

И. А. Селиванова¹, Р. П. Терехов^{1, 2,*}

ИНЖЕНЕРИЯ КРИСТАЛЛОВ ДИГИДРОКВЕРЦЕТИНА

¹ ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И. М. Сеченова Минздрава РФ (Сеченовский университет), Россия, 119991, Москва.

² Институт клеточной терапии и иммунологии имени Фраунгофера, Германия, 06120, Галле-на-Заале.
* e-mail: r.p.terekhov@yandex.ru

Дигидрокверцетин (ДКВ) — промышленно доступный биофлавоноид, характеризующийся богатой палитрой фармакологических свойств. Низкая растворимость в воде при комнатной температуре коммерческой субстанции ограничивает разработку лекарственных препаратов с ДКВ. Используя базовую концепцию инженерии кристаллов, были получены кокристаллы ДКВ с бензальдегидом, ванилином, коричневым альдегидом, мочевиной и никотиновой кислотой. ИК-спектроскопию использовали для подтверждения формирования супрамолекулярных комплексов ДКВ с коформерами. В результате оценки физико-химических параметров кокристаллов установлена перспективность использования инженерии кристаллов для получения новых форм ДКВ с улучшенной растворимостью в воде.

Ключевые слова: дигидрокверцетин; инженерия кристаллов; кокристаллы; ИК-спектроскопия; растворимость.

Дигидрокверцетин (ДКВ) — 2,3-дигидро-3,5,7-тригидрокси-2-(3,4-дигидроксифенил)-4H-1-бензопиранон-4 — биофлавоноид, известный также как таксифолин, характеризуется высокой антиоксидантной активностью и широким спектром фармакологических свойств [1–3]. Данное соединение представляет собой флаванол (рис. 1). На основе ДКВ разработан ряд лекарственных средств [4].

Коммерчески доступная субстанция ДКВ имеет низкую растворимость в воде при комнатной температуре. По мнению многих ученых, это обстоятельство негативно сказывается на биодоступности ДКВ и ограничивает его концентрацию в плазме крови. Согласно современным классификационным системам лекарственное вещество характеризуется его биофармацевтическими свойствами: растворимостью, проницаемостью, метаболизмом [5]. В связи с этим ДКВ привлекает внимание исследователей с позиций улучшения его биофармацевтических характеристик, например, микронизацией [6, 7]. Показано, что при пероральном введении нанодисперсной формы биодоступность ДКВ почти в 2 раза выше по сравнению с исходной субстанцией [8].

Ранее методом рентгеноструктурного анализа было установлено, что субстанция ДКВ представляет собой кристаллогидрат, в котором на 2 молекулы ДКВ приходится 5 молекул воды. При этом молекулы ДКВ в кристалле объединены друг с другом и с молекулами воды межмолекулярными водородными связями в сложную структурную систему (код LORKEI в Кембриджской структурной базе данных) [9]. Учитывая наличие выявленных межмолекулярных нековалентных взаимодействий можно предположить, что оптимизация свойств субстанции ДКВ может быть осуществлена инженерией кристаллов, являющейся современным направлением для дизайна новых систем с требуемыми свойствами на основе положений супра-

молекулярной химии [10]. В арсенале инженерии кристаллов имеется целый ряд методов, отличающихся техникой исполнения, инструментальным оснащением и временными затратами. Среди них можно выделить выпаривание, сливание, растирание, добавление антирастворителя, в том числе в суперкритическом состоянии, экструзию, сонокристаллизацию и некоторые другие [11–13].

В настоящей работе решалась задача получения новых форм ДКВ с модифицированным параметром растворимости методом инженерии кристаллов и последующего исследования физико-химических свойств новых форм.

Экспериментальная часть

В качестве исходной субстанции использовали ДКВ производства ЗАО Аметис, Россия (ФС № 000388-270812).

Коформерами служили бензальдегид (Acros Organics, Бельгия), ванилин (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Германия), коричный альдегид (Acros Organics, Бельгия), мочевины (Carl Roth GmbH, Германия) и никотиновая кислота (Fluka, Германия). В теории инженерии кристаллов термин “коформер” означает вспомогательный компонент, который совместно с дейст-

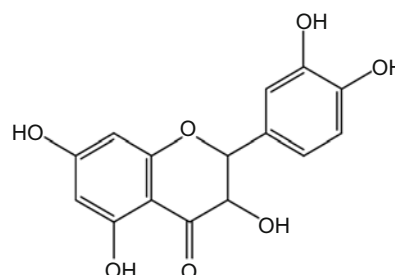


Рис. 1. Структурная формула ДКВ.

вующим веществом участвует в формировании твердой фазы кокристалла посредством образования нековалентных межмолекулярных связей [14].

В качестве растворителя использовали этанол денатурированный (99,8 %, Carl Roth GmbH, Германия).

Морфологию твердой фазы новых форм ДКВ изучали при помощи инверторного оптического микроскопа Axiovert S100 с микрокамерой AxioCam MRc (Германия) при увеличении в 400 раз.

ИК-спектры в таблетке калия бромида получали на ИК-спектрометре ФСМ-1201 (Россия). Спектр снимали в области от 4000 см^{-1} до 500 см^{-1} с разрешением 1 см^{-1} .

Фазовые изменения в точке плавления исследовали на микроскопе с нагревательным столом Leica Galen III (Германия) с цифровым термометром Testo 720 (Германия).

Растворимость определяли согласно ГФ XIII [15].

Методика приготовления кокристаллов

Для получения кокристаллов 2 ммоль ДКВ смешивали с 2 ммоль коформера и растворяли в этаноле. Полученный раствор подвергали обработке в соответствии со следующими экспериментальными приемами кристаллизации (табл. 1).

Результаты и их обсуждение

Основной идеей инженерии кристаллов является целенаправленное конструирование структур, характеризующихся нековалентным типом связывания между молекулами (водородные, донорно-акцепторные связи; диполь-дипольное, гидрофобное, π , π -взаимодействие). Нековалентные межмолекулярные взаимодействия являются характерной особенностью процесса кокристаллизации. Контент-анализ литературных данных послужил основой для выбора коформеров и оптимизации дизайна исследования. Для кокристаллов полифенолов было установлено, что водородные связи в супрамолекулярных гетеросинтонах образуются, как правило, с коформерами, содержащими пиридиновый атом азота, а также карбонильные и амидные функциональные группы [16]. Распространенность таких межмолекулярных ассоциатов можно объяснить наличием фенольных гидро-

ксильных групп, выступающих в качестве доноров водорода при образовании связей в гетеросинтонах с вышеперечисленными функциональными группами. В формировании как гомосинтонов, так и гетеросинтонов могут участвовать 4 фенольные гидроксильные группы в молекуле ДКВ. Кроме того, имеющиеся 2 ароматических кольца с повышенной электронной плотностью за счет электронодонорных свойств фенольных гидроксильных групп способны к π , π -взаимодействию с электронодефицитными структурными фрагментами. Поэтому в качестве коформеров были выбраны ароматические альдегиды (бензальдегид, ванилин, коричный альдегид), гетероциклическое соединение с π -недостаточным ароматическим фрагментом (никотиновая кислота) и полный амид угольной кислоты (мочевина).

Получено 8 новых кристаллических форм ДКВ, характеризующихся стабильностью при хранении в условиях комнатной температуры (табл. 2).

В результате микроскопического анализа выявлено несколько особенностей в морфологии полученных кокристаллов. Если исходная субстанция ДКВ существует в виде мелких агломератов иррегулярной формы (рис. 2, а), то для лиофилизатов характерны так называемые скелетные формы, когда твердая фаза формируется за счет разрастания граней и не заполняет пространство внутри ячеек (рис. 2, б). Этот феномен можно объяснить тем, что в условиях лиофилизации происходит ускоренный рост твердой фазы, форсированный быстрым переходом к экстремально холодной температуре, поэтому ячейки остаются полыми. Интересно отметить, что при формализации изображения лиофилизатов с позиции стереометрии сформировалось представление о фрактальности их структуры. С точки зрения геометрии, фракталы — это объекты, обладающие свойством самоподобия. В идеальных условиях составные элементы в точности повторяют структуру целого, но в реальности всегда наблюдаются некоторые различия. Тогда, как и в нашем случае, принято говорить о статистическом самоподобии. Важной особенностью фракталов является то, что они обладают промежуточной пространственной размерностью и лиофилизаты по расчетам находятся между 2D- и 3D-размерностями. Эта закономерность способ-

Таблица 1

Приемы кокристаллизации

№	Прием	Описание методики	Время кристаллизации, ч
1.	Вымораживание	Раствор выдерживали при температуре $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение 7 дней. Осадок отфильтровывали и сушили на воздухе.	240
2.	Выпаривание	Раствор концентрировали, используя лабораторный ротационный испаритель Hei-VAP Value (Германия), работающий при температуре $55\text{ }^{\circ}\text{C}$ и давлении 0,15 атм. Остатки растворителя удаляли в вакууме при той же температуре до образования сплава.	72
3.	Лиофилизация	Раствор разбавляли водой в 20 раз. Полученную смесь выдерживали при температуре $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение 24 ч, затем колбу с твердой фазой присоединяли к лабораторному лиофилизатору Alpha 1 – 2LD (Германия), работающему при температуре $-55\text{ }^{\circ}\text{C}$ и давлении 0,35 атм.	36
4.	Сонокристаллизация	Растворитель удаляли согласно методике выпаривания. Сплав помещали в ультразвуковую ванну Sonorex RK-100 (Германия).	1

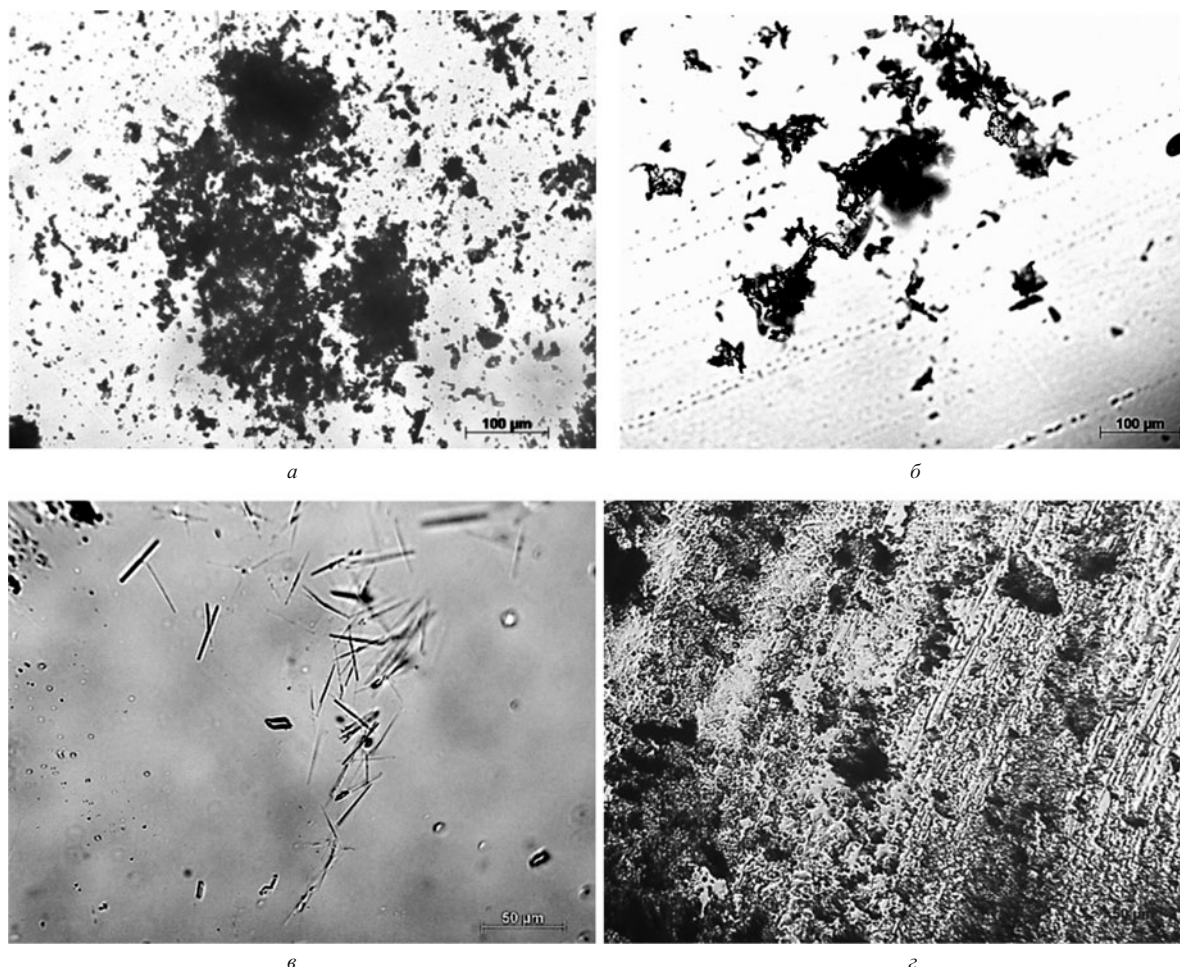


Рис. 2. Сравнение морфологических особенностей кристаллических форм ДКВ: агломераты исходной субстанции (*a*); фрактальная структура лиофилизатов с ванилином (*b*); игольчатые кокристаллы с ванилином (*в*); островковые структуры с ванилином (*г*).

ствует увеличению площади поверхности твердой фазы, и, как следствие этого, можно ожидать изменения физических свойств и повышения растворимости для форм ДКВ, полученных методом лиофилизации.

Среди других морфологических особенностей новых форм ДКВ можно отметить игольчатые кристаллы (рис. 2, *в*) и так называемые островковые структуры (рис. 2, *г*), которые были обнаружены при микроскопическом анализе кокристаллов, образовавшихся из

Т а б л и ц а 2

Физико-химические параметры новых форм ДКВ

Исходные компоненты	Метод кокристаллизации	Характеристика кристаллических форм ДКВ				
		морфология	длина, мкм	$T_{пл}$, °C	растворимость в воде	стабильность
ДКВ	лиофилизация	фрактальная	$138,8 \pm 5,3$	$127,0 \pm 1,1$	растворим	нестабилен
ДКВ и бензальдегид	лиофилизация	фрактальная	$81,3 \pm 3,4$	$64,0 \pm 0,8$	умеренно растворим	нестабилен
ДКВ и ванилин	выпаривание	игольчатая	$24,0 \pm 5,7$	$60,1 \pm 0,9$	растворим	стабилен
	сонокристаллизация	островковая	$11,0 \pm 2,5$	$60,1 \pm 0,8$	растворим	стабилен
	лиофилизация	фрактальная	$46,7 \pm 1,7$	$46,0 \pm 0,7$	легко растворим	нестабилен
	выпаривание	игольчатая	$87,3 \pm 8,0$	$90,5 \pm 0,8$	мало растворим	стабилен
ДКВ и коричный альдегид	сонокристаллизация	игольчатая	$47,2 \pm 5,5$	$90,5 \pm 0,9$	мало растворим	стабилен
	лиофилизация	фрактальная	$125,0 \pm 9,9$	$58,0 \pm 0,8$	растворим	нестабилен
	выпаривание	островковая	$58,6 \pm 2,1$	$67,0 \pm 0,8$	очень мало растворим	стабилен
ДКВ и никотиновая кислота	лиофилизация	фрактальная	$131,4 \pm 2,6$	$102,0 \pm 0,9$	умеренно растворим	стабилен
	вымораживание	островковая	$137,2 \pm 3,5$	$143,0 \pm 1,0$	мало растворим	стабилен
	лиофилизация	фрактальная	$185,7 \pm 3,4$	$54,0 \pm 0,7$	очень легко растворим	нестабилен
ДКВ и мочевины	лиофилизация	фрактальная	$185,7 \pm 3,4$	$54,0 \pm 0,7$	очень легко растворим	нестабилен
	вымораживание	игольчатая	$15,1 \pm 1,8$	$93,7 \pm 0,9$	мало растворим	стабилен

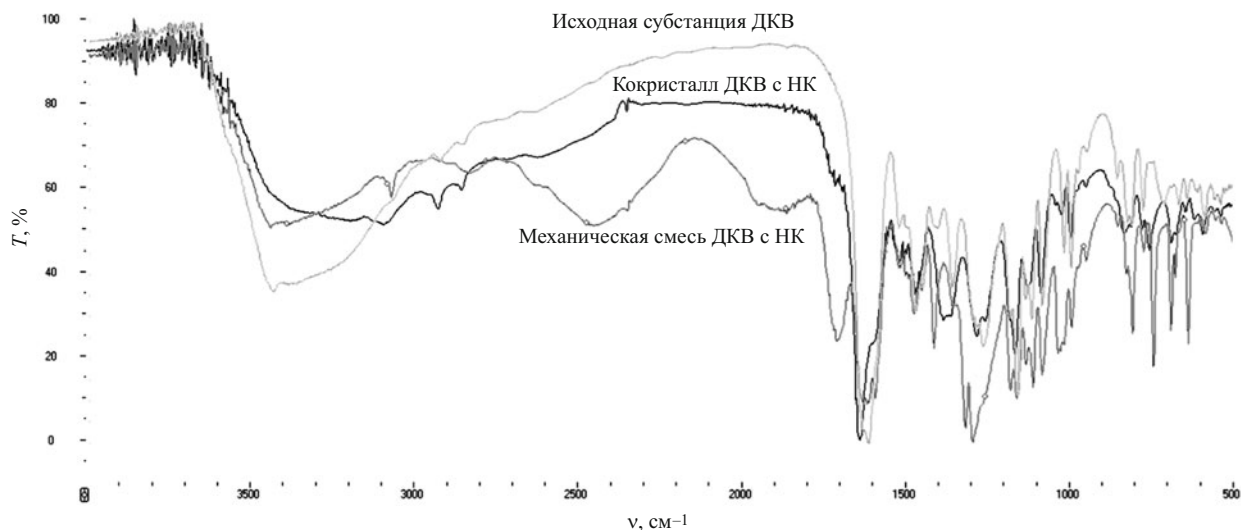


Рис. 3. Суперпозиция ИК-спектров ДКВ (светло-серый), механической смеси ДКВ с никотиновой кислотой (темно-серый) и кокристаллов ДКВ с никотиновой кислотой, полученных лиофилизацией (черный).

сплавов с некоторыми коформерами (табл. 2). Изменение условий получения позволяет увеличить выход одной формы и уменьшить образование другой. Например, при кокристаллизации ДКВ с ванилином процесс образования точек кристаллизации был ускорен под действием ультразвука, что увеличивало долю островковых структур. В то же время при медленном выпадении кокристаллов ДКВ с ванилином из концентрированного раствора, полученного после выпаривания, образовывались преимущественно игольчатые кристаллы. Несмотря на различную форму кристаллов, образованных в ходе кокристаллизации ДКВ с ванилином методами выпаривания растворителя и сонокристаллизации, наблюдается аналогия в их физико-химических свойствах (табл. 2). Таким образом, можно говорить о наличии конкурентности в процессах формирования игольчатой и островковой структур.

Для подтверждения формирования кокристаллов был использован метод ИК-спектроскопии. Гипотеза о супрамолекулярном взаимодействии между ДКВ и коформерами была подтверждена для всех кокристаллов и визуализирована на рис. 3 на примере кокристаллов ДКВ и никотиновой кислоты. В области валентных колебаний фенольных гидроксильных групп наблюдаются значительные различия. Для исходного образца ДКВ и механической смеси ДКВ с никотиновой кислотой характерен спектр с выраженной полосой поглощения в области 3420 см^{-1} . В ИК-спектре кокристалла в этой же области наблюдается плавная широкая полоса в диапазоне $3550 - 3200\text{ см}^{-1}$, что указывает на участие гидроксильных групп в формировании межмолекулярных водородных связей. Кроме того, в ИК-спектре механической смеси ДКВ с никотиновой кислотой наблюдаются полосы поглощения в областях $2700 - 2200$ и $2100 - 1800\text{ см}^{-1}$, которые интерпретируются как валентные колебания гидроксильного фрагмента в карбоксильной группе никотиновой кислоты и межмолекулярное взаимодействие карбоксильной группы и пиридинового атома азота [17], со-

ответственно. В кокристаллах эти полосы поглощения отсутствуют, что может быть объяснено образованием водородных связей между ДКВ и никотиновой кислотой. В области “отпечатков пальцев” спектры образцов тоже не идентичны.

Температура плавления всех кокристаллов значительно ниже, чем у исходной субстанции ($226,0\text{ °C}$), что объясняется более слабой энергией образования супрамолекулярных гетеросинтонов по сравнению с гомосинтонами. Иными словами, кокристаллы всегда более лабильны к нагреванию, чем исходная субстанция в силу природы нековалентных взаимодействий. Лиофилизированные формы характеризуются наилучшей растворимостью в воде при комнатной температуре, но они нестабильны и на открытом воздухе деградируют в течение нескольких часов. Однако для большинства стабильных кокристаллов достигнуто улучшение показателя растворимости в воде по сравнению с исходной субстанцией ДКВ (очень мало растворим).

В итоге нами получено 8 новых стабильных форм ДКВ со следующими коформерами: ванилином (выпариванием и сонокристаллизацией), коричневым альдегидом (выпариванием и сонокристаллизацией), никотиновой кислотой (выпариванием, вымораживанием и лиофилизацией) и мочевиной (вымораживанием). Наиболее перспективными с точки зрения физико-химических параметров продуктами для дальнейшего изучения являются кокристаллы, полученные в ходе лиофилизации с никотиновой кислотой, а также при выпаривании растворителя и сонокристаллизации с ванилином. Эти формы обладают лучшей растворимостью в воде по сравнению с исходной субстанцией и остаются стабильными на открытом воздухе в течение длительного времени (табл. 2).

Таким образом, применительно к ДКВ инженерия кристаллов представляет интерес как новая стратегия улучшения физико-химических характеристик, в част-

ности растворимости в воде при комнатной температуре.

Авторы выражают признательность заслуженному профессору Сеченовского университета Н. А. Тюкавкиной, доценту кафедры фармацевтической технологии Института фармации Сеченовского университета Е. О. Бахрушиной и сотрудникам Института иммунологии и клеточной терапии имени Фраунгофера (Германия) доктору М. Бухольцу и доктору Д. Рамсбеку за помощь при выполнении данной работы и конструктивные советы.

ЛИТЕРАТУРА

1. M. B. Plotnikov, O. I. Aliev, N. A. Tyukavkina, et al., in: *Frontiers of antioxidant research*, H. V. Panglossi (ed.), Nova Science Publishers Inc., New York (2006), pp. 103 – 132.
2. S. Saito, Y. Yamamoto, T. Maki, et al., *Acta Neuropathol. Commun.*, **26**(5), 1 – 16 (2017).
3. I. R. Piyasov, V. L. Beloborodov, I. A. Selivanova, *Chem. Pap.*, **72**, 1917 – 1925 (2018).
4. М. Б. Плотников, Н. А. Тюкавкина, Т. М. Плотникова, *Лекарственные препараты на основе диквертина*, Томский университет, Томск (2005), сс. 125 – 191.
5. Г. В. Раменская, И. Е. Шохин, Ю. И. Кулинич, *Вестник ВГУ. Серия: хим., био., фарм.*, **1**, 212 – 215 (2012).
6. R. Terehov, M. Buchholz, D. Ramsbeck, et al., *Abstracts book 11-th World Congress on Polyphenols Applications.*, University of Vienna-Austria (2017), p. 154.
7. Y. Zu, W. Wu, X. Zhao, et al., *Int. J. Pharm.*, **477**, 148 – 158 (2014).
8. Ch.-J. Yang, Z.-B. Wang, Y.-Y. Mi, et al., *Molecules*, **21**(4), 494 (2016).
9. I. A. Selivanova, N. A. Tyukavkina, Yu. A. Kolesnik, et al., *Chem.-Phar. J.*, **33**(4), 51 – 53 (1999).
10. G. R. Desiraju, *J. Am. Chem. Soc.*, № 135, 9552 – 9967 (2013).
11. U. Kotak, V. Parajapati, H. Solanki, et al., *World J. Pharm. Pharmaceut. Sci.*, **4**(4), 1484 – 1508 (2015).
12. R. Chadha, Y. Bhalla, M. Karan, K. Chadha, in: *Recrystallization in Materials Processing*, V. Glebovsky (ed.), IntechOpen Limited, London (2015), pp. 171 – 190.
13. R. P. Terehov, I. A. Selivanova, N. A. Tyukavkina, et al., *Acta Cryst. B*, **75**(2), 175 – 182 (2019).
14. I. Sathisaran, S. V. Dalvi, *Pharmaceutics*, **10**(3), E108 (2018).
15. *Государственная фармакопея Российской Федерации*, 13 изд., Т. 1, Министерство здравоохранения Российской Федерации, Москва (2015), сс. 531 – 534.
16. P. Kavuru, *Thes. Deg. Mast. Sci.*, Tampa (2008), pp. 18 – 25.
17. J. Xu, C.-L. Toh, X. Liu, et al., *Macromolecules*, **38**, 1684 – 1690 (2005).

Поступила 14.09.17

ENGINEERING OF DIHYDROQUERCETIN CRYSTALS

I. A. Selivanova¹ and R. P. Terehov^{1,2}

¹ I. M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, 119991 Russia

² Fraunhofer-Institut für Zelltherapie und Immunologie, 06120 Halle (Saale), Germany.

Dihydroquercetin (DHQ) is commercially available bioflavonoid with a wide range of pharmacological activity. There are certain restrictions in the creation of DHQ related drugs because the commercial DHQ is characterized by poor solubility in water at room temperature. The crystal engineering approach was used for obtaining of DHQ cocrystals with benzaldehyde, vanillin, cinnamaldehyde, urea, and nicotinic acid. Infrared spectroscopy data confirmed the formation of supramolecular complexes between DHQ and conformers. Based on estimation of the physicochemical parameters of cocrystals, it is established that crystal engineering is a promising way to obtaining new DHQ forms with improved aqueous solubility.

Keywords: dihydroquercetin; crystal engineering; cocrystals; IR spectroscopy; solubility.