

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение
высшего образования

«РОССИЙСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ДРУЖБЫ НАРОДОВ»

На правах рукописи

Казымова Илаха Вагиф кызы

**СТАНДАРТИЗАЦИЯ И КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА
ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ РАЗНОЙ СТЕПЕНИ
ДИСПЕРСНОСТИ МЕТОДАМИ СТАТИЧЕСКОГО И
ДИНАМИЧЕСКОГО РАССЕЯНИЯ СВЕТА**

3.4.2. Фармацевтическая химия, фармакогнозия

Диссертация

на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук

Научный руководитель:

доктор фармацевтических наук, доцент

Успенская Елена Валерьевна

Москва – 2023

ОГЛАВЛЕНИЕ

Введение	5
Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	12
1.1. Инновационные методы дисперсного анализа в фармации	12
1.1.1. Совершенствование методов анализа несферических субмикронных и микронного размера частиц на основе малоуглового (LALLS) и многоуглового (MALS) статического, динамического и электрофоретического рассеяния света	13
1.1.2. Определение фракционного состава порошков и гранул методом ситового анализа: существующие ограничения к использованию.....	16
1.1.3. Гравиметрия, как абсолютный метод химического анализа: преимущества и недостатки.....	18
1.2. Особенности фармацевтического применения биологических дисперсных систем: популяции клеток <i>Spirostomum ambiguum</i> и других пресноводных инфузорий (<i>Stentor polymorphus</i> Mtiller, <i>Paramecium caudatum</i> Ehrenberg, <i>Spirostomum minus</i> Ehrenberg, <i>Coleps hirtus</i> Nitzsch)	20
1.3. Дисперсные лекарственные, косметические средства синтетического и природного происхождения	21
1.3.1. Микрогетерогенные системы: суспензии, эмульсии, пены, аэрозоли, порошки.....	22
1.3.2. Белковые коллоидные растворы.....	26
1.3.3. Вакцины различного спектра действия. Новейшие наносистемы доставки вакцин <i>in vivo</i>	27
ГЛАВА 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	29
2.1. Исследуемые образцы, реактивы и расходные материалы	29
2.1.1. Моксифлоксацина гидрохлорид.....	29
2.1.2. Левофлоксацина полугидрат.....	30
2.1.3. Гумусовые кислоты (гуминовые, фульвовые кислоты).....	30
2.1.4. Вакцины лечебные и профилактические для применения у человека и животных.....	32
2.1.5. Изотопологи воды, как лабораторные растворители.....	35
2.2. Методы исследования	36
2.2.1. Метод статического рассеяния света (лазерная дифракция) в применении к гранулометрическому анализу и кинетической оценке растворения малорастворимых лекарственных субстанций.....	35

2.2.2. Метод динамического рассеяния света (фотонная корреляционная спектроскопия) в определении размера и заряда (ζ -потенциала) поверхности наночастиц в исследуемых образцах.....	36
2.2.3. Метод определения потери в массе при высушивании.....	37
2.2.4. Оптическая микроскопия в морфологическом анализе кристаллов.....	38
2.2.5. Спектрофотометрия в УФ и видимой областях для определения подлинности и содержания действующих веществ в объектах исследования.....	39
2.2.6. Спектрофлуориметрический качественный и количественный анализ моксифлоксацина гидрохлорида и гумусовых кислот.....	39
2.2.7. Рентгенофлуоресцентный анализ элементного состава исследуемых образцов синтетического, природного и иммунобиологического происхождения.....	40
2.2.8. Спектроскопия НПВО в инфракрасной области.....	42
2.2.9. Определение оптического вращения в растворах объектов исследований.....	43
2.2.10. Метод <i>Spirotox</i> в исследовании индивидуальной и комбинированной токсичности. Исследования концентрационной и температурной зависимости времени гибели клеточного биосенсора.....	43
2.2.11. Статистическая обработка результатов.....	45
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.....	46
3.1. Разработка и валидация методики контроля качества малорастворимой субстанции моксифлоксацина гидрохлорида по показателю «Растворимость» методом статического лазерного светорассеяния.....	48
3.2. Валидация в рамках разработки аналитической методики определения скорости растворения моксифлоксацина гидрохлорида LALLS-методом.....	50
3.2.1. Повторяемость (прецизионность внутри методики).....	50
3.2.2. Прецизионность <u>внутрилабораторная</u> (промежуточная).....	51
3.2.3. Линейность и аналитическая область.....	53
3.3. Кинетический изотопный эффект растворения.....	54
3.4. Определение спектральных характеристик моксифлоксацина гидрохлорида для разработки методик анализа подлинности и содержания действующего вещества.....	59
3.4.1 Ультрафиолетовая спектрометрия.....	59

3.4.2. Спектрофлуориметрия.....	62
3.5. Разработка подходов для стандартизации и контроля качества биологически активных веществ природного происхождения гуминовых (ГК) и фульвокислот (ФК)	66
3.5.1. Оптимизация методики определения потери в массе при высушивании образцов ГК и ФК.....	66
3.5.2. Исследование гранулометрического состава и морфологии частиц ГК и ФК в остатке после высушивания методами оптической и Digital микроскопии.....	69
3.5.3. Определение элементного состава остатка после высушивания ГК и ФК по данным метода рентгенофлуоресцентного анализа	71
3.5.4. Оценка размера, распределения по размерам и ζ -потенциала поверхности частиц ГК и ФК по данным метода динамического светорассеяния.....	73
3.5.5. Оптимизация методов спектрофотометрии и спектрофлуориметрии для контроля качества ГК и ФК по показателям «подлинность» и «количественное определение»	77
3.5.6. Оптическая активность ГК и ФК в водных средах изотопологов.....	83
3.5.7. Исследование концентрационной и температурной зависимости гибели клеточного биосенсора в оценке индивидуальной и комбинированной токсичности образцов ГК и ФК методом Spirotox.....	84
3.6. Комплексный подход к контролю качества иммунобиологических препаратов – вакцин для применения у человека и животных.....	89
3.6.1. Дисперсный анализ образцов ДНК и мРНК вакцин по данным методов статического и динамического светорассеяния, исследование электрофоретической подвижности наночастиц.....	90
3.6.2. Оценка токсичности ДНК и мРНК вакцин методом Spirotox.....	94
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	99
ВЫВОДЫ	101
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ	102
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	104

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность работы. Контроль размера частиц порошков, жидких лекарственных форм, аэрозолей имеет решающее значение в проявлении фармакологической активности лекарственных средств. Стандартные методы определения размера, такие как эксклюзионная хроматография, оптическая микроскопия, ситовой анализ требуют затрат большого количества образца и временных затрат [Moser M.R. et al., 2022]. Размер частиц является важным параметром, определяющим механизм интернализации клеток: частицы вводятся в клетки посредством клатрин-опосредованного эндоцитоза ($d_{\text{частиц}} \leq 200$ нм), пиноцитоза или кавеоло-опосредованного эндоцитоза ($d_{\text{частиц}} \geq 200-500$ нм) [Petithory T. et al., 2021]. Измерение размеров малых молекул в настоящее время представляет большой интерес в связи с активным введением в фармацию наночастиц в виде липосомальных препаратов природного и синтетического происхождения, векторных систем и других средств направленного транспорта активных фармацевтических ингредиентов (АФИ) [Bonaccorso A. et al., 2021]. Дисперсный анализ статического и динамического светорассеяния — это валидированные аналитические методы обратного определения размера частиц, не требующие калибровки, что является их преимуществом в сравнении со многими прямыми методами анализа. Несмотря на введение метода малоуглового рассеяния лазерного света (статическое светорассеяние, LALLS) в фармацевтический анализ и структуру фармакопей РФ, США и Евросоюза более 15 лет назад, его применение до сих пор не занимает лидирующих позиций в контроле дисперсности лекарственных средств, уступая прямым методам оптической микроскопии и ситового анализа. Текст общей монографии «Анализ размера частиц методом динамического светорассеяния» (DLS, фотонной корреляционной спектроскопии) для включения в фармакопею Евросоюза (*Ph. Eur*) находится на стадии гармонизации (по состоянию на 31 января 2022 г.) под

контролем Европейского управления качества лекарственных средств и здравоохранения (EDQM <https://www.edqm.eu/en>). Поскольку проблема качества фармацевтических средств рассматривается как важнейшая составляющая качества жизни населения, то разработка подходов и методик анализа дисперсных систем методами статического и динамического рассеяния света позволит решить проблему стандартизации лекарственных средств различного происхождения – синтетических, природных и транспортных векторных.

Степень разработанности темы исследования. Существенный вклад в изучение проблемы стандартизации дисперсных лекарственных средств лазерными методами внесли исследователи: *Сыроешкин А.В.2021, Плетенева Т.В.2018, Лесников Е.В.2011, Бункин Н.Ф.2020, Смирнов А.Н.2005, Гончарук В.В.2010*, а также исследовательские группы кафедры химической и биомолекулярной инженерии инженерной школы Тандон Нью-Йоркского университета (США), института молекулярной, клеточной и системной биологии Университета Глазго, работы которых в значительной мере способствовали изучению мицеллообразования, коэффициентов диффузии и профиля распределения размера частиц при изучении агрегации и гетерогенности.

Область исследований. Диссертационная работа соответствует формуле специальности 3.4.2. Фармацевтическая химия, фармакогнозия (фармацевтические науки) и конкретно пунктам 3, 4 и 6 паспорта специальности:

Пункт 3 – Разработка новых, совершенствование, унификация и валидация существующих методов контроля качества лекарственных средств на этапах их разработки, производства и потребления.

Пункт 4 – Разработка методов анализа лекарственных веществ и их метаболитов в биологических объектах для фармакокинетических исследований,

эколого-фармацевтического мониторинга, судебно-химической и наркологической экспертизы.

Пункт 6 – Изучение химического состава лекарственного растительного сырья, установление строения, идентификация природных соединений, разработка методов выделения, стандартизации и контроля качества лекарственного растительного сырья и лекарственных форм на его основе.

Объект и предмет исследования. В рамках диссертационного исследования изучали физико-химические и биологические свойства (растворение, *n*КИЭ, способность поглощать, пропускать, рассеивать и испускать ЭМИ, взаимодействие с клеточным биосенсором) таких объектов, как противомикробные фторхинолоны, компоненты низкоминерализованных пелоидов и иммунобиологические ЛП для фармакокинетических исследований, разработки и валидации новых методов контроля их качества всех этапах их обращения.

Цель работы заключается в разработке новых подходов к стандартизации и контролю дисперсности лекарственных средств, биологически активных веществ и тестовых препаратов различной природы и фармакологического применения методами статического и динамического рассеяния лазерного света.

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

1. Разработать и валидировать аналитическую методику определения скорости растворения синтетических антибактериальных ЛС на примере моксифлоксацина гидрохлорида $Mxf \cdot HCl$ методом статического рассеяния лазерного света (LALLS) для исследований *in vitro*.

2. Оценить возможность применения оригинального способа модификации свойств и растворения малорастворимых лекарственных веществ на основании исследования *нормального* кинетического изотопного эффекта (*n*КИЭ) по растворителю методом LALLS.

3. Разработать подходы к стандартизации, контролю качества и биологической активности дисперсных полиэлектролитных систем природного происхождения на примере компонентов низкоминерализованных пелоидов – гуминовых и фульвовых кислот, как перспективных лекарственных средств.

4. Обосновать необходимость применения метода динамического светорассеяния (DLS) в контроле дисперсности и коллоидной стабильности частиц м-РНК и ДНК-содержащих иммунобиологических лекарственных препаратов (ИБЛП) – вакцин для человека и животных на основании изучения их электрофоретической подвижности.

Научная новизна диссертационного исследования заключается в разработке практических, оригинальных подходов к стандартизации лекарственных средств разной степени дисперсности на основе методов статического и динамического рассеяния света. Ключевые результаты исследования, составляющие его научную новизну, состоят в:

1. апробации LALLS методики кинетической оценки растворения моксифлоксацина гидрохлорида $Mxf \cdot HCl$ в условиях повторяемости, внутрилабораторной воспроизводимости с определением линейности и аналитической области;

2. обосновании наблюдаемого нормального кинетического изотопного эффекта ($nКИЭ$) по растворителю при исследовании растворения $Mxf \cdot HCl$ в воде, обедненной по изотопу H_1^2 (D);

3. разработке подходов к контролю качества компонентов низкоминерализованных пелоидов – гуминовых и фульвовых кислот, продемонстрировавших противовирусную активность в отношении SARS-CoV-2;

4. проведении DLS-исследования дисперсных и электрокинетических свойств частиц в м-РНК и ДНК-содержащих вакцин с целью контроля нанообъектов и определения иммуногенности/реактогенности.

Теоретическая и практическая значимость работы состоит в разработке шаблона, состоящего из новых положений и этапов контроля качества и стандартизации ЛС и БАВ разной природы; в выявлении эффекта в водных растворах, основанного на различиях в скорости растворения одного и того вещества в зависимости от изотопии воды; в обосновании необходимости контроля наночастиц в ИБЛП с целью определения их иммуногенности/реактогенности, в также в внедрении методик в лабораторный практикум учебного процесса кафедры фармацевтической и токсикологической химии медицинского института ФГАОУ ВО «РУДН».

Методология и методы диссертационного исследования для решения поставленных задач включали инструментальные подходы, основанные на применении современного аналитического оборудования (DLS, LALLS, SEM) для экспериментального изучения строения, различных спектральных свойств, механизмов растворения, а также взаимодействия с клеточным биосенсором.

Положения, выносимые на защиту:

1. доказана пригодность аналитической методики определения скорости растворения $Mxf \cdot HCl$ в воде для применения в качестве самостоятельного испытания на всех стадиях разработки и обращения ЛС;

2. продемонстрировано развитие $nKIЭ$ по растворителю в условиях обеднения по содержанию тяжелого изотопа H_1^2 , как способ модификации свойств малорастворимых ЛВ;

3. разработаны подходы контролю качества гуминовых веществ и фульвокислот, как представителей дисперсных полиэлектролитов природного происхождения, проявляющих анти-SARS-CoV-2 активность;

4. обоснована необходимость контроля размеров и коллоидной стабильности частиц в м-РНК и ДНК-содержащих ИМБЛП методом DLS.

Степень достоверности результатов исследования подтверждается валидированными методиками, используемым современным физико-химическим оборудованием, многочисленными повторами, обеспечивающими статистически достоверные данные таблиц и графиков, а также подтвержденными ссылками на литературные источники зарубежных и отечественных авторов.

Апробация результатов исследования по диссертации «Стандартизация и контроль качества лекарственных средств разной степени дисперсности методами статического и динамического рассеяния света» проведена на заседании кафедры фармацевтической и токсикологической химии ФГАОУ ВО «РУДН» (протокол № 0300-35-04/03 от 27.10.2022). Основные результаты исследования отражены в 11 публикациях, среди которых 9 статей в журналах, индексируемых в международных базах цитирования (Scopus, WoS и CAS), 2 статьи в изданиях, рекомендуемых ВАК, а также в 6 тезисах докладов конференций: IX Всероссийской научной конференции студентов и аспирантов с международным участием «Молодая фармация - потенциал будущего» (Санкт-Петербург, 2019 г.); XXI Международном конгрессе " Здоровье и образование в XXI веке " (Москва, 2019 г); Третьей всероссийской конференции «Физика водных растворов» ИОФ им. А.М. Прохорова РАН (Москва, 2020 г); XVIII Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых “Ломоносов” (Москва, 2021 г.); Четвертой всероссийской конференции «Физика водных растворов» ИОФ им. А.М. Прохорова РАН (Москва, 2021); Пятой всероссийской конференции «Физика водных растворов» ИОФ им. А.М. Прохорова РАН (Москва, 2022).

Структура и объем диссертации. Общий объем диссертации составляет 121 страниц машинописного текста, включая 28 рисунков, 19 таблиц, 162 ссылки на источники зарубежных и отечественных авторов.

Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Инновационные методы дисперсного анализа в фармации

Дисперсность лекарственных веществ (ЛВ) напрямую связана с терапевтическим эффектом: с уменьшением размера частиц увеличивается поверхностная энергия измельчаемого ЛВ, которое лучше растворяется, быстрее и полнее участвует в химических реакциях. От размера частиц зависит скорость и полнота всасывания ЛВ, его концентрация в биожидкостях при любых способах назначения в виде различных ЛФ [1]. В настоящее время действующая Государственная фармакопея XIV издания, НД фирм-производителей фармацевтических субстанций ограниченно предусматривает требования к размеру частиц. Это приводит к тому, что субстанции, удовлетворяющие требованиям к качеству по имеющимся в НД показателям, оказываются непригодными для получения качественной лекарственной формы (ЛФ). Показатель размер частиц включен в ограниченное число НД, например, на субстанцию папаверина гидрохлорид (Италия), эналаприла малеат (Индия), сальбутамол (Россия), кальция полистиролсульфонат (Япония), валсартан (Венгрия) и некоторых других. При этом требования к размеру частиц и рекомендуемые методы не стандартизованы [2].

Измерение размеров малых молекул в настоящее время представляет большой интерес в связи с активным введением в фармацию наночастиц в виде липосомальных препаратов природного и синтетического происхождения, векторных систем и других средств направленного транспорта активных фармацевтических ингредиентов (АФИ) [3]. Таким образом, возникает необходимость разработки наночастиц, которые преодолевают гетерогенные барьеры на пути доставки, что может повысить их эффективность и биодоступность [4]. Использование стандартных методов определения размера частиц, таких как эксклюзионная хроматография, оптическая микроскопия, ситовой анализ в современной фармацевтической практике для стандартизации

и контроля качества жидких ЛС требуют большого количества образца и временных затрат [5]. Следовательно, актуально использование более совершенных методов стандартизации и контроля качества ЛС.

Таким образом, для полной характеристики ЛС необходимо применять метод, не имеющий перечисленных недостатков стандартных методов и сочетающий в себе их достоинства.

1.1.1. Совершенствование методов анализа несферических субмикронных и микронного размера частиц на основе малоуглового (LALLS) и многоуглового (MALS) статического, динамического и электрофоретического рассеяния света

Среди методов, основанных на взаимодействии электромагнитного излучения с веществом, выделяют лазерную дифракцию света, основанную на измерении углового распределения интенсивности рассеянного света при прохождении лазерного луча через диспергированный образец (low-angle laser light scattering, LALLS) [6]. Проект ОФС «Определение распределения частиц по размеру методом лазерной дифракции света» был разработан сотрудниками кафедры фармацевтической и токсикологической химии медицинского института РУДН [7]. Включение данной ОФС в Государственную Фармакопею Российской Федерации XIII издания значительно расширило возможности стандартизации и контроля качества ЛС, представляющих собой дисперсные системы, на стадии их разработки и производства [8]. Современное оборудование для лазерной дифракции позволяет проводить измерения размера частиц дисперсной фазы в пределах от 0,1 до 2000 мкм. Например, дисперсные системы для парентерального применения должны иметь размер частиц от 0,1 до 10 мкм. Дисперсные системы для внутреннего применения имеют частицы дисперсной фазы от 10 до 100 мкм. Суспензии для наружного применения используются в дерматологии и проктологии и характеризуются размерами частиц дисперсной фазы в интервале 10—70 мкм. В фармацевтической промышленности широко используются порошкообразные субстанции. В некоторых фармакопейных статьях на лекарственные субстанции

приводятся нормативные требования к размеру частиц порошка, в том случае, если этот показатель качества существенно влияет на проявление терапевтической активности АФИ [9,10]. Статическое рассеяние света также обычно используется для определения размера суспензий частиц в субмикронный и сверхмикронные диапазоны с помощью формализмов Лоренца-Ми и дифракции Фраунгофера, соответственно [11]. Для экспериментов по статическому рассеянию света высокоинтенсивный монохроматический свет, обычно лазер, рассеивается в растворе, содержащем макромолекулы. Один или несколько детекторов используются для измерения интенсивности рассеяния под одним или несколькими углами. Угловая зависимость требуется для получения точных измерений как молярной массы, так и размера для всех макромолекул с радиусом более 1–2% от длины волны падающего излучения. Следовательно, одновременные измерения под несколькими углами относительно направления падающего света, известные как многоугловое рассеяние света (MALS) или многоугловое рассеяние лазерного света (MALLS), обычно рассматриваются как стандартная реализация статического рассеяния света [12].

Для измерения размеров наночастиц используется метод динамического рассеяния света (ДРС), при котором хаотическое броуновское движение дисперсных частиц вызывает флуктуации их локальной концентрации. В свою очередь, эти флуктуации приводят к локальным неоднородностям показателя преломления среды [13]. При прохождении лазерного луча через такую среду часть света будет рассеяна на этих неоднородностях. Флуктуации интенсивности рассеянного света будут соответствовать флуктуациям локальной концентрации дисперсных частиц, а коэффициент диффузии однозначно связан с радиусом частицы. Данный метод позволяет определить коэффициент диффузии дисперсных частиц в жидкости путем анализа характерного времени флуктуаций интенсивности рассеянного света. Далее, из коэффициента диффузии рассчитывается радиус наночастиц [14]. Основные идеи метода динамического рассеяния света: броуновское движение дисперсных частиц или макромолекул в жидкости приводит к флуктуациям локальной концентрации частиц (результатом

этого являются локальные неоднородности показателя преломления и соответственно - флуктуации интенсивности рассеянного света при прохождении лазерного луча через такую среду), коэффициент диффузии частиц обратно пропорционален характерному времени релаксации флуктуаций интенсивности рассеянного света (это характерное время, в свою очередь, есть время затухания экспоненциальной временной корреляционной функции рассеянного света, которая измеряется с помощью цифрового коррелятора), размер частиц рассчитывается по формуле Стокса-Эйнштейна, которая связывает размер частиц с их коэффициентом диффузии и вязкостью жидкости. (см. главу 2.2.2) [15].

Параметрами наночастиц, позволяющими охарактеризовать их являются материал частицы, ее размеры и дзета-потенциал, который возникает в результате накопления электрических зарядов на границе раздела фаз. В результате этого на фазовой границе образуется двойной электрический слой [16]. Измерение дзета (zeta) - потенциала, или потенциала двойного слоя, позволяет определить силу взаимодействия между частицами. Это является характеристикой стабильности системы и способности частиц к агрегации, определяя степень и характер взаимодействия между частицами дисперсной системы, понимание механизмов диспергирования, их контроль на уровне электростатических взаимодействий. Данные вопросы чрезвычайно важны во множестве областей производственной и исследовательской деятельности [17]. При разработке новых фармацевтических продуктов (суспензий, эмульсий или коллоидов), одним из основных и самых трудоёмких этапов является определение стабильности предполагаемых композиций в различных условиях. Использование дзета-потенциала, как параметра, позволяющего производить экспресс оценку стабильности системы, позволяет существенно оптимизировать этот исследовательский этап. Помимо этого, детальное понимание аспектов стабильности систем, способствует повышению качества производимой и разрабатываемой продукции.

1.1.2. Определение фракционного состава порошков и гранул методом ситового анализа: существующие ограничения к использованию

Ситовой анализ – это определение фракционного состава или распределения по размерам частиц порошков и гранул просеиванием через сита. Ситовой анализ осуществляют просеиванием проб материала через набор стандартных сит, размер отверстий которых последовательно уменьшается сверху вниз, в результате чего материал разделяется на фракции. Определение фракционного состава порошков и гранул используется в технологии лекарственных средств на различных стадиях производства [18]. Использование ситового анализа имеет ряд ограничений: для проведения анализа требуется, как правило, достаточно большое количество порошка (обычно – не менее 25 г); метод неприменим к несыпучим или забивающим отверстия сита порошкообразным материалам (маслянистым, липким, склонным к комкованию и др.); если исследуемые образцы гигроскопичны или, напротив, легко теряют влагу, при проведении анализа следует контролировать влажность и температуру окружающей среды; в случае анализа электризующихся веществ к образцу следует добавлять антистатик (кремния диоксид коллоидный, алюминия оксид и др.) в количестве до 0,5 % по массе [20]. Ситовой анализ может использоваться для предварительной характеристики измельченности порошка (таблица 1), а также для определения фракционного состава порошков или гранул.

Таблица 1. Классификация порошков по измельченности [19].

Измельченность порошка	Размер отверстий (мкм) сит, через которые проходит анализируемый порошок	
	не менее 95	не более 40 %
Очень крупный порошок	–	1400
Крупный порошок	1400	355
Средне-мелкий порошок	355	180

Мелкий порошок	180	125
Очень мелкий порошок	125	90

Для определения фракционного состава порошка собирают набор сит с размерами отверстий, покрывающими весь диапазон размеров частиц в образце. В зависимости от свойств исследуемого порошка и поставленных задач (технологических целей) ситовой анализ может выполняться следующими методами: механическое просеивание; воздушоструйное просеивание; звуковое просеивание.

Ситовой анализ с механическим просеиванием обычно применяют для анализа порошков или гранул, у которых не менее 80 % частиц имеют размер более 75 мкм. Для более мелких частиц, а также для частиц с выраженным свойством слипаться или прилипать к поверхности сита, более подходящим является воздушоструйное или звуковое просеивание. Разные способы просеивания дают различные результаты ситового анализа, что необходимо учитывать при оценке результатов испытания [20]. Вне зависимости от выбранного метода предварительно определяют оптимальную массу пробы и время просеивания. Выбор массы пробы: если в фармакопейной статье или нормативной документации не указана масса испытываемой пробы, то испытание проводят для навесок порошка в интервале от 10 до 100 г. Выбор времени просеивания: определяют массу каждого сита с точностью до 0,1 г. Точную навеску испытываемого порошка помещают на верхнее сито и закрывают крышкой. Проводят просеивание любым из методов в течение 5 мин, затем осторожно (без потерь вещества) снова взвешивают каждое сито и определяют массу вещества на каждом из сит [19].

Методика определения фракционного состава включает в себе определение массы каждого сита с точностью до 0,1 г: точную навеску испытываемого вещества помещают на верхнее сито и закрывают крышкой. Проводят просеивание любым из методов в течение установленного времени, затем осторожно (без потерь вещества) снова взвешивают каждое сито и определяют массу вещества на каждом из сит. Таким же способом определяют массу вещества на поддоне [19].

Фракционный состав порошков и гранул и распределение частиц по размерам выражают в виде массовой доли порошка, просеянного через сита, в процентах [21].

1.1.3. Гравиметрия, как абсолютный метод химического анализа: преимущества и недостатки

Гравиметрическим анализом называют метод количественного химического анализа, при котором о количестве элемента (вещества) в исследуемой пробе судят по массе вещества, полученного в результате анализа [22]. Гравиметрический анализ может быть: частным – определяется одно или несколько веществ, а другие не интересуют; полным – на содержание всех входящих составных частей ($\Sigma = 100\%$). Гравиметрический метод основан на законах постоянства состава, сохранения массы вещества при химических превращениях и законе эквивалентов. В основе гравиметрического метода анализа лежат различные химические реакции – обмена, замещения, разложения, комплексообразования [23]. Гравиметрический метод анализа можно применить в определение гигроскопической влаги, установление химического состава многих веществ, определение атомных масс элементов [24]. Преимущества и недостатки представлены в таблице 2.

Таблица 2. Преимущества и недостатки гравиметрического метода анализа

Преимущества	Недостатки
Высокая точность	Длительность (от нескольких часов до нескольких суток)
Простота (метод не требует сложной аппаратуры и специальных знаний)	чувствительность (трудно определять малые количества вещества).

В гравиметрическом анализе используют методы отгонки (прямой и косвенной), выделения, термогравиметрии, электрогравиметрии, осаждения.

Методы отгонки могут быть прямые и косвенные. В методе прямой отгонки определяемый компонент выделяют из пробы в виде газообразного продукта, улавливают и затем определяют его массу. В методах косвенной отгонки массу газообразного продукта определяют по разности масс анализируемого компонента до и после термической обработки. Методы выделения основаны на выделении определяемого вещества в твердую фазу в элементарном виде.

Термогравиметрический анализ основан на изменении массы вещества в процессе нагревания, что позволяет судить о происходящих превращениях и установить состав образующихся промежуточных продуктов [25].

Электрогравиметрический анализ основан на электролитическом выделении металлов и взвешивании полученного на электроде осадка. Основным условием электролитического разделения металлов является определенное напряжение, при котором осаждаются одни и не выделяются другие металлы. При проведении гравиметрического анализа методом осаждения: форма осаждения и гравиметрическая форма могут различаться по составу, а могут совпадать.

Таким образом, гравиметрическое определение методом осаждения состоит из нескольких этапов. После отбора и растворения пробы, содержащей анализируемое вещество, выполняются следующие операции: осаждение; фильтрование и промывание осадка; высушивание и прокаливание осадка; взвешивание полученного осадка; расчет результатов анализа [26]. При проведении гравиметрического анализа измеряется аналитический сигнал – масса гравиметрической формы. На основании полученного аналитического сигнала проводится расчет результатов анализа по уравнению реакции или с использованием гравиметрического фактора (F) [27].

1.2. Особенности фармацевтического применения биологических дисперсных систем: популяции клеток *Spirostomum ambiguum* и других пресноводных инфузорий (*Stentor polymorphus* Mtiller, *Paramecium caudatum* Ehrenberg, *Spirostomum minus* Ehrenberg, *Coleps hirtus* Nitzsch)

Простейшие играют важную роль в водной пищевой сети в качестве основных потребителей. Широкое распространение в поверхностных водах способствует питанию бактериями и возможности поглощать загрязняющие вещества непосредственно из воды. *Spirostomum ambiguum* является представителем одного из самого крупного типа реснитчатых простейших (*Protozoa*) с длительным временем генерации около 70 часов. Он переносит изменение pH от 5,5 до 8,0, может культивироваться в лаборатории и храниться в неорганической среде не менее восьми дней. Таким образом, это очень удобный организм, который уже более 25 лет используется в качестве тест-объектов экотоксикологических исследованиях [28]. Как правило, виды *Spirostomum* представляют собой удлиненные, слегка уплощенные одноклеточные реснитчатые тела, которые сокращаются по спирали [29]. *Spirostomum ambiguum*, в качестве тест-объектов, удобные при культивировании не прихотливы в кормлении, относительно крупны, что удобно при наблюдении за их состоянием в исследуемом образце. Простейшие одновременно могут совмещать функции клетки и организма [30]. Инфузории являются олиготрофами, что позволяет определять реакцию на любой химический лиганд в водном растворе, отличном от нормы. Использование одноклеточных, вместе с изменениями температуры или концентрации, влияет на скорость гибели, что позволяет описать этот эффект с использованием уравнений химической кинетики [31].

Реакция инфузорий на ксенобиотики подобна реакции многоклеточных организмов. Будучи потревоженной, клетка дает мгновенный ответ, сокращаясь по своей длине в 2—3 раза. Параметры сокращения зависят от температуры. В норме *S. ambiguum* совершает свободные передвижения в толще раствора с характерным чередованием сжатия/вытягивания клетки. В среде, содержащей компоненты

фармацевтических препаратов, такое передвижение может сопровождаться конвульсивными подергиваниями, фиксацией около стенки ячейки, прецессионными движениями и другими отклонениями. При благоприятных условиях характеризуется высокой подвижностью как в горизонтальном, так и вертикальном направлении. Клетки *S. ambiguum* в благоприятных условиях (слабоминерализованная среда культивирования или дистиллированная вода, 19—29 °С, рН = 7) не гибнут в течение времени, превышающем клеточный цикл (около 20 часов) [32]. Отмечена эффективность использования *Spirostomum ambiguum* для определения токсичности лекарственных средств [33].

1.3. Дисперсные лекарственные, косметические средства синтетического и природного происхождения

Лекарственные средства – вещества или их комбинации, вступающие в контакт с организмом человека или животного, проникающие в органы, ткани организма человека или животного, применяемые для профилактики, диагностики (за исключением веществ или их комбинаций, не контактирующих с организмом человека или животного), лечения заболевания [34]. К лекарственным средствам относятся фармацевтические субстанции и лекарственные препараты. Все лекарственные формы могут быть иерархически классифицированы: по агрегатному состоянию, типу дисперсной системы, пути введения и типу высвобождения (таблица 3).

Таблица 3. Классификация лекарственных форм [34].

Уровень	Классификационный признак		
1	Лекарственные формы по агрегатному состоянию		
	твердые	жидкие	Газообразные
	Лекарственные формы по типу дисперсной системы		

2	гомогенные	гетерогенные	комбинированные	
3	Лекарственные формы по пути введения			
	для приема внутри	для наружного применения	для местного применения	для парентерального применения
4	Лекарственные формы по типу высвобождения			
	Обычным высвобождением		Модифицированным высвобождением	

По типу дисперсной системы лекарственные формы могут быть гомогенными, гетерогенными и комбинированными.

1.3.1 Микрогетерогенные системы: суспензии, эмульсии, пены, аэрозоли, порошки

Микрогетерогенные системы представляют собой системы, содержащие частицы дисперсной фазы имеют размеры от 1 мкм и выше, которые характеризуются наличием большой межфазной поверхности, что обуславливает их термодинамическую неустойчивость – стремление к укрупнению частиц дисперсной фазы [35].

К микрогетерогенным системам относят: суспензии, эмульсии, пены, аэрозоли, порошки. Суспензии - жидкая лекарственная форма, содержащая в качестве дисперсной фазы одно или несколько измельченных порошкообразных лекарственных веществ, распределенных в жидкой дисперсионной среде. Размер частиц в суспензиях составляет 0,1 – 50 мкм (иногда до 100 мкм), что различимо невооруженным глазом [36]. Определение размера частиц в суспензиях проводят методами оптической микроскопии (ОФС «Оптическая микроскопия») и лазерной дифракции (ОФС «Определение распределения частиц по размеру методом лазерной дифракции света») [37]. Преимущество суспензий заключается в более высокой терапевтической активности по сравнению с таблетками и порошками (при размере частиц дисперсной фазы менее 10 мкм). Наблюдается высокая дисперсность твердых веществ, чем в таблетках и порошках. Пролонгированное

действие по сравнению с растворами (при наличии частиц дисперсной фазы размером 40 мкм) более выраженное [38]. Существует два метода изготовления суспензий: дисперсионный (диспергирование). В основе - процесс измельчения частиц, конденсационный. В основе - укрупнение частиц в результате агрегации (конденсации) или образования молекул нерастворимого в данной дисперсионной среде вещества в результате химического взаимодействия [39].

Эмульсия – микрогетерогенная система, состоящая из взаимно нерастворимых жидкостей, распределенных одна в другой в виде капель. Эмульсии могут расслаиваться, но при взбалтывании должны легко восстанавливаться. Для обеспечения устойчивости в состав эмульсий вводят эмульгаторы [40]. Тип образующейся эмульсии определяется свойствами эмульгатора (его гидрофильно-липофильным балансом [41]). Эмульгаторы по типу образуемых эмульсий разделяются на гидрофильные (белки, слизи, крахмал, декстрин, сапонины, танин, растительные экстракты, соли желчных кислот, щелочные мыла, лецитин, полисорбаты и др.), образующие эмульсии типа масло/вода, и липофильные (мыла двух- и трехвалентных металлов, стерины, смоляные мыла, амиды жирных кислот, высокомолекулярные одноатомные спирты и др.), образующие эмульсии типа вода/масло [42]. При получении эмульсий используют миндальное, персиковое, оливковое, подсолнечное, касторовое, вазелиновое и эфирные масла, а также рыбий жир и другие несмешивающиеся с водой жидкости. Выбор эмульгатора и его количество зависит от природы и свойств эмульгатора и масла. Эмульсии получают диспергированием эмульгатора с эмульгируемой жидкостью и дисперсионной средой [43]. Действующие вещества вводят в состав эмульсий с учетом их физико-химических свойств: липофильные вещества растворяют в маслах, водорастворимые – в воде, нерастворимые вещества диспергируют и вводят в основу эмульсии [44]. Эмульсии предназначены для приема внутрь, ингаляций, местного, наружного и парентерального применения [40].

Пены - лекарственная форма, представляющая собой раствор, эмульсию или суспензию действующих и вспомогательных веществ (в том числе поверхностно-активных), которые находятся под давлением пропеллента в герметичной

упаковке, снабженной клапанно-распылительной системой, обеспечивающей высвобождение содержимого в виде дисперсии газа в жидких, реже твердых фазах. [45]. Пены относят к трехфазным аэрозолям, так называемые пенные аэрозоли, представляющие собой систему из растворов, эмульсий или суспензий действующих веществ с добавлением поверхностно-активных вспомогательных веществ, находящихся под давлением газа-пропеллента [46]. В зависимости от природы дисперсионной среды различают водные и неводные пены. По составу пены подразделяют на быстроразрушающиеся и стабилизированные пены. Пены, содержащие в своем составе спирт этиловый, обладают противомикробным действием и оказывают охлаждающий эффект при нанесении на кожные покровы. Для получения пены в состав лекарственного препарата, наряду с действующими и вспомогательными веществами обязательно вводится раствор поверхностно-активного вещества/веществ и газ-пропеллент. Пены могут быть получены с использованием водных и неводных растворителей. В качестве водных растворителей используют воду очищенную или воду для инъекций; неводных растворителей – спирты, минеральные и жирные масла. Вспомогательные вещества в составе пен должны обеспечивать оптимальные технологические характеристики лекарственной формы, быть совместимы с другими компонентами лекарственной формы и материалом упаковки. В качестве вспомогательных веществ используют поверхностно-активные вещества, пропелленты, стабилизаторы, консерванты и др., разрешенные для медицинского применения. Поверхностно-активные вещества (например, полисорбаты) используют для обеспечения распределения газа в дисперсионной среде и стабилизации пены. По способу применения выделяют пены для наружного и местного применения [40-эмуль].

Порошки - лекарственная форма, состоящая из твердых отдельных сухих частиц различной дисперсности, обладающая свойством сыпучести [47]. Порошки должны быть однородными при рассмотрении невооруженным глазом и иметь размер частиц не более 160 мкм. Процесс получения порошков состоит из следующих стадий: измельчение исходных веществ; получение однородного

порошка (просеивание); смешивание; фасовка, упаковка, маркировка. В качестве вспомогательных веществ, входящих в состав порошков, используют индифферентные наполнители, солюбилизаторы, корригенты вкуса, красители, консерванты, разрешенные к медицинскому применению порошки могут содержать вспомогательные вещества, обеспечивающие растворение или диспергирование, предотвращающие слеживаемость, снижающие гигроскопичность, регулирующие или стабилизирующие рН, либо стабилизирующие фармацевтическую субстанцию и др. В зависимости от лекарственной формы и способа применения к порошкам предъявляют различные требования в отношении дисперсности.

Дисперсность порошков характеризуется размером отверстия сита, через которое проходит порошок. Размер частиц порошка выражают в микронах. При получении порошков для наружного, местного применения и/или для приготовления суспензий для наружного, местного применения необходимо предусматривать соответствующий размер частиц с указанием его в фармакопейной статье или нормативной документации. В зависимости от способа применения различают: порошки для наружного применения; порошки для местного применения; порошки для приготовления растворов или суспензий для наружного применения; порошки для приготовления растворов или суспензий для местного применения; порошки для приготовления растворов или суспензий для парентерального применения; порошки для приготовления глазных капель (и глазных примочек); порошки для приема внутрь; порошки для приготовления растворов, капель или суспензий для приема внутрь [48].

1.3.2. Белковые коллоидные растворы

Молекулы протеинов, полипептидов в составе белков определяют свойства белковых растворов, выступая коллоидными частицами, и образуя коллоидные растворы [49].

К свойствам белковых растворов можно отнести: рассеивание света вследствие дифракции на коллоидных частицах – опалесценция, что особенно заметно при прохождении луча света через белковый раствор, когда виден светящийся конус (эффект Тиндаля) [50]; скорость диффузии белковых растворов значительно мала, в сравнении с истинным [51]; неспособность белковых частиц проникать через мембраны, поры которых меньше диаметра белков (полунепроницаемые мембраны); высокая вязкость в результате сил сцепления между крупными молекулами, что проявляется, например, при образовании гелей и студней, создание онкотического (коллоидно-осмотического) давления (около 0,5 %) осмотического давления) [52].

1.3.4. Вакцины различного спектра действия.

Новейшие наносистемы доставки вакцин *in vivo*

Вакцины (от лат. *vaccinus* — «коровий») — профилактические средства лечения, известные уже более 200 лет. Впервые вакцина была применена для предупреждения заболевания черной оспой. Доказано, что они эффективны в предотвращении инфекций, которые ранее характеризовались высокой заболеваемостью и смертностью. Со времен предупреждения и ликвидации оспы вакцинация оказалось экономически эффективной мерой, поэтому вакцины стали частью многочисленных национальных программ здравоохранения. Эти многообещающие результаты привели к разработке все большего количества вакцин и к изучению их применимости в других областях, таких как профилактика и лечение рака.

Вакцины — медицинский препарат биологического происхождения, который вводят здоровым людям, и, как и другие лекарства, вакцины связаны с побочными

эффектами. Обычно описанные нежелательные явления являются преходящими и острыми, но редко могут проявляться гиперчувствительностью и индукцией аутоиммунитета, которые могут быть тяжелыми и фатальными [53]. Варианты лечения многих болезней животных и человека либо отсутствуют, либо проблематичны (например, из-за развития резистентности), либо имеют ограниченную эффективность. Это подчеркивает постоянную потребность в новых альтернативах лечения заболеваний, включая вакцины для предотвращения эпидемий и индукции устойчивости к антибиотикам [54]. Большинство лицензированных вакцин представляют собой традиционные инактивированные или живые аттенуированные вакцины; вирусные векторные вакцины и вакцины на основе субъединиц оказались очень полезными из-за присущей им способности действовать как адъюванты, инфицировать клетки или активировать врожденные иммунные ответы. Однако эффективных вакцин против большинства эпидемических болезней животных не существует. Это, в основном, связано с присущей ограничениями вакцинацией и побочными эффектами.

В настоящее время нанотехнологии позволяют разрабатывать вакцины на основе наноматериалов, обладающих инкапсулирующей способностью и свойствами благодаря своим размерам и площади поверхности, что позволяет им служить эффективными средствами доставки антигенов и иммуностимулирующими агентами. Вакцина против вируса гепатита В была первой рекомбинантной вакциной, одобренной для использования на людях; он был составлен с поверхностным антигеном, который первоначально был приготовлен из инфицированной донорской плазмы. Тем не менее, нанотехнология началась раньше (еще в 1974 г.) с манипулирования наноразмерными материалами. Нанотехнологии описывают материалы, одно или несколько из которых имеют размер от 1 до 100 нм, а вирусы — от 10 до 100 нм. Другие недавно разработанные нанобиоматериалы (обычно 5–20 нм) разрабатываются так, чтобы иметь структурное сходство с различными рецепторами, лигандами, ДНК и белками. Размер наночастицы оказывает решающее влияние на биораспределение нановакцины и ее взаимодействие с клетками иммунной системы. Сами

наноматериалы действуют как эффективные адъюванты, способные активировать гуморальные и клеточные реакции. Также можно улучшить время циркуляции биоматериалов, повысить их биодоступность или защитить биологический материал от деградации.

Контроль размера, формы, поверхностного заряда, гибкости, гидрофобности и плотности заряда антигена и адъюванта в нановакцинах является ключом к доставке наночастиц в лимфатические сосуды и оптимизации сильного иммунного ответа

Нановакцины, вакцины нового поколения, в которых в качестве носителей и/или адъювантов используются наночастицы, также, широко используются для профилактики и лечения различных заболеваний, включая рак [55].

Использование вакцин на основе наночастиц становится многообещающим новым подходом к вакцинации из-за конкурентных преимуществ по сравнению с использованием традиционных субъединичных вакцин. Нановакцины могут индуцировать как быстрый, так и длительный клеточный и гуморальный иммунитет [56]. Нановакцины легко вводятся несколькими путями доставки, включая интраназальный, внутривенный, пероральный, и могут быть функционализированы для преодоления гематоэнцефалического барьера [57]. Вакцины такого состава демонстрируют расширенную термическую стабильность при комнатной температуре и не требуют холодной цепи, в отличие от традиционных субъединичных вакцин [58]. Стабильность хранения нановакцин значительно снижает затраты на хранение медицинских препаратов и позволяет осуществлять глобальную доставку в удаленные места [60]. В дополнение к термической стабильности наночастицы способны поддерживать стабильность и функциональность белка-антигена в течение длительных периодов времени, что желательно для вызова соответствующего иммунного ответа [61]. Частицы обычно синтезируются из множества природных и синтетических биосовместимых полимерных материалов. Разнообразие материалов, используемых для синтеза наночастиц, позволяет манипулировать формой, размером, поверхностным

зарядом и гидрофобностью частиц и, в конечном счете, самоадьювантными эффектами.

Учитывая эти преимущества, нановакцины могут быть полезны для повышения эффективности и безопасности вакцин [62].

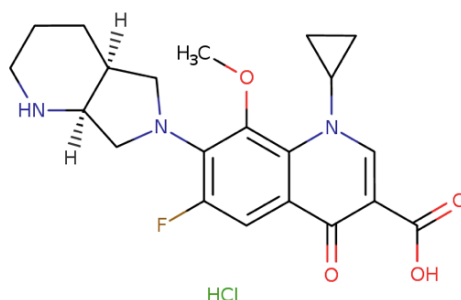
Глава 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. ИССЛЕДУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ, РЕАКТИВЫ И РАСХОДНЫЕ МАТЕРИАЛЫ

2.1.1. Моксифлоксацина гидрохлорид / *Moxifloxacin hydrochloride*

Объектами исследований выступили порошки-субстанций, а также готовые жидкие лекарственные формы - глазные капли, содержание АФИ группы фторхинолона.

Моксифлоксацина гидрохлорид – антибактериальное средство широкого спектра антибактериального действия (рисунок 1).



$C_{21}H_{25}ClFN_3O_4$

$M_r 437,9$

1-Циклопропил-6-фтор-8-метокси-7-[(4aS,7aS)-октагидро-6H-пирроло[3,4-b]пиридин-6-ил]-4-оксо-1,4-дигидрохинолин-3-гидрохлорид карбоновой кислоты

Рисунок 1. Структурная формула моксифлоксацина гидрохлорида.

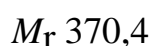
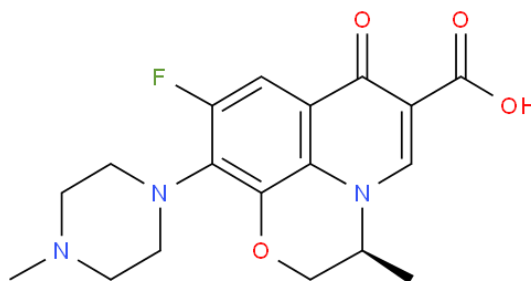
Вигамокс 0,5% - 5 мл. Активное вещество - моксифлоксацин (Alcon-Souvenir, Бельгия). Вспомогательные вещества: натрия хлорид, борная кислота, хлористоводородная кислота и/или натрия гидроксид (для поддержания постоянства pH), очищенная вода.

Оптик 0,5 % - 5 мл. Активное вещество - моксифлоксацин (ЗАО «ЛЕККО» РФ, Владимирская область).

2.1.2 Левофлоксацина полугидрат/ *Levofloxacin hemihydrate*

Капли глазные Офтавикс® (Oftaquix ®) 0,5% - 5 мл. Активное вещество: левофлоксацина полугидрат 5,12 мг (эквивалентный левофлоксацину — 5 мг/1 мл), (Santen OY, Финляндия). Вспомогательные вещества: бензалкония хлорид – 0,05 мг, натрия хлорид - 9 мг, хлористоводородная кислота, натрия гидроксид, вода д/и - до 1 мл.

Левофлоксацин - *S*-изомер рацемической лекарственной субстанции офлоксацина, проявляющий, в отличие от *R* - изомера, антибактериальную активность (рисунок 2).



(3S)-9-Фтор-3-метил-10-(4-метилпиперазин-1-ил)-7-оксо-2,3-дигидро-7H-пиридо[1,2,3-*de*][1,4]бензоксазин-6-карбоновой кислоты полугидрат

Рисунок 2. Структурная формула левофлоксацина полугидрата.

Глазные капли, содержащие моксифлоксацин и левофлоксацин гидрохлориды широко используется в офтальмологии для лечения бактериального конъюнктивита, вызванного чувствительными к моксифлоксацину и левофлоксацину микроорганизмами, активны в отношении большинства штаммов грамположительных и грамотрицательных бактерий (как *in vitro*, так и *in vivo*).

2.1.3 Гумусовые кислоты (гуминовые, фульвовые кислоты)

В качестве объекта исследования образца гумусовых кислот был использован природный комплекс гуминово-фульвовых кислот, выделенный из низинного

торфа, сапропеля и некоторых сортов бурых углей (леонардит) по технологии компании VimaVita (ООО «Система-БиоТехнологии», РФ) (рисунок 3).

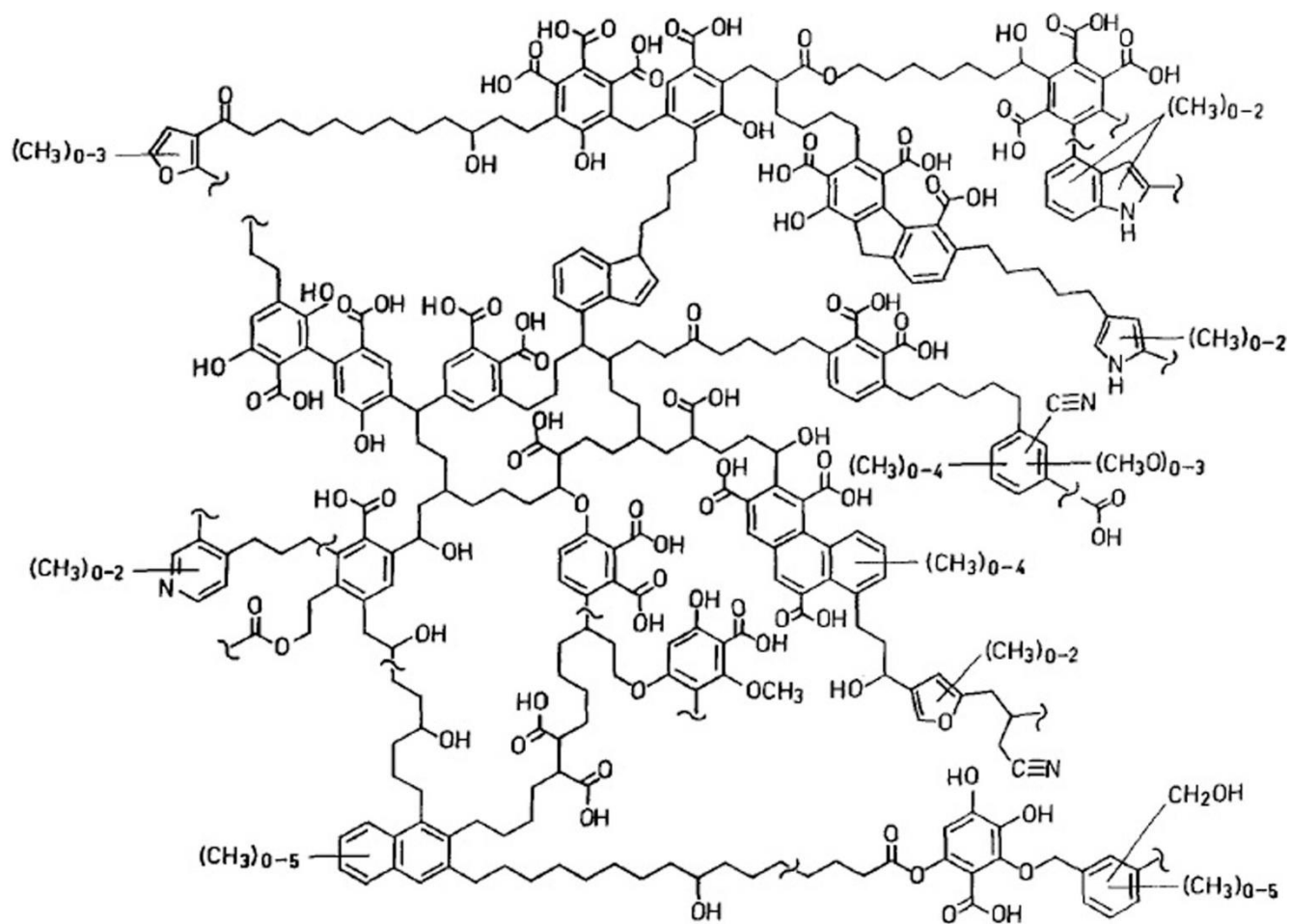
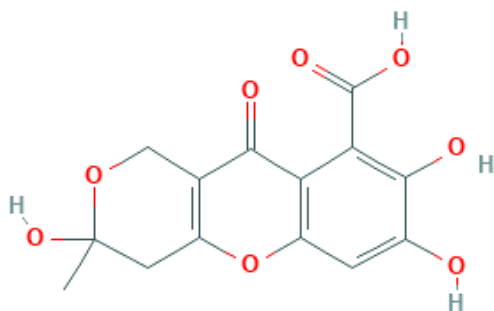


Рисунок 3. Гипотетическая структура молекул гуминовых кислот.

Концентрат гуминового комплекса, содержащий гуминовые кислоты (ГК), гиматомелановые кислоты (ГМК), фульвовые кислоты (ФК), гумусовые кислоты (ГФК) и структурные аналоги гуминовых веществ, могут быть получены методом окислительно-гидролитической деструкции лигнинсодержащего сырья (твердофазной ферментации) с последующей очисткой [63].

В результате высокоинтенсивной акустической очистки была получена для проведения исследований концентрированная вязкая коллоидная дисперсная система гуминовых веществ темно-бурого цвета ($pH=7,98\pm 0,1$).

Экстракт фульвокислот (*Terra Aquatica, France*) в виде жидкого, прозрачного раствора бурого цвета получают извлечением из особого сорта бурых углей-леонардита ($\text{pH}=5,77\pm 0,1$) (рисунок 4).



*3,7,8-тригидрокси-3-метил-10-оксо-1,4-дигидропирано[4,3-*b*]хромен-9-карбоновая кислота*

Рисунок 4. Структура молекулы фульвокислоты.

Для изучения физико-химических свойств гуминовых и фульвокислот были приготовлены водные растворы из исходного концентрата.

Все растворы фракций гуминовых веществ хранились при температуре $+4^{\circ}\text{C}$.

2.1.4 Вакцины лечебные и профилактические для применения у человека и животных

В качестве объектов исследования нами были выбраны ДНК и м-РНК образцы вакцин для человека и животных.

Образцы ДНК - содержащих вакцин:

Вакдерм F («Ветзвероцентр» январь 2020 г, серия 75) - целнопатогенная (содержащая инактивированные споры дерматофитов *Microsporum canis*, *Microsporum gypsum* и *Trichophyton mentagrophytes*), лечебно-профилактическая (используется в инкубационном периоде заболевания и для профилактики микроспории и трихофитии у животных) вакцина; предоставляет собой однородную взвесь желтовато-коричневого цвета в 1 прививной дозе; безвредна, ареактогенна.

Нобивак (MSD Animal Health, Нидерланды), в РФ представлена фирмой «Интервет»:

Нобивак (Lepto) – активная вакцина против чумы, парагриппа, энтерита и гепатита и лептоспироза. Содержит только одну серогруппу лептоспир наиболее агрессивного штамма. Одна доза вакцины (1 мл) содержит действующее вещество: лептоспиры *Leptospira interrogans* серогруппы *Canicola*, штамм Ca-12-000 – не менее 957 ЕД/мл и серогруппы *Icterohaemorrhagiae*, штамм 820К – не менее 625 ЕД/мл. **Lepto** предохраняет от заражения лептоспирозом. Чаще всего используется в комплексе с ДНППИ (вакцина комбинированного действия, предназначена для защиты животных против чумы, парагриппа, энтерита и гепатита).

Нобивак (L4) – этим препаратом вакцинируют животных от инфекционных заболеваний, возбудители которого содержатся в вакцине ДНППИ и лептоспироза. Отличается расширенной защитой к лептоспирозу. Активна против 6 различных серогрупп лептоспир, особенно опасных для собак. Вакцина содержит инактивированные культуры лептоспир: *Leptospira Canicola* (серовар *Portland-vere* (штамм Ca-12-000), *Leptospira Icterohaemorrhagiae* (серовар *Copenhageni* штамм Ic-02-001), *Leptospira Australis* (серовар *Bratislava* штамм As-05-073), *Leptospira Grippotyphosa* (серовар *Dadas* штамм Gr-01-005), консервант тиомерсал и буферные компоненты, натрия хлорид, калия хлорид, калия дигидрофосфат, динатрия гидрофосфата дигидрат и воду для инъекций.

Рабифел (Rabifel) - вакцина против бешенства кошек, инактивированная. Лекарственная форма – суспензия для инъекций. Вакцин изготовлена из инактивированного производственного штамма вируса бешенства «ERA-CB-20M», выращенного на культуре клеток ВНК-21 и адьюванта AbISCOR (Tscanova, Швеция) в рекомендованной производителем концентрации. Вакцина расфасована по 1,0 см³ (1 доза) в стерильные ампулы или флаконы соответствующей вместимости.

Образцы мРНК - содержащих вакцин:

Спутник V (торговое наименование «Гам-КОВИД-Вак») двух различных производителей. Состоит из нескольких модифицированных частей, взятых от разных вирусов: оболочки состоящей из так называемого вектора — вируса-доставщика, лишённого способности размножаться, но способного проникать

внутри клеток, и встроенного в этот вирус гена, который кодирует один из белков патогенного опасного вируса, (т.е. комбинированная векторная) вакцина на основе нуклеиновых кислот.

Флакон компонента I (вектор 1): производитель АО «Генериум» РФ, Владимирская область, Петушинский район, пос. Вольгинский; дата выпуска – 12.2020, годен до 06.2021) содержит: рекомбинантные аденовирусные частицы 26 серотипа, содержащие ген белка S вируса SARS-CoV-2 в кол-ве $1,0 \cdot 10^{11}$ частиц, вспомогательные вещества: ТРИС, NaCl, сахароза полисорбат 80, MgCl $\cdot 9H_2O$, Na₂ЭДТА, этанол 95%, вода для инъекций.

Флакон компонента II (вектор 2): производитель ЗАО «БИОКАД», РФ г. Санкт-Петербург, содержит: рекомбинантные аденовирусные частицы 5 серотипа, содержащие ген белка S вируса SARS-CoV-2 в кол-ве $1,0 \cdot 10^{11}$ частиц, вспомогательные вещества: ТРИС, NaCl, сахароза полисорбат 80, MgCl $\cdot 9H_2O$, Na₂ЭДТА, этанол 95%, вода для инъекций.

VLP-вакцина против SARS-CoV-2 (производство РФ). ИБЛП на основе вирусоподобных (*virus-like particles*, VLP) частиц – принципиально новая стратегия создания (дизайна) иммуногена на основе включения специфических гликопротеинов вируса в вирусоподобные частицы. Однако синтезированный пептид, корректно представляющий главную антигенную детерминанту патогена, не проявляет иммуногенных свойств из-за малого размера (<10 нм) и подверженности протеолитической деградации. Решением является экспонирование на поверхность частиц антигенные детерминанты патогена. Частицы VLP состоят из мономеров основных структурных белков, имитирующих конформационную структуру эпитопов, с целью увеличения иммуногенности. Многократное «повторение» антигенной детерминанты на поверхности VLP облегчает фиксацию комплемента и кластеризацию рецепторов В-лимфоцитов для активации иммунного ответа.

Сходство с вирусами позволяет VLP проникать в лимфу, а также эффективно поглощаться антигенпрезентирующими клетками.

2.1.5 Изотопологи воды, как лабораторные растворители

Исходя из литературных данных было установлено, что вода с измененным изотопным составом по водороду обладает отличительными биологическими свойствами и физико-химическими свойствами - новый «инструмент» в терапии рака [64]. Таким образом, представляя значительный научный интерес, в качестве растворителя была использована вода с низким содержанием тяжелого водорода (вода, обедненная дейтерием/ddw, легкая вода): Water, deuterium depleted (DDW) – 2-3 PPM Deuterium производитель: Cambridge Isotope Laboratories, Inc., USA.

2.2 МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.2.1 Метод статического рассеяния света (лазерная дифракция) в применении к гранулометрическому анализу и кинетической оценке растворения малорастворимых лекарственных субстанций

С помощью метода «малоголового рассеяния лазерного света» (*Low-angle laser light scattering, LALLS*) нами было исследовано объемное и численное распределение частиц по размеру с использованием лазерного малоуглового измерителя дисперсности «MasterSizer» 3600 Ес производства фирмы «Malvern», Великобритания» [65]. Основные составляющие части измерительного блока : лазерный He-Ne источник с длиной волны $\lambda=633\text{нм}$; оптическая система линз Фурье с фокусным расстоянием 63 мм, 100 мм или 300 мм); многоугловой детектор лазерного светорассеяния. Принцип заключается в том, что частицы большого диаметра отклоняют луч на малый угол, в то время как частицы маленького размера отклоняют луч на больший угол (рисунок 5) [66].

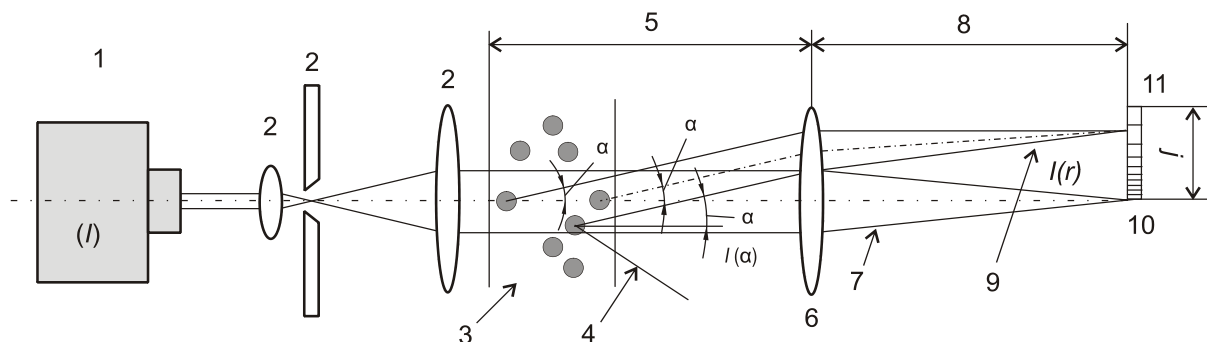


Рисунок 5. «Схема прибора определения размера частиц методом лазерной дифракции. 1 – источник лазерного излучения, 2 – модуль обработки лазерного излучения, 3 – частицы, 4 – рассеянный свет, не собранный линзой, 5 – рабочее расстояние линзы, 6 – линза Фурье, 7 – прямой луч, 8 – фокусное расстояние линзы, 9 – рассеянный луч, 10 – детектор затемнения, 11 – многоэлементный детектор» [67].

Принцип метода заключается в излучении лазерным генератором монохроматического пучка света, который попадая в специальную ячейку с помещённым в ней образцом, в результате чего происходит световая дифракция от частиц, таким образом попадая и покидая освещенную зону, частицы способствуют возникновению дифракционной картины, в которой представлено распределение частиц по размерам [68].

Дисперсность образцов характеризуют интегральные характеристики такие как: лазерное светорассеяния/*laser obscuration* (1-T), объемная концентрация/*volume concentration* (%), удельная площадь поверхности/*specific surface area* (см³/г).

2.2.2 Метод динамического рассеяния света (фотонная корреляционная спектроскопия) в определении размера и заряда (ζ -потенциала) поверхности наночастиц в исследуемых образцах

Метод «динамическое рассеяния света» (*Dynamic Light Scattering, DLS*) имеет и альтернативные названия, указывающие на принцип явления: фотонная корреляционная спектроскопия или метод квазиупругого рассеяния света [69]. Принцип метода включает в себе анализ броуновского движения частиц дисперсной фазы в дисперсионной среде, это, в свою очередь, приводит к флуктуациям локальной концентрации частиц, локальным неоднородностям показателя преломления и флуктуациям интенсивности рассеянного света. Определён стандартом ISO 22412-2008. Характерное время релаксации флуктуаций интенсивностей обратно пропорциональны коэффициенту диффузии.

Дисперсный анализ исследуемых образцов проводили в одноразовых пластиковых кюветах на анализаторе Malvern серии ZetaSizer Nano ZS.

Технические характеристики оборудования Zetasizer Nano ZS: позволяет оценивать размер частиц от 1 нм до 10 мкм; размер молекул, дзета-потенциал, абсолютную молекулярную массу с использованием He-Ne лазера ($\lambda = 633$ нм) с максимальной мощностью 4 мВт; точность определения размера частиц составляет $\pm 2\%$; предел обнаружения 0,1 мг/мл; диапазон абсолютной молекулярной массы 980 Да – 20М Да; точность определения абсолютной молекулярной массы $\pm 10\%$.

2.2.3 Метод определения потери в массе при высушивании

Поскольку определение сухого вещества в жидком образце дает более удобное представление о химическом составе анализируемого материала, а также позволяет сравнивать различные образцы со схожими физико-химическими свойствами, нами было проведено испытание на определение содержания остатка после высушивания образцов.

Определение потери в массе при высушивании определяли согласно ОФС.1.2.1.0010.15 «Потеря в массе при высушивании». Потеря в массе исследуемых образцов происходит за счёт гигроскопической влаги и летучих веществ, которую определяют в веществе при высушивании до постоянной массы, или в течение времени.

Методика: точную навеску исследуемого образца помещали в предварительно высушенный до постоянной массы и взвешенный в условиях проводимого испытания бюкс; пробу помещали в сушильный шкаф и выдерживали в течении 1 часа при 105 C^0 с последующим переносом в эксикатор на 50 минут для охлаждения и дальнейшего взвешивания. Последующие взвешивания проводили после каждого часа высушивания до достижения постоянной массы.

2.2.4 Оптическая микроскопия в морфологическом анализе кристаллов

Известно, что размер и форма частиц являются индивидуальными характеристиками. Метод оптической микроскопии был использован нами для

определения размера и формы частиц исследуемых кристаллических субстанций. Определение размера частиц связано с разрешающей способностью микроскопа и составляет около 1 мкм. Исследования проводили с помощью микроскопа «Альтами БИО 2» с увеличением объектива 10х.

Технические характеристики:

- Общее увеличение: 40х-1600х
- Насадка: бинокулярная насадка, межзрачковое расстояние составляет 55-75 мм, угол наклона равен 30°
- Окуляры: Широкопольные (пара) WF 10х/20, диоптрийная подстройка находится на каждом окуляре
- Объективы: увеличение (4х, 10х), числовая апертура (0.1, 0.25), парфокальное расстояние (45 мм), цвет маркировки (красный, желтый)
- Конденсатор: Конструкция Аббе, числовая апертура 1.25, с регулируемой ирисовой диафрагмой и держателем светофильтров
- Освещение: Галогенная лампа 12В/20Вт, плавная регулировка яркости освещения
- Цифр.камера: USB камера, с разрешением 3 Мпикс

Образцы исследуемых субстанций наносили таким образом, чтобы частицы порошкообразных веществ находились в одной плоскости. Наблюдение проводили посредством разных полей зрения. Для каждого исследуемого образца рассматривали около 10 полей в каждом из которых находилось около 6-30 частиц. Длину кристаллических частиц измеряли с использованием микроскопических снимков с помощью программы “Altami Studio 3.3” с учетом его калибровки посредством объекта-микрометра.

2.2.5 Спектрофотометрия в УФ и видимой областях для определения подлинности и содержания действующих веществ в объектах исследования

Спектры для растворов исследуемых субстанций и образцов в ультрафиолетовой и видимой области получали с помощью спектрофотометра Cary-60 (Agilent Technologies, США), предназначенный для измерения оптической плотности жидких и твердых веществ различного происхождения. Технические характеристики:

- **Монохроматор:** представлен двумя сферическими зеркалами для коллимации и фокусировки излучения на выходную щель (схема Черни-Тернера).
- **Источник излучения:** Импульсная Хе лампа непрерывного спектра (80 Гц)
- **Детекторы:** предназначенные для одновременного измерения в эталонном и рабочем луче, два детектора на кремниевых диодах.
- **Диапазон длин волн спектров:** от 190 до 1100 нм

2.2.6 Спектрофлуориметрический качественный и количественный анализ моксифлоксацина гидрохлорида и гумусовых кислот

Качественный и количественный флуоресцентный анализ исследуемых образцов в растворе регламентируется ОФС. 1.2.1.1.0006.15 Флуориметрия и был проведен нами на оборудовании AGILENT Cary Eclipse (USA) с двумя сверхбыстрыми сканирующими монохроматорами. Флуоресцентный анализ (ФА) основан на свечении (флуоресценции) определяемого вещества, возбуждаемого энергией излучения в УФВ-области 200 до 830 нм длительностью $\sim 10^{-6}$ - 10^{-9} с, прекращающейся сразу после действия источника возбуждения. Длина волны флуоресцентного излучения больше длины волны возбуждения (около 20 — 30 нм) из-за потери части энергии в возбуждённом состоянии (Стоксов сдвиг). ФА основан на прямой зависимости между интенсивностью флуоресценции и концентрацией вещества в растворе: $I_{Flu} = k \cdot C$, где I - интенсивность флуоресценции, k -коэффициент пропорциональности, C - концентрация раствора (моль/л). Интенсивность флуоресценции зависит от температуры, растворителя, величины рН испытуемого раствора, присутствия в растворе посторонних частиц,

концентрации кислорода в испытуемом растворе, постороннего освещения.

Условия проведения флуоресцентного анализа:

- Длина волны возбуждения $<$ длины волны люминесценции
- Концентрация раствора $C < 10^{-4}$ моль/л (концентрационное тушение люминесценции из-за частоты безизлучательного перехода)
- Отсутствие посторонних примесей и кислорода
- Постоянная температура (температурное тушение)
- Проведение люминесцентной реакции (если анализируемое вещество не люминесцирует)
- Квантовый выход флуоресценции постоянный и максимальный

Флуоресцентный анализ характеризуется: низким пределом обнаружения – до 10^{-8} %; в растворах с концентрацией ниже 10^{-5} моль/л наблюдается прямая зависимость $I_{\text{Flu}} - C$; сравнительно несложное аппаратное оформление метода; погрешности анализа составляют 2-5%. Полученные в результате спектры специфичны для исследуемых веществ, таким образом данный метод можно использовать для идентификации исследуемых образцов [70].

2.2.7 Рентгенофлуоресцентный анализ элементного состава исследуемых образцов синтетического, природного и иммунобиологического происхождения

Рентгенофлуоресцентный анализ регламентируется ОФС.1.2.1.1.0010.15 Рентгеновская флуоресцентная спектрометрия. Анализ элементного состава исследуемых сухих образцов в виде зависимостей интенсивности флуоресценции и концентрации элемента от химического состава образцов был проведен с помощью энергодисперсного рентгенофлуоресцентного спектрометра серии EDX-7000P (Shimadzu, Europa GmbH, Duisburg, Germany). Принцип метода основан на облучении образца рентгеновским излучением. Атомы, находящиеся в составе анализируемых проб, испускают свое характеристическое флуоресцентное излучение, со строго определенной длиной волны и энергией для каждого

элемента. В результате мы получаем спектр, характеризующий качественный элементный состав образца. Измерения интенсивности различных длин волн и энергий дают нам возможность проводить также, количественный анализ, определяя содержание каждого элемента [71]. Технические характеристики:

- **Основная спецификация:** диапазон определяемых элементов ($_{11}\text{Na} - {}_{92}\text{U}$ (EDX-7000P), ${}_6\text{C} - {}_{92}\text{U}$ (EDX-8000P/EDX-8100P); диапазон определяемых концентраций (от долей ppm до 100%); виды анализируемых образцов (твердые тела, жидкости, порошки, пасты, гранулы, фильтры, тонкие пленки, покрытия); размеры образцов (до 300 мм (ширина) x 275 мм (глубина) x 100 мм (высота))
- **Рентгеновские генератор:** Рентгеновская трубка - Rh-анод; напряжение- 4–50 кВ; ток- 1–1000 мкА; охлаждение- воздушное (с помощью вентилятора); облучаемая площадь образца- выбор из 4-х вариантов: круг диаметром 1, 3, 5 или 10 мм; автоматическая смена; первичные фильтры - 5 типов (6 позиций, включая одну позицию без фильтра); автоматическая смена
- **Детектор:** тип- кремниевый дрейфовый детектор (SDD); способ охлаждения - термоэлектрическое охлаждение- термоэлектрическое охлаждение
- **Камера для образцов:** атмосфера анализа- воздух, вакуум¹⁾, гелий He²⁾; смена образца - 12-позиционный автосамплер; наблюдение за образцом - CMOS камера
- **Программное обеспечение:** качественный анализ - измерения/анализ; количественный анализ - метод калибровочных кривых; матричная коррекция; метод фундаментальных параметров (ФП), метод ФП — анализ пленок, метод ФП с учетом фона, скрининг опасных элементов в соответствии с директивой RoHS
- **Требования к установке:** Температура- 10–30°C (максимальный температурный градиент 2°C/час, диапазон колебаний температуры не более 10°C); относительная влажность - 40–70% (без образования конденсата);

электропитание- АС, 100–240 В ± 10%, заземлённая розетка 2 А; Размеры - (Ш) 460 мм x (Г) 590 мм x (В) 360 мм [72].

2.2.8 Спектроскопия НПВО в инфракрасной области

Метод регламентируется ОФС.1.2.1.1.0002.15 Спектрометрия в инфракрасной области. Спектры в инфракрасной области исследуемых образцов, проб, субстанций получали с использованием ИК-спектрометра с Фурье-преобразованием Cary 630 (Agilent Technologies, США) с приставкой НПВО (нарушенного полного внутреннего отражения - attenuated total reflection (ATR)). Система Cary 630 управляется программным обеспечением Agilent MicroLab PC. Технические характеристики:

- Приставка НПВО: наличие алмазного кристалла позволяет без предварительной пробоподготовки проводить анализ отбираемых проб и получать спектры высокого качества.
- Спектральный диапазон: 7000 до 350 см⁻¹
- Спектральное разрешение: <2 см⁻¹
- Получение и анализ спектров: программное обеспечение Resolutions Pro Software.

Подготовка проб для получения спектров проводилась с использованием агатовой ступки, в которой измельчались небольшие навески исследуемых образцов, которые после помещались на алмазный кристалл НПВО. Достижение максимального соприкосновения анализируемых проб и луча, выходящего из алмазного окна приставки, определяли с помощью щелчка от прижимного устройства. Спектры получены в среднем ИК-диапазоне (400 – 4000 см⁻¹)

2.2.9 Определение оптического вращения в растворах объектов исследования

Метод регламентируется ОФС.1.2.1.0018.15 Поляриметрия. Величина угла вращения растворов зависит от природы растворителя и растворенного вещества,

концентрации оптически активного вещества и длины оптического пути по закону Био: $\alpha = [\alpha_D^{20}] \cdot C \cdot l$, где $[\alpha_D^{20}]$ - удельное вращение, $[(^\circ) \cdot \text{мл} \cdot \text{дм}^{-1} \cdot \text{г}^{-1}]$, C – концентрация раствора, г/мл, l – длина оптического пути, дм.

Оптическую активность растворов исследуемых образцов определяли с помощью автоматического поляриметра поляриметре POL-1/2 с внешним модулем Пельтье для термостатирования (Atago Co., LTD, Япония). Технические характеристики:

- Диапазон измерений угла вращения: $\pm 90^\circ$
- Точность измерений: $\pm 0.002^\circ$ при значениях угла $<1^\circ$, и $\pm 0.2\%$ – при значениях $>1^\circ$
- Время одного измерения: 5 секунд
- Диапазон температуры: 0,0 до 99.9 $^\circ\text{C}$
- Толщина кюветы: 1 дм

2.2.10. Метод Spirotox в исследовании индивидуальной и комбинированной токсичности. Исследования концентрационной и температурной зависимости времени гибели клеточного биосенсора

Для оценки биологической активности и токсичности исследуемых образцов был использована клеточная модель *Spirostomum ambiguum* (метод *Spirotox*). Являясь простейшей инфузорией, *Sp. Ambiguum* характеризуется лентообразной, спинной формой тела (длина 1-3 мм). Выбор данного объекта биотестирования объясняется рядом преимуществ: являясь эукариотическими организмами, статистически достоверная чувствительность к токсикантам позволяет сопоставить реакцию простейших с реакцией человека [73]. Находясь в «своей» среде обитания (питательная среда) инфузории отличается высокой подвижностью, свободно передвигаясь по всему объёму среды (рисунок 6).

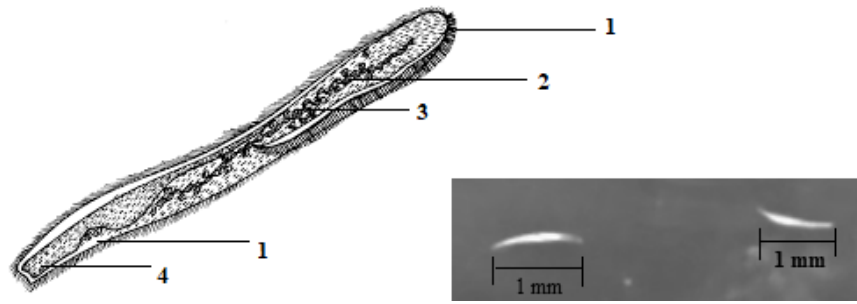


Рисунок 6. Внешний вид *S. Ambiguum*, где 1 – перистом; 2 – большой макронуклеус; 3 -мелкие ядра; 4 -редуцирующая вакуоль [73].

Попадая не в «свою» среду обитания (под механическим и химическим воздействием) инфузория сокращается, меняет траекторию движения, обездвижена. Гибель клетки фиксировали при полном обездвиживании, отсутствием сократительной реакции на раздражении, высвобождением содержимого клетки и разрывом мембраны. Кинетическая схема лиганд-индуцированной гибели *Sp. ambiguum* включает обратимую реакцию с образованием промежуточного продукта ($C \cdot L_n$) и состояние перехода к гибели клеток (DC) (рисунок 7). По аналогии с базовой моделью ферментативной реакции, предложенной Михаэлисом и Ментеном.

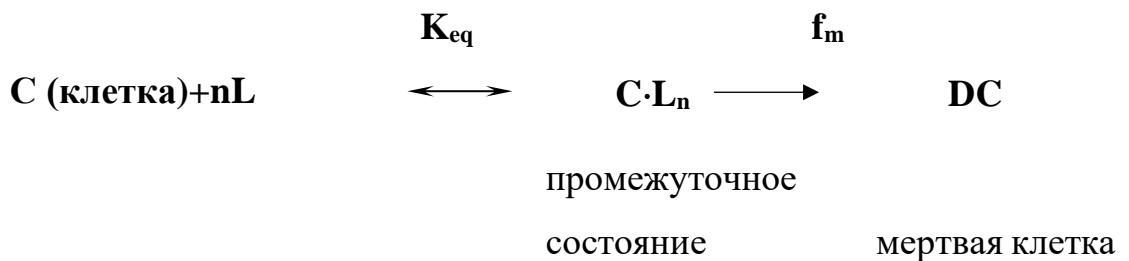


Рисунок 7. Кинетическая схема лиганд-рецепторного взаимодействия *Sp. ambiguum* с ксенобиотиком (L) [74].

Построение и анализ диаграмм концентрация-время жизни («доза-ответ») и графиков зависимости времени жизни инфузории *S. ambiguum* от температуры, были использованы для оценки биологической активности и токсичности исследуемых образцов [75]. Полученные в ходе анализа результаты дают

возможность рассчитать энергию активации процесса клеточного перехода (гибели), не зависящую от состояния культуры клеток и характеризующуюся соответствием с химическим составом исследуемого образца, что, в свою очередь, можно использовать для характеристики токсичности образцов (таблица 4).

Таблица 4. Установка метода Spirotox, включающая следующие блоки:

5-луночная термостатируемая ячейка	термостат – производитель Lauda AlphaA 6	биноккуляр МБС-10	лампа (~ 10 Вт) дневного света
--	--	----------------------	-----------------------------------

Методика. В каждую из лунок 5-луночной термостатируемой ячейки вносили аликвоту исследуемого образца $V \sim 300$ мкл и 3-5 особей тест-культуры, с помощью пипетки с диаметром носика более 1 мм для избежания травматизма инфузорий. За время жизни клетки (t_L) принимали интервал от момента внесения клеток в исследуемый раствор до их гибели, как среднее из 3-5 измерений.

2.2.11 Статистическая обработка результатов

Графическое представление и численный анализ (среднее значение, относительное стандартное отклонение, доверительный интервал) результатов каждого эксперимента были проведены с использованием математико-статистической обработки с помощью программного обеспечения Origin Pro 9.1 (OriginLab Corporation, США).

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Необходимым компонентом обеспечения надлежащего качества лекарственного средства является разработка спецификации, включающей аналитические методики и критерии приемлемости, являющейся частью общей стратегии управления качеством [76]. Понятие «управление качеством» включает: контроль качества исходной субстанции, валидация методики, исследование стабильности и межсерийный контроль. В свою очередь при контроле качества исходной активной фармацевтической субстанции (АФС) указывают свойства, значимые для клинической практики, такие, как pK_a , растворимость, коэффициент распределения октанол/вода ($\log P$), полиморфизм, степень кристалличности, изомерия, распределение частиц по размерам. Исследованиям перечисленных важнейших свойств АФС посвящены многочисленные научные исследования [77]. Помимо перечисленных факторов на фармакологическую активность влияют растворимость, проницаемость через липидный слой мембран, адсорбция, диффузия и др.

Растворимость является одним из важнейших показателей качества АФС, отражающим его физико-химические свойства, высвобождение из лекарственного препарата и, следовательно, эффективность лекарственного средства [78]. Растворимость обуславливает распределение вещества и, следовательно, во многом определяет фармакокинетические свойства лекарственного препарата [79]. Известно, что сродство к воде уменьшается при введении функциональных групп и радикалов в структуру молекулы лекарственного вещества в последовательности: карбоксильная > гидроксильная > альдегидная > кетогруппа > аминная > иминная > амидная > имидная (гидрофильные группы) и алкильная > фенильная (гидрофобные радикалы) [80]. Согласно [81,82,83,84], характеристики растворимости подразделяются на качественные и количественные. Представленная в ГФ РФ XIV общая фармакопейная статья (ОФС) «Растворимость» приводит понятие растворимости в качестве «приблизительной» характеристики и выражается в условных терминах (Таблица 5) [85].

Таблица 5. Условные термины растворимости [85].

Условный термин	Примерное количество растворителя (мл), необходимое для растворения 1 г вещества
Очень легко растворим	До 1 включительно
Легко растворим	От 1 до 10 включительно
Растворим	От 10 до 30 включительно
Умеренно растворим	От 30 до 100 включительно
Мало растворим	От 100 до 1000 включительно
Очень мало растворим	От 1000 до 10000 включительно
Практически нерастворим	Более 10000

Следовательно, введение в фармацевтический анализ и валидация методики количественной оценки (k, c^{-1}) растворения лекарственных субстанций представляет актуальную задачу современной фармацевтической химии. Исходя из этого на кафедре фармацевтической и токсикологической химии медицинского института РУДН была разработана кинетическая методика оценки и определения скорости растворения фармацевтических субстанций с применением фармакопейного метода малоуглового рассеяния лазерного света [86].

В качестве объекта исследования выступила умеренно растворимая в воде (см. Таблицу 5) фармацевтическая субстанции группы фторхинолона моксифлоксацина гидрохлорид ($Mxf HCl$).

3.1. Разработка и валидация методики контроля качества малорастворимой субстанции моксифлоксацина гидрохлорида по показателю «Растворимость» методом статического лазерного светорассеяния

Методика кинетической оценки растворения АФИ заключалась в следующем: в кювету с водой Milli-Q малоуглового измерителя дисперсности (см. Главу 2 рис. 5) вносили навеску порошка субстанции $m=0,0300$ г (точная навеска), исходя из

фармакопейной растворимости субстанции (см. таблицу 5) при постоянном перемешивании с помощью с магнитной мешалки. Момент добавления растворителя в кювету служило временем начала измерения. Результатом уменьшения дисперсности во времени является изменение углового распределения интенсивности рассеяния в зависимости от соотношения $\pi d/\lambda$, где λ – длина волны, d – размер частиц [87, 88]. Исследования растворения продолжали до полного растворения порошка субстанции, которое фиксировали по прекращению изменения во времени регистрируемого параметра лазерного затемнения (рисунок 8).

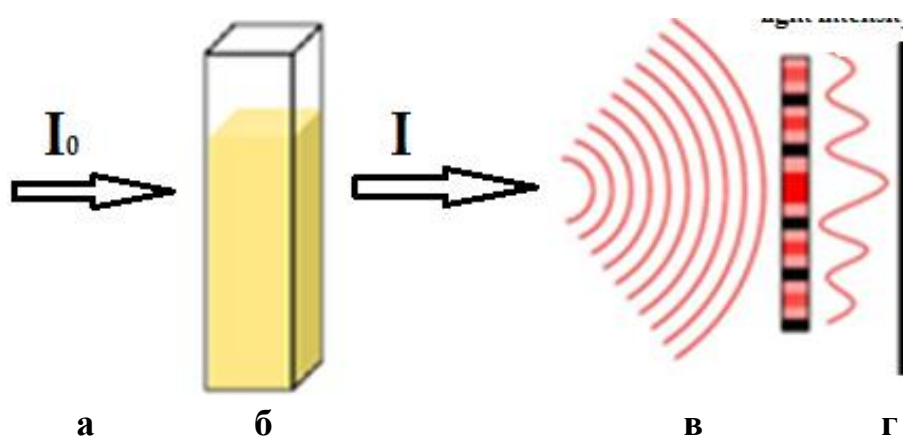


Рисунок 8. Схема LALLS метода для исследования кинетики растворения АФС: (а)—He-Ne лазер (632.8 nm); (б)—измерительная ячейка с диспергированной в растворителе субстанцией; (в)—дифракционная картина; (г)—детектор.

Математически лазерное светозатемнение (*laser obscuration*, LO) может быть представлено выражением [89]:

$$LO = 1 - I/I_0 \cdot 100\% \quad (1)$$

Предварительно проводилось измерения лазерного затемнения фона, в качестве которого послужила бидистиллированная вода; $T = 21^\circ\text{C} (\pm 1^\circ\text{C})$. Общее время одного измерения составило около двух минут от момента внесения навески порошка субстанции в кювету до выхода измеряемого параметра лазерного затемнения на плато (рисунок 9).

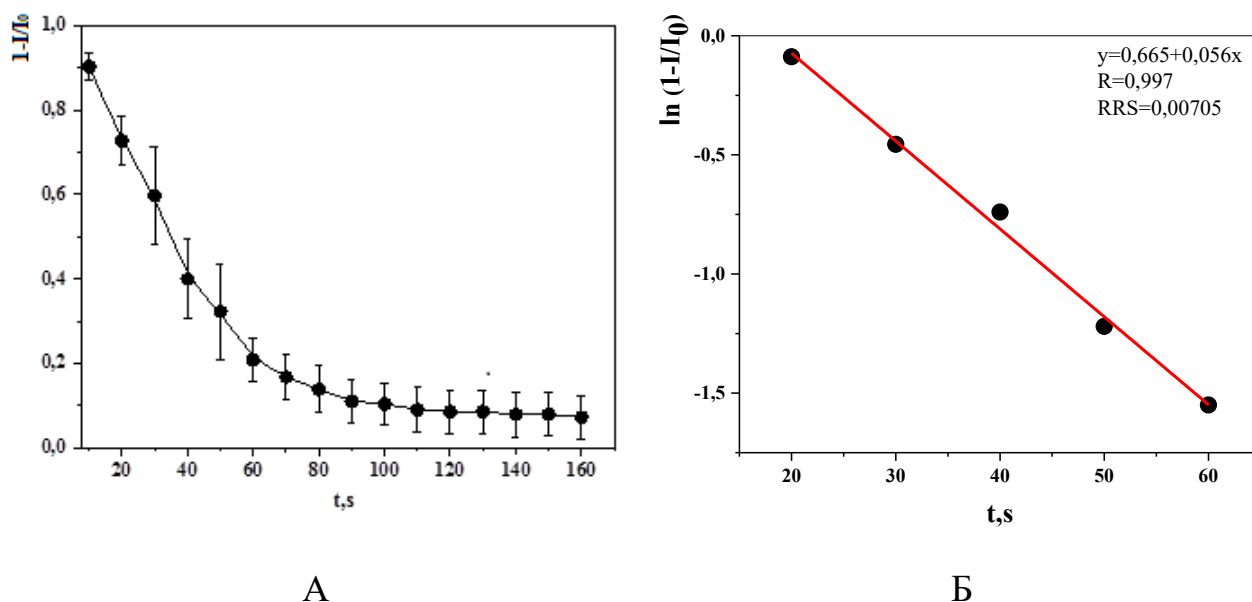


Рисунок 9. Изменение лазерного затемнения (LO) во времени при растворении Mxf·HCl в воде по данным LALLS-метода (n=6, P=0,95) в виде линейной (а) и полулогарифмической (б) зависимости; $C_{\text{суспензии}} = 1 \cdot 10^{-2}$ мг/мл.

Видно, что кинетика растворения Mxf·HCl в воде представляет собой двухстадийный процесс: резкое уменьшение регистрируемого параметра растворимости порошка испытуемой субстанции от начала растворения (первая стадия) сменяется на постепенное снижение величины LO до выхода на плато (вторая стадия), что фиксировалось нами как полное растворение субстанции (см. рисунок 9). Первая стадия является скоростью – определяющей.

Применяя закономерности кинетики первого порядка в описании гетерогенных процессов, нами проведены исследования количественной оценки скорости растворения АФС разных химических и фармакологических классов [90]. 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:

$$V = -\frac{dC}{dt} = kC \quad (2)$$

Интегрируя выражение в пределах $C=C_0$ при $t=0$, получаем:

$$k = \frac{1}{t} \ln \frac{C_0}{C} \quad (3) \quad C = C_0 e^{-kt} \quad (4)$$

Уравнение 4 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 среды.

Прологарифмировав обе части, линейризуем уравнение (4) и используем его для определения растворения АФС, представив результаты экспоненциальных кривых в координатах: $y = \ln 1 - I/I_0$, $x=t$.

Для определения скорости растворения нами рассчитаны значения констант скорости по коэффициенту b уравнения прямой $y=a+bx$, как тангенс угла наклона к оси абсцисс: $k = -\text{tg}\alpha$; $\text{tg}\alpha = -\frac{d(\text{laser obscuration})}{dt}$ (5).

По результатам проведенного исследования и расчетов константа скорости растворения $\text{Mxf} \cdot \text{HCl}$ в воде составила $0,058 \pm 0,003 \text{ c}^{-1}$.

3.2. Валидация в рамках разработки АМ определения скорости растворения Mxf HCl методом лазерной дифракции

Разработка и дальнейшее внедрение новой аналитической методики сопровождаются валидационными испытаниями, позволяющими подтвердить ее пригодность для целевого назначения [91]. Валидация аналитической методики является обязательным процессом при внедрении новой методики, а также в случае изменения условий анализа [92]. Нами проведена оценка пригодности аналитической методики (АМ) с использованием фармакопейного метода для определения скорости растворения лекарственной субстанции группы фторхинолонов в воде на примере моксифлоксацина гидрохлорида по следующим параметрам: повторяемость/сходимость (*repeatability*), внутрилабораторная/промежуточная прецизионность (*intermediate precision*), линейность (*linearity*), аналитическая область (*range*).

3.2.1. Повторяемость (прецизионность внутри методики)

Оценка повторяемости проведена нами в условиях шести независимых результатов измерений константы скорости растворения $Mxf \cdot HCl$ в одной лаборатории, одним методом, на одном оборудовании, в пределах короткого промежутка времени (рисунок 10). Результаты оценки повторяемости представлены, также, в виде табличных значений коэффициента вариации, величины дисперсии, доверительного интервала и стандартного отклонения (таблица 6).

Таблица 6. Оценка повторяемости (*repeatability*) АМ (n=6, P=0,95, f=5) АМ.

k, c^{-1}	\bar{k}, c^{-1}	SD	S^2	RSD, %	$(\bar{k} \pm \Delta\bar{k}), c^{-1}$ $t_{p, f} = 2,57$ при $P=0,95, n=6, f=5$
0,055; 0,061; 0,061; 0,057; 0,058; 0,053	0,058	$3,1 \cdot 10^{-3}$	$9,6 \cdot 10^{-6}$	5,3	$0,058 \pm 0,003$

Результаты статистической обработки свидетельствуют о достоверности полученных результатов при доверительной вероятности 95%: рассчитанное значение коэффициента вариации (RSD) меньше 10%, следовательно, степень рассеивания результатов измерений незначительная [93].

На основании оценки повторяемости аналитической методики проведены исследования внутрилабораторной прецизионности (*precision*).

3.2.2. Прецизионность внутрилабораторная (промежуточная)

Прецизионность (*precision*), как выражение близости результатов между сериями измерений, была оценена нами при проведении испытаний внутри лаборатории в разные дни на идентичных образцах одной серии $Mxf HCl$ (таблица 7).

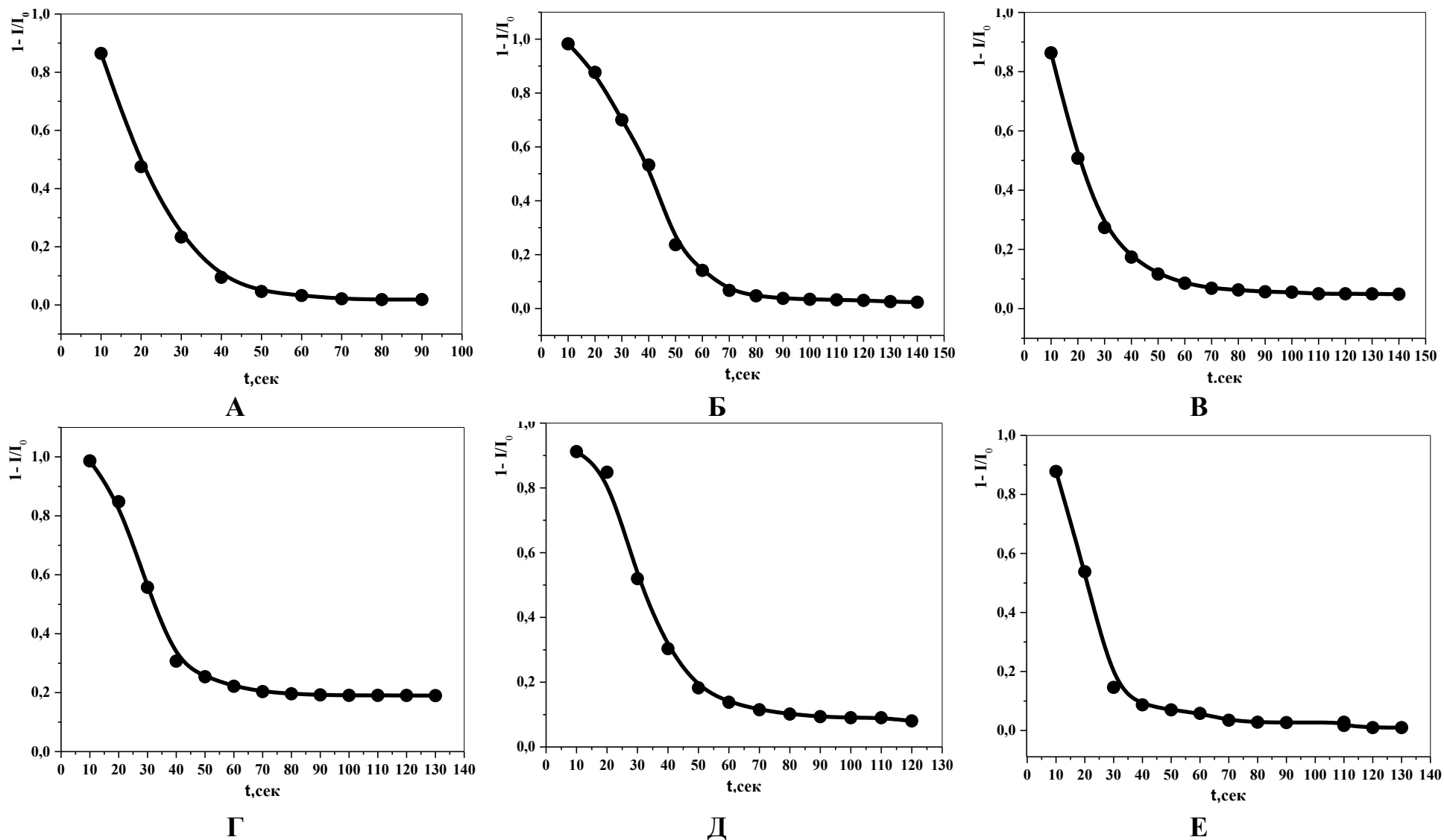


Рисунок 10. Изменение лазерного затемнения во времени при растворении $Mxf \cdot HCl$ в воде по данным LALLS-метода ($n=6$ (A-E), $P=0,95$) в условиях оценки повторяемости АМ.

Таблица 7. Оценка прецизионности внутрилабораторной.

Прецизионность (<i>precision</i>) АМ (n=18, P=0,95, f=17)						
k, c^{-1}	\bar{k}, c^{-1}	SD	S^2	RSD, %	$(\bar{k} \pm \Delta\bar{k}), c^{-1}$	$\bar{\varepsilon}, \%$
					$t_p, f = 2,57$	
0,055; 0,061; 0,061 0,057; 0,058; 0,053 0,055; 0,059; 0,065 0,052; 0,058; 0,053 0,055; 0,060; 0,051 0,057; 0,050; 0,053	0,057	$4,7 \cdot 10^{-3}$	$2,3 \cdot 10^{-5}$	8,3	$0,057 \pm 0,002$	4,1

Как показывают результаты, коэффициент вариации составил 8%, относительная ошибка среднего – 4%. Это доказывает пригодность разработанной АМ определения скорости растворения фармацевтической субстанции моксифлоксацина гидрохлорида, основанной на малоголовом рассеянии лазерного света [93].

3.2.3. Линейность и аналитическая область

Линейность, как прямую зависимость регистрируемого сигнала лазерного затемнения от концентрации в пределах аналитической области подтверждали приготовлением отдельных (модельных) навесок $Mxf\ HCl$ с использованием разработанной АМ. Для установления линейности готовили растворы $Mxf\ HCl$ шести концентраций, исходя из данных по фармакопейной растворимости ФС в воде (0,01 г/мл). Линейность оценивали визуально по зависимости величины лазерного затемнения от концентрации (рисунок 11).

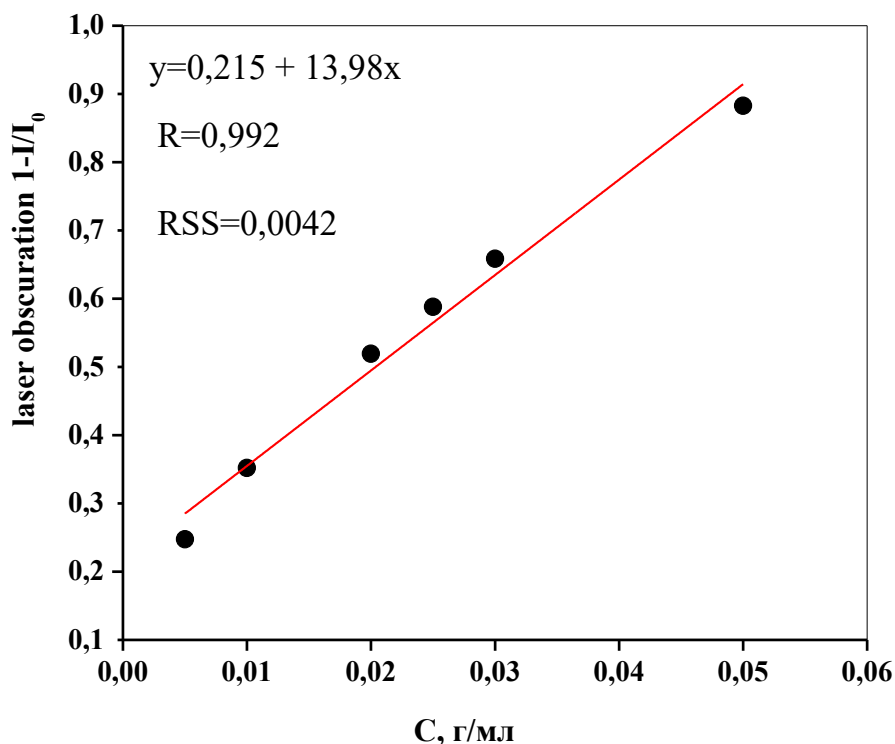


Рисунок 11. Зависимость величины лазерного затемнения от концентрации растворов $Mxf \cdot HCl$.

Аналитическая область, как диапазон применения АМ, определена нами при анализе линейности и составила от $5 \cdot 10^{-3}$ г/мл до $5 \cdot 10^{-2}$ г/мл. Для подтверждения линейности и аналитической области представлены статистические показатели: коэффициент корреляции ($R > 0,99$), остаточная сумма квадратов отклонений ($RSS = 0,0042$), свободный член регрессии ($a = 0,215$), тангенс угла наклона линии регрессии ($b = 13,98$) (см. рисунок 11).

3.3. Кинетический изотопный эффект растворения

Согласно [94] более 60% ЛВ-кандидатов, находящихся на стадии разработки, мало и очень растворимы в воде, следовательно, относятся к III и IV классу БКС [96]. В связи с чем актуальна разработка и внедрение новых технологических подходов повышения их растворимости и растворения для улучшения биофармацевтических характеристик. С этой целью нами предложена оригинальная методика, основанная на применении в качестве среды растворения воды с пониженным, по отношению к природному уровню, содержанием тяжелого

изотопа водорода H_1^2 (deuterium depleted water, ddw, «легкая» вода). Используя преимущества LALLS метода, такие, как непрерывный контроль за процессом растворения при регистрации во времени величин LO, высокая повторяемость и быстрота анализа – мы применили данный метод для исследования кинетического изотопного эффекта (КИЭ) по растворителю в растворах малорастворимых лекарственных субстанций.

Вода ddw – признанный растворитель-адыювант в фармакокинетических/фармакодинамических исследованиях в области медицины и фармацевтической химии [95]. На рисунке 12 представлены кинетические кривые, демонстрирующие различия в скорости снижения лазерного затемнения (LO) в водных растворах Mxf HCl с природным (около 145 ppm) и пониженным (4 ppm) содержанием H_1^2 , соответствующие сверхчистой бидистиллированной воде (BD) и воде ddw.

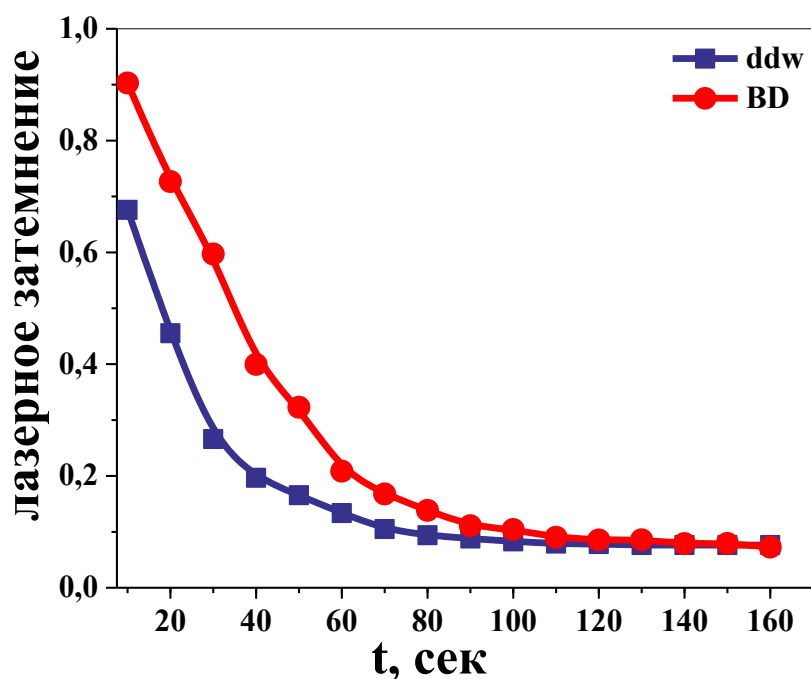


Рисунок 12. Зависимость величины лазерного затемнения (laser obscuration) от времени при растворении в воде моксифлоксацина гидрохлорида в воде, обедненной по дейтерию, в прямых (А) и полулогарифмических координатах (В) (n=6, P=0,95).

Обе кинетические кривые демонстрируют экспоненциальное уменьшение во времени величины LO с линейным участком в начальный момент времени. Однако дифференциальный подход к анализу кинетических кривых по методу тангенсов показал, что стадия растворения $Mxf \cdot HCl$ в воде ddw протекает в 3,5 раза быстрее в сравнении со сверхчистой водой (BD) (Таблица 8).

Таблица 8. Константы скорости и наблюдаемый КИЭ субстанции $Mxf HCl$ в воде с различным изотопным составом по водороду ($n=6, P=0,95$).

Содержание H_1^2	$(k \pm SD) \cdot 10^2, c^{-1}$	$\Delta k \cdot 10^2$ $t_p, f = 2,78, P=0,95 n=5, f=4$	k_H/k_D
145	1.20 ± 0.14	0.17	3.5
4	4.24 ± 0.2	0.25	

Полученные результаты указывают на значительную роль соотношения дейтерий/протий (D/H) в растворении лекарственной субстанции с среде растворения [96]. Известно, что снижение концентрации H_1^2 приводит к изменению физико-химических свойства воды, что свидетельствует об "управляющей" функции «тяжелых» HOD и DOD молекул воды [97, 98]. Особенности свойств воды с вариациями D/H может приводить к изменению длин и энергии связей между атомами вещества и растворителя, валентных углов и эффективных зарядов, поляризации, гидратации и, следовательно, энергии, необходимой для разрушения связи R—H и R—D на лимитирующей стадии реакции. Согласно полученным результатам, при обеднении воды H_1^2 развивается *нормальный* кинетический изотопный эффект (*n*КИЭ) при ($k_H/k_D > 1$). Следовательно, модификация растворителя стабильными изотопами водорода выступает в качестве средства управления свойствами образующихся растворов.

Концепция растворения субстанции в воде (с вариациями D/H), включающего прохождение стадии образования переходного/активированного комплекса (АК), представлена на рисунке 13.



Рисунок 13. Схема растворения лекарственного вещества в воде с вариациями H_1^2 (на примере $\text{Mxf} \cdot \text{HCl}$).

Гетеролитический процесс растворения частиц дисперсной фазы сопровождается образованием активированного комплекса. При этом сольватные оболочки исходного состояния частиц дисперсной фазы и оболочки активированного комплекса претерпевают существенную перестройку. Согласно теории активированного комплекса (ТАК), разработанного Эйрингом и Поляни, константа скорости реакции связана со свойствами переходного состояния, а скорость реакции равна скорости распада комплекса [99,100]. Согласно теории ТАК константа скорости реакции связана со свойствами переходного состояния, а скорость реакции равна скорости распада комплекса и, следовательно, времени, необходимого для прохождения переходного состояния системы [101].

$$\frac{k_H}{k_D} = e^{-\frac{E_a^H - E_a^D}{RT}} \quad (6)$$

Замена протия на тяжелый изотоп - дейтерий должна замедлять реакцию, что продемонстрировано нами на примере растворения $\text{Mxf} \cdot \text{HCl}$. Мы предполагаем, что в воде, обедненной дейтерием, процесс гидратации (см. рисунок 13) молекулами протия значительно облегчается, в отличие от молекулярных стабилизированных водных кластеров сверхчистой воды, содержащих смесь изотопов воды. Обычно замена протия на дейтерий приводит к снижению скорости реакции в 3-8 раз [102]. В нашем случае удаление дейтерия из среды растворения привело к увеличению скорости растворения плохо растворимых лекарственных средств в 3,5 раза (таблицу 8).

На увеличение скорости растворения влияют, также, физико-химические свойства веществ, в том числе растворимость, рН, рКа и липофильность, определяющие основные механизмы поступления и распределения лекарств *in*

vivo. [103]. Проникновение через эпителиальную мембрану кишечника напрямую зависит от липофильности препарата, а характер распределения и проникновения через биологические барьеры зависит от его растворимости. Для объяснения наблюдаемого кинетического изотопного эффекта при растворении $MxI HCl$ нами проведено ранжирование значений $\log P_{oct-w}$ для субстанций разных фармакологических и химических классов в порядке увеличения их водной растворимости (рисунок 14).

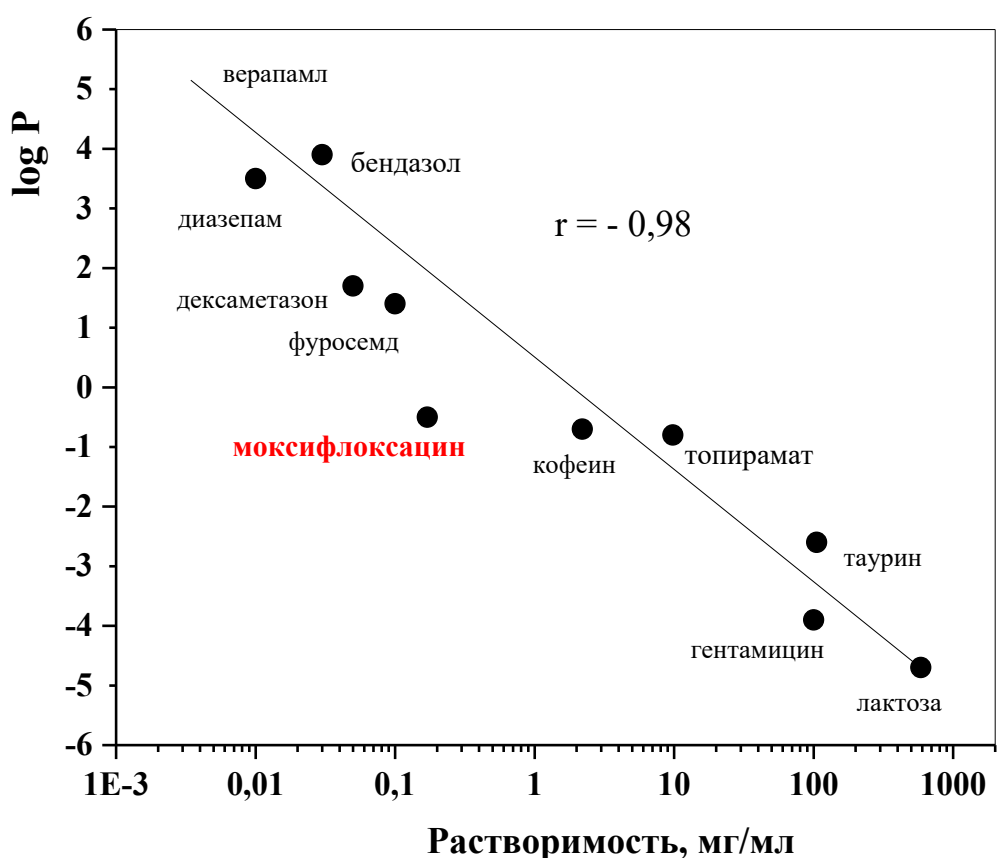


Рисунок 14. Взаимно–однозначные соответствия: $\log P_{oct-w}$ – растворимость (мг/мл) для субстанций разных химических и фармакологических классов.

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

3.4. Определение спектральных характеристик Mxf·HCl для разработки методик определения подлинности и содержания действующего вещества

Учитывая способность фармацевтической субстанции моксифлоксацина г/хл умеренно растворяться в воде (см. таблицу 5), в терапии бактериальных инфекций изготавливаются и применяются водные растворы Mxf·HCl с содержанием действующего вещества до 1 г на 100 мл раствора. В связи с возможностью применения фторхинолонов (ФТХ) по новым показаниям [104] актуальны разработки, направленные на новые, экспрессные и доступные способы определения их подлинности и содержания действующего. Для этого и в дополнение к основным результатам, посвященным изучению дисперсных свойств фармацевтической субстанции Mxf·HCl, нами были применены фармакопейные методы: ультрафиолетовая спектрофотометрия (УФ-СФ), спектрофлуориметрия (СФ).

3.4.1 Методика определения подлинности и содержания действующего вещества в ЛС, содержащих Mxf·HCl, методом УФ-СФ и СФ

Для разработки методики оценки подлинности нами была приготовлена и исследована серия водных растворов Mxf·HCl в диапазоне концентраций от 0,5 мкг/мл до 20 мкг/мл. Спектры водных растворов Mxf·HCl получали в интервале от 250 нм до 350 нм (рисунок 15). В качестве среды сравнения использовали воду бидистиллированную.

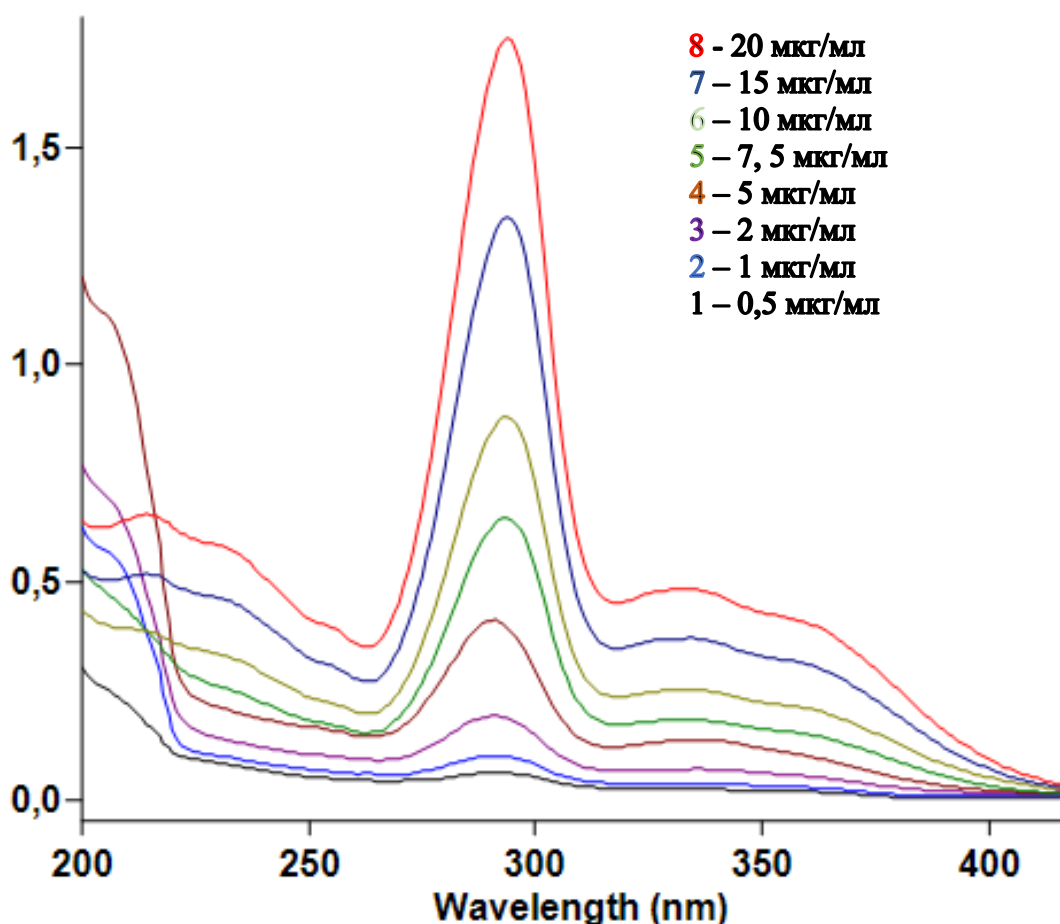


Рисунок 15. Спектры поглощения водных растворов $Mxf \cdot HCl$ различных концентраций ($n=3$, $P=0,95$).

Сложная сопряженная структура $Mxf \cdot HCl$ обуславливает интенсивное поглощение в ультрафиолетовой области с формированием максимума поглощения при 291 нм, при переходе к более низкому разведению наблюдается смещения максимума поглощения в область 294 нм.

Для подтверждения выполнения закона Бугера-Ламберта-Бэра, нами построена калибровочная зависимость абсорбции от концентрации водных растворов $Mxf \cdot HCl$ (рисунок 15).

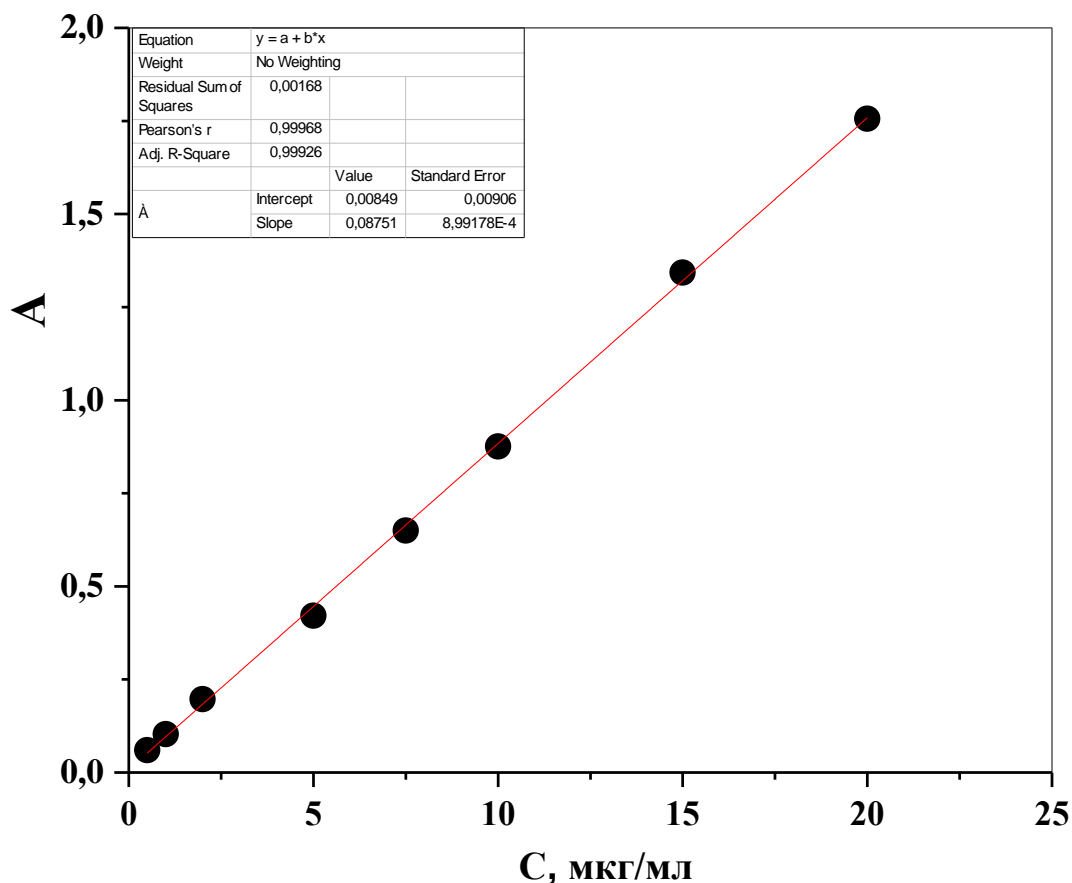


Рисунок 15. Зависимость абсорбции от концентрации водных растворов $Mxf \cdot HCl$ (калибровочная прямая) ($n=3^*$, $P=0,95$).

* Q тест применен нами при $n=3$, так как в основе лежит модель Бугера-Ламберта-Бера

Для подтверждения линейности $y=a+bx$ представлены: коэффициент корреляции (*Pirson's coefficient*) $R=0,99968$, свободный член регрессии (отрезок, отсекаемый на оси ординат прямой/intersept) $a=0,00849$ (см рисунок 15). Полученные графические результаты и математическая обработка свидетельствуют о строгой прямой зависимости «A-C,мкг/мл» и подтверждают выполнение закона Бугера-Ламберта-Бэра.

На основании полученных результатов нами были рассчитаны значения удельного и молярного коэффициентов экстинкции согласно формулам (Таблица 9):

$$E_{1\text{ см}}^{1\%} = \frac{A}{c \cdot l} \quad (7)$$

$$\epsilon = \frac{E_{1\text{ см}}^{1\%} \cdot M}{10} \quad (8),$$

Где $E_{1\text{ см}}^{1\%}$ – удельный коэффициент поглощения раствора ($100\text{мл}\cdot\text{г}^{-1}\cdot\text{см}^{-1}$), A – оптическая плотность, безразмерная величина, c – концентрация раствора, $\text{г}/100\text{мл}$, l – толщина светопоглощающего слоя, см ; ϵ – молярный коэффициент поглощения раствора, $\text{л}\cdot\text{моль}^{-1}\cdot\text{см}^{-1}$, M – молярная масса определяемого вещества, $\text{г}/\text{моль}$.

Таблица 9. Спектральные характеристики водных растворов $\text{Mxf}\cdot\text{HCl}$ разной концентрации ($n=3$).

№	C , $\text{мкг}/\text{мл}$	\bar{A}	$\bar{\lambda}_{\text{max}}$, нм	$E_{1\text{ см}}^{1\%}$, $100\text{ мл}\cdot\text{г}^{-1}\cdot\text{см}^{-1}$	$\epsilon_{1\text{ см}}^{1\text{ моль}/\text{л}}$, $\text{л}\cdot\text{моль}^{-1}\cdot\text{см}^{-1}$
1	0,5	0,060	291	1200	52548
2	1	0,103	291	1030	45103
3	2	0,197	291	985	43133
4	5	0,421	292	842	36871
5	7,5	0,650	293	866	37922
6	10	0,876	294	876	38360
7	15	1,343	294	895	39192
8	20	1,756	294	878	38447

Как следует из представленных табличных данных, наблюдается смещение аналитической длины волны от 291 нм (в области высоких разведений от 0,05 до 0,2 $\text{мкг}/\text{мл}$) до 294 нм (в области низких разведений от 10 до 20 $\text{мкг}/\text{мл}$). Разброс значений удельной абсорбции в области высоких разведений в пределах 23% ($\bar{x} \pm \Delta\bar{x} = 1014 \pm 235$).

При концентрации выше 0,5 $\text{мкг}/\text{мл}$ отклонения в значениях удельной абсорбции - в пределах 2% ($\bar{x} \pm \Delta\bar{x} = 879 \pm 19$), следовательно, в интервале концентраций от 7,5 $\text{мкг}/\text{мл}$ до 20 $\text{мкг}/\text{мл}$. (см рисунок 15). Рассчитанное значение удельной абсорбции можно использовать при идентификации $\text{Mxf}\cdot\text{HCl}$ группы ФТХ методом УФ-СФ.

В качестве практического применения разработанной нами методики определения концентрации $Mx_f \cdot HCl$, была использована ЖЛФ глазные капли: «Оптик» (см. главу 2.2.1). Для УФ-СФ исследований исходная ЖЛФ была разведена в 500 раз для получения 0,001% (10мкг/мл) р-р. Основываясь на калибровочной зависимости нами были получены следующие результаты: при $A=1,01$, $C=12,5$ мкг/мл (0,00126%), $E_{1cm}^{1\%} = 879$ ($100 \text{ мл} \cdot \text{г}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$). На основании закона Бугера-Ламберта-Бера нами были рассчитана концентрация ЖЛФ р-ра моксифлоксацина гидрохлорида – 0,5 % глазных капель, она составила 0,575 % (0,50% - прописано). Известно, что в 5 мл 0,50% раствора содержится 0,025 г АФИ, при НДО – 15%, интервал составляет [0,02125 до 0,02875]. Следовательно, в 5 мл 0,575% раствора содержится 0,02872г АФИ, что соответствует требованиям НД.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о возможности применения метода УФ-СФ как для определения подлинности, так и для определения содержания действующего вещества лекарственных веществ группы фторхинолонов.

Спектрофлуориметрия. Благодаря сложной структуре, большинство фторхинолонов обладают собственной флуоресценцией. Имея в составе молекулы сопряженные π -электронные системы, фторхинолоны, с одной стороны, обладают способностью к фотолюминесценции, с другой – особенно содержащие фтор – при использовании в клинической практике могут вызывать фототоксические реакции в организме человека [105]. Спектроскопические методы, основанные на измерении флуоресценции, широко применяются в химическом анализе для определения подлинности, концентрации, для исследований стабильности растворов и механизмов взаимодействия на молекулярном уровне [70]. Для разработки методики качественного анализа ЛС, содержащих субстанцию $Mx_f \cdot HCl$, применяли метод спектрофлуориметрии (СФ). С этой целью готовили водные растворы субстанции, для которых наблюдается прямая зависимость интенсивности флуоресценции от концентрации: 0,8 мкмоль/л - 46 мкмоль/л. (рисунок 16) [106]. Спектры флуоресценции, водных разведений $Mx_f \cdot HCl$, регистрировали при их собственной длине волны возбуждения.

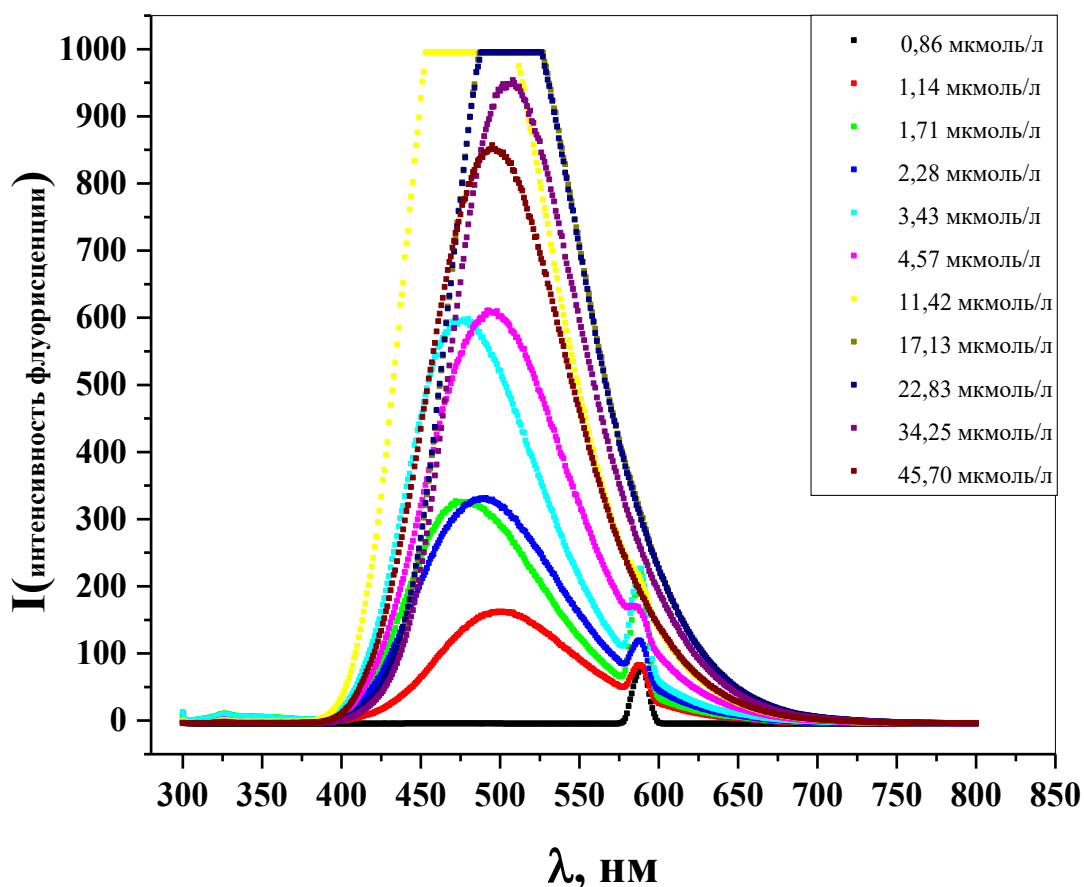


Рисунок 16. Спектры флуоресценции водных растворов $Mxf \cdot HCl$ различных концентраций ($n=3$, $P=0,95$).

Водные растворы $Mxf \cdot HCl$ дают интенсивную ($\lambda=486$ нм) и малоинтенсивную ($\lambda=580$ нм) флуоресценцию при длине волны возбуждения $\lambda_{max}=291$ нм (см. рисунок 16). Продемонстрировано соблюдение закона Стокса-Ломмеля, согласно которому спектр флуоресценции всегда сдвинут в сторону более длинных волн, по сравнению со спектром поглощения того же вещества (см. главу 3.4.1). Анализ спектров показал, что при $C \geq 17,13$ мкмоль/л происходит снижение интенсивности флуоресценции, что указывает на «пороговую» концентрацию. При $C=34,25$ мкмоль/мл мы наблюдаем концентрационное тушение флуоресценции, причина которой, может быть, заключена в возрастании числа столкновения частиц и вероятности безизлучательной потери возбужденными молекулами

Основываясь на полученных результатах нами построена зависимость « I (интенсивность флуоресценции) - C , моль/л» всего концентрационного диапазона и прямого концентрационного диапазона (рисунок 17).

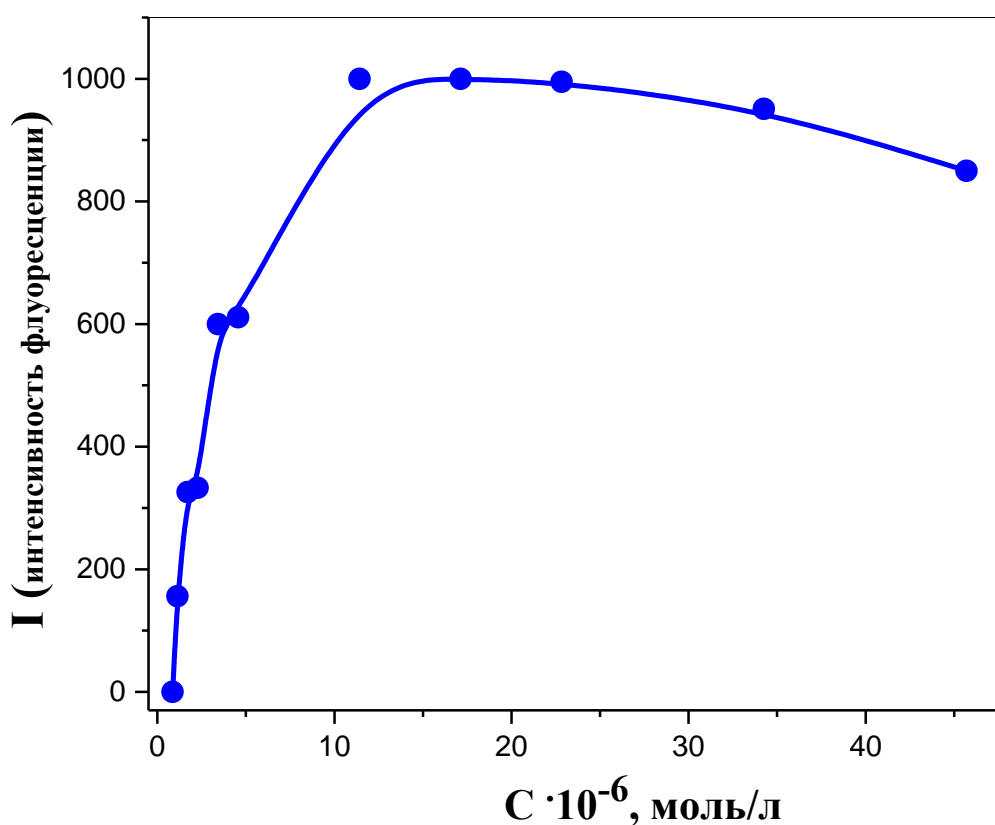


Рисунок 17. Зависимость « I (интенсивность флуоресценции) - C , моль/л» в широком концентрационном диапазоне.

На рисунке 17 мы наблюдаем наличие прямой зависимости между интенсивностью флуоресценции и концентрации вещества в растворе вплоть до 10 мкмоль/л, следовательно, линейная зависимость реализуется в интервале концентраций от 1,14 мкмоль/мл до 4,57 мкмоль/мл. Отсутствие прямой зависимости от 10 мкмоль/л демонстрирует отклонение от закона Вавилова ($\phi = \text{const}$, если $\lambda_{\text{abs}} < \lambda_{\text{lm}}$) и значительное превышение величины интенсивности флуоресценции $I \geq 1000$ (a.u.).

Таким образом, СФ является весьма перспективным методом в силу его точности и экспрессности, полученный спектр флуоресценции может быть использован для идентификации лекарственных веществ группы фторхинолонов.

3.5. Разработка подходов для стандартизации и контроля качества биологически активных веществ природного происхождения – гуминовых (ГК) и фульвокислот (ФК)

Известно, что гумусовые вещества (ГВ) представляют собой сложные гетерогенные, полидисперсные системы, образующиеся в результате гумификации в почвах и природных водах в процессе разложения остатков растений [107]. Гумусовые вещества извлекают из почвы в виде щелочных растворов, далее они разделяют на фракции гуминовые (ГК) и фульвовые кислоты (ФК), основываясь на различной растворимости в воде [108]. Гумусовые вещества характеризуются специфичностью структуры, состава и свойств в зависимости от условий их формирования [109,110] Однако, ГВ не имеют постоянной химической структуры, что объясняется хаотичностью процессов гумификации [111,112].

Обзорные публикации описывают разнообразные биологические свойства гумусовых кислот [113]. Литературные данные создают предпосылки для создания новых биологически активных веществ в основе природных полиэлектролитов гумусовых кислот. Несмотря на это, применение препаратов на основе гуминовых веществ проблематично, вследствие отсутствия зарегистрированных лекарственных средств на их основе, что связано со сложностью проведения их стандартизации.

Таким образом стандартизация гуминовых и фульвовых кислот с использованием физико-химических, биологических методов актуально для современной фармации.

3.5.1. Оптимизация методики определения потери в массе при высушивании образцов ГК и ФК

Нами проведено испытание на определение сухого остатка после высушивания образцов ГК и ФК до постоянной массы, так как сухой остаток дает более подробное представление о химическом составе исследуемого вещества,

также, дает возможность провести сравнение образцов во схожими физико-химическими свойствами (рисунок 18).

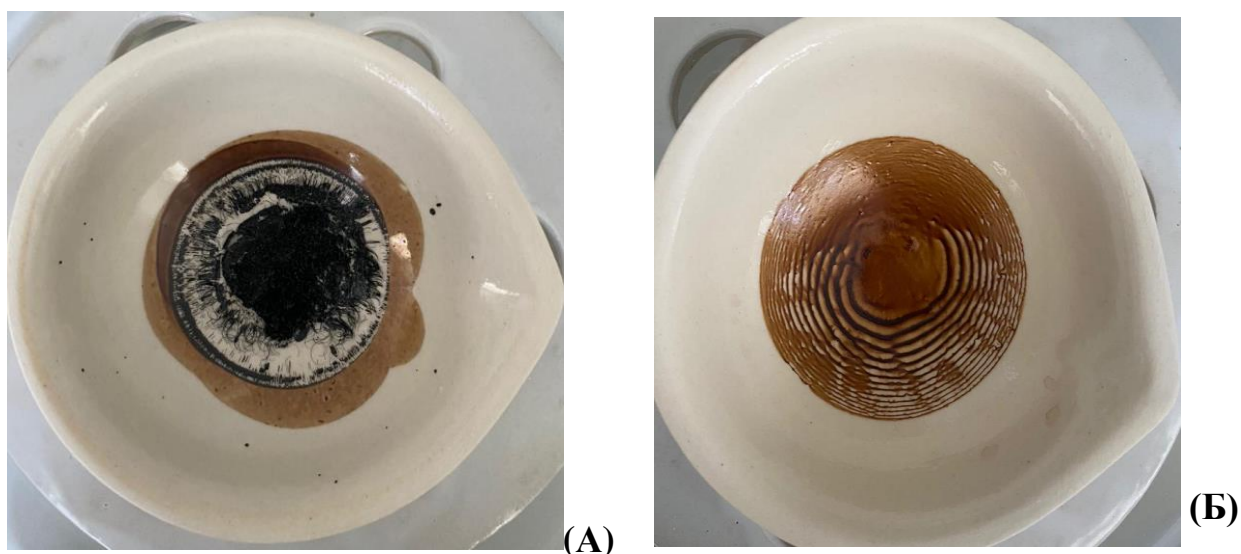


Рисунок 18. Сухой остаток образцов гуминового комплекса (А) и фульвовой кислоты (Б).

Определение сухого остатка ГК и ФК при высушивании проводили согласно ОФС.1.2.1.0010.15 “Потеря в массе при высушивании”. Для этого точно отмеренную навеску исследуемого образца помещали в фарфоровую чашку, предварительно высушенную и доведённую до постоянной массы. Высушивание проводили при $105 \pm 5^\circ\text{C}$ в течение 6 часов в сушильном шкафу BINDER FD (Germany), с поддержанием постоянной, равномерной температуры во всем объеме камеры (см. главу 2.2.3) [114]. Масса чашки определялась и записывалась нами каждый час, при извлечении фарфоровой чашки, с учетом остывания чашки в течении 30 минут. Потери в массе при высушивании (%) рассчитывали в соответствии с таблицей 10 и следующим выражением:

$$w = \frac{m_2 - m_3}{m_2 - m_1} \cdot 100\%, \quad (9)$$

где m_1 – постоянная масса чашки (г); m_2 – масса чашки с испытуемым образцом перед сушкой (г); m_3 – масса мерного стакана с испытуемым образцом после сушки (г).

Таблицей 10. Определение потери в массе при высушивании образцов экстракта гуминовых веществ и фульвовой кислоты.

Экстракт гуминовых веществ (ГК)				
Время, ч	m₁, г	m₂, г	m (испытуемая жидкая субстанция) г	Потеря в массе при высушивании, (%)
0	118,6004	127,2238	8,6234	
1		119,2702	0,6698	
2		119,2473	0,6469	
3		119,2411	0,6407	
		m₃, г		
4		119,2362	0,6358	
5		119,2362	0,6358	
6		119,2362	0,6358	
				92,63
Фульвовая кислота (ФК)				
Время, ч	m₁, г	m₂, г	m(испытуемая жидкая субстанция) г	Потеря в массе при высушивании, %
0	115,3210	120,1194	4,7984	
1		115,3398	0,0188	
2		115,3391	0,0181	
3		115,3387	0,0177	
		m₃, г		
4		115,3371	0,0161	
5		115,3371	0,0161	
6		115,3371	0,0161	
				99,66

Результатом испытаний стало определение сухого остатка – $7,34 \cdot 10^{-2}$ г/мл и $3,36 \cdot 10^{-3}$ г/мл, а также потери в массе за счет воды и летучих веществ, которая составила 92,63% для ГК и 99,66% для ФК, соответственно. Таким образом, образцы ГК и ФА отличаются друг от друга содержанием растворимых соединений и сухого остатка.

3.5.2. Исследование морфологии (дисперсности) частиц ГК и ФК

Микроскопические методы. Поскольку размер кристаллов твердого вещества, а также их форма и пространственная организация являются индивидуальными характеристиками образца, нами проведены исследования морфологии и распределения частиц сухих образцов, невидимых невооруженным глазом, с применением оптической и портативной микроскопии, поскольку форма, окраска и размер кристаллов твердого вещества являются его индивидуальными характеристиками [115]. Определение размера, формы и гранулометрического состава сухого остатка в образцах экстракта ГК и ФК проводили с использованием микроскопа со специальной бинокулярной насадкой (Altami BIO 2, Russia) с увеличением 10X (поле зрения линейное 20 миллиметров), (см. главу 2.2.4). Предварительно проводили калибровку с помощью объекта-микрометра со шкалой 1DIV=0,01мм. Частицы наблюдали в отдельных полях зрения. На микроскопических снимках измеряли длину и определяли форму частиц с помощью программы “Altami Studio 3.3” [116].

Структуру поверхности порошкообразных веществ, полученных после высушивания образцов экстракта ГК и ФК, исследовали с помощью портативного USB digital microscope LX200 (Levenhuk DTX 50, USA) для определения размеров объектов от 1 до 50 мкм [117]. Микроскоп оснащен встроенной цифровой 1,3-мегапиксельной камерой, подключенной к компьютеру. Преимуществом цифрового микроскопа является экспресс-диагностика участков образца большой площади без проведения пробоподготовки. Анализ структуры, рельефа и дефектов слоев, прилегающих к поверхности, позволило нам провести идентификацию исследуемых объектов (рисунок 18). Визуализация сложной упорядоченной морфологии приповерхностного слоя требует дополнительных передовых методов микроскопии. В связи с чем нами выполнены, также, исследования приповерхностного слоя в исследуемых дисперсных образцах методом сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) (рисунок 19 (д) (к)).

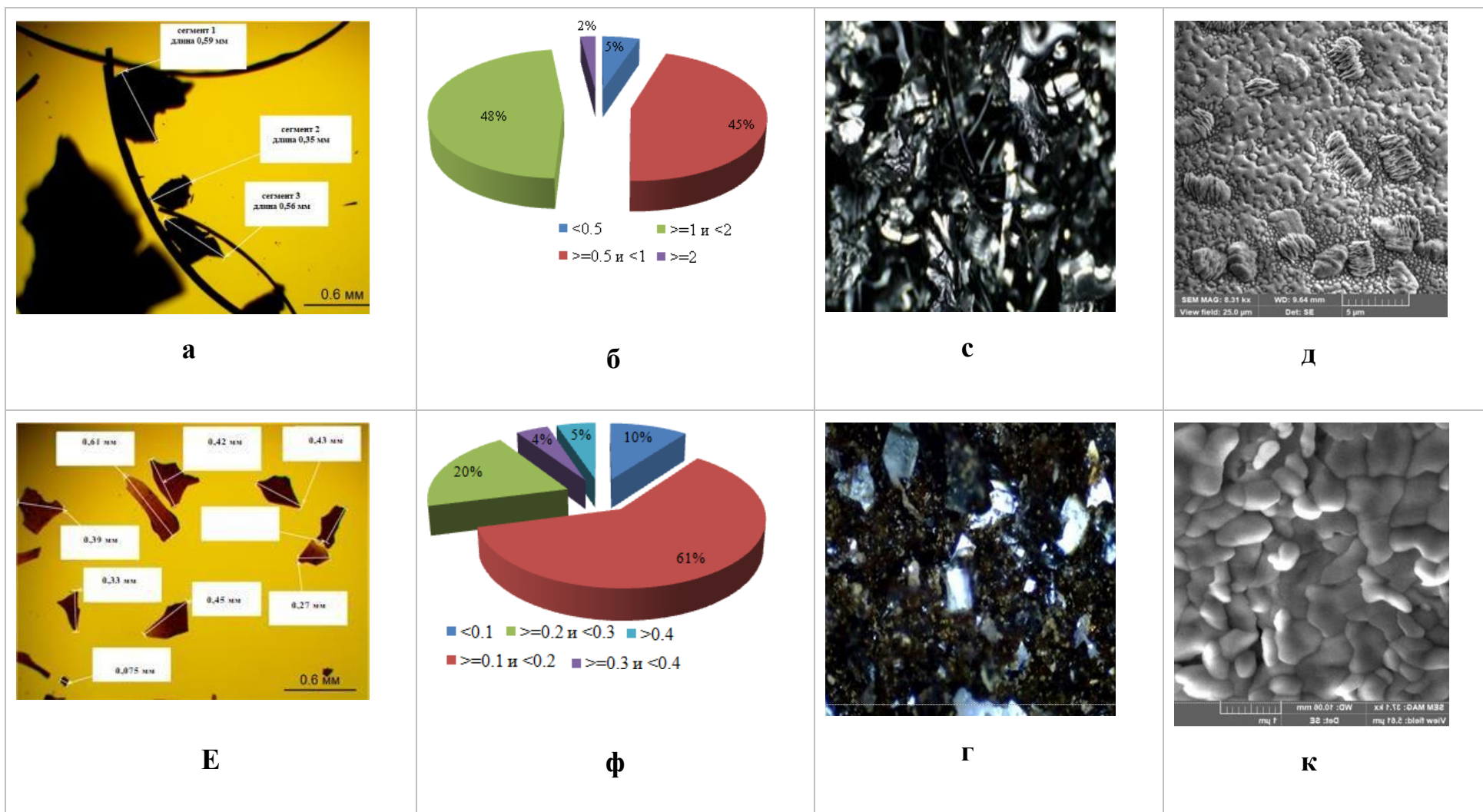


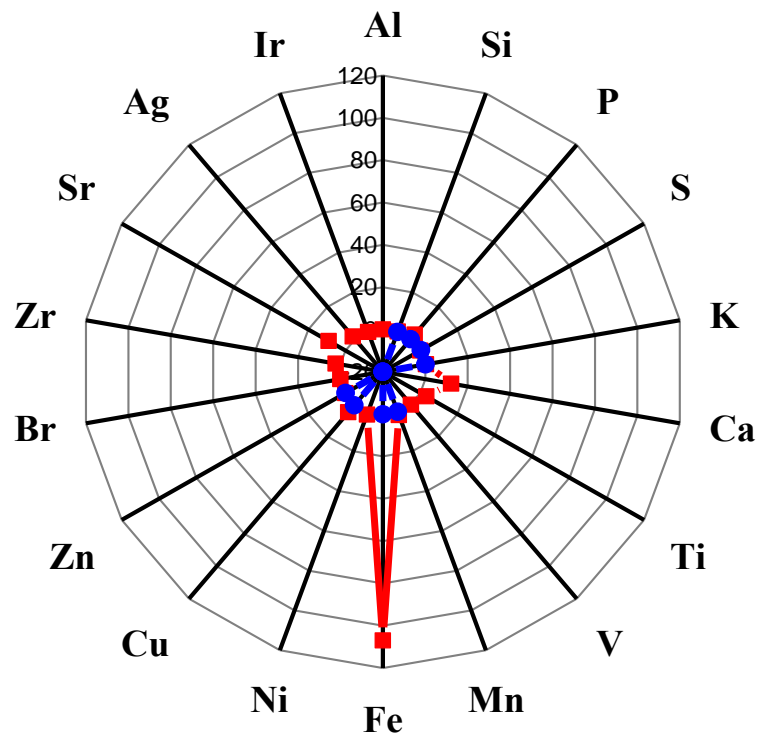
Рисунок 19. Морфология, гранулометрическое распределение и СЭМ частиц в высушенных образцах: (а), (б), (с), (д) - ГК; (е), (ф), (г), (к) - ФК.

Исходя из полученных результатов, мы можем наблюдать (см. рис. 19 а и б), что в образце ГК присутствует несколько минеральных фаз с разной формой частиц и размерами от 0,5 до 2 мм (кристаллы, осколочные частицы, сложные агломераты, протяженные линейные структуры), большая доля которых 48% и 45%. Образец сухого остатка ФК (см. рис. 19 е и ф), представляет собой высокодисперсный, однородный микроагрегатный состав, большая доля фракции (61%) которого не превышает 0,2 мм. При просмотре в объективе бинокля частицы ФК – однородные, окатанные обломки минералов. Анализ и *Digital* визуализация [118, 119,120] рельефа поверхности образцов ГК и ФК (см. рис. 19 с и г) демонстрируют различия качественных признаков микроструктуры их поверхности, характеризующейся удлинёнными телами и скоплением дискретных минеральных фрагментов. Структура поверхности твердых частиц по данным метода СЭМ неоднородна и представлена субмикронными частицами, инкапсулированными во внутренние полости молекулполиэлектролитов ГК и ФК.

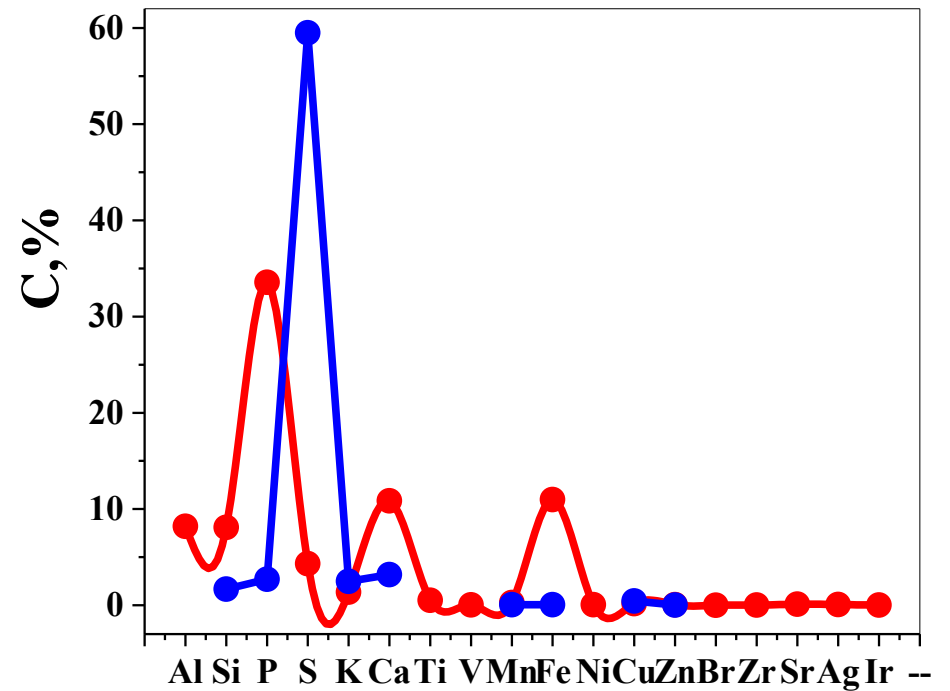
3.5.3. Определение элементного состава остатка после высушивания ГК и ФК по данным метода рентгенофлуоресцентного анализа

Элементный состав может иметь решающее значение для характеристики средств, применяемых в медицине. Элементный анализ исследуемых высушенных образцов ГК и ФК был проведен нами с использованием энергодисперсионной рентгеновской флуоресценции (см. главу 2.2.7). На рисунке 20 представлены результаты РФА содержания элементов в сухом остатке образцов ГК и ФК в виде зависимостей интенсивности флуоресценции и концентрации элемента от химического состава образцов.

Как можно наблюдать из рисунка 20 атомы элементов Si, P, S, K, Ca, Mn, Fe, Cu, Zn были обнаружены в обоих исследуемых образцах экстракта ГК и ФК. Высокая интенсивность сигнала рентгеновской флуоресценции для атомов Fe в образце экстракта ГК объясняется тем, что гуминовые вещества, участвуя в образовании хелатов с железом, способствуют питанию растений [121].



(a)



Элемент

(б)

Рисунок 20. Рентгенофлуоресцентный анализ элементов в анализе ГК (красный) и ФК (синий): (а) зависимость интенсивности флуоресценции от химического состава и (б) зависимость концентрации определяемого элемента.

Гумифицированные фракции органических веществ в почвенных отложениях способствуют, в зависимости от растворимости и молекулярного размера ГК, созданию резервуара Fe, доступного для растений [121]. Показано [122], что распределением и высвобождением Fe внутри растения можно управлять, если их снабжать водорастворимыми комплексами Fe-ГК по сравнению с другими природными или синтетическими хелатами. В случае Fe высокостабильные комплексы ГК в основном включают кислородосодержащие группы (карбоксовые и фенольные) [123].

ФК менее склонны к образованию нерастворимых комплексов с металлами.

3.5.4. Оценка размера, распределения по размерам и ζ -потенциала поверхности частиц ГК и ФК по данным методов статического (SLS) и динамического (DLS) светорассеяния

Измерение светорассеяния образцов-полиэлектролитов ГК и ФК позволяет оценивать молекулярные и надмолекулярные параметры, которые важны для их идентификации и характеристики. Совместное применение методов DLS и SLS делает более эффективным определение размеров частиц, исследование агрегации, межчастичного взаимодействия, исследование структуры и релаксационной динамики сложных жидкостей, когда молекулярная ассоциация / диссоциация происходят одновременно (см. главу 2.2.2) [124].

Объемное распределение на ансамбле частиц по размерам/размерные спектры (гранулометрический анализ) регистрировали методом статического светорассеяния (Low-angle laser light scattering, LALLS) с применением лазерного малоуглового измерителя дисперсности «MasterSizer» 3600 Ec (Malvern, UK) (см. главу 2.2.1) [125]. Оптический модуль применяемого оборудования позволяет определять размеры частиц дисперсной фазы в диапазоне от 1 мкм до 180 мкм на основании измерения угловой зависимости

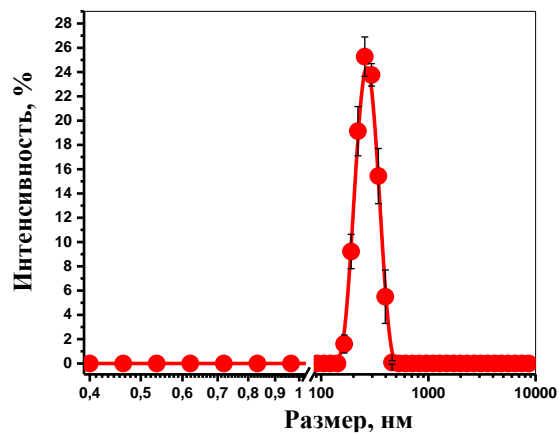
интенсивности рассеянного лазерного света при прохождении через диспергированный образец [126]. Для проведения гранулометрического анализа исследуемых образцов использовали разведения экстракта ГК и ФК в воде 1:1000 и 1:2 соответственно. Для измерения размера наночастиц в исследуемых образцах экстракта ГК и ФК от 0,1 нм до 10000 нм применяли Zetasizer Nano ZSP (Malvern, UK), основанный на динамическом рассеянии света (DLS). Технология DLS измеряет диффузию частиц за счёт броуновского движения с последующим преобразованием её в размер согласно формуле Стокса–Эйнштейна [127].

$$D = \frac{k_B T}{6 \pi \eta r}, \quad (11)$$

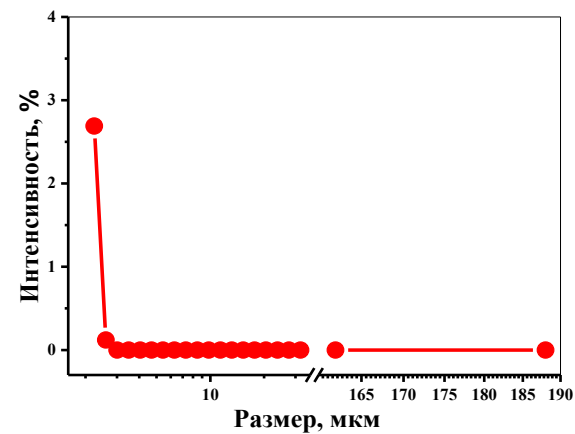
Где, D - коэффициент диффузии, k_B — постоянная Больцмана, T — абсолютная температура, η — вязкость жидкости, r — радиус частицы.

Дисперсный анализ проводили с использованием анализатора Malvern серии ZetaSizer Nano ZS (рисунок 21).

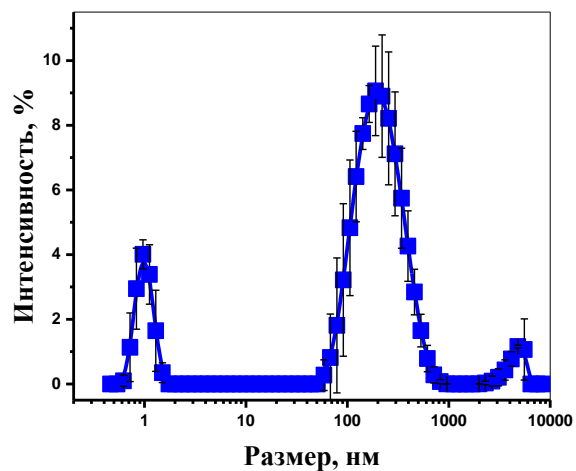
В растворе-разведении экстракта ГК (1:10⁴) обнаружены частицы, находящиеся в мономерном состоянии, занимающими область от 130 нм до 400 нм с максимумом при 200 нм по данным метода DLS. В области размеров от 1 до 200 нм отсутствуют частицы по данным метода SLS. Образец водного разведения (1:2) ФК демонстрирует бимодальное распределение с максимумами при 1 нм и 180 нм по данным DLS. Объемная доля частиц в образце ФК распределена по трем размерным группам: 4 нм, 9 нм, 12 нм. Таким образом обнаруженные в исследуемых образцах наночастицы экстракт ГК и ФК обуславливают свои биохимические и физические свойства, определяющие перенос через клеточные мембраны разными путями исключительно из-за своего размера. Это качество может использоваться для доставки в клетки лекарственных веществ и нуклеиновых кислот [128,129].



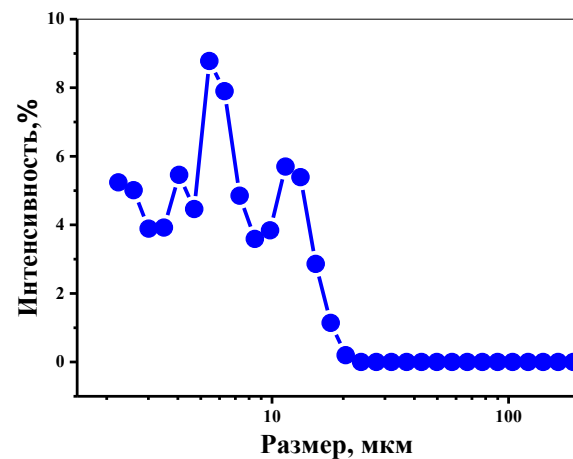
(а)



(б)



(с)



(д)

Рисунок 21. Распределение частиц по размерам по данным динамического и статического светорассеяния: (а), (б) – экстракт ГК; (с), (д) ФК.

Дальнейший экспериментальный анализ показал существование связи между размерами частиц, их биологической активностью и эффективностью интернализации наночастиц экстракта ГК и ФК клетками.

Также, для характеристики дисперсных систем и описания свойств частиц природного происхождения использовались ширина (индекс PDI) распределения частиц по размерам, а также ζ -потенциал в качестве показателя поверхностного заряда частиц и меры электростатического взаимодействия (таблица 11)

Таблица 11. DLS-Характеристика (ζ -потенциал, индекс PDI) частиц в дисперсных образцах ГК и ФК природного происхождения.

Образец	PDI \pm SD	$\zeta \pm$ SD, <u>mV</u>
ГК	0,39 \pm 0,01	-36 \pm 8
ФК	0,38 \pm 0,07	-31 \pm 12

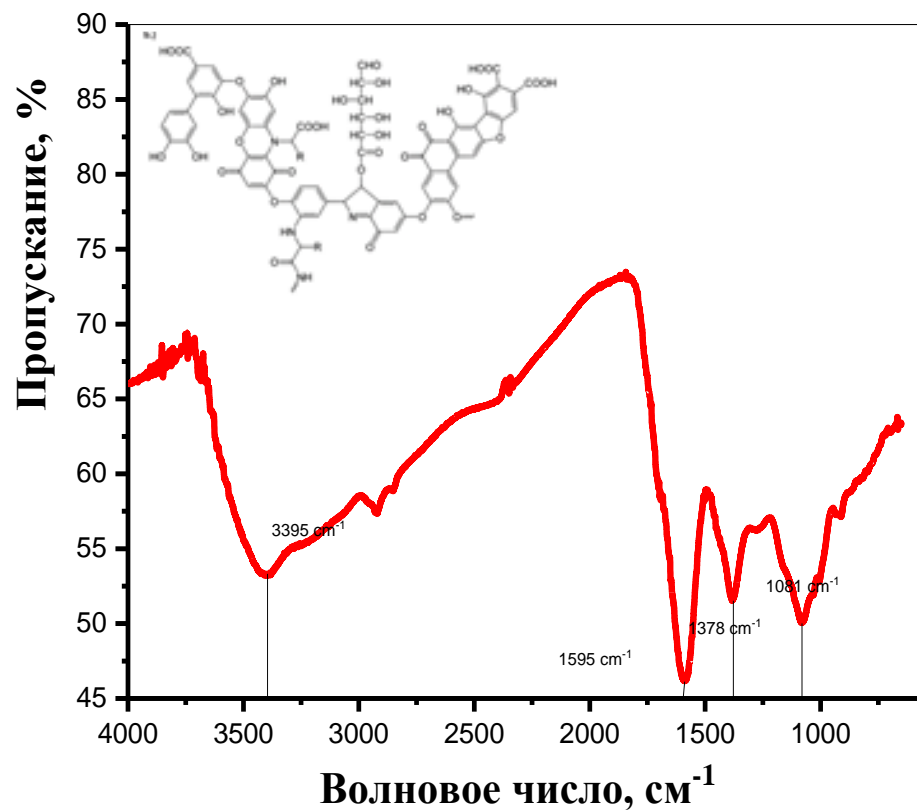
Как следует из таблицы 11, значения PDI варьируются от 0,38 до 1,00 и зависят как от природы дисперсных систем природного происхождения, так и от концентрации растворов.

Согласно теории Дерягина-Ландау-Верви-Овербека (теория ДЛФО), толщина диффузного двойного электрического слоя и поверхностный потенциал частиц являются наиболее важными факторами стабильности коллоидов [130]. Исходя из табличных данных, при разбавлении раствора ФК наблюдается не только уменьшение диаметра частиц, но и увеличение абсолютного значения отрицательного ζ -потенциала. Это может быть связано с увеличением толщины двойного электрического слоя в результате уменьшения концентрации противоионов в диффузионном слое. Величина ζ -потенциала частиц в формуле может быть использована для логического выбора химического состава рецептуры для выбора наиболее подходящих материалов для обеспечения стабильности и увеличения срока годности.

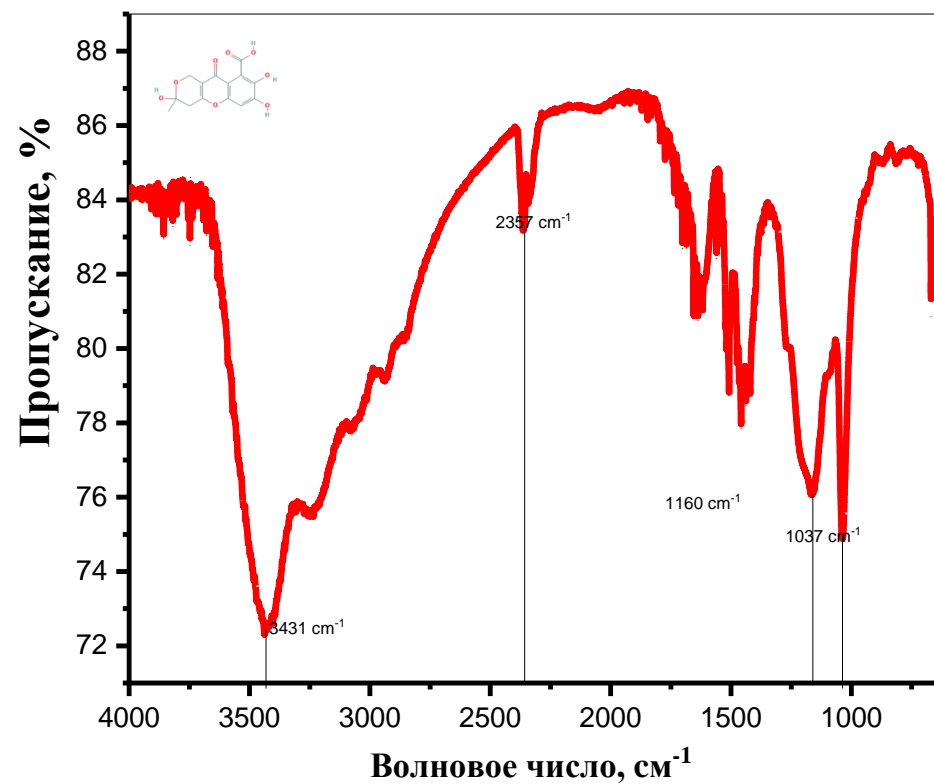
3.5.5 Оптимизация методов спектрофотометрии и спектрофлуориметрии для контроля качества ГК и ФК по показателям «подлинность» и «количественное определение»

Идентификация ГК и ФК методом Фурье-ИКС. Колебательно -вращательные спектры сухих остатков образцов экстракта ГК и ФК были получены и проанализированы в спектральном диапазоне от 4000 до 750 см^{-1} по с использованием ИК-Фурье спектрофотометр (Agilent Cary 630, USA) с приставкой на пропускание (см. главу 2.2.8) [131]. Образцы были приготовлены в соответствии с требованиями [132]. С этой целью использовали около 1 мг сухого остатка, который растирали с 400 мг тщательно измельченным и высушенным калием бромидом до однородного состояния и прессовали в течение 3-5 минут до диаметра диска около 13 мм для получения спектра подходящей интенсивности (рисунок 22).

Анализ ИК спектров исследуемых образцов показал присутствие характеристических полос светопропускания, соответствующих колебаниям связей между атомами в структурных фрагментах спиртовых и фенольных гидроксидов, циклических простых эфиров, карбониллов, а также многочисленных метиленовых групп [133]. Спектр образца сухого остатка ГК представлен несколькими характерными полосами при 3395, 1595, 1378 и 1081 см^{-1} . При сравнительном анализе спектров пропускания исследуемых соединений установлено, что для образца сухого остатка ГК характерны более высокие значения коэффициентов экстинкции, в результате чего заметно снижается процент светопропускания, что, вероятно, обусловлено нестехиометрическим составом и нерегулярной гетерогенной структурой с многочисленными функциональными группами. Широкополосную область в диапазоне частот от 3200–3670 см^{-1} образуют валентные колебания свободных и связанных гидроксильных групп (ОН) [134].



(A)



(B)

Рисунок 22. ИК-спектры с Фурье- преобразованием в сухих остатках: (А) ГК;(Б) ФК.

Однако вследствие координирующего влияния атомов железа, присутствующих в составе экстракта ГК, и образования комплексных наноструктур, содержащих связи Ме-О, колебания связи О-Н могут быть смещены в низкочастотную область ($\approx 3400 \text{ см}^{-1}$). Кроме того, валентные колебания первичных или ассоциированных аминогрупп, и, возможно, иминов, могут быть также отнесены к полосе поглощения при $\approx 3400 \text{ см}^{-1}$. Присутствие углеродного скелета проявляется в виде полосы валентных колебаний С – Н связи при 2900 и 2850 см^{-1} [135]. (Таблица 12).

Таблица 12. Основные полосы пропускания в ИК спектре экстракта ГК и ФК.

Диапазон частот, см-1	Группа	Составной класс	Вид/ Комментарии
Экстракт гуминовых веществ (ГК)			
3550-3200	О-Н растяжение	Спирт	сильная, широкая/
2920-2850	С-Н растяжение	Алкан	средняя/ полосы, вызванные наносферами Fe
1650-1580	Н-Н сгибание	Амин	Средняя
1690-1640	С=О растяжение	Сопряженный кетон	Сильная
1390-1310	О-Н сгибание	Фенол	Средняя
1085-1050	С-О растяжение	Первичный спирт	Сильная
Фульвовая кислота (ФК)			
3550-3200	О-Н растяжение	Спирт	сильная, широкая межмолекулярная связь
3100-3000	С-Н растяжение	Алкен	Средняя
2920–2850	С-Н растяжение	Алкан	средняя / полосы, вызванные наносферами Fe

2275-2250	N-C=O растяжение	Амид	сильная, широкая
1650-1566	C=C растяжение	Циклический алкен	Средняя
1440-1395	O-H сгибание	карбоновая кислота	Средняя
1450	C-H сгибание	Алкан	метильная группа
1275-1200	C-O растяжение	алкилариловый эфир	Сильная
1085-1050	C-O растяжение	первичный спирт	Сильная

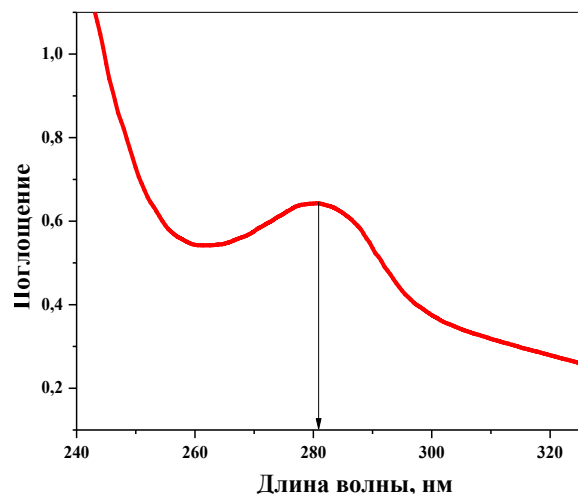
Полученные колебательно-вращательные спектры характеризуются схожими частотами колебаний, формой полос пропускания, характерными для производных бензо- γ - (хромон (1-бензопиран-4-он), что определяет строение молекул гумусовых кислот. Таким образом, метод инфракрасной спектроскопии позволил подтвердить структурные особенности исследуемых соединений [136].

Идентификация ГК и ФК УФ-СФ и СПФЛ методами. Хорошо известно, что соединения, представляющие собой конденсированные ядра бензола с окисленным пираном (кумарины, хромоны), являются флуорофорами или хромофорами из-за их высокой фотостабильности, большого стоксова сдвига и интенсивной флуоресценции с высоким квантовым выходом [137,138]. Спектры флуоресценции, являющиеся инструментом для исследования влияния структуры фульват-хромона на его оптические свойства, регистрировали при их собственной длине волны возбуждения.

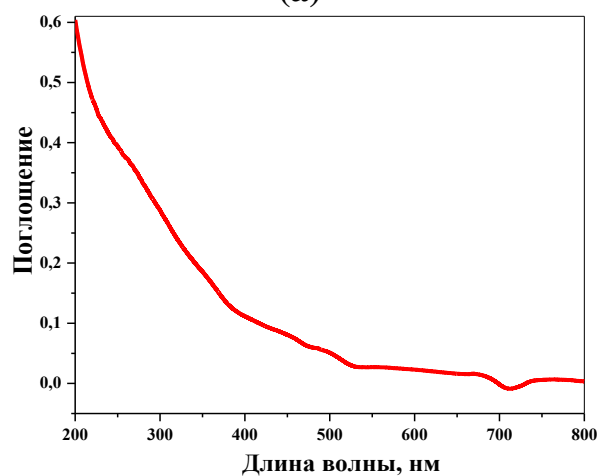
Спектры флуоресценции серии разведений образцов экстракта ГК и ФК получали с использованием спектрофлуориметра AGILENT Cary Eclipse (USA) с двумя сверхбыстрыми сканирующими монохроматорами (см главу 2.2.6). Длина волны возбуждения составила 280 нм. Исследовали спектры флуоресценции в интервале от 300 до 800 нм с максимумами фиолетовой и зеленой флуоресценции. Спектр поглощения водным раствором-разведения (1:100) ФК был получен в интервале от 200 нм до 350 нм с использованием оборудования AGILENT Cary 60 (USA) (см. главу 2.2.5) (рисунок 23).

Исходя из рисунка 23 (а), максимум поглощения фульвата составляет 281 ± 2 нм, что связано с присутствием хромонного гетероциклического ядра в структуре. Молекула ФК дает интенсивную фиолетовую (360 нм) и малоинтенсивную зеленую (560 нм) флуоресценцию при длине волны возбуждения 280 нм (рисунок 23 (б) благодаря тому, что представляет собой малый органический флюорофор, содержащим несколько конденсированных ядер в флуоресцентной открытой форме. Пики излучения в коротковолновой и длинноволновой областях спектров флуоресценции, могут быть обусловлены прототропной таутомерией в возбужденном состоянии, характерной для фрагментов с внутримолекулярными водородными связями

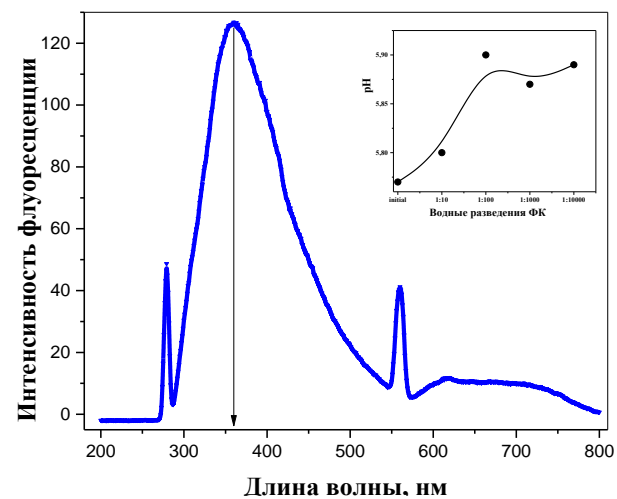
Исходя из рисунка 23 (а), максимум поглощения фульвата составляет 281 ± 2 нм, что связано с присутствием хромонного гетероциклического ядра в структуре. Молекула ФК дает интенсивную фиолетовую (360 нм) и малоинтенсивную зеленую (560 нм) флуоресценцию при длине волны возбуждения 280 нм (рисунок 23 (б) благодаря тому, что представляет собой малый органический флюорофор, содержащим несколько конденсированных ядер в флуоресцентной открытой форме. Пики излучения в коротковолновой и длинноволновой областях спектров флуоресценции, могут быть обусловлены прототропной таутомерией в возбужденном состоянии, характерной для фрагментов с внутримолекулярными водородными связями [139]. Так как образец экстракта ГК показал прозрачность в ближней ультрафиолетовой области и увеличение поглощения в дальнем ультрафиолете в отсутствие определяемых аналитических длин волн (рисунок 22 (с)). Спектры флуоресценции, также позволяет охарактеризовать структуру образца экстракта ГК (рисунок 232 (д)).



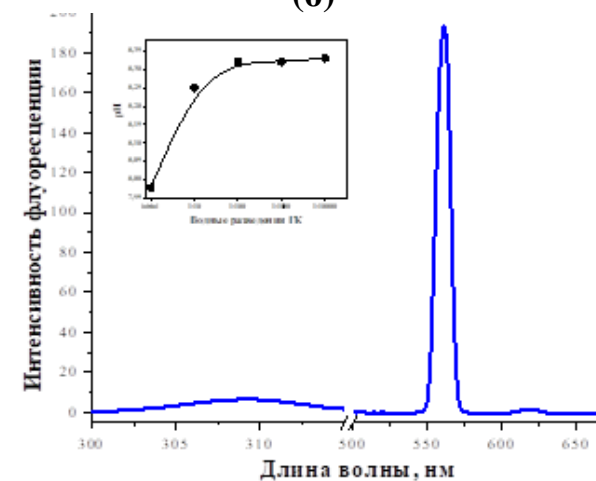
(а)



(с)



(б)



(д)

Рисунок 23. Ультрафиолетовые и флуоресцентные спектры при длине волны возбуждения 280 нм и УФ: (а), (б) – водный раствор образца фульвокислоты (1:100); с, д – водный раствор образца экстракта гуминовых веществ (1:10¹²). На вставках показана зависимость от разведения.

Фотофизические свойства ГК, содержащих многочисленные замкнутые циклы, вариации заместителей и делокализованные π -связи, претерпели некоторые изменения; интенсивность флуоресценции ГК появилась в области 620 нм и значительно увеличилась в области 560 нм.

3.5.6. Оптическая активность ГК и ФК в водных средах изотопологов

Для определения угла оптического вращения и значения удельного вращения жидких образцов ФК была приготовлена серия водных разведений, отфильтрованных через фильтры Millex (Millipore) $d=0,22 \mu\text{m}$) в условия контроля pH растворов. Исследования оптической активности проводили с помощью автоматического поляриметра поляриметре POL-1/2 с внешним модулем Пельтье для термостатирования (Atago Co., LTD, Япония) (см. главу 2.2.9). С учетом структурных особенностей ФК, для исследования оптической активности концентрацию исходного жидкого образца ФК рассчитывали исходя из содержания сухого остатка по результатам сушки субстанции, масса составила $m=3,36 \cdot 10^{-3}$ г/мл (см. главу 3.5.1).

После проведения математических расчетов концентрация исходного жидкого образца ФК составила 0,336% (в 100 мл) и далее готовили серию водных разведений в условиях выполнения закона Био:

$$\alpha = \frac{[\alpha]_D^{20} \cdot c, \% \cdot l_{\text{дм}}}{100} \quad (12)$$

где α – измеренный угол вращения, градусы; l – толщина слоя, дм; c – концентрация раствора, г вещества на 100 мл раствора; $[\alpha]_D^{20}$ – удельное оптическое вращение.

Исходные данные исследования оптической активности образца ФК представлены в таблице 13.

Таблица 13. Угол вращения и удельное вращение водных разведений образца ФК (pH= [4,8-6,5]).

Наименование показателей	С, %				
	1,68	1,12	0,84	0,72	0,56
Угол вращения, α^0	-0,0198	-0,0132	-0,0114	-0,0122	-0,0081
Удельное вращение, $[\alpha]_D^{20}$	-1178,5	-1178,5	-1357,1	-1694,4	-1446,0

С помощью статистической обработки результатов было получено среднее удельное вращение и его стандартное отклонение при $n=5$ (1,68; 1,12; 0,84; 0,72; 0,56 $10^{-3}\%$): $[\alpha]_D^{20} = -1371 \pm 214$ (град $100 \text{ мл г}^{-1} \text{ дм}^{-1}$). Исследования оптической активности водных растворов ФК показали, что в широком диапазоне концентраций от $6,70 \cdot 10^{-3}$ до $0,56 \cdot 10^{-3}\%$ растворы проявляют отрицательное оптическое вращение. Значения удельного оптического вращение для серии из пяти концентраций рассчитанные с помощью закона Би́о можно использовать при идентификации образцов фульвово́й кислоты.

3.5.7. Исследование концентрационной и температурной зависимости гибели клеточного биосенсора в оценке индивидуальной и комбинированной токсичности образцов ГК и ФК методом *Spirotox*

Нами исследована биологическая активность водных разведений экстракта ГК с добавлением фторхинолона, с использованием клеточной культуры *Spirostomum ambiguum* [140,141]. Постановка эксперимента заключалась в использовании концентрационной зависимости: воздействие на клетку ксенобиотиком приводит к ее гибели через прохождение переходного состояния по аналогии с моделью ферментативной кинетики Михаэлиса-Ментен [142]. С механизмом лиганд-рецепторного взаимодействия можно более подробно познакомиться (см. главу 2.2.10). С этой целью оценена эффективность снижения токсичности фторхинолонов III и IV поколений на примере левофлоксацина и моксифлоксацина в средах растворения разной природы методом биотестирования на основе модели ферментативной кинетики.

Готовые ЖЛФ (см. главу 2.1.1 и 2.1.2) были разведены в различных средах: «легкой» воде (≤ 1 , ppm D₂O) (см. главу 2.1.5) и природном комплексе гуминово-фульвовых кислот (ГФК). Показателями изменения функционального состояния *S. ambigua* могут служить объективно регистрируемые изменения в двигательной активности, спонтанные сокращения тела и гибель [143].

Обработка результатов осуществлялась с использованием программных пакетов Origin Pro 9.1 и представляла собой среднее значение \pm SD (n=3).

На рисунке 24 представлены кривые «доза-ответ» для растворов-разведений лекарственных форм исследуемых ФТХ в различных средах: воде очищенной, воде «легкой» с пониженным содержанием дейтерия по отношению к природному уровню (ddw, «легкая» вода) и комплексе ГФК. Вид кривых – экспоненциальное падение. Увеличение концентрации ФТХ приводит к уменьшению времени жизни клеточного биосенсора.

Мы наблюдаем, что в случае использования комплекса ГФК и «легкой» воды в качестве среды растворения время жизни клеточного биосенсора значительно увеличилось в сравнении с водой очищенной. Для определения токсической концентрации (С, моль/л), при которой наблюдается изменение характера действия ксенобиотика на клеточный биосенсор, применяли метод касательных в координатах «время жизни *S. ambiguum* – $-\lg C$ » (таблица. 14).

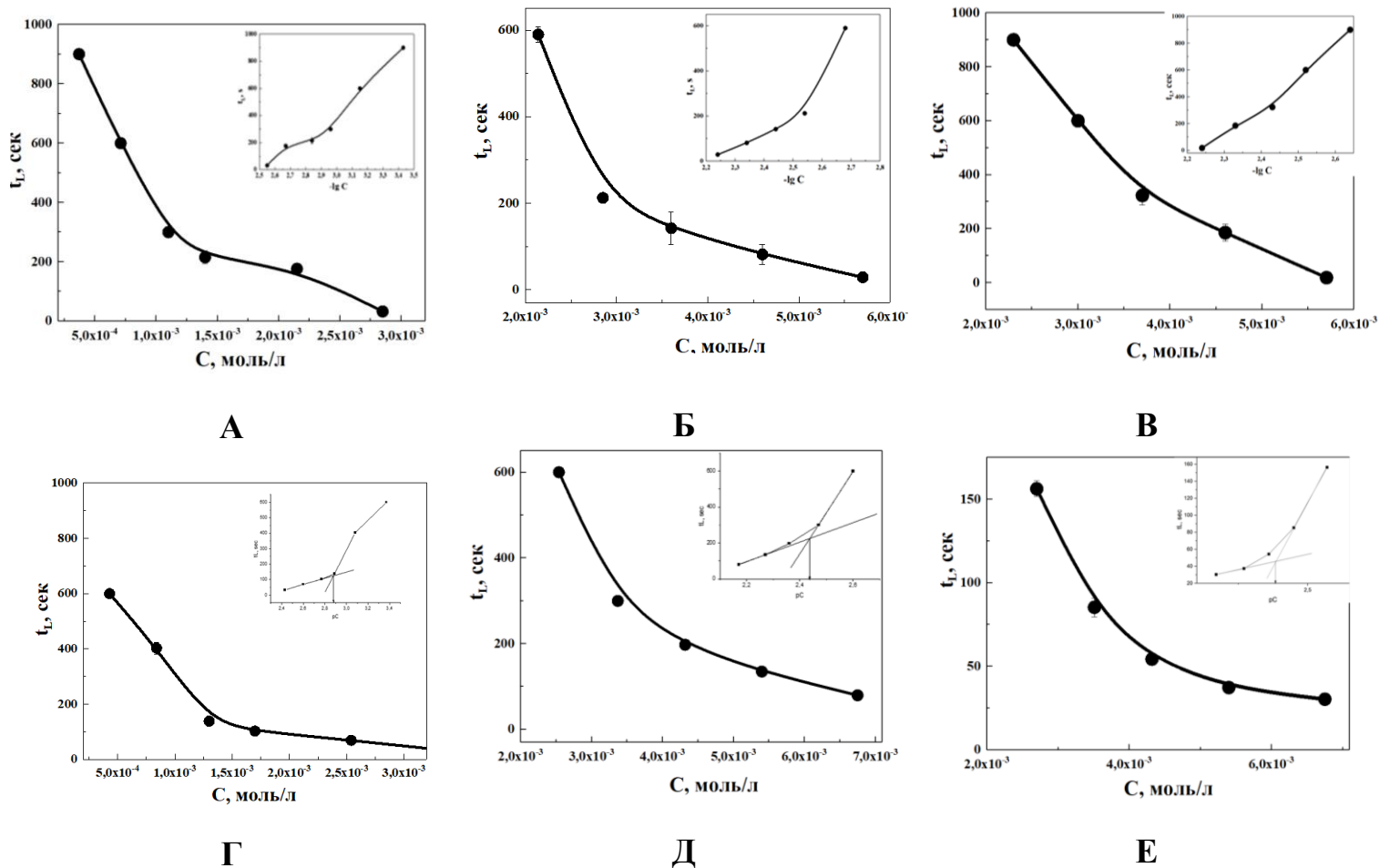


Рисунок 24. Зависимость времени жизни клеточного биосенсора *S. ambigua* (диаграмма «доза-ответ») в растворах-разведениях моксифлоксацина (А, Б, В) и левофлоксацина (Г, Д, Е). На вставках - в координатах “ t_L ,сек – $-\lg C$ ”: А - вода очищенная; Б; – комплекс гуминово-фульвовых кислот С - вода «легкая (ddw).

Таблица 14. Значения токсической концентрации фторхинолонов в разных средах растворения.

Моксифлоксацин			Левифлоксацин	
Среда растворения	$pC_{tox}=-lgC$	C_{tox} , моль/л	$pC_{tox}=-lgC$	C_{tox} , моль/л
Вода очищенная	2,93	$1,17 \cdot 10^{-3}$	2,88	$1,32 \cdot 10^{-3}$
Комплекс ГФК	2,52	$3,02 \cdot 10^{-3}$	2,44	$3,63 \cdot 10^{-3}$
Вода «легкая» (ddw)	2,42	$3,80 \cdot 10^{-3}$	2,38	$4,17 \cdot 10^{-3}$

Табличные данные демонстрируют значимое (в 3-4 раза) уменьшение токсической концентрации моксифлоксацина и левифлоксацина в среде гуминового-фульвового комплекса и «легкой» воде в сравнении с водой очищенной.

Эффект снижения токсической концентрации ФТХ в среде комплекса гуминовых-фульвовых кислот можно объяснить, исходя из их состава, как металлорганических наноразмерных объектов [144], что определяет их выраженную биологическую активность и перспективы использования в качестве среды-разведения лекарственных средств.

На основании представленной схемы модели ферментативной кинетики (см. главу 2.2.10), нами рассчитаны параметры K_p и f_m , отражающие механизм

токсического действия ФТХ: $t_L = \frac{1}{f_m} + \frac{K_p}{f_m} \cdot \frac{1}{L^n}$, где t_L – время жизни клеточного биосенсора, L^n – концентрация лиганда (таблица 15).

Таблица 15. Кинетические параметры уравнения Михаэлиса-Ментен

Параметры	Моксифлоксацин			Левифлоксацин		
	H ₂ O	Ddw	Комплекс ГФК	H ₂ O	ddw	Комплекс ГФК
f_m , с ⁻¹	$7,87 \cdot 10^{-2}$	$1,75 \cdot 10^{-2}$	$2,06 \cdot 10^{-2}$	$2,17 \cdot 10^{-3}$	$4,62 \cdot 10^{-2}$	$1,61 \cdot 10^{-2}$
K_p , М ⁿ	$3,87 \cdot 10^{-3}$	$7,5 \cdot 10^{-3}$	$9,89 \cdot 10^{-8}$	$3,99 \cdot 10^{-2}$	$1,12 \cdot 10^{-1}$	$6,37 \cdot 10^{-1}$

Чем выше значение f_m , тем больше скорость гибели клеточного биосенсора, и, соответственно выше токсичность лиганда.

Табличные данные демонстрируют, что при использовании комплекса ГФК в качестве растворителя время жизни клеточного биосенсора значительно увеличилось в сравнении с водой очищенной. Определенные значения C_{tox} , моль/л, а также кинетические параметры ферментативной реакции f_m и K_p , дают возможность использования полученных результатов в промышленности при производстве ЛС с улучшенным фармакологическим профилем.

Биологическую активность (индивидуальную и комбинированную) с соответствие с Аррениусовской моделью температурной кинетики, также, исследовали с помощью тест-культуры *Spirostomum ambiguum* [145]. Описание механизмов лиганд-рецепторного взаимодействия при исследовании биологической активности веществ позволяет количественно оценить биологический ответ клеточного биосенсора на воздействие токсиканта [146]. Переходное состояние в случае лиганд-индуцированной гибели тест-объекта связано с расходом энергии. *Spirotox*-исследования с использованием образцов экстракта ГК и ФК продемонстрировали отсутствие токсичности и значительную продолжительность жизни клеточного биосенсора в данных средах. Наши предположения, относительно причины этого явления связаны с уникальной способностью гуминизированных веществ воспринимать производимые воздействия без изменения свойств неопределенно длительный период, проявляя эффект ассимиляционного потенциала (АП) [147,148,149]. Для биологической активности экстракта ГК, показавших эффект АП, нами выбран объект лекарственной субстанции антибактериального действия на примере моксифлоксацина гидрохлорида (см. главу 2.1.1). Обнаружено, что лиганд-индуцированные клеточные переходы линеаризованы в координатах Аррениуса:

$$\ln k = \ln A - \frac{E_a}{R} \cdot \frac{1}{T} \quad , \quad (13)$$

здесь k — константа скорости, E_a — энергия активации, R — газовая постоянная, A — предэкспоненциальный множитель, T — температура.

В полулогарифмических координатах тангенс наклона прямой $\ln(1/tL) = F(1/T)$ к оси абсцисс равен E_a/R . Значения наблюдаемой энергии активации ($^{obs}E_a$) для тестируемых соединений были найдены с использованием координат Аррениуса (таблица 16) [150].

Таблица 16. Рассчитанные значения $^{obs}E_a$ лиганд-индуцированного процесса гибели *S. ambigua* в воде и растворах экстракта ГК $Mxf \cdot HCl$; $n=5$.

Образцы раствора	$^{obs}E_a \pm SD$, кДж моль ⁻¹
Водный раствор с 0,094% $Mxf \cdot HCl$	157±2,5
Водный раствор экстракта ГК с 0,160 % $Mxf \cdot HCl$	196±7

Исходя из полученных данных, мы наблюдаем наибольшее значение энергии активации, а также увеличение времени жизни *S. ambigua* примерно в 1,25 раза при той же температуре для водного раствора экстракта ГК с $Mxf \cdot HCl$ по сравнению с водным раствором $Mxf \cdot HCl$ демонстрирует способность ГК снижать токсичность [151,152,153].

3.6. Комплексный подход к контролю качества иммунобиологических препаратов – вакцин для применения у человека и животных

Из литературных данных известно, что в разработке вакцин против SARS-CoV-2 с использованием различных технологий были задействованы многочисленные организации. Для быстрой разработки были одобрены РНК-вакцины и аденовирусные векторные вакцины и их внедрение уже началось во всем мире. Одобренные вакцины проявили высокую эффективность в отношении SARS-CoV-2 в течение короткого периода времени, однако оценка безопасности и эффективности должна постоянно контролироваться в течение длительного периода времени [154]. Зарубежные вакцины против SARS-CoV-2, как правило, являются нано-иммунологическими препаратами. Нановакцины предусматривает

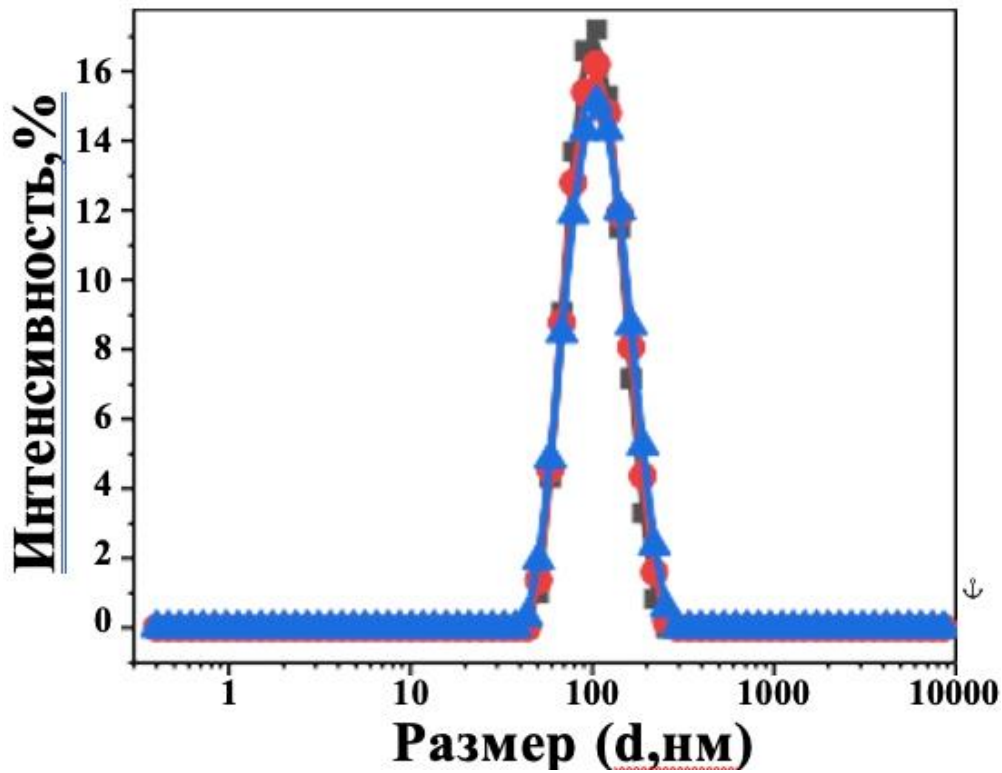
наличие наночастиц используемых как адъюванты. Например, вакцина BNT162b2 разработанная Pfizer и BioNTech, в которой вместо вирусного вектора применяют липидные наночастицы (жировые пузырьки), внутри которых находится м-РНК, содержащая ген белка S вируса SARS-CoV-2. Аденовирусы содержат единичную двухцепочечную молекулу ДНК и имеют размер 70-90 нм. Современные тенденции в разработке иммунобиологических лекарственных препаратов (ИБЛП, вакцин) предполагают введение в их состав наноматериалов—адъювантов, усиливающих их иммуногенность [155] (липосомы, полимерные микрочастицы, наночастицы, вирусоподобные частицы и иммуностимулирующие комплексы) [156].

Известно, что факторы нанотоксичности, связанные со значительной удельной площадью их поверхностью (отношением площади частиц к размерам), обуславливают высокую адсорбционную и проникающую активность наноадъювантов. Однако в существующей ОФС.1.7.1.0004.15 «Вакцины и анатоксины» нет указаний на нормирование в ИБЛП наночастиц. Поскольку содержание наноадъювантов или векторов м-РНК в ИБЛП определяет соотношение иммуногенности, реактогенности вакцины, актуально исследование на содержание (размер и распределение) и коллоидную стабильность (ξ потенциал) наночастиц с целью стандартизации ИБЛП.

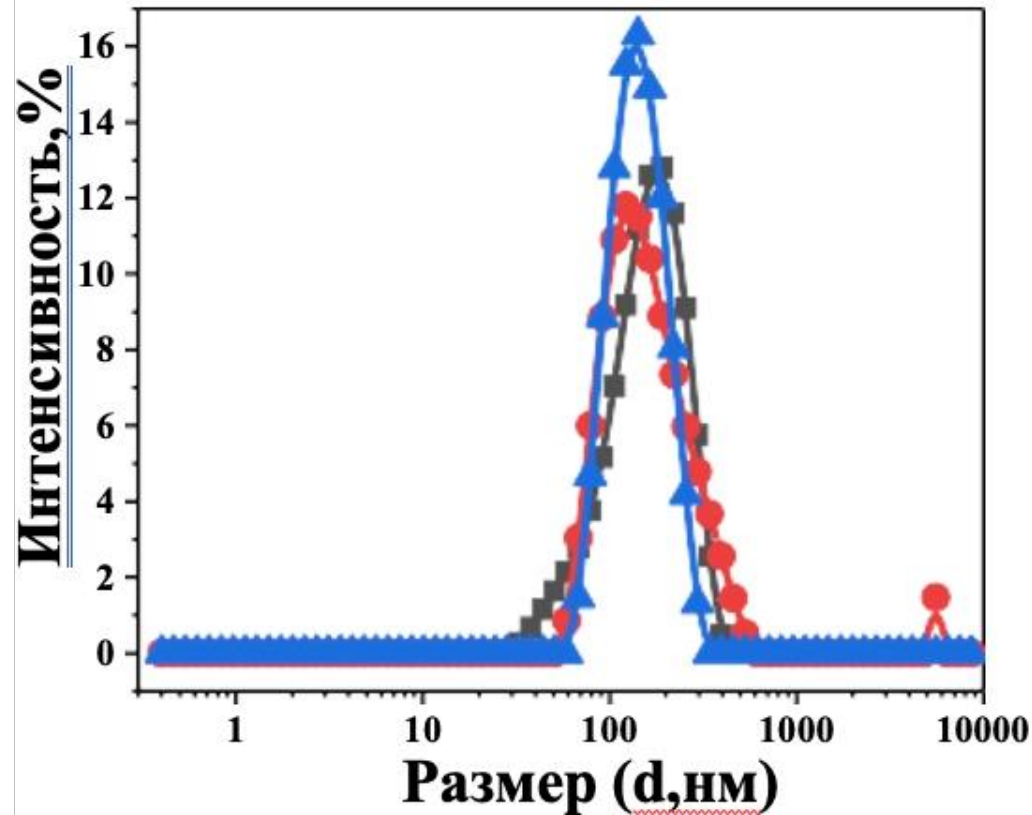
3.6.1. Дисперсный анализ образцов ДНК и мРНК вакцин по данным методов статического и динамического светорассеяния

В качестве образцов м-РНК- вакцин была исследована двухвекторная вакцина против SARS-CoV-2 (см. главу 2.1.4).

На рисунке 25 представлено распределение частиц по размерам (в единицах интенсивности) в растворах разведениях обоих образцов.



А



Б

Рисунок 25. Распределение интенсивности (%) по размерам частиц образце «химерного» ИБЛП против SARS-CoV-2 производства РФ: (А) - вектор 1, (Б) - вектор 2.

Полученные результаты демонстрируют распределение частиц по размеру в диапазоне около 100 нм (вектор 1) и 140 нм (вектор 2), что соответствует размеру вектора – аденовируса (~70–100 нм в диаметре) [157].

Величина электрокинетического ξ -потенциала наночастиц, которая определяет коллоидную устойчивость, анализ пиков распределения частиц по размерам в единицах интенсивности представлены в таблице 17.

Таблица 17. DLS-характеристика частиц в «химерном» двухвекторном ИБЛП против SARS-CoV-2 производства РФ.

Образец	Размер \pm SD, нм	Интенсивность \pm SD, %	$\xi \pm$ SD, mV
Вектор 1	106 \pm 23	16 \pm 1	-28 \pm 6
Вектор 2	144 \pm 19	13 \pm 3	-4 \pm 0,5

Результаты демонстрируют, что ξ -потенциала наночастицы вектора 1 близко к -30 мВ, что составляет граничное значение устойчивости дисперсных систем в 30 мВ, ξ - потенциал наночастицы вектора 2 демонстрируют меньшую устойчивость (см. таблицу 17).

В качестве ИБЛП на основе вирусоподобных частиц был исследован тестовый образец образца VLP-вакцины, состоящей из рекомбинантных вирусоподобных частиц структурных белков *S*, *M*, *N*, *E* вируса SARS-CoV-2, синтезированных в бакуловирусной системе экспрессии. На рисунке 26 представлено распределение частиц по размерам (в единицах интенсивности) в растворе-разведении тестового образца.

Результаты исследования методом динамического рассеяния света образцов инактивированных ИБЛП для животных характеризуются бимодальным распределением частиц по размеру в нано- (около 100 нм) и субмикронной (около 1 мкм) диапазонах (рисунок 27).

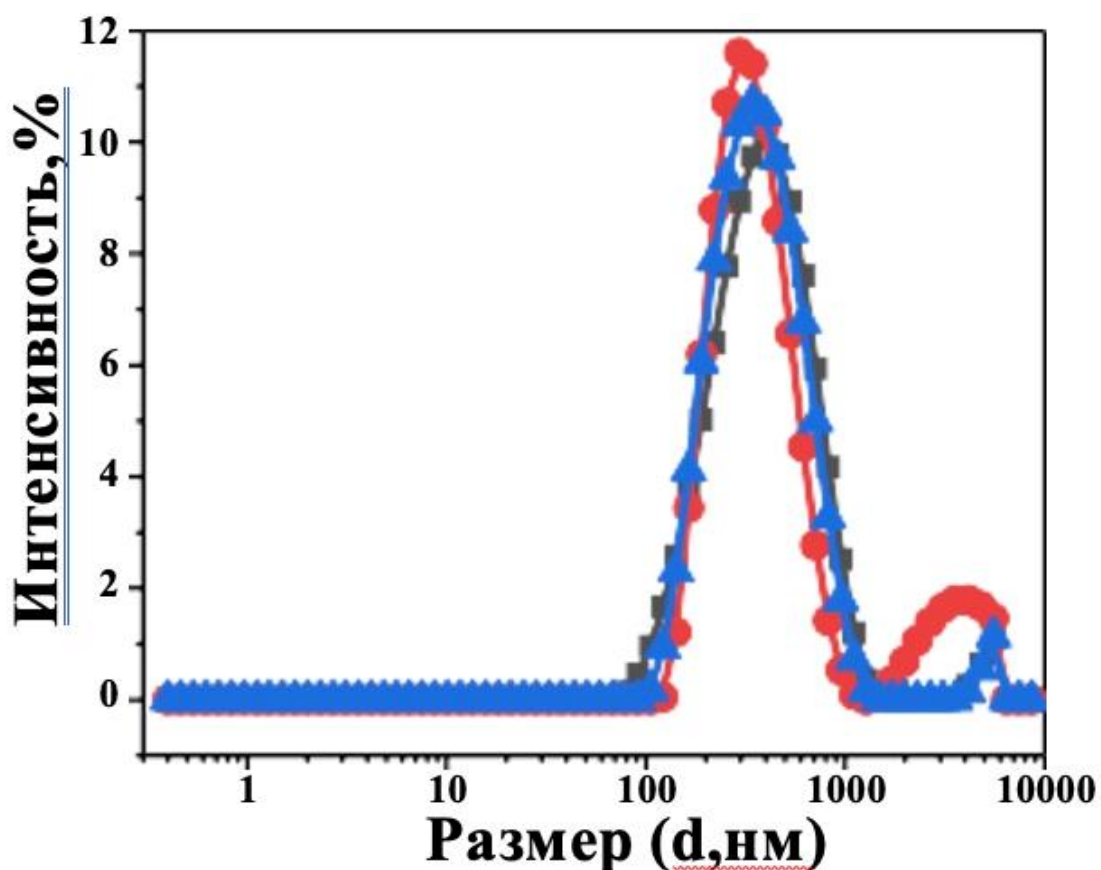


Рисунок 26. Распределение интенсивности (%) рассеянного лазерного света по размерам частиц в тестовом образце VLP-вакцины против SARS-CoV-2 производства РФ (n=3).

Измеренный индекс PDI («неоднородности») демонстрирует стабильность значений - от 0,6 до 0,8 и характеризует полидисперсность образцов вакцин и их природу (таблица 18).

Таблица 18. Устойчивость частиц в дисперсиях ДНК-вакцин по данным метода DLS.

Образец	Размер, нм	PDI±SD	$\xi \pm SD$, mV
Нобивак (Lepto)	d1=97; d2=1035	0,68±0,1	-10 ± 0,4
Нобивак (L ₄)	d1=106; d2=712	0,65±0,1	-17 ±0,7
Рабифел	d1=87; d2=510	0,80±0,1	-25 ±0,47
Вакдерм F	d1=5300; d2= 4000		-28±6,0

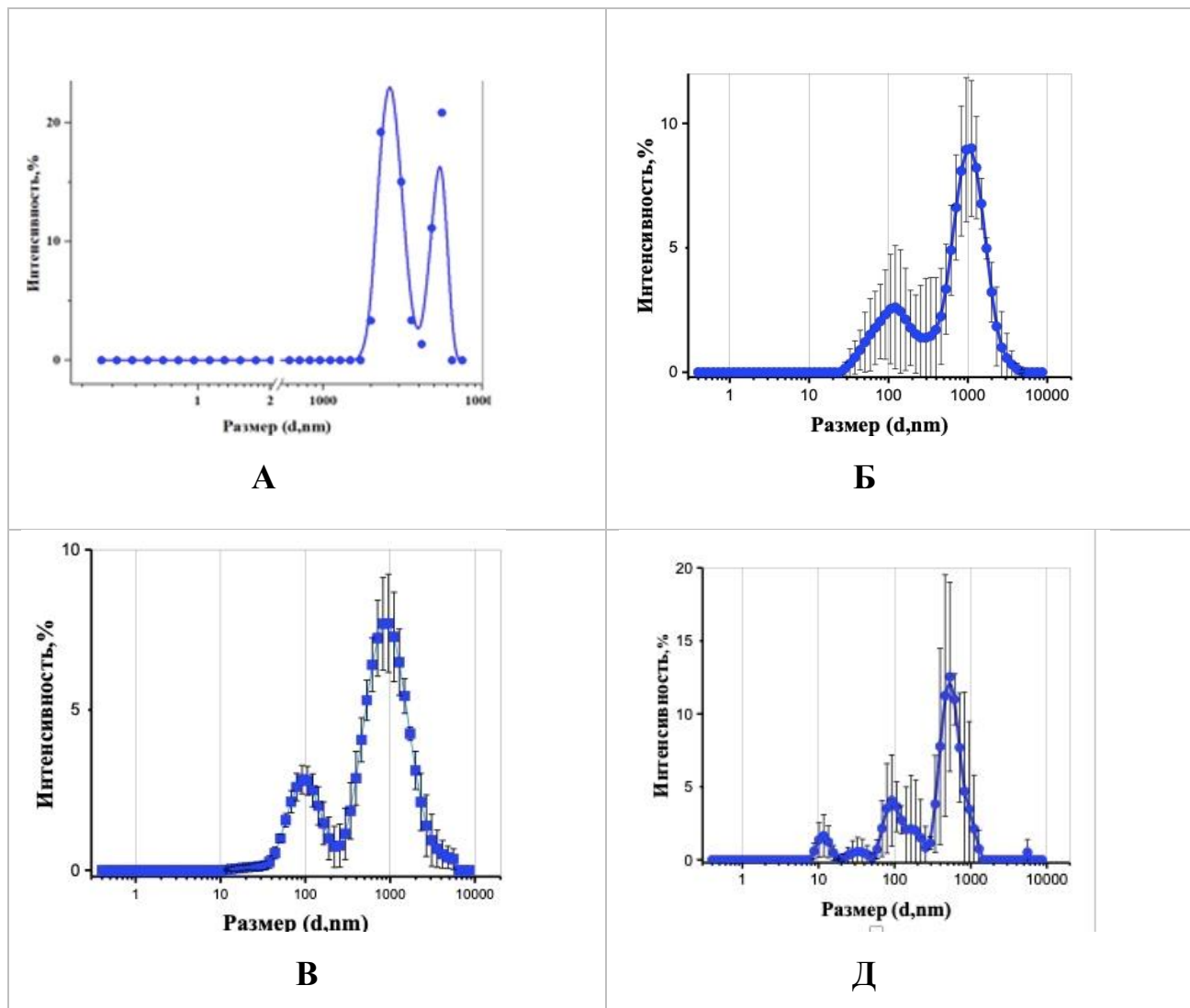


Рисунок 27. Распределение интенсивности (%) по размерам частиц образцах ИБЛП: (А) - Важдерм F, (Б) – Нобивак (Lepo), (В)- Нобивак (L₄), (Д)- Рабифел.

Значение ξ -потенциала наночастицы образца вакцины Вакдерм F близко к -30 мВ, что составляет граничное значение устойчивости дисперсных систем в 30 мВ, ξ -потенциала наночастицы образцов вакцин Нобивак (Lepto), Нобивак (L₄), Рабифел проявляют меньшую устойчивость.

Результаты исследований природы и устойчивости ИБЛП в профилактике и терапии вирусных и микробных заболеваний человека и животных методом рассеяния света на флуктуациях неоднородности в жидких коллоидных системах позволяют уверенно рекомендовать возможность включения DLS в спецификацию для вакцин с целью их стандартизации и надежного контроля качества.

3.6.2. Оценка токсичности ДНК и м-РНК вакцин методом Spirotox

Для исследования фармакологии и токсичности АФИ широко используются простейшие, в частности *Spirostomum ambiguum* применяют в качестве тест объектов, благодаря их сходству по строению и функциям с клеточной мембраной многоклеточных высших организмов [158]. Схема лиганд-индуцируемой гибели *S. ambiguum* представлена промежуточным состоянием, в котором происходит связывание лиганда (АФИ) с рецептором клетки. Для количественной оценки биологической активности исследуемых образцов нами использовано значение энергии активации ($^{obs}E_a$), которая выделяется в процессе перехода клетки из промежуточного в мертвое состояние (см. главу 2.2.10).

Для оценки биологической активности образцов ДНК вакцин (Вакдерм F) и мРНК вакцин (двухвекторная вакцина против SARS-CoV-2) нами проанализирована температурная зависимость гибели *S. ambiguum* в диапазоне 24-32 °C с шагом 2°C. Значения $^{obs}E_a$ для исследуемых образцов соединений находили, исходя из арениусовских координат [159,160,161]. (рисунок 28).

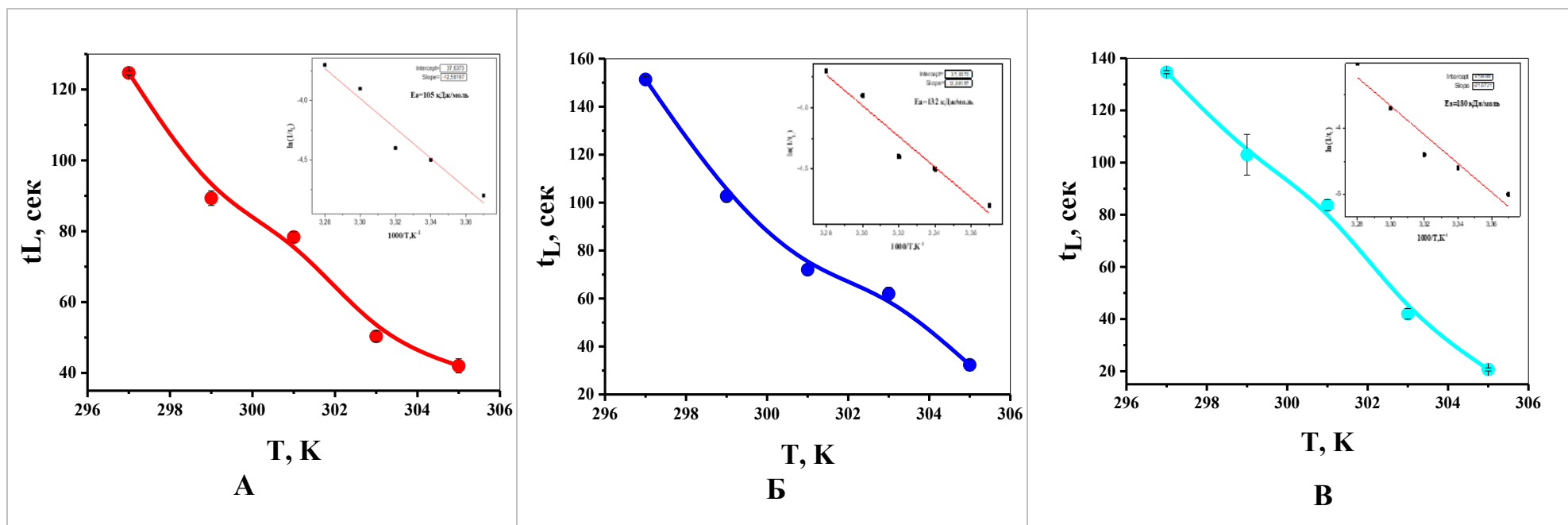


Рисунок 28. Зависимость времени жизни клеточного биосенсора *S. ambigua* от температуры в прямых и в аррениусовских координатах (на вставках) в образцах ДНК вакцины Вакдерм F (А) и м-РНК вакцины: Вектор 1 (Б), Вектор 2 (В).

$$k = A \cdot e^{-E_a/RT}, \quad (14)$$

где:

k – константа скорости процесса; A – предэкспоненциальный множитель связанный с вероятностью столкновения частиц (лиганд-рецепторного взаимодействия); R – газовая постоянная; T – абсолютная температура, К; E_a – энергия активации.

Логарифмическая форма уравнения Аррениуса

$$\ln k = \ln A - \frac{E_a}{R} \cdot \frac{1}{T}, \quad (15)$$

$\frac{E_a}{R}$ – постоянная величина для данной реакции.

По аналогии с уравнением прямой $y = a + bx$, 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: (таблица 19).

$$\text{tg } \beta = - E_a/R \quad (16)$$

$$E_a = - R \cdot \text{tg} \beta \quad (17)$$

Таблица 19. Энергия активации реакции для ДНК и мРНК вакцин для человека и животных

Образцы	^{obs} E_a , кДж/моль, ($x \pm \Delta x$, $n= 3$, $P=0,90$)
Вакдерм F	105
Вектор 1	132
Вектор 2	180

Как видно из таблицы 19 полученные результаты демонстрируют наименьшее значение энергии активации в образце ДНК вакцины Вакдерм F, что может свидетельствовать о более высокой биологической активности и токсичности в сравнении с образцом двухвекторной мРНК вакцин против SARS-CoV-2.

Возможно это связано с тем, что ДНК вакцины, которые несмотря на многообещающие свойства и характеристику доказанной безопасности, переносимости и иммуногенности, по данным ранних клинических испытаний, обладают неоптимальной специфической активностью, что может способствовать возникновению возможной интеграции чужеродной ДНК в геном хозяина, что может вызвать тяжелые мутации и новые заболевания, мРНК вакцины более эффективны для прямого переноса генов и, кроме того, неспособность встраиваться в геном хозяина и естественным образом разлагаться в процессе экспрессии антигенов, могут способствовать повышению безопасности, а также служить многообещающей платформой для вакцинации [162].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Поскольку качество лекарственных средств рассматривается как важнейшая составляющая качества жизни населения, следовательно, разработка подходов и методик анализа дисперсных систем методами статического и динамического рассеяния света позволит решить проблему стандартизации ЛС различного происхождения – синтетических, природных и транспортных векторных. В диссертационном исследовании разработана и экспериментально доказана пригодность аналитической методики определения константы скорости растворения $Mx_f \cdot HCl$ в воде по данным статического светорассеяния, которая может быть использована в качестве самостоятельного испытания свойств фармацевтических субстанций на всех стадиях разработки и обращения ЛС.

Продемонстрировано развитие нКИЭ по растворителю, обедненному по содержанию тяжелого изотопа водорода методом LALLS, что может служить основой для оригинального способа модификации свойств водных растворов малорастворимых лекарственных веществ.

Разработаны подходы к стандартизации и контролю качества гуминовых веществ и фульвокислот, как представителей дисперсных полиэлектролитов природного происхождения, включающие: определение сухого остатка; анализ морфологии, гранулометрического распределения и результатов СЭМ частиц; оценку размера и ζ -потенциала частиц ГК и ФК по данным метода DLS; РФА-анализ, а также качественный анализ методами ИК-Фурье, УФ-СФ и СПФМ и биотестирование Spirotox.

Обоснована необходимость контроля размеров и коллоидной стабильности частиц в м-РНК и ДНК-содержащих ИМБЛП методом динамического светорассеяния для определения факторов иммуногенности/реактогенности вакцин для человека и животных.

ВЫВОДЫ

1. Разработаны новые подходы к стандартизации и контролю дисперсности фармацевтических объектов различного происхождения и назначения: синтетических ЛС, БАВ природного происхождения и иммунобиологических ЛП, основанные на получении и анализе результатов определения индикатрисы лазерного рассеяния на дисперсных неоднородных объектах микронного уровня (метод LALLS) и флуктуации интенсивности рассеянного лазерного света на частицах нанодиапазона (метод DLS).
2. Разработана аналитическая методика определения константы скорости растворения моксифлоксацина гидрохлорида $Mxf\ HCl$ в воде по данным LALLS метода: $k=0,058\pm 0,003\text{с}^{-1}$; доказана прецизионность разработанной методики в условиях повторяемости и внутрилабораторной воспроизводимости (при $P=95\%$); определена линейность и аналитическая область. Достоверности полученных результатов и пригодности АМ по оценена по параметрам: коэффициент вариации **RSD <10%**, относительная ошибка среднего **S=4%**.
3. Исследовано явление *нормального* кинетического изотопного эффекта (КИЭ) по растворителю методом LALLS: $k_H/k_D=3,5$. Установление данного факта может служить в качестве основы для оригинального способа модификации сольубилизационных характеристик водных растворов малорастворимых лекарственных веществ.
4. Разработаны подходы к стандартизации и контролю качества полиэлектролитов природного происхождения (гуминовых веществ и фульвокислот), включающие: определение сухого остатка – $7,34 \cdot 10^{-2}$ г/мл и $3,36 \cdot 10^{-3}$ г/мл в образцах экстрактов ГВ и ФК соответственно; анализ морфологии, гранулометрического распределения и результатов сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) частиц в высушенных образцах; оценку размера, распределения по размерам и ζ -потенциала частиц ГК и ФК по данным метода DLS; определение элементного состава в остатке после высушивания ГК и ФК, а также качественный анализ методами ИК-Фурье, УФ-СФ и спектрофлуориметрии.

5. Обоснована необходимость применения DLS-метода в контроле дисперсности и электрокинетической стабильности м-РНК и ДНК-содержащих вакцин для человека и животных. Нами показано, что профилактическая «химерная» м-РНК вакцина против SARS-CoV-2 у человека (производство РФ) представляет собой нановакцину с размерами частиц вектора-аденовируса **100 нм (вектор 1) и 140 нм (вектор 2)**. Анализ тестового образца профилактической вакцины с вирусоподобными частицами содержит устойчивые ($\xi = -69 \text{ mV}$), монодисперсные частицы (PDI=0,26) с гидродинамическим размером **349 нм**. Данный факт может, предположительно, определять преимущество VLP-вакцины в условиях развития иммуногенности/реактогенности. ИБЛП для животных представляют собой ДНК-вакцины с микронными размерами устойчивых инактивированных микробных частиц.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

АК	активированный комплекс
АМ	аналитическая методика
АР	ассимиляционный потенциал
АФС	активная фармацевтическая субстанция
ЛД	лазерная дифракция
ОФС	официальная фармакопейная статья
ФС	фармацевтическая субстанция
ЛВ	лекарственное вещество
ЛО	лазерное затемнение
ВД	бидистиллированная вода
Mxf HCl	моксифлоксацин гидрохлорид
АК	переходный/активированный комплекс
<i>n</i> КИЭ	<i>нормальный</i> кинетический изотопный эффект
ЖЛФ	жидкая лекарственная форма
ГВ	гумусовые вещества
НП	низкоминерализованные пелоиды
ПС	полидисперсные системы
ГК	гуминовые кислоты
ФК	фульвокислоты
СЭМ	сканирующая электронная микроскопия
ДС ПП	дисперсные системы природного происхождения
РФА	рентгенофлуоресцентный анализ
Фурье-ИКС	Фурье- инфракрасный спектрометр УФ-
СФ	ультрафиолетовая спектрофотометрия
СПФЛ	спектрофлуориметрия
ИБЛП	иммунобиологические лекарственные препараты

РАЧ	рекомбинантные аденовирусные частицы
ЭМИ	электромагнитное излучение
DLS	динамическое светорассеяние
VLP	<i>virus-like particles</i> вирусоподобные частицы
Digital-M	цифровая микроскопия
LALLS	малоугловое рассеяние лазерного света

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Gobyzov , O.A. Comparative analysis of the dispersion quality of oxymetazoline nasal sprays / O. A. Gobyzov , M.N. Ryabov, V.G. Yankova, S.V. Griбанова, N.K. Slonskaya, I.L. Udyanskaya, A.A. Zhukova, V.Y. Gridoryeva // Pharm Technol Res. – 2022. - V 13 (1). - P. 30 – 37.
2. Новик, Е.С. Методы оценки размера частиц в фармацевтической отрасли / Е. С. Новик, А. В. Доренская, Н. А. Борисова, О. В. Гунар // Научно-практический журнал / ММА им. И. М. Сеченова, Российский центр фармацевтической и медико-технической информации. — 2017. — Т 66 (3). - С. 8-11.
3. Bonaccorso, A. Clozapine, neutropenia and Covid-19: should clinicians be concerned? 3 months report / A. Ricciardi, S. Ouabbou, C. Theleritis, A. Ross-Michaelides, A. Metastasio, N. Stewart, M. Mohammed, F.Schifano // Brain Behav Immun Heath. – 2021. – V 14. - P. 100212.
4. Michael, J. Engineering precision nanoparticles for drug delivery / M. Margaret, R. Billingsley , M Haley , M. E. Wechsler, A. Nicholas, A. Peppas , R. Langer // Rev Drug Discov. – 2021. - V 20(2). - P. 101-124.
5. Moser, F. BEAN: Brain Extraction and Alignment Network for 3D Fetal Neurosonography / R. Huang, W.P. Bartlomiej, A.L. Namburete // NeuroImage. – 2022. - V 258. - P. 119341.
6. Igushi, T. Investigation of low-angle laser light scattering patterns using the modified Twomey iterative method for particle sizing /T. Igushi, H. Yoshida // Rev Sci Instrum. – 2011. – V 82(1). - P.015111.
7. Pleteneva, T.V. Vedomosti SCEMA // T.V Pleteneva, P.I. Popov, A.V. Syroeshkin. - 2007. - V 4. - P. 104.
8. The State Pharmacopoeia of the Russian Federation. - 2015. Available at: <http://femb.ru/feml> (in Russian)].
9. Reitz, E. Solid crystal suspensions containing griseofulvin-preparation and bioavailability testing // Eur J Pharm Biopharm. - 2013. - V 83(2). - P.193—202.

10. Успенская, Е.В. Фармакопейные методы определения размера частиц. Метод лазерной дифракции света в контроле гетерогенности / Е.В. Успенская, А.В. Сыроешкин, Т.В. Плетенева, В.И. Добровольский // Пульс. – 2016. - С. 112-114.
11. Striegel, A.M. Absolute molar mass determination in mixed solvents. 1. Solving for the SEC/MALS/DRI "trivial" case / A.M. Striegel, P Sinha // Anal Chim Acta. – 2019. - V 11(1053). - P. 186-195.
12. Rogstad, S. Modern analytics for synthetically derived complex drug substances: NMR, AFFF-MALS, and MS tests for glatiramer acetate. / S. Rogstad, E. Pang, C. Sommers, M. Hu, X. Jiang, D.A. Keire, M.T. Boyne // .Anal Bioanal Chem. - 2015. - V 407(29). - P.8647-59.
13. Cai, P.C. Dynamic light scattering microrheology for soft and living materials / P.C. Cai, B.A. Krajina, M.J. Kratochvil, L. Zou, A. Zhu, E.B. Burgener, P.L. Bollyky, C.E. Milla, M.J. Webber, A.J. Spakowitz, S.C. Heilshorn // Soft Matter. – 2021. - V 17(7). - P.1929-1939.
14. Panday, N.H. Dynamic Light Scattering: A New Noninvasive Technology for Neonatal Heart Rate Monitoring. Gangaram / T. van Essen, T. G. Goos, R.C.J de Jonge I.K.M. Reiss, W, van Weteringen // Neonatology. – 2020. - V 117(3). - P.279-286.
15. Roberge, E.J. Application of Voltage in Dynamic Light Scattering Particle Size Analysis. Ren T / E.J. Roberge, J.R. Csoros, W.R. Seitz, E.R.M. Balog, J.M.J. Halpern // Vis Exp. – 2020. – V 24(155). - P.10.3791- 60257.
16. Liu, Z. Detecting zeta potential of polydimethylsiloxane (PDMS) in electrolyte solutions with atomic force microscope /Z. Liu, Y. Song, D.J. Li // Colloid Interface Sci. – 2020. – V 15(578). - P.116-123.
17. Khademi, M. Zeta Potential of Poly (methyl methacrylate) (PMMA) in Contact with Aqueous Electrolyte-Surfactant Solutions / M. Khademi, W. Wang, W. Reitingner, D.P.J. Barz // Langmuir. – 2017. - V33(40). - P.10473-10482.

18. Yang, G. Causal inference methods for vaccine sieve analysis with effect modification / G. Yang, L.B. Balzer, D. Benkeser // *Stat Med.* - 2022. – V 41(8). - P. 1513-1524.
19. ОФС. 1. 1. 0015.15 Ситовой анализ. Государственная фармакопея Российской Федерации (ГФ РФ) XIV.
20. Zhang, Y. Sieve-through vertical flow platform for efficient liquid exchange in particle-based assays / Y. Zhang, DYS. Lee, A. Farwin, JY. Ying // *Anal Chim Acta.* – 2019. - V 1051. - P. 94-102.
21. Nousheen, R. Comprehensive analysis of spatial distribution of microplastics in Rawal Lake, Pakistan using trawl net and sieve sampling methods / R. Nousheen, I. Hashmi, D. Rittschof, A Capper // *Chemosphere.* – 2022. - V 308. - P. 136111.
22. Sendra-Garcia, A. Quantitative and qualitative control of antineoplastic preparations: Gravimetry versus HPLC / A. Sendra-Garcia, M.A. Martinez-Gomez, A. Albert-Mari, N.V. Jimenez-Torres, M.J. Climente-Marti // *Oncol Pharm Pract.* – 2019. - V 25(5). – P. 1204-1216.
23. Miura, T. Precise Purity Analysis of High-Purity Lanthanum Oxide by Gravimetric Analysis Assisted With Trace Elemental Analysis by Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry / T. Miura, A. Wada // *Front Chem.* – 2022. – V 15 (10). - P. 888636.
24. Monaco, C. In vitro 3D and gravimetric analysis of removed tooth structure for complete and partial preparations / C. Monaco, A, Arena, J. Stelemekaite, E. Evangelisti, P.J. Baldissara // *Prosthodont Res.* – 2019. – V 63(2). - P. 173-178.
25. Arafat, M. Comparison between Branded and Generic Furosemide 40 mg Tablets Using Thermal Gravimetric Analysis and Fourier Transform Infrared Spectroscopy / M. Arafat, K.M. Faelelbom, M.K. Sarfraz, M.F. Bostanudin, Q.U. Sharif, A. Esmaeil, O.A. Al Hanbali, S.J. Aburuz // *Pharm Bioallied Sci.* – 2020. - V 12(4). – P. 489-498.
26. Liem, L.E. Gravimetric Quantification of Hydrophobic Fulvic Acids in Lignite Material Using Acetone / L.E. Liem, T. Serben, M.J. Cano // *AOAC Int.* – 2019. – V 102(6). – P. 1901-1907.

27. O'Connor, S. Gravimetric Analysis of Particulate Matter using Air Samplers Housing Internal Filtration Capsules / S. O'Connor, P.F. O'Connor, H.A. Feng, K. Ashley // *Gefahrst Reinhalt Luft*. - 2014. - V 74(10). – P. 403-410.
28. Nalecz-Jawecki, G. Influence of Selected Antidepressants on the Ciliated Protozoan *Spirostomum ambiguum*: Toxicity, Bioaccumulation, and Biotransformation Products / G. Nalecz-Jawecki, M. Wawryniuk, J. Giebultowicz, A. Olkowski, A. Drobniewska // *Molecules*. – 2020. - V 25(7). – P. 1476.
29. Boscaro, V. Symbiont replacement between bacteria of different classes reveals additional layers of complexity in the evolution of symbiosis in the ciliate *Euplotes* / V. Boscaro, I. S. Fokin, G. Petroni, F. Verni, P. J. Keeling // *Protist*. – 2018. – V 169. – P. 43–52.
30. Mukhtar, I. Transcriptome Profiling Revealed Multiple *rquA* Genes in the Species of *Spirostomum* (Protozoa: Ciliophora: Heterotrichea) / I. Mukhtar, S. Wu, S. Wei, R. Chen, Y. Cheng, C. Liang, J. Chen // *Front Microbiol*. – 2021. - V 5 (11). - P.574285.
31. Marukhlenko, A.V. Chelation of Zinc with Biogenic Amino Acids: Description of Properties Using Balaban Index, Assessment of Biological Activity on *Spirostomum Ambiguum* Cellular Biosensor, Influence on Biofilms and Direct Antibacterial Action / A.V. Marukhlenko, M.A. Morozova, A.M.J. Mbarga, N.V. Antipova, A.V. Syroeshkin, I.V. Podoprigrora, T.V. Maksimova // *Pharmaceuticals*. – 2022. - V 15(8). – P. 979.
32. Nalecz-Jawecki, G. Spirotox-Spirostomum ambiguum acute toxicity test-10 years of experience / G. Nalecz-Jawecki // *Environ. Toxicol*. – 2004. - V 19(4). - P. 359—64.
33. Злацкий, И.А. Использование *Spirostomum Ambiguum* для определения токсичности лекарственных средств / И.А. Злацкий // *Пульс*. – 2016.
34. ОФС. 1. 4. 1. 0001.15 Лекарственные формы. Государственная фармакопея Российской Федерации (ГФ РФ) XIV.
35. Dey, N. Modulation of Excited-State Proton-Transfer Dynamics inside the Nanocavity of Microheterogeneous Systems: Microenvironment-Sensitive Förster

- Energy Transfer to Riboflavin / N. Dey, D. Biswakarma, A. Bajpai, J.N. Moorthy, S. Bhattacharya // *Chemphyschem.* – 2019. V 20(6). – P. 881-889.
36. Smith, W.C. Impact of particle flocculation on the dissolution and bioavailability of injectable suspensions / W.C. Smith, J. Bae, Y. Zhang, B. Qin, Y. Wang, D. Kozak, M. Ashraf, X. Xu // *Int J Pharm.* – 2021. V 15 (604). – P. 120767.
37. ОФС. 1. 4. 1. 0014.15 Суспензии. Государственная фармакопея Российской Федерации (ГФ РФ) XIV.
38. Yousaf, S.S. Impact of nanosizing on the formation and characteristics of polymethacrylate films: micro- versus nano-suspensions / S.S. Yousaf, A. Isreb, I. Khan, E. Mewsiga, A. Elhissi, W. Ahmed, M.A. Alhnan // *Pharm Dev Technol.* – 2021. – V 26(7). – P. 729-739.
39. Salzmann, B.B.V. Oriented Attachment: From Natural Crystal Growth to a Materials Engineering Tool / B.B.V. Salzmann, M.M. van der Sluijs, G. Soligno, D. Vanmaekelbergh // *Acc Chem Res.* - 2021. – V 54(4). – P. 787-797.
40. ОФС. 1. 4. 1. 0017.15 Эмульсии. Государственная фармакопея Российской Федерации (ГФ РФ) XIV.
41. Wang, Y. Multilayer-Stabilized Water-in-Water Emulsions / Y. Wang, J. Yuan, S. Dong, J. Hao // *Langmuir.* – 2022. - V 38(15). – P. 4713-4721.
42. Fritz, V. A comparison of emulsifiers for the formation of oil-in-water emulsions: stability of the emulsions within 9 h after production and MR signal properties / V. Fritz, P. Martirosian, J. Machann, R. Daniels, F. Schick // *MAGMA.* – 2022. - V 35(3). – P. 401-410.
43. Salminen, H. Formation and stability of emulsions stabilized by Quillaja saponin-egg lecithin mixtures / H. Salminen, S. Bischoff, J.J. Weiss // *Food Sci.* - 2020. - V 85(4). – P. 1213-1222.
44. Hajhosseini, A. Stress response and characterization of oil-in-water emulsions stabilized with *Kluyveromyces marxianus* mannoprotein. A. Hajhosseini, D. Doroud, A. Sharifan, Z.J. Eftekhari // *Food Sci.* – 2021. – V 86(2). – P. 454-462.

- 45.ОФС. Пены. Государственная фармакопея Российской Федерации (ГФ РФ) XIV.
- 46.Oraby, A. Foam fractionation methods in aerobic fermentation processes / A. Oraby, I. Weickardt, S. Zibek // *Biotechnol Bioeng.* – 2022. – V. 119(7). -P.1697-1711.
- 47.Chang, R.Y.K. Overcoming challenges for development of amorphous powders for inhalation / R.Y.K. Chang, L. Chen, D. Chen, H.K. Chan // *Expert Opin Drug Deliv.* – 2020. - V 17(11). – P. 1583-1595.
- 48.ОФС. 1. 4. 1. 0010.15 Порошки. Государственная фармакопея Российской Федерации (ГФ РФ) XIV.
- 49.Stradner, A. Potential and limits of a colloid approach to protein solutions / A. Stradner, P. Schurtenberger // *Soft Matter.* – 2020. – V 16(2). – P. 307-323.
- 50.Sun, Y. Tyndall-Effect-inspired assay with gold nanoparticles for the colorimetric discrimination and quantification of mercury ions and glutathione / Y. Sun, K. Yuan, X. Mo, X. Chen, Y Deng, C Liu, Y Yuan, J . Nie, Y. Zhang // *Talanta.* – 2022. – V 238(P1). – P. 122999.
- 51.Bramham, J.E. Stability of a high-concentration monoclonal antibody solution produced by liquid-liquid phase separation / J.E. Bramham, S.A. Davies, A. Podmore, A.P. Golovanov // *MAbs.* – 2021. – V 13(1). – P. 1940666.
- 52.Bramham, J.E. Stability of a high-concentration monoclonal antibody solution produced by liquid-liquid phase separation / J.E. Bramham, S.A. Davies, A. Podmore, A.P. Golovanov // *MAbs.* – 2021. – V 13(1). – P. 1940666.
- 53.Guimaraes, L.E. Vaccines, adjuvants and autoimmunity / L.E. Guimaraes, B. Baker, C. Perricone, Y. Shoenfeld // *Pharmacol Res.* – 2015. – V 100. – P.190-209.
- 54.Celis-Giraldo, C.T. Nanovaccines against Animal Pathogens: The Latest Findings / C.T. Celis-Giraldo, J. Lopez-Aban, A. Muro, M.A. Patarroyo, R. Manzano-Roman // *Vaccines (Basel).* – 2021. – V 9(9) – P. 988.
- 55.Liao, Z. Self-adjuvanting cancer nanovaccines / Z. Liao, J. Huang, P.C. Lo, J.F. Lovell, H. Jin, K.J. Yang // *Nanobiotechnology.* – 2022. – V 20(1). - P. 345.

56. Maina, T. W. Applications of Nanovaccines for Disease Prevention in Cattle / T.W. Maina, E.A. Grego, P.M. Boggiatto, R. E. Sacco, B. Narasimhan J. L. McGill // *Front Bioeng Biotechnol.* – 2020. – V 8. – P. 608050.
57. McGill, P. Reducing challenging behaviour of adults with intellectual disabilities in supported accommodation: A cluster randomized controlled trial of setting-wide positive behaviour support / P. McGill, L. Vanono, W. Clover, E. Smyth, V. Cooper, L. Hopkins, N. Barratt, C. Joyce, K. Henderson, S. Sekasi, S. Davis, R. Deveau // *Res Dev Disabil.* – 2018. – V 81. – P. 143-154.
58. Chenthamara, D. Therapeutic efficacy of nanoparticles and routes of administration / D. Chenthamara, S. Subramaniam, S. G. Ramakrishnan, S. Krishnaswamy, M. M. Essa, F. H. Lin, M. W. Qoronfleh // *Biomater Res.* – 2019. – V 23. – P. 20.
59. Wagner-Muniz, D. A. Room Temperature Stable PspA-Based Nanovaccine Induces Protective Immunity / D. A. Wagner-Muniz, S. L. Haughney, S. M. Kelly, M. J. Wannemuehler, B. Narasimhan // *Front Immunol.* – 2018. – V 9. – P. 325.
60. Lee, D. A calcium- and light-gated switch to induce gene expression in activated neurons / D. Lee, J. H. Hyun, K. Jung, P. Hannan, H. B. Kwon // *Nat Biotechnol.* – 2017. – V 35 (9). – P. 858-863.
61. Liu, Y. Aerodynamic analysis of SARS-CoV-2 in two Wuhan hospitals / Y. Liu, Z. Ning, Y. Chen, M. Guo, Y. Liu, N. K. Gali, Li, Sun, Y. Duan, J. Cai, D. Westerdahl, X. Liu, K. Xu, K. F. Ho, H. Kan, Q. Fu, K. Lan // *Nature.* – 2020. – V 582 (7813). – P. 557-560.
62. Maina, T.W. Applications of Nanovaccines for Disease Prevention in Cattle / T.W. Maina, E.A. Grego, P.M. Boggiatto, R.E. Sacco, B. Narasimhan, J.L. McGill // *Front Bioeng Biotechnol.* – 2020. – V 8. – P. 608050.
63. Kumar, S. Physiochemical, Optical and Biological Activity of Chitosan-Chromone Derivative for Biomedical Applications / S. Kumar, J. Koh // *Int. J. Mol. Sci.* - 2012. - V 13. - P. 6102–6116.
64. Somlyai, G. Structural homologies between phenformin, lipitor and gleevec aim the same metabolic oncotarget in leukemia and melanoma / G. Somlyai, T. Q.

- Collins, E. J. Meuillet, P. Hitendra, D. P. D'Agostino, L. G. Boros // *Oncotarget*. – 2017. – V 8 (30). - P. 50187 – 50192.
65. Ульянцев, А.С. Разработка лазерного метода определения подлинности ЖЛФ / АС Ульянцев. - 2010. – С. – 23.
66. Fisher, P. Adequacy of laser diffraction for soil particle size analysis / P. Fisher, C. Aumann, K. Chia, N. O'Halloran, S. Chandra // *PLoS One*. – 2017. – V. 12 (5). – P. 20.
67. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIII издание – 2015.
68. Storti, F. Particle size distributions by laser diffraction: sensitivity of granular matter strength to analytical operating procedures / F. Storti, F. Balsamo // *Solid Earth*. – 2010. – V.1. – P. 25–48.
69. Ульянцев, А.С. Разработка лазерного метода определения подлинности ЖЛФ / АС Ульянцев. - 2010. – С. 23.
70. ОФС. 1. 2. 1. 0006.15 Флуориметрия. Государственная фармакопея Российской Федерации (ГФ РФ) XIV.
71. ОФС. 1. 2. 1. 0010.15 Рентгеновская флуоресцентная спектрометрия . Государственная фармакопея Российской Федерации (ГФ РФ) XIV.
72. Mahavir, J. Application of nanostructures in antimicrobial therapy / J. Mahavir, L. Sneh, K. Preeti, M. Tulika M // *Int J App Pharm*. - 2018. – V 10. – P.11.
73. Stom, D.I. The influence of pharmaceutical vermipreparations on the test-reaction of organisms of the different levels of the organization / D.I. Stom, V.A. Bybin, A.E. Balayan, M.N. Saksonov, V.P. Salovarova // *Pharmacogn Res*. – 2014. - V 6. – P. 195–8.
74. Xu, L.X. Biophysical mechanism of ultrafast helical twisting contraction in the giant unicellular ciliate *spirostomum ambiguum*/ L.X. Xu, M.S. Bhamla // *bioRxiv*. – 2019. V 25. – P.1-10.
75. Goncharuk, V.V. Quasichemical description of the cell death kinetics of cellular biosensor *Spirostomum ambigua* for testing the biological activity of aqueous solutions / V.V. Goncharuk, A.V. Syroeshkin, I.A. Zlatskiy, E.V. Uspenskaya, A.V.

- Orekhova, O.V. Levitskaya, V.I. Dobrovolskiy, T.V. Pleteneva // J Water Chem Tech. - 2017. V 39. – P. 97–102.
76. Сыроешкин, А.В. Современные методы мониторинга загрязнения абиотических объектов морской среды / А.В. Сыроешкин, С.Г. Орадовский, М.Ю. Яблоков, И.С. Матвеева, М.В. Колесников, В.Б. Лапшин // Труды ГОИН. – 2007. – № 210. – С. 126-137.
77. Резвых, Ю.А. Современные подходы к совершенствованию системы обеспечения и контроля качества лекарственных средств на региональном уровне / Ю.А. Резвых, Г.Н. Ковальская // Сиб. мед. журн. – 2012. – С. 7.
78. Shahram, E. Are Crystallinity Parameters Critical for Drug Solubility Prediction / E. Shahram, J. Abolghasem, V. Hadi, S. Ali // Journal of Solution Chemistry. – 2015. V 44. – P. 2297–2315.
79. Гильдеева, Г. Н. Полиморфизм: влияние на качество лекарственных средств и Актуальные методы анализа. Качественная клиническая практика. – 2017. № 1. – С. 56-60.
80. Аксенова, В.В. Влияние механоактивации на состав, структуру и физико-химические свойства креатина и креатинина. Химическая физика и мезоскопия / В.В. Аксенова, О.М. Канунникова, О.В. Карбань, А.А. Суслов, В.И. Ладьянов, К.А. Тукмачева, Н.Н. Чучкова, М.В. Сметанина. - 2019. - № 19(4). – P. 626-63.
81. Petrikova, E. Influence of active pharmaceutical ingredient structures on Hansen solubility parameters / E. Petrikova, J. Patera, O. Gorlova // Eur J Pharm. – 2021. – V 167. – P. 106016.
82. Savjani, K.T. Drug Solubility: Importance and Enhancement Techniques. International Scholarly Research / K.T. Savjani, A.K. Gajjar A.K, J.K. Savjani // Network ISRN Pharmaceutics. - 2012.
83. Солдатов, А.И. Структура и свойства поверхности углеродных материалов // Вестник ЧелГУ. – 2001. V 1. – P.155-163.
84. Christel, A.S. Computational prediction of drug solubility in water-based systems: Qualitative and quantitative approaches used in the current drug discovery and

- development setting / A.S. Christel, B.P. Larsson // International Journal of Pharmaceutics. – 2018.- V 540 (1–2). – P.185-193.
- 85.ОФС.1.2.1.0005.15 «Растворимость» Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV издание.
- 86.Успенская, Е.В. Методы лазерного светорассеяния в контроле качества водных растворов фармацевтических субстанций и вспомогательных веществ (докторская). – 2018.
- 87.Uspenskaya, E.V. Evaluation of poorly soluble drugs' dissolution rate by laser scattering in different water isotopologues / E.V. Uspenskaya, T.V Pleteneva, I.V. Kazimova, A.V Syroeshkin // Molecules. - 2021.
- 88.Zhaolin, L. Particle Morphology Analysis of Biomass Material Based on Improved Image Processing Method // Int J Anal Chem.– 2017; Article ID 5840690, 9 pages
- 89.Henry, N.C. Diffraction before destruction // B Biol Sci. – 2014. - V 17. – P. 1-13.
- 90.Anfimova, E.V. Solubility kinetics of drugs studied by LALLS method in water solutions with various hydrogen isotope content / E.V. Anfimova, E. V. Uspenskaya, T.V. Pleteneva, A.V. Syroeshkin // Drug development & registration. – 2017. - V 1. – P. 150-15.
- 91.Guidance for Industry. Process Validation: General Principles and Practices”, U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration, USA. – 2011.
92. Abrao, L. C. C. Toxicological analyses: analytical method validation for prevention or diagnosis / L.C.C. Abrao, A. T. Silveira, H. D. Faria, S. C. Machado, T. V. Mendes, R. V. Placido, L. P. A. Marciano, I. Martins // Toxicol Mech Methods. – 2021. V 31(1). – P. 18-32
- 93.ОФС.1.1.0012.15 «Валидация аналитических методик». Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV издание [Электронный ресурс]. – М.: Министерство здравоохранения Российской Федерации. – 2018.
- 94.Uspenskaya, E.V. Role of stable hydrogen isotope variations in water for drug dissolution managing / E.V. Uspenskaya, T.V Pleteneva, A.V Syroeshkin, I.V

- Kazimova, T.E. Elizarova, A.I. Odnovorov // *Current Issues in Pharmacy and Medical Sciences.* - 2020.
- 95.Owens, K. Exploring the Relationship of Drug BCS Classification, Food Effect, and Gastric pH-Dependent Drug Interactions / K. Owens, S. Argon, J. Yu, X. Yang, F. Wu, S.C. Lee, W.J. Sun, A. Ramamoorthy, L. Zhang, I. Ragueneau-Majlessi // *AAPS J.* – 2021. – V 24(1). – P. 16.
- 96.Vorland, C. J. Re-Analysis and Additional Information Needed to Inform Conclusions. Comment on Halenova et al. Deuterium-Depleted Water as Adjuvant Therapeutic Agent for Treatment of Diet-Induced Obesity in Rats / C. J. Vorland, X. Chen, D. E. Chusyd, L. M. Mestre, S. L. Dickinson, D. B. Allison, A. W. Brown // *Molecules.* - 2020. – V 25. – P. 23.
- 97.Olsen, G.L. Sensitivity-enhanced three-dimensional and carbon-detected two-dimensional NMR of proteins using hyperpolarized water / G. L. Olsen, O. Szekely, B. Mateos // *J Biomol NMR.* – 2020. – V 74. – P. 161–171.
98. Potters, G. Stress- induced morphogenic responses: growing out of trouble / G. Potters, T.P. Pasternak, Y. Guisez, K. J. Palme, M. A. K. Jansen // *Trends Plant Sci.* – 2007. -V 12(3). – P. 98 – 105.
- 99.Laidler, K.J. The development of Transition-State Theory / K.J. Laidler, M.C. King // *J. Phys. Chem.* – 1983.– V 87(15).
- 100.Polanyi, J.C. Some concepts in reaction dynamics / J.C. Polanyi // *Science.* – 1987. – V 236. –P.680–690.
- 101.Kresge, A. J. The kinetics of isotope exchange reactions: Use of initial rates to measure isotope effects on carbon acid ionization / A.J. Kresge, M.F. Powell // *Int. J. Chem. Kinet.* – 1982. – V 14. – P. 19-34.
- 102.Parmar, K. Increase in Dissolution Rate of Zotepine via Nanomilling Process - Impact of Dried Nanocrystalline Suspensions on Bioavailability / K. Parmar, K. Oza // *AAPS PharmSciTech.* - 2021. – V 23(1). – P. 20.
- 103.Castillo, J.G.D. Community-acquired pneumonia: selection of empirical treatment and sequential therapy. SARS-CoV-2 implications / J. G. D. Castillo, A. Julian-Jimenez, F. J. Candel // *ev Esp Quimioter.* – 2021. - V 34(6). – P. 599-609.

104. Яковлев В.П. Моксифлоксацин – новый антимикробный препарат из группы фторхинолонов. Фототоксичность / Яковлев В.П., Яковлев С.В
105. El-Aziz H.A. Concurrent estimation of some co-administered antimicrobial drugs applying conventional and first derivative synchronous fluorescence spectroscopy techniques / H.A. El-Aziz, M.E. Fathy, N. El-Enany, F.A. Aly, M.M. Tolba // *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc.* – 2022. – V 5. – P. 264.
106. Zech, W. Factors controlling humification and mineralization of soil organic matter in the tropics. *International Humic Substance Society* / W. Zech, N. Senesi, G. Guggenberger, K. Kaiser, J. Lehmann, T.M. Miano, A. Miltner, G. Schroth // *Geoderma.* – 1997. - V 79. P. 117-16.
107. Zanin, L. Humic Substances Contribute to Plant Iron Nutrition Acting as Chelators and Biostimulants / L. Zanin, N. Tomasi, S. Cesco, Z. Varanini, R. Pinton // *Front Plant Sci.* – 2019. – V 22. – P. 675.
108. Wei, X. Zh Effects of Litterfall on the Accumulation of Extracted Soil Humic Substances in Subalpine Forests / X. Wei, Y. Yang, Y. Shen, Z. Chen, Y. Dong, F. Wu // *Front Plant Sci.* - 2020. V 5. – P. 254.
109. Li, Y. Characterization of Humic Substances in the Soils of *Ophiocordyceps sinensis* Habitats in the Sejila Mountain, Tibet: Implication for the Food Source of *Thitarodes* Larvae / Y. Li, L.X. Guo, Q.Z. Zhou, D. Chen, J.Z. Liu, X.M. Xu, J.H. Wang // *Molecules.* - 2019. - V 10. – P. 246.
110. Meng, F. Wang, H. Humic substances as a washing agent for Cd-contaminated soils/ F. Meng, G. Yuan, J. Wei, D. Bi, Y.S. Ok // *Chemosphere.* – 2017. - V 81. – P. 461-467.
111. Wnuk, E. The effects of humic substances on DNA isolation from soils / E. Wnuk, A. Wasko, A. Walkiewicz, P. Bartmiski, R. Bejger, L. Mielnik, L. A. Bieganowski // *PeerJ.* – 2020. - V. 24. – P. 9378.
112. Shah, Z.H. Humic Substances: Determining Potential Molecular Regulatory Processes in Plants / Z.H. Shah, H.M. Rehman, T. Akhtar, H. Alsamadany, B.T. Hamooh, T. Mujtaba, I. Daur, Y. Al Zahrani, H.A.S. Alzahrani, S. Ali, S.H. Yang, G. Chung // *Front Plant Sci.* - 2018. – V 13. – P. 263.

113. Zhernov, Y.V. Antiviral activity of natural humic substances and shilajit materials against HIV-1: Relation to structure / Y.V. Zhernov, A.I. Konstantinov, A. Zherebker, E. Nikolaev, A. Orlov, M.I. Savinykh, G.V. Kornilaeva, E.V. Karamov, I.V. Perminova // *Environ Res* 2021, *193*, 110312.
114. Lomovskiy, I. Mechanochemical and Size Reduction Machines for Biorefining / I. Lomovskiy, A. Bychkov, O. Lomovsky, T. Skripkina // *Molecules*. - 2020. – V 16. – P. 5345.
115. Hafez, M. Humic substances as an environmental- friendly organic wastes potentially help as natural anti-virus to inhibit COVID-19 / M. Hafez, A.I. Popov, V.N. Zelenkov, T.V. Teplyakova, M. Rashad, M // *Science Archives*. - 2020. – V 1. – P. 53-60.
116. Xu, K. Fine structure, physicochemical and antioxidant properties of LM-pectins from okra pods dried under different techniques / K. Xu, M.M. Martinez, B. Yang, M. Guo // *Carbohydr Polym*. – 2020. - V 241. – P. 116272.
117. Hunger, K. Review of Progress in Coloration and Related Topics. The effect of crystal structure on colour application properties of organic pigments. - 2008. – V 29. – P. 71-84.
118. Odnovorov, A. I. Physicochemical properties and biological hysicochemical properties and Hysicochemical properties and biological activity of the new antiviral substance / A. I. Odnovorov, T. V. Grebennikova, T. V. Pleteneva, T. M. Garaev, E. V. Uspenskaya, N. A. Khodorovich, O.V. Levitskaya, A.M. Koldina, A. M // *Int J App Pharm*. - 2020. V 12. – P. 237-242.
119. Ismatullaev, A. Evaluation of bond strength of resin cement to Er:YAG laser-etched enamel and dentin after cementation of ceramic discs / A. Ismatullaev, S. Taşın, A. Usumez // *Lasers Med Sci*. – 2021. – V 36. P. 447-454.
120. Mondal, H. Development of a Low-cost Smartphone-connected Digital Microscope / H. Mondal, S. Mondal, K. Saha, B. Roul // *J Microsc Ultrastruct*. - 2019. – V 29. – P. 51-54.

121. Zanin, L. Humic Substances Contribute to Plant Iron nutrition Acting as Chelators and Biostimulants / L. Zanin, N. Tomasi, S. Cesco, Z. Varanini, R. Pinton // *Front Plant Sci.* - 2019. V 10. – P. 675.
122. Fuentes, M. Main binding sites involved in Fe (III) and Cu(II) complexation in humic-based structures / M. Fuentes, M. Olaetxea, R. Baigorri, A.M. Zamarreno, P. Etienne, P. Laine // *Geochem. Exp.* - 2013. V 129. – P. 14–17.
123. Gerke, J. Solubilization of Fe(III) from humic-Fe complexes, humic/Fe-oxide mixtures and from poorly ordered Fe-oxide by organic acids - consequences for P adsorption / J. Gerke // *Z. Pflanzenernahr. Bodenk.* – 1993. V 156. - P. 253–257.
124. Lucena, J. J. Fe chelates for remediation of Fe chlorosis in strategy I plants / J.J. Lucena // *J. Plant Nutr.* - 2003. – V 26. – P. 1969–1984.
125. Tomasi, N. Accumulation of nutrients in leaves of Fe-deficient cucumber plants treated with natural Fe-complexes / N. Tomasi, T. Mimmo, R. Terzano, M. Alfeld, K. Janssens, L. Zanin // *Biol Fert Soils.* - 2014. – V 50. – P. 973-982.
126. Gast, K. Dynamic and Static Light Scattering of Intrinsically Disordered Proteins / K. Gast, C. Fiedler, 2nd ed.
127. Uversky, V. Intrinsically Disordered Protein Analysis. Methods in Molecular Biology / V. Uversky, A. Dunker // Publisher: Springer, New York. – 2012. - V 896.
128. Tamborini, E. Multiangle static and dynamic light scattering in the intermediate scattering angle range Citation / E. Tamborini, L. Cipelletti // *Rev Sci Instrum.* – 2012. V 83. – P. 093106.
129. Vo, A. Analyzing ophthalmic suspension particle size distributions using laser diffraction: Placebo background subtraction method / A. Vo, X. Feng, W.C. Smith, D. Zhu, M. Patel, D. Kozak, Y. Wang, J. Zheng, M. Ashraf, X. Xu // *Int J Pharm.* – 2021. - V 1. – P. 120401.
130. Ishmatov, A.N. The low-angle laser light scattering method in the study of pulse liquid atomization / A.N. Ishmatov, I.R. Akhmadeev // *Atmos Ocean Opt.* - 2013. - V 26. – P. 444–448.

131. Uspenskaya, E.V. Evaluation of Poorly Soluble Drugs' Dissolution Rate by Laser Scattering in Different Water Isotopologues / E.V. Uspenskaya, T.V. Pleteneva, I.V. Kazimova, A.V. Syroeshkin // *Molecules*. - 2021. - V 26. – P. 601.
132. Zhdanov, V.P. How the partial-slip boundary condition can influence the interpretation of the DLS and NTA data/ V.P. Zhdanov // *J Biol Phys*. - 2020. – V 46. – P. 169-176.
133. Phanse, Y. Analyzing Cellular Internalization of Nanoparticles and Bacteria by Multi-spectral Imaging Flow Cytometry / Y.Phanse, A.E. Ramer-Tait, S.L. Friend, B. Carrillo-Conde, P. Lueth, C. J. Oster, G.J. Phillips, B. Narasimhan, M. J. Wannemuehler, B. H. Bellaire // *Vis. Exp*. – 2012. - V 64. P. 3884.
134. Graczyk, A. Gold Nanoparticles in Conjunction with Nucleic Acids as a Modern Molecular System for Cellular Delivery / A. Graczyk, R. Pawlowska, D. Jedrzejczyk, A. Chworos // *Molecules*. - 2020. - V 25. – P. 204.
135. Bayda, S. The History of Nanoscience and Nanotechnology: From Chemical–Physical Applications to Nanomedicine / S. Bayda, M. Adeel, T. Tuccinardi, M. Cordani, F. Rizzolio // *Molecules*. – 2020. -V 25. – P. 112.
136. Syroeshkin, A.V. Mechanical Transformation of Compounds Leading to Physical, Chemical, and Biological Changes in Pharmaceutical Substances / A.V. Syroeshkin, E.V. Uspenskaya, T.V. Pleteneva, M.A. Morozova, I.A. Zlatskiy, A.M. Koldina, M.V. Nikiforova // *Sci. World. J*. – 2018. – V. 8. – P. 8905471.
137. Ph. Eur. 10.0: EDQM, 2019; Volume 2.2.32, pp. 39–42.
138. Kumar, S. Physiochemical, Optical and Biological Activity of Chitosan-Chromone Derivative for Biomedical Applications / S. Kumar, J. Koh // *Int. J. Mol. Sci*. - 2012. - V 13. – P. 6102-6116.
139. Lim, S.F. Characterization of copper adsorption onto an alginate encapsulated magnetic sorbent by a combined FT-IR, XPS, and mathematical modeling study / S.F. Lim, Y.M. Zheng, S.W. Zou, J.P. Chen // *Environ. Sci. Technol*. - 2008. - V 42. – P. 2551–2556.
140. Zeng, S. Enrichment of Polychlorinated Biphenyls from Aqueous Solutions Using Fe₃O₄ Grafted Multiwalled Carbon Nanotubes with Poly Dimethyl Diallyl

- Ammonium Chloride / S. Zeng, Y. Cao, W. Sang, T. Li, N. Gan, L. Zheng // *Int. J. Mol. Sci.* - 2012. – V 13. – P. 6382-6398.
141. Shi H, N.J. Quantitative Structure-Cytotoxicity Relationship of 3-(N-Cyclicamino)chromone / N.J.; Shi H, T. Sakatsume, K. Bandow, N. Okudaira, Y. Uesawa, H. Sakagami, M. Tomomura, A. Tomomura, K. Takao, Y. Sugita // *Derivatives. Anticancer Res.* – 2018. - V 38. – P. 4459-4467.
142. Lewandowski, W. Correlations between molecular structure and biological activity in "logical series" of dietary chromone derivatives / W. Lewandowski, H. Lewandowska, A. Golonko, G. Swiderski, R. Swislocka, M. Kalinowska // *PLoS One.* – 2020. - V 15. – P. 0229477.
143. Tang, Y. A coumarin derivative as a “turn-on” fluorescence probe toward Cd²⁺ in live cells. *Spectrochim* / Y. Tang, Y. Huang, Y. Chen, L. Lu, C. Wang, T. Sun, M. Wang, G. Zhu, Y. Yang, L. Zhang // *Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.* – 2019. - V 218. – P. 359–365.
144. Wani, M.A. Coumarin-pyrene conjugate: Synthesis, structure and Cu-selective fluorescent sensing in mammalian kidney cells / M.A. Wani, P.K. Singh, R. Pandey, M.D. Pandey // *J. Lumin.* – 2016. – V 171. – P. 159–165.
145. Yanar, U. A fluorescent coumarin-thiophene hybrid as a ratiometric chemosensor for anions: Synthesis, photophysics, anion sensing and orbital interactions / U. Yanar, B. Babur, D. Pekiymaz, I. Yahaya, B. Aydiner, Y. Dede, Z. Seferoglu // *J. Mol. Struct.* - 2016. – V 1108. – P. 269–277.
146. Huang, J. A New Coumarin-Acridone Compound as a Fluorescence Probe for Fe³⁺ and Its Application in Living Cells and Zebrafish / J. Huang, Z. Yan, P. Qiu, Y. Mo, Q. Cao, Q. Li, L. Huo, L. Zhao, L // *Molecules.* - 2021. – V 26. – P. 2115.
147. Zlatskiy, I. Dependence of Biocatalysis on D/H Ratio: Possible Fundamental Differences for High-Level Biological Taxons / I. Zlatskiy, T. Pleteneva, A. Skripnikov, T. Grebennikova, T. Maksimova, N. Antipova, O. Levitskaya, M. Makarova, I. Selivanenko, A. Syroeshkin // *Molecules.* - 2020. – V 25(18). – P. 4173.

148. Mukhtar, I. Transcriptome Profiling Revealed Multiple *rqaA* Genes in the Species of *Spirostomum* (Protozoa: Ciliophora: Heterotrichea) / I. Mukhtar, S. Wu, S. Wei, R. Chen, Y. Cheng, C. Liang, J. Chen // *Front Microbiol.* - 2021. - V 5. – P. 574285.
149. Patiha, H. The langmuir isotherm adsorption equation: the monolayer approach. IOP Conf Ser/ H. Patiha // *Mater Sci Eng.* – 2016. – V 107. – P. 012067.
150. Uspenskaya, E.V. Assessment of biology activity of the peeling substances by the physicochemical approaches on the *Spirostomum Ambiguum* cell model / E.V. Uspenskaya // *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences.* – 2021. – V 13 (7).
151. Uspenskaya, E.V. Nanodispersions of Polyelectrolytes Based on Humic Substances: Isolation, Physico-Chemical Characterization and Evaluation of Biological Activity / E.V. Uspenskaya, A.V. Syroeshkin, T.V. Pleteneva, I.V. Kazimova, T.V. Grebennikova, I.T. Fedyakina, V.V. Lebedeva, O.E. Latyshev, O.V. Eliseeva, V.F. Larichev, T.M. Garaev, T.V. Maximova, M.A. Morozova, P.M. Hanh // *Pharmaceutics.* – 2021. – V 13(11). – P.1954.
152. Goncharuk, V.V. Quasichemical description of the cell death kinetics of cellular biosensor *Spirostomum ambigua* for testing the biological activity of aqueous solutions / V.V. Goncharuk, A.V. Syroeshkin, I.A. Zlatskiy, E.V. Uspenskaya, A.V. Orekhova, O. V. Levitskaya, V. I. Dobrovolskiy, T.V. Pleteneva // *J Water Chem Tech.* – 2017. - V 39. – P.97–102.
153. Palumbo, G. Biostimulant Potential of Humic Acids Extracted From an Amendment Obtained via Combination of Olive Mill Wastewaters (OMW) and a Pre-treated Organic Material Derived From Municipal Solid Waste (MSW)/ G. Palumbo, M. Schiavon, S. Nardi, A. Ertani, G. Celano, C.M Colombo // *Front Plant Sci.* - 2018. - V 9. – P. 1028.
154. Gao, X. Bacterial outer membrane vesicle – based cancer nanovaccines / X. Gao, Q. Feng, J. Wang, X. Zhao // *Cancer Biol Med.* – 2022. - V 19(9). – P. 1290-1300.
155. Hironori, N. Development of COVID-19 vaccines utilizing gene therapy technology / N. Hironori // *Department of Health Development and Medicine,*

- Graduate School of Medicine, Osaka University, 2-2 Yamada-oka, Suita, Osaka 565-0871, Japan.
156. Pulendran, B. The science and medicine of human immunology / B. Pulendran, M.M. Davis // *Science*. – 2020. – V 369(65110). – P. 4014.
157. Bonam, S. R. An Overview of Novel Adjuvants Designed for Improving Vaccine Efficacy / S.R. Bonam, C. D. Partidos, S.K.M. Halmuthur, S.Muller // *Trends Pharmacol ci*. – 2017. – V 38(9). – P. 771-793.
158. Kennedy, M.A. Development and validation of a TagMan real-time reverse transcription – PCR for rapid detection of feline calicivirus / M.A. Kennedy, K.V. Thomas, R.P. Wilkes, M.M. Abd-Eldaim // *Arch Virol*. – 2009. – V 154 (4). – P. 555-60.
159. Nałecz-Jawecki, G. Spirotox-Spirostomum ambiguum acute toxicity test- 10 years of experience / G. Nałecz-Jawecki // *Environ Toxicol*. – 2004. – V. 19(4). – P. 359-364.
160. Levitskaya, O.V. Arrhenius kinetics as a bioactivity assessment criterion for drug substances and excipients / O.V. Levitskaya, A.V. Syroeshkin, T.V. Pleteneva // *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2016. – V. 49. - № 11. – P. 779-781.
161. Гончарук, В.В. Квазихимическое описание кинетики гибели клеточного биосенсора *Spirostomum ambiguum* для биологической активности водных растворов / В.В. Гончарук, А.В. Сыроешкин, И.А. Злацкий, Е.В. Успенская, О.В. Левицкая, В.И. Добровольский, Т.В. Плетенева // *Химия и технология воды*. – 2017. – Т.39. –№2. – С.178-187.
162. Cuiling, Z. Advances in mRNA Vaccines for Infectious Diseases / Z. Cuiling, M. Giuletta, S. Hu, L. – 2019.