

На правах рукописи

**Успенская Елена Валерьевна**

**МЕТОДЫ ЛАЗЕРНОГО СВЕТОРАССЕЯНИЯ В КОНТРОЛЕ КАЧЕСТВА  
ВОДНЫХ РАСТВОРОВ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИХ СУБСТАНЦИЙ И  
ВСПОМОГАТЕЛЬНЫХ ВЕЩЕСТВ**

14.04.02 – Фармацевтическая химия, фармакогнозия

**АВТОРЕФЕРАТ**

на соискание ученой степени доктора фармацевтических наук

**Научный консультант:**  
**доктор биологических наук, профессор**  
**Сыроешкин Антон Владимирович**

**Москва – 2018**

Работа выполнена в Федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего образования «Российский университет дружбы народов» на кафедре фармацевтической и токсикологической химии медицинского института.

**Научный консультант:**

**Сыроешкин Антон Владимирович**, доктор биологических наук, профессор, заведующий кафедрой фармацевтической и токсикологической химии медицинского института Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Российский университет дружбы народов».

**Официальные оппоненты:**

**Эпштейн Наталья Борисовна**, доктор фармацевтических наук, доцент, заведующая кафедрой фармацевтической и радиофармацевтической химии Обнинского института атомной энергетики Национального исследовательского ядерного университета «МИФИ».

**Сливкин Алексей Иванович**, доктор фармацевтических наук, профессор, заведующий кафедрой фармацевтической химии и фармацевтической технологии фармацевтического факультета Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Воронежский государственный университет».

**Чистяков Виктор Владимирович**, доктор фармацевтических наук, профессор кафедры аналитической токсикологии, фармацевтической химии и фармакогнозии Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова» Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет).

**Ведущая организация:** Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова»

Защита состоится «31» января 2019 г. в \_\_ час. \_\_ мин. в аудитории \_\_ на заседании диссертационного совета ПДС0300.001 базе федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования "Российский университет дружбы народов" по фармацевтическим наукам по адресу: 117198, Москва, ул. Миклухо-Маклая, 8.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Российский университет дружбы народов».

Автореферат разослан «\_\_» \_\_\_\_\_ 2018 г.

**ВРИО Учёного секретаря Диссертационного совета  
(Приказ № 826 от 18.10.18)**

**Плетенева Т.В.**

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность работы.** Одной из задач стратегии развития фармацевтической промышленности РФ является совершенствование системы государственного контроля качества лекарственных средств. Внедрение оперативного контроля в процессе производства обуславливает разработку экспрессных, высокопроизводительных методов. До введения в ГФ РФ метода лазерной дифракции определение размера и формы частиц дисперсной фазы в жидких гетерогенных лекарственных формах осуществляли гранулометрическими методами: ситовым, седиментационным, микроскопическим. На сегодняшний день, согласно требованиям фармакопей Российской Федерации, США, Евросоюза, Японии, массовый анализ дисперсных систем выполняют с применением методов лазерного (LALLS) и динамического (DLS) светорассеяния, в том числе, в разработке Государственного эталона (ГЭТ) измерения единиц дисперсных параметров аэрозолей, взвесей и порошкообразных материалов. В диссертации обосновано применение лазерного и динамического светорассеяния в качестве стандартов, обеспечивающих унификацию исследований и единство измерений дисперсных свойств растворов активных фармацевтических ингредиентов (АФИ) и вспомогательных веществ (ВВ), содержащих нано- и микрочастицы.

Применение в фармации методов анализа одно- и многокомпонентных лекарственных форм (ЛФ), основанных на хемометрической обработке результатов, аналогично БИК-методу, представляется актуальной задачей, поскольку делает возможным проведение контроля качества без вскрытия упаковки.

В диссертации на многочисленных примерах продемонстрировано влияние на светорассеивающую способность водных растворов фармацевтических субстанций (ФС) различных способов модификации свойств: варьирования изотопного состава дисперсионной среды, дисперсности твердой фазы и механоактивации. Полученные результаты открывают возможность улучшения сольубилизационных характеристик лекарственных веществ, что является одним

из основных направлений в разработке современных систем доставки лекарственных средств (*Drug Delivery Systems*).

**Степень разработанности темы.** Вопросы обеспечения единства измерений дисперсных параметров гомогенных и гетерогенных растворов, в том числе с применением методов светорассеяния, представлены в работах следующих зарубежных и отечественных ученых: Wang C.Y., Fu W. E., 2007; Duke S.D., Brown R.E., 2000; Балаханов М.В., Балаханов Д.М., Лесников Е.В., 2015; Карпов О.В., 2013; Щипунов А.А., Асланян Э.Г., 2013. Принимая во внимание возрастающие требования к качеству и безопасности ЛС, актуальны разработки в области создания ГЭТ, обеспечивающих единство измерений дисперсных параметров. С введением в ГФ РФ ОФС.1.2.1.0008.15 «Определение распределения частиц по размеру методом лазерной дифракции света», разработанной при участии кафедры фармацевтической и токсикологической химии медицинского института РУДН, воспроизведение, хранение и передача единиц размера частиц, объемной и счетной концентрации осуществляются методом статического светорассеяния с применением измерителей дисперсности малоугловых. Однако для более полного описания свойств дисперсных систем необходим комплексный подход, включающий методы оптической микроскопии, статического и динамического светорассеяния.

Учитывая важность проведения теста на растворимость в воде при контроле качества порошкообразных АФИ и ВВ, представляет научный интерес разработка простых и эффективных способов увеличения их солубилизационных характеристик. Применение лазерных измерителей дисперсности в контроле качества АФИ и ВВ показало возможность расширения границ научно-исследовательской практики с их использованием, например, для разработки новых методов анализа.

**Цель работы** заключается в разработке современных научно-методологических подходов к оценке качества лекарственных средств по показателям «растворимость», «подлинность», «чистота», основанных на результатах исследования интенсивности лазерного светорассеяния водными растворами АФИ и ВВ в условиях варьирования изотопного (D/H) состава

растворителя, дисперсности растворяемого вещества и различной пробоподготовки.

Для достижения поставленной цели решались следующие **задачи**:

- 1.** Описать измерительный комплекс и определить метрологические характеристики (показатели точности) средств измерений на основе лазерного светорассеяния, обеспечивающих единство измерений дисперсных параметров нано– и микроразмерных частиц в водных растворах АФИ и ВВ.
- 2.** Оценить целесообразность использования методов статического и динамического светорассеяния, наряду с методами прямого измерения, для контроля качества растворов фармацевтических субстанций, жидких лекарственных форм и минеральных вод по показателям «описание», «чистота», «подлинность».
- 3.** Применить разработанный образец лабораторного оборудования, сочетающий методы лазерного светорассеяния и оптической когерентной микроскопии с интерферометрией, для экспресс–идентификации без вскрытия упаковки водных растворов лекарственных средств и образцов воды с разным содержанием тяжелого изотопа водорода.
- 4.** Разработать методику кинетической оценки растворения АФИ и ВВ с применением малоуглового лазерного измерителя дисперсности на основании результатов регистрации во времени параметра дисперсности «лазерное светозатемнение» для усовершенствования и дополнения фармакопейного теста «Растворимость».
- 5.** Обосновать приемлемость применения в качестве растворителя воду, обедненную тяжелым изотопом водорода, для управления солубилизационными характеристиками АФИ и ВВ различных химических и фармакологических классов.
- 6.** Изучить влияние технологической грануляции в условиях псевдоожижения на скорость растворения фармацевтических композиций, содержащих лактозу моногидрат, в воде с разным содержанием тяжелого изотопа водорода.

7. Оценить изменение дисперсных свойств субстанций–порошков методами оптической микроскопии и лазерной дифракции в процессе их механохимической обработки.
8. Изучить реакционную способность механоактивированных субстанций–порошков при растворении в воде в условиях реализации кинетического изотопного эффекта (КИЭ) по растворителю.
9. Применить закономерности аррениусовской кинетики для количественной оценки биологической активности (модель *Spirotox*) АФИ и ВВ до и после механохимического воздействия на субстанции–порошки.

**Научная новизна работы.** Впервые разработаны научно-методологические подходы к оценке качества лекарственных субстанций (бендазола гидрохлорида, топирамата), вспомогательных веществ (лактозы моногидрата), готовых лекарственных форм (инсулина аспартата, календулы и пиона уклоняющегося настойки), биологически–активных веществ (природных и синтезированных биорегуляторных пептидов, бычьего сывороточного альбумина), бактериальных культур (клетки штамма *E. Coli K-12*) и минеральных вод на основании результатов исследования лазерного светорассеяния в условиях варьирования изотопного (D/H) состава растворителя, дисперсного состава и способов пробоподготовки растворяемого вещества. **Описана** метрология измерительных методов и **определены** основные метрологические характеристики измерения параметров дисперсности порошков, суспензий и аэрозолей с использованием современных измерителей дисперсности. **Впервые** на примере ЛС разной природы продемонстрированы преимущества комплексного подхода к стандартизации ЛС, включающего методы прямого и косвенного гранулометрического анализа. Результаты лазерных исследований физико–химических свойств водных растворов фармацевтических субстанций (ФС) **положены** в основу разработки экспресс–способа контроля качества гомогенных жидких растворов ФС без вскрытия упаковки. **Впервые** продемонстрировано, что вода, обедненная дейтерием, является растворителем, обеспечивающим достоверность результатов измерений светорассеяния водных растворов ФС. **Впервые** расширены границы применения фармакопейного метода

лазерной дифракции для контроля качества лекарственных средств (ККЛС): оценка дисперсности применена для контроля кинетики растворения на основании регистрации величины «лазерного светозатемнения» ( $obscuration = 1 - \frac{I}{I_0}$ ) во времени. **Произведена** валидация разработанной методики на повторяемость результатов измерений. **Впервые** изучено влияние технологических условий пробоподготовки фармацевтических субстанций и произведенного механохимического воздействия на скорость растворения в воде с варьированием содержания тяжелого изотопа водорода. **Впервые** изучены свойства растворов АФИ и ВВ в условиях изотопного варьирования среды растворителя и механической активации растворяемого вещества биологическим методом *Spirotox*.

**Практическая значимость работы.** Результаты работы использованы для обоснования разработки и введения в ГФ РФ ОФС.1.2.1.0008.15 «Определение распределения частиц по размерам методом лазерной дифракции», что значительно расширило возможности контроля качества лекарственных средств на стадии их разработки и производства по показателям «Размеры частиц», «Механические включения». Сформированный атлас размерных спектров водных плотностных неоднородностей в образцах минеральных вод природного и искусственного происхождения 29 наименований производителей может быть использован в качестве библиотеки стандартов. Результаты изотопной зависимости структуры и свойств жидких сред, содержащих наночастицы, могут быть использованы для предупреждения и устранения возможных артефактов в химии растворов низких концентраций. Установленные изотопный и механохимический эффекты зависимости кинетики растворения АФИ и ВВ разных фармакологических и химических классов в воде могут быть применены для управления солюбилизационными характеристиками субстанций в производстве и контроле качества лекарственных средств. Разработанная методика кинетической оценки растворения АФИ и ВВ с применением малоуглового лазерного измерителя дисперсности может быть применена для усовершенствования и дополнения существующего фармакопейного теста «Растворимость». Эффект произведенной механоактивации может быть доказан,

наряду с существующими физико-химическими методами, на основании количественных расчетов с применением биотестирования.

**Методология и методы исследования.** В диссертационном исследовании использованы современные физико-химические и биофармацевтические методы анализа. Подтверждена необходимость системного подхода к контролю качества водных гетерогенных и гомогенных растворов лекарственных средств на основе кинетических критериев с использованием методов лазерного светорассеяния, в том числе разработанного прибора ИДЛ-1.

**Положения, выносимые на защиту:**

- 1.** Метрологическое обеспечение средств и методов лазерного светорассеяния для единства измерений дисперсных свойств порошков, суспензий и аэрозолей в фармации.
- 2.** Особенности применения методов статического и динамического светорассеяния для контроля качества различных фармацевтических объектов (настоек, минеральных вод, биологически активных пептидов, бактериальных штаммов) по показателям «описание», «чистота», «подлинность» наряду с методами прямого измерения.
- 3.** Рабочий образец лабораторного оборудования на основании методов лазерного светорассеяния и когерентной микроскопии в сочетании с интерферометрией для экспресс-идентификации водных растворов лекарственных средств без вскрытия упаковки.
- 4.** Новая методика кинетической оценки растворения АФИ и ВВ с применением малоуглового лазерного измерителя дисперсности на основании результатов регистрации во времени параметра дисперсности «лазерное светозатемнение» для усовершенствования и дополнения фармакопейного теста «Растворимость».
- 5.** Вода, обедненная тяжелым изотопом водорода, как управляющий фактор улучшения солюбилизационных характеристик АФИ и ВВ различных химических и фармакологических классов.

6. Влияние технологических условий пробоподготовки на скорость растворения ЛП, содержащих лактозу моногидрат, в воде с разным содержанием тяжелого изотопа водорода.
7. Эффект влияния механоактивации на дисперсные свойства и кинетику растворения в воде ФС в условиях реализации КИЭ по растворителю.
8. Закономерности аррениусовской кинетики для количественной оценки биологической активности (модель *Spirotox*) АФИ и ВВ до и после механохимического воздействия на порошки субстанций.

**Степень достоверности полученных результатов.** Диссертационная работа выполнена на современном научно–методическом уровне в объеме, достаточном для приведенных в работе обобщений и обоснования выводов. Достоверность результатов обеспечена использованием современных инструментальных методов фармацевтического анализа – лазерной дифракции света, динамического светорассеяния, лазерной интерференции, оптической микроскопии и биотестирования. Экспериментальные данные, полученные автором, обработаны с помощью современного ПО аналитических приборов, а также пакета программ фирмы *Origin Lab Corporation* для численного и графического анализа экспериментальных результатов с применением первичных и вторичных методов математико–статистического анализа. В диссертации приводятся ссылки на 492 работы отечественных и зарубежных авторов, имеющие отношение к теме исследования, большая часть которых приходится на период 2010–2018 годов.

**Апробация результатов диссертационной работы.** Основные результаты были доложены более, чем на 40 международных и российских научных конференциях, включая устные доклады и постерные сессии, в том числе: 25<sup>th</sup> International Conference «Engineering the Chemical Transformation by Bridging Science and Technology» (Italy, 2018); VII–IX International Scientific Conference SCIENCE4HEALTH (Moscow 2016–2018); 16<sup>th</sup> International Symposium on Trace Elements in Man and Animals (TEMA16) (Санкт-Петербург 2017); The 10<sup>th</sup> Annual Conference on the Physics, Chemistry and Biology of Water (Sofia, 2016); The 3<sup>rd</sup> International Congress on Deuterium Depletion (Budapest, 2015) и других.

**Публикации.** По материалам диссертации опубликовано: 45 статей в отечественных и зарубежных журналах, из них в журналах, индексируемых в Scopus – 18; в рецензируемых журналах по списку ВАК–19, в рецензируемых периодических изданиях–8; а также 45 тезисов докладов, 9 учебных пособий и 3 учебника с грифом УМО.

**Соответствие диссертации паспорту научной специальности.** Исследования диссертационной работы по изучению физических, химических, биологических свойств лекарственных веществ, их изменений с учетом влияния разнообразных факторов, а также разработанные новые и совершенствованные существующие методики стандартизации, контроля качества ЛС соответствуют формуле специальности 14.04.02 – «Фармацевтическая химия, фармакогнозия»; полученные результаты соответствуют областям исследования специальности согласно пунктами 2 и 3 паспорта научной специальности.

**Личный вклад автора** состоит в непосредственном участии в экспериментальных исследованиях, проводимых на протяжении 15 лет: постановке задач, обработке, обобщении результатов и подготовке публикаций в соавторстве с научным коллективом кафедры – коллегами, магистрами, аспирантами и научными сотрудниками Лаборатории прикладной гидрохимии и аналитической химии ФГУ «ГОИН», Института коллоидной химии и химии воды им. А. В. Думанского НАН Украины, МГТУ им. Н.Э. Баумана, НПФ Материал Медика Холдинг. **Работа выполнена** с использованием оборудования лабораторий кафедры фармацевтической и токсикологической химии Медицинского института ФГАОУ ВО «РУДН».

**Структура и объем диссертации.** Общий объем диссертации составляет 329 страниц машинописного текста, включая 83 рисунка, 55 таблиц, 492 ссылки на литературные источники зарубежных и отечественных авторов.

**Во введении** обсуждается актуальность темы, обосновывается цель работы и выбор объектов исследования, указывается научная новизна и практическая значимость работы. **В первой** главе приведен литературный обзор современного состояния и существующих метрологических проблем аналитических измерений, путей совершенствования стандартизации водных растворов ЛС. **Вторая** глава

посвящена описанию и характеристике использованных в работе объектов, методов и приборного обеспечения для измерения дисперсных параметров взвесей, порошков субстанций и лекарственных препаратов. В третьей главе представлены результаты исследований, включающие: метрологическое обеспечение, погрешности результатов измерения величин дисперсных параметров, значимость применения методов лазерного светорассеяния при контроле качества растворов лекарственных веществ и фармацевтических объектов разной природы; разработку оригинальной методики кинетической оценки растворения ФС разных фармакологических и химических классов в воде с измененным изотопным составом по водороду методом лазерной дифракции света, а также влияние механохимической активации субстанций на свойства растворов лекарственных веществ по результатам *Spirotox*-метода.

## ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

### Объекты и методы исследования

Объектами исследования настоящей работы выступили ЛС различных химических и фармакологических классов, представленные на российском и зарубежном фармацевтическом рынках: активные фармацевтические ингредиенты (бендазола гидрохлорид, топирамат), вспомогательные вещества (лактоза моногидрат разных производителей и серий), готовые лекарственные формы (инсулина аспарат, календулы и пиона уклоняющегося настойки), биологически-активные вещества (природные и синтезированные биорегуляторные пептиды, бычий сывороточный альбумин), бактериальные культуры (клетки штамма *E. Coli K-12*), воды минеральные бутилированные минерализацией до 1 г/л и свыше 1 до 10 г/л, образцы воды с широким диапазоном варьирования концентрации тяжелого изотопа водорода. Качество исследуемых в работе объектов — АФИ, ВВ и ЛП — соответствует требованиям НД.

Для регистрации интенсивности статического и динамического светорассеяния на частицах дисперсной фазы от субнанометрового до миллиметрового диапазона в исследуемых ЛС и БАВ применяли анализаторы как промышленного, так и собственного производства: лазерный дифракционный

анализатор размера частиц серии MasterSizer 3600E (Malvern Instruments, UK); лазерный анализатор гидродинамического размера частиц серии ZetaSizer (Malvern Instruments, UK); образец лабораторного оборудования, сочетающий метод оптической когерентной микроскопии с лазерной интерферометрией для определения подлинности без вскрытия упаковки; оптический бинокулярный микроскоп «Альтами БИО 2» с ПО Altami Studio для анализа и обработки изображений в режиме реального времени.

Для определения физико–химических свойств (молекулярно–динамических, спин–спиновой релаксации протона, вязкости, рассеяния лазерного света) образцов воды с разным изотопным составом водорода (D/H) применяли методы квазиупругого рассеяния медленных нейтронов (КРМН), ядерного магнитного резонанса (ЯМР–спиновое эхо), вискозиметрию с падающим шариком, малоуглового рассеяние лазерного света (LALLS–метод).

Для исследования кинетики растворения субстанций–порошков в воде с разным изотопным составом по водороду применяли метод лазерной дифракции на основании регистрации интенсивности углового рассеяния электромагнитной волны на дисперсных частицах в зависимости от  $\pi d/\lambda$ .

Модифицирование свойств лекарственных веществ без изменения их состава осуществляли с использованием методов механохимической активации (МА). Микроструктурирование АФИ и ВВ производили путем измельчения в механической режущей ножевой мельнице по типу «свободного прямого удара» (по Румпфу).

Исследование биологической активности образцов АФИ и ВВ проводили *Spirotox*–методом с расчётом энергии активации  $^{obs}E_a$  процесса лиганд–индуцированной гибели тест–объекта в растворах ЛС до и после МА, используя интегральную форму уравнения Аррениуса.

Последовательность обработки результатов прямых измерений в условиях повторяемости и воспроизводимости с использованием пакета программ *Origin Lab Corporation* состояла в вычисление значений стандартного отклонения ( $\bar{x} \pm SD$ ), относительного доверительного интервала среднего значения ( $\bar{x} \pm \Delta\bar{x}$ ) и относительной ошибки среднего ( $\bar{\varepsilon}, \%$ ).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

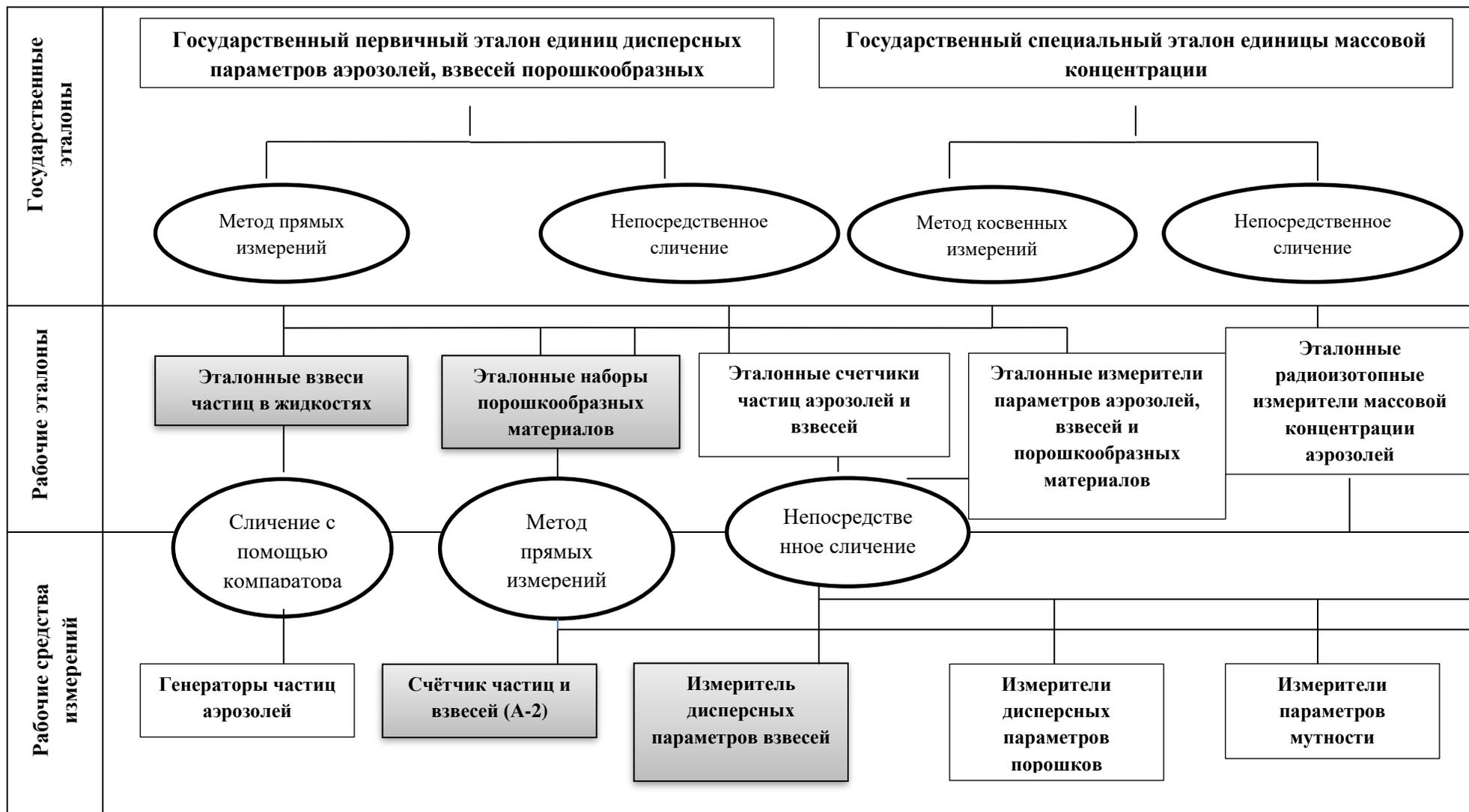
### 1. Измерительный комплекс и метрологические характеристики средств измерений дисперсных параметров нано– и микроразмерных частиц ФС

Развитие фармацевтической отрасли в области технологического перевооружения – разработки и производства отечественных ЛП, в том числе с заранее заданными свойствами и направленным действием (*targeted drug delivery system*), предъявляет растущие требования по обеспечению надежности метрологических характеристик (показателей точности) аналитического оборудования. Разработка метрологических требований к измерениям, эталонам единиц величин, стандартным образцам (СО), средствам измерений, методикам, – обеспечивает достижение требуемой точности, достоверности и сопоставимости результатов при проведении контроля качества и стандартизации ЛС на всех этапах жизненного цикла. Для этого ведется работа по созданию Государственных эталонов (ГЭТ) единиц измеряемых величин. Поскольку номенклатура ЛС широко представлена такими лекарственными формами (ЛФ) как субстанции–порошки, гетерогенные растворы и аэрозоли, актуальны вопросы разработки и внедрения ГЭТ единиц дисперсных параметров порошков, взвесей и аэрозолей. Эталоны состоят из измерителей дисперсности и счетчиков частиц, использующих оптические методы для определения размера, числа, концентрации и функции распределения частиц по размерам, и наборы порошкообразных материалов с известными дисперсными характеристиками.

Наше участие в Государственной поверочной схеме измерения параметров дисперсности ЛС различной природы продемонстрировано на этапах разработки и испытания собственного оборудования: измерителя дисперсности лазерного (ИДЛ–1), портативного счетчика аэрозольных частиц (А–2), а также создания рабочих эталонов порошкообразных материалов и взвесей (рис. 1).

*Измеритель дисперсности лазерный ИДЛ – 1* разработан нами для определения параметров дисперсности взвесей/суспензий и аэрозолей в аналитическом диапазоне от 0,5 мкм – 140 мкм решением обратной задачи рассеяния света на модели частиц сферической формы.

**Рисунок 1.** Государственная поверочная схема измерения параметров дисперсности и метрологического обеспечения аналитических методов (закрашенные элементы схемы демонстрируют собственное участие в системе).



При углах  $\sin(\varphi) \approx \varphi$  индикатриса рассеяния  $I(\beta)$  на ансамбле частиц плоской электромагнитной волны равна:  $I(\beta) = \frac{C}{\beta} \cdot I_0 \int_0^\infty f(\rho) \cdot \rho^2 \cdot J_1^2(\rho\beta) d\rho$  **1**

где  $\rho = \frac{\pi \cdot D}{\lambda}$  – безразмерный параметр;  $D$  – диаметр частиц;  $\lambda$  – длина волны излучения;  $\beta$  – угол рассеяния;  $J_1(\rho\beta)$  – функция Бесселя первого порядка;  $f(\rho)$  – плотность распределения частиц по размерам;  $C$  – постоянная;  $I_0$  – интенсивность зондирующего излучения.

Функция  $f(\rho)$  определяется по измеренной индикатрисе рассеяния  $I(\beta)$  из следующей формулы:  $f(\rho) = -\frac{\bar{c}}{\beta} \cdot \int_0^\infty h_T(\rho\beta) \cdot T(\beta) d\beta$  **2**

Здесь:  $h_T(\rho\beta) = -2 \cdot \pi Y_1(\rho\beta) \cdot [2\rho\beta J_0(\rho\beta) - J_1(\rho\beta)]^{-4}$ ;  $T(\beta) = \theta(\beta) - \theta(\infty)$ ;

$\theta(\beta) = I(\beta) \cdot \beta^3$ ;  $\theta(\infty) = \lim_{\beta \rightarrow \infty} \theta(\beta)$ , где  $Y_1(\rho\beta)$  – функция Неймана первого порядка,

$J_0(\rho\beta)$  – функция Бесселя нулевого порядка.

*Лазерный счетчик А-2* разработан нами для определения количественных характеристик рассеянного или ослабленного излучения на решении обратной задачи в виде:  $I_g \frac{I_0}{I} = \frac{\pi \cdot C_n \cdot l}{4} \cdot \int_0^\infty D^2 \cdot Q(D, \lambda, m) \cdot f(D) dD$ , где  $I_0/I$  – абсорбция света;  $C_n$  – счетная концентрация частиц;  $\lambda$  – длина волны зондирующего излучения;  $Q$  – фактор эффективности ослабления для одиночных частиц;  $l$  – оптическая длина зондирования;  $D$  – диаметр частиц;  $m$  – показатель преломления материала частиц.

*Область применения:* определение счетной, массовой концентрации и значения функции распределения частиц полидисперсной фазы в аэрозолях и суспензиях; аналитический диапазон по размеру: 0,5 мкм – 140 мкм, по счетной концентрации: от 1 частицы в 1 см<sup>3</sup>. *Принцип измерений:* определяется число частиц в измерительном объеме прибора путём подсчёта количества импульсов света, рассеянного каждой отдельной частицей при её прохождении через световой луч.

В работе продемонстрирован пример собственной постановки и способ решения обратной задачи для реализации прикладных задач в области определения параметров дисперсности фармацевтических объектов.

### 1.1. Метрологические требования к измерениям

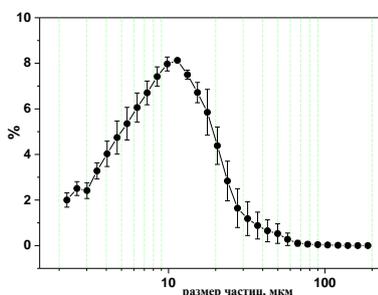
Для всех получаемых результатов измерений параметров дисперсности ЛС установлены метрологические характеристики (погрешности) в виде нормируемых

значений. Результаты измерений описываются как в концепции «погрешности», так и «неопределенности» (*сомнения в достоверности результата измерения*). Согласно ГОСТ Р 54500.3-2011 неопределенность измерения (*uncertainty of measurement*) оценивается несколькими количественными параметрами. Для характеристики отклонения результата измеряемой величины от истинного используют *неисключенную систематическую погрешность* ( $\theta$ ), обусловленную погрешностями вычислений и введения поправок на влияние систематических погрешностей:

$\theta = \mp k \sqrt{\sum_{i=1}^n \theta_i^2}$ , где  $k$  – коэффициент зависимости отдельных  $\theta$  от выбранной доверительной вероятности при их равномерном распределении (при  $P = 0,99$ ,  $k = 1,4$ ).

При определении значений размера частиц факторами, составляющими  $\theta$ , являются: погрешность измерения синуса угла дифракции решетки ( $\theta_1$ )=0,7%; погрешность длины волны источника лазерного излучения( $\theta_2$ )=0,001%; погрешность измерения размера пикселя при величине угла поворота $\alpha=90^0$ дифракционной решетки: ( $\theta_3$ )=0,02%;  $\theta_D=1,4 \cdot \theta_1=\pm 0,98\%$ .

*Среднеквадратическое отклонение* определения размера(эквивалентного диаметра,  $D$ ) частиц  $\sigma D=1,1-0,11\%$  при  $D=1-100$  мкм; определения объемной концентрации  $\sigma V = 0,5 \%$ ; определения значений функции распределения частиц по размеру  $\sigma D = 1,2-0,51 \%$  при  $D=1-100$  мкм и  $C_n \geq 400$  частиц. Пример представления результатов по определению распределения частиц дисперсной фазы по размеру с расчетом среднеквадратического отклонения представлен на рис. 2.



**Рисунок 2.** Распределение частиц по размеру в суспензии инсулина для подкожного введения ( $n=7$ ,  $\bar{X} \pm SD$ ).

При определении значений счетной концентрации  $C_n$  составляющие  $\theta$ : погрешность измерения коэффициента ослабления зондирующего излучения

$\theta_1 = \pm 0,5\%$ ; погрешность измерения длины рассеивающего объема  $\theta_2 = \pm 0,02\%$ ; погрешность измерения диаметра частиц  $\theta_3 = \pm 0,7\%$ :  $\theta_{Cn} = \pm 1,4 \cdot [\theta_1^2 + \theta_2^2 + 4 \cdot \theta_3^2]^{0,5} = \pm 2,1\%$ .

При определении значений *объемной концентрации* составляющие  $\theta$ : погрешность измерения коэффициента ослабления зондирующего излучения  $\theta_1 = \pm 0,5\%$ ; погрешность измерения длины пути  $l$  рассеивающего объема  $\theta_2 = \pm 0,02\%$ ; погрешность измерения диаметра частиц  $\theta_3 = \pm 0,7\%$ ;  $C_V = \pm 1,4 \cdot [\theta_1^2 + \theta_2^2 + \theta_3^2]^{0,5} = \pm 1,2\%$ .

При определении значений *массовой концентрации*  $C_m$  составляющие  $\theta$ : погрешность измерения  $C_V$  и неисключенная систематическая погрешность плотности вещества  $\theta_p$ :  $C_m = \pm 1,4 \cdot (\theta_1^2 + \theta_2^2 + \theta_3^2 + \theta_p^2)^{0,5} = \pm 2\%$

*Неисключенная систематическая погрешность* значений функции распределения частиц по размеру определяется аналогично неисключенной систематической погрешности измерения размера частиц и составляет  $\theta \approx \pm 1\%$ .

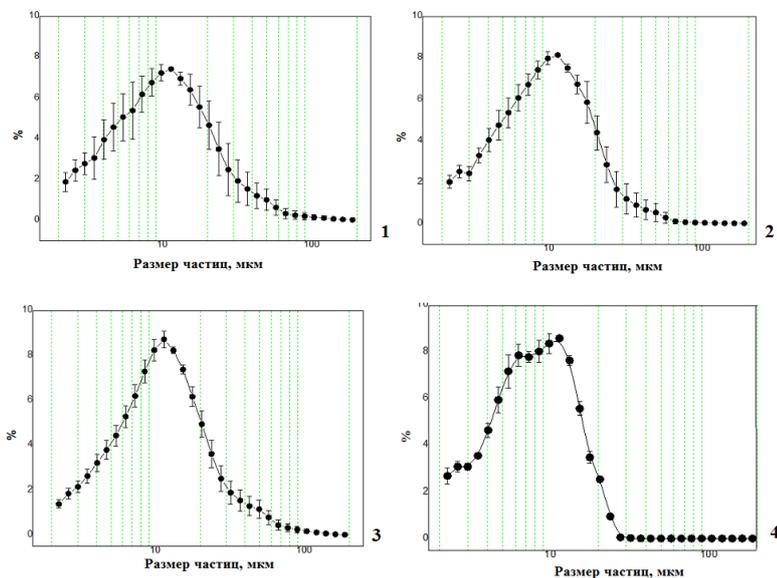
*Суммарную стандартную неопределенность* ( $u_c$ ) вычисляют по формуле:  $u_c = \sqrt{\int_{i=1}^m \left(\frac{\delta f}{\delta x_i}\right)^2 u^2(x_i)}$ . При определении размера частиц  $u_c = 1,2-0,12\%$ ; счетной концентрации  $u_c = 2,2\%$ ; объемной концентрации  $u_c = 1,1\%$ ; массовой концентрации  $u_c = 1,2\%$ ; значений функции распределения частиц по размерам  $u_c = 1,2-0,12\%$ .

*Расширенную неопределенность* ( $U$ ) рассчитывают по формуле:  $U = k \cdot u_c$ . Таким образом, при определении размера частиц  $U = 3,3\%$ ; счетной концентрации  $U_{Cn} = 6\%$ ; объемной концентрации  $U_{Cv} = 3\%$ ; массовой концентрации  $U_{Cm} = 3,5\%$ ; значений функции распределения частиц по размерам  $U_{f(D)} = 3,3\%$ .

## **2. Методы статического и динамического светорассеяния в контроле качества различных фармацевтических объектов**

На примере различных фармацевтических объектов (растворов фармацевтических субстанций, жидких лекарственных форм, бактериальных штаммов, биологически активных пептидов, минеральных вод) по показателям «описание», «подлинность», «чистота» нами проведена оценка целесообразности сочетания методов статического, динамического светорассеяния и оптической микроскопии для контроля их качества.

**Суспензии.** Согласно требованиям НД, подлинность суспензий инсулина–аспарта (НовоМикс Пенфилл®, ФлексПен®) для подкожного введения 100ЕД/мл («Ново Нордикс А/О», Дания) определяют, оценивая размер и форму кристаллов методом микроскопии: длина основной части кристаллов должна находиться в пределах 1–20 мкм. Однако применение метода оптической микроскопии для оценки размера и формы кристаллов в суспензии оказалось неприемлемым в связи с ограничениями технических характеристик оптического микроскопа. В то же время полученные нами гистограммы дифференциального объемного распределения частиц по размерам с применением анализатора дисперсности MasterSizer позволяют оценить ЛП по исследуемому показателю качества (рис. 3).



**Рисунок 3.**

Гранулометрический анализ образцов суспензий НовоМикс Пенфилл® (1,3) и ФлексПен® (2,4) для подкожного введения

( $n=7, \bar{X} \pm SD$ ):

1 – серия FT 63521;

2 – серия FT 69976;

3 – серия FT 63444;

4 – серия FJ 30093.

Поскольку неправильная геометрическая форма частиц может быть источником погрешностей при определении размера частиц методом статического светорассеяния, то оценка интегральных характеристик дисперсности анализируемого ЛП («лазерное светозатемнение»,  $obscuration = 1 - \frac{I}{I_0}$ ), «объемная концентрация», «удельная площадь поверхности») дает возможность полного описания физико–химических свойств дисперсной системы (табл.1).

**Таблица 1.** Интегральные характеристики дисперсности суспензий инсулина–аспартата разных серий для подкожного введения.

Интегральные характеристики дисперсности	Лекарственный препарат и номер серии ( $n=7, \bar{X} \pm SD$ )	
		НовоМикс Пенфилл®

	FT 63521	FT69976	FT 63444	<b>FJ 30093</b>
лазерное затемнение (1-I/I <sub>0</sub> )	0,219±0,01	0,277±0,01	0,233±0,01	<b>0,197±0,01</b>
объемная концентрация, C <sub>v</sub> %	0,0033±0,001	0,0040±0,001	0,0040±0,001	<b>0,0022±0,001</b>
удельная площадь поверхности, см <sup>3</sup> /г	0,99±0,10	0,99±0,18	0,94±0,18	<b>1,31±0,18</b>

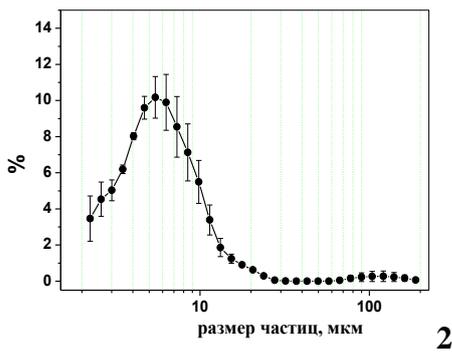
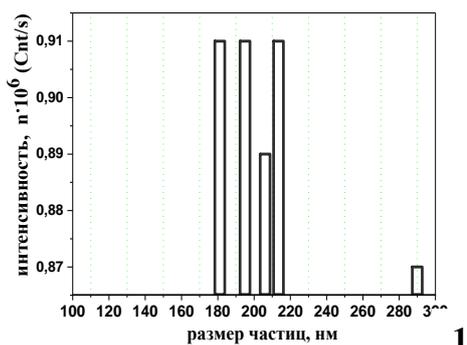
Анализ графических и табличных материалов позволяет констатировать статистически значимые отличия в свойствах дисперсности образца ФлексПен® серии FJ 30093 от других серий ЛП: в меньшей объемной доле частиц дисперсной фазы и бóльшей удельной площади, приводящей к агрегации частиц; на кривой распределения наблюдаются две размерные группы – 7мкм и 15мкм.

LALLS–метод показал бóльшую объективность в сравнении с другими оптическими методами в связи с возможностью статистической оценки всей анализируемой пробы, а также анализа интегральных характеристик дисперсности. Результаты исследования могут иметь значение при выявлении зависимости между дисперсностью ЛП и его биодоступностью.

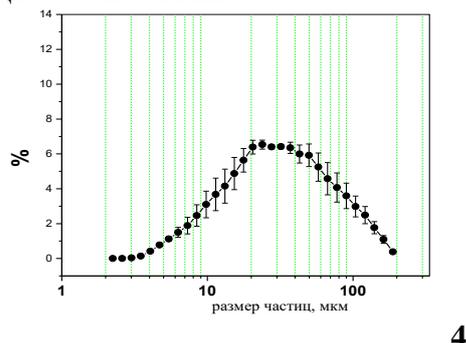
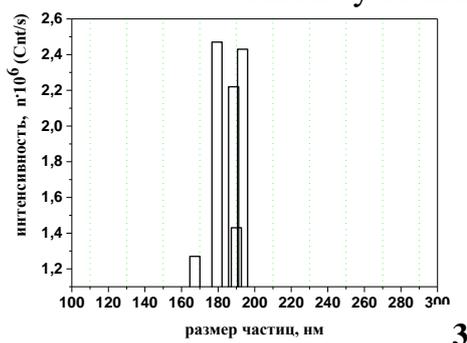
**Настойки.** Для контроля качества настоек Календулы и Пиона уклоняющегося по показателю «Описание», регламентирующего отсутствие осадка и взвешенного вещества, применяли методы DLS и LALLS (рис. 4). Кривые объемного распределения свидетельствуют о существовании 6мкм размерной группы объемной концентрации 10% в образце настойки календулы и 30мкм размерной группы объемной концентрации 7% в образце настойки пиона уклоняющегося. Механизм образования дисперсной фазы в исследуемых образцах обусловлен неконтролируемым появлением субмикронных частиц в настойках, получаемых из ЛРС. Об этом свидетельствуют размерные группы 160нм – 220нм в обоих образцах по данным метода динамического светорассеяния (см. рис. 4.1 и 4.3).

Методы DLS и LALLS можно применять при контроле качества ЖЛФ, получаемых из ЛРС, на протяжении всего срока годности. Изменение вида гистограммы объемного распределения, вызванное появлением размерных групп бóльшего диаметра, свидетельствует об окклюзии или абсорбции БАВ на субмикронных частицах дисперсной фазы.

### «Календулы настойка»



### «Пиона уклоняющегося настойка»



### Рисунок 4.

Гистограммы распределения частиц дисперсной фазы по размерам в настойках Календулы и Пиона уклоняющегося ( $n=7$ ,  $\bar{X} \pm SD$ ).

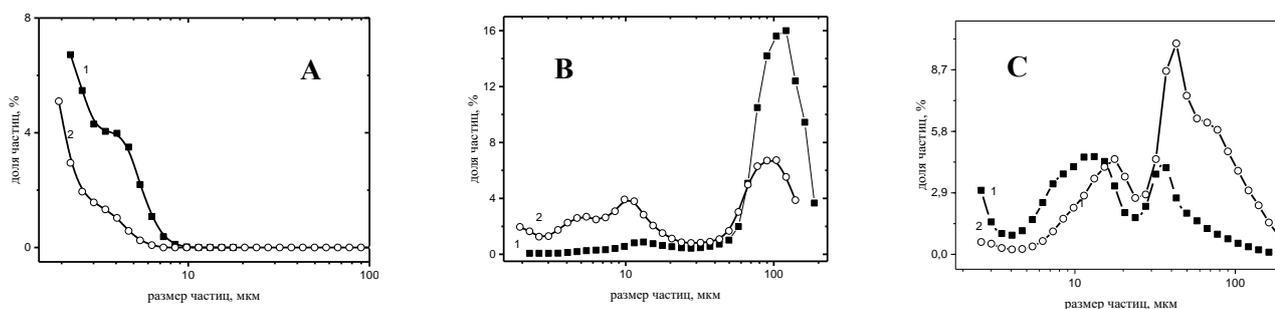
1 и 3 – по данным DLS–метода (в единицах интенсивности);  
2 и 4 – по данным LALLS–метода (в долях % от общего объема частиц в системе).

Это также имеет значение, учитывая влияние на фармакокинетику ЛП *pe ros*.

Результаты контроля дисперсности настоек лазерными методами подтверждают их необходимость при контроле качества ЖЛФ наряду с методами прямого измерения.

**Бактериальные штаммы на примере *Escherichia coli*.** Нами изучена способность клеток штамма *E. Coli* К–12 как бесплазмидных, так и с F–подобными плазмидами рАР22–2 и рАР42, маркированными включением в их структуру транспозонов Tn1 и Tn9, формировать полицеллюлярные («надклеточные») формы. В настоящее время одним из наиболее перспективных методических подходов к изучению распределения клеток бактерий по размерам и форме является малоугловое рассеяние лазерного излучения (рис.5).

На рисунке 5 А максимум численного распределения клеток — порядка 2 мкм, объемного — менее 1 мкм, что соответствует бесплазмидным единичным клеткам. Объемная доля их мала (около 7%). Гистограмма распределения по размеру клеток изогенных вариантов штамма С600, содержащих F–подобные плазмиды, свидетельствуют о присутствии полицеллюлярных форм двух размерных группы с максимумами 15 мкм и 100 мкм; в размерной 100 мкм группе обнаруживаются очень крупные частицы небольшого числа (см. рис. 5В).



**Рисунок 5.** Распределение бактериальных клеток и «надмолекулярных» ассоциатов штаммов S600 (A), S600pAP22-2: Tn1 (B) и S600pAP42:Tn9 (C) в логарифмической фазе роста по объему (1) и числу (2) (n=5). Концентрация суспензий:  $10^8$  клеток в мл.

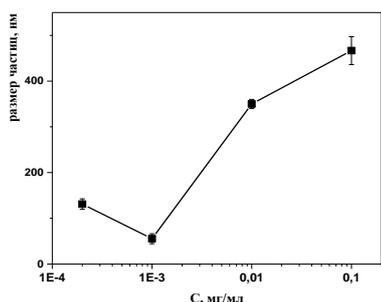
При анализе численного распределения клеток штамма S600pAP42:Tn9 в диапазоне от 3 до 100 мкм (см. рис. 5C) обнаружены две размерные группы с максимумами 15 мкм и 40 мкм. Их численная и объемная доли растут, что свидетельствует о выявлении клеточных ассоциатов.

Присутствие F-подобных плазмид в клетках *E. coli* является существенным фактором образования полицеллюлярных («ложно многоклеточных») форм у прокариот. Характер влияния плазмид на формирование полицеллюлярных форм *E. coli* связан с их генетическими особенностями и синтезируемыми под их контролем специфических поверхностных образований (конъюгативных пилей). Это может служить фактором повышенного риска возникновения антимикробной устойчивости и неблагоприятного развития инфекционного процесса в организме человека и животных.

**Биологически активные пептиды.** Широко используемым методом в исследованиях агрегации биологически активных пептидов в мономерном и агрегатном (олигомерном) состоянии является динамическое светорассеяние. DLS-метод дает возможность провести экспериментальный анализ существующей связи между размерами агрегата пептида, его биологической активностью и эффективностью интернализации. Нами исследована дисперсность образцов синтезированных и природных биорегуляторных пептидов на основании анализа гистограмм численного и объёмного распределения по размеру частиц в растворах пептидов. Биорегуляторы выделены экстракцией физиологическим раствором ( $T=40^{\circ}C$ ) из измельченных тканей печени крыс. Содержание белка во фракциях

супернатанта печени крыс (СПК) после центрифугирования определяли по уравнению Кристиана – Варбурга:  $C \text{ (мг/мл)} = E_{1\text{см}}^{1\%} \cdot Abs_{280} - E_{1\text{см}}^{1\%} \cdot Abs_{260}$  3

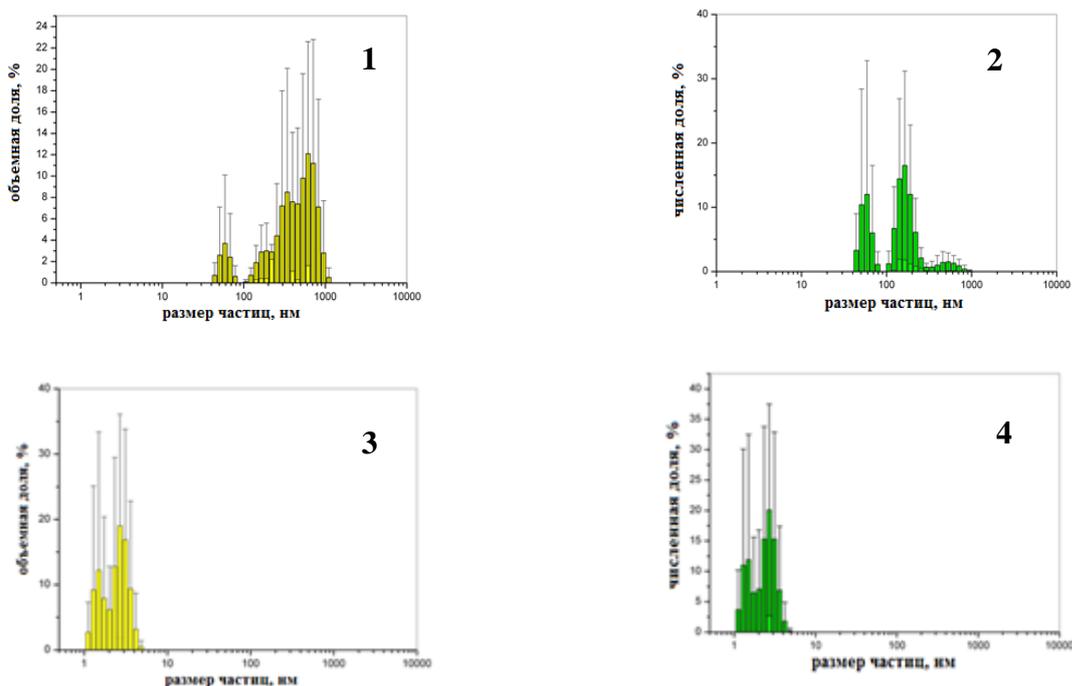
Методом DLS контролировали размер агрегатов в растворах СПК следующих разведений (мг/мл):  $2 \cdot 10^{-4}$ ;  $1 \cdot 10^{-3}$ ;  $1 \cdot 10^{-2}$ ;  $1 \cdot 10^{-1}$  (рис. 6). Выявлены пептиды, находящиеся в мономерном и олигомерном состояниях. Увеличение концентрации белка в СПК приводит к агломерации частиц: в растворах концентрацией 0,01 мг/мл и 0,1 мг/мл размер агрегатов значительно превышает 100 нм и достигает 500 нм.



**Рисунок 6.** Распределение по размеру частиц биорегулятора в растворах разной концентрации ( $n=5, \bar{X} \pm SD$ ).

Растворитель — 0,05 моль/л раствор фосфатно-боратного буфера; pH 7,4—7,6.

Также исследовались растворы синтезированных пептидов (СП), состоящих из 18-ти (A4— IAEIPTQKPAADVQFGSL) и 12-ти (A2 — LNVVIGKHGLL) аминокислотных остатков. Исследуемые образцы исходной концентрации 1 мг/мл различаются численным и объёмным распределениями частиц (рис. 7).



**Рисунок 7.** Гистограммы объёмного (1 и 3) и численного (2 и 4) распределений по

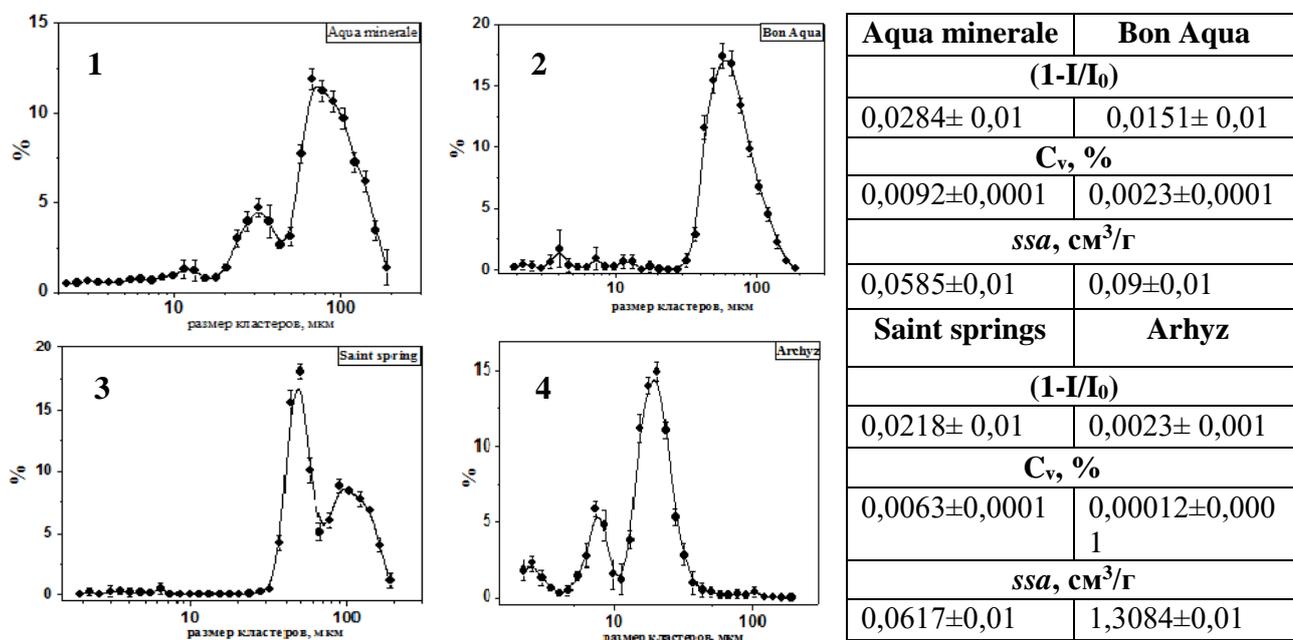
размеру частиц в растворах синтезированных пептидов исходной (1 мг/мл) концентрации по данным ДРС–метода: А4 – **1 и 2**; А2 – **3 и 4** ( $n=3, \bar{X} \pm SD$ ).

В растворе пептида А–4 наибольшая объёмная доля частиц соответствует размерным группам с максимумами около 60нм, 300нм и 700нм, очевидно, являющимися молекулярными ассоциатами. Объёмная доля таких частиц варьируется от 4 % до 12 % (см. рис. 7.1). Однако, численная доля крупных частиц в интервале размеров от 300 нм до 1000 нм наименьшая (около 1%). В растворе пептида А–2 объём и число всех частиц с размерами от 1 до 3 нм составляет ~20% от общего объёма и числа частиц в системе (см. рис. 7.3 и 7.4). В каждом из растворов наблюдается адгезия частиц; образующиеся конгломераты различаются по размеру.

**Минеральные воды.** Типирование минеральных вод строится на рутинном и длительном анализе химического состава воды (общей минерализации, ионного состава, рН и др.). Нами разработан экспресс–способ типирования минеральных вод с применением LALLS–метода, основанный на представлениях о жидкой воде, как о структурно неоднородной среде. Анизотропия рассеяния воды обусловлена существующими плотностными неоднородностями – «квазичастицами» воды эффективный показатель преломления которых внутри незначительно превышает единицу. Следовательно, наблюдаемое нами малоугловое рассеяние лазерного света в воде возникает из–за отличия локальной плотности жидкой воды от средней на границе плотностных неоднородностей. Уникальную комбинацию распределения плотностных неоднородностей воды по размеру («размерные спектры») определяет химический, изотопный и газовый состав дисперсионной среды. Полагая, что концентрация примесных веществ в воде влияет на суммарную индикатрису рассеяния, то функция распределения позволяет оценить значения концентрации и размерный состав примеси, что и было применено нами на примере получения «размерных спектров» и интегральных показателей дисперсности локальных водных плотностных неоднородностей исследуемых образцов минеральных вод 29 торговых марок. Составлен Атлас референсных «размерных спектров» водных плотностных неоднородностей для контроля

качества минеральных вод минерализацией до 1г/л по показателю «подлинность» (Глава 3.4.3. Тома Диссертации).

На рисунке 8 представлены примеры уникальных «размерных спектров» – гистограмм объемных распределений водных плотностных неоднородностей бутилированных минеральных вод минерализацией до 1г/л.



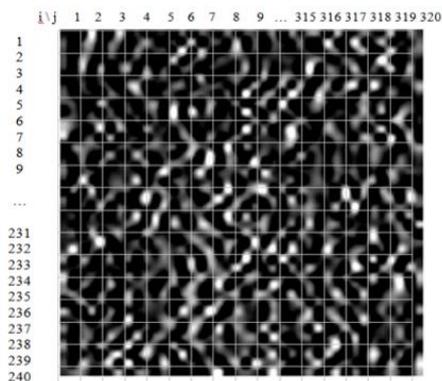
**Рисунок 8.** Гистограммы объемных распределений водных плотностных неоднородностей («размерные спектры») в образцах минеральных вод минерализацией до 1г/л: 1 – *Aqua Minerale*, 2 – *Bon Aqua*, 3 – *Saint Springs*, 4 – *Archyz* (n=20,  $\bar{X} \pm SD$ ). На вставке – интегральные показатели дисперсности.

Установление взаимно однозначных соответствий по аналогии с гетерогенными растворами: «природа минеральной воды – вид размерного спектра», применяя метод статического светорассеяния для измерения углового показателя рассеяния в воде, дает возможность экспресс типирования минеральных вод.

### 3. Способ идентификации водных растворов лекарственных средств без вскрытия упаковки

Разработанный нами образец лабораторного оборудования, сочетающий оптическую когерентную микроскопию (ОКМ) и интерферометрию, может применяться в экспресс–определении подлинности водных растворов ЛС без вскрытия упаковки. Методика основана на расчетах интерференционной картины

(ИК), формируемой световыми пучками после дифракции света в исследуемом образце на акустической волне. Основными этапами алгоритма расчета ИК являются: сегментация изображения, представление, описание и анализ изображения с целью идентификации (рис. 9).



**Рисунок 9.** Дискретное представление интерференционной картины.

Поскольку корреляционный метод, применяющийся для сравнения фрагментов изображений при малых геометрических искажениях, очень чувствителен к ракурсным искажениям, повороту и масштабированию, для описания локальных окрестностей характерных точек применяют специальные дескрипторы  $d_i(t)$  – критерии различия ИК во времени. Общая схема алгоритма вычисления дескрипторов приведена на рис. 10.



**Рисунок 10.** Схема алгоритма вычисления дескрипторов.

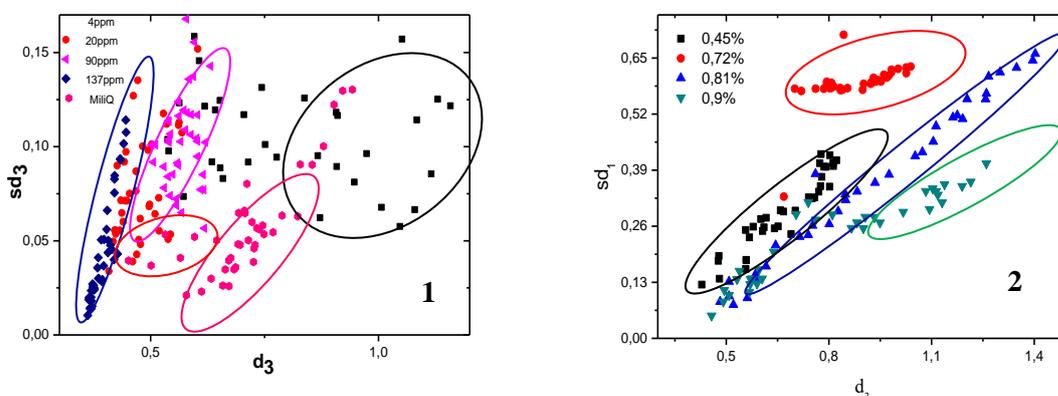
Дескрипторы характеризуются малой изменчивостью при различных геометрических и фотометрических преобразованиях получаемого изображения, например, в связи с формированием водных плотностных неоднородностей микронного масштаба во времени (табл. 2).

**Таблица 2.** Математическое представление и описание дескрипторов.

Дескриптор	Математическое представление	Описание
$d_1$	$d_1 = \frac{i_{\Delta S_i > S_b}}{i_t} \cdot 100\%$ <p>где <math>i_t</math> – общее число элементов; <math>\Delta S_i</math> – величина различий по уровню сигнала элементов двух интерференционных картин; <math>S_b</math> – пороговый уровень сигнала.</p>	– число различающихся элементов вне зависимости от степени различия
$d_2$	$d_2 = \frac{\sum_{\Delta S_i > S_b} \Delta S_i}{i_t \cdot \bar{S}} \cdot 100\%$ <p>где, <math>\sum_{\Delta S_i &gt; S_b} \Delta S_i</math> – среднее значение уровня</p>	– степень различий для каждого дискретного элемента на основании исходной интерференционной картины и суммарной

	сигнала всех элементов исходной интерференционной картины	интенсивности уровня её сигнала
$d_3$	$d_3 = \frac{\sum_{\Delta S_i > S_b} \Delta S_i}{i_t \cdot \Delta S_{max}} \cdot 100\%$ <p>где, <math>\Delta S_{max}</math> – сумма max возможных различий по уровню сигнала всех соответствующих элементов интерференционных картин абсолютно чёрного и абсолютно белого цвета</p>	– величина max возможных различий интерференционных картин абсолютно чёрного и абсолютно белого цвета

Результаты статистического анализа представлены нами в виде двумерных диаграмм зависимости варибельности  $sd_i(t)$  (стандартного отклонения) от значения дескриптора  $d_i(t)$ . Варибельность значений  $d_i(t)$  позволяет характеризовать «устойчивость» процесса формирования/распада водных плотностных неоднородностей в исследуемых образцах: растворах натрия хлорида 0,45%, 0,72%, 0,81% и 0,9% (изотонический раствор) и в воде с содержанием тяжелого изотопа  $^2_1H(D)$ : 4ppm, 20ppm, 90ppm, 137ppm, 140ppm (рис. 11). Выбор объектов исследования обусловлен частотой применения изотонического раствора в медицине и интересом к воде с пониженным содержанием изотопа  $^2_1H(D)$ , как адьювантому средству.



**Рисунок 11.** Диаграммы зависимости варибельности значений  $sd_i$  от  $d_i$  по данным метода ОКМ, комбинированной с интерферометрией. 1 – образцы воды с содержанием изотопа  $^2_1H(D)$  от 4ppm до 140ppm; 2 – образцы водных растворов NaCl с концентрацией от 0,45% до 0,9% (n=5).

Полученные диаграммы представляют собой расположенные в отдельных зонах скопление экспериментальных точек – «облака рассеяния». Каждый образец характеризуется индивидуальной зоной по координатам и форме в зависимости от своей природы, что и обуславливает процесс

формирования/распада водных плотностных неоднородностей. Проводимые нами исследования послужили основой для разработки ПО –Vidan. Это дает возможность применять новый способ, отличающийся экспрессностью и возможностью анализа без нарушения целостности упаковки, для определения подлинности водных растворов АФИ, ВВ, а также, минеральных бутилированных вод в передвижных лабораториях (аналогично БИК–спектрометрии).

#### **4. Кинетическая оценка растворения АФИ и ВВ в воде методом статического светорассеяния (лазерной дифракции)**

Растворимость – важнейший показатель качества, отражающий физико-химические свойства (АФИ): гидрофильность/гидрофобность, полиморфизм кристаллов, дисперсность АФИ, форму частиц. Предшествующая высвобождению АФИ из ЛП растворимость является одним из ключевых факторов, влияющих на эффективность лекарственных средств. Направленная разработка новых лекарственных препаратов с заранее заданными свойствами (*drug design*) основывается, в том числе, на данных по растворимости веществ–кандидатов.

Согласно требованиям ОФС фармакопейного компендиума регламентирование теста «Растворимость» для фармацевтических субстанций сводится к визуальной оценке концентрации насыщенного раствора при достижении термодинамического равновесия между растворителем и растворенным веществом и характеристике приблизительной растворимости при инкубации навески ЛВ в растворитель. В итоге, обозначения и термины растворимости АФИ и ВВ – описательные, а их значения – приблизительные.

Нами разработана методика изучения растворения АФИ и ВВ во времени на основании регистрации углового рассеяния плоской монохроматической электромагнитной волны (индикатрисы рассеяния), возникающей при взаимодействии излучения с частицами дисперсной фазы. Интенсивность индикатрисы рассеяния на частицах дисперсной фазы изменяется в зависимости от отношения  $\pi d/\lambda$ , где  $\lambda$  – длина волны электромагнитного излучения,  $d$  – размер частицы. Преимущества разработанной методики: возможность объективной оценки растворения АФИ на основании анализа изменения интегральных

характеристик дисперсности во времени и расчёт константы скорости растворения  $k(c^{-1})$ , как количественной и качественной характеристики вещества.

#### 4.1. Физико-химические свойства воды с измененным изотопным составом по водороду

В разделе представлены результаты изучения кинетики растворения фармацевтических субстанций в воде с разным изотопным составом по водороду: вода MiliQ (с природным изотопным составом по водороду), вода, обеднённая по содержанию дейтерия («легкая» вода, deuterium depleted water, ddw) и тяжёлая вода (оксид дейтерия). Данный выбор обусловлен тем, что вода с измененным изотопным составом по водороду обладает отличительными физико-химическими свойствами, следовательно, представляет интерес для изучения влияния на скорость растворения. Применяя различные методы физико-химического анализа: ЯМР-спиновое эхо, квазиупругое рассеяние медленных нейтронов КРМН (13,289 мэВ), вискозиметрия, LALLS-метод и др. нами получены результаты по молекулярно-динамическим характеристикам воды, времени спин-спиновой релаксации протонов в образцах воды, динамической вязкости, интенсивности светорассеяния и объемной концентрации плотностных неоднородностей в воде с разным содержанием тяжелого изотопа  ${}^2_1H(D)$  (табл. 3).

**Таблица 3.** Физические свойства воды с различным содержанием тяжелого изотопа  ${}^2_1H(D)$  ( $T=20\pm 0,4^\circ C$ ).

№	Физико-химический параметр	Вода ddw D/H= 4±0,9 ppm	Вода MiliQ D/H =140±0,9 ppm	Оксид дейтерия D <sub>2</sub> O, 99,9 %
1	Поверхностное натяжение $\sigma^*$ , мН/м * $\sigma = \frac{V_g}{2\pi R} \left( \frac{\rho}{n} \right)$ , где $V$ —объем жидкости, соответствующий $n$ - каплям, выпущенным из сталагмометра с радиусом трубки $R$ ; $\rho$ – плотность жидкости	75,172	72,860	67,800
2	Кинематическая вязкость, мм <sup>2</sup> /с	0,987	1,012	1,274
3	Плотность*, г/см <sup>3</sup> * $O^{18}/O^{16}=757$ ppm; $t^o=25 \pm 0,05$ °C	0,9969	0,9982	1,1042
4	Температура замерзания, T, °C	-1,5	0	+ 3,8
5	$D_l$ —коэффициент* самодиффузии, ·10 <sup>9</sup> , м <sup>2</sup> с <sup>-1</sup> ; * коллективные движения	0,63	0,46	0,52

6	Время спин–спиновой релаксации протона воды T <sub>2</sub> , с	0,347	2,000	–
7	Объемная концентрация* плотностных неоднородностей, вс (%) *по данным метода LALLS	0,20	1,00	0,18
8	Затемнение*, вызванное рассеянием лазерного света, laser obscuration (λ = 633 нм); *по данным метода LALLS	0,003	0,02	0,005

Табличные данные свидетельствуют о различиях в свойствах воды, обедненной тяжелым изотопом  ${}^2_1H(D)$ , от воды MiliQ природного изотопного состава и тяжелой воды. Экспериментальные данные дают прямые доказательства того, что плотность, поверхностное натяжение и аномалии вязкости воды, вызванные переменной концентрацией дейтерия, приводят к образованию кластеров (плотностных неоднородностей) воды разного размера, следовательно, реализации изотопного эффекта через кластерную организацию ассоциированной жидкости.

На примере фармацевтических субстанций, относящихся к разным фармакологическим и химическим классам и разным сериям, нами продемонстрированы результаты по изменению скорости растворения порошков субстанций в условиях варьирования изотопного (D/H) состава растворителя–воды.

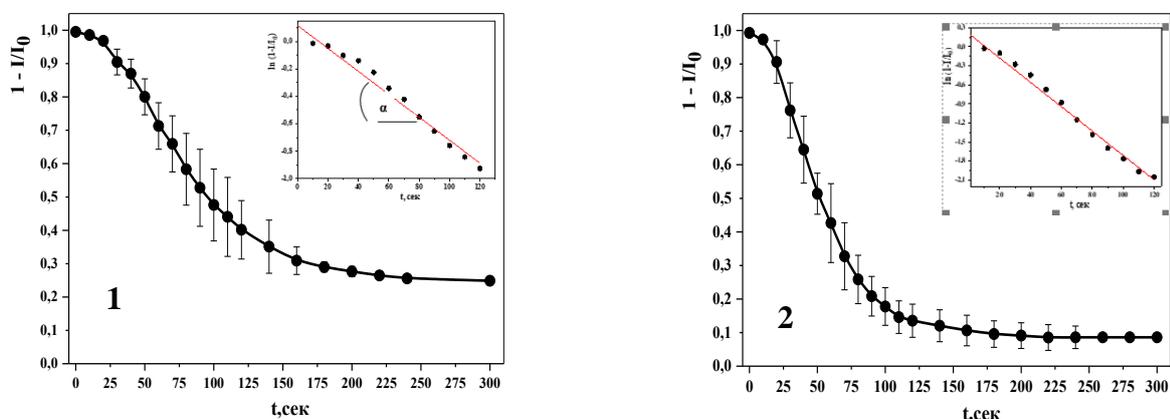
**4.1. Бендазола гидрохлорид / *Bendazoli hydrochloridum*** – белый со слегка сероватым оттенком кристаллический порошок, гигроскопичен; умеренно растворим в воде. Производитель: SECOND PHARMA CO., LTD (China); серии субстанций-порошка: P111104, P111106, P111202, P111203, P111205, P111206. Качество субстанции-порошка соответствует НД 42-14504-06«Бендазола гидрохлорид». *Методика.* Навеску АФИ подбирали, исходя из фармакопейной растворимости: для умеренно растворимых субстанций массой 1 г необходим объем растворителя от 30 до 100 мл. Навеску порошка субстанции  $m = 0,0600$  г помещали в кювету измерительного блока Particle sizer “Malvern 3600 Ec”, снабженную магнитной мешалкой, и добавляли 3 мл объема растворителя. За начало измерения принимали момент добавления воды в кювету. Момент окончания измерения фиксировался нами по прекращении изменения во времени

величины параметра *laser obscuration*, который характеризует потерю интенсивности света при введении дисперсного образца в измерительную ячейку в результате процессов отражения, поглощения, дифракции:  $1 - \frac{I}{I_0} \cdot 100\%$ . Предварительно производили измерение лазерного затемнения фона, в качестве которого служила среда растворения (вода MiliQ, «легкая» вода или D<sub>2</sub>O; T= 21°C ±1°C). Если считать, что изменением концентрации одного из реагентов-растворителя в процессе растворения можно пренебречь, тогда общий порядок кинетического уравнения равен единице, а реакция, протекающая в таких условиях – псевдопервого порядка:

$$V = -\frac{dC}{dt} = \kappa C \quad (4). \quad \text{Интегрируя выражение в пределах } C=C_0 \text{ при } t=0:$$

$$k = \frac{1}{t} \ln \frac{C_0}{C} \quad (5); \quad C = C_0 e^{-\kappa t} \quad (6)$$

Уравнение 6 доказывает экспоненциальное уменьшение во времени концентрации одного из реагентов, а, применительно к методике, основанной на методе лазерной дифракции света – уменьшение *лазерного затемнения*, зависящего от дисперсности образца (рис.12).



**Рисунок 12.** Зависимость величины *лазерного затемнения*  $1 - \frac{I}{I_0} \cdot 100\%$  от времени при растворении бендазола гидрохлорида (серия P111106) воде с разным содержанием изотопа  $^2H(D)$ . 1 – 141,0 ± 0,9ppm, 2 – 4 ± 0,9ppm. На вставках – в полулогарифмических координатах. (n=3, P=0,95).

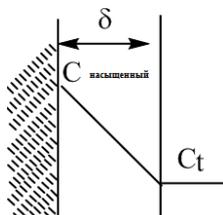
Кинетика растворения бендазола гидрохлорида в воде представляет собой двустадийный процесс: резкое уменьшение регистрируемого параметра от начала

растворения (первая стадия) сменяется на постепенное снижение величины *laser obscuration* до выхода на плато (вторая стадия), что фиксировалось нами как полное растворение порошка субстанции. Первая стадия является скоростью-определяющей.

**4.2. Гетерогенный процесс растворения**, протекающий на поверхности раздела фаз, лимитируется диффузией, адсорбцией и десорбцией согласно закону Фика и уравнению растворения Щукарева А.Н. (1896г):  $dC/dt = kS \cdot (C_{\text{насыщ}} - C_t)$ , **7**

где  $dC/dt$  – скорость растворения;  $k$  – константа скорости, зависящая от температуры и природы веществ;  $C_{\text{насыщ}}$  – концентрация насыщенного раствора;  $C_t$  – концентрация раствора в данный момент времени;  $S$  – поверхность твердого тела.

Становится вполне понятным двухстадийный процесс растворения кристаллов АФИ в воде: скорость растворения велика в начале процесса, когда разность величин  $(C_{\text{насыщ}} - C_t)$  максимальна в пределах диффузионного слоя, а затем постепенно сводится на плато (рис.13).



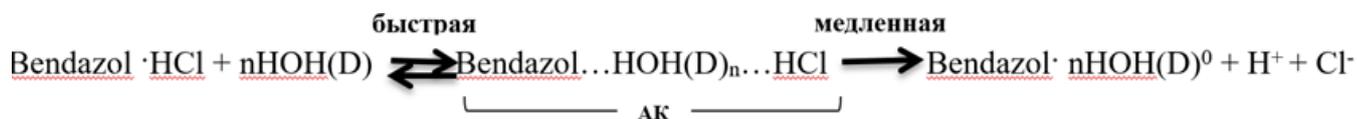
**Рисунок 13.**

Изменение концентрации раствора в пределах диффузионного слоя.

Однако анализ экспоненциальных кривых выявил различия в растворении порошка субстанции для умеренно растворимого бендазола гидрохлорида в воде в зависимости от соотношения D/H: первая стадия растворения субстанции в воде, обедненной тяжелым изотопом  $^2_1H(D)$ , протекает в два раза быстрее в сравнении с водой MilliQ; величина *лазерного затемнения* уменьшалась в  $\sim 10$  раз, в то время как в воде с природным содержанием  $^2_1H(D)$  уменьшение величины измеряемого параметра составило  $\sim 3,5$  раза (см. рис. 12).

**Кинетический изотопный эффект растворения.** Объяснить наблюдаемые явления можно, исходя из *теории активированного комплекса (ТАК)*, разработанного Эйрингом и Поляни. Согласно ТАК, константа скорости реакции связана со свойствами переходного состояния, а скорость реакции равна скорости распада активированного комплекса. Гетерогенный процесс растворения в воде

частиц дисперсной фазы бендазола гидрохлорида сопровождается образованием активированного комплекса (АК) (рис. 14):



**Рисунок 14.** Схема процесса растворения бендазола гидрохлорида в воде с образованием промежуточного активированного комплекса.

Определение скорости и константы скорости реакции сводится к определению концентрации АК и времени, необходимого для прохождения переходного состояния системы. Согласно основной формуле ТАК величина кинетического изотопного (КИЭ) эффекта равна:

$$\frac{k_H}{k_D} = e^{-\frac{E_a^H - E_a^D}{RT}}, \quad 8$$

где,  $k$  – константа скорости реакции;  $T$  – абсолютная температура;  $R$  – газовая постоянная;  $E_a$  – энергия активации активированного комплекса.

Следовательно, частичная или полная замена легкого изотопа водорода на тяжелый должна уменьшать время для прохождения АК и замедлять процесс растворения. На скорость реакции также влияет концентрация активированных комплексов, которая зависит от гидратации АФИ молекулами НОН или НОD (см. рис. 14). Согласно таблице 3, в воде, обедненной по содержанию тяжелого изотопа  $^2_1\text{H(D)}$ , величины объемной концентрации водных кластеров (плотностных неоднородностей) и светорассеяния значительно меньше в сравнении с водой MiliQ природного изотопного состава ( $\text{D/H} = 140\text{ppm}$ ). Можно предположить, что в такой воде процесс гидратации молекулярными кластерами облегчен по сравнению с надмолекулярными кластерами в воде MiliQ, стабилизированными «примесным» изотопом  $^2_1\text{H(D)}$ .

**4.3. Константа скорости растворения.** Уравнение (6) можно линеаризовать, прологарифмировав обе части:  $\ln C = \ln C_0 - kt$  9

и использовать для количественной оценки растворения бендазола гидрохлорида в воде с разным содержанием тяжелого изотопа водорода, представив результаты

экспоненциальных кривых в координатах:  $y=lnI - I/I_0$ ,  $x=t$  (см. рис. 12 вставки).

Получено уравнение вида:  $y=a+bx$

10

Константу скорости растворения в воде субстанций бендазола гидрохлорида шести разных серий определяли по коэффициенту  $b$  уравнения прямой, как тангенс угла наклона к оси абсцисс(табл.4):  $k = -tg\alpha$ ;

$$tg\alpha = - \frac{dlaserobscuration}{dt}$$

11

**Таблица 4.** Константы скорости и КИЭ растворения бендазола гидрохлорида в воде с разным содержанием изотопа водорода  $^2_1H(D)$  (n=3, P=0,95).

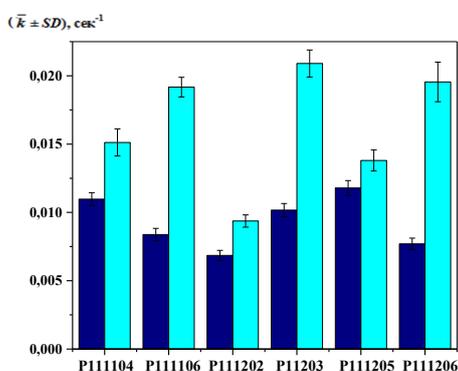
Номер серии	$(\bar{k} \pm SD)$ , сек <sup>-1</sup>		$\frac{k_H}{k_D}$
	Вода с содержанием $^2_1H(D)$ 140ppm	Вода с содержанием $^2_1H(D)$ 4ppm	
P111106	$(0,84 \pm 0,04) \cdot 10^{-2}$	$(1,92 \pm 0,07) \cdot 10^{-2}$	2,3
P111104	$(1,01 \pm 0,04) \cdot 10^{-2}$	$(1,51 \pm 0,09) \cdot 10^{-2}$	1,5
P111202	$(0,68 \pm 0,03) \cdot 10^{-2}$	$(0,94 \pm 0,05) \cdot 10^{-2}$	1,4
P111203	$(1,01 \pm 0,06) \cdot 10^{-2}$	$(2,09 \pm 0,09) \cdot 10^{-2}$	2,0
P111205	$(1,18 \pm 0,05) \cdot 10^{-2}$	$(1,38 \pm 0,07) \cdot 10^{-2}$	1,3
P111206	$(0,77 \pm 0,04) \cdot 10^{-2}$	$(1,96 \pm 0,09) \cdot 10^{-2}$	2,5

**Таблица 5.** Оценка повторяемости методики.

Вода с содержанием $^2_1H(D)$ 140ppm				
Номер серии	$\bar{k} \cdot 10^2$ , с <sup>-1</sup>	$\Delta\bar{k} \cdot 10^2$	$(\bar{k} \pm \Delta\bar{k}) \cdot 10^2$ , с <sup>-1</sup> $t_{p,f} = 4,30$ при P=0,95, n=3, f=2	$\bar{\varepsilon}$ , %
P111106	0,84	0,09	$0,84 \pm 0,09$	11
P111104	1,01	0,09	$1,01 \pm 0,09$	10
P111202	0,68	0,07	$0,68 \pm 0,07$	11
P111203	1,01	0,15	$1,01 \pm 0,15$	14
P111205	1,18	0,12	$1,18 \pm 0,12$	10
P111206	0,77	0,09	$0,77 \pm 0,09$	12
Вода с содержанием $^2_1H(D)$ 4ppm				
P111106	1,92	0,17	$1,92 \pm 0,17$	9

P111104	1,51	0,22	$1,51 \pm 0,22$	14
P111202	0,94	0,12	$0,94 \pm 0,12$	13
P111203	2,09	0,22	$2,09 \pm 0,22$	10
P111205	1,38	0,17	$1,38 \pm 0,17$	12
P111206	1,96	0,22	$1,96 \pm 0,17$	11

Табличные результаты демонстрируют, что при переходе к более легкому изотопу  $^1_1\text{H}$  в составе молекулы воды отношение  $\frac{k_H}{k_D} > 1$ , следовательно, развивается *нормальный* кинетический изотопный эффект (КИЭ) дейтерий–против по растворителю, сохраняющийся в исследовании кинетики растворения бендазола гидрохлорида от серии к серии (рис. 15).



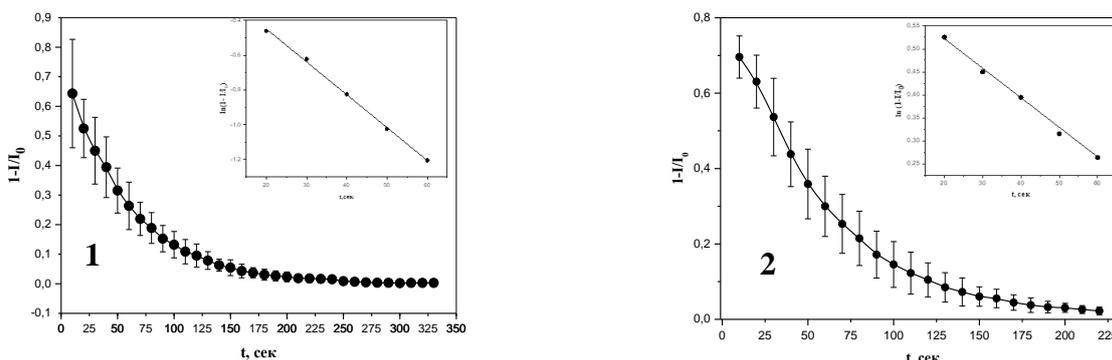
**Рисунок 15.**

Графическая интерпретация КИЭ. Синий цвет – вода MiliQ; голубой цвет – вода ddw.

номер серии субстанции бендазола гидрохлорида

**4.4. Топирамат/Topiramatum** – белый кристаллический порошок, мало растворим в воде. Качество субстанции-порошка соответствует требованиям НД 42-14280-06 «Топирамат». *Методика.* Навеску субстанции порошка топирамата (серия 140052016) подбирали, исходя из фармакопейной растворимости: для мало растворимых субстанций массой 1 г необходим объем растворителя от 100 до 1000 мл. Для измерений были взяты точные навески  $m = 0,0150$  г.;  $V=3$ мл. На рисунке 16 представлены кинетические кривые растворения порошка субстанции топирамата в средах с наблюдаемым кинетическим изотопным эффектом, а также, расчет констант скорости растворения (табл. 6). Повторяемость методики определяли в условиях, при которых пять независимых результатов измерений получали одним методом, в одной лаборатории, одним лаборантом–

исследователем, с использованием одного лазерного измерителя дисперсности, в пределах короткого промежутка времени (табл. 7).



**Рисунок 16.** Зависимость величины лазерного затемнения  $1 - I/I_0 \cdot 100\%$  от времени при растворении топирамата (серия 140052016) воде с разным содержанием изотопа  $^2_1H(D)$ . 1 –  $141,0 \pm 0,9$  ppm, 2 –  $4 \pm 0,9$  ppm. На вставках – в полулогарифмических координатах. ( $n=5, P=0,95$ ).

**Таблица 6.** Константы скорости и КИЭ растворения топирамата в воде с разным содержанием тяжелого изотопа  $^2_1H(D)$  ( $n=5, P=0,95$ ).

Номер серии	$(\bar{k} \pm SD), \text{сек}^{-1}$		$\frac{k_H}{k_D}$
	140052016	Вода с содержанием $^2_1H(D)$ 140ppm	
$(1,70 \pm 0,08) \cdot 10^{-2}$		$(1,90 \pm 0,04) \cdot 10^{-2}$	1,1

**Таблица 7.** Оценка повторяемости методики.

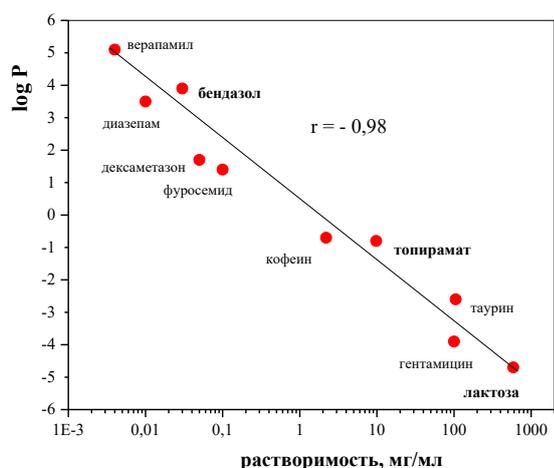
Вода с содержанием $^2_1H(D)$ 140ppm			
$\bar{k} \cdot 10^2, \text{с}^{-1}$	$\Delta \bar{k} \cdot 10^2, \text{с}^{-1}$	$(\bar{k} \pm \Delta \bar{k}) \cdot 10^2, \text{с}^{-1}$ $t_{p,t}=2,78$ при $P=0,95, n=5, f=4$	$\bar{\epsilon}, \%$
1,70	0,11	$1,70 \pm 0,11$	6
Вода с содержанием $^2_1H(D)$ 4ppm			
1,90	0,048	$1,90 \pm 0,048$	2,5

Исследование кинетики растворения топирамата показало развитие *нормального* кинетического изотопного эффекта при выполнении условия:  $\frac{k_H}{k_D} > 1$ .

Однако, обнаруженное отличие в скорости растворения субстанции топирамата в воде ddw в сравнении с водой MilliQ невелико – скорость увеличилась всего в 1,1 раза в сравнении с результатами по бендазола гидрохлориду (см. табл. 4) Вероятно, важную роль в ускорении растворения играют, в том числе, физико–

химические свойства растворяемого вещества: растворимость и липофильность, определяющие основные механизмы всасывания и распределения ЛВ *in vivo*.

Известно, что от липофильности ЛВ зависит процесс всасывания через эпителиальную мембрану кишечника, а от его растворимости – характер распределения и проникновения через биологические барьеры. Для объяснения наблюдаемого КИЭ при растворении ЛВ нами проведено ранжирование значений  $\log P_{oct-w}$  для субстанций разных фармакологических и химических классов в порядке увеличения их водной растворимости (рис. 17).



**Рисунок 17.**

Взаимно–однозначные соответствия:  $\log P_{oct-w}$  – растворимость (мг/мл) для субстанций разных фармакологических и химических классов.

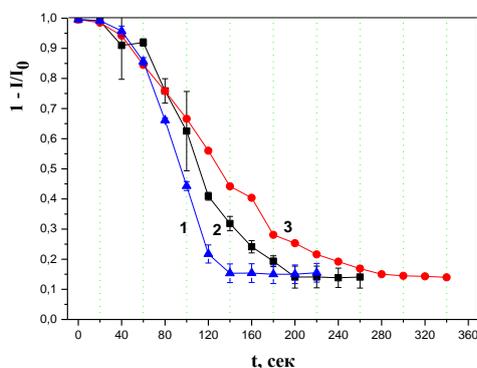
Видно, что бендазол – гидрофобная субстанция, характеризующаяся малой растворимостью в воде и бóльшим сродством к органическим веществам:  $\log P_{\frac{oct}{wat}} = \log \left( \frac{solute_{oct}}{solute_{water}} \right) = +3,9$ . Вероятно, этим объясняется более выраженный КИЭ растворения бендазола г/хл при смене изотопного состава растворителя (см. табл. 4).

Топирамат – гидрофильная субстанция, характеризующаяся умеренной растворимостью в воде и меньшим сродством к органическим веществам:  $\log P_{oct-w} = -0,8$ . Топирамат показал меньшую величину КИЭ при смене изотопного состава растворителя (см. табл. 6).

Проведенные исследования позволяют оценить важную роль варьирования изотопного состава воды в коррекции солубилизационных характеристик гидрофобных и мало растворимых в воде АФИ с целью повышения их эффективности.

**4.5. Лактоза моногидрат/Lactosum monohydricum**—вспомогательное вещество, разбавитель таблеток, капсул, порошков (USP – NF); белый кристаллический; легко, но медленно растворим в воде. Для исследования были использованы субстанции порошка лактозы моногидрата SuperTab 30GR, производитель DFE Pharma (Германия), образцы субстанции порошка производства ООО «Химмед», а также образцы лактозы моногидрата, прошедшие гранулирование распылением раствора, содержащего антитела (АТ) к интерферону ИФН $\gamma$  и АТ к NO-синтазе (NOs) (НПФ «Материя Медика Холдинг», РФ).

**Лактоза моногидрат (ООО «Химмед РФ). Методика.** Согласно ОФС 1.2.1.0005.15 «Растворимость» для легкорастворимых субстанций массой 1 г необходим объем растворителя от 1 до 10 мл. субстанции  $m = 0,3$  г (или 1 г в 10 мл). Таким образом, для измерений в емкостной кювете объёмом 3 мл были взяты точные навески испытуемой субстанции. При одной и той же исходной массе навески и объема раствора величина *лазерного затемнения* неравномерно убывает по экспоненциальному закону в средах с разным содержанием тяжелого изотопа водорода: более продолжительно в тяжелой воде D $_2$ O и более быстро в воде, обедненной дейтерием (рис. 18, табл. 8).



**Рисунок 18.** Зависимость величины лазерного затемнения от времени при растворении лактозы моногидрата (производитель ООО «Химмед») в воде с разным содержанием  $^2H(D)$  :  
1-D/H=4±0,9ppm; 2-140±0,9ppm;(n=3, P=0,95); 3 – 99,9% D $_2$ O.

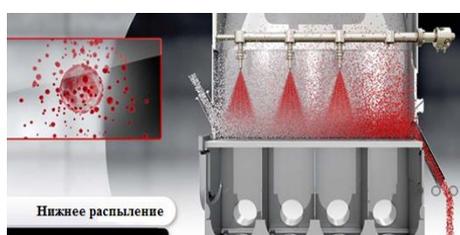
**Таблица 8.** Оценка повторяемости методики (n=3, f=2).

$\bar{k} \cdot 10^2, c^{-1}$	$SD \cdot 10^2$	P, %	$t_{p,f}$	$\Delta \bar{k} \cdot 10^2$	$(\bar{k} \pm \Delta \bar{k}) \cdot 10^2, c^{-1}$	$\bar{\varepsilon}, \%$
<b>Вода с содержанием <math>^2H(D)</math> 4ppm</b>						
2,25	0,036	95	4,30	0,089	$2,25 \pm 0,089$	4
<b>Вода с содержанием <math>^2H(D)</math> 140ppm</b>						
1,36	0,058	95	4,30	0,144	$1,36 \pm 0,144$	10
<b>Оксид дейтерия, D<math>_2</math>O (99,9%) <math>k \cdot 10^2, c^{-1} = 0,88</math></b>						

## 5. Влияние технологической грануляции в условиях псевдооживления на скорость растворения лактозы моногидрат

Для изучения влияния условий пробоподготовки ЛС на его растворение были взяты образцы смесей для изготовления ЛП, содержащих лактозу моногидрат SuperTab<sup>R</sup>30GR, высушенную распылением (серия MM25711).

Все образцы прошли гранулирование в псевдооживленном слое в различных условиях: комкование при смачивании с различными АФИ – антителами к интерферону-гамма ИНФ-γ (серия MM25712) и NO–синтазе (серия MM25713), а также насыщенным фосфатно–солевым буфером (серия MM25714), водой (серия MM25715) и водно–спиртовым раствором (серия MM25716) (рис. 19).



**Рисунок 19.** Нанесение покрытий распылением в псевдооживленном слое.

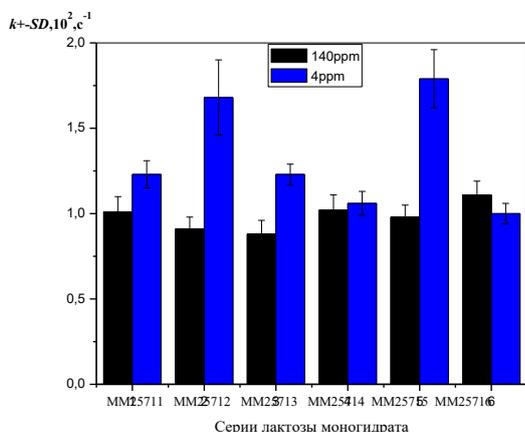
*Методика.* Навеску испытуемых образцов массой  $m=0,3000$ г, соответствующей фармакопейной дефиниции растворимости лактозы и обеспечивающей определённую длительность растворения, помещали в кювету с магнитной мешалкой, заполненной растворителем – водой с разным содержанием тяжелого изотопа водорода объемом  $V=3,0$ мл. Для подтверждения изотопного эффекта дейтерий–протий по растворителю проведены расчёты констант скорости растворения образцов лактозы на основании анализа кинетических кривых (табл.9).

**Таблица 9.** Константы скорости и КИЭ растворения лактозы моногидрата разных серий, гранулированной в псевдооживленном слое, в воде с разным содержанием тяжелого изотопа  ${}^2_1H(D)$  ( $n=3, P=0,95$ ).

Серия образца	$(\bar{k} \pm SD), \text{сек}^{-1}$		$\frac{k_H}{k_D}$
	Вода с содержанием ${}^2_1H(D)$ 140ppm	Вода с содержанием ${}^2_1H(D)$ 4ppm	
MM25711	$(1,01 \pm 0,09) \cdot 10^{-2}$	$(1,23 \pm 0,08) \cdot 10^{-2}$	1,2
MM25712	$(0,91 \pm 0,07) \cdot 10^{-2}$	$(1,68 \pm 0,12) \cdot 10^{-2}$	1,8

MM25713	$(0,88 \pm 0,08) \cdot 10^{-2}$	$(1,23 \pm 0,06) \cdot 10^{-2}$	1,4
MM25714	$(1,02 \pm 0,09) \cdot 10^{-2}$	$(1,06 \pm 0,07) \cdot 10^{-2}$	1,0
MM25715	$(0,98 \pm 0,07) \cdot 10^{-2}$	$(1,79 \pm 0,17) \cdot 10^{-2}$	1,8
MM25716	$(1,11 \pm 0,08) \cdot 10^{-2}$	$(1,00 \pm 0,06) \cdot 10^{-2}$	0,9

Показано (см. табл.9, рис. 20), что наибольшие значения кинетического изотопного эффекта:  $\frac{k_H}{k_D} = 1,8$  и 1,4 – соответствуют растворению фармацевтических композиций, полученных в результате псевдооживления гранул лактозы с растворами БАВ: ИНФ- $\gamma$ , NO-S(серии 25712 и 26713) и водой, характеризующиеся бóльшей чувствительностью к разнице нуклеарных масс дейтерий/протий и частичному изотопному замещению в растворителе.



**Рисунок 20.**

Гистограмма распределения констант скорости растворения фармацевтических композиций лактозы, различающихся условиями технологической грануляции, в воде с разным содержанием тяжелого изотопа  $^2H(D)$ . Синий цвет – вода ddw; черный – вода MiliQ.

Результаты данного исследования можно использовать для контроля качества ЛС как на стадии разработки веществ–кандидатов, так и в технологическом процессе производства лекарственных препаратов для улучшения солюбилизационных характеристик лекарственных средств и, следовательно, фармакокинетических характеристик.

## **6. Влияния механоактивации на дисперсные свойства и кинетику растворения в воде ВВ в условиях реализации КИЭ по растворителю**

Одним из способов активации физико–химических процессов при изучении свойств порошков АФИ *in vitro* является механическая обработка. Данный процесс сопровождается диспергированием, увеличением площади удельной поверхности, морфологии и среднего размера частиц порошка, формированием центров с повышенной активностью на вновь образованных поверхностях и, как следствие, накоплением точечных дефектов, аморфных областей, дислокаций, дисклинаций и

т.д. Эти неравновесные состояния с высоко запасенной энергией деформации оказывают существенное влияние на физические и механические свойства материалов.

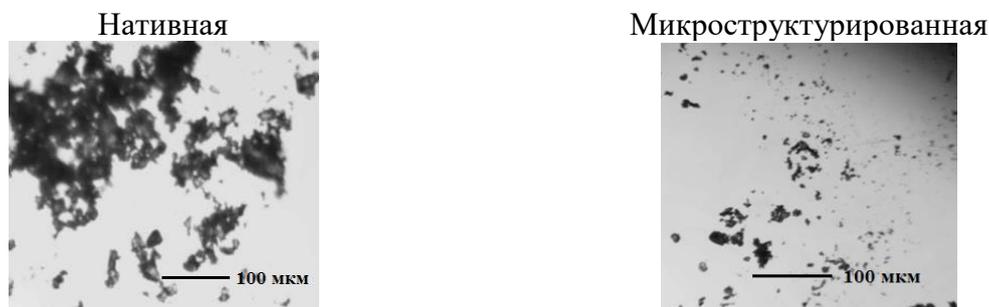
*Методика.* Микроструктурирование лактозы моногидрата (ООО «Химмед») проводили в течение 20 минут в импульсном режиме, т.е. с чередованием процессов возникновения поля напряжения и его релаксацией с использованием механической режущей ножевой мельницы по типу «свободного, прямого удара» (по Румпфу) (рис. 21).



**Рисунок 21.**

Способ передачи механического воздействия (по Румпфу).

**6.1.Микроскопическое исследование.** С целью контроля размера и формы частиц до и после проведенной механической обработки нами был применен метод оптической микроскопии (рис. 22).



**Форма частиц**

Пластины, характерно агломерирование

Частицы с отколотыми краями, неровной поверхностью, характерно агломерирование

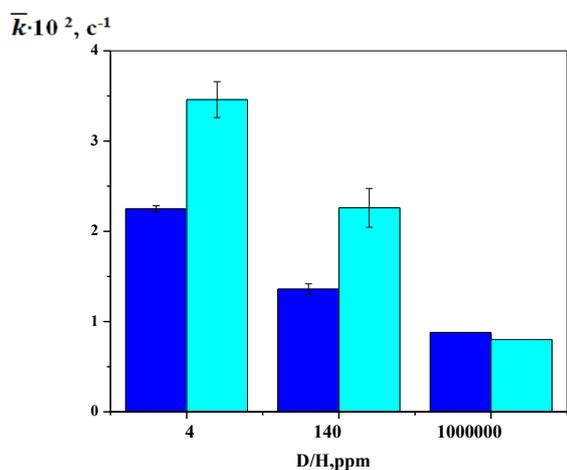
**Рисунок 22.** Внешний вид и размеры кристаллов лактозы моногидрат (ООО «Химмед») по данным метода оптической микроскопии.

После механообработки испытуемых субстанций возникают частицы с отколотыми краями, шероховатой и неровной поверхностью, с характерным агломерированием частиц. Уменьшение размера, увеличение площади поверхности частиц и накопление в кристаллах дефектов дислокации влияет на растворение.

## 6.2. Кинетика растворения после проведения механоактивации

Нами получены результаты исследования механохимических превращений в реакции «твердое тело – жидкость» на примере увеличения солюбилизационных характеристик лактозы моногидрат (ООО «Химмед»).

В фармации данное направление получило свое развитие благодаря значительному увеличению солюбилизационных характеристик малорастворимых лекарственных веществ и, как следствие, повышению эффективности и безопасности АФИ. Результаты демонстрируют достоверное увеличение (~ в 1,5 раза) скорости растворения образцов лактозы моногидрата в воде, обедненной по дейтерию, в сравнении с водой MilliQ после МА. В тяжелой воде (D<sub>2</sub>O) скорость растворения замедляется в 2,6 раза (рис. 23).

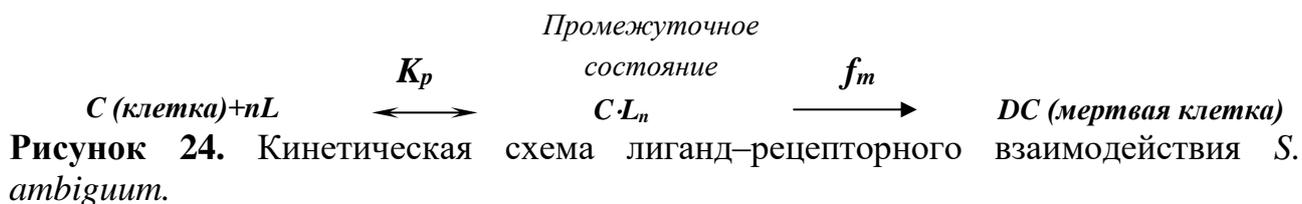


**Рисунок 23.**

Гистограмма распределения констант скорости растворения лактозы моногидрата до и после проведения МА в воде с разным содержанием изотопа  $^2\text{H}(D)$ . Синий цвет – образцы растворов нативной субстанции; голубой – образцы растворов МА субстанции.

## 7. Аррениусовская кинетика лиганд-индуцированной гибели *S. ambiguum* в водных растворах нативных и механоактивированных субстанций

Описание механизмов лиганд-рецепторного взаимодействия при исследовании биологической активности субстанций позволяет количественно оценить биологический ответ эфферентной системы (клетки) на эндогенное / экзогенное воздействие токсиканта. Допускается, что взаимодействие лиганда с рецептором ( $C_{\text{клетки}} + nL$ ), а также распад лиганд-рецепторных комплексов происходит случайным образом через изменения концентрации рецептора за счет конформационных изменений, деградации, синтеза новых рецепторов и образование промежуточного состояния  $C \cdot L_n$ . (рис. 24).



Наиболее информативными показателями биологической активности химических соединений являются аррениусовские характеристики кинетики гибели простейших:  $k = A \cdot e^{-E_a/RT}$  **13**

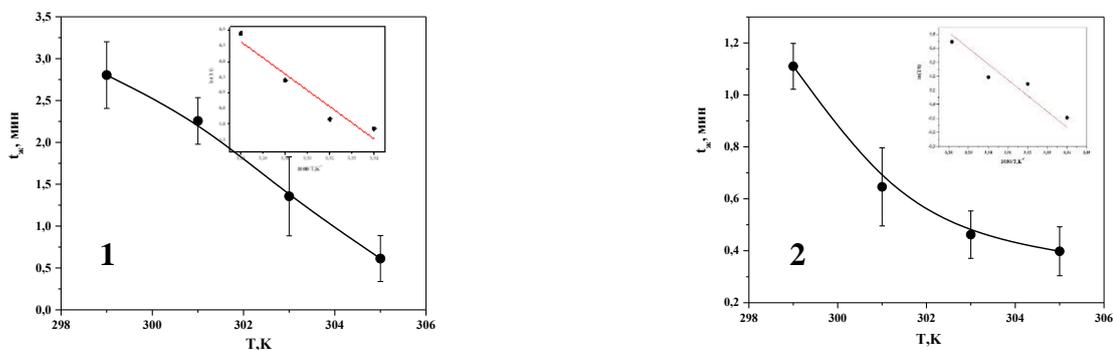
Логарифмическая форма уравнения Аррениуса аналогична уравнению прямой:

$$\ln k = \ln A - \frac{E_a}{R} \cdot \frac{1}{T}, \quad \frac{E_a}{R} - \text{постоянная величина для данной реакции} \quad \mathbf{14}$$

Поэтому в полулогарифмических координатах  $y = \ln k$ ,  $x = 1/T$  по тангенсу угла наклона прямой к оси абсцисс ( $\text{tg } \beta$ ) можно определить энергию активации гибели клеточной культуры при воздействии токсиканта:  $E_a = -R \cdot \text{tg } \beta$  **15**

Аппарат химической кинетики позволит объяснить механизм произведенных механических воздействий на порошки испытуемых субстанций. Избыточная энергия и релаксация поля напряжения, связанные с МА порошка субстанции, уменьшают эффективную энергию активации химической реакции.

Изучение температурной зависимости лиганд-индуцированной гибели тест-объектов проводилось нами в температурном диапазоне  $26 \div 32^\circ\text{C}$  с шагом  $2^\circ\text{C}$  в водных растворах лактозы моногидрата, бендазола г/хл и NaC (Глава 3.8.4. Тома Диссертации). На рис. 25 представлены результаты по исследованию в 0,025% растворах бендазола гидрохлорида. Получены статистически значимые различия значений энергии активации лиганд-индуцированной гибели тест-объектов (табл. 10). Эффект механоактивации составил 2,3 раза.



**Рисунок 25.** Зависимость времени жизни клеточного биосенсора *S. ambiguus* от температуры в 0,025% водных растворах бендазола гидрохлорида (P111202) в прямых и

в аррениусовских координатах (на вставках): 1– до МА, 2 – после МА. (n=5, p=0,90).

**Таблица 10.** Оценка повторяемости методики (n=5, f=4).

$^{obs}\bar{E}_a$ , кДж/моль	<i>SD</i>	<i>P</i> , %	$t_{p,f}$	$\Delta\bar{X}$	$(\bar{X} \pm \Delta\bar{X})$	$\bar{\varepsilon}$ , %
<b>Бендазола гидрохлорид до механической активации</b>						
215	40	90	2,13	39	215±39	18
<b>Бендазола гидрохлорид после механической активации</b>						
94	18	90	2,13	17	94±17	18

Анализ полученных температурных зависимостей времени жизни клеточного биосенсора в растворах механоактивированных субстанций-порошков АФИ и ВВ указывают на «структурный» фактор снижения  $^{obs}E_a$  лиганд–рецепторного взаимодействия *S. ambiguum*. Измельчение порошка субстанций по типу «свободного, прямого удара» уменьшает масштаб гетерогенности, определяющий характерное время массопереноса реагентов (лигандов и клеточного рецептора) друг к другу. Это способствует увеличению скорости реакции и уменьшению энергии активации. После измельчения свободная поверхность не является равновесной и статически устойчивой – в приповерхностном слое начинаются процессы перестройки по направлению к равновесному состоянию. Упорядочение структуры (переход «порядок—беспорядок—новый порядок») значительно зависит от температуры системы в целом.

## ВЫВОДЫ

1. Разработаны научно-методологические подходы к оценке качества лекарственных субстанций (бендазола гидрохлорида, топирамата), вспомогательных веществ (лактозы моногидрата), готовых лекарственных форм (инсулина аспартата, календулы и пиона уклоняющегося настойки), биологически-активных веществ (природных и синтезированных биорегуляторных пептидов, бычьего сывороточного альбумина), бактериальных культур (клетки штамма *E. Coli K-12*) и минеральных вод на основании результатов исследования лазерного светорассеяния в условиях изотопного (D/H) варьирования состава растворителя, дисперсного состава и условий пробоподготовки растворяемого вещества.
2. Описана метрология измерительных методов и создан измерительный комплекс в рамках Государственной поверочной схемы измерения параметров дисперсности порошков, суспензий и аэрозолей, включающие: разработку собственного измерителя дисперсности лазерного (ИДЛ-1), испытание собственного портативного счетчика аэрозольных частиц (А-2), создание рабочих эталонов порошкообразных материалов и взвесей частиц для оценки качества ЛС. Определены основные метрологические характеристики (неисключенная относительная погрешность  $\delta$ , % стандартная, расширенная неопределенности при измерении диаметра,

счетной, объемной концентраций, функции распределения частиц по размеру) современных измерителей дисперсности.

**3.** Продемонстрированы преимущества применения косвенных методов (динамического и статического светорассеяния) для стандартизации и контроля качества различных фармацевтических объектов (гомогенных и гетерогенных растворов АФИ, настоек, минеральных вод, растворов биорегуляторных белков, бактериальных культур) по показателям «описание», «чистота», «подлинность». В сравнении с методами прямого измерения (оптическая микроскопия) это дает возможность проведения статистической морфометрической оценки всей анализируемой пробы в широком диапазоне определяемых размеров (1 нм – 100 мкм) и анализа, численного и объемного распределений.

**4.** Разработан и применен образец лабораторного оборудования, сочетающий метод ОКМ с интерферометрией для экспресс-идентификации без вскрытия упаковки водных растворов NaCl разной концентрации, включая 0,9% (изотонический) раствор по индивидуальному расположению «облаков рассеяния» на двумерных диаграммах. Диаграммы зависимости вариабельности  $sd_i$  от значения дескриптора  $d_i$ , характеризующие устойчивость стационарного процесса образования/распада плотностных неоднородностей воды, показали, также, пригодность для дифференцирования образцов воды с содержанием тяжелого изотопа  $^2H(D)$  в широком диапазоне от 4 ppm до 137 ppm.

**5.** Разработана и валидирована методика кинетической оценки растворения АФИ и ВВ с применением малоуглового лазерного измерителя дисперсности, основанная на регистрации во времени величины лазерного светозатемнения. Доказана прецизионность разработанной методики в условиях повторяемости (при  $P=95\%$ ), включающая вычисление значений стандартного отклонения ( $\bar{k} \pm SD$ ), относительного доверительного интервала среднего значения ( $\bar{k} \pm \Delta\bar{k}$ ) и относительной ошибки среднего ( $\bar{\varepsilon}, \%$ ) в расчётах констант скорости растворения методом лазерной дифракции света. Разработанная методика может быть применена для усовершенствования и дополнения существующего фармакопейного теста «Растворимость».

**6.** Достоверно, в том числе при проведении межсерийного анализа, доказана реализация нормального КИЭ ( $\frac{k_H}{k_D} > 1$ ) по растворителю при исследовании растворения в воде с измененным изотопным составом по водороду АФИ и ВВ разных химических и фармакологических классов:  $\frac{k_H}{k_D} = 2,3$  для бендазола гидрохлорида (на примере серии P111106);  $\frac{k_H}{k_D} = 1,2$  для лактозы моногидрата (на примере серии MM25711) и  $\frac{k_H}{k_D} = 1,1$  для топирамата. Ранжирование значений  $\log P_{oct-w}$  для исследуемых субстанций в порядке увеличения их водной растворимости показало, что КИЭ по растворителю выражен сильнее для гидрофобных и мало растворимых в воде веществ. Этот факт может иметь важное значение для управления солубилизационными характеристиками веществ с подобными свойствами, применяя воду, обедненную тяжелым изотопом  $^2H(D)$ .

**7.** Рассмотрено влияние условий технологической грануляции в условиях псевдооживления на растворение в воде с разным содержанием тяжелого изотопа  $^2H(D)$  фармацевтических композиций лактозы моногидрата. Показано, что наибольшие значения КИЭ:  $\frac{k_H}{k_D} = 1,8$  и  $1,4$  соответствуют растворению ЛС, полученных в результате псевдооживления гранул лактозы с растворами антител к ИНФ- $\gamma$  и NO-S в сравнении с контрольными образцами. Полученные

результаты могут быть использованы для стандартизации и контроля качества лекарственных препаратов, содержащих лактозу моногидрат, на различных этапах технологического производства.

**8.** Методами оптической микроскопии и лазерной дифракции установлены закономерности влияния механохимической обработки (в импульсном режиме) на дисперсные свойства субстанций–порошков лактозы моногидрата: модифицированные частицы характеризуются агломерированием, шероховатой и неровной поверхностью; увеличенной удельной площадью; двукратным уменьшением размера и объемной доли, занимаемой частицами в суспендированном водном образце. Выявленные эффекты могут быть использованы для оптимизации процесса при производстве ЛП с улучшенными технологическими свойствами.

**9.** Установлен факт увеличения реакционной способности субстанций–порошков лактозы моногидрата на границе «твердое тело-жидкость» после проведения механоактивации (МА). Показано достоверное увеличение (в 1,6 и в 1,5 раза) скорости растворения лактозы моногидрата в воде MiliQ и ddw до и после МА. Наиболее вероятный механизм гетерогенного процесса растворения (по Щукареву) модифицированной субстанции заключается в уменьшении толщины диффузионного слоя и увеличения градиента концентрации. Установлена реализация КИЭ по растворителю при исследовании растворения лактозы моногидрата после МА в воде с разным содержанием тяжелого изотопа  $^2_1H(D)$ :  $\frac{k_H(ddw)}{k_D(MiliQ)}=1,5$ ;

$\frac{k_H(MiliQ)}{k_D(D2O)}=2,6$ . Следовательно, факторы механической активации субстанции и варьирования изотопного состава воды приводит к усиливающему эффекту взаимодействия, который проявляется в увеличении скорости растворения в ~2,5 раза.

**10.** Проведена количественная оценка биологической активности механоактивированных порошков субстанций бендазола гидрохлорида, натрия хлорида и лактозы моногидрата на модели *Spirotox*. Рассчитаны значения  $^{obs}E_a$  лиганд-индуцированной клеточной гибели в растворах образцов АФИ и ВВ до и после механохимического воздействия. Показано, что МА способствует модификации порошков фармацевтических субстанций, проявляющейся в увеличении биологической активности, следовательно, эффективности. Механоактивированные субстанции могут быть использованы для получения ЛП с более низкой дозой действующего вещества для уменьшения степени выраженности побочных эффектов.

#### СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

АФИ	активный фармацевтический ингредиент
ВВ	вспомогательные вещества
ГЭТ	Государственный эталон (единиц величин)
ГПЭ	Государственный первичный эталон
ЖЛФ	жидкие лекарственные формы
КИЭ	кинетический изотопный эффект
ЛВ	лекарственное вещество
ЛП	лекарственный препарат
ЛС	лекарственное средство
ЛФ	лекарственная форма
МА	механическая активация
ОФС	общая фармакопейная статья
ОКМ	оптическая когерентная микроскопия
СИ	средство измерения
СЛК	супернатант экстракта печени
СПК	супернатант экстракта легкого
ТАК	теория активированного комплекса

ТЛФ	твердая лекарственная форма
ФС	фармацевтическая субстанция
ЭМА	эффект механоактивации
ddw	deuterium depleted water/вода, обедненная дейтерием
DLS	dynamic light scattering/динамическое светорассеяние
ISO	International Organization for Standardization/международная организация по стандартизации (ИСО)
LALLS	Low-angle laser light scattering / малоугловое рассеяние лазерного света
SD	стандартное отклонение

### ВНЕДРЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

Результаты проводимых исследований в области разработки единых стандартов и методов для унификации подходов к контролю качества лекарственных средств внедрены в работу Общества с ограниченной ответственностью "Контрольно-аналитическая лаборатория ФАРМАНАЛИЗ" в виде:

- 1) Практического применения разработанной на кафедре фармацевтической и токсикологической химии МИ РУДН валидированной методики оценки скорости растворения лекарственных субстанций в воде (кинетика растворения) на основании результатов регистрации во времени параметра дисперсности «лазерное светозатемнение» с применением метода лазерной дифракции света.
- 2) Практических рекомендаций по оценке качества лекарственных субстанций и вспомогательных веществ по показателям «подлинность», «чистота» при проведении межсерийного анализа на основании вычисления значений констант скорости ( $k$ ,  $\text{с}^{-1}$ ) растворения субстанций в воде. Данный подход основывается на том, что при соблюдении стабильности технологического процесса производства фармацевтических субстанций значения константа скорости их растворения будут идентичными (в пределах нормативных отклонений).

В учебный процесс кафедры фармацевтической и токсикологической химии МИ РУДН, а также в научно-производственную деятельность в виде:

- 1) Расширения измерительных функций первичного государственного эталона по государственному контракту в рамках НИР «Создание метрологического комплекса и нормативно-методической базы для измерения параметров наночастиц в природных и технологических средах» (шифр 2008- 3-3.1-048 по контракту с ФГУП «ВНИИФТРИ» № Д-08/27 от 01.11.2008).
- 2) Проведения целевых ориентированных фундаментальных исследований в интересах МПР (Росгидромета) по использованию опытного образца полевого лазерного наноизмерителя дисперсности при мониторинге загрязнения морских курортов и интактных арктических территорий (номер проекта 07-05-13523-офи\_ц и 06-05-02107\_э\_к).
- 3) Проведения целевых ориентированных фундаментальных исследований в интересах Минпромторга (Росстандарт) по созданию методов и стандартных образцов для определения подлинности бутилированных вод на основе мониторинга алюмосиликатных наночастиц в подземных водах (номер проекта 09-05-13595-офи\_ц).
- 4) Обоснования разработки и введения в ГФ РФ ОФС «Определение распределения частиц по размерам методом лазерной дифракции»: включение ОФС в Государственную Фармакопею Российской Федерации XII и XIII изданий позволяет значительно расширить возможности контроля качества лекарственных средств, представляющих собой дисперсные системы, как на стадии их разработки, так и при производстве.

### Основное содержание диссертации изложено в следующих работах:

#### Статьи в журналах, индексируемых в Scopus

1. D/H control of chemical kinetics in water solutions under low deuterium concentrations/ A.V. Syroeshkin, T.V. Pleteneva E.V. Uspenskaya, I. A. Zlatskiy, N.A. Antipova, T. V. Grebennikova, O. V. Levitskaya//Chemical Engineering Journal. – 2018. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2018.08.213> (в печати).
2. Kinetics of Pharmaceutical Substance Solubility in Water with Different Hydrogen Isotopes Content/ E.V. Uspenskaya, E.V. Anfimova, A.V. Syroeshkin, T.V. Pleteneva //Indian Journal of Pharmaceutical Sciences. –2018. –V 80.–№2. –P.318-324.[DOI: 10.4172/pharmaceutical-sciences.1000360](https://doi.org/10.4172/pharmaceutical-sciences.1000360)
3. Determination of Biological Activity of Water Having a Different Isotope Ratio of Protium and

- Deuterium/V.V. Goncharuk, T. V. Pleteneva, T. V. Grebennikova, A. V. Syroeshkin, **E. V. Uspenskaya**, N. V. Antipova, V. F. Kovalenko, M. N. Saprykina, M. D. Skil'skaya, I. A. Zlatskiy//Journal of Water Chemistry and Technology. – 2018. – V. 40. – I.1. – P. 27–34. DOI <https://doi.org/10.3103/S1063455X18010058>
4. Polarimetric research of pharmaceutical substances in aqueous solutions with different water isotopologues ratio / A. V. Syroeshkin, T. V. Pleteneva, E. V. Uspenskaya, O. V. Levitskaya, M. A. Tribot-Laspierre, I. A. Zlatskiy, N. A. Khodorovich, M. V. Nikifirova, S. A. Zaytseva// International Journal of Applied Pharmaceutics. –2018. –V 10.–I 5. –P. 243-248. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2018.08.213>
  5. Near-surface structure of Nafion in deuterated water /N. F. Bunkin, A. V. Shkirin, V. A. Kozlov, B. W. Ninham, E.V. Uspenskaya, S.V. Gudkov // Journal of Chemical Physics. – 2018.<https://doi.org/10.1063/1.5042065> (в печати).
  6. Deuterium is an important element of biological kinetics processes control/ **E.V. Uspenskaya**, A.V. Syroeshkin, T.V. Pleteneva, O.V. Levitskaya// Abstracts/Journal of Trace Elements in Medicine and Biology. – 2017. –V.41S. – P. 45.
  7. Basic Principles of Comprehensive Biotesting of Drinking Water and Point System Classification of Water Quality/V. V. Goncharuk, T. V. Pleteneva, A. V. Rudenko, A. V. Syroeshkin, V. F. Kovalenko, **E. V. Uspenskaya**, M. N. Saprykina, I. A. Zlatskiy // Journal of Water Chem. and Technol. – 2018. V. 40. –I.1.– P. 35-40. DOI <https://doi.org/10.3103/S1063455X1801006X>
  8. Genetically Safe Drinking Water. Requirements and Methods of Its Quality Control/ V. V. Goncharuk, G. N. Pshinko, A. V. Rudenko, T. V. Pleteneva, A. V. Syroeshkin, **E. V. Uspenskaya**, M. N. Saprykina, I. A. Zlatskiy // Journal of Water Chem. and Technology. – 2018. V. 40. – I.1. – P. 16-20. DOI <https://doi.org/10.3103/S1063455X18010034>
  9. Time dependence of the luminescence from a polymer membrane swollen in water: Concentration and isotopic effects / N.F. Bunkin, G.A. Lyakhov, V.A. Kozlov, A.V. Shkirin, I.I. Molchanov, M.T. Vu, I.S. Bereza, N.G. Bolikov, V.L. Fouilhe, I.S. Golyak, I.L. Fufurin, V.S.Gorelik, **E.V. Uspenskaya**, H.S. Nguyen, S.V. Gudkov // Physics of Wave Phenomena.— 2017.— V. — 25. —№4. — P. 259-271. [doi: 10.3103/s1541308x17040045](https://doi.org/10.3103/s1541308x17040045)
  10. Controlled chaos: Heterogeneous catalysis / V.V. Goncharuk, T.V. Pleteneva, E.V. Uspenskaya, A.V. Syroeshkin // Journal of Water Chemistry and Technology. —2017. — V. —39. —№ 6—P. 325-330. DOI <https://doi.org/10.3103/S1063455X17060030>
  11. On the possibility of chiral structure-density submillimeter inhomogeneities existing in water/ V. V. Goncharuk, A.V. Syroeshkin, T.V. Pleteneva, **E.V. Uspenskaya**, O. V. Levitskaya, V. A. Tverdislov// Journal of Water Chemistry and Technology. – 2017. – V.39. – № 6. – P.319–324. DOI <https://doi.org/10.3103/S1063455X18010034>
  12. Quasichemical description of the cell death kinetics of cellular biosensor *Spirostomum ambigua* for testing the biological activity of aqueous solutions/ Goncharuk V.V., Syroeshkin A.V., Zlatskiy I.A., Uspenskaya E.V., Orekhova, Levitskaya O. V, Dobrovolskiy V. I., Pleteneva T.V. //J. of Water Chemistry and Technology.— 2017.— V.— 39.— № 2.— P. 97–102. [doi: 10.3103/s1063455x17020072](https://doi.org/10.3103/s1063455x17020072)
  13. The modern approaches to the determination of the content of elemental impurities in the pharmaceutical substances with the use of inductively-coupled plasma mass-spectrometry / M.A. Bol'shov, I.F. Seregina, **E.V. Uspenskaya**, O.V. Timorovich, A.V. Syroeshkin, T.V. Maksimova, T.V. Pleteneva //Sud. Med. Ekspert.— 2015.— 58(6).— P.31-3.
  14. Study of the supramolecular structure of aqueous solutions of bioregulators of animal origin in ultralow doses / T.A. Golubtsova, **E.V. Uspenskaya**, D.I. Maltsev, V.P. Yamskova, I.A. Yamskov, A.V. Syroeshkin// Modern Problems in Biochemical Physics: New Horizons. — 2012. —P. 141-147.
  15. Role of plasmids in the formation of *E. coli* polycellular forms / A.V. Syroeshkin, N.I. Buyanova, S.L. Sokolova, **E.V. Uspenskaya**, V.P. Shchipkov//Bull. Exp. Biol. Med.— 2011.— V.150.— №4.— P.440-442.
  16. Physicochemical Properties and Biological Activity of the Water Depleted of Heavy Isotopes /Goncharuk V.V., Lapshin V.B., Burdeinaya T.N., Pleteneva T.V., Chernopyatko A.S., Atamanenko I.D., Ul'yantsev A.S., **Uspenskaya E.V.**, Samsoni-Todorov A.O., Taranov V.V., Nikolaev G.M., Kavitskaya A.A., Romanyukina I.Y., Prikhod'ko R.V., Orekhova E.A., Yaremenko V.A., Kotel'chuk A.S., Syroeshkin A.V. //Journal of Water Chemistry and Technology. – 2011. – V. 33.— №.1. – P. 8–13.
  17. Rapid determination of the identity of aqueous drug solutions / Ul'yantsev A.S., **Uspenskaya E.V.**, Pleteneva T.V., Popov P.I., Syroeshkin A.V., Samsoni-Todorov A.O., Goncharuk V.V.// Pharmaceutical Chemistry Journal.— 2009. —T. 43.— № 12. —P. 687-691.
  18. Application of low-angle laser scattering to the quality control of pharmaceutical powders and

suspensions. 2. Barium sulfate / A.S. Ul'Yantsev, E.V. Uspenskaya, N.S. Sorokina, T.V. Pleteneva, A.V. Syroeshkin//Pharmaceutical Chemistry Journal. — 2009.— V. 43. №7. — P. 422-424. [doi: 10.1007/s11094-009-0324-x](https://doi.org/10.1007/s11094-009-0324-x)

### Статьи в журналах, рецензируемых ВАК

19. Разработка и валидация методики кинетической оценки растворения лекарственной субстанции топирамат методом лазерной дифракции света/ **Е.В. Успенская**, А.А. Кешишян, Т.В. Плетенева, А.В. Сыроешкин// Разработка и регистрация лекарственных средств. — 2018.— №2. — Т.23.— С. 38–42.
20. Изучение возможности применения метода малоуглового рассеяния лазерного света для определения подлинности активного фармацевтического ингредиента анаферона детского / М.В. Никифорова, **Е.В. Успенская**, А.В. Сыроешкин // Здоровье и образование в XXI веке. — 2018. — Т. 20, № 5. — С. 107-112. <http://dx.doi.org/10.26787/nydha-2226-7425-2018-20-5-107-112>.
21. Исследование кинетики растворимости лекарственных субстанций методом лазерной дифракции в водных растворах с различным изотопным составом по водороду / Е.В. Анфимова, **Е.В. Успенская**, Т.В. Плетенева А.В. Сыроешкин //Разработка и регистрация лекарственных средств. — 2017.— №1. —Т. 18. — С.150 – 155.
22. Фармакопейные методы определения размера частиц. Сообщение 2. Контроль качества суспензий пептидно-белковой природы для подкожного введения / **Е.В. Успенская**, А.В. Сыроешкин, А.А. Стаброва, Т.В. Плетенева //Журнал научных статей «Здоровье и образование в XXI веке». — 2017.—Т.19.— № 7.—С.160-163. <https://clinical-journal.co.uk/gallery/p197-160-163.pdf>
23. Изучение сравнительной кинетики растворения антигипертензивных лекарственных средств II класса биофармацевтической классификационной системы в соответствии с процедурой «биоэвейвер»/ Е.Р. Бригас, **Е.В. Успенская**, В.В. Писарев // Разработка и регистрация лекарственных средств. —2016.— №4.— Т.17. — С.152 –158.
24. Фармакопейные методы определения размера частиц. Метод лазерной дифракции света в контроле гетерогенности лекарственных средств / **Е.В. Успенская**, А.В. Сыроешкин, Т.В. Плетенева, В.И. Добровольский // Здоровье и образование в XXI веке. — 2016. — Т. 18. № 9. — С.112-119.
25. Влияние изотопного состава воды на биологическую активность фармацевтической и вспомогательной субстанций. Сообщение 2 / О.В. Титорович, Т.В. Плетенева, **Е.В. Успенская**, Т.В. Максимова, М.С. Лукашова, Н.А. Ходорович, А.В. сыроешкин, Т.Н Бурдейная // ВЕСТНИК РУДН. Серия Медицина. — 2015. — №1. —Р. 120-125. <https://cyberleninka.ru/article/v/vliyanie-izotopnogo-sostava-vody-na-biologicheskuyu-aktivnost-farmatsevticheskoy-i-vspomogatelnoy-substantsiy-soobschenie-2>
26. Влияние изотопного состава на биологическую активность лекарственных препаратов группы антигипоксантов с антиоксидантными свойствами / Е.Б. Люлина, Т.В. Плетенева, О.В. Титорович, Е.В. Успенская // Спортивная медицина: Наука и практика. — 2014. —№S1. -С. 130-131.
27. Лазерные методы в анализе растворов синтезированных пептидов / **Е.В. Успенская**, Т.В. Плетенева Т.В. Плетенева, Т.А. Голубцова, А.Ю. Скрипников, А.В. Сыроешкин // Вестник РУДН. Серия: Медицина. —2013. —№ 3. —С.94-99.
28. Комбинированная токсичность Na<sub>2</sub>ЭДТА и D<sub>2</sub>O / Т.Н. Бурдейная, О.Ю. Зрелов, Т.В. Максимова, М.А. Морозова, Г.И. Мтеи, **Е.В. Успенская**, Т.В. Плетенева, А.В. Сыроешкин // Вестник РУДН. Серия: Медицина. —2013. —№ 2. —С.5-9.
29. Study of biological activity and d/h ratio of water with the aid of cellular biosensor Spirostomum ambiguum / E.S. Tsisanova, **E.V. Uspenskaya**, T.V. Pleteneva, A.V. Syroeshkin//Trace Elements in Medicine. — 2010. —V. 11. — № 2. — С. 83.
30. Nanoparticles in natural waters / A.S. Ulyantsev, Maveeva I.S., **Uspenskaya E.V.**, Pleteneva T.V., Syroeshkin A.V. // Trace elements in medicine. — 2010. — №. 11. (2). — С.18.
31. Water as a “complex mineral”: trace elements, isotopes and the problems of incoming mineral elements with drinking water / **Uspenskaya E.V.**, Syroeshkin A.V., Pleteneva T.V. // Trace elements in medicine. — 2010. — №. 11(2). — С.50.
32. Токсичность веществ для химического пилинга: кинетическое исследование методом биотестирования/ **Е.В. Успенская**, А.В. Майорова, Е.В. Талызина, Е.С. Цисанова, А.В. Сыроешкин // Косметика и медицина. — 2010. - № 3. — С. 36-39.
33. О возможности применения метода лазерной интерферометрии при определении

подлинности водных растворов лекарственных средств без вскрытия упаковки/ А.С. Ульянов, **Е.В. Успенская**, А.В. Сыроешкин //Вестник РУДН, Серия Медицина. – 2008. – № 7. – С. 572–574.

34. О биологической активности и супрамолекулярной структуре морских вод: проблемы использования природных вод в составе лекарственных средств/ **Е.В.Успенская**, А.В. Балышев, А.В. Сыроешкин//Вестник РУДН. –2008. –№ 3. – С.14–18.

35. Потепление климата как новая медико-экологическая проблема для населения Западной Арктики / А.В. Сыроешкин, А.В. Балышев, Т.В. Гребенникова, **Е.В.Успенская** // Вестник РУДН, Серия Медицина. –2008. – № 7. – С.–539-542.

36. Структура воды и лазерные экспресс-методы определения подлинности / **Е.В. Успенская**, А.В. Сыроешкин, А.Н. Смирнов, В.В.Гончарук, Т.В. Плетенева, В.Б. Лапшин //Фармация. – 2007. – № 5.– С. 21-23. [https://elibrary.ru/download/elibrary\\_12945215\\_86060769.pdf](https://elibrary.ru/download/elibrary_12945215_86060769.pdf)

37. Новые лазерные методы определения подлинности и контроля качества лекарственных средств / А.В. Сыроешкин, Е.В. Лесников, А.Н. Смирнов, Е.В. Лесников, П.И. Попов, **Е.В. Успенская**, Т.В. Плетенева //Вестник РУДН. – 2006. – №2 (32). – С.90–94.

#### Статьи в рецензируемых журналах

38. Submillimeter density inhomogeneities in aqueous solutions: small-angle light scattering of aqueous solutions without particles of the dispersed phase depends on the concentration of heavy isotopes, ph and salt composition / **E.V. Uspenskaya** , А.М. Koldina, I.V. Tarabrina, А.А. Gornak, А.V. Syroeshkin //Polish Journal of Science. – 2018. – №3 – P. 25-38.

39. Методы экспресс-определения подлинности и контроля качества гомогенных водных растворов (бутилированные воды, пищевые продукты, лекарственные средства) / А.В. Сыроешкин, В.И. Добровольский, Т.В. Плетенева, А.С. Ульянов, **Е.В. Успенская**, М.А. Морозова, Д.И. Беленький, Е.В. Лесников // Альманах современной метрологии. – 2016.– № 6.– С.107-116.

40. О возможности применения лазерного метода для контроля качества высоких разведений жидких лекарственных средств / А.В. Сыроешкин, Т.В. Плетенева, М.А. Морозова, **Е.В. Успенская**, О.В. Титорович, Е.В. Лесников, В.И. Добровольский //Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения. –2016. – № 3. – С. 31-36.

41. Оптические методы в исследованиях хиральных свойств лекарственных средств. 1. Валин в воде с различным содержанием дейтерия свойств лекарственных средств / А.В. Сыроешкин, Т.В. Плетенева, **Е.В. Успенская**, О.В. Левицкая //Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения. –2016. – № 1. –С. 25-38.

42. Применение лазерного малоуглового измерителя дисперсности для контроля качества питьевых бутилированных вод /**Успенская Е.В.**, Сыроешкин А.В. //Материалы Международной научно-практической конференции «Разработка, исследование и маркетинг новой фармацевтической продукции». Пятигорск. – 2006.– С.312-316.

43. Наночастицы в природных и технологических средах. Методы и средства измерений /Сыроешкин А.В., Гребенникова Т.В., Матвеева И.С., Плетенева Т.В., Чиквиладзе Г.Н., Ульянов А.С., **Успенская Е.В.**, Суздалева О.С., Полевщиков Д.М., Карпов О.В., Лесников Е.В., Балаханов Д.М., Лапшин В.Б. //Труды ВНИИФТРИ. Под ред. П. А. Красовского. – 2009. – №56. – С. 91 – 106.

44. Экспедиция Государственного океанографического института в Западной Арктике/ Сыроешкин А.В., Балышев А.В., Гребенникова Т.В., Григорьев А.В., Игнатченко А.В., Колесников М.В., Сыроешкин А.В., Матвеева И.С., Плотникова Н.В., **Успенская Е.В.**, Лапшин В.Б. // Метеоспектр. – 2006. – №1. – С. 117-122.

45. Вода как гетерогенная структура/ А.В. Сыроешкин, А.Н. Смирнов, В.В. Гончарук, Е.В. Успенская, Г.М. Николаев, П.И. Попов, Т.В. Карамзина, А.О. Самсоны-Тодоров, В.Б. Лапшин // Исследовано в России. –2006. –Т. 9. – С. 843-854.

**Успенская Елена Валерьевна**

(Российская Федерация)

**МЕТОДЫ ЛАЗЕРНОГО СВЕТОРАССЕЯНИЯ В КОНТРОЛЕ КАЧЕСТВА ВОДНЫХ РАСТВОРОВ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИХ СУБСТАНЦИЙ И ВСПОМОГАТЕЛЬНЫХ ВЕЩЕСТВ**

В диссертационном исследовании продемонстрировано влияние на светорассеивающую способность водных растворов фармацевтических субстанций различных способов модификации свойств: варьирования изотопного состава дисперсионной среды, дисперсности твердой фазы и механоактивации.

Продемонстрированы преимущества комплексного подхода к стандартизации ЛС, включающего методы прямого и косвенного гранулометрического анализа. Результаты лазерных исследований физико-химических свойств водных растворов фармацевтических субстанций (ФС) положены в основу разработки экспресс-способа контроля качества гомогенных жидких растворов ФС без вскрытия упаковки. Определены основные метрологические характеристики измерения параметров дисперсности порошков, суспензий и аэрозолей с использованием современных измерителей дисперсности.

Расширены границы применения фармакопейного метода лазерной дифракции для контроля качества лекарственных средств. Произведена валидация разработанной методики на повторяемость результатов измерений.

Изучено влияние технологических условий пробоподготовки ФС и произведенного механохимического воздействия на скорость растворения в воде с варьированием содержания тяжелого изотопа водорода. Изучены свойства растворов АФИ и ВВ в условиях изотопного варьирования среды растворителя и механической активации растворяемого вещества биологическим методом Spirotox.

Полученные результаты открывают возможность улучшения солюбилизационных характеристик лекарственных веществ, что является одним из основных направлений в разработке современных систем доставки лекарственных средств (Drug Delivery Systems).

**Uspenskaya Elena Valerievna**

(Russian Federation)

**LASER LIGHT SCATTERING METHODS IN QUALITY CONTROL OF AQUEOUS SOLUTIONS OF PHARMACEUTICAL SUBSTANCES AND EXCIPIENTS**

In dissertation study demonstrated effect on light-scattering capability of pharmaceutical's aqueous solutions: variation in the isotopic composition of solvent, solid phase and mechanical activation.

There was demonstrated the benefits of an integrated approach to the standardization of pharmaceuticals, which includes direct and indirect methods of particle size analysis. Laser research results in physics and chemical properties of water solutions of pharmaceutical substances based on the development of express quality control of homogeneous liquid pharmaceutical's solutions without opening the package. Defines the main metrological characteristics of measuring particle size of powders, suspensions and aerosols using contemporary measures of dispersion.

Expanded the boundaries of the use of laser diffraction method for quality control of drugs. Performed validation of the developed method for repeatability of measurement results.

The influence studied of technological conditions of drugs production and mechanochemical effects on the rate of dissolution in water with a change in the content of the heavy isotope of hydrogen.

Properties studied of solutions of API and excipients in the context of the isotopic variation in solvent and mechanical activation of dissolved substances by Spirotox-method.

The findings open the possibility of improving the API's solubilization characteristics of medicinal substances, that is one of the basic directions in the development of advanced Drug Delivery Systems.