

На правах рукописи



Панков Денис Игоревич

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

3.4.2. Фармацевтическая химия, фармакогнозия

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата фармацевтических наук

Москва – 2026

Работа выполнена в федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего образования Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет)

Научный руководитель:

доктор фармацевтических наук, профессор

Селиванова Ирина Анатольевна

Официальные оппоненты:

Тринеева Ольга Валерьевна, доктор фармацевтических наук, профессор, федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Воронежский государственный университет», кафедра фармацевтической химии и фармакогнозии, заведующий кафедрой

Зилфикаров Ифрат Назимович, доктор фармацевтических наук, профессор РАН, федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Всероссийский научно-исследовательский институт лекарственных и ароматических растений», отдел химии и технологии природных соединений, главный научный сотрудник

Ведущая организация:

федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Самарский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита диссертации состоится 17 июня 2026 г. в 12:00 на заседании диссертационного совета ДСУ 208.002.02 при ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) по адресу: 119048, Москва, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2.

С диссертацией можно ознакомиться в Фундаментальной учебной библиотеке ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) по адресу: 119034, г. Москва, Зубовский бульвар, д. 37, стр. 1 и на сайте организации: <https://www.sechenov.ru>.

Автореферат диссертации разослан «____» _____ 2026 г.

Ученый секретарь

диссертационного совета ДСУ 208.002.02
доктор фармацевтических наук, профессор

Демина Наталья Борисовна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

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 β -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 β -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 α -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 коформером, 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 σ -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: σ -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 σ -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 σ -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.

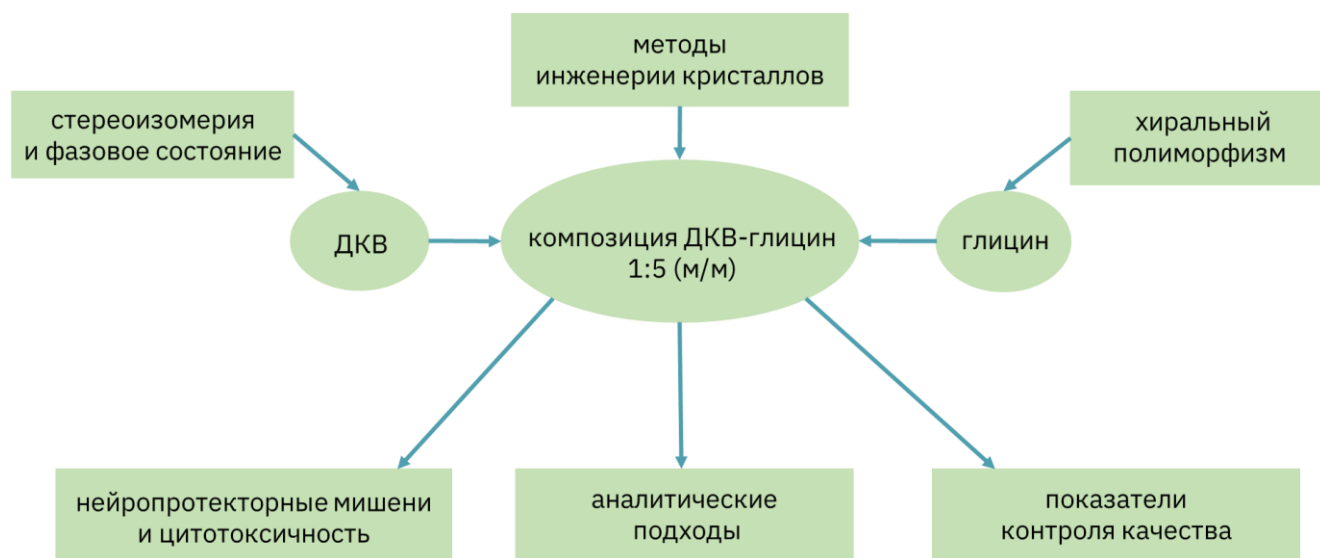


Рисунок 1 – Объекты и дизайн исследования

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 σ -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 σ -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 ^1H .
4. Комплексный подход к характеристике морфологии (форма, размер, гомогенность частиц), фазового состояния (коаморфное или кокристаллическое) и физико-химических параметров (растворимость, положения полос поглощения в ИК-спектре, величины химических сдвигов на спектрах ЯМР 1D и 2D, температуры фазовых переходов и оптическая активность) 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 σ -диастереомеров дигидрокверцетина, представленных в диссертации. Разработанные методики валидированы по показателям: специфичность, линейность, прецизионность и правильность. 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. Часть работы выполнена 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.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы

Объектом исследования служила композиция ДКВ-глицин, объектами сравнения – ДКВ (ФС 000388-270812), глицин (ФС 001825-280125), формулы которых представлены на рисунке 2, и стандартный образец состава дигидрокверцетина (ГСО 10766-2016).

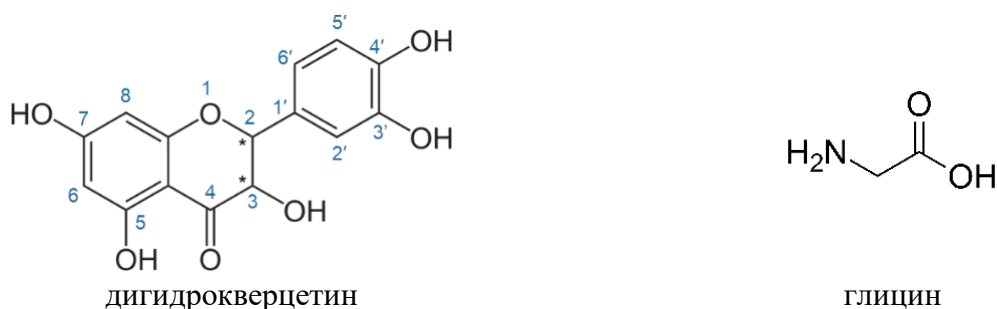


Рисунок 2 – Структурные формулы ДКВ и глицина

σ -Диастереомерный состав ДКВ был исследован на промышленных партиях трех производителей.

Композиция ДКВ-глицин была проанализирована методами: СЭМ, РПД, ДСК, ТГ, ИК и УФ-спектроскопией, спектроскопией ЯМР $1D^1H$, ^{13}C и $2D^1H,^{13}C$ -HSQC.

Мишени нейропротекторного действия прогнозировали в программе PASS. Цитотоксичность определяли на клеточных линиях CaCo-2, HEK293, HUVEC и 3T3 при помощи ССК-8.

В работе было использовано следующее оборудование: влагомер I-Thermo GA64M (BEL Engineering srl, Монца, Италия); дифрактометр порошковый ARL X'TRA (Thermo Electron Corporation, Уолтем, Массачусетс, США); калориметр сканирующий DSC 204 HP Phoenix® (Netzsch GmbH & Co. KG, Зельб, Германия); лиофильная сушилка (BK-FD12P, Jinan Biobase Medical Co, Ltd., Шандонг, Китай); микроскоп сканирующий электронный JSM-6380LA (JEOL Technics Ltd., Акишима, Япония); 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); спектрометр атомно-абсорбционный Spectr AA-240 FS; спектрометр инфракрасный ФСМ 2202 (ООО «Инфраспек», Санкт-Петербург, Россия); спектрометр эмиссионный с индуктивно-связанной плазмой iCAP 7400 DUO (Thermo Scientific); спектрометр ядерного магнитного резонанса Bruker Avance III (Германия); спектрофотометр Specord 250 (Analytik Jena AG, Йена, Германия); термовесы TG 209 F1 Libra® (Netzsch GmbH & Co. KG, Зельб, Германия); хроматограф LicArt 62 (ООО «Лабконцепт», Санкт-Петербург, Россия); хроматограф Shimadzu LC-30 (Shimadzu Corporation, Киото, Япония).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Супрамолекулярный синтез композиции

Базовые методы инженерии кристаллов (сухой гриндинг, кристаллизацию на границе раздела фаз, суспендирование, распылительную сушку и лиофилизацию) использовали для оптимизации получения композиции под контролем СЭМ.

Новая монофазная композиция флавоноид-аминокислота получена путем лиофилизации водного раствора, содержащего ДКВ и глицин в соотношении 1:5 (м/м) при температуре $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ и разрежении 25 Па.

Характеристика композиции дигидрокверцетин-глицин

Морфология. Твердая фаза лиофилизата ДКВ-глицин является гомогенной, представляет собой частицы в форме тонких чешуек размером от 50 до 500 мкм с перфорированной поверхностью, диаметр отверстий составляет 20-50 мкм, при увеличении 2000× становятся различимы бороздки (Рисунок 3А), в отличие от морфологической картины исходных компонентов (Рисунок 3Б,В), в которой видны отдельные частицы ДКВ и глицина.

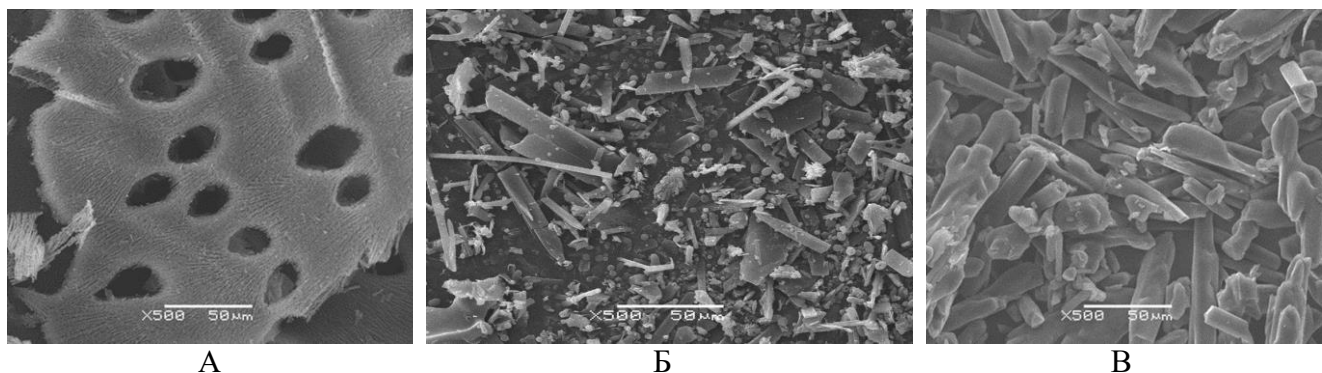


Рисунок 3 – Морфология лиофилизатов: А – ДКВ-глицин, Б – ДКВ, В – глицина

Дифракционный анализ. Композиция ДКВ-глицин отличается от исходных веществ значительно меньшей степенью кристалличности и появлением новых пиков отражения при значениях 2θ 17,9°, 20,3°, 31,0° и 41,1° (Рисунок 4А).

Термический анализ. Температура плавления композиции ДКВ-глицин составляет 210 °С. Кристаллизация аморфного флавоноида в составе композиции не наблюдается, следовательно, ДКВ полностью израсходован на образование комплекса с аминокислотой (Рисунок 4Б). На кривой ДСК композиции виден фазовый переход γ -глицина в α -форму при температуре 197 °С, свидетельствующий о том, что часть глицина осталась несвязанной.

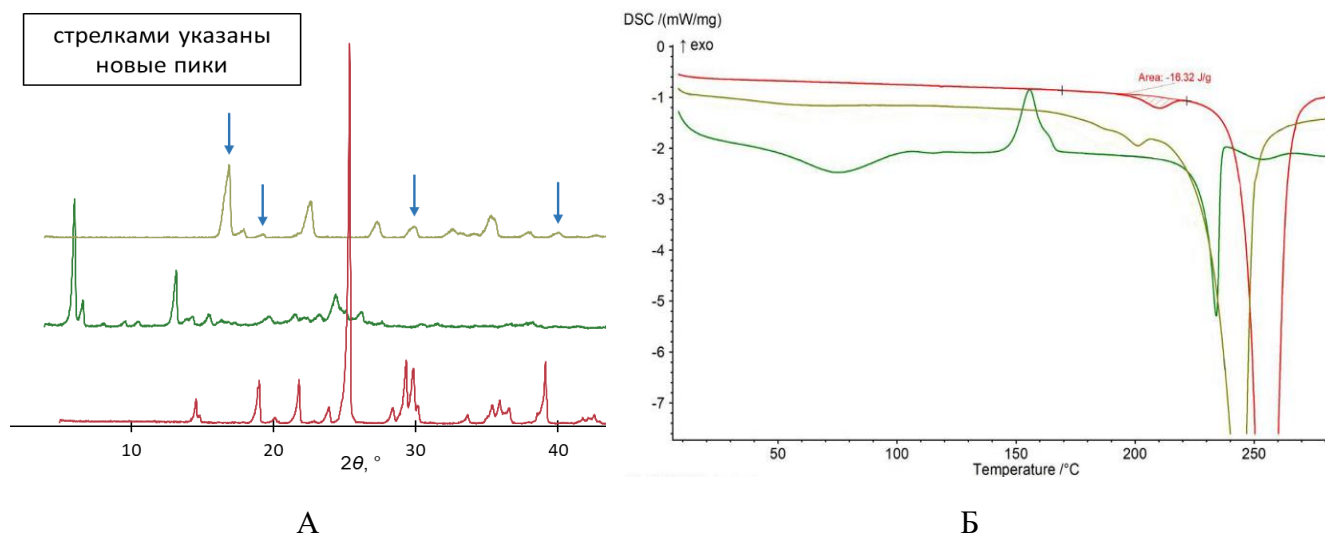


Рисунок 4 – Дифрактограммы (А) и кривые ДСК (Б) лиофилизатов: ДКВ-глицин (желтый), ДКВ (зеленый), глицин (красный)

Анализ методами спектроскопии ЯМР ^1H и ^{13}C . Спектры композиции ДКВ-глицин на ядрах ^1H (Рисунок 5) и ^{13}C (Рисунок 6) содержат сигналы с теми же значениями химических сдвигов, что и спектры исходных веществ, что подтверждает отсутствие ковалентных связей между флавоноидом и аминокислотой в композиции.

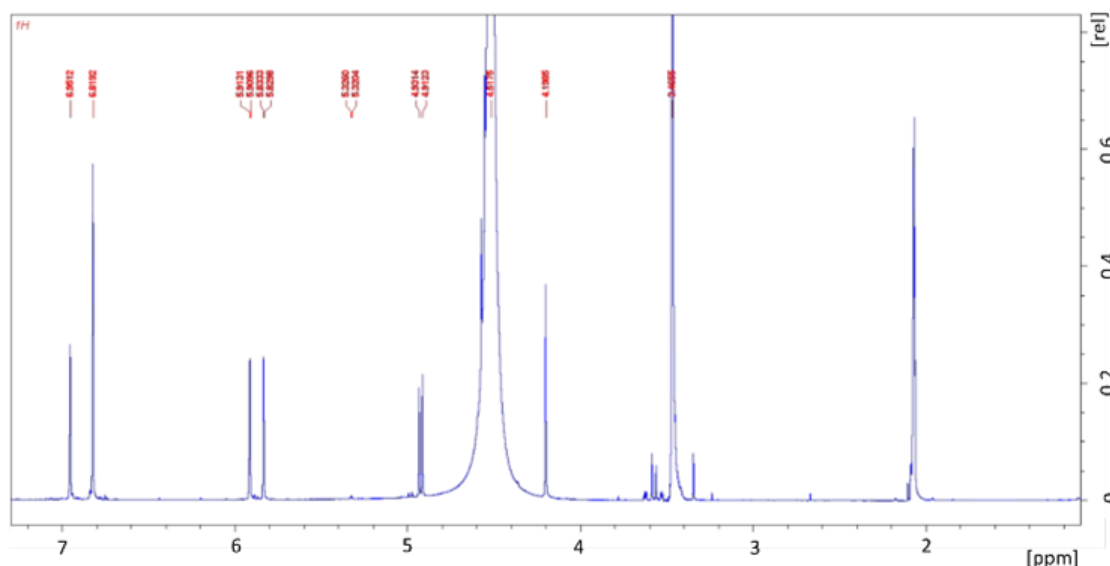


Рисунок 5 – 1D ^1H ЯМР-спектр композиции ДКВ-глицин

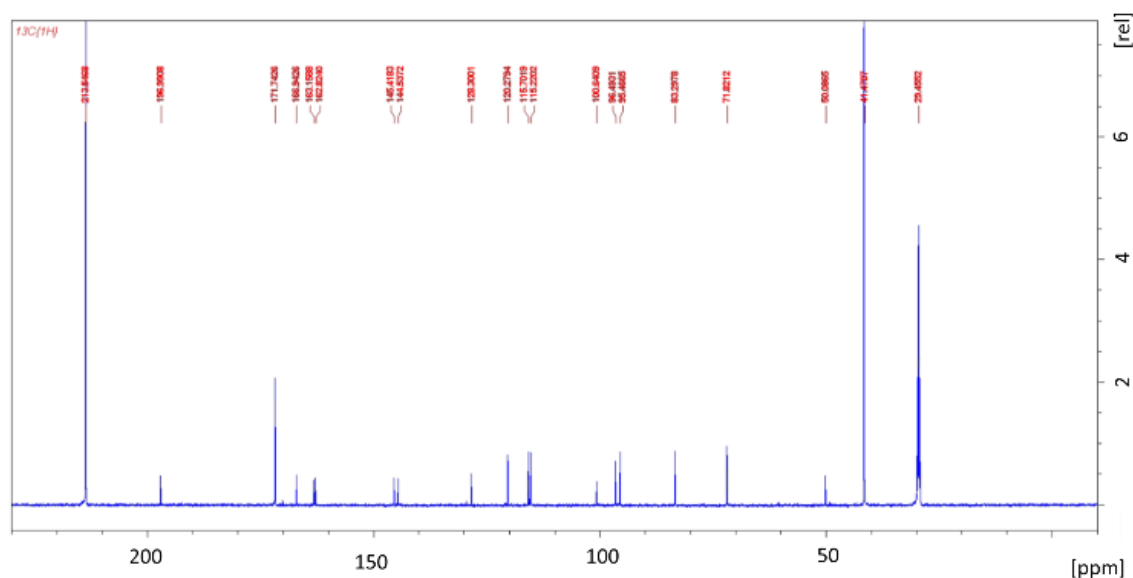


Рисунок 6 – $1D^{13}C$ ЯМР-спектр композиции ДКВ-глицин

Анализ методом ИК-спектроскопии. В ИК-спектре композиции по сравнению с исходными компонентами произошли следующие изменения: исчезла полоса поглощения ν_{O-H} групп ДКВ, связанных внутримолекулярной водородной связью при 3310 см^{-1} (фенольный гидроксил у С5 и карбонил у С4) и появилась полоса свободных валентных колебаний O–H групп ДКВ при 3446 см^{-1} . Наблюдается сдвиг полос поглощения $\nu_{C=O}$ ДКВ с 1635 см^{-1} до 1610 см^{-1} , ν_{N-H} глицина кватернизованного атома азота с 3177 см^{-1} до 3171 см^{-1} . Изменения 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 ($\text{NH}_3^+ \cdots \text{O}=\text{C}^4$).

Растворимость композиции в физиологическом растворе в 1,9 раза превышает растворимость ДКВ (Рисунок 7).

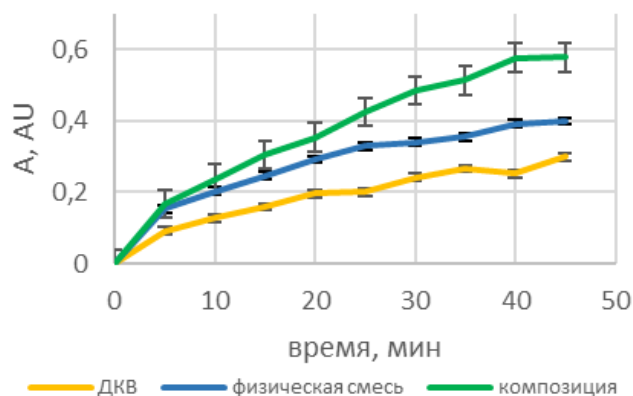


Рисунок 7 – Кинетика растворения объектов исследования в физиологическом растворе

Сtereoхимические особенности компонентов композиции

В молекуле ДКВ содержатся два центра хиральности в положениях С-2 и С-3, поэтому ДКВ может существовать в виде 4 стереоизомеров, из которых природным является *транс*-изомер с (2*R*,3*R*)-конфигурацией центров хиральности.

Пространственные особенности строения молекулы ДКВ и наличие твердых хиральных полиморфных форм у глицина вызвало несомненный научный интерес и послужило основой для углубленного изучения стереохимических особенностей строения компонентов композиции.

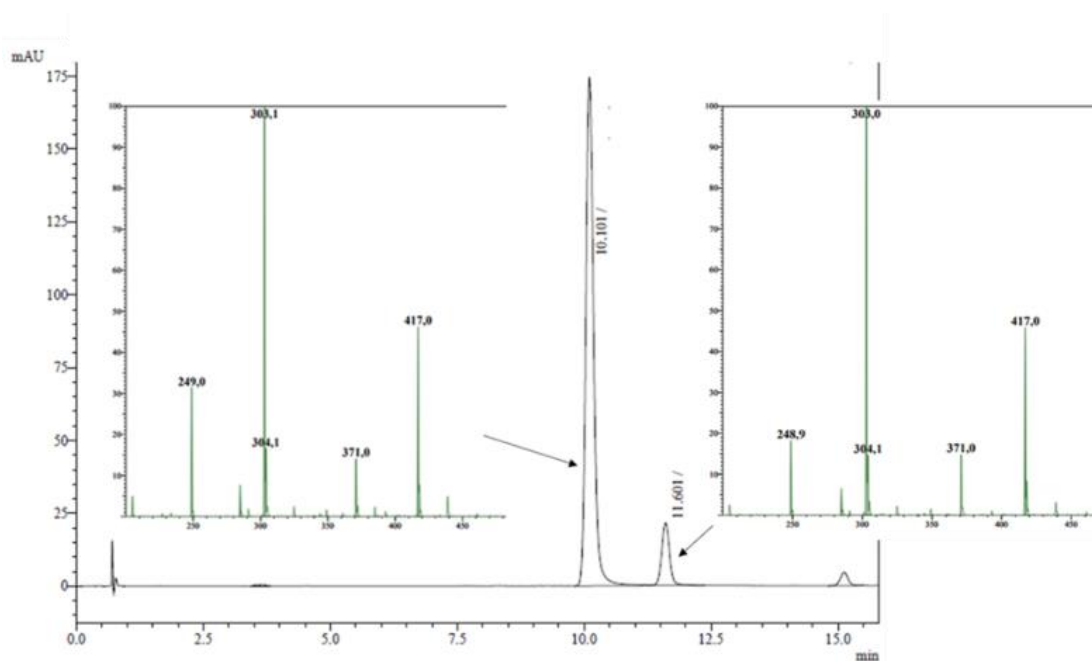


Рисунок 8 – Идентификация σ -диастереомеров ДКВ методом ВЭЖХ с масс-детектором. Условия хроматографического разделения: колонка – Kinetex™ 2,6 мкм Biphenyl 100 Å, 100 × 3,0 мм; ПФ – раствор муравьиной кислоты в воде (рН 2,7), метанол; 7% → 21% метанола за 15 мин; 0,65 мл/мин; 60 °С; 0,01 мг/мл; 20 мкл; 290 нм

Хроматографический анализ. На типичной хроматограмме субстанции ДКВ наблюдаются два пика с ВУ 10,1 мин и 11,6 мин. Используя стандарт (2*R*,3*R*)-ДКВ, пик с ВУ 10,1 мин был определен как *транс*-ДКВ.

Пики с ВУ 10,1 и 11,6 мин характеризуются одинаковыми масс-спектрами (Рисунок 8) и УФ-спектрами (Рисунок 9), что позволяет отнести эти пики к диастереомерам, поскольку разделение осуществляли в ахиральных условиях, то есть пик с ВУ 11,6 мин принадлежит *цис*-ДКВ. Хорошего разрешения между пиками (R_s 2,5) удалось достичь в градиентном режиме элюирования на сорбенте с фенильными привитыми группами за счет π - π стэкинга между сорбентом и ароматическими кольцами ДКВ.

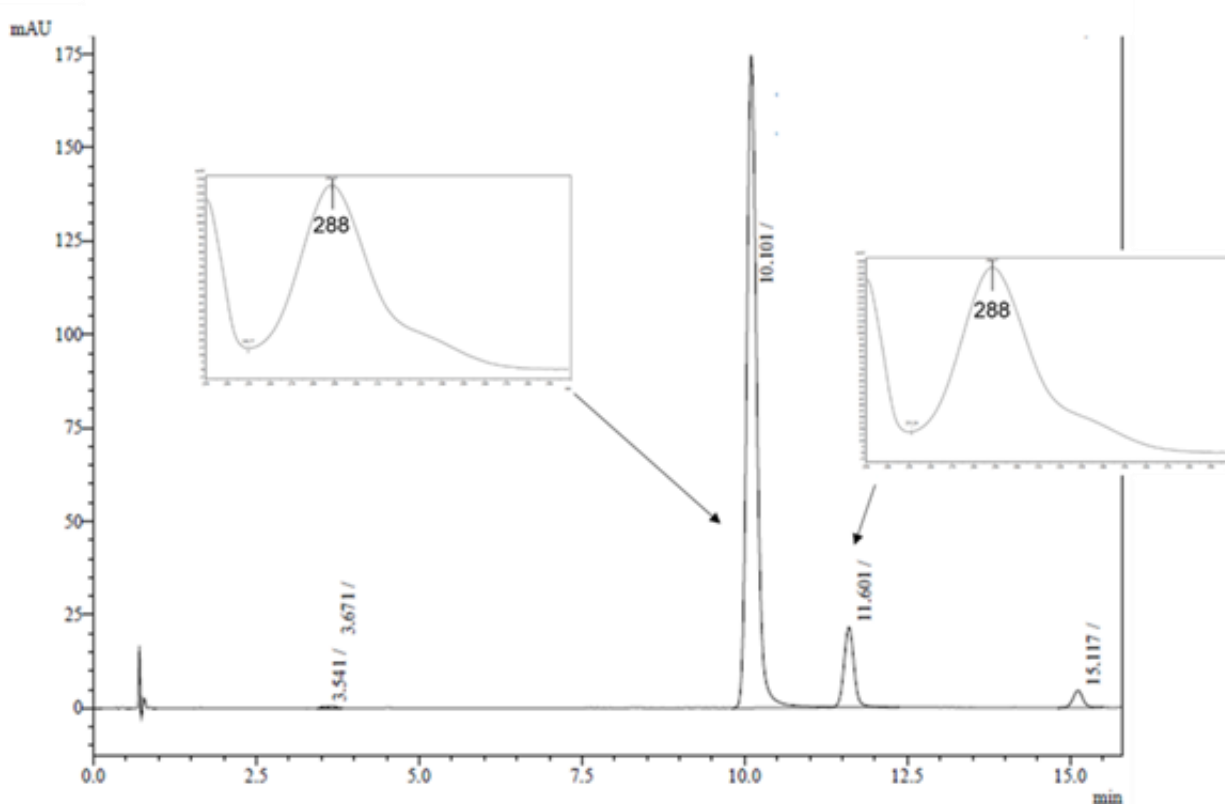


Рисунок 9 – Идентификация σ -диастереомеров ДКВ методом ВЭЖХ с диодно-матричным детектором. Условия хроматографического разделения: колонка – Kinetex™ 2,6 мкм Biphenyl 100 Å, 100 × 3,0 мм; ПФ – раствор муравьиной кислоты в воде (pH 2,7), метанол; 7% → 21% метанола за 15 мин; 0,65 мл/мин; 60 °C; 0,01 мг/мл; 20 мкл; 290 нм

Анализ стереоизомеров ДКВ методом 1D и 2D спектроскопии ЯМР. σ -Диастереомеры ДКВ были исследованы методами ЯМР ^1H (Рисунок 10) и $^1\text{H},^{13}\text{C}$ -HSQC (Рисунок 11). Спектр ЯМР ^1H *транс*-ДКВ содержит дублеты протонов Н3 (δ = 4,52 м.д.) и Н2 (δ = 4,93 м.д.) с J = 12,0 Гц, а *цис*-ДКВ – дублеты протонов Н3 (δ = 4,20 м.д.) и Н2 (δ = 5,31 м.д.) с J = 2,4 Гц.

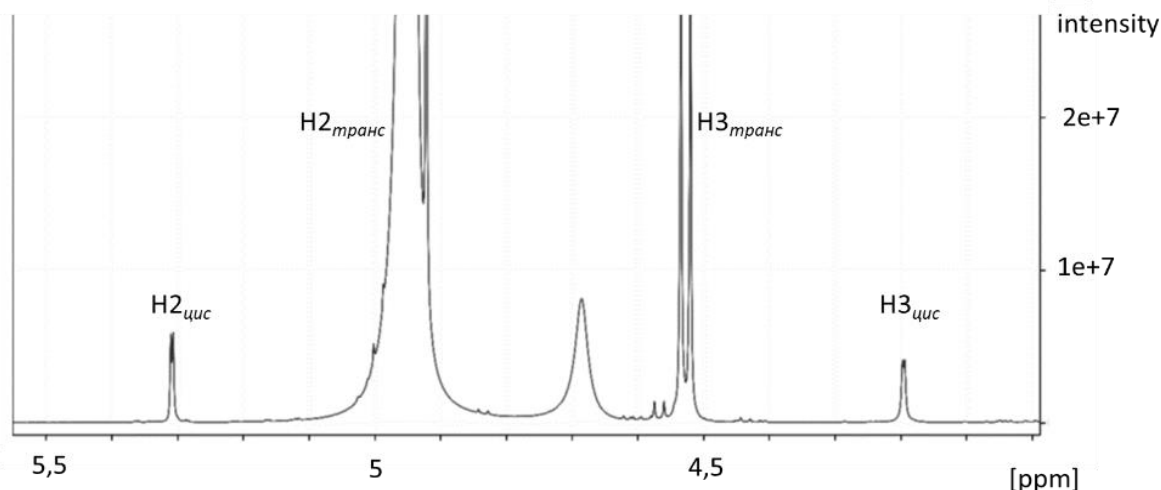


Рисунок 10 – σ -Диастереомеры ДКВ на ЯМР-спектре 1D ^1H

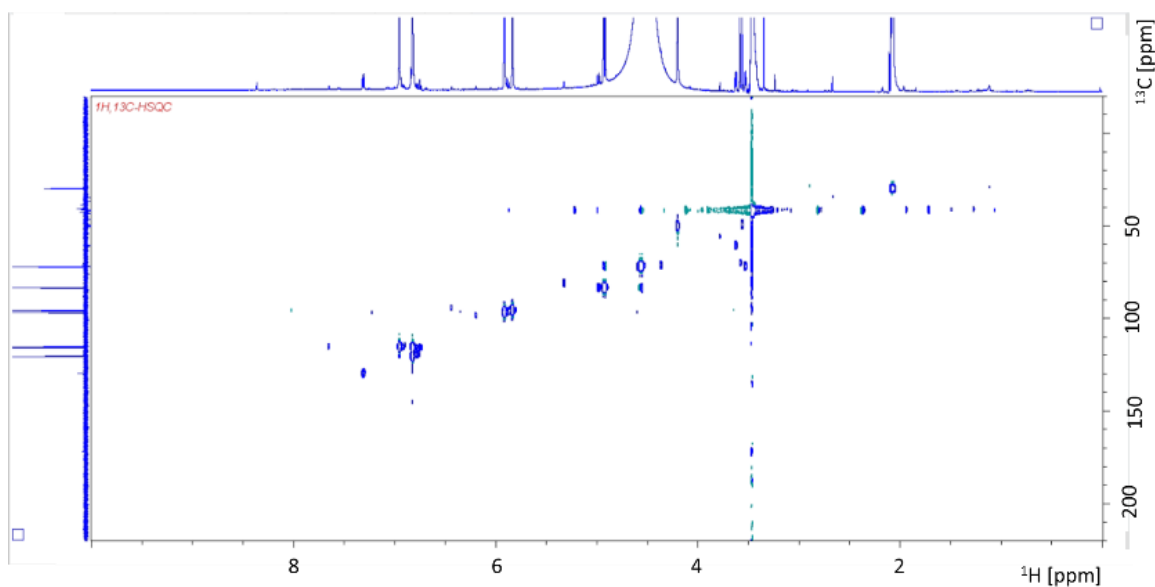
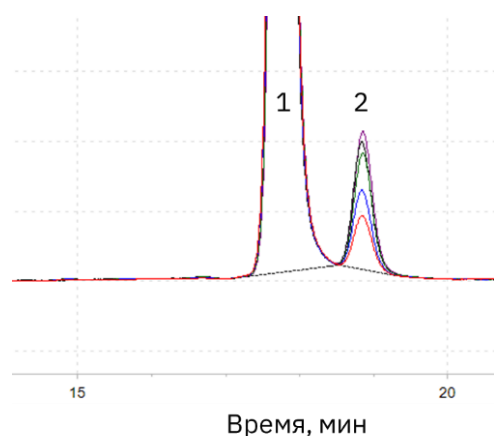


Рисунок 11 – σ -Диастереомеры ДКВ на ЯМР-спектре 2D ^1H , ^{13}C -HSQC

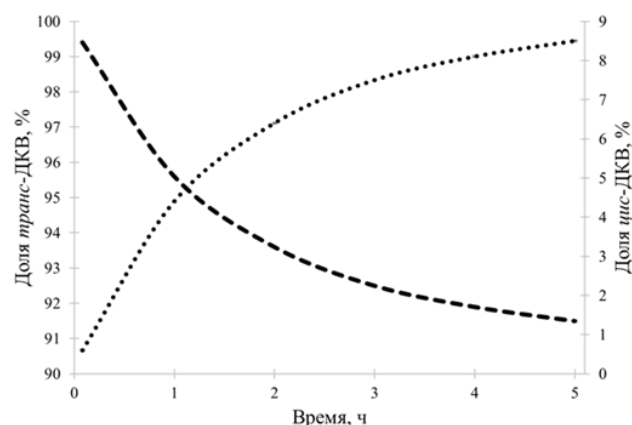
В водной среде была впервые обнаружена самопроизвольная σ -диастереомеризация ДКВ (Рисунок 12А). При изучении кинетики реакции наблюдали уменьшение концентрации *транс*-изомера и увеличение *цис*-ДКВ до установления равновесия с долей *цис*-изомера, равной $8,36 \pm 0,72\%$. (Рисунок 12Б).

При исследовании влияния различных факторов (наличия воды, значений pH среды, температуры) было установлено, что в безводных растворителях изомеризация не происходит, в кислой среде не наблюдали значимого увеличения концентрации *цис*-ДКВ, а при повышении pH реакция σ -диастереомеризации ускоряется, что хорошо объяснимо с точки зрения возможных механизмов реакции – C-2 или C-3-эпимеризации в щелочной среде.



1 – транс-ДКВ, 2 – цис-ДКВ

А



--- транс-ДКВ цис-ДКВ

Б

Рисунок 12 – Доказательство самопроизвольного изменения концентраций σ -диастереомеров ДКВ в водной среде: А – хроматографическая картина, Б – кинетическая кривая

При анализе диастереомерного состава ДКВ в композиции ДКВ-глицин обнаружено повышение количества *цис*-изомера в 2 раза по сравнению с исходной субстанцией флавоноида, что свидетельствует о влиянии лиофилизации на стереоизомерный состав. В отличие от лиофилизации, при стерилизации композиции потоком быстрых электронов статистически значимых изменений оптической активности и соотношения *цис-транс*-изомеров не наблюдали.

Свойство хиральности проявляет не только флавоноид, но и аминокислота, так как после лиофилизации водного раствора глицина происходит его кристаллизация в виде хирального γ -полиморфа.

Разработка и валидация методик контроля качества

Для контроля композиции по показателю «количественное определение ДКВ» использовали метод ВЭЖХ-УФ, а по показателю «количественное определение глицина» – метод УФ-спектроскопии пурпура Руэманна (λ_{max} 440 нм и 570 нм), образующегося в результате дериватизации аминокислоты нингидрином. Обе методики валидированы по следующим показателям: специфичность, линейность, прецизионность, правильность (Таблица 1).

Таблица 1 – Валидационные характеристики методик контроля качества

Показатель	Количественное определение компонентов композиции	
	ДКВ	глицина
Специфичность	На хроматограмме растворителя отсутствуют пики в области выхода ДКВ	На спектрах нингидрина и продукта реакции ДКВ с нингидрином отсутствует поглощение выше 350 нм
Линейность	$r = 0,9998$	$r = 0,9968$
Прецизионность	RSD = 1,2 – 3,9 %	RSD = 1,3 – 3,2 %
Правильность	Доверительные интервалы значений, полученных при анализе ДКВ и композиции ДКВ-глицин, пересекаются	

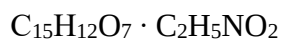
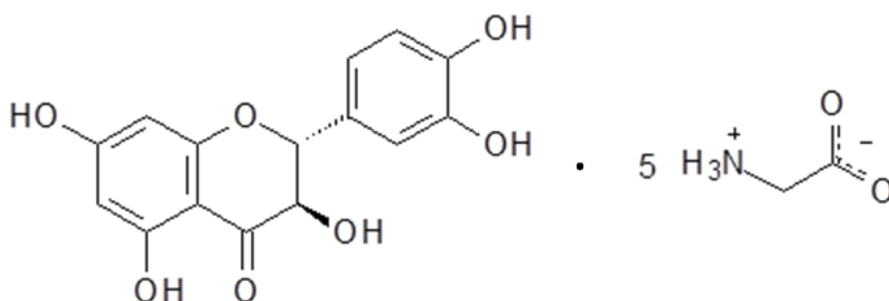
Нейропротекторная активность и цитотоксичность

Наиболее вероятные механизмы нейропротекторного действия флавоноида, рассчитанные в программе PASS по значениям P_a и P_i , связаны с его способностью ингибировать агрегацию β -амилоида и фосфоинозитид фосфатазу, а также стимулировать рецептор пролиферации пероксисом γ .

Цитотоксичность композиции ДКВ-глицин в 3,4 раза меньше на клеточной линии HUVES (IC_{50} композиции $0,303 \pm 0,002$ мг/мл и ДКВ $0,088 \pm 0,004$ мг/мл) и в 5,8 раз меньше на линии НЕК 293 (IC_{50} композиции $0,227 \pm 0,002$ мг/мл и ДКВ $0,039 \pm 0,001$ мг/мл), чем у фармацевтической субстанции ДКВ.

Проект спецификации на ДКВ-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 2.


 $M_r 379,33$

ОПРЕДЕЛЕНИЕ

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

Таблица 2 – Показатели и нормы качества субстанции ДКВ-глицин

Показатели	Методы	Нормы
СВОЙСТВА		
Описание	ОФС.1.1.0001 «Общие положения»	Мелкокристаллический порошок светло-желтого цвета со слабым смолистым запахом

Продолжение Таблицы 2

Растворимость	ОФС.1.2.1.0005 «Растворимость»	Мало растворим в воде при комнатной температуре
ИДЕНТИФИКАЦИЯ		
1. ИК-спектроскопия	ИК-спектроскопия	Должен содержать полосы поглощения при 3446 см ⁻¹ , 1610 см ⁻¹ (дигидрокверцетин) и 3171 см ⁻¹ (глицин)
2. Качественная реакция на дигидрокверцетин	Цианидиновая проба	Должно появиться малиновое окрашивание
3. Качественная реакция на глицин	Реакция с нингидрином	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 спектроскопия», ОФС.1.2.1.1.0004 «Атомно-эмиссионная спектроскопия», ОФС.1.5.3.0009 «Определение содержания тяжелых 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		
<i>транс</i> -дигидрокверцетин	ВЭЖХ-СФМ	от 15,05% до 17,95%
<i>цис</i> -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	

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 (1:5 м/м) методом лиофилизации при температуре –40 °С 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 σ -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 π - π стэкинга ароматических фрагментов ДКВ и бензольных колец сорбента при исследовании образца, полученного методом распылительной сушки.
- выявлен самопроизвольный процесс σ -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 γ -глицин, а также увеличение содержания *цис*-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 см⁻¹, 1610 см⁻¹; для глицина – нингидриновая реакция и полоса поглощения в ИК-спектре при 3171 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 β-амилоида и фосфоинозитид фосфатазы, а также стимулирования рецептора пролиферации пероксисом γ.

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 РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ АВТОРОМ

ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1) Modification of Taxifolin Properties by Spray Drying / Taldaev A., **Pankov D.I.**, Terekhov R.P., Zhevlakova A.K., Selivanova I.A. // **Scientia Pharmaceutica**. – 2022. – Vol. 90, No. 4. – P. 67. [Scopus Q2]

2) Кокристаллизация дигидрокверцетина с глицином / **Панков Д.И.**, Терехов Р.П., Селиванова И.А. // XXII международная научно-практическая конференция студентов и молодых ученых, Витебск, 26–27 октября 2022.

3) Solubility Enhancement of Dihydroquercetin via "Green" Phase Modification / Terekhov R.P., Ilyasov I.R., Beloborodov V.L., Zhevlakova A.K., **Pankov D.I.**, Dzuban A.V., Bogdanov A.G., Davidovich G.N., Shilov G.V., Utenyshev A.N., Saverina E.A., Selivanova I.A. // **International Journal of Molecular Sciences**. – 2022. – Vol. 23, No. 24. – P. 15965. [Scopus Q1]

4) Лиофилизация как способ модификации физико-химических свойств фармацевтических субстанций / **Д. И. Панков**, Р. П. Терехов, И. А. Селиванова // Молодая фармация - потенциал будущего: Сборник материалов конференции, Санкт-Петербург, 01 марта – 11 апреля 2023 года. – 2023. – С. 35-40.

5) «Зеленый» синтез и анализ лиофилизированных форм дигидрокверцетина / **Д. И. Панков**, И. А. Селиванова, Р. П. Терехов // Актуальные вопросы студенческой медицинской науки и образования: Материалы IX Всероссийской с международным участием студенческой научно-образовательной конференции, Рязань, 17 мая 2023 года. – 2023. – С. 169-170.

6) Разработка хиральных лекарственных средств на основе дигидрокверцетина / Селиванова И.А., Терехов Р.П., Свотин А.А., **Панков Д.И.**, Никитин И.Д. // Пути и формы совершенствования фармацевтического образования. Актуальные вопросы разработки и исследования новых лекарственных средств: Сборник трудов 9-ой Международной научно-методической конференции. Воронеж, 28–29 сентября 2023 года. – 2023. – С. 374-378.

7) Modification of the Physicochemical Properties of Active Pharmaceutical Ingredients via Lyophilization / Taldaev A., **Pankov D.I.**, Terekhov R.P., Zhevlakova A.K., Selivanova I.A. //

Pharmaceutics. – 2023. – Vol. 15, No. 11. – P. 2607. [**Scopus Q1**]

8) Diastereomers of Spheroidal Form and Commercially Available Taxifolin Samples / Terekhov R.P., Melnikov E.S., Nikitin I.D., Tokareva M.A., Rodina T.A., Savina A.D., **Pankov D.I.**, Zhevlakova A.K., Beloborodov V.L., Selivanova I.A. // **Scientia Pharmaceutica.** – 2024. – Vol. 92, No. 1. – P. 5. [**Scopus Q2**]

9) Современные подходы к анализу стереоизомерного состава дигидрокверцетина / Терехов Р.П., Савина А.Д., **Панков Д.И.**, Никитин И.Д., Селиванова И.А. // **Фармация.** – 2024. – Т. 73, № 2. – С. 5-12.

10) Исследование изомеризации *транс*-дигидрокверцетина методом ВЭЖХ-УФ-МС/МС / **Д. И. Панков**, М. А. Токарева, М. Д. Корочкина, Терехов Р.П., Мельников Е.С., Селиванова И.А. // Молодая фармация – потенциал будущего: Сборник материалов XIV всероссийской научной конференции с международным участием Молодежного научного общества СПХФУ, Санкт-Петербург, 28 марта – 02 апреля 2024 года. – 2024. – С. 649-652.

11) Spatial structure of taxifolin's diastereomers via NMR analysis / Terekhov R.P., Taldaev A., Bocharov E.V., **Pankov D.I.**, Savina A.D., Selivanova I.A. // Magnetic resonance and its applications: 21th International School-Conference, Schola Spinus, Saint Petersburg, 01–05 апреля 2024 года. – 2024. – P. 327-329.

12) Analysis of *cis*-isomer-enriched dihydroquercetin sample by 1D and 2D NMR spectroscopy / Terekhov R.P., Taldaev A., Bocharov E.V., **Pankov D.I.**, Savina A.D., Selivanova I.A. // **Drug Development & Registration.** – 2024. – Vol. 13, No. 2. – P. 68-76. [**Scopus Q3**]

13) Эпимеризация дигидрокверцетина / **Панков Д.И.**, Терехов Р.П., Селиванова И.А. // II Всероссийская студенческая научно-практическая конференция с международным участием «Современные достижения фармацевтических наук»: Материалы, Рязань, 03 июня 2024 года. – 2024. – С. 14.

14) Стереоизомерный состав дигидрокверцетина / **Д. И. Панков**, Р. П. Терехов, И. А. Селиванова // 6-я Российская конференция по медицинской химии: Сборник тезисов, Нижний Новгород, 01–04 июля 2024 года. – 2024. – С. 269.

15) Insights into the stereoisomerism of dihydroquercetin: analytical and pharmacological aspects / Terekhov R.P., Savina A.D., **Pankov D.I.**, Korochkina M.D., Taldaev A., Yakubovich L.M., Zavadskiy S.P., Zhevlakova A.K., Selivanova I.A. // **Frontiers in Chemistry.** – 2024. – Vol. 12. – P. 1439167. [**Scopus Q1**]

16) Влияние ионизирующего излучения на стереохимический состав образца дигидрокверцетина / **Панков Д.И.**, Корочкина М.Д., Терехов Р.П., Токарева М.А., Мельников Е.С., Родина Т.А., Селиванова И.А. // **Фармация.** – 2024. – Т. 73, № 6. – С. 32-38.

17) Chromatographic control of dihydroquercetin diastereomerization / **Pankov D.I.**, Terekhov

R.P., Selivanova I.A. // XIII International conference on chemistry for young scientists «MENDELEEV 2024»: Book of abstracts, St Petersburg, September 2-6, 2024. – 2024. – P. 496.

18) Хроматографическое разделение диастереомеров дигидрокверцетина / **Панков Д.И.**, Терехов Р.П., Селиванова И.А. // XXII Менделеевский съезд по общей и прикладной химии: Сборник тезисов, Федеральная территория «Сириус», 07–12 октября 2024 года. – 2024. – С. 445.

19) Влияние «зеленого» способа деконтаминации на стереохимический состав дигидрокверцетина / **Панков Д.И.**, Савина А.Д., Корочкина М.Д., Терехов Р.П., Селиванова И.А. // Интеграционные связи фармацевтической экологии – 2024. Вторая международная конференция: сборник материалов конференции, Москва, 30 октября – 1 ноября 2024. – 2025. – С. 78-80.

20) Изучение влияния лиофилизации на стереоизомерный состав дигидрокверцетина в композиции с глицином / **Панков Д.И.**, Терехов Р.П., Селиванова И.А. // Интеграционные связи фармацевтической экологии – 2024. Вторая международная конференция: Сборник материалов конференции, Москва, 30 октября – 1 ноября 2024. – 2025. – С. 80-82.

21) Cytotoxicity assessment of natural biologically active compounds / M. Korochkina, D. Kolesnikova, A. Svotin, **D. Pankov**, R. Terekhov, I. Selivanova // The 5th China-Russia International Symposium for Young Scholars: Digests, Guangzhou, December 13, 2024. – P. 5.

22) Композиция таксифолин-глицин: супрамолекулярный синтез, физико-химические свойства и цитотоксичность / **Панков Д.И.**, Терехов Р.П., Корочкина М.Д., Свотин А.А., Колесникова Д.Р., Селиванова И.А. // III Всероссийская студенческая научно-практическая конференция с международным участием «Современные достижения фармацевтических наук»: Материалы, Рязань, 03 июня 2025 года. – 2025. – С. 49.

23) Определение тяжелых металлов и мышьяка в лиофилизате дигидрокверцетин-глицин / Рахимов А.А., **Панков Д.И.**, Селиванова И.А. // III Всероссийская студенческая научно-практическая конференция с международным участием «Современные достижения фармацевтических наук»: Материалы, Рязань, 03 июня 2025 года. – 2025. – С. 51.

24) Твердофазный продукт на основе дигидрокверцетина и глицина: получение и физико-химические свойства / **Панков Д.И.**, Терехов Р.П., Рахимов А.А., Дзубан А.В., Утенышев А.Н., Шилов Г.В., Селиванова И.А // **Фармация**. – 2025. – Т. 74, № 5. – С. 12-20.

25) Лيوфилизат дигидрокверцетин-глицин / **Панков Д.И.**, Терехов Р.П., Корочкина М.Д., Свотин А.А., Колесникова Д.Р., Рахимов А.А., Селиванова И.А. // XII Всероссийский симпозиум с международным участием «Фенольные соединения: фундаментальные и прикладные аспекты»: Материалы докладов, Москва, 13–17 октября 2025 года. – 2025. – С. 66.

26) Разработка и валидация методик количественного определения компонентов лиофилизата дигидрокверцетин-глицин / **Д. И. Панков**, Е. М. Сухова, Р. П. Терехов, Жевлакова

А.К., Селиванова И.А. // **Фармация**. – 2025. – Т. 74, № 8. – С. 40-51.

27) Comparison of antioxidant activity of dihydroquercetin samples with different diastereomeric composition / Terekhov R.P., Ilyasov I.R., Li B., Zeng Y., **Pankov D.I.**, Svotin A.A., Olicheva V.V., Kolesnikova D.R., Goman V.F., Korochkina M.D., Selivanova I.A. // **Drug Development & Registration**. – 2026. – Vol. 15, No. 1. – P. 43-52. [Scopus Q3]

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