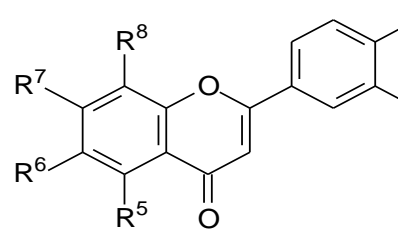
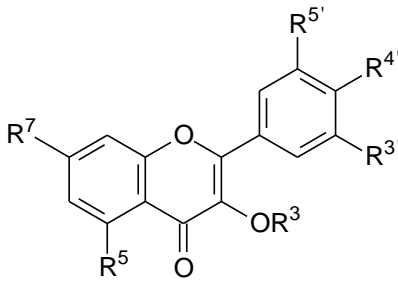
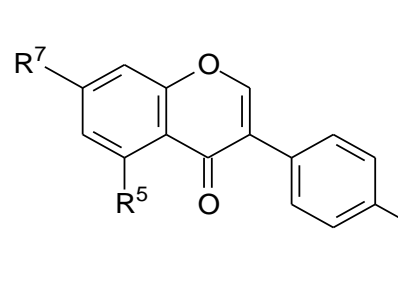
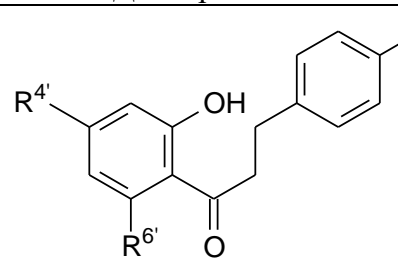
Флаваноны	Флавоны
	
<p style="text-align: center;">гесперидин</p> $R^5 = R^{3'} = \text{OH}$ $R^7 = \alpha\text{-L-Rhap-(1}\rightarrow\text{6)-}\beta\text{-D-Glcp-O}$ $R^{4'} = \text{OCH}_3$ <p style="text-align: center;">нарингенин</p> $R^5 = R^7 = R^{4'} = \text{OH}$ $R^{3'} = \text{H}$	<p style="text-align: center;">апигенин</p> $R^5 = R^7 = R^{4'} = \text{OH}$ $R^6 = R^8 = R^{3'} = \text{H}$ <p style="text-align: center;">байкалеин</p> $R^5 = R^6 = R^7 = \text{OH}$ $R^8 = R^{3'} = R^{4'} = \text{H}$ <p style="text-align: center;">байкалин</p> $R^5 = R^6 = \text{OH}$ $R^7 = \beta\text{-D-GlcUp-O}$ $R^{3'} = R^{4'} = \text{H}$ <p style="text-align: center;">лютеолин</p> $R^5 = R^7 = R^{3'} = R^{4'} = \text{OH}$ $R^6 = \text{H}$ <p style="text-align: center;">нобилетин</p> $R^5 = R^6 = R^7 = R^8 = R^{3'} = R^{4'} = \text{OCH}_3$ <p style="text-align: center;">хризин</p> $R^5 = R^7 = \text{OH}$ $R^6 = R^8 = R^{3'} = R^{4'} = \text{H}$
Флавонолы	Изофлавоны
	
<p style="text-align: center;">кверцетин</p> $R^3 = R^{5'} = \text{H}$ $R^5 = R^7 = R^{3'} = R^{4'} = \text{OH}$ <p style="text-align: center;">рутин</p> $R^3 = \alpha\text{-L-Rhap-(1}\rightarrow\text{6)-}\beta\text{-D-Glcp}$ $R^5 = R^7 = R^{3'} = R^{4'} = \text{OH}$ $R^{5'} = \text{H}$ <p style="text-align: center;">кемпферол</p> $R^3 = R^{3'} = R^{5'} = \text{H}$ $R^5 = R^7 = R^{4'} = \text{OH}$ <p style="text-align: center;">мирицетин</p> $R^3 = \text{H}$ $R^5 = R^7 = R^{3'} = R^{4'} = R^{5'} = \text{OH}$	<p style="text-align: center;">генистеин</p> $R^5 = R^7 = R^{4'} = \text{OH}$ <p style="text-align: center;">Дигидрохалконы</p>  <p style="text-align: center;">флоретин</p> $R^4 = R^{4'} = R^{6'} = \text{OH}$

Рисунок 1.15 – Структурные формулы флавоноидов, используемых для получения композиций с аминокислотами

Из основных аминокислот наиболее часто использовали аргинин, из него были получены 26% композиций. Это не удивительно и объяснимо желанием исследователей добиться ионизации фенольных гидроксильных групп, что является предпосылкой для формирования водорастворимых комплексов. Интересно отметить, что большой популярностью пользуется нейтральный пролин, имеющий циклическую структуру, конформационное строение которой может способствовать кокристаллизации. Он разрабатывается в составе 29% композиций (Рисунок 1.16).

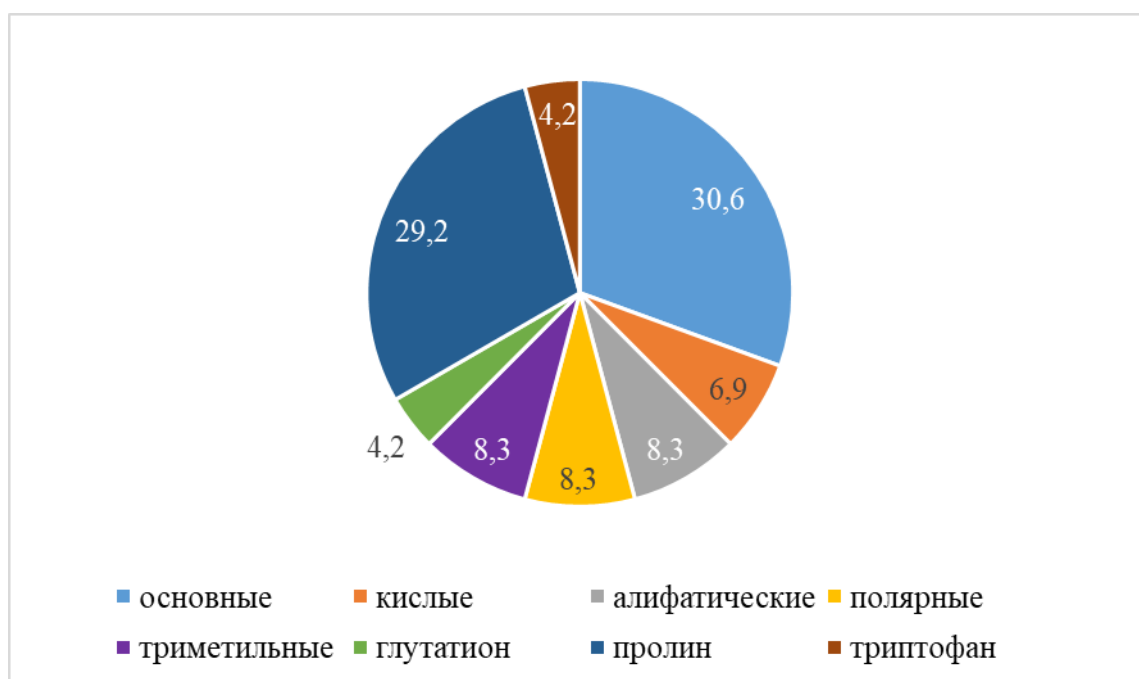


Рисунок 1.16 – Сравнительный анализ распределения представителей групп аминокислот, разрабатываемых в композициях с флавоноидами (%)

Глицин фигурирует в композициях с кверцетином и гесперидином. Ранее полученные и описанные композиции флавоноидов с аминокислотами в обобщенном виде представлены в таблице 1.2. В литературе описан способ получения композиции ДКВ с аргинином [167]. С 2021 года на кафедре химии Института фармации им. А.П. Нелюбина Сеченовского Университета развивается направление по разработке линейки потенциальных лекарственных средств на основе ДКВ с протеиногенными  $\alpha$ -аминокислотами. Нашей научной группой предложен и запатентован способ повышения биодоступности флавоноидов путем получения водорастворимых пленкообразующих композиций с L-лизином [168].

Таблица 1.2 – Композиции флавоноидов с аминокислотами

Флавоноид	Аминокислота	Способы получения	Ссылка
<b>Флавоны и их глюкурониды</b>			
апигенин	аргинин	влажный гриндинг, выпаривание растворителя	[169]
	пролин	выпаривание растворителя	[170]
байкалеин	бетаин	влажный гриндинг	[171]
	пролин	суспендирование	[172]
байкалин	аспарагин, гистидин, глутаминовая кислота	выпаривание растворителя	[173]
лютеолин	пролин	суспендирование	[172]
нобилетин	аргинин	влажный гриндинг	[174]
хризин	пролин	суспендирование	[172]
<b>Изофлавоны</b>			
генистеин	аргинин, глутамин, лизин, тирозин, триптофан	сухой гриндинг	[162]
	пролин	суспендирование	[172]
<b>Флавонолы и их гликозиды</b>			
кверцетин	$\beta$ -аланин	сухой гриндинг	[175]
	аргинин	сухой гриндинг, выпаривание растворителя	[175, 176, 177]
	аспарагиновая кислота, глицин, глутаминовая кислота, триптофан	сухой гриндинг	[176]
	бетаин	суспендирование	[171]
	карнитин	суспендирование, влажный гриндинг	[178]
	пролин	суспендирование, влажный гриндинг	[172, 179]
рутин	метионин	сухой гриндинг	[180]
кемпферол	пролин	суспендирование	[172]
мирицетин	пролин	суспендирование	[181]
<b>Флаваноны и их гликозиды</b>			
гесперидин	аргинин, глицин, глутатион	влажный гриндинг	[182]
нарингенин	бетаин, пролин	суспендирование	[156]
<b>Дигидрохалконы</b>			
флоретин	бетаин	влажный гриндинг	[171]

В имеющихся литературных источниках композиция, состоящая из ДКВ и глицина, представлена не была.

### 1.3.3. Способы получения

Инженерия кристаллов стала многообещающей стратегией для устранения ограничений флавоноидов в виде низкой растворимости в воде путем изменения физико-химических свойств без изменения биологической активности [183]. Благодаря улучшению таких параметров, как стабильность и биодоступность, кокристаллизация может значительно повысить эффективность флавоноидов в контексте разработки лекарств. В фармации это открывает новые возможности для создания более эффективных и стабильных твердых лекарственных форм, включая таблетки, капсулы и системы с контролируемым высвобождением, а также разработки жидких лекарственных форм. Этот потенциал делает кокристаллизацию ценным инструментом, устраняя разрыв между химией природных соединений и их практическим применением. Выбор подходящего метода кокристаллизации/коаморфизации в значительной степени является эмпирическим и во многих случаях зависит от опыта исследователя и повторяющихся экспериментов методом проб и ошибок. В литературе можно найти два основных экспериментальных подхода к получению кокристаллических и коаморфных композиций: твердофазные методы и методы с использованием растворителя [165].

*Твердофазные методы.* Распространенным методом получения композиций является гриндинг, который осуществляется за счет перетирания сухих веществ в шаровой мельнице или ступке.

Таблица 1.3 – Коаморфные композиции, полученные методом сухого гриндинга

Композиция	Объем чаши, мл	Диаметр (мм), количество шаров (шт)	Время (ч) и скорость перемалывания (об/мин)	Ссылка
генистеин-аргинин	25	10, 2	1,5; 1800	[162]
генистеин-глутамин				
генистеин-лизин				
генистеин-тирозин				
генистеин-триптофан				
кверцетин-аргинин	25	18, 3; 15, 2; 12, 1	2; н/д	[176]
кверцетин-аспарагиновая кислота				
кверцетин-глицин				
кверцетин-глутаминовая кислота				
кверцетин-триптофан				
кверцетин-β-аланин	45	10, 8	3 и 12; 600	[175]
кверцетин-L-аргинин				
рутин-L-метионин	45	10, 8	12; 600	[180]

Сухой гриндинг имеет преимущество перед методами на основе растворителей, поскольку не нарушается прямое взаимодействие между субстанцией и коформером. Неполная конверсия и дефекты кокристаллов являются распространенными проблемами, связанными с этим методом. С помощью сухого гриндинга были получены следующие коаморфные композиции: генистеин-лизин, генистеин-аргинин, генистеин-триптофан, генистеин-тирозин, генистеин-глутамин, кверцетин-аргинин, кверцетин-глутаминовая кислота, кверцетин-глицин, кверцетин-аспарагиновая кислота, кверцетин-триптофан, кверцетин- $\beta$ -аланин, кверцетин-L-аргинин, рутин-L-метионин (Таблица 1.3).

*Методы с использованием растворителя.* Среди таких методов наиболее часто применяют суспендирование и влажный гриндинг. Первый подход заключается в диспергировании смеси флавоноида и аминокислоты в органическом растворителе.

Таблица 1.4 – Кокристаллы, полученные методом суспендирования

Композиция	Растворитель	Температура (°C) и время диспергирования (ч)	Температура (°C) и время сушки (ч)	Ссылка
байкалеин-D/L-пролин	Этилацетат – этанол (1:1, об/об)	25, 72	50, 12	[172]
генистеин-D/L-пролин	Этилацетат – этанол (1:1, об/об)	25, 72	50, 12	[172]
кверцетин-D/L-пролин	Этилацетат – этанол (1:1, об/об)	н/д	50, 12	[172]
кверцетин-L-карнитин	Метанол, этанол, ацетонитрил, ацетон, диметилформамид и их водные смеси	25, 168	60, н/д	[178]
кверцетин-L-пролин		25, 168	60, н/д	[178]
кверцетин-бетаин	Метанол – этилацетат (1:4, об/об)	н/д, 72	40, 12	[171]
кемпферол-D/L-пролин	Этилацетат – этанол (1:1, об/об)	н/д	50, 12	[172]
лютеолин-D/L-пролин	Этилацетат – этанол (1:1, об/об)	50, 24	50, 12	[172]
нарингенин-L-пролин	Этанол 90%	25, 72	25, 24	[156]
нарингенин-бетаин	Этанол	25, 24	25, 24	[156]
нарингенин-бетаин форма А	Этанол	25, 48	40, 12	[184]
нарингенин-бетаин форма В	Метанол или ацетонитрил	25, 72	40, 12	[184]
хризин-D/L-пролин	Этилацетат – этанол (1:1, об/об)	25, 72	50, 12	[172]

Иногда, как в случае с мирицетином-пролином, для повышения эффективности суспендирование проводят при помощи ультразвука. Для получения продукта, свободного от жидкой дисперсионной среды, кристаллический порошок фильтруют или центрифугируют и высушивают. Этот метод прост в исполнении и не требует большого количества растворителя, однако он плохо поддается масштабированию, а остаточные органические растворители в продукте приходится нормировать. Таким способом были синтезированы кокристаллы кверцетин-D/L-пролин, кемпферол-D/L-пролин, лютеолин-D/L-пролин, хризин-D/L-пролин, генистеин-D/L-пролин, байкалеин-D/L-пролин, нарингенин-L-пролин, нарингенин-бетаин, кверцетин-L-карнитин, кверцетин-бетаин (Таблица 1.4).

Влажный grinding проводят перетиранием субстанции флавоноида и коформера с добавлением небольшого количества растворителя, что приводит к повышению супрамолекулярной селективности в кристаллических системах. Потенциальные преимущества этого метода включают контролируемую и увеличенную производительность при улучшенных качественных характеристиках, получаемых кокристаллов. Основными недостатками этого метода являются мелкосерийность, высокая энергозатратность и низкая производительность. Таким методом были получены кокристаллы гесперидин-L-аргинин, гесперидин-глутатион, гесперидин-глицин, апигенин-аргинин, кверцетин-L-пролин, кверцетин-L-карнитин, байкалеин-бетаин, флоретин-бетаин (Таблица 1.5).

Таблица 1.5 – Кокристаллы, полученные методом влажного grinding

Композиция	Растворитель	Объем чаши, мл	Диаметр (мм) и количество шаров (шт)	Время (мин) и скорость перемалывания (об/мин)	Ссылка
байкалеин-бетаин	метанол	10	15, 1	20, 2400	[171]
кверцетин-L-карнитин	ацетонитрил, диметилформамид	10	5 или 9, 2	н/д, 1800	[178]
кверцетин-L-пролин	или вода	10	5 или 9, 2	н/д, 1800	[178]
флоретин-бетаин	метанол	10	15, 1	20, 2400	[171]

Композиции апигенин-L-пролин, апигенин-D-пролин и апигенин-DL-пролин [170] были получены выпариванием растворителя из раствора, содержащего флавоноид и аминокислоту. После выпаривания метанола из растворов байкалин-глутаминовая кислота, байкалин-аспарагин, байкалин-гистидин тонкий слой смеси растворяли в воде при помощи ультразвука. Полученный водный раствор лиофилизировали и получали коаморфные композиции [173]. Преимущество этого метода заключается в высоком выходе, простоте и возможности масштабирования.

Основные недостатки связаны с использованием большого количества растворителя, от которого невозможно полностью избавиться.

Некоторые кокристаллы получали методом осаждения антирастворителем. Так, например, кокристаллы кверцетин-аргинин осаждали водным раствором аргинина из раствора кверцетина в органическом растворителе [177].

Из приведенных методов супрамолекулярного синтеза композиций лиофилизация является легко масштабируемым, который не требует значительных энергетических затрат. Лиофилизаты имеют развитую поверхность, что способствует их лучшей растворимости в воде. Кроме того, они применяются как готовая инфузионная лекарственная форма, поэтому данный подход представляется перспективным для преодоления ограничения ДКВ в виде низкой биодоступности.

#### 1.3.4. Анализ физико-химическими методами

Для полной характеристики композиций используются различные методы, которые непосредственно связаны с исследованием их физико-химических свойств, например, определение удельной поверхности, растворимости, построение трехфазной диаграммы, исследование стабильности [165]. Обзор литературы показывает, что методы анализа можно разделить на четыре основные группы:

- рентгеновские (рентгеновская монокристаллическая и порошковая дифрактометрия);
- спектральные методы (ИК и Рамановская спектроскопия, твердофазный ЯМР);
- термические (дифференциальная сканирующая калориметрия, термогравиметрия);
- микроскопические (оптическая микроскопия, сканирующая электронная микроскопия).

*Рентгеновские методы анализа.* Для изучения структуры кристаллических ячеек композиций были выращены кокристаллы. Следует отметить, что кокристаллы, пригодные для рентгеноструктурного анализа (РСА), были получены методами, отличными от методов получения порошков композиций. По данным рентгеноструктурного анализа, гетеросинтоны образованы фенольным гидроксилем флавоноида и карбоксилат-ионом аминокислоты, которые связаны между собой водородными связями как показано на рисунке 1.17А для кверцетина и L-пролина, а на рисунке 1.17Б для байкалеина и бетаина.

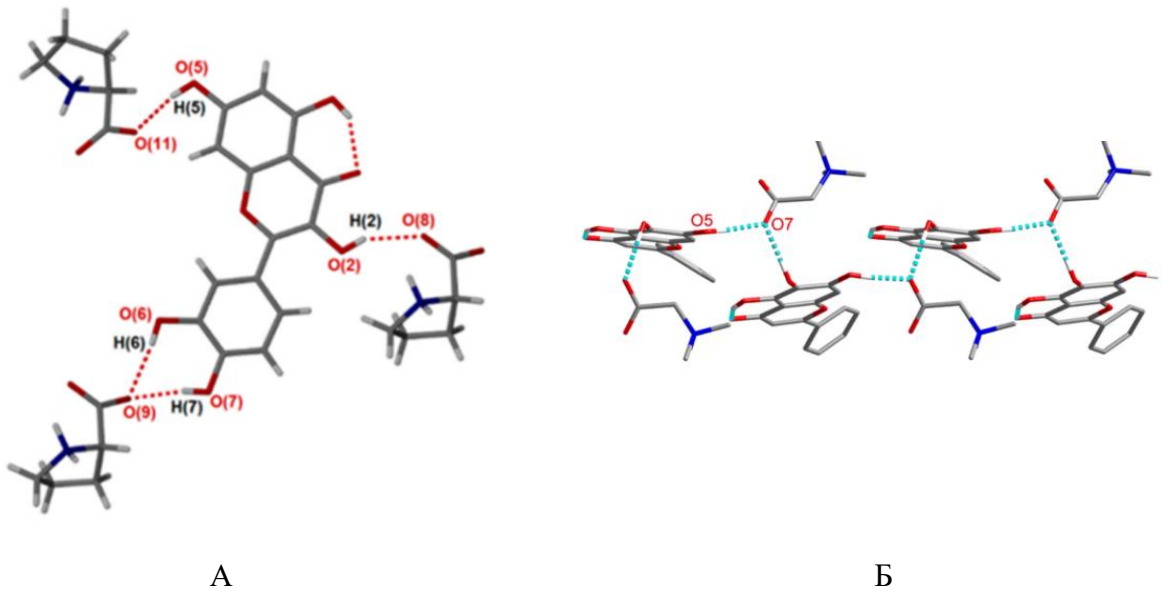


Рисунок 1.17 – Гетеросинтоны: А – кверцетин–L-пролин [172]; Б – байкалеин-бетаин [171]

Для идентификации фазового состояния и определения степени кристалличности композиции используют метод рентгеновской порошковой дифрактометрии (РПД). Из 70 полученных композиций с известным фазовым состоянием 46 представляют собой кокристаллы, а 24 имеют коаморфное строение.

Мирицетин имеет пики отражения при углах  $2\theta$ :  $5,80^\circ$ ;  $11,54^\circ$ ;  $13,66^\circ$ ;  $14,20^\circ$ ;  $16,78^\circ$ ;  $26,36^\circ$ ;  $28,14^\circ$ ;  $29,64^\circ$  и  $41,78^\circ$  (Рисунок 1.18А), а для пролина характерен следующий набор пиков:  $30,72^\circ$ ;  $32,26^\circ$ ;  $36,58^\circ$  и  $39,88^\circ$  (Рисунок 1.18Б).

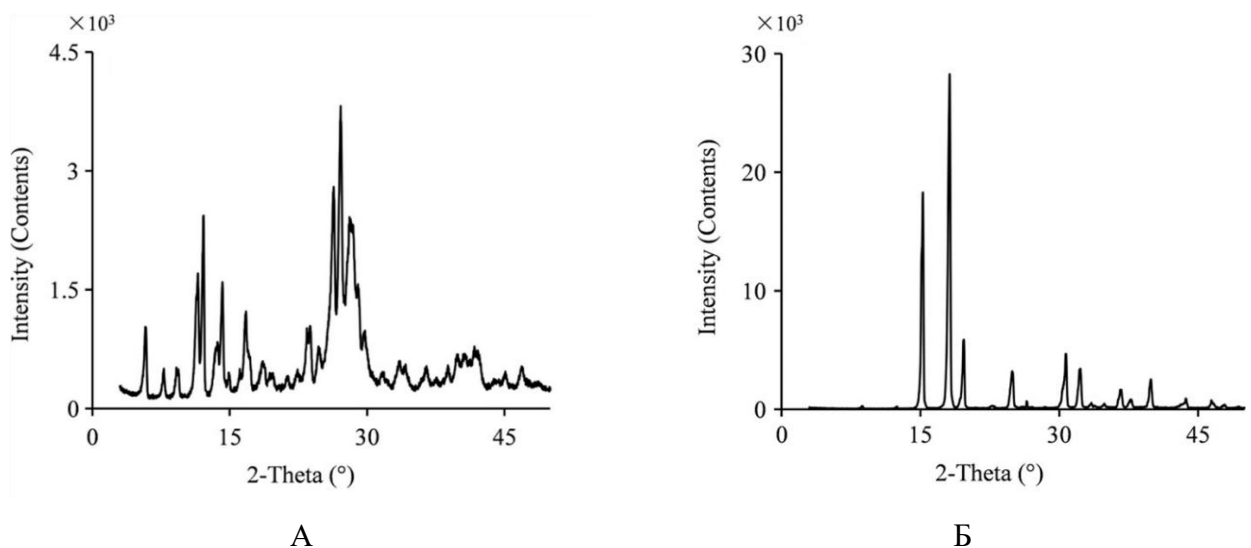


Рисунок 1.18 – Дифрактограммы мирицетина (А) и пролина (Б) [181]

Композиция мирицетин-пролин имеет уникальную кристаллическую структуру (Рисунок 1.19А), отличную от структуры обоих компонентов или их смеси (Рисунок 1.19Б).

Кокристаллы мирицетин-пролин демонстрируют некоторые новые характерные интерференционные пики при значениях  $2\theta$ , равных  $10,26^\circ$ ;  $12,28^\circ$ ;  $15,06^\circ$ ;  $18,28^\circ$ ;  $20,56^\circ$ ;  $21,68^\circ$ ;  $23,46^\circ$  и  $25,02^\circ$  [181].

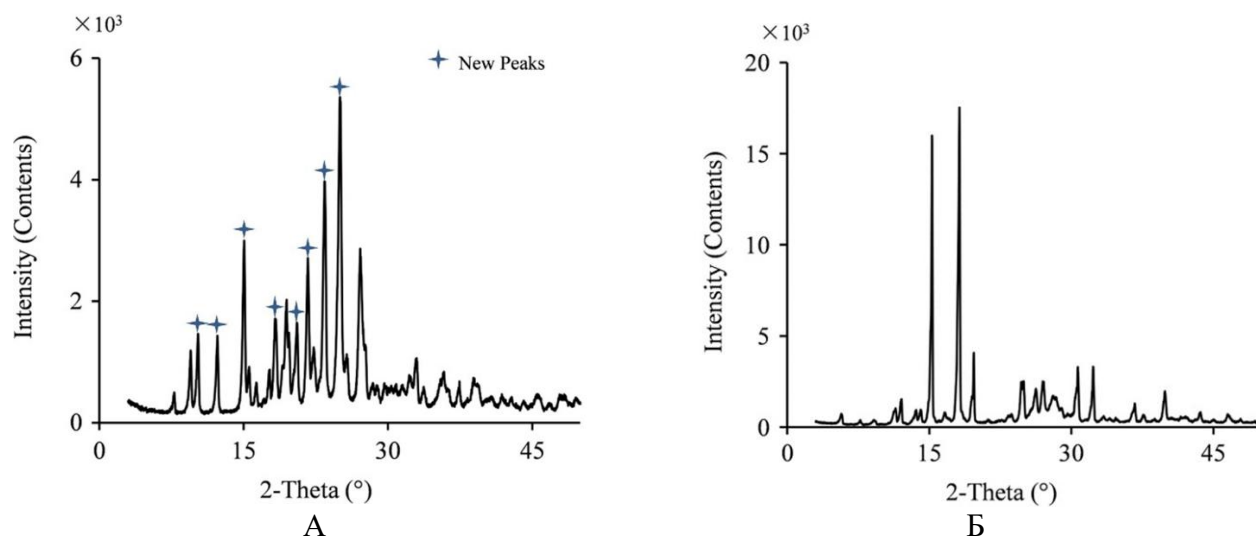


Рисунок 1.19 – Дифрактограммы кокристалла мирицетин-пролин (А) и физической смеси (Б) [181]

Острые пики на дифрактограмме генистеина подтверждают кристаллическую природу флавоноида. Его композиции с лизином (Рисунок 1.20А) и аргинином (Рисунок 1.20Б), полученные методом сухого гриндинга, имеют на дифрактограммах эффект гало, который свидетельствует об аморфном характере полученных продуктов [162].

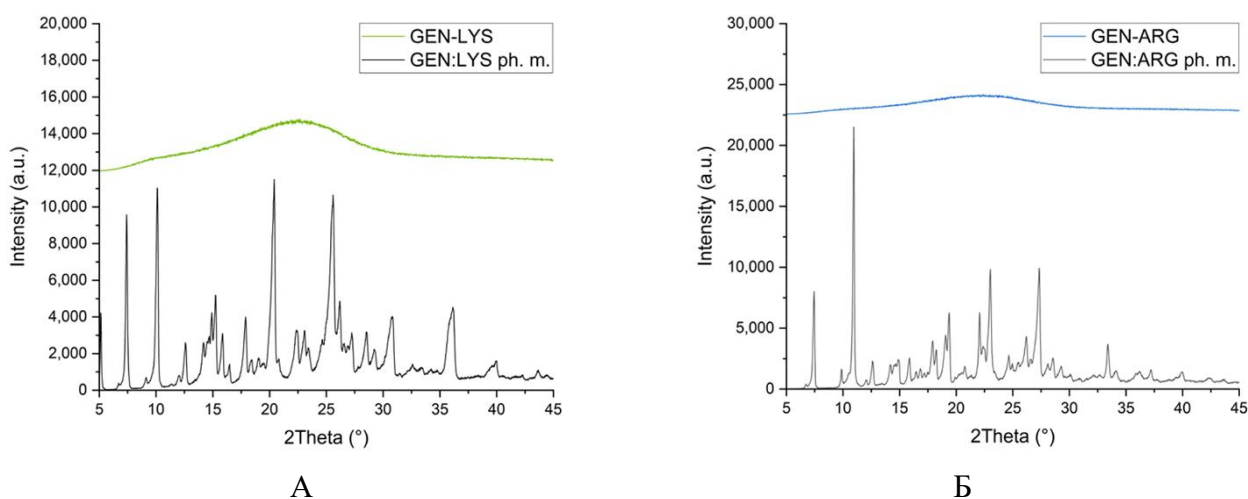


Рисунок 1.20 – Дифрактограммы: А – композиции генистеин-лизин и физической смеси, Б – композиции генистеин-аргинин и физической смеси [162]

*Спектральные методы анализа.* Спектры поглощения в инфракрасной области (ИК) несут информацию о наличии либо отсутствии водородных связей между кислотными и основными функциональными группами флавоноида и аминокислоты.

Так, на основании наблюдаемых сдвигов полос валентных колебаний связей O–H, C=C–C=O, C–N и C=O кокристаллов нарингенин–L-пролин и нарингенин-бетаин относительно исходных соединений исследователи из Факультета фармацевтических наук Шанхайского университета традиционной китайской медицины высказали предположение о том, что кокристаллизация между флавоноидом и аминокислотой происходит за счет образования водородных связей (Таблица 1.6) [156].

Таблица 1.6 – Сравнение характеристических частот в ИК-спектрах исходных соединений и кокристаллов

Тип колебания	Волновое число, см <sup>-1</sup>				
	нарингенин	бетаин	L-пролин	нарингенин-бетаин	нарингенин–L-пролин
O–H $\nu$	3035	-	-	3135	3120
C=C–C=O $\nu$	1628	-	-	-	1624
	1600	-	-	1605	1611
	1588	-	-	1587	-
C=O $\nu$	-	1614	1560	1620	1611
C–N $\nu$	-	1338	1378	1324	1363

Отличить кокристалл от соли представляется возможным по спектрам твердофазного <sup>13</sup>C-ядерного магнитного резонанса (ЯМР), так как химический сдвиг углерода различается у протонированной и депротонированной форм. Было показано, что байкалеин-бетаин, флоретин-бетаин и кверцетин-бетаин являются кокристаллами [171], в то время как ДКВ-аргинин и катехин-аргинин имеют ионное строение [167].

Образование радикалов в частицах во время измельчения в шаровой мельнице оценивали с помощью спектроскопии электронного парамагнитного резонанса (ЭПР) [180].

*Термические методы анализа.* Для определения термических характеристик многокомпонентных аморфных и кристаллических форм, используют дифференциальную сканирующую калориметрию (ДСК) и термогравиметрию (ТГ), которые позволяют установить формирование новой твердой фазы на основании сравнения температур и энтальпий фазовых переходов исходных веществ и полученной композиции.

Международный коллектив из Индии и Австралии получил коаморфные композиции байкалина с некоторыми аминокислотами. На кривой ДСК флавоноида они обнаружили резкие эндотермические пики при 145 °С и 210 °С. Пик при 145 °С может быть вызван дегидратацией байкалина, в то время как пик при 210 °С соответствует его температуре плавления. Отсутствие или смещение этих пиков на кривых ДСК композиций указывает на изменение фазового состояния байкалина (Рисунок 1.21).

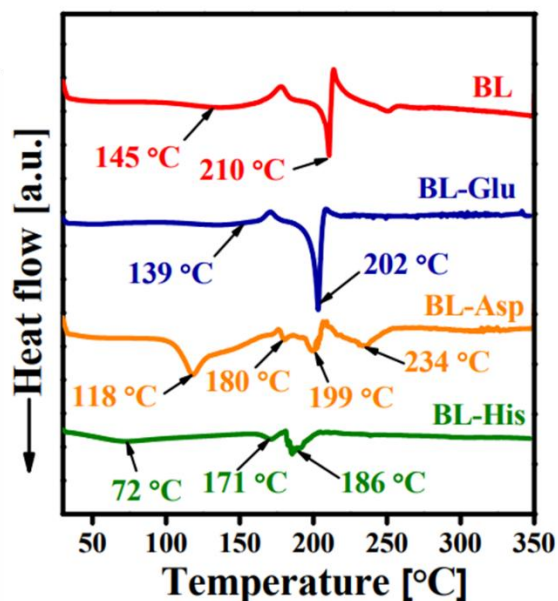


Рисунок 1.21 – Кривые ДСК байкалина (BL) и его композиций с глутаминовой кислотой (BL-Glu), аспарагином (BL-Asp) и гистидином (BL-His) [173]

Байкалин имеет температуру стеклования  $101 \pm 0,5$  °С, в то время как у композиций с глутаминовой кислотой, аспарагином и гистидином она составляет  $99 \pm 0,9$  °С,  $52 \pm 0,7$  °С и  $38 \pm 0,6$  °С, соответственно. Следовательно, ДСК показало значительные сдвиги и позволило предположить образование новой фазы [173].

*Микроскопические методы анализа.* Композиция и физическая смесь исходных веществ отличаются своей морфологией, которую исследуют методами сканирующей электронной микроскопии (СЭМ), конфокальной рамановской микроскопии (КРМ) и микроскопии в поляризованном свете (МПС).

При совместной кристаллизации хризина с L-пролином в 95%-ном этаноле, тетрагидрофуране и ацетонитриле образуются стержнеобразные кристаллы, которые при увеличении в поляризованном свете изображены на рисунке 1.22 [172].

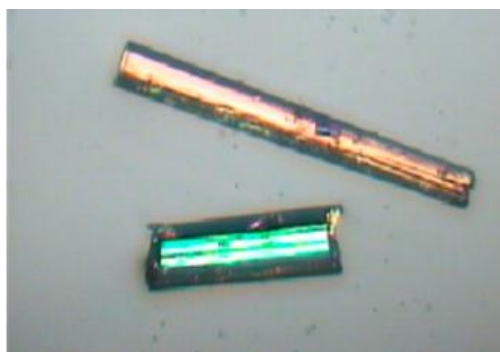


Рисунок 1.22 – Микрофотография кокристаллов хризин–L-пролин в поляризованном свете ( $\times 50$ ) [172]

На электронограмме кокристаллов кверцетин–L-пролин (Рисунок 1.23), полученных методом газового антирастворения, видно, что образец представляет собой игольчатые кристаллы [179].

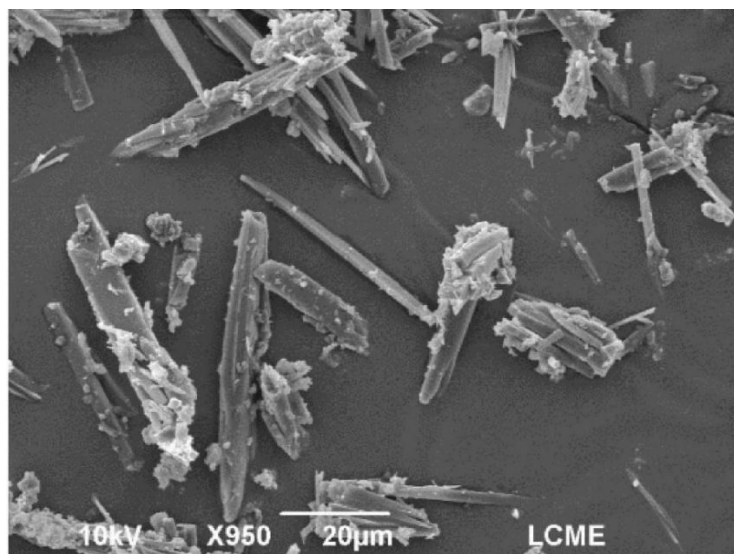


Рисунок 1.23 – Электронограмма кокристаллов кверцетин–L-пролин [179]

Используемые аналитические подходы для физико-химической характеристики кокристаллических и коаморфных композиций флавоноидов с аминокислотами обобщены в таблице 1.7. Исходя из данных таблицы, до настоящего времени исследователи не уделяли внимание стереоизомерному составу флавоноидов в композициях, поскольку нами не обнаружены работы, в которых использовали бы хироптические методы анализа даже тогда, когда обо компонента синтезируемой композиции проявляют свойство хиральности [156].

Таблица 1.7 – Методы физико-химического анализа композиций флавоноидов с аминокислотами

Композиция	Морфологический анализ			Термический анализ		Спектральный анализ		Дифракционный анализ	
	СЭМ	КРМ	МПС	ДСК	ТГ	ИК	ЯМР	РСА	РПД
апигенин-аргинин				✓		✓			✓
апигенин-пролин			✓	✓	✓	✓		✓	✓
байкалеин-бетаин				✓			✓	✓	✓
байкалеин-пролин		✓	✓	✓	✓	✓		✓	✓
байкалин-аспарагин				✓		✓			✓
байкалин-гистидин				✓		✓			✓
байкалин-глутаминовая кислота				✓		✓			✓
генистеин-аргинин	✓			✓	✓	✓			✓

Продолжение Таблицы 1.7

генистеин-глутамин	✓			✓	✓	✓			✓
генистеин-лизин	✓			✓	✓	✓			✓
генистеин-пролин		✓	✓	✓	✓	✓		✓	✓
генистеин-тирозин	✓			✓	✓	✓			✓
генистеин-триптофан	✓			✓	✓	✓			✓
гесперидин-аргинин				✓		✓			✓
гесперидин-глицин				✓		✓			✓
дигидрокверцетин-аргинин							✓		
дигидрокверцетин-лизин	✓			✓	✓	✓	✓		✓
катехин-аргинин							✓		
кверцетин-β-аланин				✓					✓
кверцетин-аргинин			✓			✓			
кверцетин-аргинин						✓			✓
кверцетин-аргинин				✓					✓
кверцетин-аргинин							✓		
кверцетин-аспарагиновая кислота						✓			✓
кверцетин-бетаин				✓			✓	✓	✓
кверцетин-глицин						✓			✓
кверцетин-глутаминовая кислота						✓			✓
кверцетин-карнитин				✓		✓			✓
кверцетин-пролин		✓	✓	✓	✓	✓		✓	✓
кверцетин-пролин	✓	✓		✓					✓
кверцетин-пролин				✓	✓	✓			✓
кверцетин-триптофан						✓			✓
кемпферол-пролин		✓	✓	✓	✓	✓		✓	✓
лютеолин-пролин		✓	✓	✓	✓	✓		✓	✓
мирицетин-пролин	✓			✓		✓			✓
нарингенин-бетаин	✓			✓		✓	✓		✓
нарингенин-бетаин				✓		✓		✓	✓
нарингенин-пролин				✓		✓	✓		✓
рутин-метионин				✓		✓			✓
флоретин-бетаин				✓			✓	✓	✓
хризин-пролин		✓	✓	✓	✓	✓		✓	✓

*Количественное определение.* Для определения стехиометрических соотношений флавоноида и аминокислоты в кокристаллах была проведена спектроскопия  $^1\text{H}$ -ядерного магнитного резонанса в растворе [156]. Количественное определение компонентов композиции в тесте растворения проводили методами прямой спектрофотометрии (СФМ) или высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) со спектрофотометрическим способом детектирования. Аминокислотный компонент определяли только в исследовании кокристаллов мирицетин-пролин путем ВЭЖХ-СФМ дериватов пролина с 2,4-динитро-1-фторбензолом [181]. В исследовании фармакокинетики и распределения в тканях нарингенина после введения кокристаллов флавоноид–бетаин и флавоноид–L-пролин использовали ВЭЖХ с масс-детектором [156].

До настоящего времени валидированные методики количественного определения встречаются лишь в ограниченном числе работ, поэтому актуальной задачей является разработка системных аналитических подходов к количественному определению флавоноидов и аминокислот в композициях.

### 1.3.5. Биофармацевтические характеристики

Практически все работы по получению новых кокристаллических и коаморфных композиций подчинены цели повысить растворимость малорастворимого в воде флавоноида, поэтому проведение теста кинетики растворения является неотъемлемой частью таких исследований. По результатам этого теста, собранным в таблице 1.8, делали вывод о биодоступности полученной композиции.

Таблица 1.8 – Увеличение растворимости флавоноида путем получения композиций

Композиция	Кратность увеличения растворимости флавоноида	Ссылка
генистеин-лизин	23820	[162]
генистеин-аргинин	18760	[162]
байкалин-гистидин	61,67	[173]
мирицетин-пролин	7,69	[181]
апигенин-пролин	7,17	[170]
байкалин-аспарагин	6,60	[173]
кверцетин-аргинин	5,00	[175]
гесперидин-аргинин	4,50	[182]
кверцетин-аргинин	3,78	[177]
кверцетин-бетаин	3,67	[171]
кверцетин- $\beta$ -аланин	3,10	[175]

Продолжение Таблицы 1.8

кемпферол-пролин	2,70	[172]
байкалин-глутаминовая кислота	2,60	[173]
апигенин-аргинин	2,01	[169]
нарингенин-бетаин форма В	1,93	[184]
нарингенин-бетаин форма А	1,78	[184]
байкалеин-бетаин	1,73	[171]
хризин-пролин	1,70	[172]
флоретин-бетаин	1,59	[171]
байкалеин-пролин	1,50	[172]

Около 70 % композиций повысили растворимость флавоноида в 1,5–5 раз. В некоторых случаях кратность достигала 60. Встречаются и уникальные примеры. Так, коаморфные композиции генистеина с лизином и аргинином обладают увеличенной в 19-24 тысячи раз растворимостью. Наилучшая растворимость последних может быть объяснена сильными основными свойствами аминокислот, которые способствуют ионизации фенольных гидроксильных групп флавоноида.

### 1.3.6. Биологическая активность и фармакокинетика

*Биологическая активность.* Антиоксидантные свойства, как один из основных механизмов неспецифического действия флавоноидов, изучались на реакции с DPPH, CUPRAC и FRAP.

Таблица 1.9 – Виды биологической активности

Образец	Вид биологической активности	Ссылка
апигенин-аргинин	цитотоксичность	[169]
генистеин-аргинин, генистеин-лизин	антиоксидантная активность (DPPH, CUPRAC), ингибирование $\alpha$ -глюкозидазы	[162]
гесперидин–L-аргинин, гесперидин-глицин	противовоспалительная и антиоксидантная активность	[182]
кверцетин–L-карнитин, кверцетин–L-пролин	антиоксидантная активность (DPPH, FRAP), цитотоксичность, ингибирование сериновой протеазы	[178]
кверцетин-аргинин	противовоспалительная активность	[176]
нарингенин-бетаин, нарингенин–L-пролин	антигиперлипидемическая активность	[156]

Интересно отметить, что антиоксидантную способность кверцетина– $\beta$ -аланина, кверцетина–L-аргинина и рутина–L-метионина оценивали с помощью спектроскопии

электронного парамагнитного резонанса. Противовоспалительный эффект устанавливали в условиях *in vitro* и *in vivo*. Среди специфических видов биологической активности флавоноидов были проведены испытания на цитотоксичность, антигиперлипидемический эффект и способность ингибировать  $\alpha$ -глюкозидазу и сериновую протеазу (Таблица 1.9).

В одной из немногих работ, где аминокислота позиционировалась как фармакологически активный компонент, изучали влияние композиции даидзеин-бетаин на регуляцию липидного обмена. Было показано, что по сравнению с группами, принимавшими флавоноид и аминокислоту по отдельности, в группе композиции наблюдается синергизм между компонентами в борьбе с ожирением [185].

*Фармакокинетика.* Были проанализированы четыре основных фармакокинетических параметра: площадь под фармакокинетической кривой (AUC), максимальная концентрация активного вещества в плазме крови ( $C_{max}$ ), время достижения максимальной концентрации ( $T_{max}$ ) (Таблица 1.10). Для композиции мирицетин-пролин также определяли время полувыведения, среднее время удержания и биодоступность. Кокристаллы кемпферол-L-пролин анализировали по метаболиту флавоноида – кемпферол-3-O-глюкозиду.

Таблица 1.10 – Фармакокинетические параметры флавоноидов, вводимых в составе композиций с аминокислотами

Образец	$\tau$ , ч	AUC, (мкг/мл)·ч	$C_{max}$ , мкг/мл	$T_{max}$ , ч	Ссылка
кемпферол	24	39,55±8,49	7,83±1,26	6,00±0,00	[172]
физическая смесь кемпферола и L-пролина		29,86±15,38	6,54±3,45	4,00±0,00	
кемпферол-L-пролин		178,68±79,96	36,79±20,52	4,66±3,05	
мирицетин	48	3,88±1,61	0,43±0,10	4,00±1,41	[181]
мирицетин-пролин		11,51±3,68	1,49±0,36	2,60±1,34	
нарингенин	48	2,93±0,90	0,51±0,31	2,20±1,10	[156]
нарингенин-бетаин		14,38±4,86	1,71±0,51	3,60±0,89	
нарингенин-L-пролин		7,00±1,77	1,02±0,24	2,00±0,00	

Все три композиции демонстрируют увеличение AUC (в 2,4–4,9 раза) и  $C_{max}$  (в 2,0–4,7 раза) вместе с уменьшением  $T_{max}$  (в 1,1–1,5 раза) по сравнению с флавоноидом. Исключение составляет композиция нарингенин-бетаин, у которой  $T_{max}$  увеличился в 1,6 раза.

#### 1.4. Выводы по главе 1

1. Осуществлен скрининг литературных источников, в которых описаны методы получения, физико-химические и биологические свойства более 50 кокристаллических и

коаморфных композиций флавоноидов и аминокислот. За десятилетний период (с момента появления первой статьи в 2015 году) из 1840 статей по критериям включения и исключения отобрано для подробного изучения 28 публикаций.

2. Выявлено, что, используя подходы инженерии кристаллов, удастся получить водорастворимые композиции флавоноидов с аминокислотами в качестве коформеров, поэтому это направление представляется актуальным для разработки лекарственных препаратов на основе субстанций природного происхождения.

3. Установлено, что для характеристики физико-химических свойств композиций флавоноидов с аминокислотами используются микроскопические, дифракционные, спектральные и термические методы анализа, однако до настоящего времени остаются нерешенными вопросы разработки методик количественного содержания аминокислот в коаморфных и кокристаллических продуктах. Не выявлено исследований, в которых бы уделялось внимание стереохимическим особенностям строения даже тогда, когда оба компонента синтезируемой композиции являются хиральными.

4. Показано, что полученные композиции продемонстрировали улучшенные биофармацевтические характеристики флавоноидов, но на данный момент еще ни одна композиция такого типа не доведена до этапа клинических испытаний эффективности и безопасности.

5. Выявлено, что в проанализированных литературных источниках композиция состава дигидрокверцетин-глицин описана не была. В отличие от большинства похожих по дизайну работ, в этой композиции фармакологической активностью обладает не только флавоноид, но и аминокислота. Учитывая способность ДКВ и глицина воздействовать на звенья биохимических механизмов нейродегенеративных заболеваний, от нее можно ожидать мультитаргетного фармакологического действия.

## ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### 2.1. Объекты исследования

Дигидрокверцетин (ФС 000388-270812, АО «Аметис», Благовещенск, Россия);  
Дигидрокверцетин (опытный образец, полученный методом распылительной сушки, АО «Аметис», Благовещенск, Россия);  
Дигидрокверцетин (ООО «Таксифолия», Белгород, Россия);  
ВитаРост (ООО «Робиос», Серпухов, Россия);  
Таксифолин Аква (ООО «Продвинутые технологии», Москва, Россия);  
Глицин (Reanal, Венгрия)

### 2.2. Реагенты, растворители, среды, стандартные образцы

#### Реагенты

Азотная кислота 65%, х.ч.

Аскорбиновая кислота (Luwei Pharmaceutical Group Co., Ltd, Цзыбо, Китай)

Ацетатный буферный раствор:

19,62 г калия ацетата растворяли в 50 мл воды, добавляли 22,2 мл уксусной кислоты ледяной. Объем раствора доводили водой до 100 мл.

Боргидрид натрия, х.ч.

Водорода пероксид, 30% водный раствор, х.ч.

Гидриндантин, получен путем восстановления нингидрина аскорбиновой кислотой:

Раствор аскорбиновой кислоты (8 г в 50 мл воды) при 40 °С добавляют к раствору нингидрина (8 г в 250 мл воды) при 90 °С. Смесь оставляют стоять в течение 30 мин и затем охлаждают до комнатной температуры. Гидриндантин отфильтровывают, промывают водой и высушивают в эксикаторе над хлоридом кальция.

Гидроксид натрия, х.ч.

Калия ацетат (ч.д.а., «Химреактивкомплект», СССР, ГОСТ 5820-68)

Муравьиная кислота (для ВЭЖХ, Macklin Inc., Китай)

Набор для подсчета клеток (Cell Counting Kit 8, ССК-8) – Selleck Chemicals, Хьюстон, США

Нингидрин (ч., Химический завод им. Войкова, СССР)

Нингидриновый реактив с олова(II) хлоридом:

20 мг нингидрина растворяли в 7,5 мл диметилсульфоксида при помощи ультразвуковой ванны и добавляли 2,5 мл раствора олова(II) хлорида. Раствор используют свежеприготовленным.

Нингидриновый реактив с гидриндантином:

100 мг нингидрина и 4 мг гидриндантина растворяли в 7,5 мл диметилсульфоксида и добавляли 2,5 мл ацетатного буферного раствора. Раствор используют свежеприготовленным.

Олова(II) хлорида дигидрат (ч., завод им. Войкова, СССР, ГОСТ 36-68)

Олова(II) хлорида раствор:

8 мг олова(II) хлорида дигидрата растворяли при помощи обработки ультразвуком в 10 мл ацетатного буферного раствора.

Пенициллина и стрептомицина раствор (P/S) – 1X, Gibco, Уолтем, США

Трипсина раствор с этилендиаминтетраацетатом (ЭДТА) – 1X, Gibco, Уолтем, США

Уксусная кислота ледяная (х.ч., ООО «Реахимкомплект», Россия, ГОСТ 61-75)

Фосфатный буферный раствор (PBS) – 0,01 М, Biosharp, Хэфей, Китай

Хлороводородная кислота 37%, ос.ч.

Эмбриональная телячья сыворотка (Fetal bovine serum, FBS) – 1X, ExCell, Шанхай, Китай

### **Растворители**

Ацетон (ОСЧ, АО «База №1 Химреактивов», г. Старая Купавна, Россия)

Ацетонитрил ( $\geq 99,9\%$ , «для градиентной ВЭЖХ», Fisher Scientific, Соединенное Королевство)

Вода дистиллированная, получена из воды водопроводной при помощи аквадистиллятора

Вода для хроматографии, получена из воды дистиллированной при помощи деионизатора

Дейтерированный ацетон

Дейтерированная вода

Дейтерированный метанол

Диметилсульфоксид (ДМСО) – ч., «Химреактивкомплект», СССР – для реакции глицина с нингидрином

Диметилсульфоксид (ДМСО) – 99,9%, Veoytime, Шанхай, Китай – для оценки цитотоксичности

Метанол (для ВЭЖХ, ООО «Акваметрия», Москва, Россия)

### **Среды**

Минимально необходимая среда заменимых аминокислот (Minimal essential medium, MEM) – 1X, Gibco, Уолтем, США

Среда Дульбекко, модифицированная по Иглу (Dulbecco's modified Eagle medium, DMEM) – 1X, Gibco, Уолтем, США

### Стандартные образцы

Государственный стандартный образец ионов кадмия ГСО 7733-2000 1,0 мг/см<sup>3</sup>

Государственный стандартный образец ионов мышьяка ГСО 7344-96 0,1 мг/см<sup>3</sup>

Государственный стандартный образец ионов никеля ГСО 7873-2000 1,0 мг/см<sup>3</sup>

Государственный стандартный образец ионов ртути ГСО 7879-2001 1,0 мг/см<sup>3</sup>

Государственный стандартный образец ионов свинца ГСО 7778-2000 1,0 мг/см<sup>3</sup>

Государственный стандартный образец состава глицина ГСО 10272-2013

Государственный стандартный образец состава дигидрокверцетина ГСО 10766-2016

Стандартный раствор иттрия 1000 мг/мл

### 2.3. Оборудование

Автодозаторы одноканальные рабочим объемом 100-1000 мкл и 1000-5000 мкл;

Аквадистилятор Liston A1110 (ООО «Листон», Жуков, Россия);

Весы электронные GR-300 (AND, Япония);

Весы электронные Sartorius;

Влагомер ML-50 (A&D, Токио, Япония);

Влагомер I-Thermo GA64M (BEL Engineering srl, Монца, Италия);

Деионизатор Водoley-М (ООО «НПП Химэлектроника», Москва, Россия);

Дифрактометр монокристалльный Xcalibur Eos (Agilent Technologies, Inc., Санта-Клара, Калифорния, США);

Дифрактометр порошковый ARL X'TRA (Thermo Electron Corporation, Уолтем, Массачусетс, США);

Иономер SevenCompact S220 с электродом InLab<sup>®</sup> Expert Pro-ISM (Mettler-Toledo GmbH, Грайфензее, Швейцария);

Калориметр сканирующий DSC 204 HP Phoenix<sup>®</sup> (Netzsch GmbH & Co. KG, Зельб, Германия);

Камера Горяева ХВ.К.25 (QUIJING, Шанхай, Китай);

Лиофильная сушилка (BK-FD12P, Jinan Biobase Medical Co, Ltd., Шандонг, Китай);

Микроскоп оптический Analytik RNMK-05 (VEB Wägetechnik Rapido, Радебойль, Германия) с нагревательным столиком Voetius (Nagema, Германия) и камерой DEM200 (Levenhuk, США);

Микроскоп оптический СКХ41 (Olympus, Токио, Япония);

Микроскоп сканирующий электронный JSM-6380LA (JEOL Technics Ltd., Акишима, Япония);

Поляриметр UniPol 2020 (Schmidt + Haensch, Берлин, Германия);

Прибор для проведения теста растворения DT 126 light (Erweka GmbH, Ланген, Германия);  
Радиационно-технологическая установка УЭЛР-10-15-С-1 (АО "НПП "Торий", Москва, Россия);  
Система минерализации Milestone Ethos Easy;  
Спектрометр атомно-абсорбционный Spectr AA-240 FS с ртутно-гидридной установкой VGA-77 (Agilent);  
Спектрометр инфракрасный ФСМ 2202 с приставкой нарушенного полного внутреннего отражения горизонтального типа НПВО–Алмаз (ООО «Инфраспек», Санкт-Петербург, Россия);  
Спектрометр эмиссионный с индуктивно-связанной плазмой iCAP 7400 DUO (Thermo Scientific);  
Спектрометр ядерного магнитного резонанса Bruker Avance III 800 МГц (Германия);  
Спектрометр ядерного магнитного резонанса Bruker Avance III 600 МГц (Германия);  
Спектрофотометре микропланшетный Eon (BioTek, Винуски, США);  
Спектрофотометры Specord 50 и Specord 250 (Analytik Jena AG, Йена, Германия);  
Термовесы TG 209 F1 Libra® (Netzsch GmbH & Co. KG, Зельб, Германия);  
Термостат пробирочный TS-100 (Biosan SIA, Рига, Латвия);  
Термостат суховоздушный FED 53 (Binder GmbH, Туттлинген, Германия);  
Ультразвуковая ванна УЗВ-9,5 («Сапфир», Москва, Россия);  
Установка для нанесения ионного покрытия IB-3 (Eiko Engineering Co., Токио, Япония);  
Хроматограф LicArt 62 (ООО «Лабконцепт», Санкт-Петербург, Россия): насос QP-62d, термостат T-85, спектрофотометрический детектор UV-62, инжектор 7725i;  
Хроматограф Shimadzu LC-30 (Shimadzu Corporation, Киото, Япония): дегазатор DGU-20A5, два насоса LC-30AD, автосамплер SIL-20AC, термостат CTO-20A, диодно-матричный детектор SPD-M20A и масс-спектрометра LCMS-8040;  
Центрифуга 5418 (Eppendorf AG, Гамбург, Германия) – для пробоподготовки перед ВЭЖХ  
Центрифуга 5810 R (Eppendorf AG, Гамбург, Германия) – для эксперимента с клетками

#### **2.4. Посуда и вспомогательные материалы**

Колбы мерные на 10, 25, 50 и 100 мл;  
Пипетки градуированные на 1,0, 2,0 и 5,0 мл;  
Сосуд Дьюара (YDS-30-125, Haier Biomedicinal Technology Co., Ltd., Чэнду, Китай);  
Фарфоровая ступка и пестик;  
Фильтровальная бумага;  
Фильтры шприцевые с нейлоновой мембраной с диаметром пор 0,45 мкм;

Цилиндры мерные на 50 и 100 мл;

Чашка Петри

Шприц для инъекций объемом 50 мкл 705 N (Hamilton, Румыния)

## **2.5. Клеточные линии и условия культивирования**

*Клеточные линии:* иммортализованные клетки карциномы кишечника человека CaCo-2, иммортализованные клетки эмбриональных почек человека HEK293, иммортализованные эпителиальные клетки пупочной вены человека HUVEC, иммортализованные фибробласты мыши 3T3.

*Условия культивирования клеток.* Клетки культивировали в среде, содержащей DMEM : FBS : MEM : P/S в соотношении 88:10:1:1 для CaCo-2 и DMEM : FBS : P/S в соотношении 89:10:1 для остальных клеточных линий. Культуру клеток накапливали в чашках Петри диаметром 100 мм в инкубаторе при температуре 37 °C в атмосфере, содержащей 5% углекислого газа и при относительной влажности 95%. Питательную среду обновляли каждые 24 ч.

## **2.6. Способы получения композиции дигидрокверцетин-глицин**

### **2.6.1. Кристаллизация на границе раздела фаз**

Глицин растворяли в воде (125 мг/мл), а в качестве органического растворителя использовали несмешивающийся с водой этилацетат, в котором хорошо растворяется ДКВ (14 мг/мл). Раствор ДКВ наслаивали на раствор глицина так, чтобы получилось два несмешивающихся слоя. Полученную систему выдерживали при температуре 4 °C в течение 7 дней. На дне бюкса выпали призматические прозрачные бесцветные кристаллы, которые подвергли рентгеноструктурному анализу.

### **2.6.2. Лиофилизация**

Смесь ДКВ (2 г) и глицина (10 г) растворяли при нагревании в 150 мл воды. Раствор помещали в круглодонную колбу и замораживали в сосуде Дьюара с сухим льдом. Колбу присоединяли к коллектору лиофильной сушилки. В зоне образцов поддерживали температуру  $-40^{\circ}\text{C}$ , а на конденсаторе  $-80^{\circ}\text{C}$ . Разрежение, создаваемое вакуумным насосом 2XZ-2, составляло 25 Па. Цикл сушки останавливали после полной сублимации растворителя.

Для получения образцов сравнения глицин (10 г) растворяли в 150 мл воды, а ДКВ (2 г) растворяли в том же объеме воды, но при нагревании. Далее растворы лиофилизировали при тех же условиях.

### **2.6.3. Распылительная сушка**

К горячему водному раствору ДКВ (66 мг/мл) добавляли навеску глицина (1:1, моль) до концентрации 15 мг/мл и распыляли на охлажденную стеклянную поверхность. Полученную твердую фазу подвергали термомикроскопическому анализу.

### **2.6.4. Суспендирование**

Насыщенный раствор ДКВ в этилацетате (14 мг/мл) и насыщенный водный раствор глицина (125 мг/мл) в соотношении 1:1 (об/об) тщательно перемешивали и оставляли при комнатной температуре для испарения растворителя. Образовавшуюся твердую фазу (продукт 2) подвергали термомикроскопическому анализу.

### **2.6.5. Сухой гриндинг**

В фарфоровой ступке пестиком растирали 2 г ДКВ и 10 г глицина в течение 10 мин. Полученный порошок анализировали методом сканирующей электронной микроскопии.

## 2.7. Методы анализа

### 2.7.1. Дифракционные методы анализа

**Рентгеноструктурный анализ** осуществляли на дифрактометре Xcalibur Eos. В качестве источника излучения использовали молибденовый катод ( $\lambda = 0,71 \text{ \AA}$ ). Структуру расшифровывали прямым методом при помощи комплекса программ SHELXTL (версия 6.14, Bruker AXS GmbH, Карлсруэ, Германия).

**Рентгеновская порошковая дифрактометрия.** Дифрактограммы регистрировали с помощью рентгеновского дифрактометра ARL X'TRA, оснащенного вертикальным широкоугольным  $\theta$ - $\theta$  гониометром и твердотельным детектором Пельтье с монохроматическим излучением Cu-K $\alpha$  ( $\lambda = 1,54 \text{ \AA}$ ). Он работал при температуре 22 °C, силе тока 25 мА и напряжении 45 кВ. Время интегрирования составляло 1 с.

### 2.7.2. Методы органолептической оценки

**Цвет** порошка определяли на фильтровальной бумаге при рассеянном дневном свете в условиях минимального проявления тени. Небольшое количество вещества (0,5–2,0 г) помещали на белую бумагу и без нажима разравнивали шпателем так, чтобы поверхность стала плоской.

**Запах.** Навеску субстанции массой 0,5–2,0 г равномерно распределяли на стеклянной поверхности и через 15 мин определяли запах на расстоянии  $5 \pm 1$  см.

**Растворимость** субстанций в растворителе оценивали по методикам Государственной фармакопеи Российской Федерации XV издания (ОФС.1.2.1.0005) и Фармакопеи Евразийского экономического союза (2.3.6.0.).

**Плотность.** Во флакон помещали 1 г (точная навеска) субстанции, переносили в мерный цилиндр и определяли объем, занимаемый порошком, по нанесенной шкале. Плотность выражали как отношение массы к объему.

### 2.7.3. Микроскопия

**Сканирующая электронная микроскопия.** На держателе закрепляли образцы с помощью двусторонней полипропиленовой ленты и покрывали золотом в атмосфере аргона при 13,33 Па в установке для нанесения ионного покрытия ИВ-3. Толщина золотого покрытия составляла приблизительно 20 нм. Сканирующий электронный микроскоп JSM-6380LA работал при ускоряющем напряжении 20 кВ в режиме вторичной электронной визуализации и был использован для получения изображений при увеличении 30×, 500× и 2000×.

**Термомикроскопический анализ** проводили на оптическом микроскопе при увеличении 10× и 16×, снабженном нагревательным столиком и реостатом. Прибор калибровали по ацетанилиду. Микрофотографии получали при помощи камеры DEM200.

### 2.7.4. Потеря в массе при высушивании

Измерение потери в массе при высушивании проводили с помощью анализатора влажности (влажмера). Навеску массой 0,5 г помещали на алюминиевый лоток и нагревали галогенной инфракрасной лампой накаливания при температуре 105 °С. Анализ автоматически заканчивался, когда потеря в массе за 30 с становилась менее 5 мг.

### 2.7.5. Спектральные методы анализа

#### ***Спектрофотометрия в ультрафиолетовой и видимой областях.***

Спектры растворов снимали в кварцевой кювете с толщиной светопоглощающего слоя 1 см на спектрофотометре Spesord 50 или Spesord 250 и обрабатывали при помощи программного обеспечения WinASPECT (версия 2.3.1.0).

**Процедура дериватизации.** К 500 мкл раствора глицина или композиции ДКВ-глицин прибавляли 500 мкл нингидринового реактива, нагревали в термостате при температуре 100 °С в течение 30 минут. Охлаждали 5 мин при пониженной температуре (2-8 °С). Отбирали 500 мкл и помещали в мерную колбу вместимостью 10 мл. Доводили водой до метки. Измеряли оптическую плотность при длине волны 568 нм относительно раствора без глицина.

**Спектрометрия в средней инфракрасной области.** Спектры регистрировали с помощью инфракрасного Фурье-спектрометра методом нарушенного полного внутреннего отражения. Полученные спектры обрабатывали при помощи программного обеспечения FSpec (версия 4.3.1.15, ООО «Инфраспек», Санкт-Петербург, Россия).

**Спектроскопия ядерного магнитного резонанса.**

**Методика для субстанций ДКВ.** Образцы ДКВ в количестве 15 мг растворяли в 450 мкл дейтерированного метанола. Растворы помещали в 5-миллиметровую ЯМР-пробирку. Спектры ЯМР были получены при температуре 298 К на спектрометре Bruker Avance III с частотой 800 МГц, оснащенный тройным резонансным датчиком TXI. Импульсными программами для 1D  $^1\text{H}$ ,  $^1\text{H}, ^1\text{H}$ -COSY,  $^1\text{H}, ^1\text{H}$ -NOESY и  $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ -HSQC были zg, cosydfetgppp.2, noesyetgp и hsqcetgpsp соответственно. Во всех случаях количество сканирований составило 32. Время смешивания в эксперименте NOESY составило 400 мс.  $^1\text{H}$  и  $^{13}\text{C}$  были проанализированы с помощью программного обеспечения CcpNmr.

**Методика для композиции ДКВ-глицин.** Навеску композиции ДКВ-глицин около 18 мг растворяли в 500 мкл дейтерированной воды и 400 мкл дейтерированного ацетона. Растворы фильтровали и помещали в стеклянную пробирку. ЯМР спектры регистрировали на спектрометре Bruker Avance III 600 МГц при комнатной температуре. Химические сдвиги приведены относительно сигнала тетраметилсилана (ТМС) – 0 м.д. и остаточных протонов растворителей. Спектры были проанализированы с помощью программного обеспечения TopSpin.

**Атомно-эмиссионной спектрометрией** определяли концентрацию мышьяка, кадмия, никеля и свинца.

**Атомно-абсорбционной спектрометрией** анализировали содержание ртути.

**Минерализация.** На лабораторных весах в лодочках взвешивали до 100 до гомогенизированной пробы, после чего количественно переносят в лайнер для минерализации. Объем кислоты, необходимый для минерализации в системе Milestone Ethos Easy – смесь 3 мл перекиси водорода и 7 мл азотной кислоты.

Таблица 2.1 – Программа разложения под давлением

Шаг	Температура, °С	Время, мин	Номинальная мощность, Вт
1	150	5	1800
2	200	10	1800
3	200	15	1800

Для снижения давления внутри сосуда для минерализации его охлаждали в системе микроволновой пробоподготовки в закрытом состоянии до 40 °С.

**Атомно-эмиссионная спектрометрия (АЭС).** Определяли содержание мышьяка, кадмия, свинца и никеля в двух параллелях при помощи спектрометра эмиссионного с индуктивно-

связанной плазмой iCAP 7400 DUO. Для анализа проб использовали следующие спектральные линии: мышьяк – 189,042 нм; кадмий – 228,802 нм; свинец – 220,353 нм; никель – 231,604 нм.

Таблица 2.2 – Условия анализа методом АЭС

Параметры анализа	Значения
Обзор пламени	Аксиальный
Время промывки, с	105
1-щель, с	20
2-щель, с	20
Скорость промывки, об/мин	100
Скорость анализа, об/мин	50
Время успокоения между промывкой и анализом, с	10
Скорость распылителя, л/мин	0,6
Мощность, Вт	1150

**Атомно-абсорбционная спектрометрия (ААС).** Для ртутно-гидридной установки VGA-77 готовили растворы кислоты и редуцанта. Раствор кислоты: соляная кислота в воде с концентрацией 5,0 моль/л объемом 200 мл. Раствор редуцанта: боргидрид натрия в 0,5% водном растворе гидроксида натрия с концентрацией 0,3% объемом 250 мл. Измерения проводили на атомно-абсорбционном спектрометре Spectr AA-240 FS. Для анализа проб использовали спектральную линию ртути при 253,7 нм и скорости потока: проб – 6 мл/мин; кислоты – 1 мл/мин; редуцанта – 1 мл/мин.

Спектрофотометрию в ультрафиолетовой и видимой областях использовали для определения концентрации вещества в среде растворения в тесте «наблюдаемая скорость растворения».

Испытуемый образец упаковывали в мешочек из полупроницаемого нетканого материала, мешочек помещали в корзинку, закрывали крышкой и прикручивали к валу аппарата перемешивания.

Таблица 2.3 – Условия теста растворения

Параметры	Значения
Среда растворения	0,9 % раствор натрия хлорида в воде
Объем среды растворения	500 мл
Температура среды растворения	37 °С
Скорость вращения корзинки	75 об/мин

Отбирали пробу, в чашу растворения возвращали эквивалентный объем среды растворения. Пробу фильтровали через мембранный нейлоновый фильтр с размером пор 0,22 мкм. Концентрацию ДКВ определяли хроматографически (ВЭЖХ-СФМ) или спектрофотометрически.

### 2.7.6. Термический анализ

Дифференциальную сканирующую калориметрию проводили на сканирующем калориметре DSC 204 HP Phoenix<sup>®</sup> в алюминиевых тиглях, а термогравиметрию – на термовесах TG 209 F1 Libra<sup>®</sup> в алундовых тиглях в токе сухого азота (20-70 мл·мин<sup>-1</sup>) со скоростью нагрева 10 °С·мин<sup>-1</sup>. Приборы были предварительно откалиброваны для определения температур и энтальпий фазовых переходов чистых (99,999%) стандартных веществ: циклогексан, Hg, Ga, бензойная кислота, In, Sn, Bi, Pb, Zn, CsCl — для ДСК; In, Sn, Bi, Zn, Al, Ag, Au — для ТГ. Для проверки термовесов использовали моногидрат оксалата кальция. Экспериментальные данные были обработаны в программном обеспечении Proteus<sup>®</sup> (Netzsch GmbH & Co. KG, Selb, Германия).

### 2.7.7. Хироптические методы анализа

Оптическое вращение определяли с помощью автоматического цифрового поляриметра UniPol 2020 при длине волны 589,44 нм. Для приготовления рабочих растворов образцы ДКВ по 0,2 мг растворяли в 20 мл ацетона и фильтровали. Длина кюветы 1 дм.

### 2.7.8. Хроматографические методы анализа

*Высокоэффективная жидкостная хроматография со спектрофотометрическим и масс-детектированием (ВЭЖХ-СФМ-МС).* Для приготовления испытуемого раствора точную навеску (10,0 мг) ДКВ растворяли в 1 мл метанола, а затем центрифугировали в течение 10 мин при 12000 об/мин с использованием центрифуги 5418. Для получения рабочих растворов надосадочные жидкости (10 мкл) разводили в 990 мкл растворителя вода/метанол (2:8 об/об).

Подвижная фаза А. Раствор муравьиной кислоты в воде с рН 2,7.

Подвижная фаза Б. Метанол.

Условия хроматографирования: колонка – Kinetex<sup>™</sup> 2,6 мкм Biphenyl 100 Å, 100 мм × 3,0 мм (Phenomenex Inc.), скорость потока – 0,65мл/мин, режим элюирования – градиентный, от 7% до 21% метанола в течение 15 мин, температура колонки – 60 °С, объем пробы – 20 мкл.

Разделение проводили на хроматографе LC-30 с диодно-матричным и масс-детектором. Масс-спектрометр работал в режиме отрицательной ионизации. Хроматограммы регистрировали с помощью диодного матричного детектора при длине волны 290 нм. Данные обрабатывали с помощью программного обеспечения LabSolutions (Shimadzu Corporation).

**Высокоэффективная жидкостная хроматография со спектрофотометрическим детектированием (ВЭЖХ-СФМ).** Для приготовления испытуемого раствора точную навеску (10 мг) ДКВ или композиции ДКВ-глицин растворяли в 10 мл смеси метанол – вода 1:1 (об/об). 250 мкл полученного раствора разбавляли в 20 раз смесью метанол – вода 1:1 (об/об). Полученный раствор пропускали через шприцевой фильтр с нейлоновой мембраной с диаметром пор 0,45 мкм.

Подвижная фаза А. Раствор муравьиной кислоты в воде с рН 2,7.

Подвижная фаза Б. Метанол.

Условия хроматографирования: колонка – Zorbax 3,5 мкм SB-Phenyl 4,6 мм × 150 мм (Agilent Technologies, Inc.), скорость потока – 0,5 мл/мин, режим элюирования – градиентный, от 29% до 42,3% в течение 25 мин, температура колонки – 30 °С, объем пробы – 20 мкл.

Разделение проводили на хроматографе LicArt 62 со спектрофотометрическим детектором при длине волны 288 нм. Данные обрабатывали с помощью программного обеспечения LicArt WS (версия 00.01.01.11, ООО «Лабконцепт»).

## 2.8. Стерилизация потоком быстрых электронов

Образец ДКВ (ВитаРост, >90%, ООО «Робиос», Серпухов, Россия) подвергали ионизирующему облучению величиной 9,5 МэВ на радиационно-технологической установке УЭЛР-10-15-С-1.

## 2.9. Методы анализа *in silico*

Для прогнозирования значений  $P_a$  и  $P_i$  в программу PASS (версия 2.0, Way2Drug.com © 2011-2026) загружали формулу в виде SMILES (Simplified Molecular Input Line Entry System) или предварительно отрисованную в Marvin JS (ChemAxon) структурную формулу исследуемого вещества.

## 2.10. Методы анализа *ex vivo*

*Оценка концентрации клеток.* Для расчета концентрации клеток в чашку Петри добавляли 1,0 мл заранее разогретого до 37 °С раствора трипсина с ЭДТА и выдерживали до 5 мин. Ферментацию ингибировали, добавляя 1,0 мл питательной среды с последующей промывкой внутренней поверхности чашки Петри этой же суспензией. Полученную клеточную суспензию центрифугировали со скоростью 1000 об/мин в течение 3 мин. Супернатант удаляли, а осадок разводили 10,0 мл питательной среды, после чего 100 мкл раствора помещали в камеру Горяева и осуществляли расчет концентрации клеток ( $C$ , кл/мл), согласно формуле:

$$C = N_{cell} / N_{squares} \times 10^3, \quad (1)$$

где  $N_{cell}$  – количество клеток, обнаруженных в поле камеры Горяева,  $N_{squares}$  – количество клеток в камере Горяева, использованных для расчета концентрации.

*Оценка цитотоксичности.* Суспензию клеток разводили культуральной средой до концентрации 40000 кл/мл и распределяли по 100 мкл в лунку в 96-луночный планшет, после чего к суспензии клеток добавляли по 100 мкл анализируемых образцов, растворенных в DMEM, в диапазоне концентраций от 10,0 мг/мл до 0,0188 мг/мл. Кроме того, ряд лунок использовали в качестве «положительного», «отрицательного» и «нулевого» контроля, для чего в лунки добавляли удвоенное количество клеточной суспензии, 100 мкл ДМСО и удвоенное количество питательной среды, соответственно.

Смеси инкубировали 24 ч при 37 °С в атмосфере, содержащей 5% углекислого газа и при относительной влажности 95%. По истечении указанного срока в каждую лунку вносили по 10 мкл ССК-8 и инкубировали еще 1 ч при аналогичных условиях.

Полученные растворы анализировали на спектрофотометре в максимуме поглощения восстановленной формы WST-8 при 450 нм. Значение оптической плотности использовали для расчета выживаемости клеток ( $V$ ) по формуле:

$$V = (D_n - D_0) / (D_{100} - D_n) \times 100\%, \quad (2)$$

где  $D_n$  – оптическая плотность анализируемого образца,  $D_0$  – оптическая плотность холостого эксперимента,  $D_{100}$  – оптическая плотность положительного контроля.

Полученные значения подвергли регрессионному анализу с целью построения модели линейной регрессии зависимости выживаемости от концентрации анализируемого образца. На основании полученных линейных зависимостей рассчитывали концентрацию полумаксимального ингибирования ( $IC_{50}$ ) для анализируемых образцов как значение концентрации, при которой выживаемость клеток составляет 50%.

*Статистическая обработка.* Холостой эксперимент проводили в трехкратной повторности для каждой концентрации анализируемого образца каждого объекта исследования. Из полученных данных рассчитывали арифметические средние и доверительный интервал ( $p = 0,05$ ), а затем строили модели линейной регрессии зависимости оптической плотности испытуемого раствора от концентрации анализируемого образца.

Оценку цитотоксичности осуществляли в восьмикратной повторности для каждой концентрации каждого анализируемого образца каждого объекта исследования для каждой клеточной линии. Из полученных данных рассчитывали арифметические средние и доверительный интервал ( $p = 0,05$ ), а затем – строили модели линейной регрессии зависимости оптической плотности испытуемого раствора от концентрации анализируемого образца.

Взаимосвязь между молекулярной долей примеси *цис*-диастереомера дигидрокверцетина оценивали путем расчета коэффициента корреляции.

Для оценки статистически значимых различий в наблюдаемой цитотоксичности, а также для обоснования наличия синергизма и ингибирующего эффекта между компонентами поликомпонентных объектов исследования, на основании значений оптической плотности испытуемых образцов осуществляли двухфакторный дисперсионный анализ ( $\alpha = 0,05$ ).

Кроме того, эффект взаимодействия между компонентами поликомпонентных объектов исследования иллюстрировали при помощи изобол – диаграмм, отражающих концентрацию каждого отдельного компонента поликомпонентного объекта, при котором ожидается достижение  $IC_{50}$ , если между компонентами наблюдается аддитивный эффект.

## **2.11. Расчеты, статистическая обработка результатов и программное обеспечение**

Статистическую обработку результатов экспериментов проводили с помощью программного обеспечения Microsoft® Excel® в соответствии с ОФС.1.1.0013 ГФ РФ XV издания и ОФС 2.3.13.0. Фармакопеи ЕАЭС.

Температурный коэффициент ( $\gamma$ ) вычисляли по уравнению Вант-Гоффа:

$$\gamma = \frac{V_2^{10}}{V_1^{T_2 - T_1}}, \quad (3)$$

где  $V_2$  – скорость реакции при температуре  $T_2$ ;

$V_1$  – скорость реакции при температуре  $T_1$ .

Энергию активации ( $E_a$ ) рассчитывали по уравнению Аррениуса:

$$E_a = \frac{2,303R \cdot \lg \frac{k_2}{k_1}}{\frac{1}{T_1} - \frac{1}{T_2}}, \quad (4)$$

где  $R$  – универсальная газовая постоянная;

$k_2$  – константы скорости реакции при температуре  $T_2$ ;

$k_1$  – константа скорости реакции при температуре  $T_1$ .

График зависимости аналитического сигнала ( $A$ ) от концентрации вещества ( $C$ ) строили в программе Microsoft® Excel® в виде точечной диаграммы с добавлением линии тренда. Регрессионное уравнение и коэффициент линейной корреляции  $r$  были получены с помощью инструмента Регрессия из пакета Анализ данных.

Рассчитывали чистую ошибку (pure error,  $PE$ ) и ошибку неадекватности подбора (lack of fit error,  $LOF$  error) по формулам (1) и (2):

$$PE = A_{i,j} - \bar{A}_i, \quad (5)$$

где  $A_{i,j}$  – результат  $j$ -го измерения раствора  $i$ -ой концентрации;  $\bar{A}_i$  – среднее значение измерения при  $i$ -ой концентрации;

$$LOF = \bar{A}_i - \hat{A}_i, \quad (6)$$

где  $\hat{A}_i$  – значение  $A$  при  $i$ -ой концентрации, вычисленное по уравнению регрессии.

Суммы квадратов чистой ошибки ( $SS_{PE}$ ) и ошибки неадекватности подбора ( $SS_{LOF}$ ) вычисляли по уравнениям (3) и (4):

$$SS_{PE} = \sum_{i=1}^k \sum_{j=1}^{m_i} (A_{i,j} - \bar{A}_i)^2, \quad (7)$$

где  $k$  – количество концентраций;  $m_i$  – число параллельных определений при  $i$ -ой концентрации;

$$SS_{LOF} = \sum_{i=1}^k m_i \cdot (\bar{A}_i - \hat{A}_i)^2. \quad (8)$$

Экспериментальное значение F-критерия ( $F_{exp}$ ) рассчитывали по формуле (5):

$$F_{exp} = \frac{\frac{SS_{LOF}}{f_1}}{\frac{SS_{PE}}{f_2}}, \quad (9)$$

где  $f_1=k-2$  и  $f_2=n-k$  – степени свободы двух дисперсий,  $n$  – общее число измерений.

Прецизионность методики оценивали по результатам 3 определений для каждого из 3 уровней концентраций. Тест проводили в течение трех дней, каждый день анализировали три образца с тремя различными концентрациями вещества.

Относительное стандартное отклонение рассчитывали по формуле (6):

$$RSD = \frac{SD}{\bar{A}_i} \cdot 100\%, \quad (10)$$

где  $RSD$  (relative standard deviation) – относительное стандартное отклонение;  $SD$  (standard deviation) – стандартное отклонение значений оптической плотности при одной концентрации, вычисленное в программе Microsoft® Excel®. Доверительный интервал (confidence interval, CI) рассчитывали с помощью функции ДОВЕРИТ.НОРМ ( $\alpha = 0,05$ ) в программе Microsoft® Excel®.

Коэффициенты  $HorRat$  (Horwitz ratio) рассчитывали по формуле (7):

$$HorRat = \frac{RSD}{PRSD}, \quad (11)$$

где  $RSD$  – экспериментально найденное относительное стандартное отклонение;  $PRSD$  (predicted RSD) – стандартное отклонение, вычисленное по формуле Горвица (8):

$$PRSD = 2w^{-0,15}, \quad (12)$$

где  $w$  – массовая доля определяемого компонента в анализируемой смеси.

Расчет жизнеспособности клеток проводили по формуле:

$$V = \frac{A_n - A_0}{A_{100} - A_0} \times 100\%, \quad (13)$$

где  $A_n$  - оптическая плотность анализируемого образца,  $A_0$  – оптическая плотность холостого опыта (с исследуемым веществом, но без клеточной культуры),  $A_{100}$  - оптическая плотность положительного контроля.

**Построение формул.** Структурные формулы органических соединений, схемы и механизмы реакций были отрисованы в ChemWindow® (версия 6.0, © 1998-1999 Bio-Rad Laboratories) и KingDraw (версия 3.0.2, © 2018-2026 KingDraw Software Solutions, Inc.).

**Построение библиометрических сетей.** Из подборки статей в Lens (версия 9.7.16, © 2026, Австралия) выгружали файл библиографических данных в формате .csv. По этим данным были построены сети, основанные на отношениях совместного использования ключевых слов и совместного авторства, в программе VOSviewer (версия 1.6.20, © 2009-2023 Nees Jan van Eck и Ludo Waltman).

**Оцифровка спектров.** Содержащие спектр изображения были скачаны в формате .jpg или .png и сканированы при помощи программного обеспечения Graph2Digit (версия 0.7.1b, © 1998-2007 Вячеслав Плиско).

**Формирование списка литературы.** Список библиографических записей на документы, которые использовались автором при работе, был сформирован при помощи программного обеспечения Zotero (версия 7.0.32).

### ГЛАВА 3. СУПРАМОЛЕКУЛЯРНЫЙ СИНТЕЗ КОМПОЗИЦИИ ДИГИДРОКВЕРЦЕТИН-ГЛИЦИН НА ОСНОВЕ ХИРАЛЬНЫХ ТВЕРДЫХ ФАЗ

Улучшение фармакологических и биофармацевтических свойств уже известных биологически активных веществ осуществляется через направленное изменение структуры с помощью различных химических подходов, которые на основании вида вновь образованной связи можно разделить на две группы.

К первой группе относится ковалентная модификация, проводимая при помощи классической синтетической химии. Путем такого изменения структуры действующего вещества удается повысить эффективность его связывания с макромолекулярной мишенью, однако новые соединения представляют собой молекулы, биологическая активность, фармакодинамика и фармакокинетика которых может существенно отличаться от исходного продукта, поэтому для дальнейшей разработки лекарственного препарата потребуются проведение новых исследований на эффективность и безопасность.

Ко второй группе принадлежат методы получения супрамолекулярных ансамблей, компоненты которых не связаны между собой ковалентной связью, а удерживаются вместе за счет ионных, водородных и ван-дер-Ваальсовых взаимодействий. Нековалентный синтез позволяет получить композиции с улучшенными биофармацевтическими характеристиками, при этом оставляя фармакологические свойства неизменными, так как действующий компонент, фармакология которого уже изучена, в среде организма высвобождается из полученного комплекса. Данный подход активно привлекается для повышения растворимости фармацевтических субстанций. На мировом рынке обращается порядка 10 примеров успешного приложения инженерии кристаллов к оптимизации свойств лекарственных веществ [186]. Так, например, действующим веществом гипогликемического средства Суглат является кокристаллическая субстанция ипраглифлозин–L-пролин [187].

#### 3.1. Разработка состава композиции

На кафедре химии Института фармации им. А.П. Нелюбина в настоящее время развивается направление по получению водорастворимых композиций флавоноида ДКВ с протеиногенными  $\alpha$ -аминокислотами [188]. Так как биодоступность ДКВ в составе пероральных лекарственных форм низкая, составляет всего 0,17 % [189, 190] и даже использование липидного раствора позволило повысить ее лишь до 36 % [191], несомненный научный интерес представляет задача

получить жидкую лекарственную форму для инфузионного введения. Для ее решения нами в качестве коформера была выбрана аминокислота глицин, которая также, как и ДКВ, проявляет нейропротекторное действие. Препараты этой фармакологической группы наиболее часто применяются парентерально [192].

Соотношение флавоноида и аминокислоты для синтеза композиции ДКВ-глицин выбирали, руководствуясь их разовыми дозами в лекарственных препаратах Диквертин® (МНН: Дигидрокверцетин) и Глицин (МНН: Глицин), соответственно. Таблетки Диквертин® содержат 20 мг действующего вещества, а в подъязычных таблетках Глицин находится 100 мг фармацевтической субстанции. Таким образом, для приготовления твердофазного продукта использовали массовое соотношение ДКВ:глицин 1:5.

### 3.2. Получение композиции методами инженерии кристаллов

При оптимизации способов получения композиции проводили сопоставительный анализ морфологических и физико-химических характеристик получаемого продукта и механической смеси ДКВ и глицина. Композицию получали базовыми методами инженерии кристаллов: сухим гриндингом, кристаллизацией на границе раздела фаз, суспендированием, распылительной сушкой и лиофилизацией [193, 194, 195].

*Сухой гриндинг.* После тщательного растирания и измельчения веществ в ступке и последующего анализа продукта сухого гриндинга методом электронной микроскопии была получена электронограмма, изображенная на рисунке 3.1.

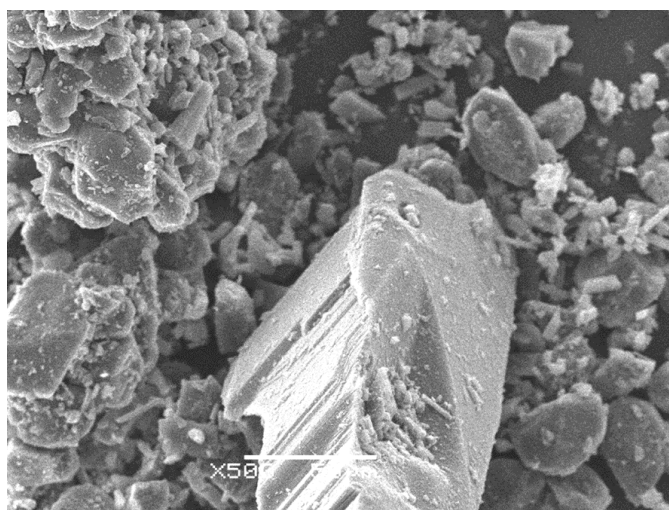


Рисунок 3.1 – Морфология продукта сухого гриндинга (500×)

На ней видны частицы порошка ДКВ неправильной формы с развитой шероховатой поверхностью, различающиеся между собой по размерам, и крупные призматические кристаллы глицина, соответствующие литературным данным (Рисунок 3.2).

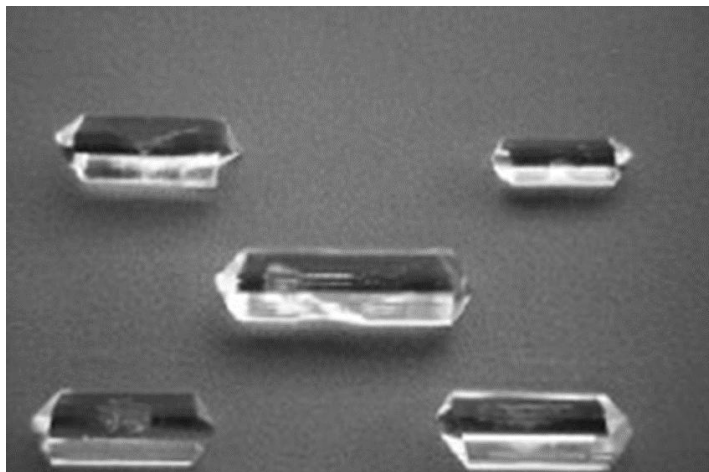


Рисунок 3.2 – Кристаллы  $\alpha$ -глицина [196]

Таким образом, этот способ не привел к получению нового твердофазного продукта.

*Кристаллизация на границе раздела фаз.* После растворения ДКВ в этилацетате, а глицина – в воде и выдерживании системы несмещающихся фаз в холодильнике при температуре 4–8 °С на дне колбы выпали красивые призматические прозрачные кристаллы (Рисунок 3.3).



Рисунок 3.3 – Внешний вид продукта кристаллизации на границе раздела фаз

К сожалению, результаты рентгеноструктурного анализа однозначно подтверждают кристаллизацию глицина отдельно от ДКВ (Рисунок 3.4).

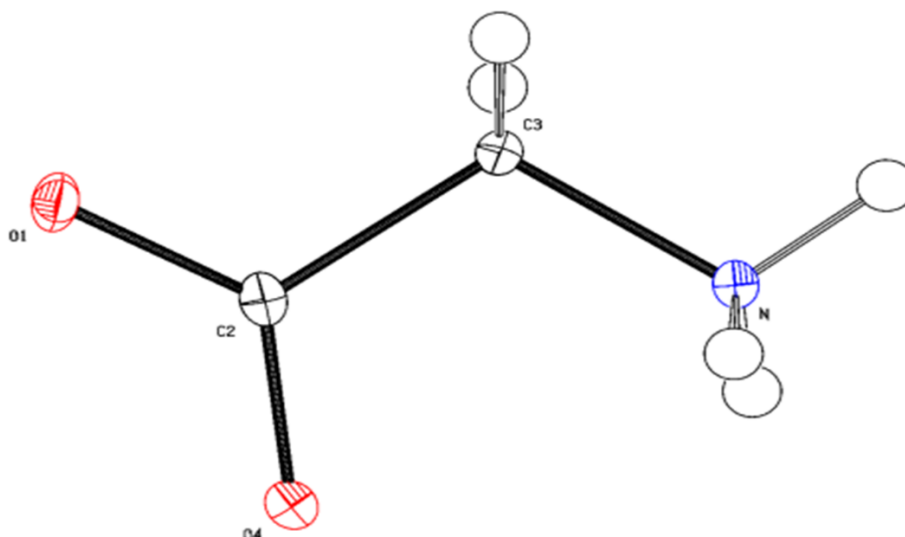


Рисунок 3.4 – Структура продукта кристаллизации на границе раздела фаз по данным рентгеноструктурного анализа

*Суспендирование.* Насыщенный раствор ДКВ в этилацетате и насыщенный водный раствор глицина тщательно перемешивали и оставляли при комнатной температуре. После испарения растворителя наблюдали образование бесцветных кристаллов игольчатой формы длиной до 10,0 мм, хорошо растворимых в воде (Рисунок 3.5А). Полученные кристаллы под микроскопом при увеличении в 16 раз визуализированы на рисунке рисунке 3.5Б. При нагревании образца до 185 °С начался процесс перехода твердой фазы в жидкую, который сопровождался изменением степени прозрачности кристаллов (Рисунок 3.5В). Аналогичное изменение зафиксировали при нагревании субстанции глицина.

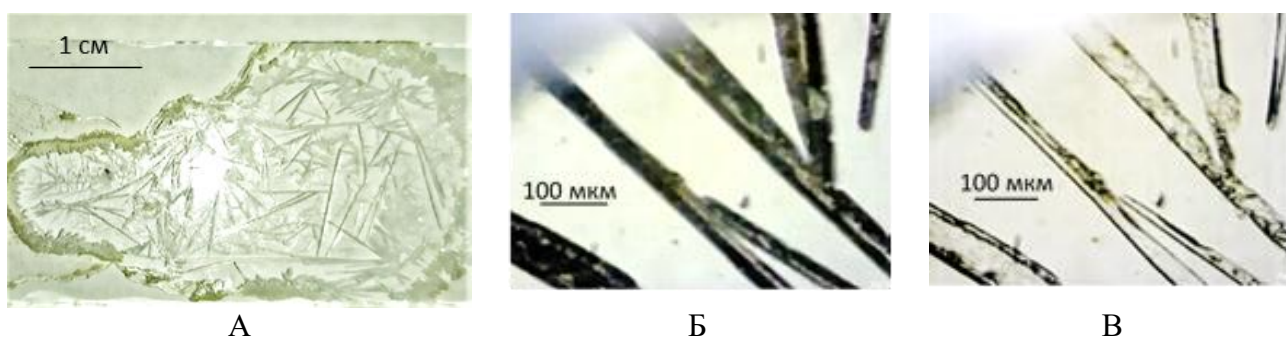


Рисунок 3.5 – Фотографии продукта суспендирования: А – макроскопический уровень, 25 °С; Б – микроскопический уровень, 25 °С (16×); В – микроскопический уровень, 185 °С (16×)

Из наблюдаемого сходства морфологических и термических свойств продукта суспендирования и исходной субстанции глицина можно сделать вывод о несостоявшейся кокристаллизации двух компонентов.

*Распылительная сушка.* Горячий водный раствор ДКВ и глицина распыляли на охлажденную стеклянную поверхность. Продукт синтеза представляет собой желтый мелкий порошок, хорошо растворимый в воде (Рисунок 3.6А). При увеличении 10× видны округлые частицы с шероховатой поверхностью диаметром 15 – 35 мкм (Рисунок 3.6Б). Температура плавления продукта составляет 120 °С, в то время как оба исходных компонента плавятся при температуре приблизительно 230 °С ( $T_{пл}$  ДКВ 228 °С,  $T_{пл}$  глицин 230 °С).

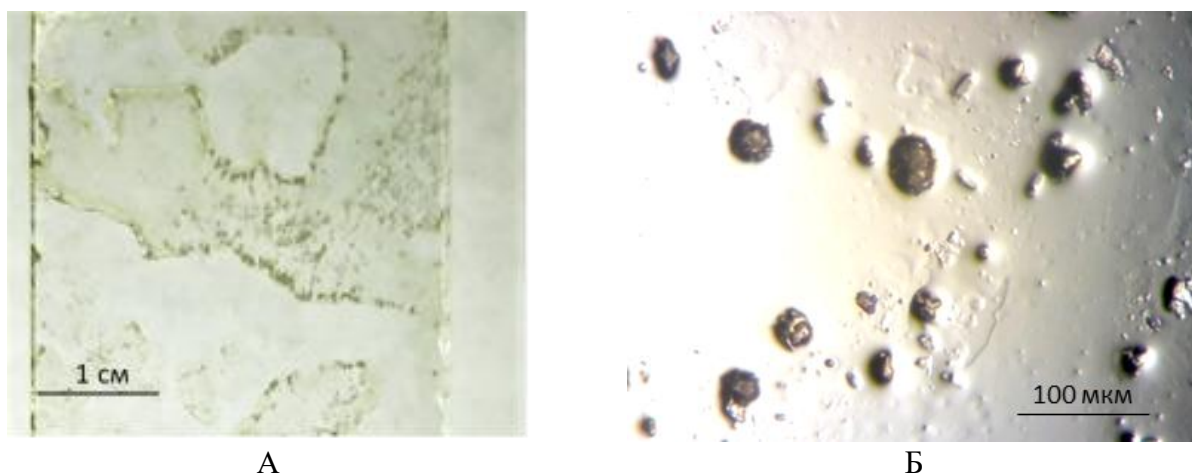


Рисунок 3.6 – Фотографии продукта, полученного в результате распылительной сушки: А – макрофотографический уровень, 25 °С; Б – микрофотографический уровень, 25 °С (10×)

Полученный продукт явно отличается по физико-химическим свойствам от исходных веществ, поэтому данный способ супрамолекулярного синтеза композиции ДКВ-глицин можно считать успешным. Однако высокая температура распылительной сушки (температура воздуха на входе – 180 °С) [197] может способствовать процессам окисления ДКВ в кверцетин за счет дегидратации. Это обстоятельство не позволило нам масштабировать процесс.

*Лиофилизация.* После лиофилизации водного раствора ДКВ и глицина был получен рыхлый воздушный порошок светло-желтого цвета со слабым смолистым запахом (Рисунок 3.7). Плотность лиофилизата композиции составляет 0,25 г/мл, при этом плотность глицина почти в 2 раза больше (0,51 г/мл).



Рисунок 3.7 – Макрофотография лиофилизата

При увеличении в 30 раз видна гомогенность твердой фазы, представленной разнородными ансамблями неправильной чешуйчатой формы различной пористости (Рисунок 3.8).

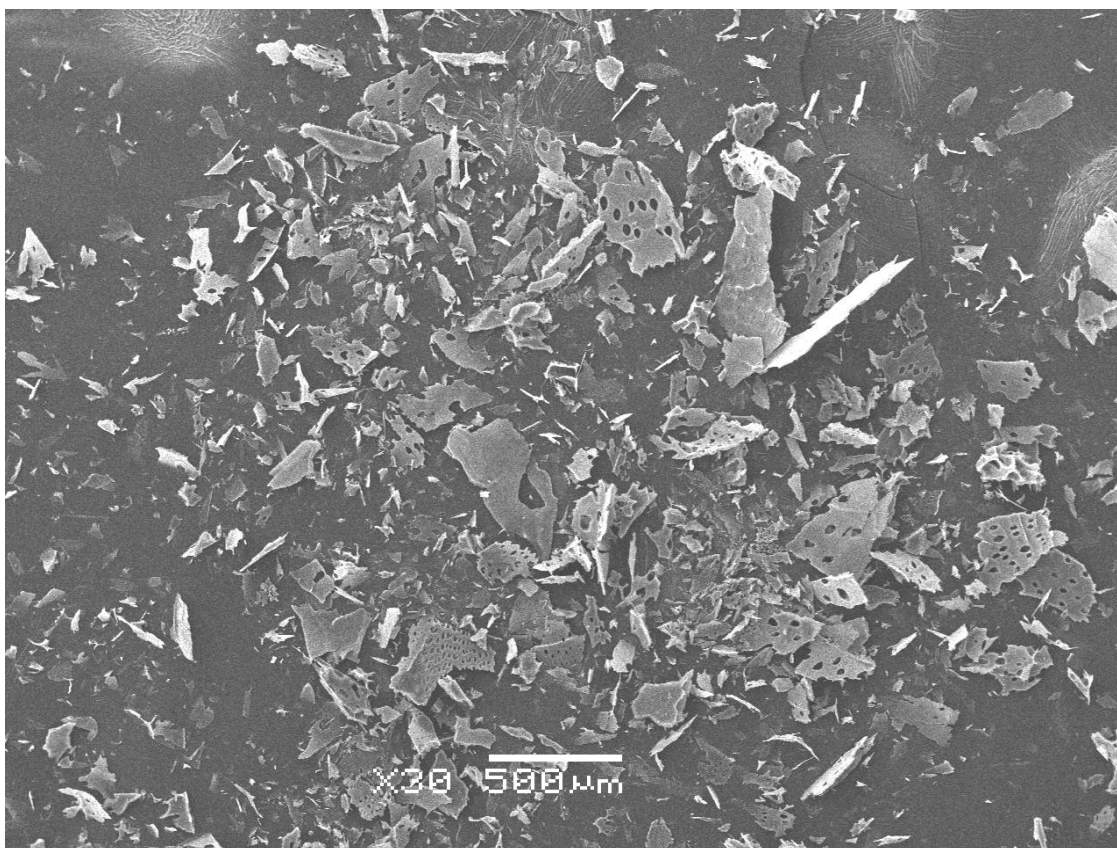


Рисунок 3.8 – Морфология лиофилизата ДКВ-глицин (30×)

Таким образом, лиофилизация водного раствора флавоноида и аминокислоты является оптимальным методом, который привел к получению новой твердой фазы на основе ДКВ и глицина [198, 199].

Учитывая пространственные особенности строения молекулы ДКВ и наличие у глицина в твердом состоянии хиральных полиморфных форм, представляло несомненный теоретический интерес исследование влияния различных технологических факторов на стереоизомерный состав ДКВ и возможность полиморфных превращений глицина в процессе лиофилизации.

### 3.3. Выводы по главе 3

1. Апробированы методы супрамолекулярного синтеза для получения композиции ДКВ-глицин под контролем продукта методом электронной микроскопии. При использовании

кристаллизации на границе раздела фаз, суспендирования и сухого гриндинга образования новой твердой фазы не наблюдали.

2. Выявлены методы, приводящие к образованию монофазного продукта на основе ДКВ и глицина – распылительная сушка и лиофилизация.

3. Получена твердая монофазная композиция ДКВ-глицин путем лиофилизации водного раствора, содержащего флавоноид (13 мг/мл) и аминокислоту (67 мг/мл), при температуре  $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$  и разрежении 25 Па.

4. Установлена специфическая морфология лиофилизата композиции ДКВ-глицин, отличающаяся от исходных компонентов однородностью и повышенной пористостью, поэтому метод сублимационной сушки выбран в качестве базового для наработки продукта.

## ГЛАВА 4. СТЕРЕОХИМИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ КОМПОНЕНТОВ КОМПОЗИЦИИ

### 4.1. $\sigma$ -Диастереомерия дигидрокверцетина

ДКВ получил свое тривиальное название благодаря структурному сходству с известным ранее кверцетином. Впервые ДКВ был выделен из древесины *Pseudotsuga menziesii* (MIRB.) FRANCO [syn. *Pseudotsuga taxifolia* LAMB. & BRITTON], поэтому данное соединение также известно под названием таксифолин. В 50-х годах прошлого века в Японии его называли дистилин, так как был выделен из *Distylium racemosum* SIEBOLD & ZUCC.

Согласно номенклатуре флавоноидов, изложенной в рекомендациях Международного союза теоретической и прикладной химии и Международного союза биохимии и молекулярной биологии, систематическое название флаванонов и 3-гидроксифлаванонов может быть построено от двух родоначальных структур: 4*H*-1-бензопирана или хромана, причем использование первого более распространено. Таким образом, ДКВ имеет следующее систематическое название: 2,3-дигидро-3,5,7-тригидрокси-2-(3,4-дигидроксифенил)-4*H*-1-бензопиран-4-он.

Как и другие 3-гидроксифлаваноны, ДКВ, содержит два центра хиральности в положениях С-2 и С-3, поэтому он может существовать в виде 4 стереоизомеров, из которых природным является, по-видимому, только (2*R*,3*R*)-ДКВ (Рисунок 4.1) [200].

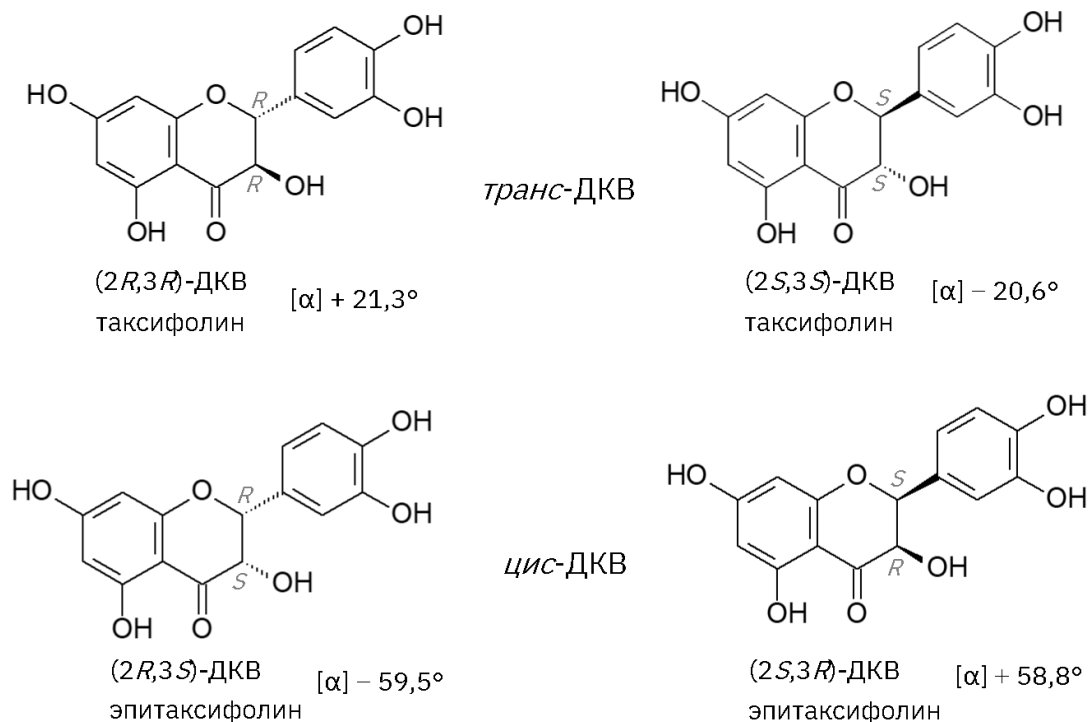


Рисунок 4.1 – Стереизомеры ДКВ

Для определения диастереомерного состава ДКВ необходимо было разработать методику разделения *транс*- и *цис*-изомеров. Учитывая способность ДКВ поглощать излучение в ультрафиолетовой области в качестве базового был выбран метод высокоэффективной жидкостной хроматографии со спектрофотометрическим способом детектирования.

#### 4.1.1. Оптимизация разделения $\sigma$ -диастереомеров дигидрокверцетина

Для разработки методики использовали ДКВ, полученный путем распылительной сушки, предполагая, что эта субстанция может характеризоваться повышенным содержанием *цис*-изомера. Разделение флавоноидов, по литературным данным, обычно проводят методом обращенно-фазной ВЭЖХ. При разработке методики разделения нами были опробованы сорбенты с октадецильными, фенильными и циано-группами [201]. Кроме того, варьировали состав подвижной фазы, режим элюирования, температуру и скорость потока. На октадецильной неподвижной фазе и фазе с привитыми циано-группами разделение  $\sigma$ -диастереомеров ДКВ не происходит (Рисунок 4.2).

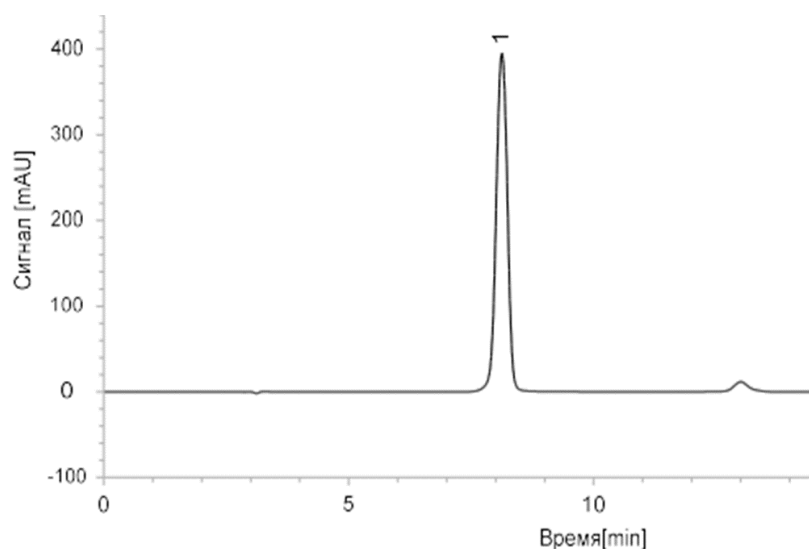


Рисунок 4.2 – Хроматограмма субстанции ДКВ: 1 – ДКВ. Колонка: Luna™ 5 мкм C<sub>18</sub>(2) 100 Å, 250 × 4,6 мм; подвижная фаза: раствор муравьиной кислоты в воде (рН 2,7), ацетонитрил; 30% ацетонитрила за 20 мин; 1 мл/мин; 25 °С; 0,05 мг/мл; 20 мкл; 288 нм

Учитывая наличие в молекуле ДКВ ароматических фрагментов с повышенной электронной плотностью за счет +M-эффекта фенольных гидроксильных групп можно предположить, что будет осуществляться  $\pi$ - $\pi$ -стэкинг в случае использования в качестве неподвижной фазы силикагеля с привитыми фенильными группами (фенильные и бифенильные колонки).

Применение силикагеля с фенильными привитыми группами было описано в литературе для отделения гиперцицина от остальных компонентов экстракта *Hypericum perforatum* L., причем положительный результат авторы объясняли за счет  $\pi$ - $\pi$  взаимодействие бензольных колец флавоноида и сорбента [202].

Для того чтобы добиться приемлемого разрешения между пиками *транс*- и *цис*-ДКВ на фенильных колонках в качестве органического компонента подвижной фазы были опробованы ацетонитрил и метанол. В случае использования ацетонитрила желаемого разделения не наблюдали (Рисунок 4.3).

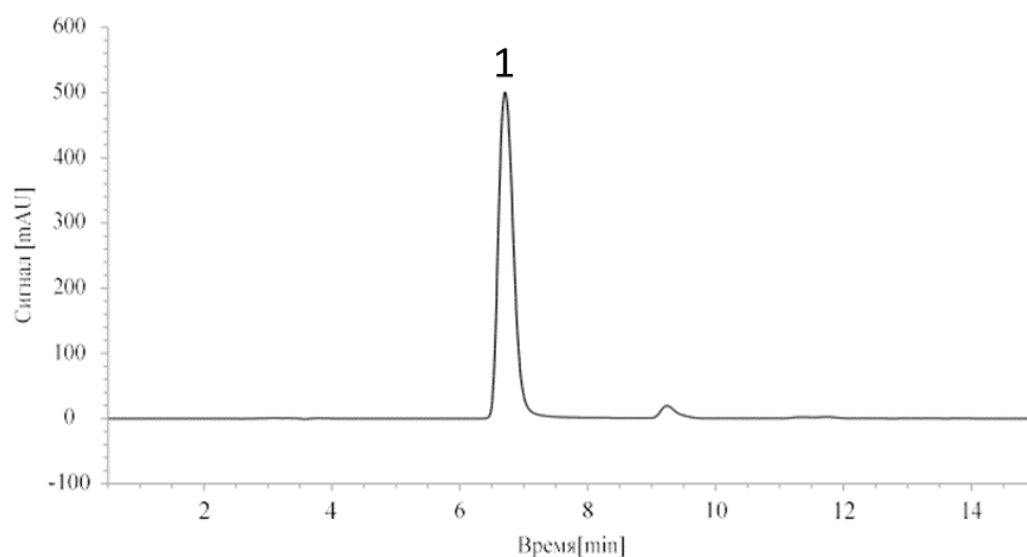


Рисунок 4.3 – Хроматограмма лиофилизата ДКВ-глицин: 1 – ДКВ. Колонка: Zorbax® 3,5 мкм SB-Phenyl 150 × 4,6 мм; подвижная фаза: раствор муравьиной кислоты в воде (pH 2,7), ацетонитрил; 29% → 42,3% ацетонитрила за 25 мин; 0,5 мл/мин; 30 °С; 0,05 мг/мл; 20 мкл; 288 нм

Подвижная фаза из воды и метанола обладала разрешающей способностью для пары  $\sigma$ -диастереомеров ДКВ (Рисунок 4.4). Более низкую селективность сорбента по отношению к фенильному заместителю разделяемых соединений при элюировании ацетонитрилом можно объяснить сольватацией, которая различается в метанольной и ацетонитрильной средах [203].

Во избежание размывания пиков воду подвижной фазы подкисляли муравьиной кислотой до значения pH 2,7 для подавления диссоциации фенольных гидроксильных групп ДКВ.

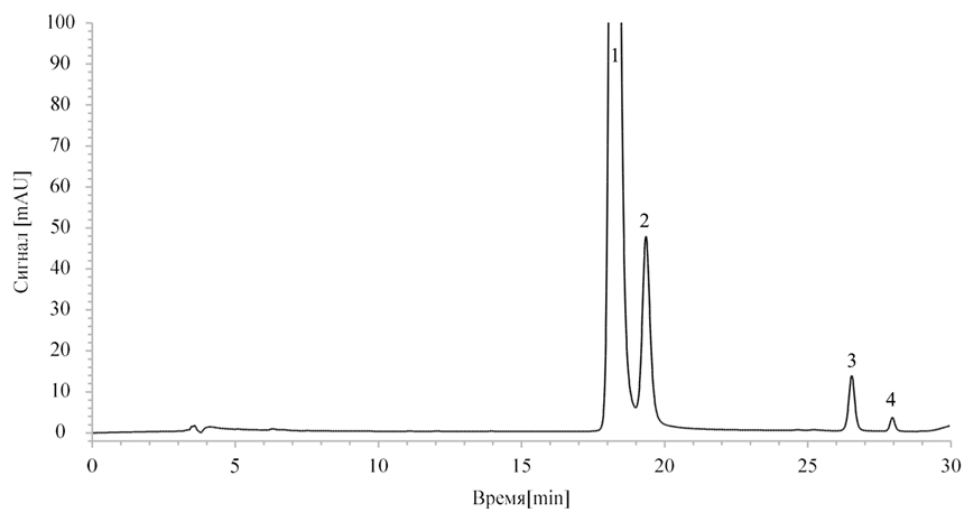


Рисунок 4.4 – Хроматограмма раствора ДКВ: 1 – *транс*-ДКВ, 2 – *цис*-ДКВ, 3 и 4 –  $\sigma$ -диастереомеры дигидрокемпферола. Колонка: Zorbax® 3,5 мкм SB-Phenyl 150 × 4,6 мм; подвижная фаза: раствор муравьиной кислоты в воде (pH 2,7), метанол; 29% → 42,3% метанола за 25 мин; 0,5 мл/мин; 30 °С; 0,05 мг/мл; 20 мкл; 288 нм

Подбор режима элюирования и температуры колонки показал, что наиболее оптимальным по разрешению *транс*-ДКВ/*цис*-ДКВ и времени анализа является увеличение доли метанола в подвижной фазе на 0,9% в минуту при температуре 60 °С. Хроматограмма раствора ДКВ приведена на рисунке 4.5.

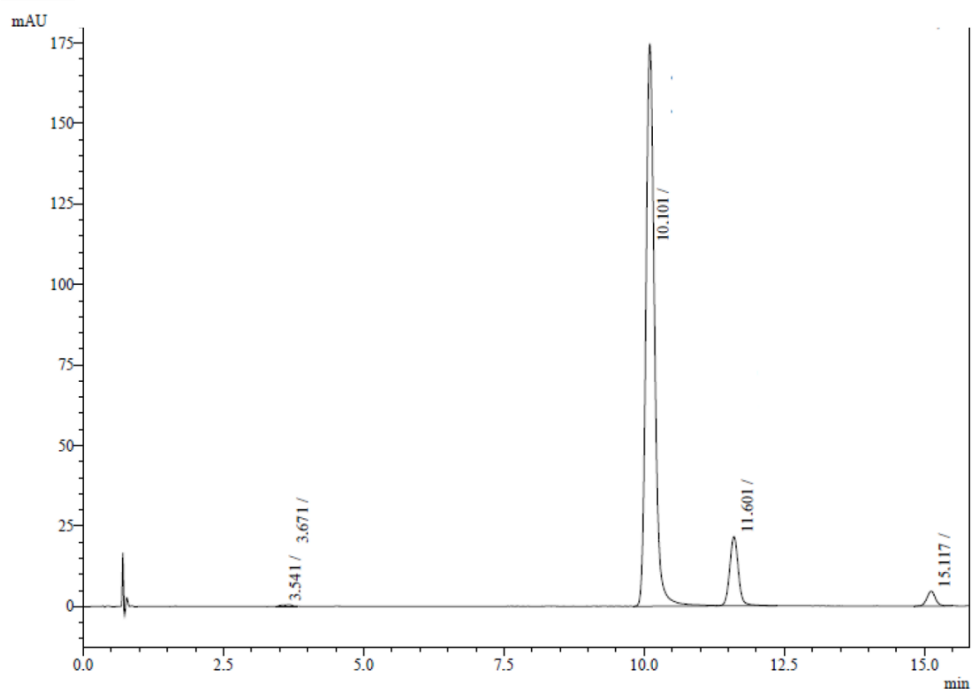


Рисунок 4.5 – Типичная хроматограмма образца субстанции ДКВ: пик с ВУ 10,101 мин – *транс*-ДКВ, пик с ВУ 11,601 мин – *цис*-ДКВ. Колонка: Kinetex™ 2,6 мкм Biphenyl 100 Å, 100 × 3,0 мм; подвижная фаза: раствор муравьиной кислоты в воде (pH 2,7), метанол; 7% → 21% метанола за 15 мин; 0,65 мл/мин; 60 °С; 0,01 мг/мл; 20 мкл; 290 нм

Скорость потока была настроена по минимуму на кривой ван Деетера, построенной в интервале от 0,2 до 0,8 мл/мин. по данным, приведенным в таблице 4.1.

Таблица 4.1 – Данные для построения кривой ван Деетера

Объёмная скорость потока ( $v$ ), мл/мин	Разрешение, $R_s$	Обратное разрешение, $1/R_s$
0,2	2,349	0,426
0,3	2,428	0,412
0,4	2,441	0,410
0,5	2,455	0,407
0,6	2,426	0,412
0,7	2,403	0,416
0,8	2,396	0,417

Для определения оптимальной скорости по оси абсцисс откладывали объёмную скорость потока ( $v$ ), а по оси ординат – обратное разрешение между пиками *транс*-ДКВ и *цис*-ДКВ ( $1/R_s$ ). Кривая ван Деетера приведена на рисунке 4.6. Точка пересечения двух веток кривой является минимумом функции  $1/R_s(v)$  и соответствует скорости потока подвижной фазы, равной 0,5 мл/мин, которая приводит к максимальному разрешению пиков  $\sigma$ -диастереомеров ДКВ ( $R_s = 2,5$ ).

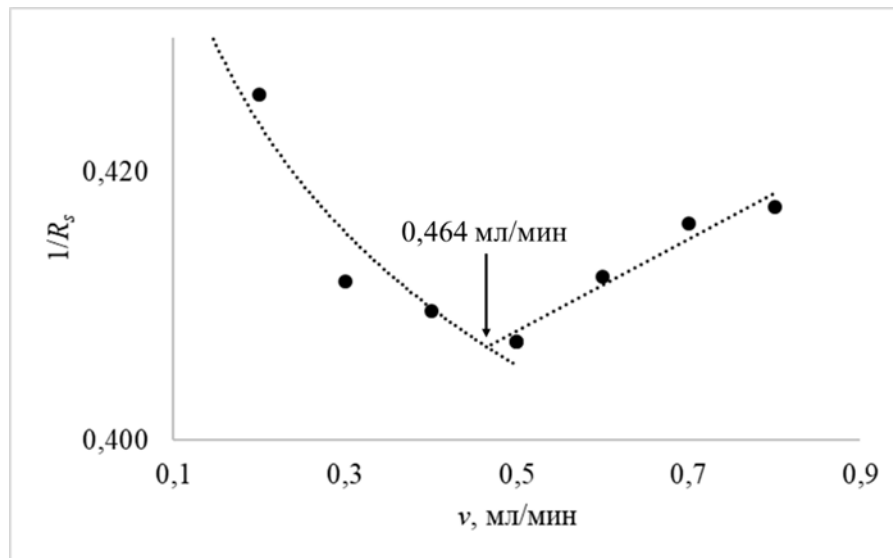


Рисунок 4.6 – Кривая ван Деетера

Исходя из представленных в таблице 4.2 данных, наиболее эффективного разделения удастся достичь при использовании колонки с бифенильным сорбентом и градиентного элюирования водно-метанольной подвижной фазой при росте доли метанола от 7% до 21% в течение 15 мин со скоростью потока 0,65 мл/мин при 60 °С.

Методика разделения флавоноидов обладает пригодными хроматографическими характеристиками для контроля родственных примесей, диастереомерной чистоты и количественного определения ДКВ в лиофилизате ДКВ-глицин.

Таблица 4.2 – Условия и характеристики хроматографического разделения  $\sigma$ -диастереомеров ДКВ

Условия хроматографирования							Характеристики разделения				
Колонка	Подвижная фаза		Режим элюирования		Т, °С	V, мл/мин	<i>транс</i> -ДКВ		<i>цис</i> -ДКВ		Rs
	А	Б	Время, мин	Доля ПФ Б, %			ВУ, мин	ЧТТ	ВУ, мин	ЧТТ	
Luna™ 5 мкм C <sub>18</sub> (2) 100 Å, 250 × 4,6 мм	H <sub>2</sub> O	MeCN	20	30	25	1	разделения не произошло				
Luna™ 5 мкм CN 100 Å, 250 × 4,6 мм	H <sub>2</sub> O	MeCN	30	10→90	25	1	8,5	4551	9,2	17767	1,7
				10→55			9,3	3150	9,9	18263	1,2
				20→50			разделения не произошло				
Zorbax® 3,5 мкм SB-Phenyl 150 × 4,6 мм	H <sub>2</sub> O	MeCN	25	29 → 42,3	30	0,5	разделения не произошло				
		MeOH					18,1	20679	19,3	26921	2,5
Acquity UPLC® 1,7 мкм BEH Phenyl 100 × 2,1 мм	H <sub>2</sub> O	MeOH:MeCN (1:1, об.)	13	10→75	25	0,2	10,8	81111	11,1	139805	1,7
Kinetex™ 2,6 мкм Biphenyl 100 Å, 100 × 3,0 мм	H <sub>2</sub> O	MeOH	15	15→40	60	0,65	4,9	15721	5,6	18708	4,0
				7→21			10,1	20531	11,6	26285	5,3

Примечание: ПФ – подвижная фаза, Т – температура, V – объемная скорость потока, ВУ – время удерживания, ЧТТ – число теоретических тарелок, Rs (resolution) – разрешение. Кислотный модификатор в составе подвижной фазы опущен.

#### 4.1.2. Идентификация пиков на хроматограмме

На типичной хроматограмме субстанции ДКВ наблюдается два пика с временами удерживания 10,1 мин и 11,6 мин, которые идентифицировали по спектрам поглощения в ультрафиолетовой и видимой областях и масс-спектрам по сравнению с литературными данными [204]. Используя стандарт (2*R*,3*R*)-ДКВ, пик с временем удерживания 10,1 мин был определен как *транс*-ДКВ. Профили УФ-спектров, соответствующие соединениям с ВУ 10,1 мин и 11,6 мин совпадают и имеют максимум поглощения при 289 нм, что характерно для ДКВ, находящегося в кислой среде в неионизированном состоянии (Рисунок 4.7).

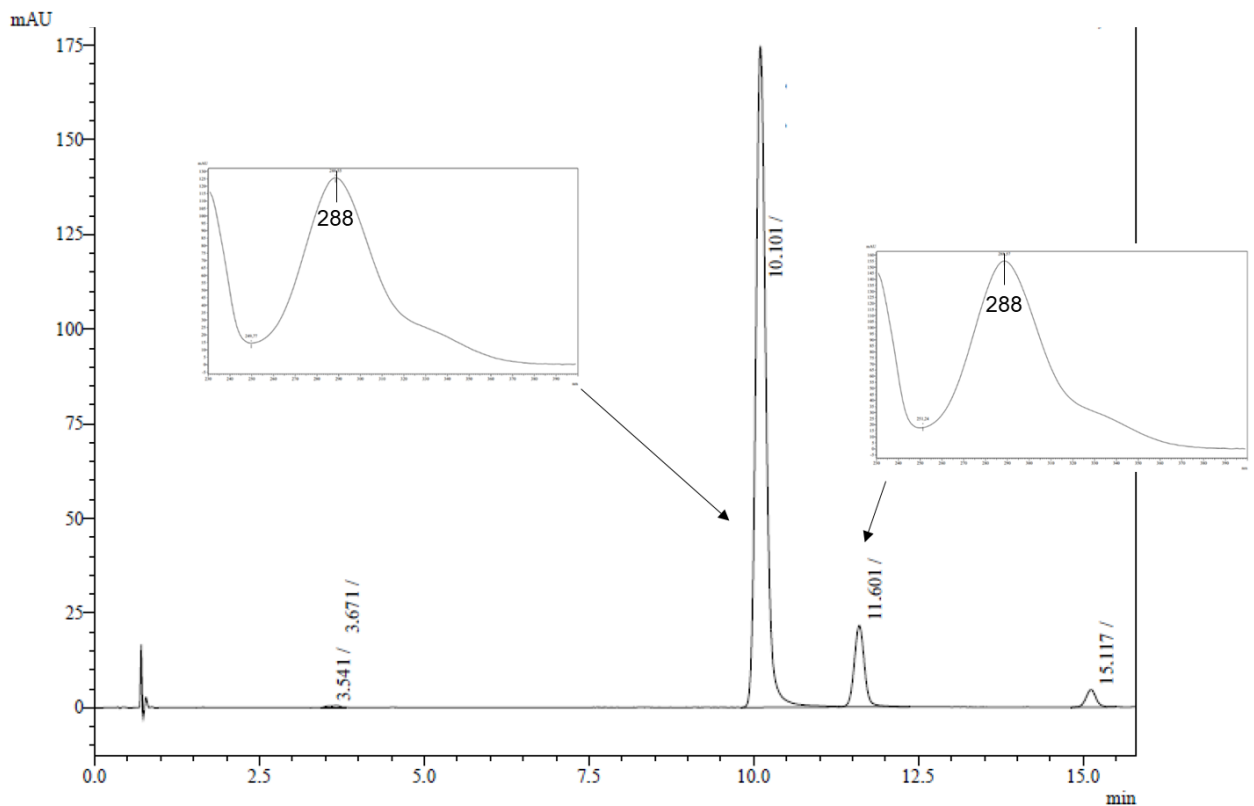


Рисунок 4.7 – УФ-спектры пиков с ВУ 10,1 мин и 11,6 мин. Колонка: Kinetex™ 2,6 мкм Biphenyl 100 Å, 100 × 3,0 мм; подвижная фаза: раствор муравьиной кислоты в воде (pH 2,7), метанол; 7% → 21% метанола за 15 мин; 0,65 мл/мин; 60 °С; 0,01 мг/мл; 20 мкл; 290 нм

Масс-спектры обоих пиков, полученные при ионизации электрораспылением в отрицательном режиме, также идентичны и содержат пик молекулярного иона  $[M]^-$  при  $m/z$  304 и пик квазимолекулярного иона  $[M-H]^-$  при  $m/z$  303 (Рисунок 4.8), что соответствует данным, опубликованным в журнале *Antioxidants* [205].

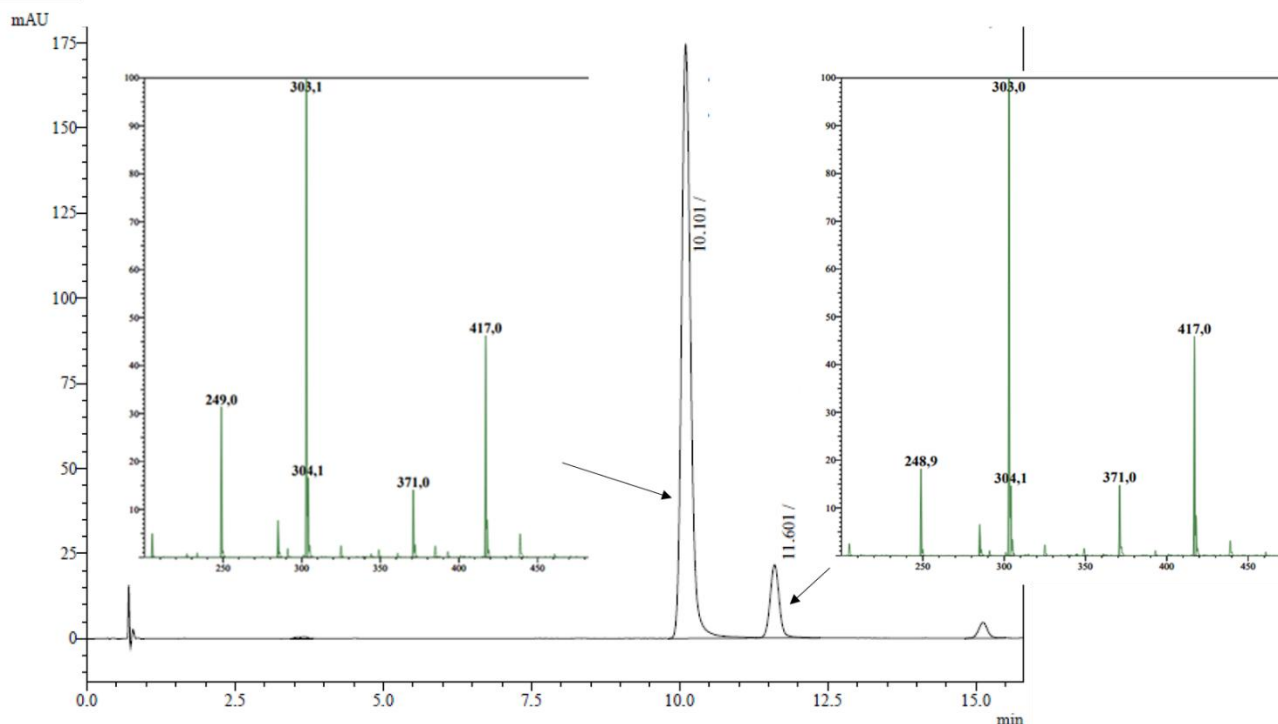


Рисунок 4.8 – Масс-спектры пиков с ВУ 10,1 мин и 11,6 мин. Колонка: Kinetex™ 2,6 мкм Biphenyl 100 Å, 100 × 3,0 мм; подвижная фаза: раствор муравьиной кислоты в воде (pH 2,7), метанол; 7% → 21% метанола за 15 мин; 0,65 мл/мин; 60 °С; 0,01 мг/мл; 20 мкл; 288 нм

Низкоинтенсивный пик при  $m/z$  249 может быть объяснен потерей трех молекул воды из квазимолекулярных ионов. Пик при  $m/z$  371 может быть связан с образованием ассоциатов между квазимолекулярными ионами и формиатом натрия  $[M-H+HCOONa]^-$ . Кроме того, пик при  $m/z$  417 может быть связан с образованием кластера с муравьиной кислотой и ее натриевой солью  $[M-H+HCOOH+HCOONa]^-$ . Предположение о формировании кластеров с компонентами подвижной фазы при анализе ДКВ методом ВЭЖХ-МС/МС согласуется с данными, опубликованными ранее Abad-García и соавторами [206].

Учитывая ахиральные условия хроматографического разделения, два вещества с ВУ 10,1 мин и 11,6 мин были приняты за  $\sigma$ -диастереомеры. Поскольку первый пик был идентифицирован как *транс*-ДКВ, вторым компонентом является *цис*-ДКВ.

Родственным компонентом ДКВ, экстрагируемым из комлевой части древесины лиственницы, является дигидрокемпферол (Рисунок 4.9). Дигидрокемпферол относится к группе флаванолов, имеет два центра хиральности С-2 и С-3, способен существовать также, как и ДКВ, в виде 4 стереоизомеров. Нами была предпринята попытка обнаружения этого соединения в образце ДКВ, для чего была заведомо увеличена концентрация ДКВ.

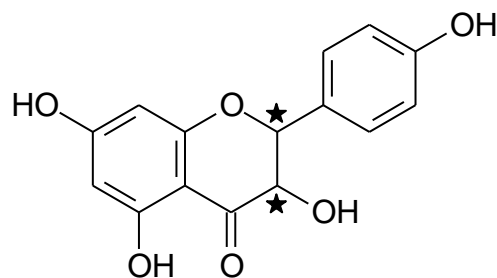


Рисунок 4.9 – Дигидрокемпферол (аромадендрин)

При увеличении концентрации ДКВ почти в 2 раза и использовании более крутого градиента (увеличение доли метанола с 15% до 40%, остальные условия неизменны) происходит перегрузка колонки, приводящая к ухудшению разделения стереоизомеров ДКВ (пики 1 и 2), но зато становятся видны два пика (3 и 4) с ВУ 27,0 мин и 28,3 мин (Рисунок 4.10).

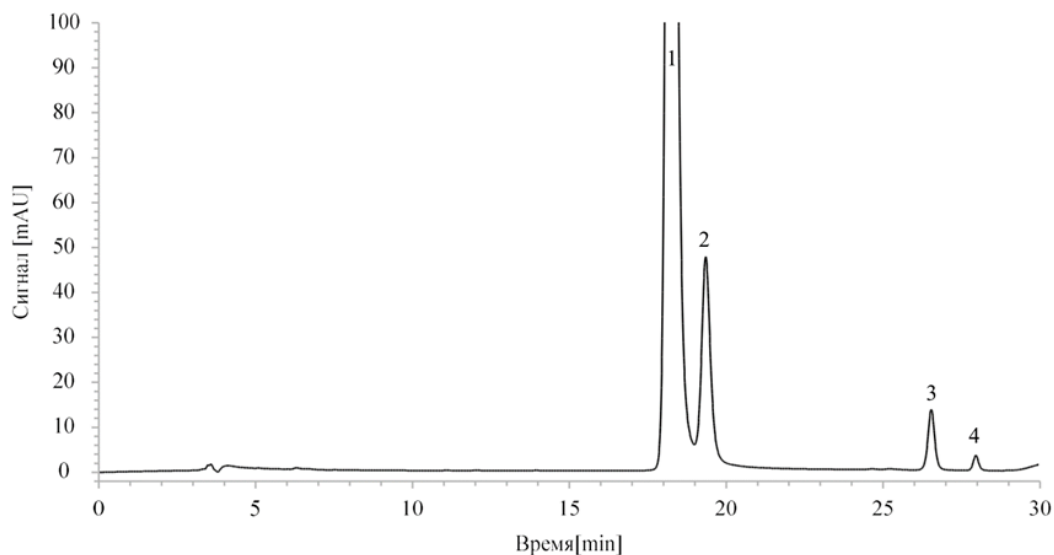


Рисунок 4.10 – Типичная хроматограмма образца субстанции ДКВ-глицин: 1 – *транс*-ДКВ, 2 – *цис*-ДКВ, 3 и 4 –  $\sigma$ -диастереомеры дигидрокемпферола. Колонка: Zorbax<sup>®</sup> 3,5 мкм SB-Phenyl 150 × 4,6 мм; подвижная фаза: раствор муравьиной кислоты в воде (pH 2,7), метанол; 29% → 42,3% метанола за 25 мин; 0,5 мл/мин; 30 °С; 0,05 мг/мл; 20 мкл; 288 нм

Хроматографические характеристики разделения компонентов с ВУ 27,0 мин и 28,3 мин приведены в таблице 4.3.

Таблица 4.3 – Характеристики хроматографического разделения

Компонент смеси	Разрешение*, $R_s$	Число теоретических тарелок
$\sigma$ -диастереомер дигидрокемпферола (пик 3)	16,7	72 137
$\sigma$ -диастереомер дигидрокемпферола (пик 4)	4,0	117 182
Примечание: * разрешение данного пика с предыдущим		

Пики с ВУ 27,0 мин и 28,3 мин имеют сходные спектры в ультрафиолетовой области с максимумом поглощения при длине волны 288 нм (Рисунок 4.11).

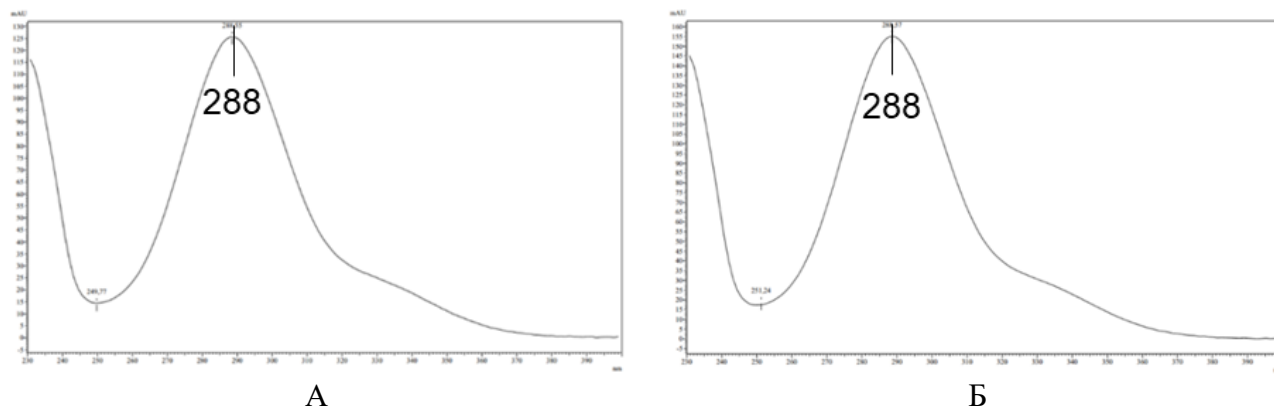


Рисунок 4.11 – УФ-спектры пиков с ВУ 27,0 мин (А) и 28,3 мин (Б)

Пики квазимолекулярного иона  $[M-H]^-$  в масс-спектрах в случае отрицательной ионизации для пиков с ВУ 27,0 мин и 28,3 мин были одинаковыми и соответствовали массе аниона дигидрокемпферола – 287. По аналогии с ДКВ, пик с  $m/z$  401 связан с образованием кластера  $[M-H+HCOOH+HCOONa]^-$  (Рисунок 4.12).

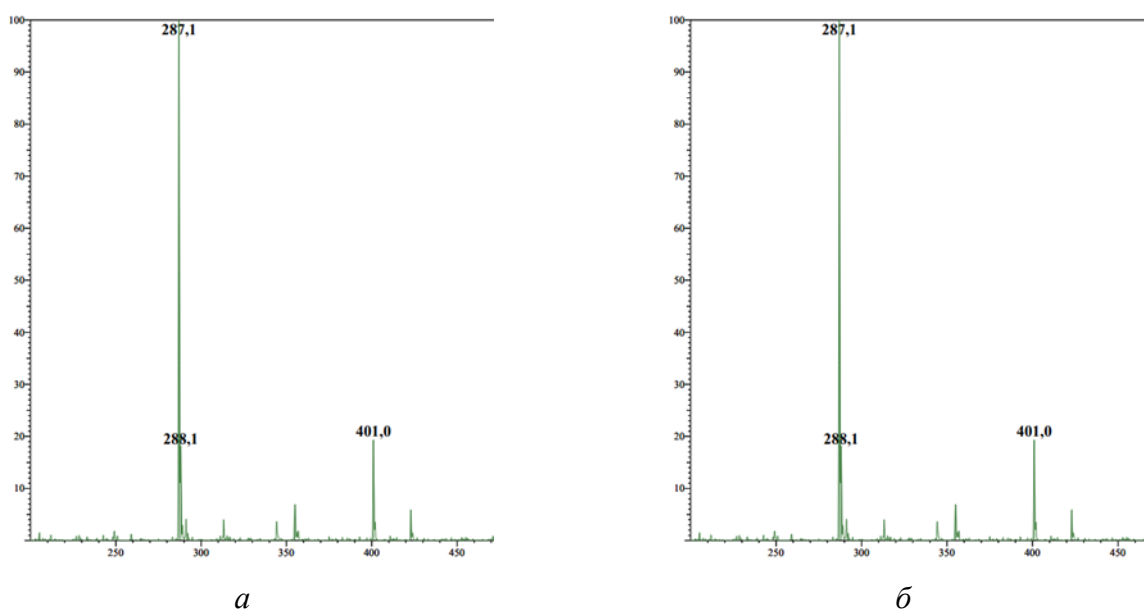


Рисунок 4.12 – УФ-спектры пиков с ВУ 27,0 мин (А) и 28,3 мин (Б)

Таким образом, в условиях обращенно-фазной ВЭЖХ впервые удалось разделить родственный ДКВ флаванол. На хроматограмме наряду с  $\sigma$ -диастереомерами ДКВ наблюдаются два пика с ВУ 27,0 мин и 28,3 мин с разрешением 4,0, которые были идентифицированы как  $\sigma$ -диастереомеры дигидрокемпферола. Эту задачу удалось решить в случае увеличения концентрации образца в 2 раза. Так как образец получен методом

лиофилизации горячего водного раствора, вероятно, произошла эпимеризация дигидрокемпферола и стал виден его второй  $\sigma$ -диастереомер. Оценка количественного содержания этой примеси методом нормировки в образце ДКВ, полученном путем распылительной сушки, составила  $1,66 \pm 0,08\%$ , поэтому в условиях аналитической нагрузки колонки в некоторых анализируемых образцах пик дигидрокемпферола может не превышать шум базовой линии. В связи с этим, в промышленных образцах ДКВ анализировали содержание  $\sigma$ -диастереомеров только мажорного компонента по специально валидированной методике.

#### 4.1.3. Стереизомерный состав дигидрокверцетина в промышленных образцах

Пространственное строение любого вещества может оказывать непосредственное влияние на его связь с биологическими мишенями. Нами был изучен диастереомерный состав ДКВ в фармацевтической субстанции Дигидрокверцетин ФС 000388-270812 (АО "Аметис") и в образцах биологически активных добавок к пище (БАД): Дигидрокверцетин (ООО «Таксифолия»); ВитаРост (ООО «Робиос»); Таксифолин Аква (ООО «Продвинутые технологии») [207]. Методику оптимального хроматографического разделения  $\sigma$ -диастереомеров ДКВ на бифенильном сорбенте использовали для количественной оценки и установления соотношения стереоизомеров в вышеперечисленных образцах.

Предлагаемая методика была валидирована для количественного анализа. Линейность зависимости между площадью пика *транс*-ДКВ и концентрацией растворенного вещества доказана в диапазоне от 0,01 до 0,20 мг/мл ( $R^2 = 0,9999$ ). Функция  $S(C)$  может быть описана следующей формулой:

$$S = 2,54573 \times 10^7 \times C + 12419,5, \quad (14)$$

где  $S$  – площадь пика *транс*-ДКВ, mAU·s

$C$  – концентрация субстанции в анализируемом растворе, мг/мл.

Пределы обнаружения и количественного определения составили 0,0016 и 0,0049 мг/мл, соответственно. Относительное стандартное отклонение между параллельными заколами 0,18%, между различными анализами внутри одного рабочего дня 0,24%, между днями 0,93%. Концентрацию *транс*- и *цис*-ДКВ определяли методом внутренней нормализации, принимая сумму площадей пиков определяемых веществ за 100%.

По результатам исследований, приведенных в таблице 4.4, установлено преобладание *транс*-изомера над *цис*-ДКВ во всех анализируемых объектах. В образцах субстанции ДКВ и БАД Дигидрокверцетин производства ООО «Таксифолия» количество *транс*-ДКВ

приблизительно в 60 раз превышает содержание *цис*-изомера. Наиболее гомогенным продуктом является БАД ВитаРост, в котором соотношение *транс/цис*-изомеров равно 120/1. Самым высоким содержанием *цис*-изомера (11,7 %) характеризовался опытный образец ДКВ, полученный методом распылительной сушки (АО «Аметис»).

Таблица 4.4 – Диастереомерный состав ДКВ в образцах различных производителей

Название продукта	Производитель	Содержание, %		Соотношение, <i>транс</i> -ДКВ / <i>цис</i> -ДКВ
		<i>транс</i> -ДКВ	<i>цис</i> -ДКВ	
Дигидрокверцетин (ФС 000388-270812)	АО «Аметис»	98,35	1,65	60/1
ДКВ опытный образец*	АО «Аметис»	88,27	11,7	8/1
ВитаРост	ООО «Робиос»	99,17	0,83	120/1
Дигидрокверцетин (БАД)	ООО «Таксифолия»	98,40	1,60	62/1
Таксифолин Аква	ООО «Продвинутые технологии»	94,79	5,21	18/1

Примечание: \*получен методом распылительной сушки [208].

Наряду с хроматографическим разделением  $\sigma$ -диастереомеры ДКВ хорошо визуализировались при анализе методом одномерной и двумерной спектроскопии ядерного магнитного резонанса [209]. Поэтому представляло интерес сопоставить результаты количественного определения *цис/транс*-изомеров, полученные двумя высокопрецизионными методами.

ЯМР-спектроскопия была проведена для ФС ДКВ и опытного образца, полученного путем распылительной сушки водного раствора ДКВ. Поскольку ФС ДКВ характеризуется более высокой диастереомерной однородностью, его можно рассматривать как эталонный *транс*-изомер.

На рисунке 4.13 представлены результаты 1D  $^1\text{H}$  ЯМР-спектроскопии. Независимо от конфигурации, спектральный профиль ДКВ в  $\text{MeOH-}d_4$  включает пять сигналов, связанных со следующими атомами водорода: Н8 ( $\delta = 5,90$  м.д.; 1Н; d), Н6 ( $\delta = 5,94$  м.д.; 1Н; d), Н5' и Н6' ( $\delta = 6,86$  м.д.; 2Н; m), Н2' ( $\delta = 6,99$  м.д.; 1Н; d) и ОН5 ( $\delta = 11,75$  м.д.; 1Н; s). *Транс*-ДКВ может быть идентифицирован по сигналу атомов водорода в хиральных центрах: Н3 ( $\delta = 4,52$  м.д.; 1Н; d) и Н2 ( $\delta = 4,93$  м.д.; 1Н; d). Напротив, в *цис*-ДКВ эти сигналы имеют другие характеристики: Н3 ( $\delta = 4,20$  м.д.; 1Н; d) и Н2 ( $\delta = 5,31$  м.д.; 1Н; d).

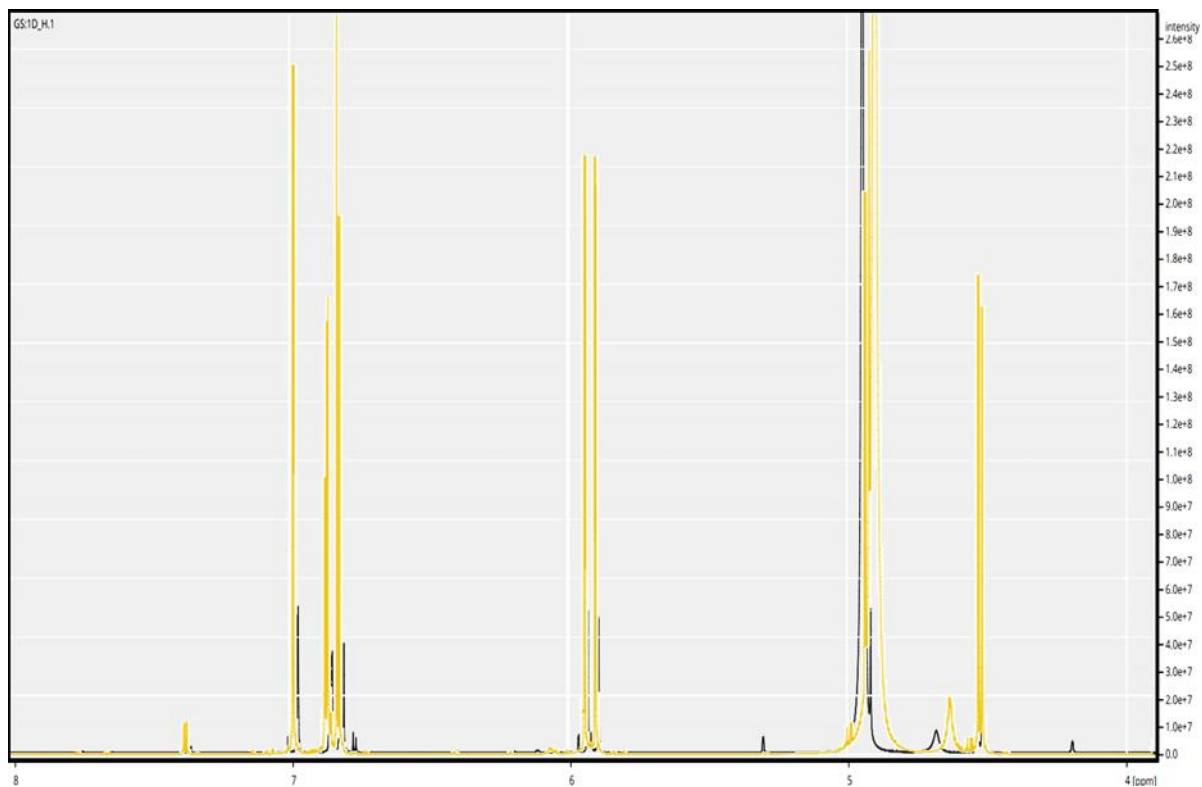


Рисунок 4.13 – 1D  $^1\text{H}$  ЯМР-спектры ФС ДКВ (желтый) и ДКВ опытный образец (серый) [210]

Константы спин-спинового взаимодействия между атомами водорода в положениях 2 и 3, которые можно рассчитать на основании сигналов, хорошо визуализированных на рисунке 4.14, для *транс*- и *цис*-ДКВ составили 12,00 Гц и 2,40 Гц, соответственно.

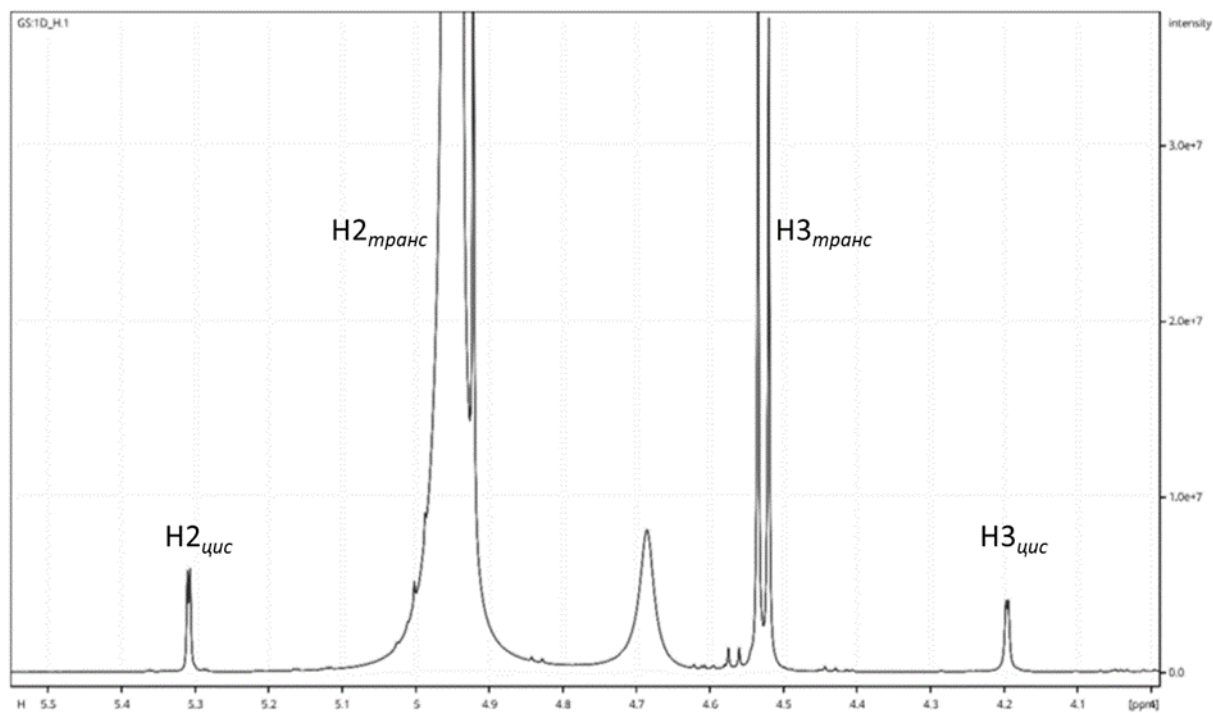


Рисунок 4.14 – 1D  $^1\text{H}$  ЯМР-спектр ДКВ

Данные 2D гетероядерной одноквантовой корреляционной ЯМР-спектроскопии (heteronuclear single quantum correlation, HSQC) в целом подтвердили принадлежность водорода к сигналам в 1D  $^1\text{H}$  спектрах (Рисунок 4.15). Пять атомов водорода образуют кросс-пики с ароматическими атомами углерода: Н8 с С8 ( $\delta = 94,72$  м.д.), Н6 с С6 ( $\delta = 95,81$  м.д.), Н5' и Н6' с С5' и С6' ( $\delta = 114,52$  м.д.) и Н2' с С2' ( $\delta = 119,61$  м.д.). Кроме того, имеются два кросс-пика с  $sp^3$ -гибридизованными атомами углерода, связанными с атомами кислорода: Н3 с С3 ( $\delta = 72,18$  м.д.) и Н2 с С2 ( $\delta = 83,60$  м.д.). На спектре опытного образца ДКВ наблюдаются два дополнительных кросс-пика, которых нет в спектре ФС ДКВ. Они находятся при значениях  $\delta\text{C}$ , которые аналогичны С3 и С2, однако значения  $\delta\text{H}$  равны параметрам *цис*-конфигурации ДКВ.

Основываясь на площади сигналов Н2 и Н3, установлено, что анализируемое вещество содержит 12,5% *цис*-ДКВ от суммарного количества двух  $\sigma$ -диастереомеров ДКВ. По данным ВЭЖХ доля *цис*-изомера составляет 11,7%.

Установлено, что ДКВ, полученный методом распылительной сушки, характеризуется наиболее высоким из всех проанализированных образцов содержанием *цис*-ДКВ, из чего можно сделать вывод о влиянии технологии получения на диастереомерный состав субстанции.

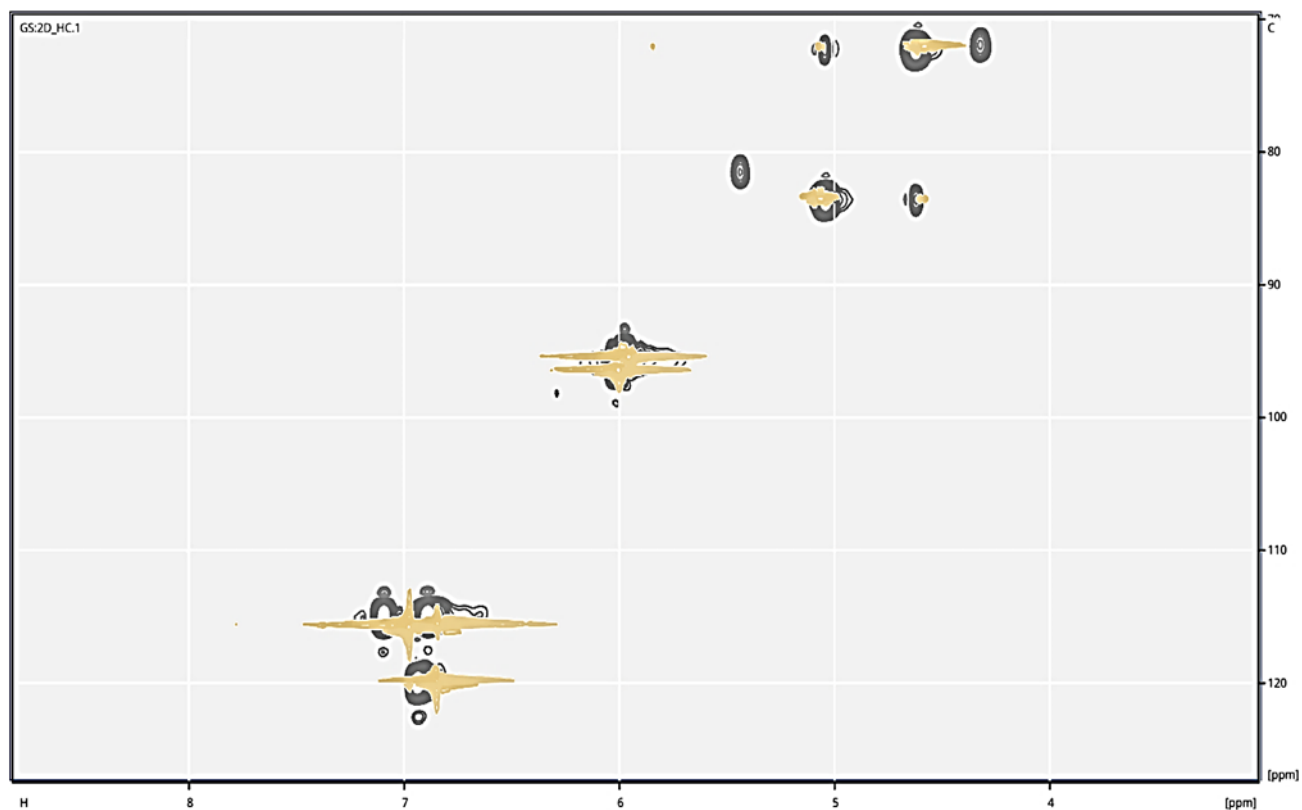


Рисунок 4.15 – 2D  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ -HSQC ЯМР-спектры ФС ДКВ (желтый) и ДКВ опытный образец (серый) [210]

Кроме ДКВ, выпускаемого в виде порошка, существуют продукты в жидкой форме. Особый интерес в нашем исследовании представляла БАД Таксифолин Аква, поскольку является водорастворимой формой ДКВ за счет образования комплекса с поливинилпирролидоном.

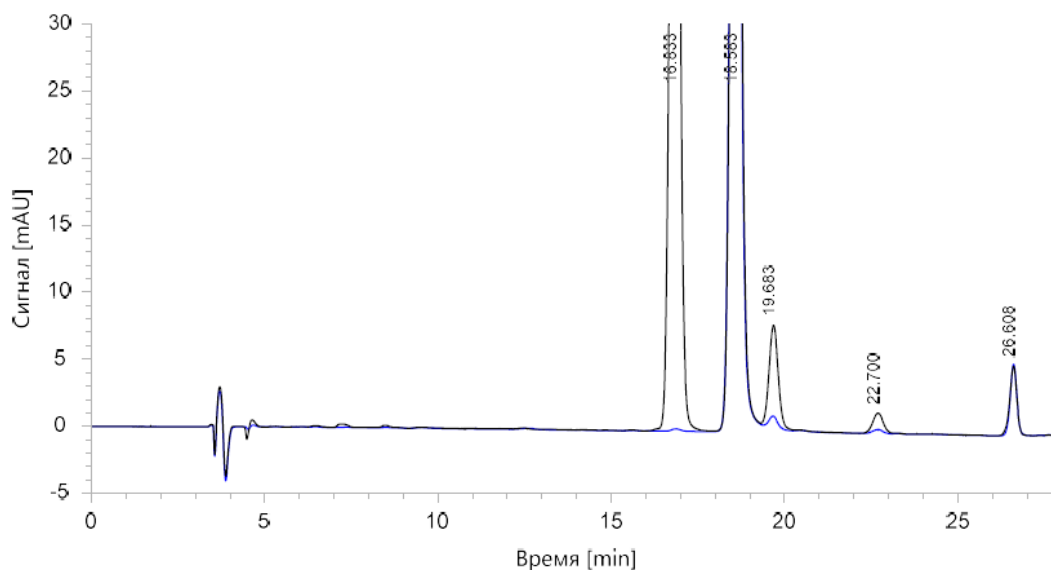


Рисунок 4.16 – Хроматограмма БАД Таксифолин Аква (черная) и сырья для ее получения (синяя). Пик с ВУ 16,833 мин – сорбиновая кислота; пик с ВУ 18,583 мин – *транс*-ДКВ; пик с ВУ 19,683 мин – *цис*-ДКВ. Колонка: Zorbax® 3,5 мкм SB-Phenyl 150 × 4,6 мм; подвижная фаза: раствор муравьиной кислоты в воде (рН 2,7), метанол; 29% → 42,3% метанола за 25 мин; 0,5 мл/мин; 30 °С; 0,05 мг/мл; 20 мкл; 288 нм

На хроматограмме образца БАД помимо ДКВ был обнаружен пик с ВУ 16,8 мин (Рисунок 4.16). Этот пик соответствовал используемому консерванту – сорбиновой кислоте, создающему кислую среду всей композиции (рН 4). Нас очень заинтересовал тот факт, что БАД Таксифолин Аква, одним из компонентов которой является вода, характеризовалась очень высоким содержанием *цис*-изомера по сравнению с образцом ВитаРост, из которого она была получена. Возник вопрос, не является ли наличие водной среды в присутствии кислотного катализатора условиями, которые способствуют  $\sigma$ -диастереомеризации ДКВ.

#### 4.1.4. Самопроизвольная $\sigma$ -диастереомеризация дигидрокверцетина

Во время проведения измерений на содержание  $\sigma$ -диастереомеров ДКВ в образце ВитаРост было обнаружено, что при хранении анализируемых водно-метанольных растворов при комнатной температуре содержание *цис*-ДКВ в них постепенно возрастает (Рисунок 4.17) [211]. Так, за 5 часов концентрация *цис*-изомера увеличилась в 3 раза.

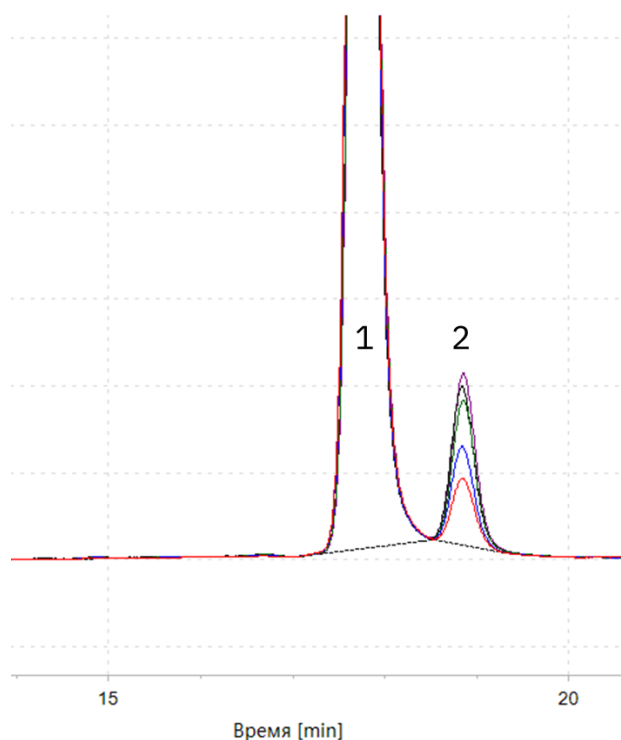


Рисунок 4.17 – Самопроизвольное увеличение концентрации *цис*-ДКВ: *транс*-ДКВ (1), *цис*-ДКВ (2). Колонка: Zorbax® 3,5 мкм SB-Phenyl 150 × 4,6 мм; подвижная фаза: раствор муравьиной кислоты в воде (рН 2,7), метанол; 29% → 42,3% метанола за 25 мин; 0,5 мл/мин; 30 °С; 0,05 мг/мл; 20 мкл; 288 нм

Объяснением наблюдаемому явлению может служить  $\sigma$ -диастереомеризация *транс*-ДКВ в *цис*-изомер. Изучение влияния воды на обнаруженное явление самопроизвольной изомеризации представляет особый интерес в связи с перспективной задачей дальнейшего получения из разрабатываемой композиции ДКВ-глицин жидкой лекарственной формы для инфузионного введения. Кроме того, исследование влияния технологических параметров получения композиции и ее стерилизации, таких как температурный режим, рН среды, облучение потоком быстрых электронов, также имеет большое значение.

#### 4.1.5. Влияние различных факторов на $\sigma$ -диастереомеризацию дигидрокверцетина

Наблюдаемая  $\sigma$ -диастереомеризация подразумевает изменение конфигурации только одного центра хиральности, С-2 или С-3, то есть эпимеризацию [212]. Конфигурация С-2 может обращаться в результате раскрытия кольца С и образования хинонметида после депротонирования 4'-гидроксильной группы. (2*S*)-конфигурация устанавливается вследствие *O*-нуклеофильной атаки с *si*-стороны при обратном замыкании кольца (Рисунок 4.18).

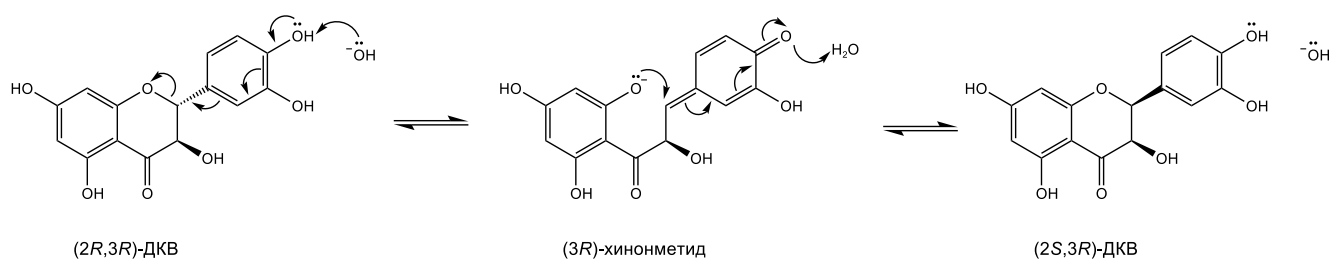


Рисунок 4.18 – Механизм С-2 эпимеризации

Альтернативный путь возможен через образование ендиольной формы после депротонирования СН-кислотного центра в положении С-3. Протонирование двойной связи С3-С4 с *si*-стороны приводит к изменению конфигурации асимметрического атома С-3 (Рисунок 4.19).

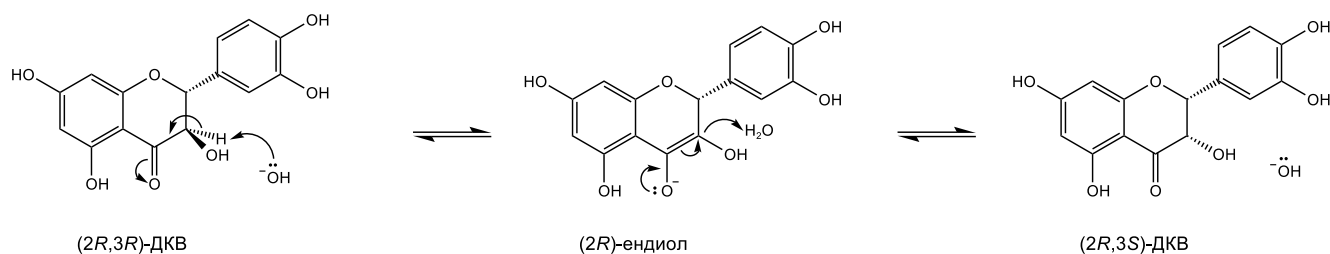
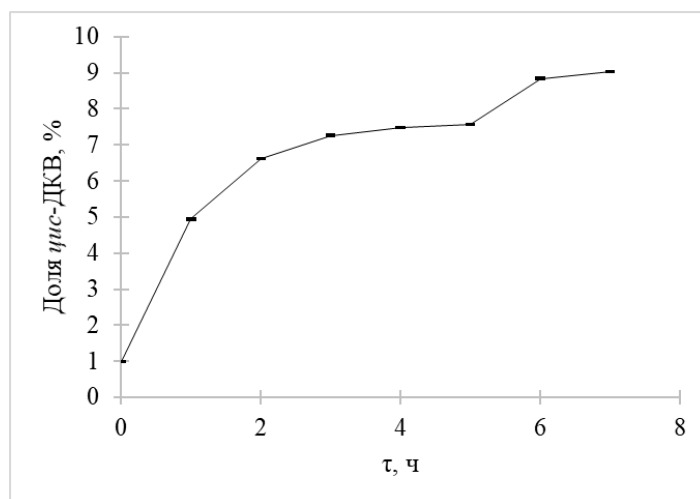


Рисунок 4.19 – Механизм С-3 эпимеризации

Кинетику реакции *транс*-ДКВ → *цис*-ДКВ исследовали под контролем ВЭЖХ-СФМ [213]. Описываемое превращение не идет до конца, так как не происходит полной конверсии *транс*-ДКВ в *цис*-изомер, что может быть интерпретировано как химическое равновесие между продуктом  $\sigma$ -диастереомеризации, интермедиатами и исходными веществами (Рисунок 4.20). Обратную реакцию, переход *цис*-ДКВ в *транс*-ДКВ в кислой среде, наблюдали в своей работе Eberhard Kiehlmann и Edmond P. M. Li [214].

Рисунок 4.20 – Кинетическая кривая образования *цис*-ДКВ

**Влияние растворителя.** Для исследования влияния растворителя на происходящий процесс приготовили два раствора, содержащих 5 мг ДКВ в 10 мл: 1) метанола, 2) водно-метанольной смеси 1:1 об./об. (Рисунок 4.21). Количественный анализ стереоизомеров проводили ежечасно в течение 5 часов.

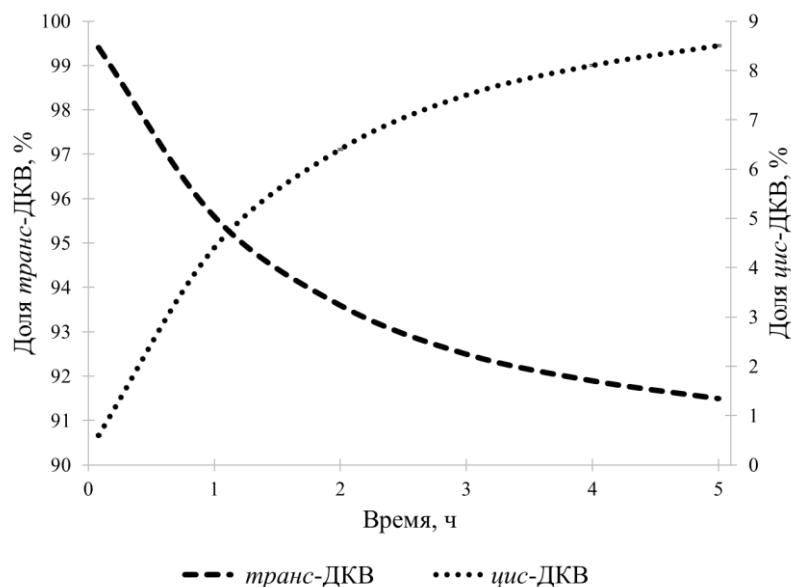


Рисунок 4.21 – Самопроизвольное изменение концентрации  $\sigma$ -диастереомеров ДКВ в водно-метанольной смеси 1:1 об./об.

В водно-метанольной смеси (раствор 2) наблюдается самопроизвольное увеличение концентрации *цис*-ДКВ и уменьшение – *транс*-ДКВ. В отсутствие же воды (раствор 1) изомеризация не происходит. Присутствие воды является критическим фактором для самопроизвольной  $\sigma$ -диастереомеризации.

**Влияние значения pH.** Для установления влияния значения pH на скорость диастереомеризации и создания кислой среды ДКВ растворяли в водно-метанольной смеси 1:1 (об.) и добавляли хлороводородную кислоту до установления значения pH около 1. Раствор нагревали при 78 °С в течение 10 ч. Щелочной раствор готовили аналогичным образом, но вместо хлороводородной кислоты добавляли 0,1 М раствор гидроксида натрия до pH 12 и оставляли при комнатной температуре на 3 часа. В кислой среде не происходило значимого увеличения концентрации *цис*-ДКВ, в то время как в щелочных условиях его количество возросло в 4 раза, что хорошо объяснимо с точки зрения возможных механизмов реакции (см. рис. 4.18 и 4.19).

Для определения порядка и молекулярности реакции по  $\sigma$ -диастереомерам ДКВ и по гидроксид-иону были построены кинетические кривые в координатах натуральный логарифм площади пиков  $\sigma$ -диастереомеров ДКВ от времени (Рисунок 4.22). Константа скорости реакции определена как тангенс угла наклона регрессионной прямой к оси времени.

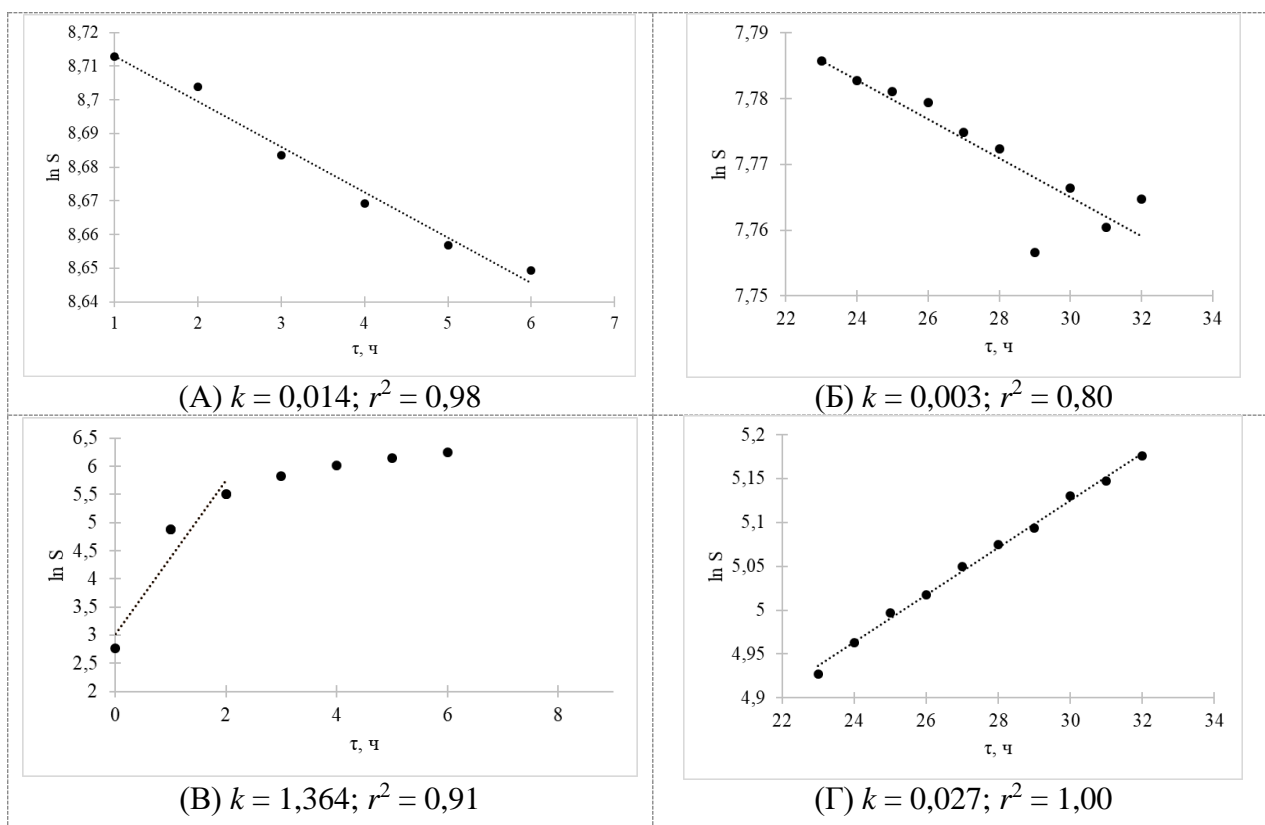
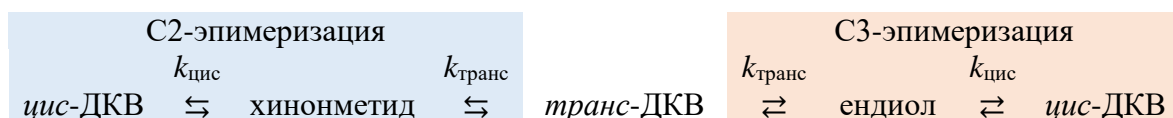


Рисунок 4.22 – Кинетические кривые убывания *транс*-ДКВ (А,Б) и образования *цис*-ДКВ (Б,Г) в условиях избытка гидроксид-иона (А,В) или избытка *транс*-ДКВ (Б,Г).  $S$  – площадь пиков ДКВ,  $\text{mAU}\cdot\text{s}$ ;  $\tau$  – время, ч;  $k$  – константа скорости реакции,  $r^2$  – коэффициент детерминации линейной зависимости  $\ln S(\tau)$ .

Исходя из предложенных механизмов изомеризации схема равновесной химической реакции *транс*-ДКВ  $\rightleftharpoons$  *цис*-ДКВ может быть представлена в следующем виде:



Неравенство констант скоростей подтверждает предположение о многостадийности процесса. При избытке как гидроксид-иона, так и *транс*-ДКВ константа скорости образования *цис*-диастереомера много больше константы скорости убывания *транс*-ДКВ ( $k_{\text{транс}} \ll k_{\text{цис}}$ ). Из этого сравнения можно сделать вывод о том, что первая стадия является лимитирующей. В случае недостатка одного из реагентов, *транс*-ДКВ или гидроксид-иона, порядок реакции стремится к первому, так как наблюдается линейная зависимость между логарифмом количества ДКВ и временем. В случае избытка гидроксид-иона скорость реакции настолько высока, что длительность аналитической методики (45 мин) не позволяет получить более трех точек в линейной области, а после двух часов концентрация *цис*-ДКВ выходит на плато. Так как скорость изомеризации зависит от концентрации обоих реагентов (*транс*-ДКВ и гидроксид-иона), то молекулярность данной реакции следует считать равной двум. Таким

образом,  $\sigma$ -диастереомеризация ДКВ представляет собой двухстадийный процесс, обе стадии которого являются бимолекулярными реакциями второго порядка. Скорость реакции убывания *транс*-ДКВ описывается следующим уравнением:

$$V = k_{\text{транс}} \cdot C(\text{транс-ДКВ}) \cdot C(\text{ОН}^-)$$

**Влияние температуры.** Следующим этапом работы стало исследование влияния температуры на скорость реакции изомеризации. Для этого водно-метанольные растворы ДКВ нагревали при температурах 20, 30, 40 и 50 °С. На основании определенных концентраций  $\sigma$ -диастереомеров ДКВ строили кинетические кривые (Рисунок 4.23) и определяли начальные скорости реакций. Рассчитывали температурный коэффициент Вант-Гоффа и энергию активации, результаты приведены в Таблице 4.5.

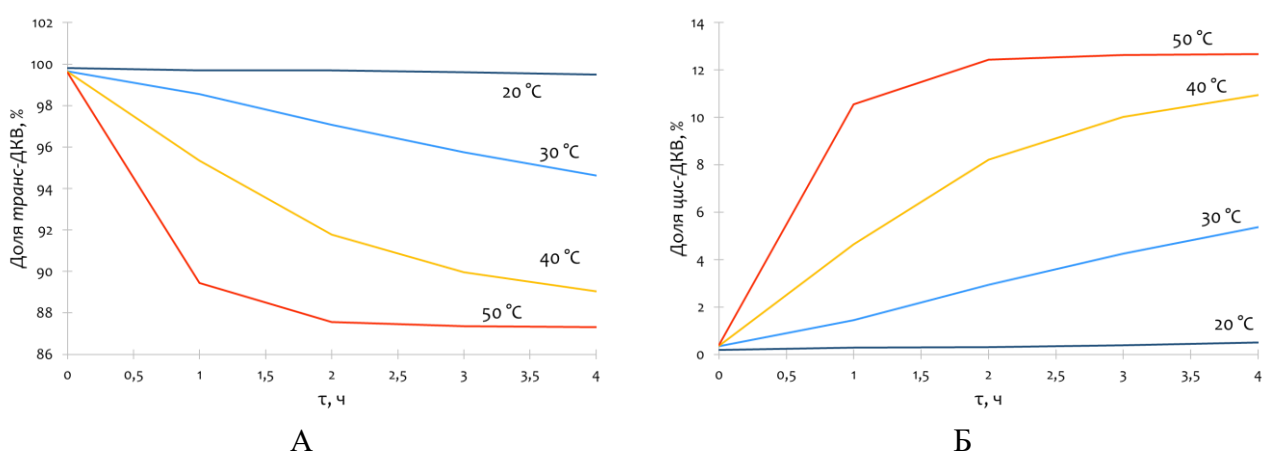


Рисунок 4.23 – Кинетические кривые убывания *транс*-ДКВ (А) и образования *цис*-ДКВ (Б) при различных температурах

Несмотря на большее значение константы скорости 2 стадии  $\sigma$ -диастереомеризации (Рисунок 4.22В,Г), уменьшение количества *транс*-ДКВ (1 стадия) происходит быстрее образования *цис*-изомера (2 стадия) независимо от температуры. Это связано со значительно большей концентрацией исходного  $\sigma$ -диастереомера по сравнению с промежуточным продуктом.

Таблица 4.5 – Эмпирические параметры стадий  $\sigma$ -диастереомеризации

Процесс	Температура, °С	Скорость реакции, мАУ·с·h <sup>-1</sup>	Температурный коэффициент Вант-Гоффа	Энергия активации, кДж/моль
уменьшение количества <i>транс</i> -ДКВ	20	16,6	2,78	80,76
	30	150,7		
	40	341,5		
	50	896,0		
увеличение количества <i>цис</i> -ДКВ	20	5,0	3,39	95,09
	30	85,9		
	40	262,5		
	50	675,0		

Так как стереоизомеры ДКВ отличаются друг от друга углом вращения плоскости поляризации света (см. рис. 4.1), реакция изомеризации была проведена под контролем поляриметрии. Вычисляли удельный угол вращения и строили кинетическую кривую (Рисунок 4.24).

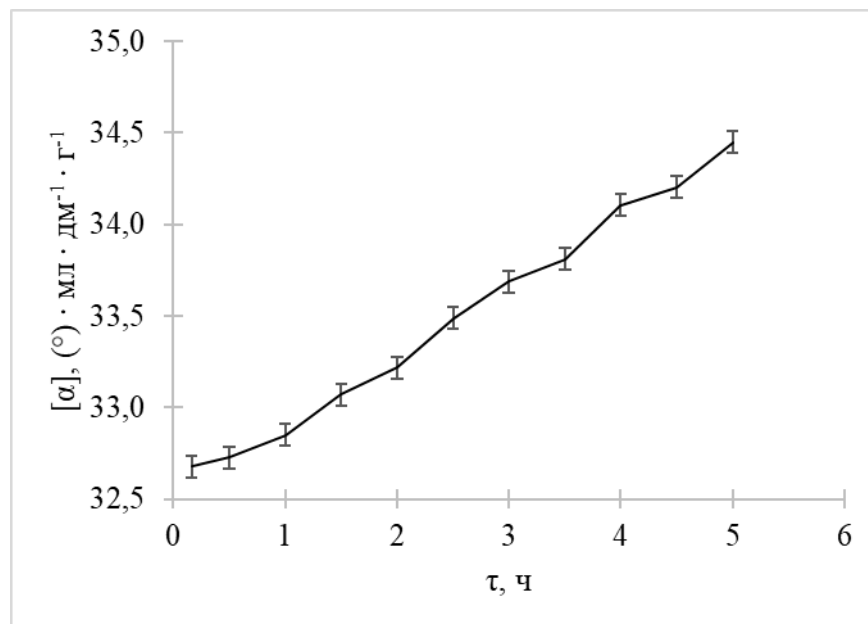
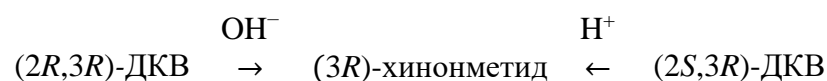


Рисунок 4.24 – Кинетика изменения оптической активности

Наблюдаемое в процессе  $\sigma$ -диастереомеризации увеличение угла оптического вращения позволяет сделать вывод, что из двух возможных механизмов в действительности осуществляется тот, при котором происходит обращение конфигурации атома С-2, так как по литературным данным  $[\alpha] (2S,3R)\text{-ДКВ} > [\alpha] (2R,3R)\text{-ДКВ}$ . Уравнение, объединившее результаты исследований механизма  $\sigma$ -диастереомеризации ДКВ, имеет вид:



#### 4.1.6. $\sigma$ -Диастереомеризация и лиофилизация

Подходящим методом супрамолекулярного синтеза композиции ДКВ-глицин является сублимационная сушка двухкомпонентного водного раствора, так как этот способ получения зачастую приводит к повышению растворимости [197]. Обнаруженная и изученная самопроизвольная  $\sigma$ -диастереомеризация ДКВ может происходить и в водном растворе ДКВ и глицина перед его лиофилизацией [215].

ДКВ с содержанием *цис*-диастереомера  $1,46 \pm 0,07\%$  смешивали с глицином в соотношении 1:5 (м/м) и растворяли в воде при нагревании. Растворы замораживали и лиофилизировали. Содержание *цис*-ДКВ в лиофилизате ДКВ-глицин, определенное методом ВЭЖХ-СФМ, составило  $2,95 \pm 0,18\%$ . Доля того же изомера, определенная после однократного снятия спектра ЯМР по площади сигнала НЗ, равна 1,95%.

Повышение количества *цис*-ДКВ с 1,46% в исходном ДКВ до 2,95% в лиофилизате подтверждает изомеризацию флавоноида в процессе получения композиции.

В соответствии Рекомендацией Коллегии Евразийской экономической комиссии от 11 ноября 2025 года № 30 фармацевтическая разработка, основанная на проектировании качества, должна включать в себя определение функциональных зависимостей, связывающих параметры технологического процесса с критическими показателями качества лекарственного препарата.

Придерживаясь плана получить композицию ДКВ-глицин для дальнейшей разработки жидкой лекарственной формы необходимо принять во внимание крайнюю скудность информации по биологической активности *цис*-ДКВ, концентрация которого в лекарственном препарате становится критическим показателем качества.

Исходя из результатов изучения влияния различных факторов на  $\sigma$ -диастереомеризацию ДКВ, изложенных в разделе 4.1.5., такие параметры технологического процесса получения композиции, как температура и продолжительность нагрева, оказывают непосредственное влияние на выявленный критический показатель качества (Рисунок 4.25).

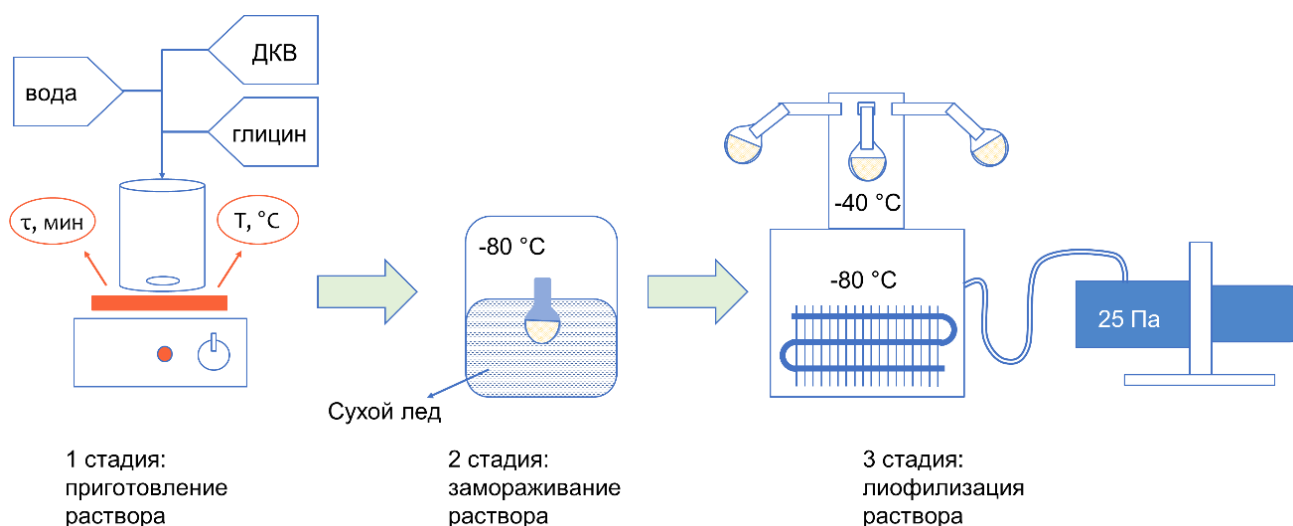


Рисунок 4.25 – Схема технологического процесса получения композиции ДКВ-глицин. Параметры, влияющие на критический показатель качества, обведены в красный овал

#### 4.1.7. Диастереомерный состав стерилизованных образцов дигидрокверцетина

Одним из ключевых показателей, предъявляемых к качеству фармацевтических субстанций согласно является микробиологическая чистота. Обеспечение надлежащего состояния фармацевтической продукции по данному параметру закладывается еще на этапе разработки лекарственного средства согласно системному подходу «качество путем разработки» (Quality-by-Design) [216].

Помимо комплекса профилактических мер, активно используются различные методы деконтаминации. Химический подход предполагает добавление в лекарственный препарат antimicrobных консервантов, которые, в зависимости от механизма действия, подразделяются на нарушающие проницаемость мембран, понижающие внутриклеточное значение pH, угнетающие ферменты, коагулирующие белки и повреждающие нуклеиновые кислоты [217]. Однако подобные вспомогательные вещества характеризуются собственным биологическим действием на организм пациента, что часто может быть нежелательным. Кроме того, не стоит забывать о возможности химического взаимодействия между компонентами лекарственного препарата.

Другой группой распространённых подходов являются физические методы. Классическим вариантом стерилизации является автоклавирование, предполагающее воздействие высоких температур и давления на микробные агенты [218]. Есть и более инновационные подходы, например, обработка низкотемпературной плазмой [219].

Сравнительно новым инструментом в арсенале производителя лекарственных средств, является стерилизация ионизирующим излучением [220]. Данный подход зарекомендовал себя как высокоэффективный способ обеспечения микробиологической чистоты [221, 222]. Применение любого из перечисленных методов требует тщательного подбора условий обработки субстанции и соблюдения баланса между эффективностью деконтаминации и обеспечением стабильности действующего вещества. При воздействии ионизирующего излучения на ДКВ может происходить диссоциация фенольных гидроксиллов, например, у C4', которая запустит процесс раскрытия кольца C с последующей  $\sigma$ -диастереомеризацией (Рисунок 4.26).

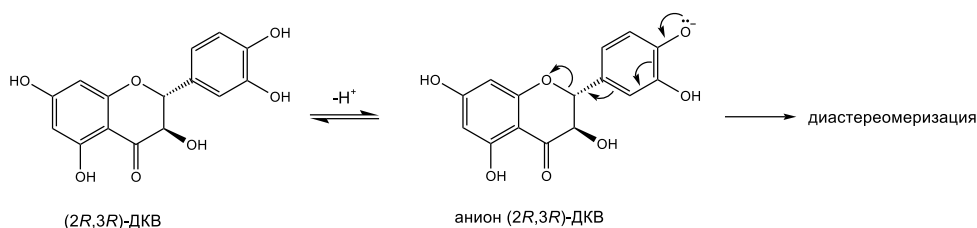


Рисунок 4.26 – Гипотеза о влиянии ионизирующего излучения на диастереомерный состав ДКВ

В связи с этим, внедрению этого метода стерилизации в фармацевтическую практику должны предшествовать исследования, подтверждающие отсутствие критических изменений в компонентном составе фармацевтической субстанции. Цель настоящего этапа исследования заключалась в изучении влияния облучения потоком быстрых электронов на стереоизомерный состав ДКВ [223, 224].

Объектом исследования (ДКВ<sub>об</sub>) служил образец ДКВ, подвергнутый ионизирующему облучению. Аналогичный образец ДКВ того же производителя и серии, для которого не проводили противомикробную обработку, использовали как объект сравнения (ДКВ<sub>ср</sub>). Поляриметрический анализ осуществляли в течение 1 мес с интервалом в 1 день в течение первой недели, а в дальнейшем – 1 раз в 7 дней. Количество диастереомеров в исследуемых образцах определяли методом ВЭЖХ-СФМ-МС.

Динамика результатов поляриметрического анализа растворов образцов ДКВ в ацетоне представлена на рисунке 4.27. Можно отметить, что для ДКВ<sub>об</sub> и ДКВ<sub>ср</sub> наблюдается общая тенденция к снижению величины удельного оптического вращения по  $0,1587^\circ/\text{день}$  ( $r^2 = 0,7588$ ) и  $0,1206^\circ/\text{день}$  ( $r^2 = 0,3408$ ), соответственно. Вместе с тем, результаты измерений для ДКВ<sub>об</sub> варьируют от  $17,60^\circ \pm 0,11^\circ$  до  $20,66^\circ \pm 0,66^\circ$ , а для ДКВ<sub>ср</sub> – от  $17,57^\circ \pm 1,54^\circ$  до  $18,76^\circ \pm 1,54^\circ$ , что можно объяснить погрешностями в работе прибора. Средние значения величины удельного оптического вращения растворов ДКВ<sub>об</sub> и ДКВ<sub>ср</sub> составили  $19,08^\circ \pm 1,41^\circ$  и  $17,98^\circ \pm 1,77^\circ$ , соответственно, что позволяет говорить об отсутствии статистически значимых различий между результатами анализа обоих образцов. Принимая во внимание влажность образцов, равную  $8,5 \pm 0,3\%$ , полученные характеристики оптической активности можно скорректировать до  $20,85^\circ \pm 1,54^\circ$  и  $19,65^\circ \pm 1,93^\circ$  для ДКВ<sub>об</sub> и ДКВ<sub>ср</sub>, соответственно.

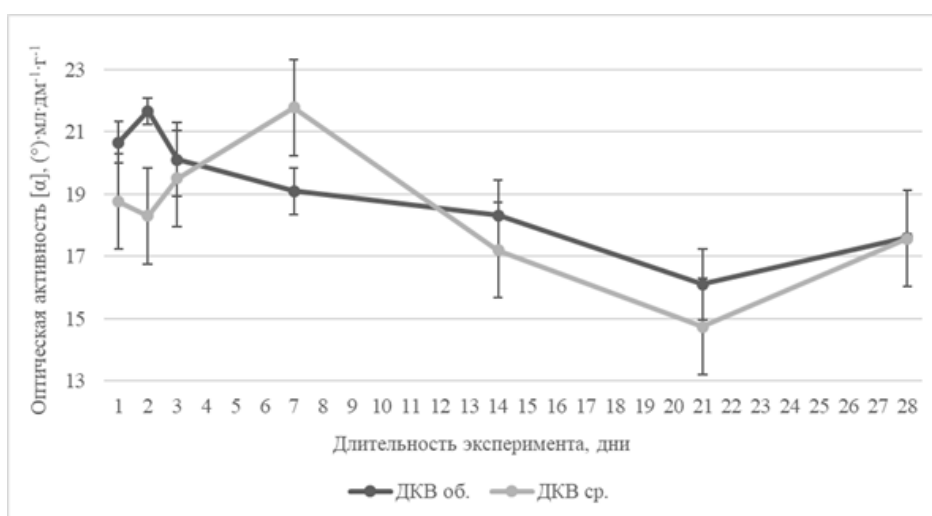


Рисунок 4.27 – График зависимости величины удельного оптического вращения от времени для растворов ДКВ в ацетоне

Вышеупомянутые данные согласуются с ранее полученными результатами для коммерчески доступных образцов этого производителя: по литературным сведениям, величина удельного оптического вращения для ДКВ составляет  $22,06^\circ \pm 1,36^\circ$  [225]. Более того, в ходе ранее проведенного систематического обзора информации по физико-химическим свойствам стереоизомеров ДКВ было установлено, что раствор (2*R*,3*R*)-ДКВ в ацетоне характеризуется значением угла удельного вращения  $21,1^\circ \pm 3,7^\circ$  [226], что позволяет говорить о достаточно высокой стереоизомерной гомогенности изучаемых образцов.

Хроматограммы образцов, полученные при длине волны 290 нм, характеризуются двумя пиками с временами удерживания  $10,18 \pm 0,03$  мин и  $11,63 \pm 0,01$  мин (Рисунок 4.28), которые на основании профилей УФ- и масс-спектров были идентифицированы как *транс*- и *цис*-диастереомеры ДКВ. Общее содержание ДКВ с учетом влажности в анализируемых образцах составляло  $93,25 \pm 0,01\%$  (ДКВ<sub>об</sub>) и  $94,92 \pm 0,01\%$  (ДКВ<sub>ср</sub>), что соответствует заявленным показателям производителя. В ходе количественного анализа было установлено, что доля *цис*-изомера в образцах ДКВ<sub>об</sub> и ДКВ<sub>ср</sub> –  $0,59 \pm 0,13\%$  и  $1,27 \pm 0,70\%$ , соответственно. Эти данные согласуются с результатами поляриметрии и указывают на отсутствие эффекта радиационного облучения на пространственную структуру молекулы ДКВ.

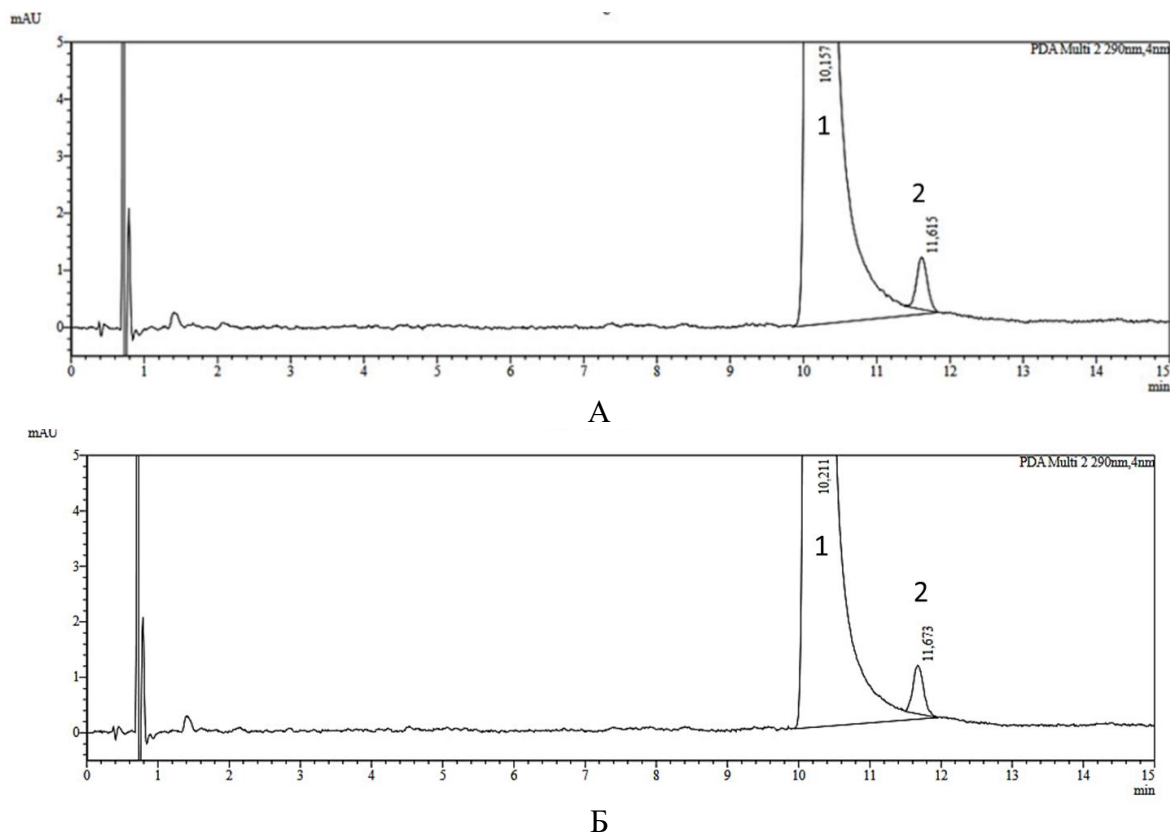


Рисунок 4.28 – Хроматограммы испытуемых образцов: А – ДКВ<sub>об</sub>, Б – ДКВ<sub>ср</sub>. 1 – *транс*-ДКВ, 2 – *цис*-ДКВ. Колонка: Kinetex™ 2,6 мкм Biphenyl 100 Å, 100 × 3,0 мм; подвижная фаза: раствор муравьиной кислоты в воде (рН 2,7), метанол; градиентное элюирование 7% → 21% метанола за 15 мин; скорость потока 0,65 мл/мин; 60 °С; 0,01 мг/мл; 20 мкл; 290 нм

Установлено, что после облучения ДКВ потоком быстрых электронов отсутствуют статистически достоверные различия в величине удельного оптического вращения между образцами до обработки и после нее, и не обнаружено изменений стереоизомерного состава. Эти данные служат подтверждением безопасности радиационной стерилизации с энергией 9,5 МэВ для конечных потребителей и могут быть использованы для обоснования внедрения данного метода деконтаминации в технологию получения жидкой лекарственной формы на основе композиции ДКВ-глицин.

## 4.2. Хиральный полиморфизм глицина

### 4.2.1. Фазовое состояние глицина

Глицин (2-аминоуксусная кислота) – это единственная протеиногенная аминокислота, не имеющая асимметрических атомов углерода, но способная становится хиральным объектом в состоянии кристаллов полиморфных модификаций. Глицин кристаллизуется в виде 5 полиморфов [227], из которых стабильными являются  $\alpha$ -,  $\beta$ - и  $\gamma$ -формы.  $\gamma$ -Полиморф наиболее стабилен при температуре и давлении окружающей среды [228].

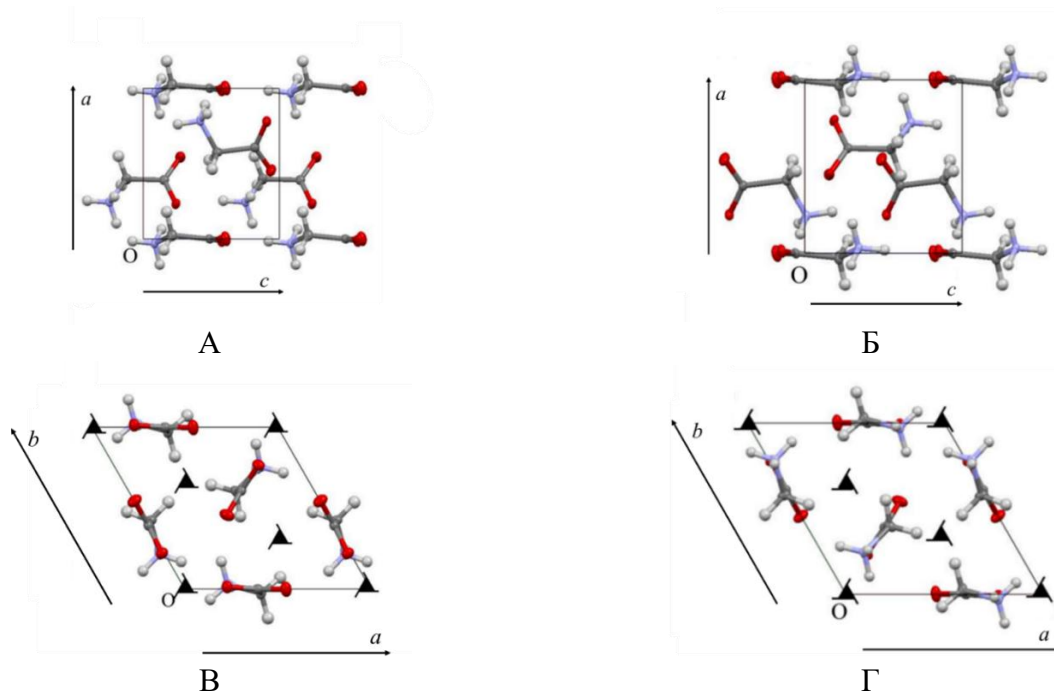


Рисунок 4.29 – Кристаллические структуры левовращающего (А,В) и правовращающего (Б,Г)  $\gamma$ -глицина, вид вдоль оси  $b$  (А,Б) и  $c$  (В,Г) [229]

В то время как  $\alpha$ -полиморф представляет собой ахиральный кристалл (пространственная группа  $P2_1/n$ ) [230],  $\beta$ - и  $\gamma$ -полиморфы проявляют кристаллическую хиральность.  $\beta$ -Форма относится к пространственной группе  $P2_1$  [231]. Левовращающие кристаллы  $\gamma$ -глицина имеют пространственную группу  $P3_1$ , а правовращающие –  $P3_2$  (Рисунок 4.29) [229].

Так как каждая полиморфная форма глицина имеет свой уникальный набор пиков отражения на дифракционной картине, нами был расшифрован полиморфный состав субстанции глицина, из которой получали композицию ДКВ-глицин. При анализе дифрактограммы физической смеси ДКВ с глицином (Рисунок 4.30) обнаружено, что исходный глицин представляет собой смесь  $\alpha$ - и  $\gamma$ -полиморфов. Так, пики  $29,8^\circ$  и  $35,4^\circ$  были отнесены к  $\alpha$ -глицину, а пики  $14,8^\circ$ ,  $21,8^\circ$ ,  $25,3^\circ$ ,  $29,3^\circ$ ,  $39,1^\circ$  и  $44,4^\circ$  приписаны  $\gamma$ -глицину [196].

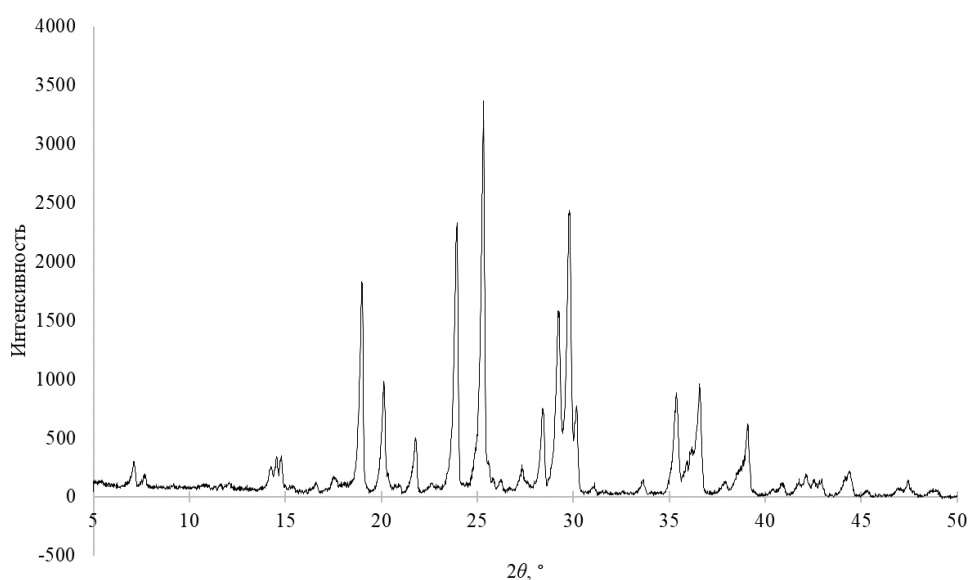


Рисунок 4.30 – Дифрактограмма физической смеси ДКВ с глицином

Итак, ДКВ и глицин хиральны в твердом агрегатном состоянии. При их совместной кристаллизации может произойти изменение стереоизомерного состава ДКВ вплоть до разделения. В литературе описан очень интересный случай разделения комплексов этирацетам-хлорид цинка [232] (Рисунок 4.31).

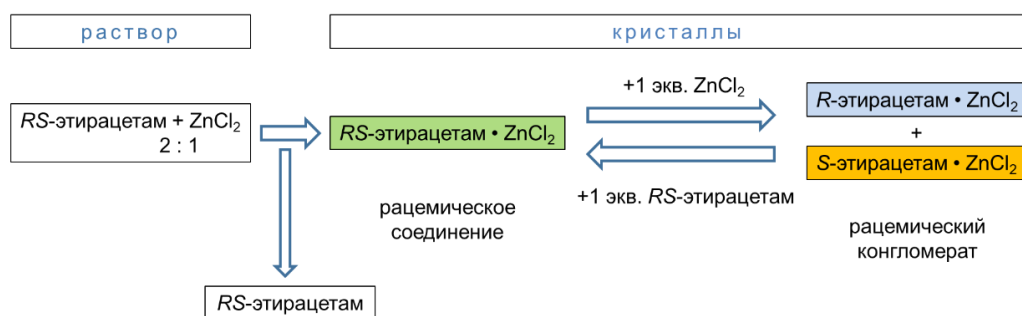


Рисунок 4.31 – Схема перехода между рацемическим соединением и рацемическим конгломератом этирацетама [232]

В случае леветирацетама ((*S*)-этирацетам), независимо от стехиометрического соотношения реагентов, неизменно получали комплекс *S*-этирацетам·ZnCl<sub>2</sub> (Рисунок 4.32) в мольном соотношении 1:1 вместе с непрореагировавшим исходным веществом. В случае рацемата этирацетама, напротив, увеличение количества ZnCl<sub>2</sub> не только повлияло на стехиометрию продукта, но также вызвало нарушение зеркальной симметрии с последующим образованием рацемического конгломерата, состоящего из кристаллов (*R*)-этирацетам·ZnCl<sub>2</sub> и (*S*)-этирацетам·ZnCl<sub>2</sub>.

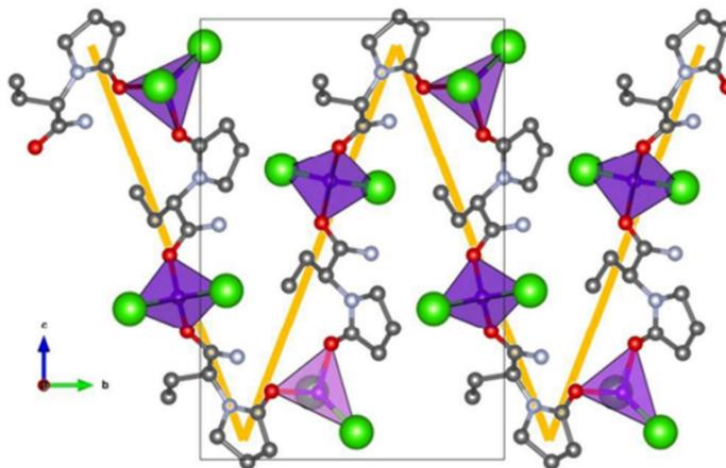


Рисунок 4.32 – Кристаллическая структура комплекса (*S*)-этирацетам·ZnCl<sub>2</sub> [232]

Рацематы отличаются от индивидуальных стереоизомеров такими физико-химическими свойствами, как плотность, температура плавления и растворимость. Правило Валлаха (Otto Wallach) гласит, что рацемические кристаллы, как правило, более плотные, чем чистые энантиомеры [233]. Для рацемического конгломерата температура плавления всегда ниже температуры плавления индивидуальных энантиомеров. Если рацемат является истинным, то температура его плавления может быть как выше, так и ниже температуры плавления энантиомеров. Растворимость рацемических конгломератов выше растворимости чистых энантиомеров. Ещё в начале прошлого столетия Вильгельмом Мейерхоффером (Wilhelm Meyerhoffer) было обнаружено, что рацемические конгломераты имеют приблизительно вдвое большую растворимость по сравнению с чистыми энантиомерами [234]. Для истинных рацематов растворимость может быть больше или меньше растворимости энантиомеров.

Так как возможное хиральное разделение комплекса ДКВ-глицин может привести к изменению физико-химических и фармакологических свойств композиции, необходимо оценить влияние технологии получения субстанции на полиморфизм глицина.

#### 4.2.2. Воздействие лиофилизации на полиморфизм

На скорость кристаллизации глицина из водного раствора и тип образующихся кристаллов оказывают влияние рН, ионная сила и то, в какой солевой форме находится аминокислота. Раствор нейтрального глицина подвергается быстрой вторичной кристаллизации при замораживании с образованием  $\beta$ -полиморфа с температурой эвтектического плавления  $-3,4$  °С. Растворы гидрохлорида глицина подвергаются вторичной кристаллизации относительно медленно, и температура плавления эвтектики составляет  $-28$  °С. Глицинат натрия кристаллизуется из замороженного раствора с промежуточной скоростью, образуя эвтектическую смесь с температурой плавления  $-17,8$  °С [235]. Повышенная ионная сила значительно замедляет кристаллизацию нейтрального глицина и способствует образованию  $\gamma$ -полиморфа. При комнатной температуре в присутствии влаги  $\beta$ -форма легко превращается в смесь  $\gamma$ - и  $\alpha$ -глицина.

Abira Pyne и Raj Suryanarayanan исследовали влияние условий заморозки раствора и температуры первичной сушки на фазовое состояние глицина в лиофилизате [236]. В то время как медленное охлаждение (до  $-70$  °С со скоростью  $2$  °С/мин) водных растворов приводило к образованию  $\beta$ -глицина, при быстром охлаждении (до  $-90$  °С со скоростью  $500$  °С/мин) образовывалась смесь  $\beta$ - и  $\gamma$ -глицина. При выдерживании замороженного раствора при температуре  $-35$  °С и ниже  $\beta$ -глицин оказался стабилен. При более высоких температурах ( $-20$  °С и выше) происходит полиморфный переход  $\beta \rightarrow \gamma$ . Кроме того, оценивали влияние исходной концентрации раствора. Лиофилизат, полученный из  $15\%$  (м/м) раствора при температуре сушки  $-20$  °С и выше, содержал  $\beta$ - и  $\gamma$ -глицин. При низкой концентрации глицина ( $5\%$  м/м) примесь  $\gamma$ -формы в лиофилизате появлялась уже при температуре первичной сушки  $-35$  °С и выше. Эти результаты показали, что твердое состояние лиофилизата является сложной функцией скорости охлаждения, температуры первичной сушки и начальной концентрации растворенного вещества.

Исходя из имеющихся данных, в результате лиофилизации водного раствора глицина образуется  $\beta$ -форма, которая при повышении температуры до комнатной переходит в  $\gamma$ -глицин, который обладает свойством хиральности, поэтому может образовывать с ДКВ энантиоморфные кокристаллы. Дифрактограмма лиофилизата глицина приведена на рисунке 4.33.

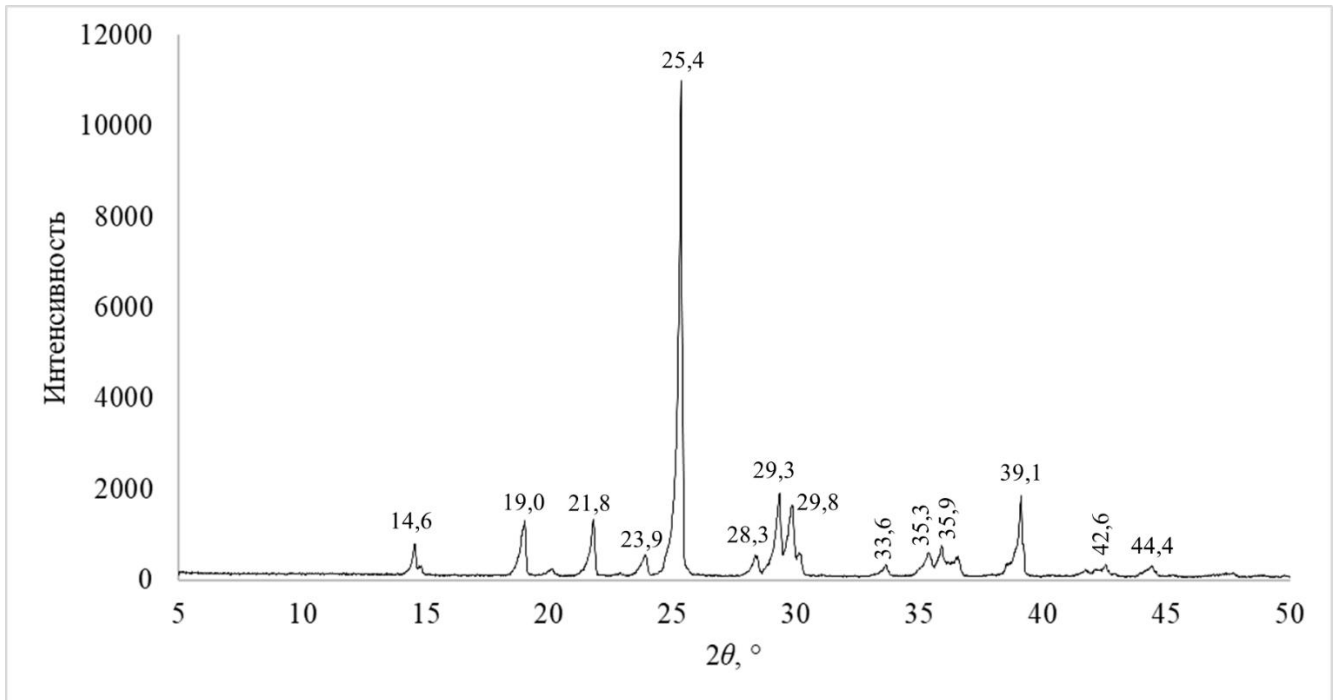


Рисунок 4.33 – Дифрактограмма лиофилизата глицина

Полученные значения углов  $2\theta$  были сопоставлены с литературными данными, в которых  $\gamma$ -форма глицина исследовалась методом рентгеновской порошковой дифрактометрии. Пики, принадлежащие  $\gamma$ -глицину, приведены в таблице 4.6.

Таблица 4.6 – Пики  $\gamma$ -глицина из литературных источников и полученные нами результаты

Положения углов $2\theta$ пиков $\gamma$ -глицина, °			
Peter M.E. и др. [237]	Srinivasan K. [196]	Moolya B.N. и др. [238]	Панков Д.И. и др. [239]
-	14,4	14,7	14,6
21,6	21,7	21,9	21,8
25,2	25,3	25,3	25,4
29,2	29,3	29,3	29,3
-	-	30,0	29,8
-	-	33,6	33,6
35,6	35,7	35,8	35,9
38,8	39,1	39,0	39,1
42,2	42,5	42,3	42,6
44,1	44,4	44,4	44,4

Существование в лиофилизате именно  $\gamma$ -формы глицина подтверждает фазовый переход  $\gamma \rightarrow \alpha$ , который был обнаружен на кривой ДСК этого образца (Рисунок 4.34).

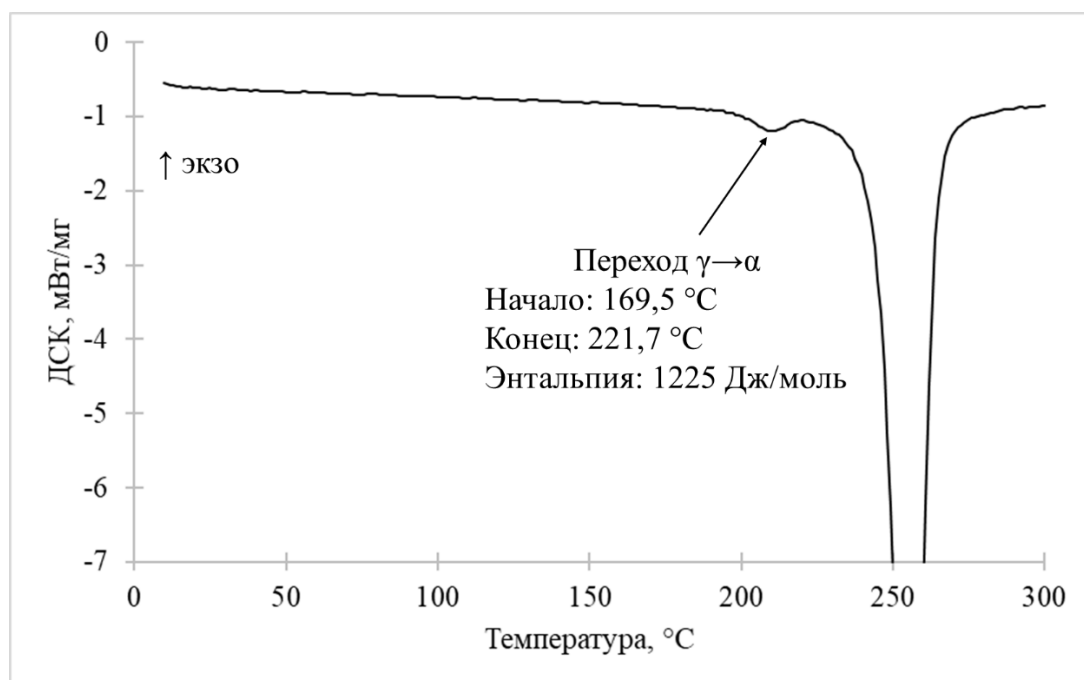


Рисунок 4.34 – Кривая ДСК лиофилизата глицина

Переход  $\gamma \rightarrow \alpha$  начинается при температуре 169,5 °С, заканчивается при температуре 221,7 °С и имеет энтальпию, равную 1225 Дж/моль. Перлович Г.Л. и др. сообщает о довольно широком разбросе значений  $T_{tr}(\gamma \rightarrow \alpha)$ , находящихся в интервале от 168,4 °С до 200,7 °С. Так, фазовый переход  $\gamma$ -глицина при  $T_{tr}=165$  °С соответствует тепловому эффекту в  $1200 \pm 80$  Дж/моль [228].

На основании проведенного анализа сделано заключение о том, что после лиофилизации водного раствора глицина происходит его кристаллизация в виде  $\gamma$ -полиморфа.

### 4.3. Выводы по главе 4

1. Достигнуто разделение  $\sigma$ -диастереомеров ДКВ ( $R_s$  2,5) на силикагеле с привитыми фенильными группами за счет  $\pi$ - $\pi$  стэкинга ароматических фрагментов ДКВ и бензольных колец сорбента.

2. Установлено влияние водного растворителя, значения рН и температуры на процесс самопроизвольной изомеризации *транс*-ДКВ в *цис*-изомер.

3. Доказано отсутствие  $\sigma$ -диастереомеризации ДКВ при стерилизации субстанции флавоноида потоком быстрых электронов.

4. Обнаружено образование хиральных кристаллов  $\gamma$ -глицина после лиофилизации водного раствора аминокислоты.

5. Достигнуто разделение  $\sigma$ -диастереомеров родственного ДКВ флаванолола – дигидрокемпферола (аромадендрина), обнаруженного в образце, полученном методом распылительной сушки.

## ГЛАВА 5. ХАРАКТЕРИСТИКА КОМПОЗИЦИИ ДИГИДРОКВЕРЦЕТИН-ГЛИЦИН

### 5.1. Органолептические свойства

Исходная субстанция ДКВ соответствует описанию производителя и представляет собой мелкокристаллический порошок от белого до бледно-жёлтого цвета со смолистым запахом. Как и указано в разделе Свойства ФС.2.1.0086 внешний вид глицина описывается как белый кристаллический порошок. Обнаружено, что используемый для супрамолекулярного синтеза глицин склонен к комкованию. В свою очередь, порошок композиции ДКВ-глицин имеет светло-желтый цвет, слабый смолистый запах и характеризуется рыхлой пористой поверхностью см. рис. 3.7).

#### Физические параметры

В терминах Государственной фармакопеи Российской Федерации XV издания кристалличность композиции должна быть охарактеризована на уровне «кристаллический порошок», так как по данным сканирующей электронной микроскопии не менее 95 % частиц порошка имеет размер менее 0,4 мкм и не более 40 % – размер менее 0,2 мкм (см. рис. 3.8).

Плотность исходной субстанции ДКВ и композиции составляет около 0,25 г/мл, при этом плотность глицина почти в 2 раза больше (0,51 г/мл).

Растворимость композиции ДКВ-глицин в воде описывается фармакопейным термином «мало растворим», в то время как субстанция ДКВ «очень мало растворима», а глицин «легко растворим».

Для получения количественной характеристики растворимости композиции был определен показатель «наблюдаемая скорость растворения» по ОФС.1.1.1.0016. Измеряли растворимость ДКВ, физической смеси ДКВ с глицином и композиции ДКВ-глицин в 0,9 % водном растворе натрия хлорида. Тест проводили в течение 45 минут, пробы среды растворения объемом 600 мкл отбирали каждые 5 мин. Пробу разбавляли средой растворения до 3 мл, фильтровали и определяли концентрацию ДКВ спектрофотометрически при длине волны 288 нм. Из сравнения кинетических кривых скорости растворения (Рисунок 5.1) видно, что наилучшую растворимость в физиологическом растворе проявляет композиция ДКВ-глицин.

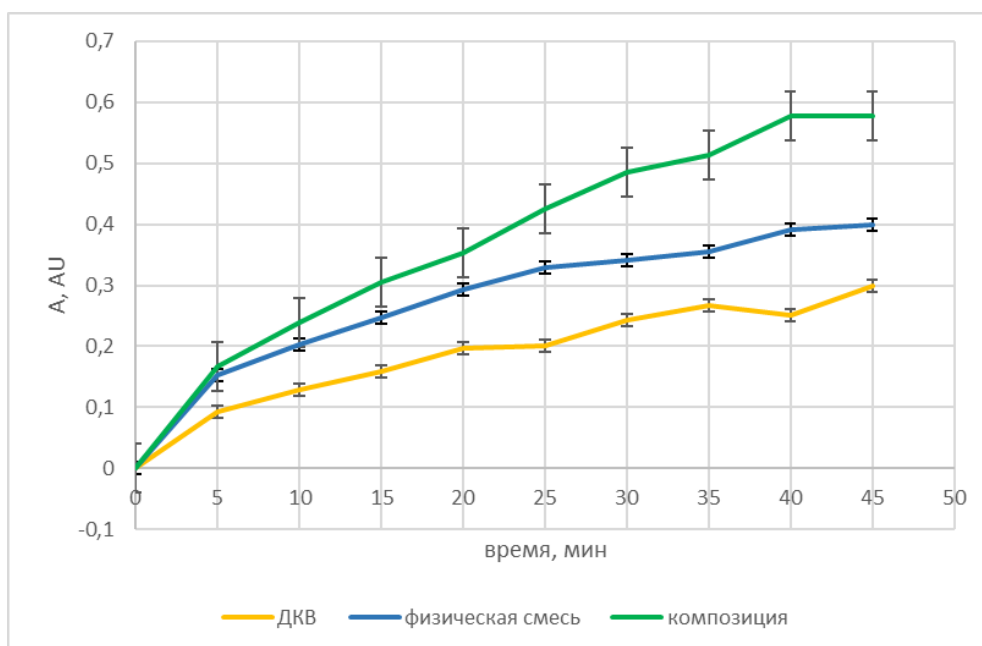


Рисунок 5.1 – Кинетика скорости растворения ДКВ, физической смеси и композиции ДКВ-глицин

Наблюдаемое повышение растворимости флавоноида в композиции по сравнению с чистым ДКВ позволяет сделать вывод о достижении цели супрамолекулярного синтеза и предположить улучшение биодоступности ДКВ. Более того, на растворимость влияет не только состав, но и технология получения образца, так как композиция растворяется лучше, чем физическая смесь. Таким образом, лиофилизацию можно признать подходящим методом синтеза фармацевтической субстанции ДКВ-глицин для дальнейшей разработки на ее основе лекарственной формы для парентерального применения.

Лекарственная форма лиофилизат может применяться для приготовления раствора для парентерального введения. Для лиофилизатов, предназначенных для получения восстановленных жидких лекарственных форм путём растворения или диспергирования исходной лекарственной формы в соответствующем растворителе, проводят испытание «Время растворения или диспергирования» [240]. По общим требованиям ОФС.1.4.2.0019 Государственной фармакопеи РФ XV издания и ОФС 2.1.9.21 Фармакопеи ЕАЭС твёрдая лекарственная форма выдерживает испытание по показателю «Время растворения» или «Время диспергирования», если каждый из 6 образцов растворяется или диспергируется в течение не более 5 мин в объеме растворителя, необходимом для получения максимальной терапевтической концентрации.

В различных препаратах в качестве растворителя инструкцией по применению предписано использовать воду для инъекций или специальный прилагаемый в упаковке растворитель. Так, например, Гептрал® (МНН: Адеметионин) выпускается в лекарственной форме «лиофилизат для приготовления раствора для внутривенного и внутримышечного введения» в комплекте с

растворителем, который содержит L-лизин, натрия гидроксид и воду для инъекций. Растворенный лиофилизат далее следует разбавить в 250 мл физиологического раствора или в 5 % растворе глюкозы и ввести медленно в течение 1-2 часов.

Учитывая кислотные свойства ДКВ, мы опробовали основной растворитель и провели тест растворения композиции ДКВ-глицин в водном растворе натрия гидроксида. Концентрацию натрия гидроксида взяли аналогичную растворителю в препарате Гептрал<sup>®</sup>, которая составляет 2,3 мг/мл. Пробы отбирали на 0, 5 и 10 минут растворения, разбавляли в 7,5 раз, фильтровали и определяли концентрацию ДКВ спектрофотометрически при длине волны 318 нм. Как видно из кинетических кривых скорости растворения в физиологическом растворе и в растворе натрия гидроксида, в основном растворителе (рН 12,65) ДКВ из композиции растворяется в 3 раза быстрее (Рисунок 5.2).

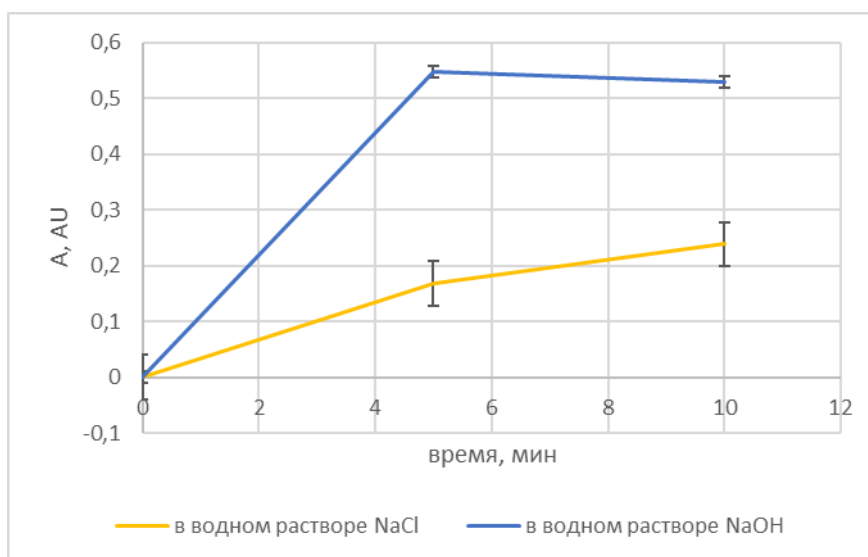
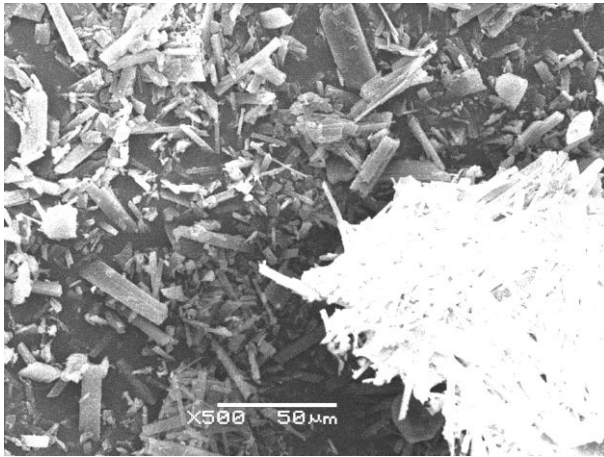


Рисунок 5.2 – Кинетика скорости растворения композиции ДКВ-глицин в физиологическом растворе и в растворе натрия гидроксида

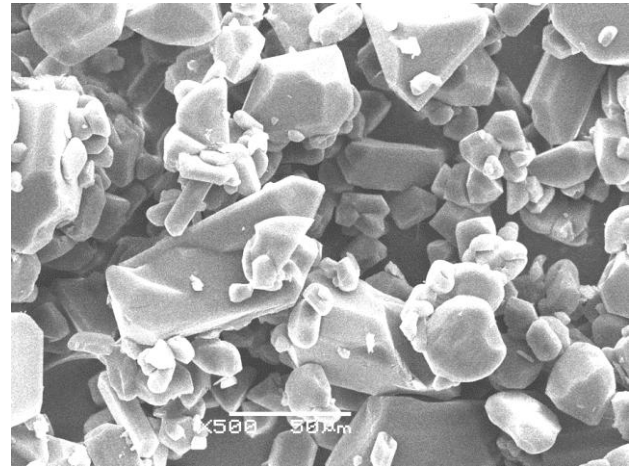
Из результатов этого эксперимента можно сделать вывод о более целесообразном использовании основного растворителя для лиофилизата ДКВ-глицин, однако нельзя упускать из виду ускоренную  $\sigma$ -диастереомеризацию ДКВ в щелочной среде при повышенной температуре (37 °С) среды растворения.

### 5.3. Морфология композиции

Игольчатые кристаллы ДКВ имеют длину от 10 мкм до 50 мкм (Рисунок 5.3А). Призматические и сферические кристаллы размером 10-80 мкм характерны для глицина (Рисунок 5.3Б).



А



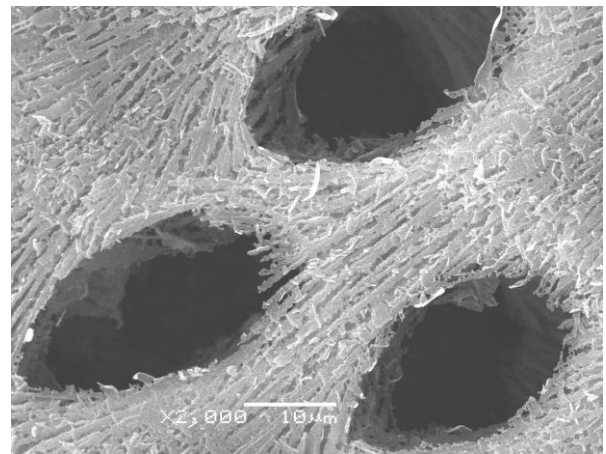
Б

Рисунок 5.3 – Морфология твердой фазы: А) ДКВ (500×), Б) глицин (500×)

Частицы лиофилизата композиции размером от 50 до 500 мкм (см. рис. 3.8) имеют форму тонких чешуек с перфорированной поверхностью, диаметр отверстий составляет 20-50 мкм (Рисунок 5.4а). При увеличении 2000× становятся различимы бороздки (Рисунок 5.4б). Наблюдается явная гомогенность твердой фазы, отдельные частицы исходных компонентов отсутствуют.



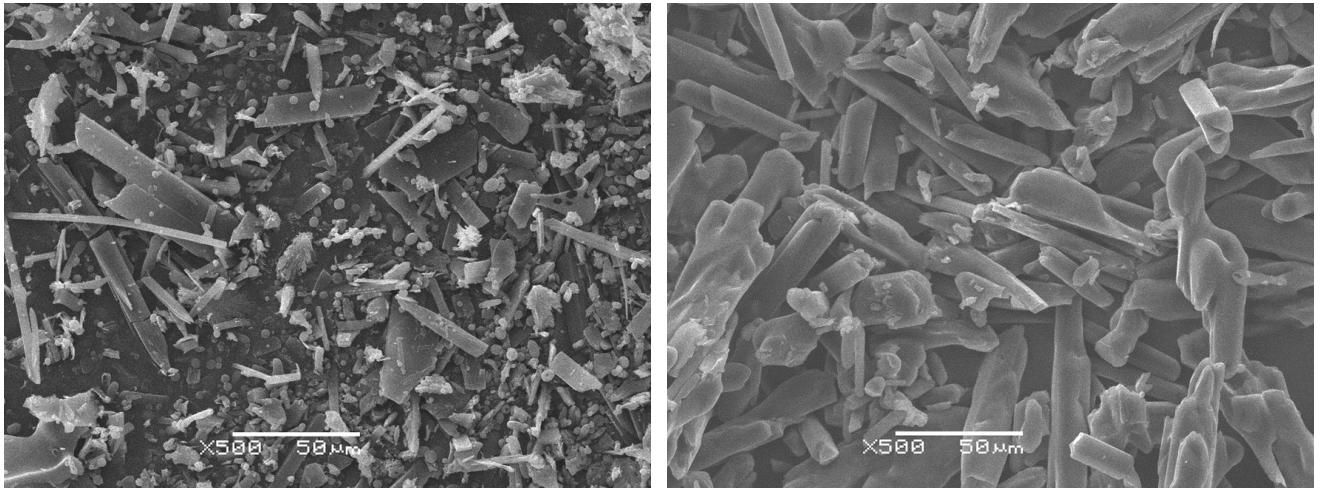
А



Б

Рисунок 5.4 – Морфология твердой фазы: А) лиофилизат ДКВ-глицин (500×),  
Б) лиофилизат ДКВ-глицин (2000×)

По своим морфологическим параметрам композиция отличается от лиофилизатов исходных веществ. Лيوфилизат ДКВ состоит из двух фракций: пластинок с гладкой поверхностью, часто игольчатой формы длиной 15-50 мкм, и сферических частиц диаметром около 5 мкм (Рисунок 5.5А). Лيوфилизат глицина однороден, представляет собой кристаллы продолговатой формы, также с гладкой поверхностью (Рисунок 5.5Б).



А

Б

Рисунок 5.5 – Морфология твердой фазы: А) лиофилизат ДКВ (500×),  
Б) лиофилизат глицина (500×)

Так как лиофилизат композиции ДКВ-глицин имеет особую гомогенную морфологию, отличную от наблюдаемой у исходных субстанций, их лиофилизатов и физической смеси, то можно предположить образование монофазного продукта.

#### 5.4. Дифракционная картина

На дифрактограмме лиофилизата ДКВ-глицин (Рисунок 5.6А) наблюдаются пики отражения при значениях  $2\theta$  17,9°, 20,3°, 31,0° и 41,1°, которые отсутствуют у образцов сравнения – физической смеси и лиофилизатов исходных веществ. Физическая смесь характеризуется высокой степенью кристалличности (Рисунок 5.6Б). Пики отражения при значениях  $2\theta$  7,1°, 7,7°, 14,3°, 27,3° и 36,6° принадлежат кристаллической форме ДКВ [241]. Лиофилизация ДКВ привела к неполной аморфизации вещества. Тем не менее, некоторые пики (7,1°, 7,7°, 14,3°, 15,4°, 16,6°, хоть и потеряли свою интенсивность, но сохранились на дифрактограмме (Рисунок 5.6В) [241]. Влияние технологии получения композиции на полиморфизм глицина подробно представлено в разделе 4.2, там же сделано отнесение пиков отражения, наблюдаемых на дифрактограмме физической смеси. Обобщая имеющиеся данные, лиофилизация водного раствора глицина привела к кристаллизации  $\gamma$ -формы (Рисунок 5.6Г).

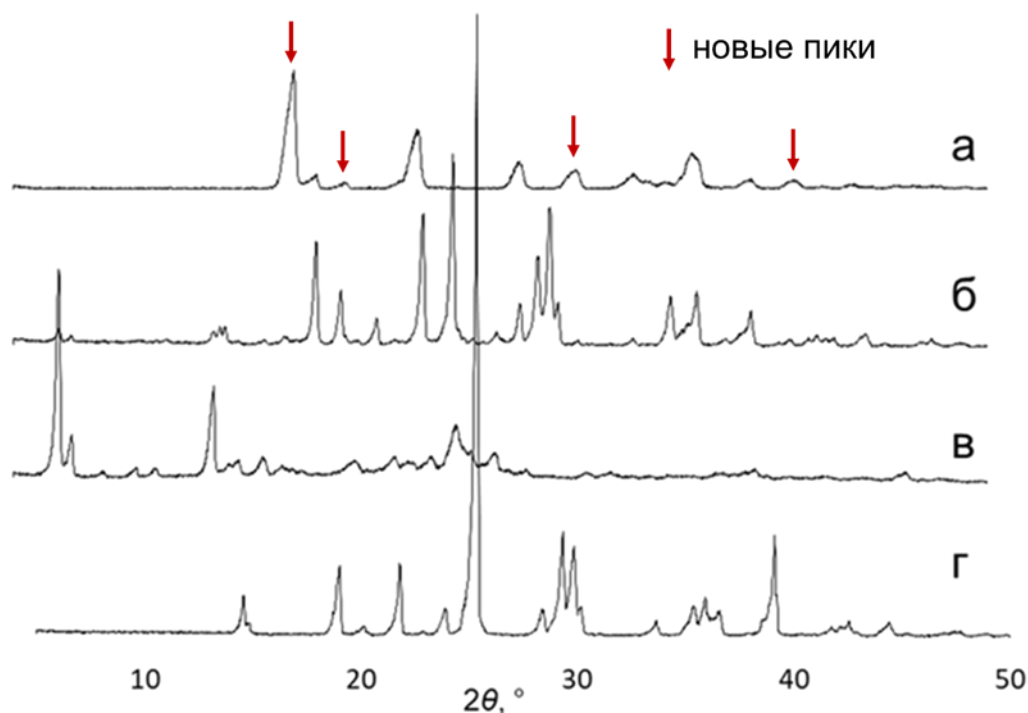


Рисунок 5.6 – Дифрактограммы: а) лиофилизат ДКВ-глицин, б) физическая смесь, в) лиофилизат ДКВ, г) лиофилизат глицина

Установлено, что совместная лиофилизация ДКВ и глицина привела к формированию продукта с новой супрамолекулярной структурой, которая отличается значительно меньшей степенью кристалличности по сравнению с физической смесью и лиофилизатами индивидуальных исходных веществ.

### 5.5. Термическое поведение

Широкий эндотермический эффект на кривой ДСК лиофилизата ДКВ до 115 °С указывает на потерю влаги и кристаллизационной воды (Рисунок 5.7а). При температуре около 150 °С ДКВ претерпевает экзотермическое превращение аморфной формы в кристаллическую [125]. Кристаллизация аморфного флавоноида в составе композиции с глицином не наблюдается, значит весь ДКВ израсходовался на образование комплекса с аминокислотой. Температура плавления лиофилизата ДКВ составляет 228 °С, в то время как композиция ДКВ-глицин плавится при температуре 210 °С.

На кривой ДСК глицина имеется эндотермический пик около 200 °С перед его плавлением ( $T_{пл} = 230$  °С), который соответствует фазовому переходу из  $\gamma$ -формы в  $\alpha$ -форму (Рисунок 5.7б) [196]. Этот фазовый переход при той же температуре отчетливо виден и на кривой ДСК

композиции ДКВ-глицин (Рисунок 5.7*в*), свидетельствующий, по-видимому, о наличии в лиофилизате композиции не вступившего в реакцию глицина.

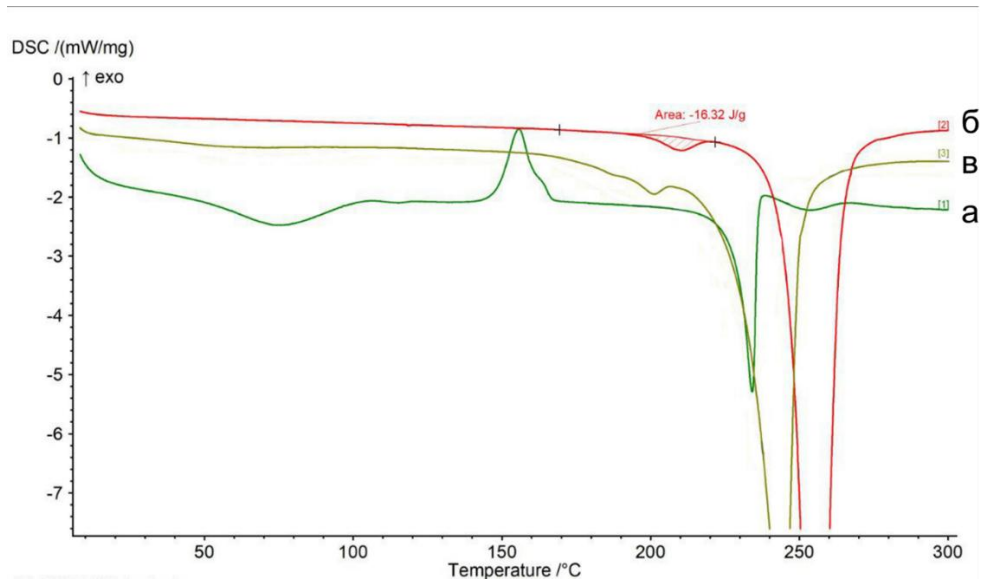


Рисунок 5.7 – Кривые, полученные дифференциальной сканирующей калориметрией: а) лиофилизат ДКВ, б) глицин, в) композиция ДКВ-глицин

Кривая ТГ лиофилизата ДКВ-глицин (Рисунок 5.8*а*) отличается от кривой ТГ физической смеси более ранним началом плавления (Рисунок 5.8*б*), что также доказывает формирование новой твердой фазы после лиофилизации.

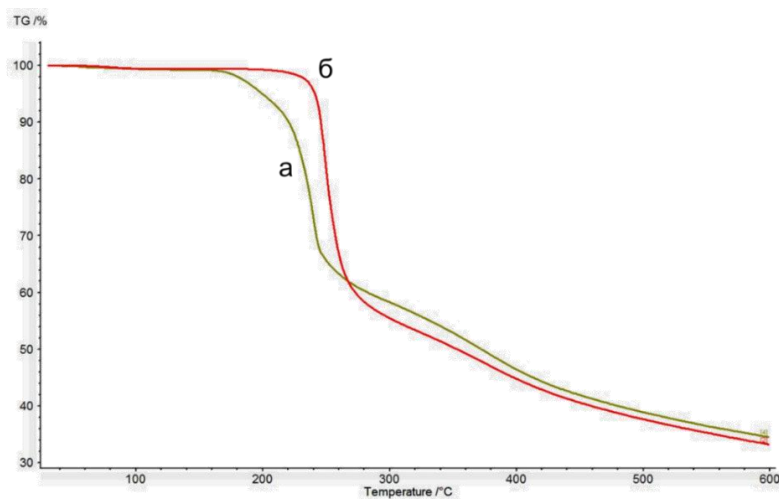


Рисунок 5.8 – Кривые, полученные термогравиметрией: а) композиция ДКВ-глицин, б) физическая смесь

Таким образом, методами термического анализа также было доказано формирование продукта с новой фазовой модификацией.

## 5.6. Спектральные свойства

### 5.6.1. Характеристические полосы поглощения в инфракрасной области

Учитывая молекулярную структуру ДКВ и цвиттер-иона глицина в их композиции можно предполагать формирование двух типов гетеросинтонов: между гидроксильной группой флавоноида и карбоксилатом аминокислоты, между аммонийной группой аминокислоты и карбонильной группой флавоноида. Гетеросинтоны первого типа наблюдал Н. Не с соавторами в композиции кверцетин–L-пролин [173]. На спектре ДКВ в инфракрасной области (Рисунок 5.9А) видны характеристические полосы валентных колебаний О–Н ( $3310\text{ см}^{-1}$ ), С=О ( $1635\text{ см}^{-1}$ ), С–О фенольных гидроксидов ( $1252\text{ см}^{-1}$ ,  $1158\text{ см}^{-1}$ ) и С–О вторичного спиртового гидроксила ( $1083\text{ см}^{-1}$ ). В свою очередь, ИК-спектр глицина (Рисунок 5.9Б) имеет колебательные полосы  $\nu$  N–H ( $3177\text{ см}^{-1}$ ),  $\nu$  C–N ( $1333\text{ см}^{-1}$ ,  $1117\text{ см}^{-1}$ ),  $\delta$  NH<sub>2</sub> ( $1591\text{ см}^{-1}$ ,  $702\text{ см}^{-1}$ ).

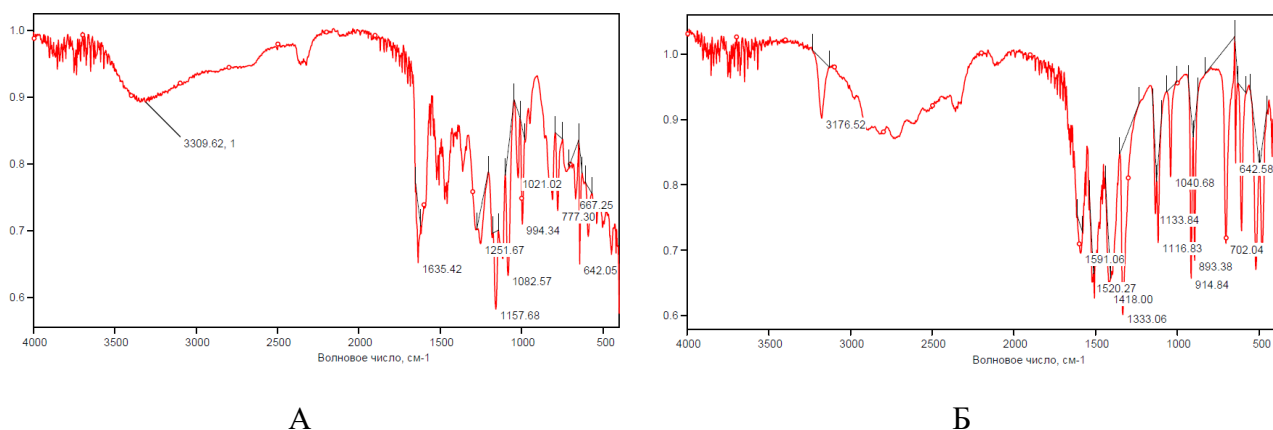


Рисунок 5.9 – ИК-спектры: А – лиофилизата ДКВ, Б – лиофилизата глицина

В ИК-спектре композиции произошли сдвиги колебательных полос ДКВ и глицина (Рисунок 5.10). Валентные колебания связи О–Н, принадлежащие ДКВ, в композиции с глицином смещаются в более высокочастотную область, с  $3310\text{ см}^{-1}$  до  $3446\text{ см}^{-1}$ . Такой сдвиг может быть объяснен освобождением связанных водородной связью валентных колебаний фенольной гидроксильной группы ( $\text{C}^5\text{OH}\cdots\text{O}=\text{C}^4$ ) в присутствии глицина с кватернизованным атомом азота ( $-\text{NH}_3^+$ ), который является более сильным кислотным центром по сравнению с ОН-группой. Уменьшились волновые числа колебаний  $\nu$  С=О ДКВ (с  $1635\text{ см}^{-1}$  до  $1610\text{ см}^{-1}$ ) и  $\nu$  N–H глицина (с  $3177\text{ см}^{-1}$  до  $3171\text{ см}^{-1}$ ). Колебания  $\nu$  С–О фенольных гидроксидов и вторичного

спиртового гидроксила сместились с  $1252\text{ см}^{-1}$  до  $1269\text{ см}^{-1}$ , с  $1158\text{ см}^{-1}$  до  $1164\text{ см}^{-1}$  и с  $1083\text{ см}^{-1}$  до  $1087\text{ см}^{-1}$ .

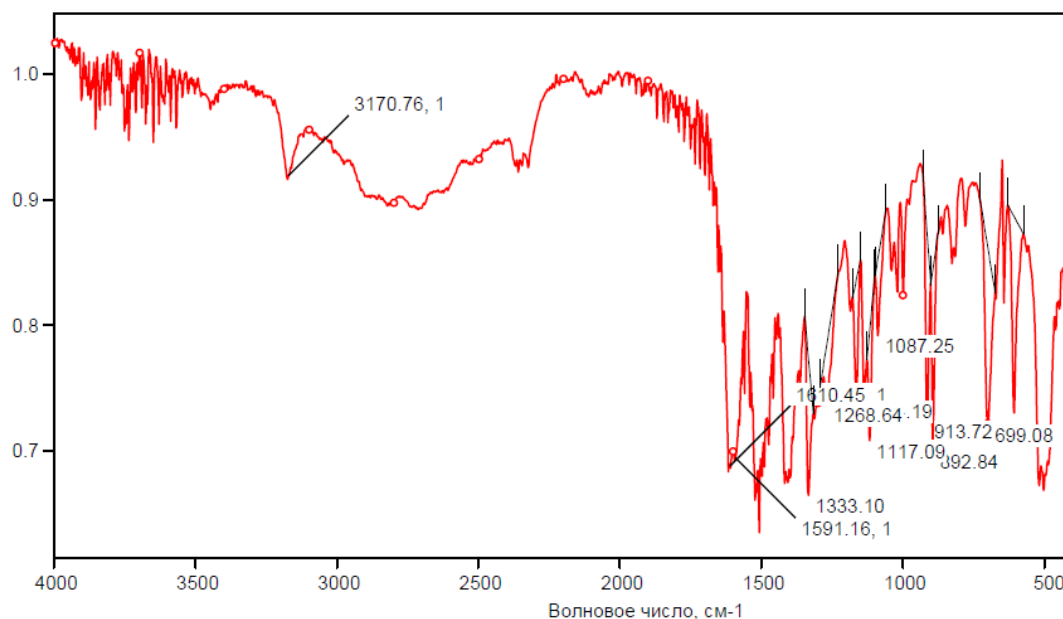


Рисунок 5.10 – ИК-спектр композиции ДКВ-глицин

Расшифрованные колебательные полосы, наблюдаемые в ИК-спектрах лиофилизатов исходных соединений и композиции ДКВ-глицин, собраны в таблице 5.1.

Таблица 5.1 – Колебательные полосы в ИК-спектре ДКВ, глицина и композиции

Тип колебания	Волновое число, $\text{см}^{-1}$		
	ДКВ лиофилизат	глицин лиофилизат	ДКВ-глицин
$\nu$ O–H	3310	-	3446
$\nu$ C=O	1635	-	1610
$\nu$ C–O (фенольный)	1252	-	1269
	1158	-	1164
$\nu$ C–O (втор. спиртовой)	1083	-	1087
$\nu$ N–H	-	3177	3171
$\delta$ NH <sub>2</sub>	-	1591	1591
	-	702	699
$\delta$ NH <sub>2</sub> + $\delta$ CH <sub>2</sub>	-	1333	1333
$\nu$ C–N + $\nu$ C–C	-	1117	1117

Сдвиги колебательных полос, зафиксированные в ИК-спектрах, свидетельствуют о том, что между ДКВ и глицином образовались гетеросинтоны за счет водородных связей карбонильной группы флавоноида (основный центр) с NH-кислотным центром аммонийной группы аминокислоты ( $\text{NH}_3^+ \cdots \text{O}=\text{C}^4$ ).

### 5.6.2. Спектральные данные в ультрафиолетовой и видимой областях

На электронном спектре раствора композиции ДКВ-глицин, снятом в ультрафиолетовой области, присутствует характерная для флавоноида полоса поглощения с  $\lambda_{\max}$  при 288 нм (Рисунок 5.11).

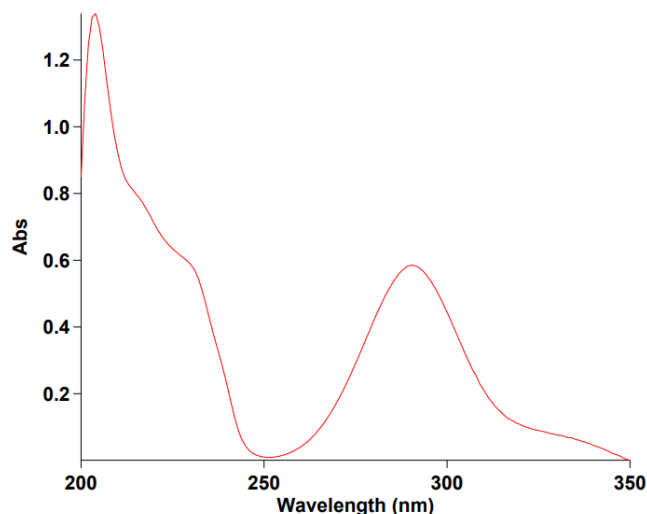


Рисунок 5.11 – Электронный спектр раствора композиции ДКВ-глицин

В результате реакции композиции ДКВ-глицин с нингидрином образуется синий раствор, электронный спектр которого имеет две полосы поглощения с  $\lambda_{\max}$  при 403 нм и 568 нм (Рисунок 5.12). Такие спектральные характеристики присущи продуктам взаимодействия  $\alpha$ -аминокислот, содержащих первичную алифатическую аминогруппу, с нингидрином.

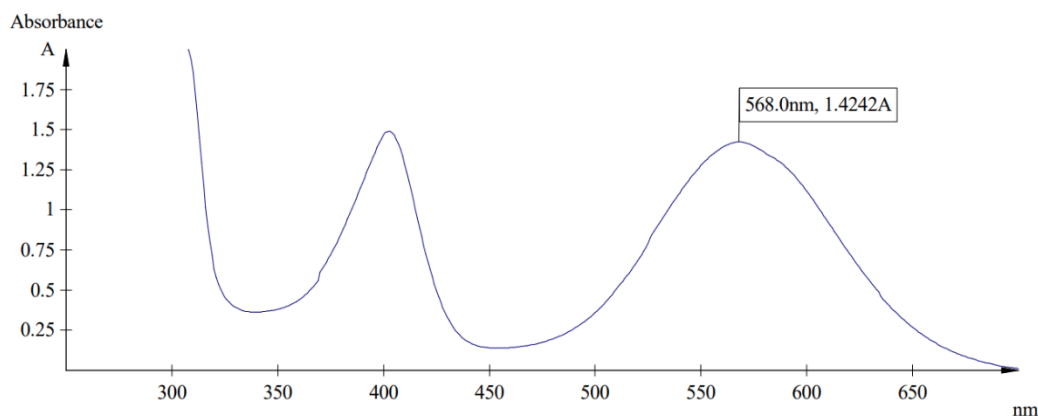


Рисунок 5.12 – Электронный спектр раствора композиции после реакции с нингидрином

Спектральными характеристиками ДКВ и глицина показано отсутствие формирования ковалентных связей между флавоноидом и аминокислотой, так как при растворении композиция

диссоциирует на составляющие ее компоненты, которые по химическим и спектральным свойствам аналогичны чистым исходным веществам.

### 5.6.3. Химические сдвиги на спектре ядерного магнитного резонанса

На  $^1\text{H}$  ЯМР спектре композиции ДКВ-глицин присутствуют сигналы с величинами химических сдвигов (м.д.): 3,47; 4,20; 4,52; 4,92; 5,32; 5,83; 5,91; 6,82; 6,95 (Рисунок 5.13).

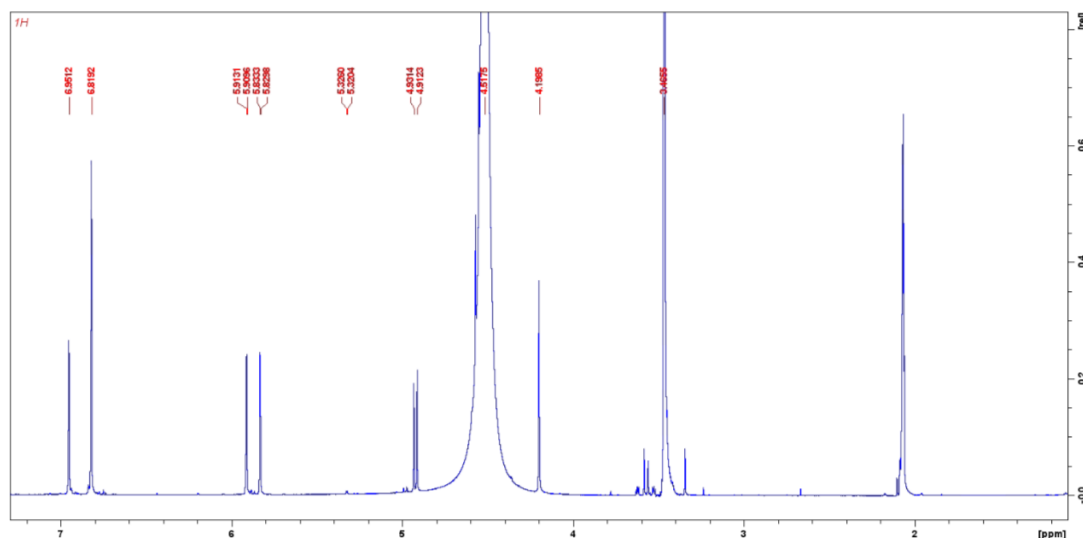


Рисунок 5.13 – 1D  $^1\text{H}$  ЯМР-спектр композиции ДКВ-глицин

Сигналы 4,52 м.д. (Н3, 1Н, s); 4,92 м.д. (Н2, 1Н, d); 5,83 м.д. (Н8, 1Н, d); 5,91 м.д. (Н6, 1Н, d); 6,82 м.д. (Н5', Н6', 2Н, s); 6,95 м.д. (Н2', 1Н, s) были отнесены к *транс*-ДКВ. Сигналы протонов Н2 и Н3 *цис*-изомера флавоноида находятся при 4,20 м.д. (Н3, 1Н, s); 5,32 м.д. (Н2, 1Н, d). Протоны метиленовой группы глицина имеют величину химического сдвига 3,47 м.д.

На  $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$  ЯМР спектре композиции ДКВ-глицин присутствуют следующие сигналы с величинами химических сдвигов (м.д.): 29,5; 41,5; 50,1; 71,8; 83,3; 95,5; 96,5; 100,6; 115,2; 115,7; 120,3; 128,3; 144,5; 145,4; 162,8; 163,2; 166,9; 171,7; 197,0; 213,5 (Рисунок 5.14). В качестве растворителя использовалась смесь дейтерированной воды и ацетона, поэтому на спектре видны сигналы углерода в составе метильной (29,5 м.д.) и карбонильной (213,5 м.д.) групп ацетона. ДКВ принадлежат 15 сигналов углерода ( $\delta$ , м.д.): 71,8 (C3), 83,3 (C2), 95,5 (C8), 96,5 (C6), 100,6 (C4a), 115,2 (C5'), 115,7 (C2'), 120,3 (C6'), 128,3 (C1'), 144,5 (C4'), 145,4 (C3'), 162,8 (C8a), 163,2 (C5), 166,9 (C7), 197,0 (C4). Два сигнала были отнесены к глицину ( $\delta$ , м.д.): 41,5 ( $\underline{\text{C}}\text{H}_2$ ), 171,7 ( $\underline{\text{C}}\text{OOH}$ ).

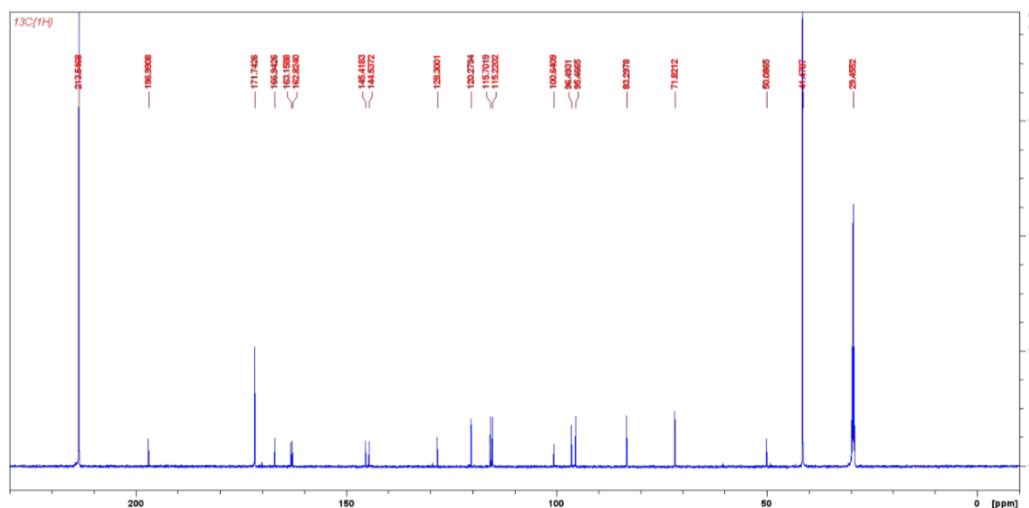


Рисунок 5.14 – 1D  $^{13}\text{C}$  ЯМР-спектр композиции ДКВ-глицин

Так как спектры композиции ДКВ-глицин на ядрах  $^1\text{H}$  и  $^{13}\text{C}$  содержат сигналы с теми же значениями химических сдвигов, что и спектры исходных веществ, то между флавоноидом и аминокислотой ковалентных связей не образовалось.

На спектре 2D  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ -HSQC помимо основных, наблюдаются два дополнительных кросс-пика при  $\delta\text{C}$  71,8 м.д. и 83,3 м.д., имеющие величину химического сдвига  $\delta\text{H}$ , соответствующую протонам в *цис*-конфигурации ДКВ: 4,20 м.д и 5,32 м.д. (Рисунок 5.15).

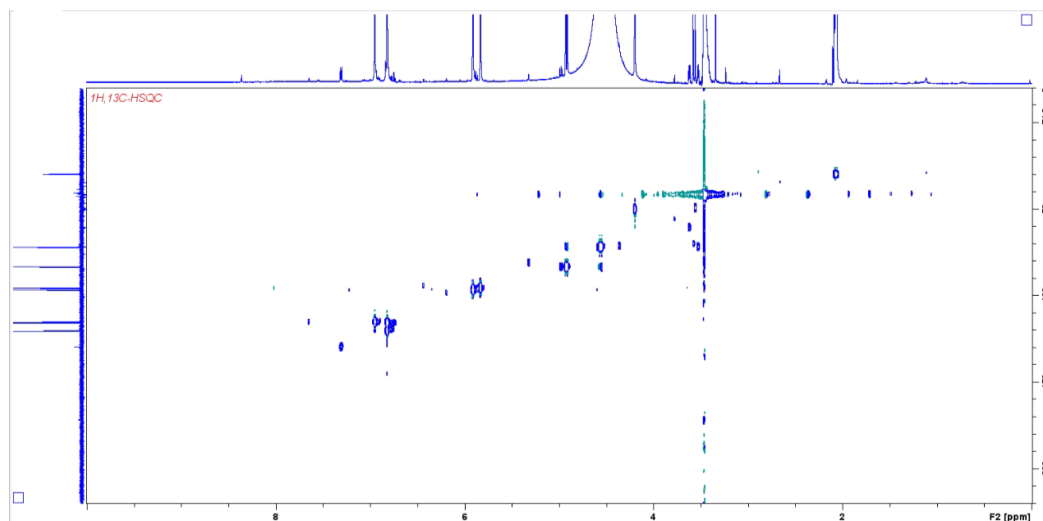


Рисунок 5.15 – 2D  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ -HSQC ЯМР-спектр композиции ДКВ-глицин

Величины химических сдвигов пиков углерода у композиции ДКВ-глицин и исходных соединений идентичны, что указывает на формирование комплекса за счет водородных связей без полной ионизации кислотных и основных центров флавоноида и аминокислоты. Другую ситуацию при анализе композиции ДКВ-L-аргинин наблюдали Коротеев с соавторами. Существенное изменение химического сдвига пика седьмого атома углерода со 166,6 м.д. у ДКВ

до 177,8 м.д. у композиции в спектрах ЯМР  $^{13}\text{C}$  является подтверждением образования комплекса солевого типа [168].

### 5.7. Выводы по главе 5

1. Описаны органолептические свойства композиции. Композиция ДКВ-глицин представляет собой пористый порошок светло-желтого цвета со слабым смолистым запахом.

2. Приведена дифракционная картина композиции ДКВ-глицин, которая отличается значительно меньшей степенью кристалличности по сравнению с физической смесью и лиофилизатами индивидуальных исходных веществ.

3. Описаны морфологические портреты композиции ДКВ-глицин и ее отдельных компонентов, доказывающие получение новой твердой фазы.

4. Исследовано термическое поведение композиции. Температура плавления композиции снизилась на 18-20 °С по сравнению с ДКВ и глицином. Термический профиль продукта также отличается от исходных веществ: исчезает пик фазового перехода ДКВ из аморфного состояния в кристаллическое, что свидетельствует о полном включении ДКВ в композицию.

5. Зафиксированы сдвиги полос поглощения карбонильной группы ДКВ и аминогруппы глицина в композиции ДКВ-глицин относительно исходных компонентов. Наблюдаемые изменения спектральных характеристик позволяют сделать предположение об участии этих функциональных групп в формировании межмолекулярных водородных связей в гетеросинтонах.

6. Не установлено образования ковалентных связей в композиции ДКВ-глицин методом ЯМР  $^{13}\text{C}$  и ЯМР  $^1\text{H}$ .

7. Установлено повышение растворимости флавоноида в композиции в 2 раза по сравнению с фармацевтической субстанцией ДКВ.

8. Апробирован и предложен растворитель (водный раствор гидроксида натрия с концентрацией 2,3 мг/мл) для будущих лекарственных форм для парентерального применения, в том числе «лиофилизата для приготовления раствора для инфузионного введения».

## ГЛАВА 6. РАЗРАБОТКА МЕТОДИК КОНТРОЛЯ КАЧЕСТВА

### 6.1. Количественное определение дигидрокверцетина

Так как в процессе получения композиции ДКВ-глицин происходит увеличение концентрации *цис*-изомера флавоноида, эффективность и безопасность которого практически не изучена, возникает необходимость контролировать диастереомерную чистоту субстанции ДКВ-глицин. Для контроля этого показателя мы предлагаем использовать разработанную методику хроматографического разделения диастереомеров ДКВ со спектрофотометрическим детектированием, которая описана в главе 2 [242].

#### 6.1.1. Валидация методики

При производстве ДКВ (таксифолина) помимо целевого вещества экстрагируются и другие флавоноиды, например, дигидрокемпферол (аромадендрин). Каждая из молекул этих двух флаванолов содержит по два центра хиральности в положениях С-2 и С-3, поэтому они могут существовать в виде  $\sigma$ -диастереомеров (Рисунок 6.1). Такая особенность строения основного вещества и родственной примеси в сочетании с отсутствием информации по биологической активности минорных диастереомеров вызывает необходимость их разделения. Таким образом, оптимальным методом определения ДКВ является высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ), так как данный подход позволяет контролировать качество ФС и ЛФ по показателям «Количественное определение» и «Родственные примеси» в рамках одного анализа.

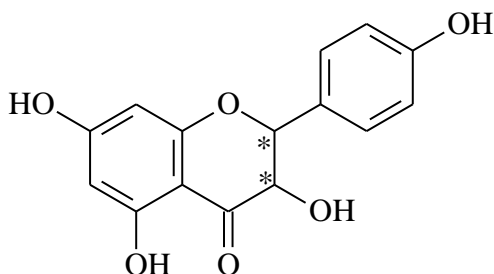


Рисунок 6.1 – Дигидрокемпферол (аромадендрин)

Ранее было установлено, что использование фенильного силикагеля обеспечивает возможность определения диастереомеров ДКВ, поскольку на данном сорбенте происходит их разделение [226].

Валидацию методик количественного определения ДКВ и глицина в лиофилизате ДКВ-глицин проводили в соответствии с ОФС.1.1.0012 Государственной Фармакопеи Российской Федерации ГФ РФ XV и ОФС 2.3.14.0. Фармакопеи Евразийского экономического союза.

### ***Тест специфичности***

Специфичность методики определения основного флаванонола обеспечивается хорошим разрешением пика *цис*-ДКВ и родственной примеси – дигидрокемпферола ( $R_s = 14,8 \pm 0,4$ ). Определению также не мешает глицин, который, в отличие от ДКВ, не обладает хромофорной системой и не поглощает свет выше 250 нм. На хроматограмме растворителя отсутствуют пики в области выхода ДКВ и сопутствующих флавоноидов, среднее колебание базовой линии составляет 0,04 mAU (Рисунок 6.2).

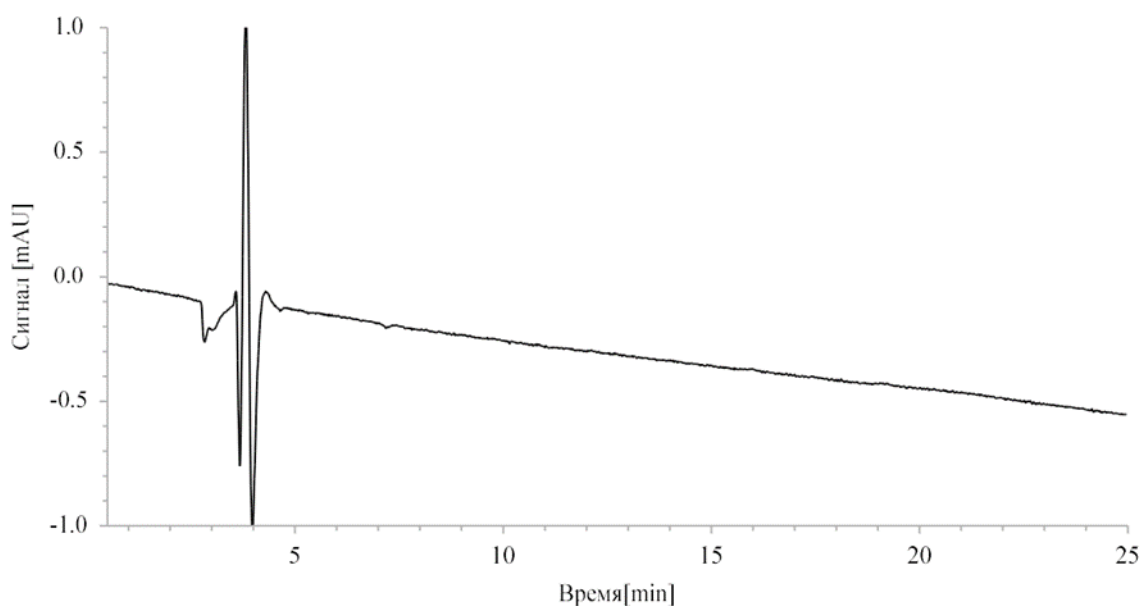


Рисунок 6.2 – Хроматограмма растворителя. Условия см. 2.7.8.

### ***Тест линейности***

Основным критерием приемлемости валидационной характеристики «линейность» является близость к единице коэффициента корреляции  $r$  линейной регрессии [243, 244]. График зависимости площади пика *транс*-ДКВ ( $A$ , mAU·s) от концентрации ДКВ ( $C$ , мкг/мл) приведен на рисунке 6.3. Регрессионное уравнение имеет вид  $A = 121,518C - 47,935$ . Коэффициент корреляции Пирсона линейной регрессионной зависимости  $r$  в диапазоне концентраций 10 – 200 мкг/мл составил 0,9998 и оказался выше критического значения (0,99), приведенного в ОФС.1.1.0012, что удовлетворяет критерию приемлемости.

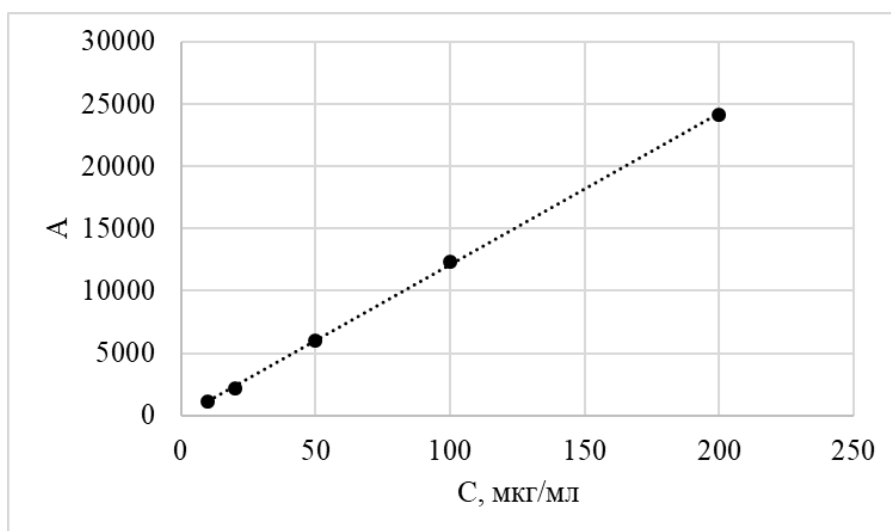


Рисунок 6.3 – График зависимости площади пика *транс*-ДКВ от концентрации

Для проведения дисперсионного анализа сравнивали экспериментальное и критическое значения F-критерия [245]. Экспериментальное значение F-критерия составило 2,93, что меньше, чем критическое значение для вероятности 95% и степеней свободы  $f_1 = 3$  и  $f_2 = 10$  ( $F_{crit} = 3,71$ ), т.е. можно говорить о выполнении критерия приемлемости.

#### **Тест прецизионности**

Эту валидационную характеристику определяли по ГСО-ДКВ-АМЕТИС (№ 10766-2016). Стандартное отклонение, относительное стандартное отклонение и доверительный интервал по выборке значений площади пика *транс*-ДКВ ( $A_{i,j}$ ) при трех концентрациях ДКВ ( $C$ ) приведены в таблице 6.1.

Таблица 6.1 – Параметры прецизионности для ДКВ

C, мкг/мл	$A_{i,j}$ , день 1	$A_{i,j}$ , день 2	$A_{i,j}$ , день 3	$\bar{A}_i$	SD	RSD, %	CI
10	1128	1141	1190	1153	33	2,8	37,0
50	6328	5917	5913	6053	238	3,9	269,7
200	24125	23824	24424	24124	300	1,2	339,5

Критерием приемлемости значений RSD служит  $RSD \leq 2,0\%$  [246]. Полученные коэффициенты HorRat представлены в таблице 6.2.

Таблица 6.2 – Коэффициенты HorRat для ДКВ

w	$\bar{A}_i$	SD	RSD, %	PRSD, %	HorRat
0,00001	1153	33	2,8	11,3	0,25
0,00005	6053	238	3,9	8,9	0,44
0,0002	24124	300	1,2	7,2	0,17

Для оценки приемлемости методик по показателю «внутрилабораторная прецизионность» рекомендуют использовать предельное значение коэффициента HorRat  $\leq 1,3$  [247].

### Тест правильности

Апробировали методику количественного определения ДКВ на лиофилизате ДКВ-глицин. Образец растворяли в воде при помощи обработки ультразвуком и нагревания до 30 °С. Хроматографировали и измеряли концентрацию *транс*-ДКВ.

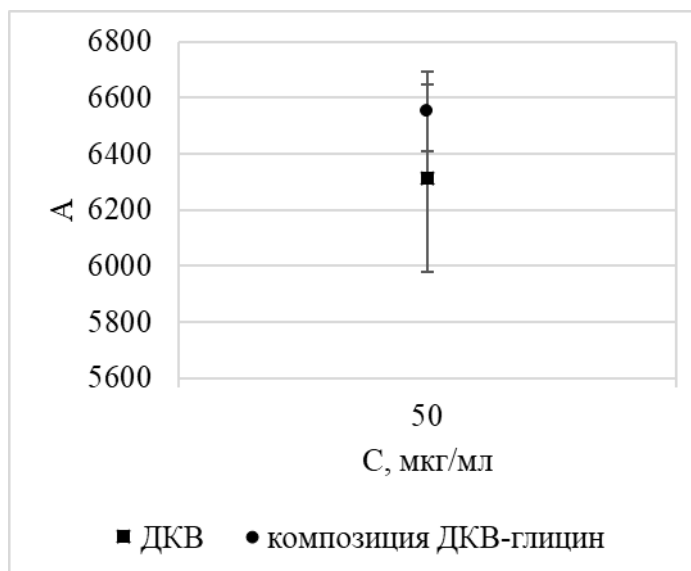


Рисунок 6.4 – Тест правильности для ДКВ

Доверительные интервалы значений, полученных при анализе ДКВ и композиции ДКВ-глицин, пересекаются, что говорит о пригодности методики анализа по критерию «правильность» (Рисунок 6.4).

### 6.1.2. Установление норматива качества

Установление норматива качества по показателям «диастереомерная чистота» и «количественное определение» проводили по результатам анализа трех лабораторных серий субстанции ДКВ-глицин, полученных в 2024 году: 13.01, 09.04 и 16.09 (Таблица 6.3).

Таблица 6.3 – Результаты анализа лабораторных серий композиции ДКВ-глицин

Дата изготовления серии	Суммарное содержание ДКВ, % от навески	Доля диастереомеров от общего содержания ДКВ, %	
		<i>транс</i> -изомер	<i>цис</i> -изомер
13.01.2024	17,51±0,08	97,32	2,68
09.04.2024	16,30±0,06	97,30	2,70
16.09.2024	18,04±0,07	97,01	2,99

Доля *цис*-ДКВ в композиции составляет  $2,79 \pm 0,17\%$  от суммы площадей пиков *транс*- и *цис*-диастереомеров ДКВ.

## 6.2. Количественное определение глицина

Количественное определение аминокислот в смесях с самими собой или с другими веществами представляет непростую задачу для фармацевтической химии, так как большинство представителей этого класса соединений не обладают хромофорной цепочкой, достаточной для спектрального анализа в ультрафиолетовой и видимой областях. Общий принцип анализа аминокислот заключается в измерении аналитического сигнала предварительно полученных дериватов, спектр которых имеет полосы поглощения или флуоресценции.

### 6.2.1. Способы дериватизации

Используемые для дериватизации аминокислот реагенты и спектральные характеристики дериватов представлены в таблице 6.4.

Таблица 6.4 – Реагенты, применяемые для дериватизации аминокислот

Реагент	Длина волны поглощения, нм	Длина волны испускания, нм
Нингидрин	440 нм, 570 нм	-
<i>о</i> -Фталевый альдегид	348 нм	450
Фенилизотиоцианат	254 нм	-
6-Аминохинолил- <i>N</i> -гидроксисукцинимидил-карбамат	250 нм	395
(Диметиламино)азобензолсульфонилхлорид	436 нм	-
9-Флуоренилметилхлорформиат	260 нм	313
7-Фторо-4-нитробензо-2-окса-1,3-диазол	480 нм	530

В данной работе использовали реакцию с нингидрином, так как спектр продукта взаимодействия – пурпура Руэманна – имеет полосу поглощения при 570 нм, которая наиболее удалена от полос поглощения ДКВ при 288 и 315 нм (Рисунок 6.5) [242].

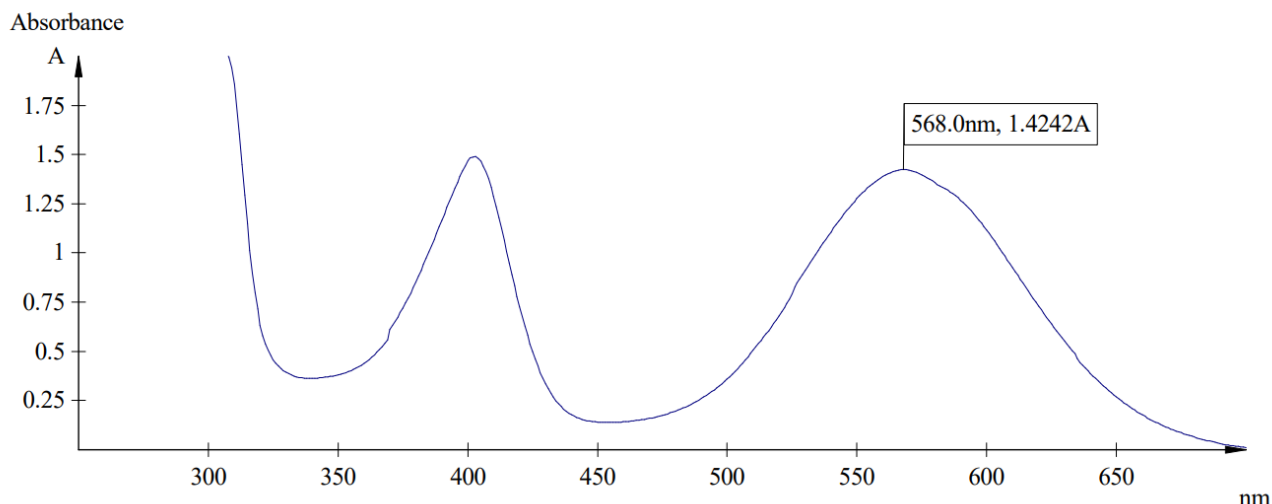


Рисунок 6.5 – Спектр пурпура Руэмманна в видимой области.  
Растворитель: ДМСО, буферный раствор 7,5:2,5 (об/об)

Механизм реакции взаимодействия  $\alpha$ -аминокислот с нингидрином (2,2-дигидроксииндан-1,3-дионом) обсуждался в научной литературе начиная с момента его первого синтеза Зигфридом Руэмманном (Siegfried Ruhemann) в 1910 году [248] вплоть до 1959 года, когда был опубликован обзор под названием «The chemistry of ninhydrin» [249]. В работе приведены шесть теорий механизма, обобщением которых стало следующее представление о протекающих в ходе реакции процессах (Рисунок 6.6). Нуклеофильное замещение гидроксильной группы нингидрина (I) приводит к образованию *N*-замещенной аминокислоты с 2-гидроксииндан-1,3-дионильной группой (II), которая подвергается декарбоксилированию и дегидратации до цвиттер-иона (III). После переноса протона он (III) претерпевает гидролиз по азометиновой группе до 2-амино-3-гидроксиинден-1-она (V), для которого возможны два пути сочетания с нингидрином: до гидролиза (*a*) или после него (*b*). Первый путь (*a*) объясняет появление фиолетового окрашивания реакционной смеси, так как конечным продуктом сочетания является анион *N*-(3-гидрокси-1-оксоинденил)иминоиндан-1,3-диола (VIII), получивший название пурпур Руэмманна благодаря характерному цвету. Наличие равновесия между пурпуром Руэмманна (VIII) и гидриндантинем (2,2'-дигидрокси-2,2'-бииндан-1,1',3,3'-тетраон, X), образующимся по второму пути (*b*), нарушает линейную зависимость между количеством аминокислоты и оптической плотностью продукта реакции, поэтому многие нингидриновые реагенты содержат либо гидриндантин, либо восстановители для его формирования *in situ*. В настоящей работе был опробован хлорид олова(II), однако при его использовании линейность методики была неудовлетворительной, поэтому восстановитель заменили на гидриндантин.

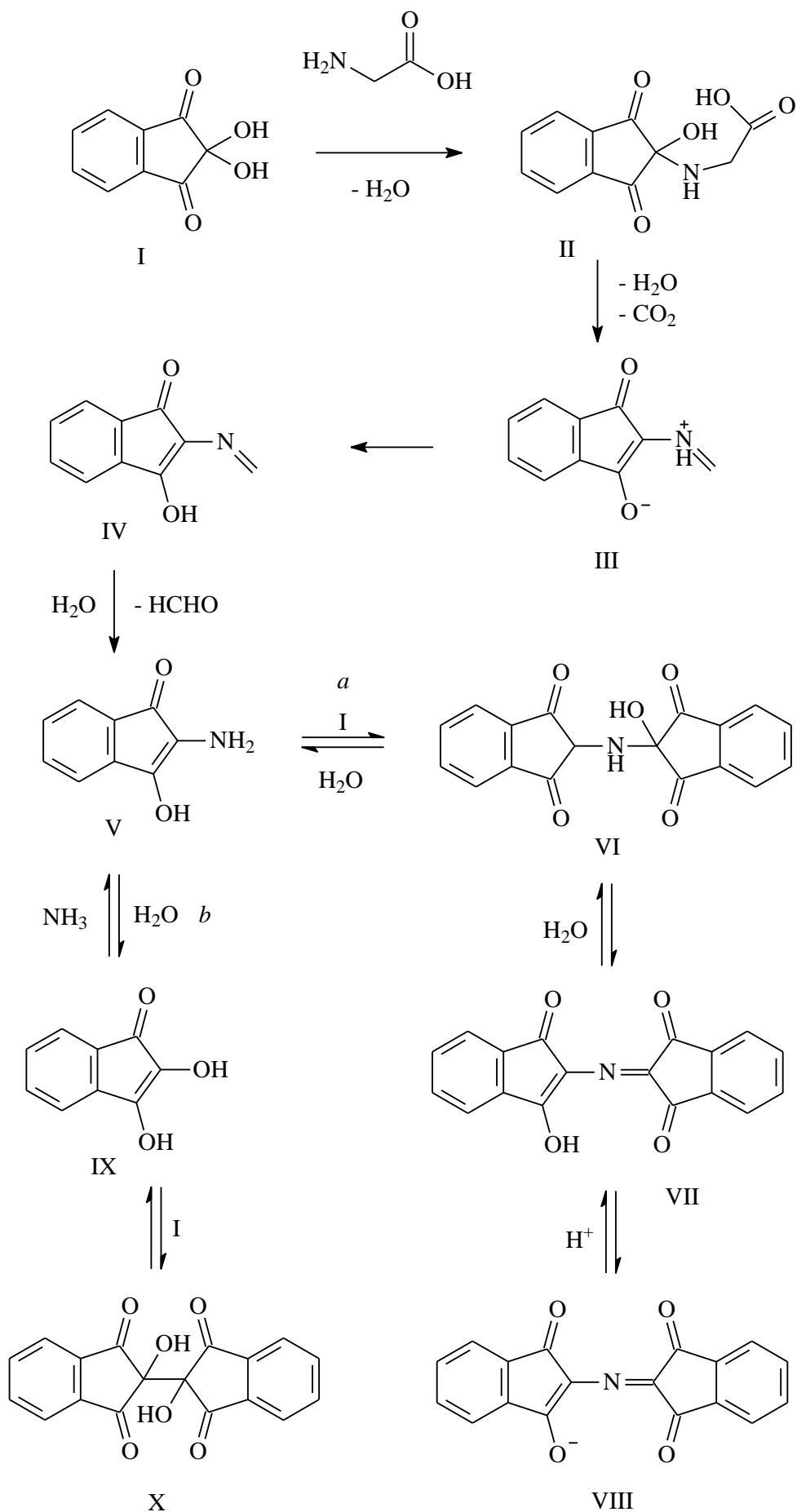


Рисунок 6.6 – Механизм реакции взаимодействия глицина с нингидрином

В 1949 году Уильям Фитцпатрик (William H. Fitzpatrick) предложил использовать нингидриновую реакцию для количественного определения аминокислот методом спектрофотометрии при длине волны максимума поглощения пурпура Руэманна [250]. Вода как растворитель не подходит для проведения реакции, так как нингидрин и гидриндантин плохо в ней растворяются. Долгое время в качестве растворителя использовали монометиловый эфир этиленгликоля (метилцеллозольв), но склонность к образованию пероксидов и токсичность привели к вытеснению его более стабильным и безопасным ДМСО [251]. Эксперименты по установлению влияния кислотности на течение реакции показали, что наилучший выход пурпура Руэманна при взаимодействии глицина с нингидрином в среде воды и ДМСО наблюдается при значении рН 5,0 [251]. В выборе соли для приготовления буферного раствора остановились на ацетате калия, так как он является доступным реактивом и среди ацетатов наиболее легко растворяется в воде [252]. На основании кинетики реакции образования пурпура Руэманна в качестве оптимальных были выбраны следующие условия дериватизации: нагревание при 100 °С в течение 30 минут [252].

Для анализа стабильности при стоянии пурпура Руэманна готовили 2 пробы испытуемого раствора глицина. Нагревали при 100 °С в течение 15 минут. Одну колбу оставили при температуре 4-8 °С, вторую – при комнатной температуре 20 °С. Измеряли оптическую плотность растворов каждые 10 минут в течение 50 минут при длине волны 570 нм. По результатам измерений оптической плотности продукта были построены графики кинетики стабильности при пониженной и при комнатной температуре (Рисунок 6.7).

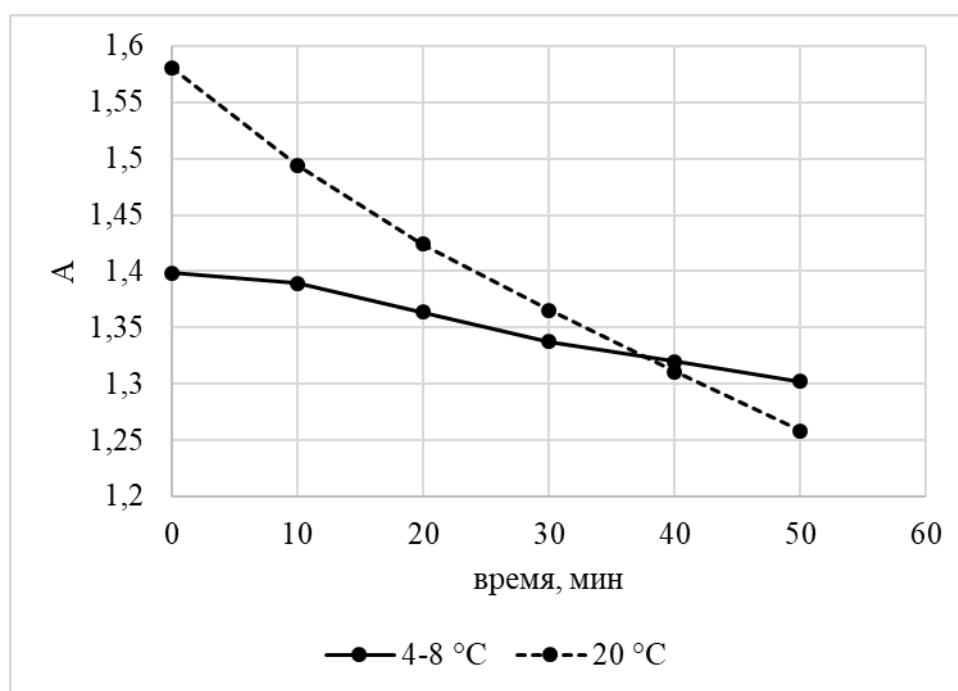


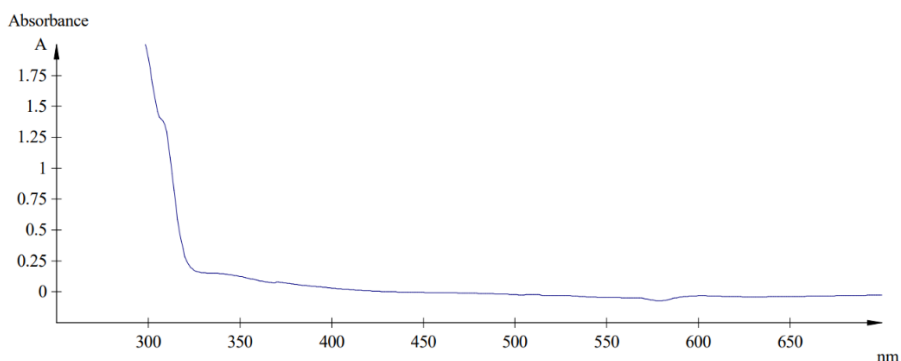
Рисунок 6.7 – Кинетика стабильности пурпура Руэманна

Визуально видно, что пурпур Руэманна более стабилен при пониженной температуре, так как он медленнее деградировал и его оптическая плотность при 570 нм снижалась значительно медленнее, чем у образца, охлаждаемого при комнатной температуре. Таким образом, для повышения точности результатов целесообразнее охлаждать растворы после нагревания при температуре 4-8 °С.

## 6.2.2. Валидация методики

### *Тест специфичности*

Методика количественного определения глицина в композиции ДКВ-глицин может считаться пригодной, если присутствие флавоноида не мешает определению аминокислоты. Валидацию методики по показателю специфичность проводили путём установления взаимодействия ДКВ с нингидрином. На спектрах нингидрина и продукта реакции ДКВ с нингидрином отсутствует поглощение в районе 570 нм (Рисунок 6.8), поэтому методика пригодна для количественного определения глицина в присутствии ДКВ.



А



Б

Рисунок 6.8 – Спектр нингидрина (А) и продукта реакции ДКВ с нингидрином (Б) в видимой области. Растворитель: ДМСО, буферный раствор 7,5:2,5 (об/об)

### Тест линейности

График зависимости оптической плотности раствора пурпура Руэманна ( $A$ , AU) от концентрации глицина ( $C$ , мг/мл) приведен на рисунке 6.9. Регрессионное уравнение имеет вид  $A = 5,1237C - 0,5553$ . Коэффициент корреляции Пирсона линейной регрессионной зависимости  $r$  в диапазоне концентраций 100 – 500 мкг/мл составил 0,9968, что выше критического значения (0,99), приведенного в ОФС.1.1.0012, поэтому удовлетворяет критерию приемлемости.

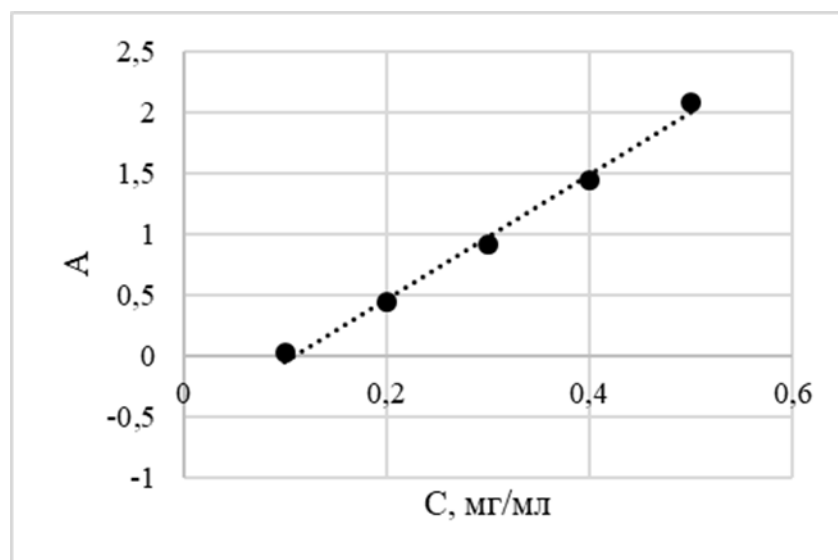


Рисунок 6.9 – График зависимости оптической плотности раствора пурпура Руэманна от концентрации глицина

Экспериментальное значение F-критерия составило 2,92, что меньше, чем критическое значение для вероятности 95% и степеней свободы  $f_1 = 3$  и  $f_2 = 10$  ( $F_{crit} = 3,71$ ).

### Тест прецизионности

Стандартное отклонение, относительное стандартное отклонение и доверительный интервал по выборке значений оптической плотности ( $A_{i,j}$ ) при трех концентрациях глицина ( $C$ ), соответствующих его 80%, 100% и 120% анализируемой концентрации, приведены в таблице 6.5.

Таблица 6.5 – Параметры прецизионности для глицина

C, мг/мл	$A_{i,j}$ , день 1	$A_{i,j}$ , день 2	$A_{i,j}$ , день 3	$\bar{A}_i$	SD	RSD, %	CI
0,192	0,6315	0,6080	0,5926	0,6107	0,0196	3,2	0,022
0,240	0,7523	0,7788	0,7764	0,7692	0,0147	1,9	0,017
0,298	0,8652	0,8564	0,8793	0,8670	0,0116	1,3	0,013

Критерием приемлемости значений RSD служит  $RSD \leq 2,0\%$  [246]. Полученные коэффициенты HorRat представлены в таблице 6.6.

Таблица 6.6 – Коэффициенты HorRat для глицина

w	$\bar{A}_i$	SD	RSD, %	PRSD, %	HorRat
0,8	0,6107	0,0196	3,2	2,1	1,6
1,0	0,7692	0,0147	1,9	2,0	1,0
1,2	0,8670	0,0116	1,3	1,9	0,7

В качестве приемлемых значений коэффициента HorRat рассматривают интервал от 0,5 до 2,0 [253].

### **Тест правильности**

Апробировали методику количественного определения глицина на лиофилизате ДКВ-глицин. Образец растворяли в воде и проводили реакцию дериватизации. Измеряли оптическую плотность раствора. Критерием приемлемости валидационной характеристики «правильность» является нахождение значений, принимаемых за истинные, внутри доверительных интервалов соответствующих средних результатов анализов, полученных экспериментально по данной методике. Обнаружено, что наличие ДКВ в реакционной смеси замедляет реакцию глицина с нингидрином, предположительно, из-за смещения уровня pH в кислую сторону. Это приводит к статистически значимой разнице между значениями, полученными при анализе глицина и лиофилизата (Рисунок 6.10А). Растворение глицина и лиофилизата в буферном растворе привело к получению значений, доверительные интервалы которых пересекаются, то есть выполняется критерий приемлемости валидационной характеристики «правильность» (Рисунок 6.10Б).

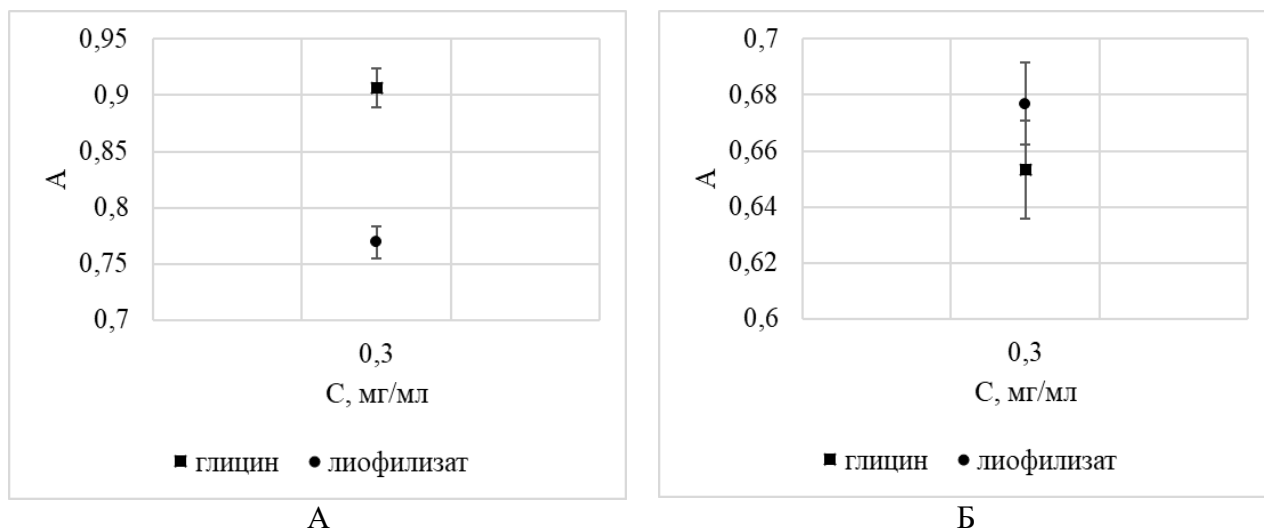


Рисунок 6.10 – Тест правильности методики при растворении лиофилизата в воде (А) и при растворении лиофилизата в буферном растворе (Б)

На основании результатов теста «правильность» в качестве растворителя лиофилизата был выбран буферный раствор.

### 6.2.3. Установление норматива качества

Содержание глицина в образцах композиции ДКВ-глицин различных серий находилось в интервале от 81,6% до 83,0%, поэтому данный интервал приняли как критерий качества субстанции по показателю «количественное определение глицина» (Таблица 6.7).

Таблица 6.7 – Результаты анализа лабораторных серий композиции ДКВ-глицин

Дата изготовления серии	Содержание глицина, %
13.01.2024	83,0 ± 1,2
09.04.2024	84,1 ± 1,3
16.09.2024	81,6 ± 1,2

### 6.3. Тяжелые металлы и мышьяк

Содержание мышьяка, кадмия, никеля, свинца в композиции ДКВ-глицин определяли методом атомно-эмиссионной спектрометрии (АЭС) с индуктивно-связанной плазмой, а ртуть – с помощью атомно-абсорбционной спектрометрии (ААС) методом холодного пара (Таблица 6.8) [254].

Таблица 6.8 – Содержание тяжелых металлов и мышьяка в композиции

Элемент	Образец	Параллель, мг/кг	Средние значение, мг/кг	Погрешность, мг/кг
Pb	ДКВ-Г/1	0,6962	0,7039	0,0198
	ДКВ-Г/2	0,7116		
As	ДКВ-Г/1	Менее 0,025	-	-
	ДКВ-Г/2	Менее 0,025		
Cd	ДКВ-Г/1	Менее 0,002	-	-
	ДКВ-Г/2	Менее 0,002		
Ni	ДКВ-Г/1	0,6379	0,6812	0,1022
	ДКВ-Г/2	0,7244		
Hg	ДКВ-Г/1	0,0287	0,0264	0,0026
	ДКВ-Г/2	0,0241		

Нормативы по содержанию тяжелых металлов и мышьяка взяты из ОФС.1.5.3.0009 «Определение содержания тяжёлых металлов и мышьяка в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах» (Таблица 6.9.).

Таблица 6.9 – Полученное и допустимое содержание тяжелых металлов и мышьяка

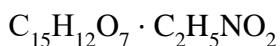
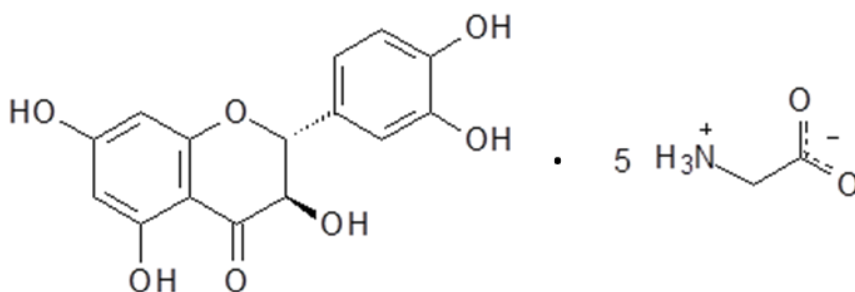
Элемент	Полученное значение, мг/кг	Предельно-допустимое содержание, мг/кг
Pb	0,7039±0,0198	6,0
As	Менее 0,025	0,5
Cd	Менее 0,002	1,0
Hg	0,0264±0,0026	0,1

#### 6.4. Проект спецификации на субстанцию дигидрокверцетин-глицин

Проект спецификации составлен в соответствии с Порядком разработки общих фармакопейных статей и фармакопейных статей и включения их в государственную фармакопею (утвержден приказом Минздрава РФ от 13 сентября 2024 г. № 468н) и Руководством по разработке частных фармакопейных статей фармакопеи Евразийского экономического союза (утверждено председателем Фармакопейного комитета Евразийского экономического союза А. У. Тулегеновой 25 мая 2021 г.). Показатели и нормы качества приведены в таблице 6.10.

Дигидрокверцетин-глицин

*Dihydroquercetinum-glycinum*



$M_r$  379,33

#### ОПРЕДЕЛЕНИЕ

(2*R*,3*R*)-3,5,7-Тригидрокси-2-(3,4-дигидроксифенил)-2,3-дигидро-4*H*-1-бензопиран-4-он  
2-азаниумилацетат

*Содержание:*

- *дигидрокверцетин* ( $C_{15}H_{12}O_7$ ;  $M_r$  304,26): от 15,5% до 18,5%;
- *глицин* ( $C_2H_5NO_2$ ;  $M_r$  75,07): от 81,5% до 84,5%.

Таблица 6.10 – Показатели и нормы качества субстанции ДКВ-глицин

Показатели	Методы	Нормы
<b>СВОЙСТВА</b>		
<b>Описание</b>	ОФС.1.1.0001 «Общие положения»	Мелкокристаллический порошок светло-желтого цвета со слабым смолистым запахом
<b>Растворимость</b>	ОФС.1.2.1.0005 «Растворимость»	Мало растворим в воде при комнатной температуре

Продолжение Таблицы 6.10

ИДЕНТИФИКАЦИЯ		
1. ИК-спектрометрия	ИК-спектрометрия	Должен содержать полосы поглощения при 3446 см <sup>-1</sup> , 1610 см <sup>-1</sup> (дигидрокверцетин) и 3171 см <sup>-1</sup> (глицин)
2. Качественная реакция на дигидрокверцетин	Растворяют 0,02 г субстанции в 1 мл спирта 50 %, к полученному раствору прибавляют 0,5 мл кислоты хлороводородной концентрированной и 0,05 г цинка гранулированного (цианидиновая проба)	Должно появиться малиновое окрашивание
3. Качественная реакция на глицин	Растворяют при нагревании 0,02 г субстанции в 1 мл спирта 50 %, прибавляют 1 мл свежеприготовленного нингидрина раствора 0,1 % и нагревают	Должно появиться сине-фиолетовое окрашивание
ИСПЫТАНИЯ		
Потеря в массе при высушивании	ОФС.1.2.1.0010 Потеря в массе при высушивании	Не более 8%
Тяжелые металлы и мышьяк	ОФС.1.2.1.1.0005 «Атомно-абсорбционная спектрометрия», ОФС.1.2.1.1.0004 «Атомно-эмиссионная спектрометрия», ОФС.1.5.3.0009 «Определение содержания тяжёлых металлов и мышьяка в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах»	Свинец: не более 6,0 мг/кг  Кадмий: не более 1,0 мг/кг  Ртуть: не более 0,1 мг/кг  Мышьяк: не более 0,5 мг/кг
КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ		
транс-дигидрокверцетин	ВЭЖХ-СФМ	от 15,05% до 17,95%
цис-дигидрокверцетин	ВЭЖХ-СФМ	от 0,45% до 0,55%
глицин	СФМ после дериватизации нингидрином	от 81,5% до 84,5%
ХРАНЕНИЕ	В плотно закупоренной стеклянной таре в сухом, защищенном от света месте	
Срок годности	2 года	

### 6.5. Выводы по главе 6

1. Разработана методика количественного определения ДКВ в субстанции ДКВ-глицин методом ВЭЖХ-УФ, которая валидирована по показателям: специфичность, линейность, прецизионность, правильность.
2. Разработана методика количественного определения глицина методом спектрофотометрии в видимой области после дериватизации нингидрином, которая валидирована по показателям: специфичность, линейность, прецизионность, правильность.
3. Определено содержание мышьяка и тяжелых металлов (никель, свинец, кадмий) методом атомно-эмиссионной спектрометрии и ртути методом атомно-абсорбционной спектрометрии в субстанции ДКВ-глицин, которое согласно ОФС.1.5.3.0009 не превышает нормативные показатели.
4. Установлены нормативы качества субстанции ДКВ-глицин и подготовлен проект спецификации.

## ГЛАВА 7. НЕЙРОПРОТЕКТОРНАЯ АКТИВНОСТЬ И ЦИТОТОКСИЧНОСТЬ

### 7.1. Скрининг мишеней нейропротекторного действия

В соответствии с приказом Министерства промышленности и торговли и Министерства здравоохранения Российской Федерации от 19 мая 2016 г. N 1605/308Н "Об утверждении перечня биомишеней для разработки схожих по фармакотерапевтическому действию и улучшенных аналогов инновационных лекарственных препаратов" разработку лекарственных средств для лечения болезни Альцгеймера можно считать приоритетным направлением развития фармацевтической науки.

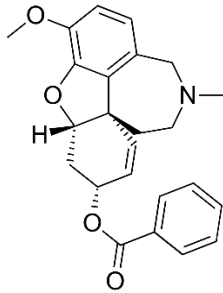
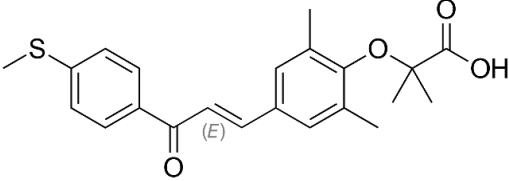
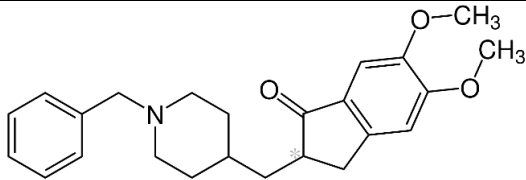
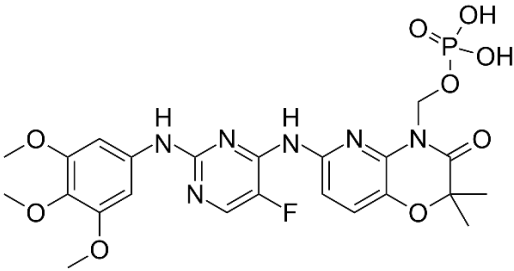
Потенциальную способность ДКВ связываться с белками, принимающими участие в механизме развития нейродегенеративных заболеваний, оценивали с помощью программы PASS (Prediction of Activity Spectra for Substances), разработанной и поддерживаемой лабораторией структурно-функционального конструирования лекарств Института биомедицинской химии РАН под руководством д.б.н., профессора, члена-корреспондента РАН Владимира Поройкова [255]. В основе функционирования программы лежит сравнение структуры исследуемого вещества с соединениями из двух выборок: активных и неактивных. Обучающий набор активных веществ сформирован из фармацевтических субстанций, одобренных для медицинского применения государственными органами регулирования различных стран. В выборку неактивных веществ были случайным образом отобраны химические соединения из базы данных PubChem. Программа PASS вычисляет вероятность "быть активным" ( $P_a$ ) и вероятность "быть неактивным" ( $P_i$ ).  $P_a$  определяет сходство с молекулами, которые являются наиболее типичными в подмножестве активных веществ.  $P_i$  определяет сходство с молекулами, которые являются наиболее типичными в подмножестве неактивных веществ. Точность прогнозирования биологической активности является достаточно удовлетворительной, когда количество соединений в обучающем наборе по этому виду активности превышает 5. Соединение может рассматриваться как потенциально активное при условии  $P_a > P_i$ . При уменьшении  $P_a$  снижается шанс наличия активности, но повышается новизна структуры (Таблица 7.1).

Таблица 7.1 – Интерпретация уровня  $P_a$

Интервал $P_a$	Шанс наличия активности	Новизна структуры
0-0,3	низкий	высокая
0,3-0,7	средний	средняя
0,7-1,0	высокий	низкая

Рассчитанные значения  $P_a$  и  $P_i$  для (2*R*,3*R*)-ДКВ в отношении некоторых механизмов нейропротекторной активности приведены в таблице 7.2. По результатам исследований *in vitro* и *in vivo* одним из основных механизмов нейропротекторной активности ДКВ считают ингибирование олигомеризации  $\beta$ -амилоида [115].

Таблица 7.2 – Возможные мишени нейропротекторного действия ДКВ

Активность	$P_a$	$P_i$	Количество соединений в обучающем наборе	Примеры зарегистрированных фармацевтических субстанций
ингибитор агрегации $\beta$ -амилоида	0,219	0,013	39	 бензгалантамин
антагонист $\beta$ -амилоида	0,182	0,012	122	н/д
агонист рецептора пролиферации пероксисом $\gamma$	0,078	0,032	935	 элафибранор
ингибитор/стимулятор киназы	0,669	0,008	7	 донепезил
ингибитор фосфоинозитид фосфатазы	0,254	0,122	11	 фостаматиниб
энхансер нейротрофического фактора	0,314	0,012	74	н/д

Другими наиболее вероятными механизмами нейропротекторной активности ДКВ являются стимулирование рецептора пролиферации пероксисом  $\gamma$  и ингибирование фосфоинозитид фосфатазы. Несмотря на высокий уровень  $P_a$ , малое количество в обучающем наборе соединений, активных по отношению к MAP киназе, не позволяет сделать вывод о влиянии ДКВ на этот каскад.

Группа ученых из Кореи (Национальный Университет Кёнсандо) и Пакистана (Марданский Университет Абдула Вали Хана) выявили способность глицина связываться с *N*-концевой киназой *c-Jun* (Рисунок 7.1) и за счет этого устранять у мышей окислительный стресс, нейроапоптоз, нейровоспаление, синаптическую дисфункцию и ухудшение памяти, вызванные *D*-галактозой [164].

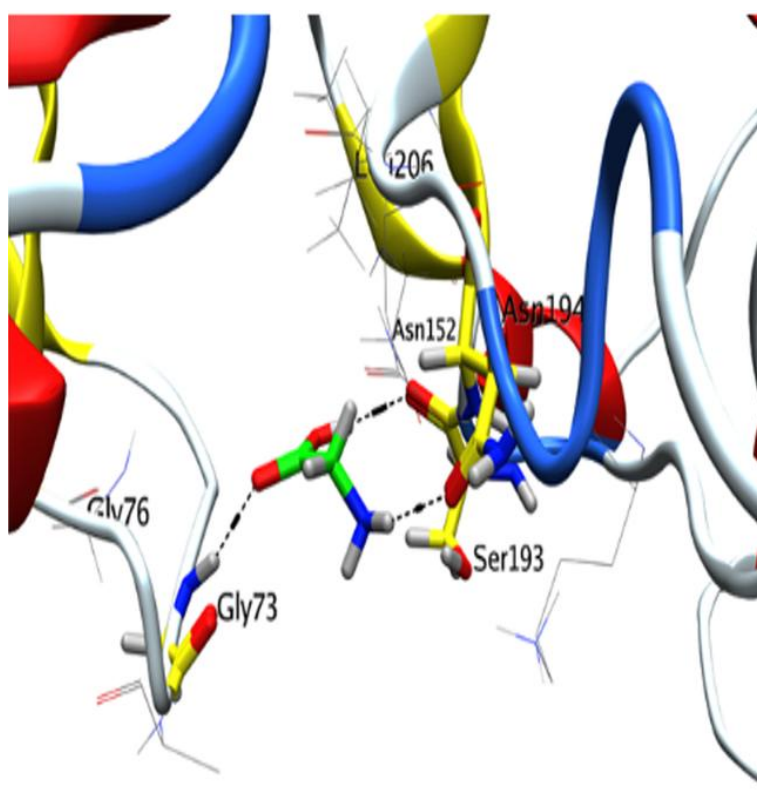


Рисунок 7.1 – 3D модель связывания глицина с остатками Gly73, Ser193 и Asn194 в активном центре *N*-концевой киназы *c-Jun* (PDB ID 3v6s цепь A) [164]

Учитывая способность ДКВ и глицина воздействовать на звенья биохимических механизмов нейродегенеративных заболеваний, от их композиции можно ожидать мультитаргетное фармакологическое действие.

## 7.2. Цитотоксичность\*

Потенциальную безопасность разрабатываемой фармацевтической субстанции ДКВ-глицин оценивали по результатам сравнения ее цитотоксичности с исходными компонентами на культурах клеток карциномы кишечника человека (Caco-2), эмбриональных почек человека эпителия пупочной вены человека (HUVEC) и фибробластов мыши (3T3) [256].

Цитотоксичность исследуемых образцов и их восстанавливающую способность по отношению к ССК-8 в холостом опыте оценивали в диапазоне концентраций от 2,50 мг/мл до 0,02 мг/мл. Результаты изучения восстанавливающих свойств образцов дигидрокверцетина представлены на рисунке 7.2. Приведены данные концентраций с 0,02 мг/мл до 1,25 мг/мл включительно, поскольку при более высоком содержании анализируемого образца оптическая плотность выходила за пределы рабочего диапазона используемого прибора.

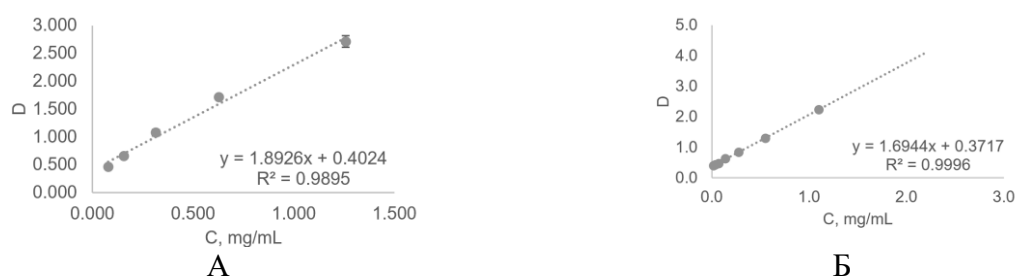


Рисунок 7.2 – Зависимость оптической плотности раствора ССК-8 при добавлении различных концентрация испытуемых образцов: А – ДКВ, Б – лиофилизат ДКВ

Для всех объектов исследования отмечено наличие линейной зависимости между оптической плотностью испытуемого образца и количеством добавленного объекта исследования. Коэффициенты регрессии для ДКВ и его лиофилизата составили 0,9895 и 0,9996, соответственно, что позволяет судить о применимости данной модели линейной регрессии для предсказания вклада восстанавливающей способности анализируемого объекта в наблюдаемое значение оптической плотности в обозначенном диапазоне концентраций.

Полученные результаты свидетельствуют о выраженной восстанавливающей способности ДКВ и, как следствие, необходимости учета его восстановительных свойств при расчете выживаемости клеток [257]. В то же время, в ходе дисперсионного двухфакторного анализа установлена статистически значимая разница между всеми приведенными объектами исследования ( $p \ll 0,01$ ), что не позволяет экстраполировать результаты оценки восстанавливающей способности между анализируемыми образцами.

\* Выполнена совместно с Гуандунским Фармацевтическим Университетом (Китайская Народная Республика)

Результаты оценки цитотоксичности испытуемых образцов дигидрокверцетина представлены на рисунке 7.3. Приведены данные концентраций с 0,02 мг/мл до 0,31 мг/мл включительно, поскольку при более высоком содержании анализируемого образца выживаемость клеток составляла 0%. Для всех образцов отмечена выраженная обратная линейная зависимость между натуральным логарифмом выживаемости клеток и концентрацией внесенного образца. Приведенные значения коэффициентов регрессии можно считать приемлемыми для экспериментов на биологических моделях.

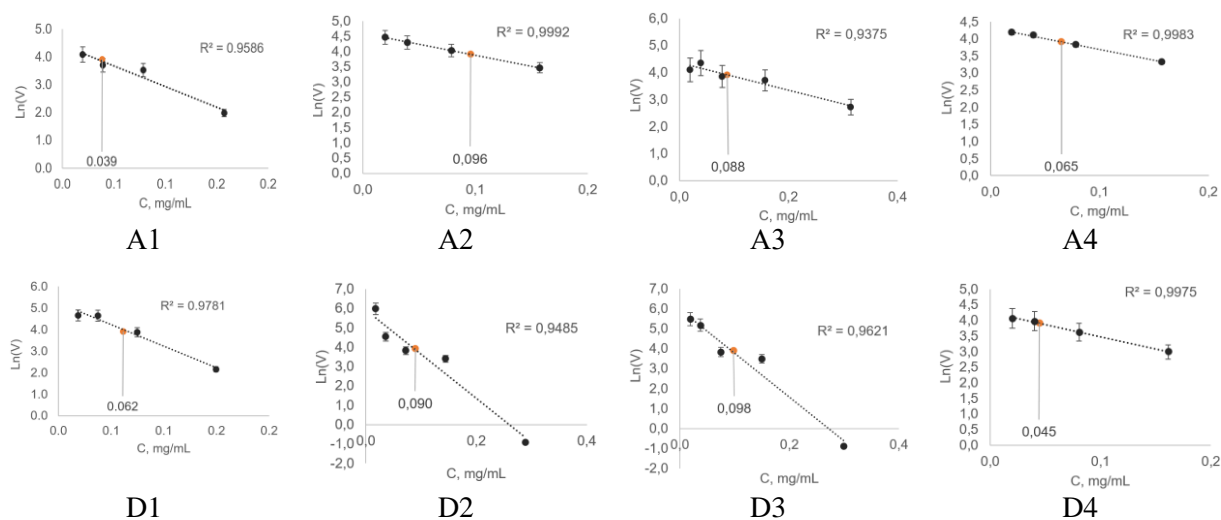


Рисунок 7.3 – Зависимость выживаемости клеток различных клеточных линий (1 – НЕК293, 2 – 3ТЗ, 3 – НУВЕС, 4 – Сасо-2) от концентрации испытуемых образцов: А – ДКВ, В – лиофилизат ДКВ. Рыжей точкой отмечено значение для  $IC_{50}$

В большинстве случаев концентрация полумаксимального ингибирования ( $IC_{50}$ ) оказалось в пределах обозначенного диапазона концентраций, что позволяло надежно рассчитать их значение.

Для ДКВ значение  $IC_{50}$  находилось в диапазоне от 0,039 мг/мл до 0,096 мг/мл для моделей клеток линии НЕК293 и 3ТЗ, соответственно. Для лиофилизата ДКВ значение  $IC_{50}$  составило 0,045 мг/мл, 0,062 мг/мл, 0,090 мг/мл и 0,098 мг/мл для моделей линии Сасо-2, НЕК293, 3ТЗ и НУВЕС, соответственно. Полученные данные свидетельствуют, что при прочих равных условиях, цитотоксичность образцов дигидрокверцетина по отношению к клеткам линии 3ТЗ и НУВЕС была минимум на треть ниже, чем к – НЕК293 и Сасо-2.

Двухфакторный дисперсионный анализ не выявил статистически значимого влияния лиофилизации на цитотоксичность образцов дигидрокверцетина.

Результаты оценки восстанавливающей способности композиции ДКВ-глицин по отношению к ССК-8 в холостом опыте представлены на рисунке 7.4.

Для лиофилизата глицина восстанавливающая способность по отношению к ССК-8 не обнаружена. Для всех объектов исследования отмечено наличие линейной зависимости между оптической плотностью испытуемого образца и количеством добавленного объекта исследования. Коэффициенты регрессии для физической смеси и композиции составили 0,9984, и 0,9996, соответственно, что, свидетельствует о применимости данной модели линейной регрессии для предсказания вклада восстанавливающей способности анализируемого объекта в наблюдаемое значение оптической плотности в обозначенном диапазоне концентраций. Вкладом восстанавливающей способности лиофилизата глицина в результаты последующих экспериментов можно пренебречь ввиду их низкого значения.

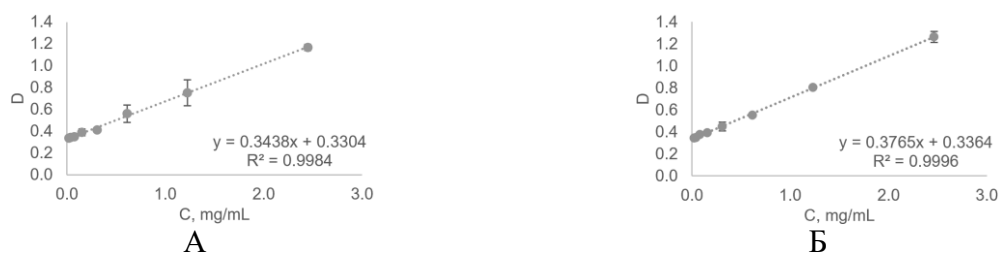


Рисунок 7.4 – Зависимость оптической плотности раствора ССК-8 при добавлении различных концентраций испытуемых образцов: А – физическая смесь, Б – композиция

Результаты оценки цитотоксичности испытуемых образцов ДКВ с глицином представлены на рисунке 7.5.

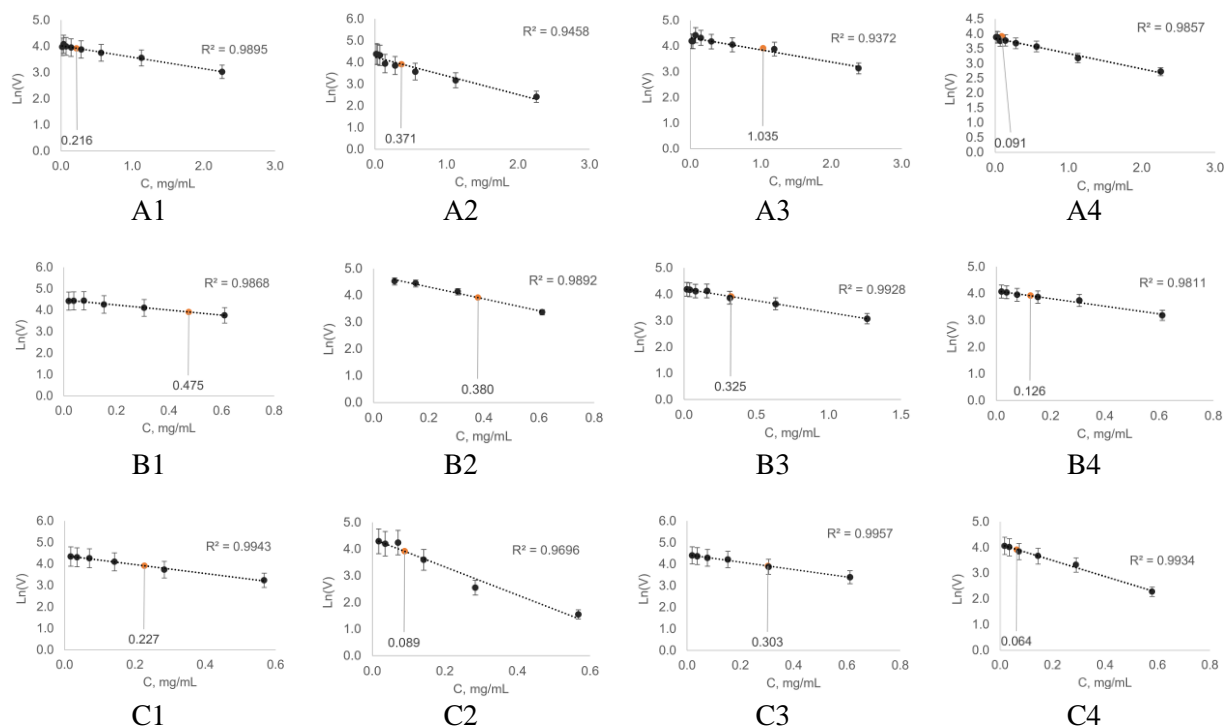


Рисунок 7.5 – Зависимость выживаемости клеток различных линий (1 – НЕК293, 2 – 3Т3, 3 – HUVЕC, 4 – Сасо-2) от концентрации испытуемых образцов: А – лиофилизат глицина, В – физическая смесь, С – композиция. Рыжей точкой отмечено значение для IC<sub>50</sub>

Для всех образцов отмечена выраженная обратная линейная зависимость между натуральным логарифмом выживаемости клеток и концентрации внесенного образца, о чем свидетельствуют коэффициенты регрессии, которые варьировали от 0,9372 для лиофилизата глицина на модели клеток линии HUVEC до 0,9957 для композиции на той же линии клеток. Значение  $IC_{50}$  оказалось в пределах обозначенного диапазона концентраций, что позволяло надежно рассчитать их значение.

Для лиофилизата глицина значение  $IC_{50}$  находилось в диапазоне от 0,091 мг/мл до 1,035 мг/мл для моделей клеток линии Сасо-2 и HUVEC, соответственно. Физическая смесь характеризовалась иным профилем цитотоксичности: минимальное значение  $IC_{50}$  обнаружено на моделях линии Сасо-2 (0,126 мг/мл), а максимальное – на НЕК293 (0,475 мг/мл). Для композиции значение  $IC_{50}$  составило 0,064 мг/мл, 0,089 мг/мл, 0,227 мг/мл и 0,303 мг/мл для линий Сасо-2, 3Т3, НЕК293 и HUVEC, соответственно.

В ходе двухфакторного дисперсионного анализа установлено статистически значимое влияния лиофилизации на цитотоксичность образцов ДКВ и глицина по отношению к клеткам линии НЕК293 ( $p = 2,9 \times 10^{-14}$ ), 3Т3 ( $p = 1,8 \times 10^{-13}$ ) и Сасо-2 ( $p = 1,0 \times 10^{-6}$ ) – во всех случаях наблюдали потенцирование цитотоксичности. Наблюдаемый эффект может быть следствием повышенной растворимости субстанции.

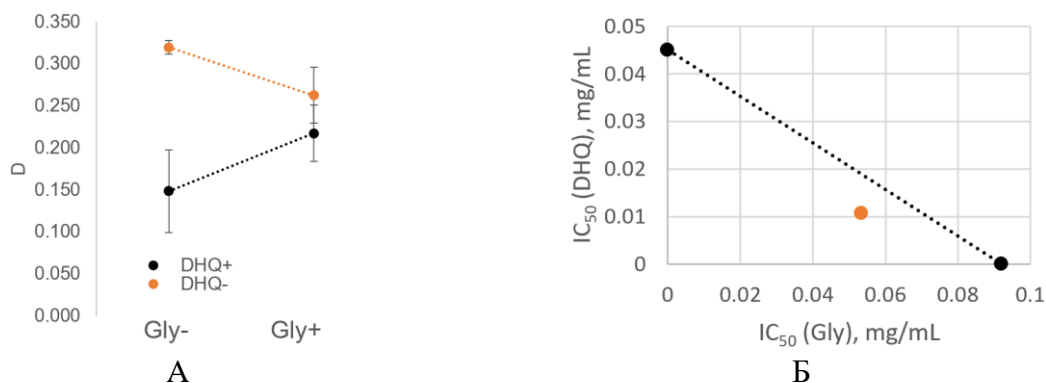


Рисунок 7.6 – Синергический эффект на цитотоксичность композиции по отношению к клеткам линии Сасо-2 от одновременного присутствия ДКВ и глицина: А – соотношение скорректированных оптических плотностей в зависимости от присутствия ДКВ или глицина в концентрации 0,015 мг/мл в испытуемом образце, Б –  $IC_{50}$  композиции (рыжая точка) лежит ниже изоболы его компонентов

Отсутствие параллельных линий на графике скорректированных оптических плотностей (Рисунок 7.6А) свидетельствует о наличии взаимодействия между ДКВ и глицином при действии лиофилизата на клетки линии Сасо-2 (если бы взаимодействия не было, линии были бы параллельными). На рисунке 7.6Б представлены пары концентраций ДКВ и глицина, которые отображаются точками на изоболе (пунктирная линия для определенного эффекта с точками

пересечения осей абсцисс и ординат). Она представляет собой комбинированные концентрации, которые являются аддитивными, когда оба компонента имеют постоянное соотношение эффективности. Поскольку заданное значение  $IC_{50}$  достигается меньшими концентрациями, то точка лиофилизата расположена ниже изоболы, значит комбинация концентраций приводит к синергизму биологического эффекта.

Однако, прежде чем можно будет окончательно сделать вывод о наличии супераддитивного эффекта, необходимо провести двухфакторный дисперсионный анализ, чтобы увидеть, достаточно ли велико проявление синергизма по сравнению со случайными вариациями в данных. Результаты данного анализа представлены в таблице 7.3.

Таблица 7.3 – Дисперсионный анализ цитотоксичности дигидрохверцетина и глицина

Источник вариации	<i>df</i>	<i>SS</i>	<i>MS</i>	<i>F</i>	<i>F<sub>крит</sub></i>
Глицин	1	0,058536	0,058536	37,89057367	4,493998478
Дигидрохверцетин	1	0,000180	0,000180	0,11651428	4,493998478
Взаимодействие	1	0,019845	0,019845	<b>12,84569949</b>	4,493998478
Внутри образца	16	0,024718	0,001545		
Итого	19	0,103279			

Примечание: *df* – число степеней свободы, *SS* – сумма квадратов отклонений, *MS* – дисперсия, *F* – фактическое значение отношения Фишера, *F<sub>крит</sub>* – критическое значение отношения Фишера

Фактическое значение отношения Фишера превышает его критическое значение для взаимодействия компонентов ( $p = 0,00248$ ), что позволяет отклонить нулевую гипотезу об отсутствии синергизма и подтверждает статистическую значимость наблюдаемого супераддитивного эффекта.

Для оценки безопасности субстанции ДКВ-глицин сравнили цитотоксичность композиции и фармацевтической субстанции флавоноида, безопасность которой была доказана ранее проведенными клиническими испытаниями в составе препарата Диквертин® (Таблица 7.4).

Таблица 7.4 –  $IC_{50}$  фармацевтической субстанции ДКВ и композиции ДКВ-глицин

Клеточная линия	$IC_{50}$ , мг/мл	
	фармацевтическая субстанция ДКВ	композиция ДКВ-глицин
НЕК 293	0,039±0,001	0,227±0,002
3Т3	0,096±0,001	0,089±0,004
HUVEC	0,088±0,004	0,303±0,002
Caco-2	0,065±0,001	0,064±0,001

На культурах здоровых клеток человека (НЕК 293 и HUVEC) значения  $IC_{50}$  ДКВ-глицин в 3-6 раз больше, чем у фармацевтической субстанции ДКВ, из чего можно сделать вывод об удовлетворительном уровне безопасности полученной композиции. На фибробластах мыши

(ЗТЗ) композиция показала несколько большую (в 1,1 раз) цитотоксичность. В отношении клеток карциномы кишечника человека (Caco-2) статистически значимой разницы не выявлено.

### 7.3. Выводы по главе 7

1. Выявлены наиболее вероятные механизмы нейропротекторной активности ДКВ, а именно способность ингибирования агрегации  $\beta$ -амилоида и фосфоинозитид фосфатазы, а также стимулирования рецептора пролиферации пероксисом  $\gamma$ .

2. Сделано предположение о биологическом синергизме ДКВ и глицина против нейродегенеративных изменений в головном мозге.

3. Оценена безопасность композиции ДКВ-глицин: цитотоксичность в 3,4 раза меньше на клеточной линии HUVES и в 5,8 раз меньше на линии НЕК 293, чем у фармацевтической субстанции ДКВ, из чего можно сделать вывод об высоком уровне безопасности композиции.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Получена твердая монофазная гомогенная хиральная композиция ДКВ-глицин за счет образования гетеросинтонов между карбонильной группой ДКВ и атомами водорода кватернизованного атома азота глицина. Учитывая сочетанное мультитаргетное действие ДКВ и глицина на мишени нейродегенеративных заболеваний и повышенную растворимость полученного лиофилизата в воде по сравнению с исходным флавоноидом, композиция может быть пригодна для разработки лекарственного средства нейропротекторного действия для парентерального применения.

## ОБЩИЕ ВЫВОДЫ

1. Осуществлен скрининг литературных источников по супрамолекулярному синтезу композиций флавоноидов и аминокислот, в которых описаны методы получения, физико-химические и биологические свойства более 50 кокристаллических и коаморфных композиций с повышенной водорастворимостью в среднем в 1,5 – 5 раз по сравнению с исходными флавоноидами. Выбраны перспективные инструментальные методы для характеристики твердой фазы. В проанализированных литературных источниках композиция состава дигидрокверцетин-глицин описана не была.

2. Получена композиция ДКВ-глицин методом лиофилизации при температуре  $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$  и разрежении 25 Па, характеризующаяся повышенной растворимостью в воде при комнатной температуре по сравнению с базовым флавоноидом. Сублимационная сушка выбрана в качестве оптимальной процедуры из всего арсенала методов инженерии кристаллов.

3. Предложен комплексный подход к анализу композиции ДКВ-глицин и ее компонентов, сочетающий хроматографические, спектральные, дифракционные, микроскопические, термические и хироптические методы:

- описаны морфологические портреты лиофилизатов композиции ДКВ-глицин и ее отдельных компонентов, доказывающие получение новой гомогенной твердой фазы с перфорированной поверхностью, и установлена взаимосвязь между морфологией лиофилизата и его физико-химическими свойствами по сравнению с исходными соединениями;
- доказано отсутствие новых ковалентных связей и образование водородных связей между ДКВ и глицином в композиции;
- достигнуто разделение  $\sigma$ -диастереомеров родственных флавоноидов дигидрокверцетина ( $R_s$  2,5) и дигидрокемпферола ( $R_s$  4,0) в условиях обращенно-фазовой ВЭЖХ на силикагеле с привитыми фенильными группами за счет  $\pi$ - $\pi$  стэкинга ароматических фрагментов ДКВ и бензольных колец сорбента при исследовании образца, полученного методом распылительной сушки.
- выявлен самопроизвольный процесс  $\sigma$ -диастереомеризации ДКВ в процессе хранения его водных растворов при комнатной температуре, приводящий к увеличению угла оптического вращения, что подтверждает механизм эпимеризации по C-2;
- установлен фазовый переход ахиральной молекулы глицина в его хиральную полиморфную форму  $\gamma$ -глицин, а также увеличение содержания *cis*-изомера ДКВ в процессе лиофилизации;
- подтверждено сохранение стереоизомерного состава ДКВ после стерилизации промышленных образцов флавоноида методом облучения потоком быстрых электронов и в процессе хранения в течение года.

4. Оптимизированы условия хроматографического разделения *транс*- и *цис*-изомеров ДКВ методом ВЭЖХ-УФ, послужившие основой разработки методики количественного определения флавоноида в композиции. Отработаны параметры дериватизации глицина в реакции с нингидрином, обеспечивающие количественное определение аминокислоты в композиции методом спектрофотометрии в видимой области. Обе методики валидированы по следующим показателям: специфичность, линейность, прецизионность, правильность.

5. Установлены основные показатели качества композиции ДКВ-глицин: потеря в массе при высушивании, тяжелые металлы и мышьяк, количественное определение *транс*-ДКВ, *цис*-ДКВ и глицина. Для идентификации компонентов композиции предложены: для ДКВ – цианидиновая проба и полосы поглощения в ИК-спектре при  $3446\text{ см}^{-1}$ ,  $1610\text{ см}^{-1}$ ; для глицина – нингидриновая реакция и полоса поглощения в ИК-спектре при  $3171\text{ см}^{-1}$ . Регламентированные значения показателя Количественное определение ДКВ находятся в диапазоне от 15,05% до 17,95% для *транс*-изомера и от 0,45% до 0,55% для *цис*-изомера, а Количественное определение глицина – в диапазоне от 81,5% до 84,5%. Хранение композиции ДКВ-глицин в течение двух лет в сухом и защищённом от света месте не привело к увеличению содержания родственных примесей. На основе этих данных составлен проект спецификации в соответствии с требованиями нормативно-правовых актов Министерства здравоохранения Российской Федерации и Фармакопейного комитета Евразийского экономического союза.

6. Проведена оценка нейропротекторной активности ДКВ-глицин методами *in silico*. Выявлены наиболее вероятные механизмы нейропротекторного действия флавоноида, а именно способность ингибирования агрегации  $\beta$ -амилоида и фосфоинозитид фосфатазы, а также стимулирования рецептора пролиферации пероксисом  $\gamma$ .

7. Обнаружена высокая безопасность композиции ДКВ-глицин. Уровень ее цитотоксичности в 3,4 раза меньше на клеточной линии HUVES и в 5,8 раз меньше на линии НЕК 293, чем у фармацевтической субстанции ДКВ, безопасность которой была ранее доказана проведенными доклиническими и клиническими испытаниями в составе препарата Диквертин®.

## ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Предложенный метод супрамолекулярного синтеза композиции ДКВ-глицин путем лиофилизации водного раствора флавоноида и аминокислоты может быть масштабирован для наработки опытно-промышленных партий. Разработанные и валидированные методики количественного определения обоих компонентов могут применяться для контроля качества продуктов, содержащих ДКВ и глицин.

**ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ**

На основе композиции ДКВ-глицин планируется разработать лекарственную форму для парентерального применения, в том числе, «лиофилизат для приготовления раствора для инфузионного введения», наработать ее опытно-промышленную партию для проведения доклинических исследований на лабораторных животных, например, трансгенных мышах линии 5xFAD, которые воспроизводят основные признаки болезни Альцгеймера.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ**

- ААС – атомно-абсорбционная спектрометрия  
АЭС – атомно-эмиссионная спектрометрия  
БА – болезнь Альцгеймера  
ВУ – время удерживания  
ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография  
ГФ – Государственная фармакопея  
ДКВ – дигидрокверцетин  
ДСК – дифференциальная сканирующая калориметрия  
ЕАЭС – Евразийский экономический союз  
ИК – инфракрасный  
ЛС – лекарственное средство  
МС – масс-спектрометрия  
ОФС - общая фармакопейная статья  
ПМ – поляриметрия  
ПФ – подвижная фаза  
РПД – рентгеновская порошковая дифрактометрия  
РСА – рентгеноструктурный анализ  
СФМ – спектрофотометрия  
СЭМ – сканирующая электронная микроскопия  
ТГ – термогравиметрия  
УФ – ультрафиолетовый  
ЯМР – ядерный магнитный резонанс

## СЛОВАРЬ ТЕРМИНОВ

Словарь содержит специфические для инженерии хиральных кристаллов термины, поэтому общепринятую для фармацевтической науки терминологию в словарь терминов не включали.

**$\sigma$ -Диастереомеризация** – это реакция изомеризации одного  $\sigma$ -диастереомера в другой.

**$\sigma$ -Диастереомерия** – это способность вещества существовать в виде пары диастереомеров, которые отличаются друг от друга взаимным расположением заместителей у пары атомов, связанных  $\sigma$ -связью.

**Инженерия кристаллов** – это область науки на стыке супрамолекулярной химии и химии твердого тела, которая занимается проектированием и синтезом надмолекулярных структур с желаемыми свойствами путем управления нековалентными взаимодействиями.

**Коаморфная композиция (коаморфное состояние)** – композиция из двух или более компонентов, структура которой имеет ближний порядок, но не имеет дальнего порядка.

**Кокристаллическая композиция (коккристалл)** – это кристалл, элементарная ячейка которого включает два или более компонента, связанных между собой нековалентными взаимодействиями.

**Композиция** – двух или более составная кокристаллическая или коаморфная система, компоненты которой связаны между собой нековалентными взаимодействиями.

**Коформер** – один из компонентов кокристаллической или коаморфной композиции. Так как композиции получают чаще всего с целью повышения растворимости вещества путем кокристаллизации или коаморфизации его с водорастворимым соединением, то такое соединение называют коформером.

**Супрамолекулярный синтез** – это синтез из низкомолекулярных веществ двух или более компонентных химических систем, связанных в единое целое посредством нековалентных взаимодействий.

**Хиральный полиморфизм** – это наличие у вещества в твердом агрегатном состоянии полиморфных форм, которые представляют собой энантиоморфные кристаллы.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Sachin, P. Размер, тенденции и отчет о росте рынка лекарственных трав 2032 года. / P. Sachin. – 2025. – URL: <https://www.databridgemarketresearch.com/ru/reports/global-medicinal-herbs-market> (дата обращения: 12.11.2025). – Текст : электронный.
2. Самылина, И. А. Фармакогнозия: пути создания лекарственных растительных препаратов / И. А. Самылина, О. Г. Потанина (Аносова) // Фармация. – 2025. – Т. 74. – Фармакогнозия. – № 4. – С. 5-14.
3. Molecular Insight into the Therapeutic Promise of Flavonoids against Alzheimer’s Disease / M. S. Uddin, M. T. Kabir, K. Niaz [et al.] // *Molecules*. – 2020. – Vol. 25. – № 6. – P. 1267.
4. Nobiletin, a Citrus Flavonoid, Improves Memory Impairment and A $\beta$  Pathology in a Transgenic Mouse Model of Alzheimer’s Disease / H. Onozuka, A. Nakajima, K. Matsuzaki [et al.] // *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. – 2008. – Vol. 326. – № 3. – P. 739-744.
5. Flavonoid-mediated presenilin-1 phosphorylation reduces Alzheimer’s disease  $\beta$ -amyloid production / K. Rezai-Zadeh, R. D. Shytle, Y. Bai [et al.] // *Journal of cellular and molecular medicine*. – 2009. – Vol. 13. – № 3. – P. 574-588.
6. Epigallocatechin-3-gallate and curcumin suppress amyloid beta-induced beta-site APP cleaving enzyme-1 upregulation / Y. Shimmyo, T. Kihara, A. Akaike [et al.] // *NeuroReport*. – 2008. – Vol. 19. – № 13. – P. 1329-1333.
7. The Anti-Amyloidogenic Effect Is Exerted against Alzheimer’s  $\beta$ -Amyloid Fibrils in Vitro by Preferential and Reversible Binding of Flavonoids to the Amyloid Fibril Structure / M. Hirohata, K. Hasegawa, S. Tsutsumi-Yasuhara [et al.] // *Biochemistry*. – 2007. – Vol. 46. – № 7. – P. 1888-1899.
8. Anti-amyloidogenic effects of antioxidants: Implications for the prevention and therapeutics of Alzheimer’s disease / K. Ono, T. Hamaguchi, H. Naiki, M. Yamada // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*. – 2006. – Vol. 1762. – № 6. – P. 575-586.
9. Taxifolin for Cognitive Preservation in Patients with Mild Cognitive Impairment or Mild Dementia / Y. Hattori, S. Saito, Y. Nakaoku [et al.] // *Journal of Alzheimer’s disease: JAD*. – 2023. – Vol. 93. – № 2. – P. 743-754.
10. Green tea epigallocatechin-3-gallate (EGCG) reduces  $\beta$ -amyloid mediated cognitive impairment and modulates tau pathology in Alzheimer transgenic mice / K. Rezai-Zadeh, G. W. Arendash, H. Hou [et al.] // *Brain Research*. – 2008. – Vol. 1214. – P. 177-187.
11. Morin attenuates tau hyperphosphorylation by inhibiting GSK3 $\beta$  / E. J. Gong, H. R. Park, M. E. Kim [et al.] // *Neurobiology of Disease*. – 2011. – Vol. 44. – № 2. – P. 223-230.
12. Qin, L. Protective effect of cyanidin 3-O-glucoside on beta-amyloid peptide-induced cognitive impairment in rats / L. Qin, J. Zhang, M. Qin // *Neuroscience Letters*. – 2013. – Vol. 534. – P. 285-288.

13. Селиванова, И. А. Инженерия кристаллов как научная основа модификации физико-химических свойств биофлавоноидов / И. А. Селиванова, Р. П. Терехов // Известия Академии Наук. Серия Химическая. – 2019. – № 12. – С. 2155-2162.
14. Taxifolin tubes: crystal engineering and characteristics / R. P. Terekhov, I. A. Selivanova, N. A. Tyukavkina [et al.] // Acta Crystallographica Section B, Structural Science, Crystal Engineering and Materials. – 2019. – Vol. 75. – № 2. – P. 175-182.
15. Kostanecki, St. v. Ueber die Constitution des Fisetins / St. v. Kostanecki, J. Tambor // Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft. – 1895. – Vol. 28. – № 2. – P. 2302-2309.
16. Куликов, Ю. А. Фармацевтический энциклопедический словарь : Регистр лекарственных средств России : РЛС+ / Ю. А. Куликов, А. И. Сливкин, Т. Г. Афанасьева. – Москва : Веданта, 2015. – 351 с. – URL: <https://search.rsl.ru/ru/record/01007891729> (дата обращения: 17.11.2025). – Текст : электронный.
17. Structure and mechanism of the evolutionarily unique plant enzyme chalcone isomerase / J. M. Jez, M. E. Bowman, R. A. Dixon, J. P. Noel // Nature Structural Biology. – 2000. – Vol. 7. – № 9. – P. 786-791.
18. Molecular Characterization of a Stereoselective and Promiscuous Flavanone 3-Hydroxylase from *Carthamus tinctorius* L / S. Sui, K. Xie, R. Guo [et al.] // Journal of Agricultural and Food Chemistry. – 2023. – Vol. 71. – № 3. – P. 1679-1689.
19. Structural and mechanistic studies on anthocyanidin synthase catalysed oxidation of flavanone substrates: the effect of C-2 stereochemistry on product selectivity and mechanism / R. W. D. Welford, I. J. Clifton, J. J. Turnbull [et al.] // Organic & Biomolecular Chemistry. – 2005. – Vol. 3. – № 17. – P. 3117-3126.
20. Harborne, J. B. The Flavonoids / J. B. Harborne, H. Marby, T. J. Marby Google-Books-ID: 1nL1BwAAQBAJ. – Springer, 2013. – 1218 p.
21. Ross, J. A. Dietary flavonoids: bioavailability, metabolic effects, and safety / J. A. Ross, C. M. Kasum // Annual Review of Nutrition. – 2002. – Vol. 22. – № Volume 22, 2002. – P. 19-34.
22. Флавоноиды: биохимия, биофизика, медицина / Ю. С. Тараховский, Ю. А. Ким, Б. С. Абдралилов, Е. Н. Музафаров. – Пушино : Synchrobook, 2013. – 310 с. – URL: (дата обращения: 17.11.2025). – Текст : электронный.
23. (+)-taxifolin. – LOTUS: Natural Products Online, . – URL: [https://lotus.naturalproducts.net/compound/lotus\\_id/LTS0090664](https://lotus.naturalproducts.net/compound/lotus_id/LTS0090664) (дата обращения: 26.12.2025). – Текст : электронный.
24. Flavonoids | Linus Pauling Institute | Oregon State University. – URL: <https://lpi.oregonstate.edu/mic/dietary-factors/phytochemicals/flavonoids> (date accessed: 17.11.2025). – Text : electronic.

25. Flavonoid Intake in European Adults (18 to 64 Years) / A. Vogiatzoglou, A. A. Mulligan, M. A. H. Lentjes [et al.] // PLOS ONE. – 2015. – Vol. 10. – № 5. – P. e0128132.
26. Identification and quantification of flavonoids of Mexican oregano (*Lippia graveolens*) by LC-DAD-ESI/MS analysis / L.-Z. Lin, S. Mukhopadhyay, R. J. Robbins, J. M. Harnly // Journal of Food Composition and Analysis. – 2007. – Vol. 20. – № 5. – P. 361-369.
27. Terahara, N. Flavonoids in Foods: A Review / N. Terahara. – Текст : электронный // Natural Product Communications. – 2015. – Flavonoids in Foods. – URL: <https://journals.sagepub.com/doi/abs/10.1177/1934578X1501000334> (дата обращения: 19.11.2025).
28. Горькова, И. В. Экстракты гречихи посевной и софоры японской как сырьевые источники биологически активных веществ / И. В. Горькова, Н. Е. Павловская, А. Н. Даниленко // Пищевая Промышленность. – 2016. – № 2. – С. 30-32.
29. Способ получения экстракта расторопши пятнистой / В. А. Куркин, А. А. Лебедев, Е. В. Авдеева, [и др.]. – 1998. – URL: <https://patents.google.com/patent/RU2102999C1/ru> (дата обращения: 14.02.2026). – Текст : электронный.
30. Репаративное средство при ожоговых поражениях / С. А. Вичканова (RU), С. А. Вичканова, В. В. Бортникова (RU), [и др.]. – 2011. – URL: <https://patents.google.com/patent/RU2410110C1/ru> (дата обращения: 14.02.2026). – Текст : электронный.
31. 杨存. Novel method for extracting hesperidin from orange peel / 杨存. – 2013. – URL: <https://patents.google.com/patent/CN103467547A/en?q=CN103467547A> (дата обращения: 14.02.2026). – Текст : электронный.
32. Mediterranean Diet and Cardiovascular Disease Prevention: What Do We Know? : Dietary Prevention of Cardiovascular Diseases / J. Salas-Salvadó, N. Becerra-Tomás, J. F. García-Gavilán [et al.] // Progress in Cardiovascular Diseases. – 2018. – Vol. 61. – № 1. – P. 62-67.
33. Virgin olive oil and nuts as key foods of the Mediterranean diet effects on inflammatory biomarkers related to atherosclerosis : Polyphenols and Health / M. Urpi-Sarda, R. Casas, G. Chiva-Blanch [et al.] // Pharmacological Research. – 2012. – Vol. 65. – № 6. – P. 577-583.
34. The Mediterranean Diet in Cancer Prevention: A Review / N. Kontou, T. Psaltopoulou, D. Panagiotakos [et al.] // Journal of Medicinal Food. – 2011. – Vol. 14. – The Mediterranean Diet in Cancer Prevention. – № 10. – P. 1065-1078.
35. Mediterranean Diet, Inflammatory and Metabolic Biomarkers, and Risk of Alzheimer's Disease / Y. Gu, J. A. Luchsinger, Y. Stern, N. Scarmeas. – Текст : электронный // Journal of Alzheimer's Disease. – 2010. – URL: <https://journals.sagepub.com/doi/abs/10.3233/JAD-2010-100897> (дата обращения: 13.11.2025).

36. Mediterranean diet polyphenols reduce inflammatory angiogenesis through MMP-9 and COX-2 inhibition in human vascular endothelial cells: A potentially protective mechanism in atherosclerotic vascular disease and cancer : 5th International Conference on Polyphenols and Health / E. Scoditti, N. Calabriso, M. Massaro [et al.] // *Archives of Biochemistry and Biophysics*. – 2012. – Vol. 527. – № 2. – P. 81-89.
37. Junji, T. Dietary flavonoids as antioxidants / T. Junji // *Food Factors for Health Promotion* / Google-Books-ID: QQIY5pszUbYC. – Karger Medical and Scientific Publishers, 2009.
38. A Comprehensive Review of Free Radicals, Oxidative Stress, and Antioxidants: Overview, Clinical Applications, Global Perspectives, Future Directions, and Mechanisms of Antioxidant Activity of Flavonoid Compounds / S. G. Tumilaar, A. Hardianto, H. Dohi, D. Kurnia // *Journal of Chemistry*. – 2024. – Vol. 2024. – № 1. – P. 5594386.
39. Es-Safi, N.-E. Flavonoids: Hemisynthesis, Reactivity, Characterization and Free Radical Scavenging Activity / N.-E. Es-Safi, S. Ghidouche, P. H. Ducrot // *Molecules*. – 2007. – Vol. 12. – Flavonoids. – № 9. – P. 2228-2258.
40. Korkina, L. Antioxidant and Chelating Properties of Flavonoids / L. Korkina, I. Afanas'ev // *Advances in Pharmacology*. – 1996. – Vol. 38. – P. 151-163.
41. Computational Study of Ortho-Substituent Effects on Antioxidant Activities of Phenolic Dendritic Antioxidants / C. Y. Lee, A. Sharma, J. Semenyá [et al.] // *Antioxidants*. – 2020. – Vol. 9. – № 3. – P. 189.
42. Vuzem, D. Computational Study of Hydrogen Atom Transfer in the Reaction of Quercetin with Hydroxyl Radical / D. Vuzem, V. Pilepić // *Hydrogen*. – 2025. – Vol. 6. – № 2. – P. 39.
43. Shahidi, F. Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: Antioxidant activity and health effects – A review : Natural Antioxidants / F. Shahidi, P. Ambigaipalan // *Journal of Functional Foods*. – 2015. – Vol. 18. – P. 820-897.
44. Molecular modeling and DFT studies on the antioxidant activity of Centaurea scoparia flavonoids and molecular dynamics simulation of their interaction with  $\beta$ -lactoglobulin / E. M. Kamel, A. Bin-Ammar, A. A. El-Bassuony [et al.] // *RSC Advances*. – 2023. – Vol. 13. – № 18. – P. 12361-12374.
45. Recent Developments in Effective Antioxidants: The Structure and Antioxidant Properties / M. Parcheta, R. Świsłocka, S. Orzechowska [et al.] // *Materials*. – 2021. – Vol. 14. – Recent Developments in Effective Antioxidants. – № 8. – P. 1984.
46. Theoretical Studies on Anti-Oxidant Activity of the Phytochemical, Coumestrol and Its Derivatives / P. Vinduja, K. Muraleedharan, P. Vinduja, K. Muraleedharan. – Text: electronic // *Functional Foods - Phytochemicals and Health Promoting Potential*. – IntechOpen, 2021. – URL: <https://www.intechopen.com/chapters/76000> (date accessed: 13.11.2025).

47. Mechanistic Insights of Chelator Complexes with Essential Transition Metals: Antioxidant/Pro-Oxidant Activity and Applications in Medicine / V. A. Timoshnikov, O. Y. Selyutina, N. E. Polyakov [et al.] // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2022. – Vol. 23. – № 3. – P. 1247.
48. Haber, F. Über die Katalyse des Hydroperoxydes / F. Haber, J. Weiss // *Naturwissenschaften*. – 1932. – Vol. 20. – № 51. – P. 948-950.
49. Sies, H. Strategies of antioxidant defense / H. Sies // *European Journal of Biochemistry*. – 1993. – Vol. 215. – № 2. – P. 213-219.
50. Iron Complexes of Flavonoids-Antioxidant Capacity and Beyond / Z. Kejík, R. Kaplánek, M. Masařík [et al.] // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2021. – Vol. 22. – № 2. – P. 646.
51. Metal complexes of dietary flavonoids: evaluation of radical scavenger properties and protective activity against oxidative stress in vivo / V. A. Kostyuk, A. I. Potapovich, T. V. Kostyuk, M. G. Cherian // *Cellular and Molecular Biology*. – 2007. – Vol. 53. – № 1. – P. 62-69.
52. Perron, N. R. A Review of the Antioxidant Mechanisms of Polyphenol Compounds Related to Iron Binding / N. R. Perron, J. L. Brumaghim // *Cell Biochemistry and Biophysics*. – 2009. – Vol. 53. – № 2. – P. 75-100.
53. Dowling, S. The characterisation of structural and antioxidant properties of isoflavone metal chelates / S. Dowling, F. Regan, H. Hughes // *Journal of Inorganic Biochemistry*. – 2010. – Vol. 104. – № 10. – P. 1091-1098.
54. Experimental evidence that flavonoid metal complexes may act as mimics of superoxide dismutase / V. A. Kostyuk, A. I. Potapovich, E. N. Strigunova [et al.] // *Archives of Biochemistry and Biophysics*. – 2004. – Vol. 428. – № 2. – P. 204-208.
55. Interactions of Flavonoids with Iron and Copper Ions: A Mechanism for their Antioxidant Activity / L. Mira, M. Tereza Fernandez, M. Santos [et al.] // *Free Radical Research*. – 2002. – Vol. 36. – № 11. – P. 1199-1208.
56. Flavonoids: biological activities and therapeutic potential / M. M. Jucá, F. M. S. Cysne Filho, J. C. de Almeida [et al.] // *Natural Product Research*. – 2020. – Vol. 34. – Flavonoids. – № 5. – P. 692-705.
57. Role of caveolin-1 in EGCG-mediated protection against linoleic-acid-induced endothelial cell activation / Y. Zheng, E. J. Lim, L. Wang [et al.] // *The Journal of Nutritional Biochemistry*. – 2009. – Vol. 20. – № 3. – P. 202-209.
58. Effects of green tea polyphenols on caveolin-1 of microvessel fragments in rats with cerebral ischemia / S. Zhang, Y. Liu, Z. Zhao, Y. Xue // *Neurological Research*. – 2010. – Vol. 32. – № 9. – P. 963-970.
59. Inhibition of nitric oxide production by quercetin in endotoxin/cytokine-stimulated microglia / T.-K. Kao, Y.-C. Ou, S.-L. Raung [et al.] // *Life Sciences*. – 2010. – Vol. 86. – № 9. – P. 315-321.

60. Quercetin enhances TRAIL-mediated apoptosis in colon cancer cells by inducing the accumulation of death receptors in lipid rafts / F. H. Psahoulia, K. G. Drosopoulos, L. Doubravska [et al.] // *Molecular Cancer Therapeutics*. – 2007. – Vol. 6. – № 9. – P. 2591-2599.
61. Szliszka, E. The role of dietary polyphenols in tumor necrosis factor-related apoptosis inducing ligand (TRAIL)-induced apoptosis for cancer chemoprevention / E. Szliszka, W. Krol // *European Journal of Cancer Prevention*. – 2011. – Vol. 20. – № 1. – P. 63.
62. Quercetin supplementation suppresses the secretion of pro-inflammatory cytokines in the lungs of Mongolian gerbils and in A549 cells exposed to benzo[*a*]pyrene alone or in combination with  $\beta$ -carotene: in vivo and ex vivo studies / S.-T. Chan, C.-H. Chuang, C.-L. Yeh [et al.] // *The Journal of Nutritional Biochemistry*. – 2012. – Vol. 23. – № 2. – P. 179-185.
63. Larsen, C. A. Tea catechins as inhibitors of receptor tyrosine kinases: Mechanistic insights and human relevance / C. A. Larsen, R. H. Dashwood, W. H. Bisson // *Pharmacological Research*. – 2010. – Vol. 62. – № 6. – P. 457-464.
64. Green tea catechin EGCG inhibits ileal apical sodium bile acid transporter ASBT / F. Annaba, P. Kumar, A. K. Dudeja [et al.] // *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*. – 2010. – Vol. 298. – № 3. – P. G467-G473.
65. Epigallocatechin gallate reduces human monocyte mobility and adhesion in vitro / E. Melgarejo, M. Á. Medina, F. Sánchez-Jiménez, J. L. Urdiales // *British Journal of Pharmacology*. – 2009. – Vol. 158. – № 7. – P. 1705-1712.
66. Apigenin inhibits HGF-promoted invasive growth and metastasis involving blocking PI3K/Akt pathway and  $\beta$ 4 integrin function in MDA-MB-231 breast cancer cells / W.-J. Lee, W.-K. Chen, C.-J. Wang [et al.] // *Toxicology and Applied Pharmacology*. – 2008. – Vol. 226. – № 2. – P. 178-191.
67. Kaempferol Suppresses Eosinophil Infiltration and Airway Inflammation in Airway Epithelial Cells and in Mice with Allergic Asthma<sub>1,2</sub> / J.-H. Gong, D. Shin, H. Han [et al.] // *The Journal of Nutrition*. – 2012. – Vol. 142. – № 1. – P. 47-56.
68. Glabridin Inhibits Migration, Invasion, and Angiogenesis of Human Non-Small Cell Lung Cancer A549 Cells by Inhibiting the FAK/Rho Signaling Pathway / Y.-M. Tsai, C.-J. Yang, Y.-L. Hsu [и др.]. – Текст : электронный // *Integrative Cancer Therapies*. – 2017. – URL: <https://journals.sagepub.com/doi/full/10.1177/1534735410384860> (дата обращения: 14.11.2025).
69. Naringenin inhibits the assembly and long-term production of infectious hepatitis C virus particles through a PPAR-mediated mechanism / J. Goldwasser, P. Y. Cohen, W. Lin [et al.] // *Journal of Hepatology*. – 2011. – Vol. 55. – № 5. – P. 963-971.
70. Medjakovic, S. Potential Health-modulating Effects of Isoflavones and Metabolites via Activation of PPAR and AhR / S. Medjakovic, M. Mueller, A. Jungbauer // *Nutrients*. – 2010. – Vol. 2. – № 3. – P. 241-279.

71. 12/15-Lipoxygenase inhibitor baicalein suppresses PPAR $\gamma$  expression and nuclear translocation induced by cerebral ischemia/reperfusion / Y.-W. Xu, L. Sun, H. Liang [et al.] // *Brain Research*. – 2010. – Vol. 1307. – P. 149-157.
72. Effect of Plant Polyphenols on Adipokine Secretion from Human SGBS Adipocytes / C. S. Derdemezis, D. N. Kiortsis, V. Tsimihodimos [et al.] // *Biochemistry Research International*. – 2011. – Vol. 2011. – № 1. – P. 285618.
73. Naringin ameliorates metabolic syndrome by activating AMP-activated protein kinase in mice fed a high-fat diet / P. Pu, D.-M. Gao, S. Mohamed [et al.] // *Archives of Biochemistry and Biophysics*. – 2012. – Vol. 518. – № 1. – P. 61-70.
74. Anti-inflammatory effect of genistein on non-alcoholic steatohepatitis rats induced by high fat diet and its potential mechanisms / G. Ji, Q. Yang, J. Hao [et al.] // *International Immunopharmacology*. – 2011. – Vol. 11. – № 6. – P. 762-768.
75. (–)-Epigallocatechin-3-gallate blocks 3T3-L1 adipose conversion by inhibition of cell proliferation and suppression of adipose phenotype expression / C. Y. Chan, L. Wei, F. Castro-Muñozledo, W. L. Koo // *Life Sciences*. – 2011. – Vol. 89. – № 21. – P. 779-785.
76. Interaction of Barley  $\beta$ -Glucan and Tea Polyphenols on Glucose Metabolism in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats / R. Gao, Y. Wang, Z. Wu [et al.] // *Journal of Food Science*. – 2012. – Vol. 77. – № 6. – P. H128-H134.
77. Modulatory effect of grape-seed procyanidins on local and systemic inflammation in diet-induced obesity rats / X. Terra, V. Pallarés, A. Ardèvol [et al.] // *The Journal of Nutritional Biochemistry*. – 2011. – Vol. 22. – № 4. – P. 380-387.
78. Lipogenesis Is Decreased by Grape Seed Proanthocyanidins According to Liver Proteomics of Rats Fed a High Fat Diet\* / I. Baiges, J. Palmfeldt, C. Bladé [et al.] // *Molecular & Cellular Proteomics*. – 2010. – Vol. 9. – № 7. – P. 1499-1513.
79. A grape polyphenol extract modulates muscle membrane fatty acid composition and lipid metabolism in high-fat–high-sucrose diet-fed rats / M. Aoun, F. Michel, G. Fouret [et al.] // *British Journal of Nutrition*. – 2011. – Vol. 106. – № 4. – P. 491-501.
80. Effects of baicalein on the pharmacokinetics of tamoxifen and its main metabolite, 4-hydroxytamoxifen, in rats: Possible role of cytochrome p450 3A4 and P-glycoprotein inhibition by baicalein / C. Li, M. Kim, H. Choi, J. Choi // *Archives of Pharmacal Research*. – 2011. – Vol. 34. – № 11. – P. 1965-1972.
81. Effects of baicalein, an antioxidant, on the bioavailability of doxorubicin in rats: possible role of P-glycoprotein inhibition by baicalein / S. C. Shin, C. Li, C. Li, J. S. Choi // *Die Pharmazie - An International Journal of Pharmaceutical Sciences*. – 2009. – Vol. 64. – № 9. – P. 579-583.

82. Choi, J.-S. Effects of quercetin on the bioavailability of doxorubicin in rats: Role of CYP3A4 and P-gp inhibition by quercetin / J.-S. Choi, Y.-J. Piao, K. W. Kang // *Archives of Pharmacal Research.* – 2011. – Vol. 34. – № 4. – P. 607-613.
83. Choi, S.-J. Effects of myricetin on the bioavailability of doxorubicin for oral drug delivery in Rats: Possible role of CYP3A4 and P-glycoprotein inhibition by myricetin / S.-J. Choi, S.-C. Shin, J.-S. Choi // *Archives of Pharmacal Research.* – 2011. – Vol. 34. – № 2. – P. 309-315.
84. Inhibition of P-glycoprotein function by procyanidine on blood–brain barrier / L. He, C. Zhao, M. Yan [et al.] // *Phytotherapy Research.* – 2009. – Vol. 23. – № 7. – P. 933-937.
85. Kimura, Y. Effects of baicalein and wogonin isolated from *Scutellaria baicalensis* roots on skin damage in acute UVB-irradiated hairless mice / Y. Kimura, M. Sumiyoshi // *European Journal of Pharmacology.* – 2011. – Vol. 661. – № 1. – P. 124-132.
86. Zhou, B. Protective effect of baicalin against multiple ultraviolet b exposure-mediated injuries in C57BL/6 mouse skin / B. Zhou, W. Liu, D. Luo // *Archives of Pharmacal Research.* – 2011. – Vol. 34. – № 2. – P. 261-268.
87. Tangeretin Reduces Ultraviolet B (UVB)-Induced Cyclooxygenase-2 Expression in Mouse Epidermal Cells by Blocking Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK) Activation and Reactive Oxygen Species (ROS) Generation / J. H. Yoon, T.-G. Lim, K. M. Lee [et al.] // *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* – 2011. – Vol. 59. – № 1. – P. 222-228.
88. Anthocyanin-rich Fractions of Blackberry Extracts Reduce UV-induced Free Radicals and Oxidative Damage in Keratinocytes / P. Murapa, J. Dai, M. Chung [et al.] // *Phytotherapy Research.* – 2012. – Vol. 26. – № 1. – P. 106-112.
89. Protective Effect of Structurally Diverse Grape Procyanidin Fractions against UV-Induced Cell Damage and Death / C. Matito, N. Agell, S. Sanchez-Tena [et al.] // *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* – 2011. – Vol. 59. – № 9. – P. 4489-4495.
90. 5,7-Dimethoxyflavone induces melanogenesis in B16F10 melanoma cells through cAMP-dependent signalling / Y.-G. Kang, E.-J. Choi, Y. Choi, J.-K. Hwang // *Experimental Dermatology.* – 2011. – Vol. 20. – № 5. – P. 445-447.
91. 7,3',4'-Trihydroxyisoflavone, a Metabolite of the Soy Isoflavone Daidzein, Suppresses Ultraviolet B-induced Skin Cancer by Targeting Cot and MKK4 / D. E. Lee, K. W. Lee, S. Byun [et al.] // *Journal of Biological Chemistry.* – 2011. – Vol. 286. – № 16. – P. 14246-14256.
92. Antimicrobial Activity of Gel-Entrapped Catechins toward Oral Microorganisms / M. Tamura, H. Saito, K. Kikuchi [et al.] // *Biological and Pharmaceutical Bulletin.* – 2011. – Vol. 34. – № 5. – P. 638-643.

93. Cushnie, T. P. T. Detection of galangin-induced cytoplasmic membrane damage in *Staphylococcus aureus* by measuring potassium loss / T. P. T. Cushnie, A. J. Lamb // Journal of Ethnopharmacology. – 2005. – Vol. 101. – № 1. – P. 243-248.
94. The  $\beta$ -lactam-resistance modifier (-)-epicatechin gallate alters the architecture of the cell wall of *Staphylococcus aureus* / P. D. Stapleton, S. Shah, K. Ehlert [et al.] // Microbiology. – 2007. – Vol. 153. – № 7. – P. 2093-2103.
95. Calcium-dependent aggregation and fusion of phosphatidylcholine liposomes induced by complexes of flavonoids with divalent iron / Y. S. Tarahovsky, E. A. Yagolnik, E. N. Muzafarov [et al.] // Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes. – 2012. – Vol. 1818. – № 3. – P. 695-702.
96. Insertion of Epicatechin Gallate into the Cytoplasmic Membrane of Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* Disrupts Penicillin-binding Protein (PBP) 2a-mediated  $\beta$ -Lactam Resistance by Delocalizing PBP2 / P. Bernal, S. Lemaire, M. G. Pinho [et al.] // Journal of Biological Chemistry. – 2010. – Vol. 285. – № 31. – P. 24055-24065.
97. Eumkeb, G. Reversing  $\beta$ -lactam antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* with galangin from *Alpinia officinarum* Hance and synergism with ceftazidime / G. Eumkeb, S. Sakdarat, S. Siriwong // Phytomedicine. – 2010. – Vol. 18. – № 1. – P. 40-45.
98. Green Tea Catechins Inhibit Bacterial DNA Gyrase by Interaction with Its ATP Binding Site / H. Gradišar, P. Pristovšek, A. Plaper, R. Jerala // Journal of Medicinal Chemistry. – 2007. – Vol. 50. – № 2. – P. 264-271.
99. d-Alanine:d-alanine ligase as a new target for the flavonoids quercetin and apigenin / D. Wu, Y. Kong, C. Han [et al.] // International Journal of Antimicrobial Agents. – 2008. – Vol. 32. – № 5. – P. 421-426.
100. Dietary bioflavonoids inhibit *Escherichia coli* ATP synthase in a differential manner / N. Chinnam, P. K. Dadi, S. A. Sabri [et al.] // International Journal of Biological Macromolecules. – 2010. – Vol. 46. – № 5. – P. 478-486.
101. Three flavonoids targeting the  $\beta$ -hydroxyacyl-acyl carrier protein dehydratase from *Helicobacter pylori*: Crystal structure characterization with enzymatic inhibition assay / L. Zhang, Y. Kong, D. Wu [et al.] // Protein Science. – 2008. – Vol. 17. – № 11. – P. 1971-1978.
102. Flavonoid inhibitors as novel antimycobacterial agents targeting Rv0636, a putative dehydratase enzyme involved in *Mycobacterium tuberculosis* fatty acid synthase II / A. K. Brown, A. Papaemmanouil, V. Bhowruth [et al.] // Microbiology. – 2007. – Vol. 153. – № 10. – P. 3314-3322.
103. Screening of Flavonoids as Candidate Antibiotics against *Enterococcus faecalis* / K.-W. Jeong, J.-Y. Lee, D.-I. Kang [et al.] // Journal of Natural Products. – 2009. – Vol. 72. – № 4. – P. 719-724.

104. Apigenin, a Component of *Matricaria recutita* Flowers, is a Central Benzodiazepine Receptors-Ligand with Anxiolytic Effects / H. Viola, C. Wasowski, M. L. de Stein [et al.] // *Planta Medica*. – 1995. – Vol. 61. – № 3. – P. 213-216.
105. Isolation and Identification of 6-Methylapigenin, a Competitive Ligand for the Brain GABAA Receptors, from *Valeriana wallichii* / C. Wasowski, M. Marder, H. Viola [et al.] // *Planta Medica*. – 2002. – Vol. 68. – № 10. – P. 934-936.
106. Salah, S. M. Two flavonoids from *Artemisia herba-alba* Asso with in vitro GABAA-benzodiazepine receptor activity / S. M. Salah, A. K. Jäger // *Journal of Ethnopharmacology*. – 2005. – Vol. 99. – № 1. – P. 145-146.
107. Chrysin (5,7-di-OH-flavone), a naturally-occurring ligand for benzodiazepine receptors, with anticonvulsant properties / J. H. Medina, A. C. Paladini, C. Wolfman [et al.] // *Biochemical Pharmacology*. – 1990. – Vol. 40. – № 10. – P. 2227-2231.
108. GABAA receptor subtype selectivity underlying selective anxiolytic effect of baicalin / F. Wang, Z. Xu, L. Ren [et al.] // *Neuropharmacology*. – 2008. – Vol. 55. – № 7. – P. 1231-1237.
109. Unravelling the neuroprotective effects of taxifolin against scopolamine-induced dementia in male Sprague Dawley rats: A comprehensive preclinical investigation / H. Chauhan, B. Nakum, U. Chaube, B. Saxena // *Brain Disorders*. – 2025. – Vol. 17. – P. 100203.
110. Role of Flavonoids in Neurodegenerative Diseases: Limitations and Future Perspectives / G. Maan, B. Sikdar, A. Kumar [et al.] // *Current Topics in Medicinal Chemistry*. – 2020. – Vol. 20. – № 13. – P. 1169-1194.
111. Protective effects of flavonoids against Alzheimer's disease-related neural dysfunctions / M. Bakhtiari, Y. Panahi, J. Ameli, B. Darvishi // *Biomedicine & Pharmacotherapy*. – 2017. – Vol. 93. – P. 218-229.
112. Structure-activity relationship for (+)-taxifolin isolated from silymarin as an inhibitor of amyloid  $\beta$  aggregation / M. Sato, K. Murakami, M. Uno [et al.] // *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. – 2013. – Vol. 77. – № 5. – P. 1100-1103.
113. Site-specific Inhibitory Mechanism for Amyloid  $\beta$ 42 Aggregation by Catechol-type Flavonoids Targeting the Lys Residues \* / M. Sato, K. Murakami, M. Uno [et al.] // *Journal of Biological Chemistry*. – 2013. – Vol. 288. – № 32. – P. 23212-23224.
114. Ginex, T. Computational Study of the Aza-Michael Addition of the Flavonoid (+)-Taxifolin in the Inhibition of  $\beta$ -Amyloid Fibril Aggregation / T. Ginex, M. Trius, F. J. Luque // *Chemistry*. – 2018. – Vol. 24. – № 22. – P. 5813-5824.
115. Taxifolin inhibits amyloid- $\beta$  oligomer formation and fully restores vascular integrity and memory in cerebral amyloid angiopathy / S. Saito, Y. Yamamoto, T. Maki [et al.] // *Acta Neuropathologica Communications*. – 2017. – Vol. 5. – № 1. – P. 26.

116. Taxifolin for prevention of COGNitive impairment (T-COG trial): a study protocol for a randomized, double-blind, placebo-controlled trial / T. Chiba, Y. Hattori, K. Asakura [et al.]. – Text : electronic // *Frontiers in Nutrition*. – 2025. – Vol. 12. – URL: <https://www.frontiersin.org/journals/nutrition/articles/10.3389/fnut.2025.1686381/full> (date accessed: 21.11.2025).
117. 2.5. Лекарственное растительное сырьё. – URL: <https://pharmacopoeia.regmed.ru/pharmacopoeia/izdanie-15/2/2-3/> (дата обращения: 21.11.2025). – Текст : электронный.
118. Antioxidant Activity of a Dihydroquercetin Isolated from *Larix gmelinii* (Rupr.) Rupr. Wood / V. K. Kolhir, V. A. Bykov, A. I. Baginskaja [et al.] // *Phytotherapy Research*. – 1996. – Vol. 10. – № 6. – P. 478-482.
119. Dicvertin: A new antioxidant and capillary-protecting drug / V. K. Kolkhir, N. A. Tyukavkina, V. A. Bykov [et al.] // *Pharmaceutical Chemistry Journal*. – 1995. – Vol. 29. – Dicvertin. – № 9. – P. 657-660.
120. Исследование кристаллической структуры дигидрокверцетина / И. А. Селиванова, Н. А. Тюкавкина, Ю. А. Колесник [и др.] // *Химико-фармацевтический журнал*. – 1999. – Т. 33. – № 4. – С. 51-53.
121. Селиванова, И. А. Физико-химические основы создания лекарственных средств и пищевых добавок на базе биологически активных веществ древесины *Larix Gmelinii* Rupr. (Rupr.) и *Larix Sibirica* Ledeb : диссертация на соискание ученой степени д.фарм.н. специальность 15.00.02 / И. А. Селиванова. – 1998.
122. Use of Micronization and Complex Coacervation to Preserve Antioxidant Properties of Flavonoids / R. Fatkullin, I. Kalinina, N. Naumenko, E. Naumenko // *International Journal of Food Science*. – 2023. – Vol. 2023. – № 1. – P. 9456931.
123. Micronization of luteolin using supercritical carbon dioxide: Characterization of particles and biological activity in vitro / A. E. dos Santos, C. Dal Magro, L. S. de Britto [et al.] // *The Journal of Supercritical Fluids*. – 2022. – Vol. 181. – P. 105471.
124. Preparation and characterization of vitexin powder micronized by a supercritical antisolvent (SAS) process / Y. Zu, Q. Zhang, X. Zhao [et al.] // *Powder Technology*. – 2012. – Vol. 228. – P. 47-55.
125. Solubility Enhancement of Dihydroquercetin via “Green” Phase Modification / R. P. Terekhov, I. R. Ilyasov, V. L. Beloborodov [et al.] // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2022. – Vol. 23. – № 24. – P. 15965.
126. Fabrication of Supercritical Antisolvent (SAS) Process-Assisted Fisetin-Encapsulated Poly (Vinyl Pyrrolidone) (PVP) Nanocomposites for Improved Anticancer Therapy / L.-F. Chen, P.-Y. Xu, C.-P. Fu [et al.] // *Nanomaterials*. – 2020. – Vol. 10. – № 2. – P. 322.

127. Kakran, M. Dissolution enhancement of quercetin through nanofabrication, complexation, and solid dispersion / M. Kakran, N. G. Sahoo, L. Li // *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. – 2011. – Vol. 88. – № 1. – P. 121-130.
128. Preparation and characterization of luteolin nanoparticles for enhance bioavailability and inhibit liver microsomal peroxidation in rats / L. Wang, C. Zhong, Y. Zu [et al.] // *Journal of Functional Foods*. – 2019. – Vol. 55. – P. 57-64.
129. Preparation, characterization and antitumor activity evaluation of apigenin nanoparticles by the liquid antisolvent precipitation technique / W. Wu, Y. Zu, L. Wang [et al.] // *Drug Delivery*. – 2017. – Vol. 24. – № 1. – P. 1713-1720.
130. Amorphous nano morin outperforms native molecule in anticancer activity and oral bioavailability / A. K. Jangid, H. Agrawal, N. Gupta [et al.] // *Drug Development and Industrial Pharmacy*. – 2020. – Vol. 46. – № 7. – P. 1123-1132.
131. Fabrication of surfactant-stabilized nanosuspension of naringenin to surpass its poor physiochemical properties and low oral bioavailability / M. K. Singh, D. Pooja, H. G. Ravuri [et al.] // *Phytomedicine*. – 2018. – Vol. 40. – P. 48-54.
132. Solid Dispersions of Genistein via Solvent Rotary Evaporation for Improving Solubility, Bioavailability, and Amelioration Effect in HFD-Induced Obesity Mice / C. Qiu, Y. Zhang, Y. Fan [et al.]. – Text : electronic // *Pharmaceutics*. – 2024. – Vol. 16. – № 3. – URL: <https://www.mdpi.com/1999-4923/16/3/306> (date accessed: 14.01.2026).
133. Cyclodextrin Complexation Improves the Solubility and Caco-2 Permeability of Chrysin / F. Fenyvesi, T. L. P. Nguyen, Á. Haimhoffer [et al.]. – Text : electronic // *Materials*. – 2020. – Vol. 13. – № 16. – URL: <https://www.mdpi.com/1996-1944/13/16/3618> (date accessed: 14.01.2026).
134. Research on Characteristics, Antioxidant and Antitumor Activities of Dihydroquercetin and Its Complexes / Y. Zhang, J. Yu, X.-D. Dong [et al.]. – Text : electronic // *Molecules*. – 2017. – Vol. 23. – № 1. – URL: <https://www.mdpi.com/1420-3049/23/1/20> (date accessed: 14.01.2026).
135. Preparation, characterization, and biological activity of the inclusion complex of dihydroquercetin and  $\beta$ -Cyclodextrin / Y. Xu, Y. Wang, C. Li [et al.] // *AAPS Open*. – 2023. – Vol. 9. – № 1. – P. 16.
136. Host–guest system of hesperetin and  $\beta$ -cyclodextrin or its derivatives: Preparation, characterization, inclusion mode, solubilization and stability / L.-J. Yang, S. Xia, S.-X. Ma [et al.] // *Materials Science and Engineering: C*. – 2016. – Vol. 59. – P. 1016-1024.
137. Characterization and In Vivo Antiangiogenic Activity Evaluation of Morin-Based Cyclodextrin Inclusion Complexes / F. D. Gaetano, F. Margani, V. Barbera [et al.]. – Text : electronic // *Pharmaceutics*. – 2023. – Vol. 15. – № 9. – URL: <https://www.mdpi.com/1999-4923/15/9/2209> (date accessed: 14.01.2026).

138. Development of morin/hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin inclusion complex: Enhancement of bioavailability, antihyperalgesic and anti-inflammatory effects / B. dos S. Lima, C. de A. Campos, A. C. R. da Silva Santos [et al.] // *Food and Chemical Toxicology*. – 2019. – Vol. 126. – P. 15-24.
139. Host-guest inclusion system of scutellarein with 2-hydroxypropyl-beta-cyclodextrin: preparation, characterization, and anticancer activity / F. Wang, B. Yang, Y. Zhao [et al.] // *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*. – 2014. – Vol. 25. – № 6. – P. 594-607.
140. Solubility and dissolution rate improvement of the inclusion complex of apigenin with 2-hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin prepared using the liquid antisolvent precipitation and solvent removal combination methods / W. Wu, Y. Zu, X. Zhao [et al.] // *Drug Development and Industrial Pharmacy*. – 2017. – Vol. 43. – № 8. – P. 1366-1377.
141. Preparation, Characterization and Water Solubility of Inclusion Complexes of Daidzein with Amino-Modified  $\beta$ -Cyclodextrins / Y.-H. Deng, L.-N. Su, Y.-H. Pang [et al.] // *Chinese Journal of Analytical Chemistry*. – 2017. – Vol. 45. – № 5. – P. 648-653.
142. Inclusion Complexes of Daidzein with Cyclodextrin-Based Metal–Organic Framework-1 Enhance Its Solubility and Antioxidant Capacity / Y. Inoue, M. Yoshida, T. Ezawa [et al.] // *AAPS PharmSciTech*. – 2021. – Vol. 23. – № 1. – P. 2.
143. QBD Approach for the Design, Optimization, Development, and Characterization of Naringenin-Loaded Phytosomes to Enhance Solubility and Oral Bioavailability / V. Metkari, R. Shah, N. Salunkhe, S. Gurav // *Journal of Pharmaceutical Innovation*. – 2023. – Vol. 18. – № 4. – P. 2083-2097.
144. Preparation of an isorhamnetin phospholipid complex for improving solubility and anti-hyperuricemia activity / F. Zou, H. Zhao, A. Ma [et al.] // *Pharmaceutical Development and Technology*. – 2022. – Vol. 27. – № 7. – P. 842-852.
145. Luteolin-phospholipid complex: preparation, characterization and biological evaluation / J. Khan, A. Alexander, null Ajazuddin [et al.] // *The Journal of Pharmacy and Pharmacology*. – 2014. – Vol. 66. – № 10. – P. 1451-1462.
146. Quercetin-Phospholipid Complex: An Amorphous Pharmaceutical System in Herbal Drug Delivery / D. Singh, M. S.M. Rawat, A. Semalty, M. Semalty // *Current Drug Discovery Technologies*. – 2012. – Vol. 9. – № 1. – P. 17-24.
147. Formulation and characterization of an apigenin-phospholipid phytosome (APLC) for improved solubility, in vivo bioavailability, and antioxidant potential : Use of phospholipids in oral drug delivery / D. R. Telange, A. T. Patil, A. M. Pethe [et al.] // *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. – 2017. – Vol. 108. – P. 36-49.
148. Preparation and evaluation of kaempferol–phospholipid complex for pharmacokinetics and bioavailability in SD rats / K. Zhang, L. Gu, J. Chen [et al.] // *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. – 2015. – Vol. 114. – P. 168-175.

149. Preparation, optimization, characterization and *in vitro* release of baicalein-solubilizing glycyrrhizic acid nano-micelles / G. You, T. Feng, G. Zhang [et al.] // *International Journal of Pharmaceutics*. – 2021. – Vol. 601. – P. 120546.
150. Daidzein–phospholipid complex loaded lipid nanocarriers improved oral absorption: *in vitro* characteristics and *in vivo* behavior in rats / Z. Zhang, Y. Huang, F. Gao [et al.] // *Nanoscale*. – 2011. – Vol. 3. – № 4. – P. 1780-1787.
151. Formulation of Genistein-HP  $\beta$  Cyclodextrin-Poloxamer 188 Ternary Inclusion Complex: Solubility to Cytotoxicity Assessment / A. Zafar, N. K. Alruwaili, S. S. Imam [et al.]. – Text : electronic // *Pharmaceutics*. – 2021. – Vol. 13. – № 12. – URL: <https://www.mdpi.com/1999-4923/13/12/1997> (date accessed: 14.01.2026).
152. Myricetin Nanofibers Enhanced Water Solubility and Skin Penetration for Increasing Antioxidant and Photoprotective Activities / T.-C. Lin, C.-Y. Yang, T.-H. Wu [et al.]. – Text : electronic // *Pharmaceutics*. – 2023. – Vol. 15. – № 3. – URL: <https://www.mdpi.com/1999-4923/15/3/906> (date accessed: 14.01.2026).
153. A novel matrix dispersion based on phospholipid complex for improving oral bioavailability of baicalein: preparation, *in vitro* and *in vivo* evaluations / Y. Zhou, W. Dong, J. Ye [et al.] // *Drug Delivery*. – 2017. – Vol. 24. – № 1. – P. 720-728.
154. A Novel Cocrystal of Daidzein with Piperazine to Optimize the Solubility, Permeability and Bioavailability of Daidzein / Z. Wang, S. Li, Q. Li [et al.]. – Text : electronic // *Molecules*. – 2024. – Vol. 29. – № 8. – URL: <https://www.mdpi.com/1420-3049/29/8/1710> (date accessed: 14.01.2026).
155. Optimized solubility and bioavailability of genistein based on cocrystal engineering / Z. Wang, Q. Li, Q. An [et al.] // *Natural Products and Bioprospecting*. – 2023. – Vol. 13. – № 1. – P. 30.
156. Naringenin Cocrystals Prepared by Solution Crystallization Method for Improving Bioavailability and Anti-hyperlipidemia Effects / W. Cui, Z. He, Y. Zhang [et al.] // *AAPS PharmSciTech*. – 2019. – Vol. 20. – № 3. – P. 115.
157. The effects of pH, surfactant, ion concentration, cofomer, and molecular arrangement on the solubility behavior of myricetin cocrystals : SI: Enhancement of dissolution and oral bioavailability of poorly water-soluble drugs / S. Ren, M. Liu, C. Hong [et al.] // *Acta Pharmaceutica Sinica B*. – 2019. – Vol. 9. – № 1. – P. 59-73.
158. Daidzein cocrystals: An opportunity to improve its biopharmaceutical parameters / Y. Bhalla, K. Chadha, R. Chadha, M. Karan. – Text : electronic // *Heliyon*. – 2019. – Vol. 5. – № 11. – URL: [https://www.cell.com/heliyon/abstract/S2405-8440\(19\)36329-7](https://www.cell.com/heliyon/abstract/S2405-8440(19)36329-7) (date accessed: 14.01.2026).
159. 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.

160. 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.
161. Crystal Structure, Solubility, and Pharmacokinetic Study on a Hesperetin Cocrystal with Piperine as Coformer / Y. Liu, F. Yang, X. Zhao [et al.]. – Text : electronic // *Pharmaceutics*. – 2022. – Vol. 14. – № 1. – URL: <https://www.mdpi.com/1999-4923/14/1/94> (date accessed: 14.01.2026).
162. Genistein Co-Amorphous Systems with Amino Acids: An Investigation into Enhanced Solubility and Biological Activity / E. Garbiec, N. Rosiak, P. Zalewski [et al.] // *Pharmaceutics*. – 2023. – Vol. 15. – № 12. – P. 2653.
163. Absolute chirality of the  $\gamma$ -polymorph of glycine: correlation of the absolute structure with the optical rotation / K. Ishikawa, M. Tanaka, T. Suzuki [et al.] // *Chemical Communications*. – 2012. – Vol. 48. – № 48. – P. 6031-6033.
164. Glycine, the smallest amino acid, confers neuroprotection against d-galactose-induced neurodegeneration and memory impairment by regulating c-Jun N-terminal kinase in the mouse brain / R. Ullah, M. H. Jo, M. Riaz [et al.] // *Journal of Neuroinflammation*. – 2020. – Vol. 17. – № 1. – P. 303.
165. Flavonoid-Based Cocrystals: A Comprehensive Study on Their Synthesis, Characterization, Physicochemical Properties and Applications / U. I. Maciołek, M. Kosińska-Pezda, T. Martínez-Senra [et al.]. – Text : electronic // *Molecules*. – 2025. – Vol. 30. – № 21. – URL: <https://www.mdpi.com/1420-3049/30/21/4315> (date accessed: 05.02.2026).
166. Co-amorphous salts of luteolin-arginine/lysine with enhanced solubility / S. Lin, Y. Wang, C. Huang [et al.] // *Materials Chemistry and Physics*. – 2026. – Vol. 352. – P. 132014.
167. Трансформация гидрофобных флавоноидов катехина, дигидрокверцетина и кверцетина в водорастворимые структуры / А. М. Коротеев, Г. З. Казиев, М. П. Коротеев [и др.] // *Бутлеровские Сообщения*. – 2020. – Т. 64. – № 10. – С. 14-21.
168. Физико-химическая характеристика коаморфных модификаций на основе дигидрокверцетина и L-лизина / А. А. Свотин, А. А. Ходячих, М. Д. Корочкина [и др.] // *Фармация*. – 2025. – Т. 74. – № 6. – С. 5-13.
169. Kassem, F. A. Ethanol-assisted kneading of apigenin with arginine for enhanced dissolution rate of apigenin: development of rapidly disintegrating tablets / F. A. Kassem, A. E. Abdelaziz, G. M. El Maghraby // *Pharmaceutical Development and Technology*. – 2021. – Vol. 26. – № 6. – P. 693-700.
170. Makadia, J. Apigenin Cocrystals: From Computational Prescreening to Physicochemical Property Characterization / J. Makadia, C. C. Seaton, M. Li // *Crystal Growth & Design*. – 2023. – Vol. 23. – № 5. – P. 3480-3495.

171. Cocrystals of Natural Products: Improving the Dissolution Performance of Flavonoids Using Betaine / Z. Zhang, D. Li, C. Luo [et al.] // *Crystal Growth & Design*. – 2019. – Vol. 19. – № 7. – P. 3851-3859.
172. 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. – № 4. – P. 2348-2356.
173. Solid-state properties, solubility, stability and dissolution behaviour of co-amorphous solid dispersions of baicalin / A. K. Jangid, P. Jain, K. Medicherla [et al.] // *CrystEngComm*. – 2020. – Vol. 22. – № 37. – P. 6128-6136.
174. Novel Pharmaceutical Cocrystals and Solvate Crystals of Nobiletin, a Citrus Flavonoid with Potent Pharmacological Activity / S. Tokunaga, C. Uchikoshi, K. Hayashi [et al.] // *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*. – 2023. – Vol. 71. – № 8. – P. 633-640.
175. Enhancement in dissolution behavior and antioxidant capacity of quercetin with amino acids following radical formation via mechanochemical technique / M. Minode, K. Kadota, D. Kawabata [et al.] // *Advanced Powder Technology*. – 2022. – Vol. 33. – № 5. – P. 103582.
176. Pellets containing quercetin amino acid co-amorphous mixture for the treatment of pain: Formulation, optimization, in-vitro and in-vivo study / P. Hatwar, I. B. Pathan, N. A. H. Chishti, W. Ambekar // *Journal of Drug Delivery Science and Technology*. – 2021. – Vol. 62. – P. 102350.
177. Effect of stoichiometry upon the characteristics of quercetin-arginine cocrystals formulated through solution crystallization / M. Mishra, S. Agrawal, P. Bahadur, S. Tiwari // *Drug Development and Industrial Pharmacy*. – 2024. – Vol. 50. – № 2. – P. 163-172.
178. Cocrystals of quercetin: synthesis, characterization, and screening of biological activity / M. Veverka, T. Dubaj, J. Gallovič [et al.] // *Monatshefte für Chemie - Chemical Monthly*. – 2015. – Vol. 146. – № 1. – P. 99-109.
179. Production of quercetin-proline cocrystals by means of supercritical CO<sub>2</sub> antisolvent / J. L. Dias, E. A. Rebelatto, M. Lanza, S. R. S. Ferreira // *Advanced Powder Technology*. – 2023. – Vol. 34. – № 11. – P. 104222.
180. Improvement in the elution behavior of rutin via binary amorphous solid with flavonoid using a mechanochemical process / S. Fujioka, K. Kadota, M. Yoshida, Y. Shirakawa // *Food and Bioprocess Processing*. – 2020. – Vol. 123. – P. 274-283.
181. Development of a pharmaceutical cocrystal with solution crystallization technology: Preparation, characterization, and evaluation of myricetin-proline cocrystals / M. Liu, C. Hong, Y. Yao [et al.] // *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. – 2016. – Vol. 107. – P. 151-159.

182. Co-crystallization of Hesperidin with different co-formers to enhance solubility, antioxidant and anti-inflammatory activities / M. Elshaer, S. k. Osman, A. M. Mohammed, G. Zayed // *Pharmaceutical Development and Technology*. – 2024. – Vol. 29. – № 7. – P. 691-702.
183. Терехов, Р. П. Влияние фазового состояния на физико-химические, технологические и биофармацевтические параметры дигидрокверцетина : специальность 14.04.02 «Фармацевтическая химия, фармакогнозия» : диссертация ... кандидата фармацевтических наук / Терехов Роман Петрович; ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет). – Москва, 2021. – 173 с.
184. Pharmaceutical cocrystals of naringenin with improved dissolution performance / C. Luo, W. Liang, X. Chen [et al.] // *CrystEngComm*. – 2018. – Vol. 20. – № 22. – P. 3025-3033.
185. A novel daidzein-betaine cocrystal alleviates obesity by improving lipid metabolism, modulating inflammation, and reshaping gut microbiota / Y. Sun, S. Li, R. Liu [et al.] // *Food Bioscience*. – 2025. – Vol. 69. – P. 106834.
186. Bolla, G. Crystal Engineering of Pharmaceutical Cocrystals in the Discovery and Development of Improved Drugs / G. Bolla, B. Sarma, A. K. Nangia // *Chemical Reviews*. – 2022. – Vol. 122. – № 13. – P. 11514-11603.
187. Bolla, G. Pharmaceutical cocrystals: walking the talk / G. Bolla, A. Nangia // *Chemical Communications*. – 2016. – Vol. 52. – № 54. – P. 8342-8360.
188. Разработка хиральных лекарственных средств на основе дигидрокверцетина / И. А. Селиванова, Р. П. Терехов, А. А. Свотин [и др.]. – Текст : электронный. – Воронежский государственный университет, 2023. – С. 374-378. – URL: <https://www.elibrary.ru/item.asp?id=54619428> (дата обращения: 07.04.2026).
189. A highly sensitive and robust UPLC–MS with electrospray ionization method for quantitation of taxifolin in rat plasma / X. Wang, H. Xia, F. Xing [et al.] // *Journal of Chromatography B*. – 2009. – Vol. 877. – № 18. – P. 1778-1786.
190. Bioavailability and Safety of Dihydroquercetin (Review) / S. V. Orlova, V. V. Tatarinov, E. A. Nikitina [et al.] // *Pharmaceutical Chemistry Journal*. – 2022. – Vol. 55. – № 11. – P. 1133-1137.
191. Determination and pharmacokinetic study of taxifolin in rabbit plasma by high-performance liquid chromatography / O. N. Pozharitskaya, M. V. Karlina, A. N. Shikov [et al.] // *Phytomedicine*. – 2009. – Vol. 16. – № 2. – P. 244-251.
192. Основные тенденции и перспективы развития российского рынка инъекционных нейропротекторов / И. А. Наркевич, А. С. Орлов, Т. Ю. Дельви́г-Каменская [и др.] // *Фармация*. – 2019. – Т. 68. – № 8. – С. 34-39.

193. Панков, Д. И. Кокристаллизация дигидрокверцетина с глицином / Д. И. Панков, Р. П. Терехов, И. А. Селиванова // XXII Международная научно-практическая конференция студентов и молодых ученых. – Витебск, 2022.
194. Панков, Д. И. «Зеленый» синтез и анализ лиофилизированных форм дигидрокверцетина / Д. И. Панков. – Текст : электронный. – ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России, 2023. – С. 169-170. – URL: <https://www.elibrary.ru/item.asp?id=54780207> (дата обращения: 07.04.2026).
195. Панков, Д. И. Лиофилизация Как Способ Модификации Физико-Химических Свойств Фармацевтических Субстанций / Д. И. Панков. – Текст : электронный. – федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 2023. – С. 35-40. – URL: <https://www.elibrary.ru/item.asp?id=54259183> (дата обращения: 07.04.2026).
196. Srinivasan, K. Crystal growth of  $\alpha$  and  $\gamma$  glycine polymorphs and their polymorphic phase transformations / K. Srinivasan // Journal of Crystal Growth. – 2008. – Vol. 311. – № 1. – P. 156-162.
197. Modification of the Physicochemical Properties of Active Pharmaceutical Ingredients via Lyophilization / A. Taldaev, D. I. Pankov, R. P. Terekhov [et al.] // Pharmaceutics. – 2023. – Vol. 15. – № 11. – P. 2607.
198. Композиция таксифолин-глицин: супрамолекулярный синтез, физико-химические свойства и цитотоксичность / Д. И. Панков, Р. П. Терехов, М. Д. Корочкина [и др.] // III Всероссийская студенческая научно-практическая конференция с международным участием «Современные достижения фармацевтических наук». – Рязань, 2025. – С. 49.
199. Лиофилизат дигидрокверцетин-глицин / Д. И. Панков, Р. П. Терехов, М. Д. Корочкина [и др.] // XII Всероссийский симпозиум с международным участием «Фенольные соединения: фундаментальные и прикладные аспекты». – Москва, 2025. – С. 66.
200. Insights into the stereoisomerism of dihydroquercetin: analytical and pharmacological aspects / R. P. Terekhov, A. D. Savina, D. I. Pankov [et al.] // Frontiers in Chemistry. – 2024. – Vol. 12. – Insights into the stereoisomerism of dihydroquercetin. – P. 1439167.
201. Панков, Д. И. Хроматографическое разделение диастереомеров дигидрокверцетина / Д. И. Панков, Р. П. Терехов, Селиванова, И.А. // XXII Менделеевский съезд по общей и прикладной химии. – Федеральная территория «Сириус», 2024. – Т. 2. – С. 445.
202. Development and Validation of 2-Azaspiro [4,5] Decan-3-One (Impurity A) in Gabapentin Determination Method Using qNMR Spectroscopy / N. E. Kuz'mina, S. V. Moiseev, M. D. Khorolskiy, A. I. Lutceva // Molecules. – 2021. – Vol. 26. – № 6. – P. 1656.

203. Bocian, S. Phenyl-bonded stationary phases—The influence of polar functional groups on retention and selectivity in reversed-phase liquid chromatography / S. Bocian, B. Buszewski // *Journal of Separation Science*. – 2014. – Vol. 37. – № 23. – P. 3435-3442.
204. Identification of flavonoids in *Hymenaea martiana* Hayne (Fabaceae) by HPLC-DAD-MS<sup>n</sup> analysis / A. G. M. Pacheco, A. Branco, C. A. Câmara [et al.] // *Natural Product Research*. – 2021. – Vol. 35. – № 14. – P. 2414-2419.
205. Taxifolin and Sorghum Ethanol Extract Protect against Hepatic Insulin Resistance via the miR-195/IRS1/PI3K/AKT and AMPK Signalling Pathways / H. Lee, W.-T. Jeong, Y.-S. So [et al.] // *Antioxidants*. – 2021. – Vol. 10. – № 9. – P. 1331.
206. A fragmentation study of dihydroquercetin using triple quadrupole mass spectrometry and its application for identification of dihydroflavonols in *Citrus* juices / B. Abad-García, S. Garmón-Lobato, L. A. Berrueta [et al.] // *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. – 2009. – Vol. 23. – № 17. – P. 2785-2792.
207. Панков, Д. И. Стереизомерный состав дигидрокверцетина / Д. И. Панков, Р. П. Терехов, И. А. Селиванова // 6-я Российская конференция по медицинской химии. – Нижний Новгород : ООО «АДМИРАЛ ПРИНТ», 2024. – С. 269.
208. Modification of Taxifolin Properties by Spray Drying / A. Taldaev, R. P. Terekhov, I. A. Selivanova [et al.] // *Scientia Pharmaceutica*. – 2022. – Vol. 90. – № 4. – P. 67.
209. Spatial structure of taxifolin's diastereomers via NMR analysis / R. P. Terekhov, A. Taldaev, E. V. Bocharov [et al.]. – Text : electronic. – ООО «Издательство ВВМ», 2024. – P. 327-329. – URL: <https://www.elibrary.ru/item.asp?id=67227286> (date accessed: 07.04.2026).
210. Analysis of *cis*-isomer-enriched dihydroquercetin sample by 1D and 2D NMR spectroscopy / R. P. Terekhov, A. Taldaev, E. V. Bocharov [et al.] // *Drug Development & Registration*. – 2024. – Vol. 13. – № 2. – P. 68-76.
211. Панков, Д. И. Исследование изомеризации транс-дигидрокверцетина методом ВЭЖХ-УФ-МС/МС / Д. И. Панков, М. А. Токарева, М. Д. Корочкина. – Текст : электронный. – Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет, 2024. – С. 649-652. – URL: <https://www.elibrary.ru/item.asp?id=68013194> (дата обращения: 07.04.2026).
212. Панков, Д. И. Эпимеризация дигидрокверцетина / Д. И. Панков, Р. П. Терехов, Селиванова, И.А. // II Всероссийская студенческая научно-практическая конференция с международным участием «Современные достижения фармацевтических наук». – Рязань, 2024. – С. 14-15.
213. Pankov, D. I. Chromatographic control of dihydroquercetin diastereomerization / D. I. Pankov, R. P. Terekhov, Selivanova, I. A. // XIII International conference on chemistry for young scientists “MENDELEEV 2024”. – Saint Petersburg, 2024. – P. 496.

214. Kiehlmann, E. Isomerization of Dihydroquercetin / E. Kiehlmann, E. P. M. Li // *Journal of Natural Products*. – 1995. – Vol. 58. – № 3. – P. 450-455.
215. Панков, Д. И. Изучение влияния лиофилизации на стереоизомерный состав дигидрокверцетина в композиции с глицином / Д. И. Панков, Р. П. Терехов, И. А. Селиванова // II Международная конференция – Интеграционные связи фармацевтической экологии. – Москва, 2025. – С. 80-82.
216. Рекомендация Коллегии ЕЭК № 30 от 11.11.2025 О Руководстве по фармацевтической разработке лекарственных средств. – URL: <https://docs.eaeunion.org/documents/450/10282/> (дата обращения: 20.02.2026). – Текст : электронный.
217. Modern Preservatives of Microbiological Stability (Review) / M. N. Anurova, E. O. Bakhrushina, N. B. Demina, E. S. Panteleeva // *Pharmaceutical Chemistry Journal*. – 2019. – Vol. 53. – № 6. – P. 564-571.
218. Определение стабильности процесса стерилизации инфузионных растворов / Я. И. Абрамова, В. С. Чучалин, А. А. Кузьмина, С. М. Тарабукина // *Разработка и регистрация лекарственных средств*. – 2016. – № 2. – С. 76-79.
219. Влияние обработки низкотемпературной плазмой на уровень микробной контаминации лекарственного растительного сырья / О. М. Тихомирова, Е. Ю. Загоруйко, А. А. Ерузин [и др.] // *Разработка и регистрация лекарственных средств*. – 2017. – № 4. – С. 198-201.
220. Radiation sterilization of medicinal formulations of doxorubicin bound to poly(butylcyanoacrylate) nanoparticles / O. O. Maksimenko, E. P. Pavlov, É. G. Tushov [et al.] // *Pharmaceutical Chemistry Journal*. – 2008. – Vol. 42. – № 6. – P. 363-367.
221. Лабораторная оценка влияния радиационной стерилизации на химический состав и антимикробную активность лекарственного средства «ФитоМП» и его компонента - маклейи мелкоплодной / А. В. Фролова, Г. Н. Бузук, В. М. Царенков [и др.] // *Вестник фармации*. – 2007. – № 1 (35). – С. 83-91.
222. Sarcan, E. T. Ionizing radiation and its effects on pharmaceuticals / E. T. Sarcan, A. Y. Ozer // *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*. – 2020. – Vol. 323. – № 1. – P. 1-11.
223. Влияние ионизирующего излучения на стереохимический состав образца дигидрокверцетина / Д. И. Панков, М. Д. Корочкина, Р. П. Терехов [и др.] // *Фармация*. – 2024. – Т. 73. – № 6. – С. 32-38.
224. Влияние «зеленого» способа деконтаминации на стереохимический состав дигидрокверцетина / Д. И. Панков, А. Д. Савина, М. Д. Корочкина [и др.] // II Международная конференция – Интеграционные связи фармацевтической экологии. – Москва, 2025. – С. 78-80.

225. Diastereomers of Spheroidal Form and Commercially Available Taxifolin Samples / R. P. Terekhov, E. S. Melnikov, I. D. Nikitin [et al.] // *Scientia Pharmaceutica*. – 2024. – Vol. 92. – № 1. – P. 5.
226. Современные подходы к анализу стереоизомерного состава дигидрокверцетина / Р. П. Терехов, А. Д. Савина, Д. И. Панков [и др.] // *Фармация*. – 2024. – Т. 73. – № 2. – С. 5-12.
227. Effect of High Pressure on the Crystal Structures of Polymorphs of Glycine / A. Dawson, D. R. Allan, S. A. Belmonte [et al.] // *Crystal Growth & Design*. – 2005. – Vol. 5. – № 4. – P. 1415-1427.
228. Perlovich, G. L. The Polymorphism of Glycine. Thermochemical and structural aspects / G. L. Perlovich, L. K. Hansen, A. Bauer-Brandl // *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*. – 2001. – Vol. 66. – № 3. – P. 699-715.
229. Absolute chirality of the  $\gamma$ -polymorph of glycine: correlation of the absolute structure with the optical rotation / K. Ishikawa, M. Tanaka, T. Suzuki [et al.] // *Chemical Communications*. – 2012. – Vol. 48. – № 48. – P. 6031-6033.
230. Marsh, R. E. A refinement of the crystal structure of glycine / R. E. Marsh // *Acta Crystallographica*. – 1958. – Vol. 11. – № 9. – P. 654-663.
231. Iitaka, Y. Crystal Structure of  $\beta$ -Glycine / Y. Iitaka // *Nature*. – 1959. – Vol. 183. – № 4658. – P. 390-391.
232. Solid-state chiral resolution mediated by stoichiometry: crystallizing etiracetam with  $ZnCl_2$  / O. Shemchuk, L. Song, K. Robeyns [et al.] // *Chemical Communications*. – 2018. – Vol. 54. – № 77. – P. 10890-10892.
233. Wallach, O. Zur Kenntniss der Terpene und ätherischen Oele / O. Wallach // *Justus Liebigs Annalen der Chemie*. – 1887. – Vol. 238. – № 1-2. – P. 78-89.
234. Meyerhoffer, W. Stereochemische Notizen / W. Meyerhoffer // *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft*. – 1904. – Vol. 37. – № 3. – P. 2604-2610.
235. Glycine Crystallization During Freezing: The Effects of Salt Form, pH, and Ionic Strength / M. J. Akers, N. Milton, S. R. Byrn, S. L. Nail // *Pharmaceutical Research*. – 1995. – Vol. 12. – № 10. – P. 1457-1461.
236. Pyne, A. Phase Transitions of Glycine in Frozen Aqueous Solutions and During Freeze-Drying / A. Pyne, R. Suryanarayanan // *Pharmaceutical Research*. – 2001. – Vol. 18. – № 10. – P. 1448-1454.
237. Peter, M. E. Growth of gamma glycine crystal and its characterisation / M. E. Peter, P. Ramasamy // *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. – 2010. – Vol. 75. – № 5. – P. 1417-1421.

238. Hydrogen bonded nonlinear optical  $\gamma$ -glycine: Crystal growth and characterization / B. Narayana Moolya, A. Jayarama, M. R. Sureshkumar, S. M. Dharmaprakash // *Journal of Crystal Growth*. – 2005. – Vol. 280. – № 3. – P. 581-586.
239. Твердофазный продукт на основе дигидрокверцетина и глицина: получение и физико-химические свойства / Д. И. Панков, Р. П. Терехов, А. А. Рахимов [и др.] // *Фармация*. – 2025. – Т. 74. – № 5. – С. 12-20.
240. Лиофилизаты. – URL: <https://pharmacopoeia.regmed.ru/pharmacopoeia/izdanie-15/1/1-4/1-4-1-lekarstvennye-formy/liofilizaty/> (дата обращения: 27.02.2026). – Текст : электронный.
241. Assembling the Puzzle of Taxifolin Polymorphism / R. P. Terekhov, I. A. Selivanova, N. A. Tyukavkina [et al.] // *Molecules*. – 2020. – Vol. 25. – № 22. – P. E5437.
242. Разработка и валидация методик количественного определения компонентов лиофилизата дигидрокверцетин-глицин / Д. И. Панков, Е. М. Сухова, Р. П. Терехов [и др.] // *Фармация*. – 2025. – Т. 74. – № 8. – С. 40-51.
243. Валидация аналитических методик. – URL: <https://pharmacopoeia.regmed.ru/pharmacopoeia/izdanie-15/1/1-1/validatsiya-analiticheskikh-metodik/> (дата обращения: 27.02.2026). – Текст : электронный.
244. Решение Коллегии ЕЭК № 113 от 17.07.2018 Об утверждении Руководства по валидации аналитических методик проведения испытаний лекарственных средств. – URL: <https://docs.eaeunion.org/documents/253/3777/> (дата обращения: 27.02.2026). – Текст : электронный.
245. Epshtein, N. A. Validation of Analytical Procedures: Graphic and Calculated Criteria for Assessment of Methods Linearity in Practice / N. A. Epshtein // *Drug development & registration*. – 2019. – Vol. 8. – № 2. – P. 122-130.
246. Horwitz, W. Quality Assurance in the Analysis of Foods for Trace Constituents / W. Horwitz, L. V. R. Kamps, K. W. Boyer // *Journal of AOAC International*. – 1980. – Vol. 63. – № 6. – P. 1344-1354.
247. Эпштейн, Н. А. Определение внутрилабораторной прецизионности (воспроизводимости) при валидации методик в фармации / Н. А. Эпштейн // *Разработка и регистрация лекарственных средств*. – 2016. – № 1. – С. 106-117.
248. Ruhemann, S. Cyclic di- and tri-ketones / S. Ruhemann // *J. Chem. Soc., Trans.* – 1910. – Vol. 97. – P. 1438-1449.
249. McCaldin, D. J. The Chemistry of Ninhydrin. / D. J. McCaldin // *Chemical Reviews*. – 1960. – Vol. 60. – № 1. – P. 39-51.
250. Fitzpatrick, W. H. Spectrophotometric Determination of Amino Acids by the Ninhydrin Reaction / W. H. Fitzpatrick // *Science*. – 1949. – Vol. 109. – № 2836. – P. 469-469.

251. Moore, S. Amino Acid Analysis: Aqueous Dimethyl Sulfoxide As Solvent for the Ninhydrin Reaction / S. Moore // *Journal of Biological Chemistry*. – 1968. – Vol. 243. – № 23. – P. 6281-6283.
252. The Ninhydrin Reaction Revisited: Optimisation and Application for Quantification of Free Amino Acids / A. C. Stauß, C. Fuchs, P. Jansen [et al.] // *Molecules*. – 2024. – Vol. 29. – № 14. – P. 3262.
253. Horwitz, W. The Horwitz Ratio (HorRat): A Useful Index of Method Performance with Respect to Precision / W. Horwitz, R. Albert // *Journal of AOAC International*. – 2006. – Vol. 89. – № 4. – P. 1095-1109.
254. Рахимов, А. А. Определение тяжелых металлов и мышьяка в лиофилизате дигидрокверцетин-глицин / А. А. Рахимов, Д. И. Панков, Селиванова, И.А. // III Всероссийская студенческая научно-практическая конференция с международным участием «Современные достижения фармацевтических наук». – Рязань, 2025. – С. 51.
255. Prediction of the Biological Activity Spectra of Organic Compounds Using the Pass Online Web Resource / D. A. Filimonov, A. A. Lagunin, T. A. Glorizova [et al.] // *Chemistry of Heterocyclic Compounds*. – 2014. – Vol. 50. – № 3. – P. 444-457.
256. Cytotoxicity assessment of natural biologically active compounds / M. D. Korochkina, D. R. Kolesnikova, A. A. Svozin [и др.] // *The 5th China-Russia International Symposium for Young Scholars*. – Guangzhou, 2024. – С. 5.
257. Comparison of antioxidant activity of dihydroquercetin samples with different diastereomeric composition / R. P. Terekhov, I. R. Ilyasov, B. Li [et al.] // *Drug development & registration*. – 2026. – Vol. 15. – № 1. – P. 43-52.

## Приложение А. Акт внедрения в учебный процесс

УТВЕРЖДАЮ

Проректор по учебной работе

ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова  
Минздрава России (Сеченовский Университет)

к.фарм.н., доц. Литвинова Т.М.



20 25.

08 ИЮЛ 2025

АКТ

704

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 Панкова Дениса Игоревича

**Предмет внедрения:** основные научные положения, выводы и рекомендации кандидатской диссертации Панкова Д.И. «Разработка состава и методик контроля качества композиции на основе дигидрокверцетина и глицина».

**Кем предложен:** Панков Д.И., аспирант кафедры химии Института фармации им. А.П. Нелюбина ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова (Сеченовский Университет).

**Кем и где выдано:** ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), 119048, Москва, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2.

**Цель внедрения:** обеспечение надлежащего уровня знаний, умений и навыков в области инженерии кристаллов флавоноидов и анализа их композиций с аминокислотами у студентов, обучающихся по направлениям подготовки 33.05.01 Фармация, 19.03.01 Биотехнология, 30.05.01 Медицинская биохимия.

**Результаты внедрения:** основные научные положения, выводы и рекомендации кандидатской диссертации Панкова Д.И. используются в образовательном процессе на кафедре химии при преподавании дисциплин «Органическая химия», «Химия биологически активных веществ», «Методы фармакопейного анализа».

Директор  
Института фармации им. А.П. Нелюбина

д.фарм.н., проф. Раменская Г.В.

(подпись)

Заведующий кафедрой химии

д.фарм.н., проф. Нестерова О.В.

(подпись)

Начальник Учебного управления

к.м.н. Юдина Л.Ю.

(подпись)

## Приложение Б. Акт внедрения в производственный процесс

УТВЕРЖДАЮ

Генеральный директор ООО "Робиос"  
Петрова Е.Н.  
«20» октября 2025г.



## АКТ

внедрения в работу отдела контроля качества общества с ограниченной ответственностью "Робиос" результатов диссертационной работы Панкова Дениса Игоревича

**Предмет внедрения:** аналитическая методика, позволяющая разделить диастереомеры дигидрокверцетина в составе лиофилизата дигидрокверцетин-глицин.


**Кем предложен:** Панков Д.И., аспирант кафедры химии Института фармации им. А.П. Нелюбина ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова (Сеченовский Университет).

**Кем и где выдано:** ООО "Робиос", 142204, Московская обл., г. Серпухов, Северное шоссе, д. 16.

**Цель внедрения:** для обеспечения контроля диастереомерного состава выпускаемого дигидрокверцетина.

**Результаты внедрения:** основные научные положения, выводы и рекомендации кандидатской диссертации Панкова Д.И. используются в контроле качества выпускаемой продукции ООО "Робиос".

Начальник отдела контроля качества  
ООО "Робиос"

  
(подпись)

Кравченко О.В.

## Приложение В. Способы получения дигидрокверцетина

Таблица В.1 – Патенты РФ на способы получения дигидрокверцетина

№, год подачи	Название	Экстрагент	Температура экстракции, °С
SU 351847 A1, 1970	Способ выделения дигидрокверцетина	Вода	80-100
RU 2 000 797 C1, 1992	Способ выделения дигидрокверцетина	Вода	100
RU 2 034 559 C1, 1993	Способ выделения дигидрокверцетина	Этилацетат	Без нагревания
RU 2 038 094 C1, 1994	Способ получения дигидрокверцетина	Вода, ацетон	18
RU 2 082 425 C1, 1995	Способ получения дигидрокверцетина	Этилацетат, бензин, гексан	77
RU 2 091 076 C1, 1996	Способ получения дигидрокверцетина	Вода, ацетон	40
RU 2 114 631 C1, 1997	Способ выделения дигидрокверцетина	Вода, ацетон	40
RU 2 174 403 C2, 1998	Способ получения диквертина - нового фитопрепарата широкого терапевтического действия	Этилацетат	60-70
RU 2 158 598 C2, 1998	Способ получения дигидрокверцетина	Этилацетат	77
RU 2 135 510 C1, 1998	Способ переработки древесины лиственницы и установка для его осуществления	Гексан и водный раствор этанола	30-40
RU 2 165 416 C1, 2000	Способ переработки древесины лиственницы и способ выделения нативных биофлавоноидов, полученных в процессе переработки	1 стадия: гексан или бензины с $T_{кип} \leq 180$ °С 2 стадия: низкокипящие эфиры с $T_{кип} \leq 90$ °С	30-40
RU 2 180 566 C1, 2001	Способ выделения дигидрокверцетина	Вода	70-92
RU 2 184 561 C1, 2001	Способ получения дигидрокверцетина	Водно-ацетоновый раствор или раствор этилового или метилового спиртов	40-45

Продолжение Таблицы В.1

RU 2 206 568 C1, 2002	Способ переработки древесины лиственницы с выделением дигидрокверцетина и устройство для его осуществления	Этанол:вода 0,5:4 (м/м)	30-40
RU 2 211 836 C1, 2002	Способ переработки древесины лиственницы с выделением дигидрокверцетина и устройство для его осуществления	1-я стадия: Вода+углеводород 2-стадия: Вода+этанол	30-40
RU 2 233 858 C1, 2003	Способ комплексной переработки древесины лиственницы	Вода	70-92
RU 2 255 750 C2, 2003	Способ получения дигидрокверцетина	80-100% водный раствор метанола	110
		80-100% водный раствор ацетона или этилацетата	115
		80-100% водный раствор этанола	125
RU 2 258 525 C1, 2004	Способ очистки дигидрокверцетина и дигидрокемферола из экстрактов биофлаваноидов, полученных в процессе переработки древесины	Этилацетат и ацетон	Без нагревания
RU 2 252 220 C1, 2004	Способ комплексной переработки хвои, коры и отходов заготовки и переработки древесины лиственницы и способ выделения дигидрокверцетина	Гексан или бензины с $T_{кип} < 180 \text{ }^{\circ}\text{C}$	Не более 38
RU 2 279 284 C1, 2005	Способ комплексной переработки древесины лиственницы	Этанол	22-25
RU 2 318 528 C2, 2006	Способ получения дигидрокверцетина	Метанол или этанол, ацетон, этилацетат или их смесь	Без нагревания
RU 2 317 093 C1, 2006	Способ выделения биологически активных изомеров дигидрокверцетина	90-95% водный раствор этанола	55-66

Продолжение Таблицы В.1

RU 2 307 834 C1, 2006	Способ получения препарата растворимого дигидрокверцетина	Вода	Без нагревания
RU 2 330 677 C1, 2007	Способ получения дигидрокверцетина	75-85% водный раствор этанола	45-50
RU 2 359 666 C2, 2007	Способ выделения секоизоларицирезинола и дигидрокверцетина из древесины (варианты)	50-75% водный раствор ацетона, пропанола-2 или этанола	Без нагревания
RU 2 346 941 C2, 2007	Способ выделения дигидрокверцетина из древесины лиственницы и установка для его осуществления	Пропанол-2:вода или этилацетат:вода	Температура кипения растворителя
RU 2 349 331 C1, 2007	Способ получения дигидрокверцетина	Метанол, этанол, пропанол-2	60
RU 2 386 624 C2, 2007	Способ получения дигидрокверцетина из отходов лесозаготовки и лесопереработки лиственницы	1 стадия: сухой гидроксид натрия 2 стадия: вода	Без нагревания
RU 2 372 095 C1, 2008	Способ получения нативной формы дигидрокверцетина	80-86% раствор этанола	Без нагревания
RU 2 435 766 C1, 2010	Способ получения дигидрокверцетина	75 % раствор этанола	40-50
RU 2 629 770 C1, 2016	Способ получения дигидрокверцетина из древесины лиственницы сибирской	10-25 % раствор этанола	Температура кипения растворителя
RU 2 747 696 C1, 2020	Способ получения дигидрокверцетина	Сжиженный углекислый газ	20,0-31,5
RU 2 814 536 C1, 2023	Способ получения дигидрокверцетина из отходов лесопереработки и лесозаготовки лиственницы	1 стадия: сухие карбонат натрия и хлорид натрия 2 стадия: вода	Без нагревания