

УДК 548.55:54.051

**АЛГОРИТМ ОБНАРУЖЕНИЯ СУЩЕСТВОВАНИЯ
И ВОСПРОИЗВОДИМОГО ПОЛУЧЕНИЯ МОНОКРИСТАЛЛОВ СОЛЕЙ
И СМЕШАННЫХ КРИСТАЛЛОВ АМИНОКИСЛОТ, ПРИГОДНЫХ ДЛЯ
РЕНТГЕНОСТРУКТУРНЫХ И КР СПЕКТРОСКОПИЧЕСКИХ ЭКСПЕРИМЕНТОВ****С.Г. Архипов^{1,2}, Е.В. Болдырева^{1,2}**¹*Институт химии твердого тела и механохимии СО РАН, Новосибирск*
E-mail: arksergey@gmail.com²*Новосибирский государственный университет**Статья поступила 22 января 2014 г.*

Разработан способ воспроизводимого получения монокристаллов солей и смешанных кристаллов аминокислот с дикарбоновыми кислотами и другими небольшими органическими молекулами. Полученные кристаллы имеют высокое качество и хорошую огранку, что делает их пригодными для монокристалльных дифракционных и КР спектроскопических (в том числе с использованием поляризованного излучения) экспериментов. Простота реализации, возможность воспроизведения кристаллизации с использованием имеющихся практически в каждой лаборатории оборудования и материалов являются отличительными чертами предложенного алгоритма, который предполагает два этапа работы. В ходе первого этапа максимально быстро и просто осуществляется перебор исходных компонентов с целью обнаружения новых фаз. Задачей второго является получение монокристаллов, удовлетворяющих требованиям различных методов исследования. Идеальным является случай, когда возможно контролировать размер отдельно лежащих, хорошо ограненных, легко отделяющихся от поверхности кристаллов, которые вырастают в течение нескольких часов.

Ключевые слова: аминокислоты, смешанные кристаллы, получение монокристаллов, "streak seeding", рентгеноструктурный анализ, КР спектроскопия.

ВВЕДЕНИЕ

Как известно, в кристаллах атомы, ионы или молекулы расположены закономерно, образуя трехмерно-периодическую пространственную укладку — кристаллическую решетку. В кристаллической структуре смешанных кристаллов периодически (в отличие от растворов замещения и внедрения) расположены два и более сорта молекул. Особенностью этих соединений является то, что их свойства могут сильно отличаться от свойств кристаллов исходных компонентов. Эта особенность смешанных кристаллов привлекает, в частности, фармацевтическую промышленность, поскольку введение дополнительных компонентов с образованием смешанных кристаллов лекарственных веществ может способствовать улучшению технологических и потребительских характеристик по сравнению с кристаллами индивидуального лекарственного вещества [1—6]. Смешанные кристаллы могут лучше кристаллизоваться, фильтроваться, иметь лучшую прессуемость, устойчивость при хранении, меньшую гигроскопичность. Кроме того, получая смешанный кристалл определенного фармацевтического компонента, можно улучшать некоторые клинически важные свойства целевого соединения, например скорость растворения, проницаемость через биологические барьеры. Последнее свойство может прояв-

ляться, в первую очередь, у особого класса смешанных кристаллов, в которых молекулы разного сорта, образующие смешанный кристалл, являются нейтральными, такие соединения называют со-кристаллами. Известно, что липидный барьер клетки лучше преодолевается неполярными молекулами, в то время как множество активных фармацевтических ингредиентов для достижения лучшей растворимости выпускаются как соли. В результате этого растворимость увеличивается, в то время как биодоступность уменьшается. Биодоступность со-кристаллов во многих случаях выше, чем солей, именно благодаря нейтральности входящих в их состав молекул [7—12].

Смешанные кристаллы аминокислот являются хорошими модельными объектами для изучения методик синтеза смешанных кристаллов и анализа структур, поскольку в молекулах присутствуют как гидрофильные, так и гидрофобные группы, а наличие amino- и карбоксильной групп способствует образованию нескольких типов водородных связей, что приводит к большому структурному разнообразию образующихся соединений [13—16]. Кроме того, некоторые смешанные кристаллы аминокислот являются перспективными в качестве молекулярных материалов [17—20]. Для исследования этих свойств необходимы монокристаллы хорошего качества. Кристаллизация солей аминокислот достаточно хорошо изучена и описана на многих примерах [21]. Процесс получения смешанных кристаллов представляет собой обычно более трудоемкую задачу [22]. В среднем только одна из 100 структур представляет собой смешанный кристалл [1]. Процедура получения данных объектов на начальном этапе включает в себя операцию скрининга, подразумевающую большое количество экспериментов по перебору пар со-кристаллизуемых компонентов. Чем выше скорость перебора пар компонентов на начальном этапе (процедура скрининга), тем производительнее предлагаемый метод. Поэтому одной из задач данной работы являлось максимальное ускорение процедуры скрининга самой возможности образования смешанного кристалла (пусть даже в виде порошка) и подбор простого и быстрого метода анализа проб. Второй задачей было получение хорошо ограненных монокристаллов контролируемого размера и формы, пригодных: а) для монокристалльных дифракционных и б) для КР спектроскопических экспериментов с использованием поляризованного излучения. В первом случае необходимы кристаллы с линейными размерами от 0,1 до 0,5 мм, по возможности изометрические, — для обычных экспериментов, и в виде пластинок — для экспериментов в условиях высоких давлений. Во втором случае необходимы линейные размеры от 1 мм с возможностью поворачивать кристалл на разные грани для исследования и хорошая огранка, позволяющая достоверно ориентировать кристалл.

ОПИСАНИЕ ЭКСПЕРИМЕНТОВ

1. Предварительный скрининг возможности образования смешанных кристаллов

Методы со-кристаллизации, дающие монокристаллы, обычно очень трудоемки и требуют очень больших затрат времени и реактивов. В частности, необходимо исследовать кривые растворимости каждого компонента и тогда уже сделать вывод о возможности получения смешанного кристалла как равновесной фазы при определенном соотношении компонентов в растворе [23, 24]. Для быстрого анализа возможности образования смешанных кристаллов используют, помимо со-кристаллизации из растворов методом испарения, также со-кристаллизацию из расплава на термостолке, высаливание, распылительную сушку, совместное растирание в ступке или мельницах (без растворителя или с добавлением небольшого нестехиометрического количества растворителя) [25—35]. Первый из этих методов возможен только для веществ с близкими температурами плавления, не разлагающимися до плавления. Распылительная сушка возможна только для хорошо растворимых в воде веществ, устойчивых к нагреванию в водном растворе, и к тому же очень затратна по реактивам и времени. Наиболее популярным в последнее время стал метод совместного растирания исходных реагентов в ступке, и именно он использовался в данной работе на первом этапе — для скрининга возможных сочетаний компонентов, способных образовать смешанные кристаллы.

Примерно 1 миллимоль обоих реагентов мягко растирали в агатовой ступке, затем отбирали необходимое количество вещества для анализа методом дифракции от порошка, а к остав-

шейся партии добавляли небольшое количество воды (примерно одна часть воды к десяти частям смеси по весу) и продолжали растирать. Затем проводили анализ обеих (полученных в результате совместного растирания с водой и без воды) проб методом порошковой дифракции. Если в результате анализа мы определяли смесь исходных реагентов, то предыдущую операцию повторяли заново, меняя при этом один или оба реагента. Большинство новых фаз смешанных кристаллов были обнаружены в экспериментах по совместному растиранию в присутствии капли воды. Однако в ряде случаев происходило образование новых фаз при растирании без воды и с водой, причем различных, в зависимости от того, добавлялась ли вода вообще, и если да, то в каком количестве. Одним из таких примеров может служить система щавелевая кислота—L-серин [36]. В случаях, когда наблюдалось получение новой фазы при растирании исходных компонентов с водой, мы переходили ко второму этапу — получению кристаллов этой фазы методом медленного испарения растворителя.

2. Получение монокристаллов фаз, найденных в результате первого этапа

Метод медленного испарения растворителя, на первый взгляд, очень прост, однако он требует большого количества реагентов и каждый эксперимент может занимать больше недели. Нередко в результате наблюдается образование поликристаллов, которые сильно прилипают к поверхности кристаллизатора, что приводит к их разрушению во время процесса пробоподготовки. Таким образом, процесс отбора кристаллов занимает много времени и часто заканчивается неудачей. Для того чтобы сократить время и расход реактивов, необходимых для кристаллизации, было решено получать кристаллы из капли, как это принято, например, в белковой кристаллографии [37]. Необходимо отметить, что эксперименты по кристаллизации белка организованы таким образом, что пересыщение достигается за счет диффузии молекул осадителя в каплю с раствором белка. В наших экспериментах достижение пересыщения раствора создается за счет испарения воды или другого испарителя. Однако на поверхности стекла капля сильно растекается, в результате чего через некоторое время после испарения части воды стекло покрывается тонкой пленкой пересыщенного раствора, что приводит к образованию поликристаллов (рис. 1). Для того чтобы уменьшить смачиваемость стекла (сделать каплю более "сферичной"), мы обрабатывали его поверхность различными веществами. Наилучшие результаты были получены в результате модификации поверхности стекла парафильмом и парафином (рис. 2, а и б).

Общеизвестно, что для зарождения ядер нуклеации требуется большой уровень пересыщения, а для роста уже зародившихся кристаллов, напротив, большой уровень пересыщения вреден. Поэтому для получения хороших кристаллов было принято решение разделить два этих процесса и переносить ядра нуклеации из капель с высоким уровнем пересыщения в капли с низким уровнем пересыщения, используя процедуру "streak seeding" [38]. Сначала мы получали поликристаллы необходимого нам соединения из капли на стекле (назовем это каплей 1).

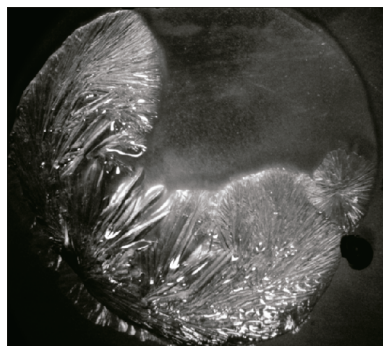


Рис. 1. Пример поликристаллов, вырастающих в капле на стекле из пересыщенного раствора

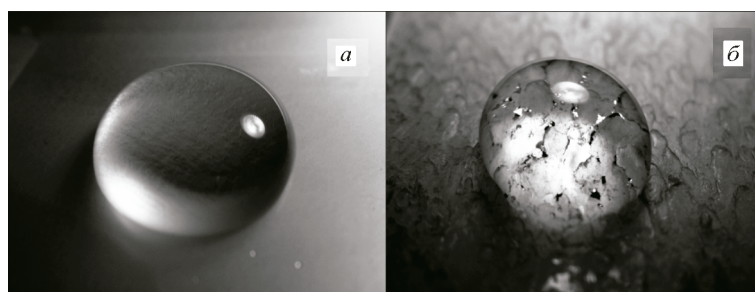
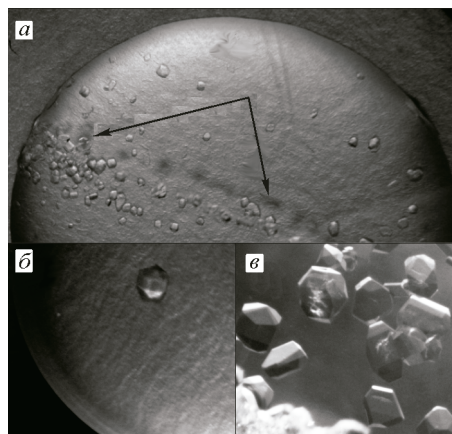


Рис. 2. Капли одинакового объема на стекле, модифицированном парафильмом (а), и на стекле, модифицированном парафином (б)

Рис. 3. Стрелками указаны кристаллы, выросшие на поверхности капли в результате использования техники "streak seeding" (а); кристаллы, образовавшиеся в результате спонтанного роста (б); кристаллы, готовые к извлечению из капли (в)



Затем капли с раствором того же соединения "садили" на модифицированную (чаще всего парафином или парафильмом) поверхность стекла (капля 2). Через небольшой промежуток времени мы дотрагивались до кристаллов из капли 1 и проводили иглой по поверхности капли 2. Если раствор в капле был ненасыщенным, то ядра нуклеации просто растворялись, в этом случае мы повторяли процедуру "streak seeding" (снова переносили микрокристаллы из капли 1 в каплю 2) через небольшой промежуток времени, когда в результате испарения концентрация целевого вещества увеличивалась до необходимого для роста кристаллов уровня. Если процедура "streak seeding" сработала, в капле 2 сначала на поверхности образуются отдельные кристаллы (рис. 3, а), которые со временем, увеличиваясь в размерах, опускаются на дно или остаются в толще капли (см. рис. 3, в). Таким образом, кристаллы, выросшие в результате использования техники "streak seeding", либо вообще не закрепляются на поверхности, на которой находится капля, либо отделяются намного проще, чем в стандартной процедуре выращивания кристаллов методом медленного испарения растворителя. Это свойство позволяет заметно уменьшить время, необходимое для приготовления кристаллов для их исследования методом монокристалльного дифракционного эксперимента. Еще одним достоинством использования техники "streak seeding" является то, что в результате растут хорошо ограненные отдельно лежащие кристаллы, что также облегчает процесс пробоподготовки и является большим плюсом для исследований кристаллов методом поляризационной КР спектроскопии. Используя данный подход, возможно наблюдать за размером кристаллов в микроскоп, что позволяет регулировать размер полученных кристаллов. Это можно использовать для получения кристаллов необходимых размеров, например, для исследования в ячейках высокого давления. Бывают случаи, когда в капле 2 наблюдаются кристаллы, образовавшиеся в результате спонтанного роста (см. рис. 3, б). Размер этих кристаллов обычно больше, чем кристаллов, полученных методом "streak seeding", однако такие кристаллы сильнее прикреплены к поверхности, на которой находится капля, чем кристаллы, полученные в результате использования затравочных техник.

Одним из важных шагов в любых монокристалльных исследованиях является извлечение кристаллов из капли. Основными задачами данного этапа являются сохранение целостности кристалла и предотвращение образования роста новых кристаллов на поверхности извлекаемого кристалла. Из капли кристалл можно извлечь, используя специальные инструменты, либо просто удалив маточный раствор. Довольно часто кристаллы органических молекул очень хрупкие и плохо переносят различные механические воздействия. В таких случаях для извлечения кристаллов из капли лучше всего использовать нейлоновые петли, которыми удобно проводить различные манипуляции с кристаллом. В наших экспериментах довольно часто наблюдалась ситуация, когда при увеличении концентрации растворов, содержащих аминокислоты с дикарбоновыми кислотами, вязкость раствора увеличивалась, что усложняло процесс пробоподготовки. Поэтому иницирование роста кристаллов при небольшом пересыщении облегчало нам задачу подготовки проб. В приведенном примере смешанные кристаллы L-серина с L-аскорбиновой кислотой устойчивы к механическим воздействиям, поэтому мы удаляли маточный раствор механической пипеткой (дозатором) (рис. 4, а), затем, как можно быстрее, осушали грани кристаллов фильтровальной бумагой (см. рис. 4, б). В некоторых экспериментах для уменьшения вязкости маточного раствора в каплю с кристаллами мы добавляли небольшое количество исходного раствора, перемешивали, удаляли полученную смесь дозатором, промо-

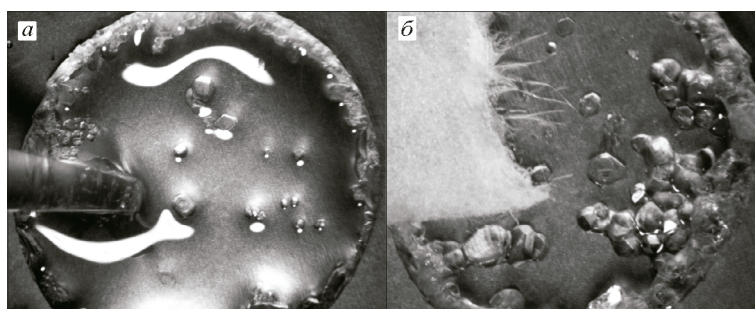


Рис. 4. Удаление маточного раствора механической пипеткой (дозатором) (а), удаление остатков раствора с граней кристаллов фильтровальной бумагой (б)

кали кристаллы фильтровальной бумагой. Еще одним способом предотвращения образования микрокристаллов на поверхности образца является помещение целевого кристалла в масло (не осушая грани фильтровальной бумагой или капнув небольшое количество масла на кристалл сразу же после удаления маточного раствора). Этот вариант подходит для дифракционных монокристаллических экспериментов, в том числе — при различных температурах, но не подходит для приготовления кристаллов, которые будут исследоваться методами КР спектроскопии, поскольку масло в результате флюоресценции дает большой фон на записанных КР спектрах.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ

В результате исследования отработан алгоритм действий, позволяющий эффективно осуществлять процедуру поиска новых фаз смешанных кристаллов аминокислот и воспроизводимо получать монокристаллы найденных фаз, пригодные для дальнейшего исследования различными методами. Стоит отметить, что поиск новых фаз осуществлялся за счет перебора исходных компонентов, а не за счет перебора условий кристаллизации. Хотя сама процедура получения кристаллов немного сложнее по сравнению с общепринятой техникой медленного испарения растворителя, однако применение данного метода в итоге значительно уменьшит суммарное время и усилия, необходимые на процедуру пробоподготовки. В результате применения описанного алгоритма уже за несколько месяцев было обнаружено более десяти новых фаз, содержащих аминокислоты (серин, валин, норвалин, цистеин, тирозин), получены монокристаллы и расшифрованы структуры четырех из них, три из которых описаны в [39]. Описанный вариант метода кристаллизации из капли применим не только в случаях получения смешанных кристаллов. Используя данный подход, были получены хорошо ограниченные кристаллы моноклинного парацетамола, ромбического *p*-ацетотолуидина, метациетина, малоновой кислоты, L-аскорбиновой кислоты. Иногда в результате применения данного метода образуются метастабильные полиморфы, как в случае *p*-ацетотолуидина. Согласно правилу "ступенчатых переходов" Оствальда [40], сначала возникает не наиболее устойчивое состояние с наименьшей свободной энергией, а наименее устойчивое и наиболее близкое по величине свободной энергии к исходному состоянию. В случае кристаллизации *p*-ацетотолуидина из капли сначала образуются зародыши метастабильной фазы, из которых вырастают кристаллы метастабильной фазы; далее мы либо быстро извлекаем их, либо весь раствор из капли испаряется. Если же кристаллизация проводится в большом количестве раствора, то сначала также образуются зародыши метастабильной фазы, из которых затем вырастают кристаллы метастабильной фазы, однако далее образуются зародыши стабильной фазы, в результате чего метастабильная фаза начинает растворяться и перекристаллизовываться в более стабильную полиморфную модификацию.

Дальнейшее развитие подхода подразумевает под собой различные вариации модификации поверхности стекла или использование совершенно иных поверхностей. Кроме того, можно использовать не только водные растворы, например, кристаллы парацетамола, метациетина и *p*-ацетотолуидина были получены из водно-спиртовых растворов. Простота и легкость воспроизведения в других лабораториях позволяют нам рекомендовать использовать этот алгоритм или

некоторые его элементы исследовательским группам, которые занимаются получением или изучением смешанных кристаллов.

Данная работа была выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант 12-03-31541 mol_a), Совета по грантам при Президенте РФ по поддержке ведущих научных школ (проект НШ-221.2012.3), гранта Министерства науки и образования Российской Федерации (14.В37.12.1093). С.Г. Архипов также благодарит организаторов Международной школы по кристаллизации в Гранаде (Испания) за финансовую поддержку участия в ней, а также ICDD за грант поддержки участия во Второй национальной конференции по методам исследования веществ и материалов (Новосибирск, Россия, октябрь 2013).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Shan N., Zaworotko M.J.* // *Drug Discov. Today.* – 2008. – **13**, N 9-10. – P. 440 – 446.
2. *Sekhon B.S.* // *Ars Pharmaceutica.* – 2009. – **50**, N 3. – P. 99 – 117.
3. *Chadha R., Saini A., Arora P. et al.* // *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* – 2012. – **29**, N 3. – P. 183 – 218.
4. *Patrick Stahly G.A.* // *Cryst. Growth Des.* – 2009. – **9**, N 10. – P. 4212 – 4229.
5. *Thakuria R., Delori A., Jones W. et al.* // *Int. J. Pharm.* – 2013. – **453**, N 1. – P. 101 – 125.
6. *Qiao N., Li M., Schindwein W. et al.* // *Int. J. Pharm.* – 2011. – **419**, N 1-2. – P. 1 – 11.
7. *Bruni G., Maietta M., Maggi L. et al.* // *J. Pharm. Sci.* – 2013. – **102**, N 11. – P. 4079 – 4086.
8. *Childs S.L., Kandi P., Lingireddy S.R.* // *Mol. Pharm.* – 2013. – **10**, N 8. – P. 3112 – 3127.
9. *Smith A.J., Kavuru P., Arora K.K. et al.* // *Mol. Pharm.* – 2013. – **10**, N 8. – P. 2948 – 2961.
10. *Sun C.C.* // *Expert Opinion on Drug Delivery.* – 2013. – **10**, N 2. – P. 201 – 213.
11. *Patel P.V., Brahmhatt H., Upadhyay U.M. et al.* // *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.* – 2012. – **16**, N 1. – P. 140 – 148.
12. *Huang N., Rodríguez-Hornedo N.* // *CrystEngComm.* – 2011. – **13**, N 17. – P. 5409 – 5422.
13. *Görbitz C.H.* // *J. Mol. Struct.* – 2006. – **775**, N 1-3. – P. 9 – 17.
14. *Görbitz C.H., Dalhus B., Day G.M.* // *Phys. Chem. Chem. Phys.* – 2010. – **12**, N 30. – P. 8466 – 8477.
15. *Suresh C.G., Vijayan M.* // *Int. J. Pept. Protein Res.* – 1983. – **22**, N 2. – P. 129 – 143.
16. *Vinogradov S.N.* // *Int. J. Pept. Protein Res.* – 1979. – **14**, N 4. – P. 281 – 289.
17. *Vijayan N., Bhagavannarayana G., Maurya K.K. et al.* // *Int. J. Light Electron Opt.* – 2012. – **123**, N 7. – P. 604 – 608.
18. *Suresh S.* // *Int. J. Light Electron Opt.* – 2012. – **1**, N 3. – P. 131 – 140.
19. *Lemanov V.V.* // *Phys. Solid State.* – 2012. – **54**, N 9. – P. 1841 – 1842.
20. *Gonzalo J.A., Guerra-Menendez L.* // *Ferroelectrics Letters Section.* – 2009. – **36**, N 5-6. – P. 129 – 132.
21. *Petrosyan A. M., Sukiasyan R.P., Karapetyan H.A.* // *J. Cryst. Growth.* – 2000. – **213**, N 1. – P. 103 – 111.
22. *Fleck M., Petrosyan A.M.* // *J. Cryst. Growth.* – 2010. – **312**, N 15. – P. 2284 – 2290.
23. *Rager T., Hilfiker R.* // *Cryst. Growth Des.* – 2010. – **10**, N 7. – P. 3237 – 3241.
24. *Rager T., Hilfiker R.* // *Z. Phys. Chem. (N. F.).* – 2009. – **223**, N 7. – P. 793 – 813.
25. *Friščić T., Jones W.* // *Cryst. Growth Des.* – 2009. – **9**, N 3. – P. 1621 – 1637.
26. *Lu E., Rodríguez-Hornedo N., Suryanarayanan R.* // *CrystEngComm.* – 2008. – **10**, N 6. – P. 665 – 668.
27. *Morissette S.L., Almarsson O., Peterson M.L. et al.* // *Adv. Drug Deliv. Rev.* – 2004. – **56**, N 3. – P. 275 – 300.
28. *Zhang G.G.Z., Henry R.F., Borchardt T.B. et al.* // *J. Pharm. Sci.* – 2007. – **96**, N 5. – P. 990 – 995.
29. *Bag P.P., Patni M., Malla Reddy C.* // *CrystEngComm.* – 2011. – **13**, N 19. – P. 5650 – 5652.
30. *Alhalaweh A., Velaga S.P.* // *Cryst. Growth Des.* – 2010. – **10**, N 8. – P. 3302 – 3305.
31. *Losev E.A., Mikhailenko M.A., Achkasov A.F. et al.* // *New J. Chem.* – 2013. – **37**, N 7. – P. 1973 – 1981.
32. *Fucke K., Myz S.A., Shakhshneider T.P. et al.* // *New J. Chem.* – 2012. – **36**. – P. 1969.
33. *Myz S.A., Shakhshneider T.P., Tumanov N.A. et al.* // *Russ. Chem. Bull.* – 2012. – **9**. – P. 1782.
34. *Myz S.A., Shakhshneider T.P., Fucke K. et al.* // *Mendeleev Commun.* – 2009. – **19**, N 5. – P. 272 – 274.
35. *Shan N., Toda F., Jones W.* // *Chem. Commun.* – 2002. – **20**. – P. 2372 – 2373.
36. *Losev E.A., Boldyreva E.V.* // *CrystEngComm.* – 2014. – **16**. – P. 3857 – 3866.
37. *Bergfors T.M.* *Protein Crystallization.* – USA Intl Univ Line, 1998.
38. *Stura E.A., Wilson I.A.* // *J. Cryst. Growth.* – 1991. – **110**, N 1. – P. 270 – 282.
39. *Arhipov S.G., Zakharov B.A., Boldyreva E.V.* // *Acta Crystallogr.* – 2013. – **69**, Pt 5. – P. o517 – o521.
40. *Ostwald W.* // *Ztschr. für Phys. Chemie.* – 1897. – **22**, Pt 3. – P. 289.