

На правах рукописи

Колябина Екатерина Сергеевна

**РАЗРАБОТКА ЭКСПРЕСС-МЕТОДОВ КОНТРОЛЯ КАЧЕСТВА ЛЕКАРСТВЕННЫХ И
ПАРАФАРМАЦЕВТИЧЕСКИХ СРЕДСТВ, СОДЕРЖАЩИХ НАНОЧАСТИЦЫ
НА ОСНОВЕ СОЕДИНЕНИЙ СЕРЕБРА**

3.4.2 Фармацевтическая химия, фармакогнозия

АВТОРЕФЕРАТ

на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук

Москва – 2025

Диссертационная работа выполнена на кафедре фармацевтической и токсикологической химии медицинского института Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации.

Научный руководитель:

Максимова Татьяна Владимировна, доцент, кандидат фармацевтических наук, доцент кафедры фармацевтической и токсикологической химии медицинского института ФГАОУ ВО "Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы" Минобрнауки РФ.

Официальные оппоненты:

Сяткин Сергей Павлович, профессор, доктор биологических наук, профессор кафедры общей патологии и патологической физиологии имени В.А. Фролова ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы» Минобрнауки РФ.

Шпрах Зоя Сергеевна, доктор фармацевтических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории химико-фармацевтического анализа НИИ экспериментальной диагностики и терапии опухолей ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» МЗ РФ.

Вихарева Елена Владимировна, профессор, доктор фармацевтических наук, профессор кафедры аналитической химии ФГБОУ ВО «Пермская государственная фармацевтическая академия» МЗ РФ.

Защита диссертации состоится «__» _____ 2025 г. в _____ часов на заседании диссертационного совета ПДС 0300.021 на базе Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы» по адресу: 117198, Москва, ул. Миклухо-Маклая, 6.

С диссертацией можно ознакомиться в Научной библиотеке РУДН по адресу: 117198, Москва, ул. Миклухо-Маклая, д.6.

Электронная версия диссертации, автореферат и объявление о защите размещены на официальном сайте Высшей аттестационной комиссии при Министерстве образования и науки РФ (<http://vak.ed.gov.ru/>) и на сайте <https://www.rudn.ru/science/dissovet>.

Автореферат разослан «__» _____ 2025 г.

Ученый секретарь

диссертационного совета ПДС 0300.021

кандидат химических наук, доцент

Левицкая Ольга Валерьевна

Актуальность темы исследования. В настоящее время на фармацевтическом рынке широко представлен ряд серебросодержащих препаратов в различных лекарственных формах и вариантах связывания ионов серебра. Серебро вводят в состав препарата в виде частиц с органическим или неорганическим анионом, которые в водных растворах имеют склонность к образованию коллоидных частиц в наноразмерном диапазоне. Наиболее известны препараты на основе катионного серебра (Ag^+) (*Barras F. et al, 2018*), в том числе, в составе оксида серебра, солей серебра (нитратов, сульфатов, фосфатов), комплексов серебра (цитратов, лактатов), свободных аквакатионов серебра, препаратов на основе коллоидного серебра (*Xu L. et al, 2020*).

Всплеск публикационной активности с 2020 года, посвященной механизмам действия серебросодержащих препаратов, обусловлен созданием многообразных форм Ag -содержащих наночастиц широкого спектра применения, включая антибактериальное и противоопухолевое действие (*Zhao J. et al, 2023*). Особый интерес к серебросодержащим наночастицам формируется по причине распространения устойчивых к антибиотическим препаратам штаммов микроорганизмов (*Aldorkee S. Y. et al, 2023*). Неспецифический механизм действия наночастиц серебра приводит к проявлению антибактериальной (*Harada A. et al, 2023*), фунгицидной (*Li T. et al, 2022*) и противовирусной активности, в том числе, вирулицидной активности в отношении SARS-CoV-2 (*Silva D. J. et al, 2023*).

Разработаны системы доставки лекарств и диагностических систем с наночастицами серебра (*Pasparakis G., 2022*). Парафармацевтическая продукция, в том числе, средства по уходу за кожей и косметики, также содержат наночастицы серебра (*Ong W. T. J. et al, 2022*). Новые лекарственные и парафармацевтические средства, включающие в свой состав AgNP , требуют современных способов контроля качества.

Степень разработанности темы исследования. В соответствии с нормативными документами на «Серебра протеинат» и «Серебра протеинат, таблетки для приготовления раствора для местного применения» Государственной Фармакопеи РФ XV издания присутствие катионов серебра определяется путем проведения качественных реакций по образованию окрашенных осадков, а их количество – многостадийным титрованием по методу Кьельдаля. Используемые способы оценки качества остаются неизменными на протяжении большого количества времени, являясь при этом достаточно долгими и трудоемкими с точки зрения, как этапа пробоподготовки, так и отказа от использования более быстрых современных инструментальных методов анализа. По этой причине разработка методики оценки качества серебросодержащих препаратов представляется актуальной и необходимой. В диссертационном исследовании данный вопрос решен путем введения новой комбинации экспрессных инструментальных физико-химических и хеометрических методов. Внедрение такого подхода в

фармацевтический анализ дает возможность не только качественного и количественного определения серебра в различных его формах, но и контроля размеров серебросодержащих частиц дисперсной фазы (в том числе в непрозрачных средах) с целью выявления фальсификата и бракованной продукции, поскольку размер и форма наночастиц влияет на биологическую активность. Кроме этого, монодисперсность частиц обеспечивает равномерность дозирования лекарственной формы.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности. Диссертационная работа соответствует паспорту научной специальности 3.4.2 Фармацевтическая химия, фармакогнозия по следующим областям исследования:

п.2. Формулирование и развитие принципов стандартизации и установление нормативов качества, обеспечивающих терапевтическую активность и безопасность лекарственных средств.

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

Объект исследования. *Объектами* диссертационного исследования выступили готовые лекарственные формы; биологически активные добавки (БАДы); медицинские изделия протеината серебра, реализуемые через аптеки; субстанции протеината серебра стандартного образца (RS) и серебра нитрата (марки ХЧ); полиакрилатные лакокрасочные покрытия и высокоочищенный парафин, содержащие наночастицы серебра.

Предмет исследования. *Предмет диссертационного исследования* заключается в поиске дополнительных возможностей применения физико-химических и хемометрических методов для экспресс-контроля качества серебросодержащих препаратов, средств медицинского назначения и парафармацевтической продукции.

Цель работы: разработать комплекс качественных и количественных экспресс-методов контроля элементного и дисперсного состава серебросодержащих лекарственных и парафармацевтических средств.

Для достижения поставленной цели были сформулированы и решены следующие основные задачи:

1. Оптимизировать метод рентгенофлуоресцентного анализа (РФА) для качественного обнаружения серебра в препаратах серебра протеината отечественных производителей в присутствии различных стабилизаторов.
2. Разработать экспресс-метод количественного определения серебра в препаратах со сложной органической и неорганической матрицей на основании рентгеновской флуоресценции.

3. Создать комбинированную методику, основанную на динамическом рассеянии лазерного света и рентгеновской флуоресценции, для определения химического состава и размера наночастиц в препаратах серебра протеината.
4. Адаптировать экспресс-методику определения размеров серебросодержащих наночастиц в гетерогенных непрозрачных средах на примере полиакрилатных красочных покрытий и высокоочищенного парафина на основании метода диффузного отражения света (ДСО) от поверхности.

Научная новизна работы. *Впервые* выведена формула для расчета содержания серебра протеината в растворах наночастиц серебра с органической и неорганической матрицей. *Впервые* для контроля качества препаратов, содержащих наночастицы, использована комбинация рентгенофлуоресцентного и лазерных методов, которая дает возможность одновременного определения серебра в анализируемом материале и оценку его дисперсных характеристик для контроля процессов коагуляции. *Впервые* использован метод диффузного отражения света (ДСО) от поверхности для оценки размера наночастиц в непрозрачных средах без разрушения образца. *Впервые* описан механизм дистантного действия лекарственных препаратов, содержащих наночастицы, на бактериальные, вирусные и грибковые клетки.

Теоретическая и практическая значимость работы. *Теоретическая значимость* работы заключается в формировании многомерной калибровочной модели, позволяющей определить размер частиц в нанодиапазоне, путем математической мультидескрипторной обработки данных, полученных методом диффузного отражения, а также в комбинировании лазерных и рентгенофлуоресцентных методов в комплексной оценке металлсодержащих препаратов в ряду основных показателей их качества (размер частиц, подлинность, количественное определение, чистота). *Практическая значимость* работы заключается в возможности проведения контроля качества серебросодержащих лекарственных препаратов и парафармацевтической продукции в твердой, жидкой и мягкой лекарственной форме; в экспресс-постановке, без длительной пробоподготовки и минерализации концентрированными кислотами. При этом предложенные методы пригодны для оценки образцов, где ионы серебра находятся в соединениях как с органическими, так и неорганическими анионами. Новая автоматизированная методика определения размера наночастиц с использованием разработанной калибровочной 3D-модели легла в основу научно-исследовательской работы «Определение физико-химических показателей соединений пептидной природы в рамках исследований нового соединения с вирулицидной активностью» (НИР № 033318-3-000) и «Разработка комплекса методов в целях стандартизации и контроля качества потенциальной лекарственной субстанции – ингибитора специфических вирусных ферментов» (НИР № 033319-3-000). Принцип вычисления математических

дескрипторов по числовым данным метода диффузного отражения света (ДСО) внедрен в практическую деятельность кафедры фармацевтической и токсикологической химии медицинского института РУДН им. Патриса Лумумбы. Разработанный метод определения размеров наночастиц в порошкообразных субстанциях и растворах без вскрытия упаковки внедрены для опытного фармацевтического производства (ОФФ) по договору №85/21/НАК от 25 декабря 2022.

Методология и методы исследования. Приемы и способы проведения диссертационного исследования основывались на общенаучной методологии – познание, сопоставление, анализ и сравнение. Проведенный обзор современных подходов к анализу наноразмерных объектов, проявляющих биологическую активность, позволил узнать состояние и разработанность данной тематики; сопоставление и анализ полученных результатов обнаружения серебра в многокомпонентных лекарственных препаратах и парафармацевтических средствах с помощью различных современных физико-химических методов (РФА, ДСО, ДРС), позволили сравнить новые подходы экспресс-определения размеров наночастиц с существующими с целью выявления преимуществ. Статистическую и хемометрическую обработку полученных результатов химического и дисперсного анализа, а также графическое представление результатов осуществляли в программах OriginPro 2021 (OriginLab Corporation, США).

Положения, выносимые на защиту:

1. Представление результатов по оптимизации метода рентгенофлуоресцентного анализа с проведенной многопараметрической настройкой и международными референс-образцами.
2. Результаты количественного обнаружения серебра в средах со сложной матрицей в рамках разработанной методики.
3. Результаты комбинированного подхода на основе элементного и дисперсного анализа (РФА, ДРС) для контроля качества серебросодержащих лекарственных средств и парафармацевтической продукции при экспресс-выявлении бракованных образцов и фальсификата.
4. Результаты по адаптации экспресс-методики определения размеров серебросодержащих наночастиц в гетерогенных непрозрачных средах на примере полиакрилатных красочных покрытий и высокоочищенного парафина на основании метода диффузного отражения света (ДСО) от поверхности.

Степень достоверности полученных результатов. О высокой степени достоверности полученных результатов свидетельствует значительный объем теоретического и экспериментального материала, полученный с использованием современных компьютеризированных и автоматизированных методов анализа. Все проведенные исследования

прошли проверку на повторяемость (до 600 повторов за цикл измерения), внутрилабораторную воспроизводимость (исследуемые образцы подвергались полному циклу повторных исследований при $n=3-5$) и достоверность (обеспечена валидацией аналитических методик) полученных результатов. Для физико-химического анализа исследуемых образцов применяли высокотехнологичное оборудование крупнейших мировых производителей, таких как Malvern Instruments Ltd (Великобритания) и Schimadzu (Япония), которые внесены в государственный реестр средств измерений (СИ) РФ.

Апробация результатов диссертационной работы проведена на заседании кафедры фармацевтической и токсикологической химии Медицинского института ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы» (протокол № 5 от 28.11.2024). Основные результаты исследования представлены в 5 публикациях, среди которых 1 статья в журнале, индексируемом в международных базах цитирования (Scopus), 2 статьи в изданиях перечня РUDN, 1 – в зарубежном рецензируемом журнале, входящем в международную базу данных CAS, 1 – в зарубежном журнале, входящем в иные базы цитирования, а также в тезисах и устных докладах: X и XIII Всероссийской научной конференции студентов и аспирантов с международным участием «Молодая фармация – потенциал будущего» (Санкт-Петербург, 2020 и Санкт-Петербург, 2023 год).

Личный вклад автора. Все результаты проведенных экспериментальных работ, представленные в диссертации, получены самим автором или при его непосредственном участии. Вклад автора, как экспериментатора, является определяющим на таких этапах научного исследования, как получение результатов, их обсуждение, подготовка самостоятельных публикаций или разделов публикаций в соавторстве с научным коллективом кафедры фармацевтической и токсикологической химии медицинского института РUDN им. Патриса Лумумбы.

Структура и объем диссертации. Диссертация изложена на 119 страницах машинописного текста и включает введение, обзор литературы, экспериментальную часть, выводы, библиографический список, содержащий 98 источников и приложения. Основная часть диссертации включает 10 таблиц и 37 рисунков.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Глава 1 посвящена обзору литературы по теме диссертационного исследования. Проанализирован фармацевтический рынок серебросодержащих препаратов, БАД и парафармацевтической продукции, а также формы их выпуска. Обобщены данные о механизмах

биологической активности серебра в ионной форме и в форме наночастиц. Охарактеризованы аналитические методы контроля качества серебросодержащих лекарственных средств.

В главе 2 описаны материалы и методы, использованные в диссертационной работе.

2.1. Объекты исследования

Серебра протеинат (~8% Ag), Sigma-Aldrich; серебра нитрат (ХЧ, ГОСТ 1277-75); Протаргол Лор (ОАО «Фармастандарт-Лек.средства», Курск); Сиалор (АО «Производственная фармацевтическая компания обновление», Новосибирск); Простолор (ЗАО «Обнинская ХФК»). Лекарственные препараты серебра протеината (протаргола) представляют собой таблетки для приготовления раствора для местного применения в комплекте с растворителем и флаконом с крышечкой-пипеткой. Таблетки разных производителей отличаются по содержанию вспомогательных веществ (повидон К 17, повидон К 30, гидроксипропилметилцеллюлоза и без стабилизатора). Другие серебросодержащие препараты, БАД и медицинские изделия отечественных и зарубежных производителей: Проталор (Эско-Фарм, Армения); Argitos серебро коллоидное (ООО НПП «Наносфера», Россия); Аргосульфам крем (ООО «Валеати», Россия); салфетки влажные антибактериальные (Premial beauty Россия); Argent Colloidal («Nutri expert», Франция); Granions d'ARGENT (Laboratoire des Granions Le Mercator, Франция).

Для калибровочной модели использовали латексные наносферы Mist-Standard (sulfonated polystyrene (sPS). Для построения калибровочных прямых (для количественной оценки содержания серебра в исследуемых образцах методом РФА) из субстанций серебра протеината и серебра нитрата были приготовлены рабочие стандартные образцы.

2.2. Методы исследования

Метод диффузного отражения света (ДСО) для контроля качества лекарственных средств по показателю «подлинность»: техническое решение регистрации обратного рассеяния света (диффузного отражения) позволяет применить неразрушающий метод контроля для анализа поверхности исследуемого. Для зондирования поверхности были применены светодиоды нового поколения длиной волны излучения $\lambda=408$ нм, мощностью 50 мВт/см² при спектральной ширине линии 3 нм (модель AA3528LVBS/D, тип C503B-BCN-CV0Z0461, производитель Cree LED). Отраженный от объекта световой сигнал регистрировали на ПЗС-матрицу с высоким разрешением (64 Мп), с последующей обработкой матрицы дискретных элементов с определенной интенсивностью сигнала. Полученные картины светорассеяния обрабатывали с помощью десяти топологических дескрипторов, созданных по подобию дескрипторов Винера и Балабана-Тринайстича, применяемых в QSAR (Morozova M.A. et al, 2022). Каждый дескриптор выступает в качестве топологической свертки матрицы светорассеяния,

полученной при поэлементном вычитании фона, и отражает не только пространственные неоднородности на поверхности или цвет, но и изменчивость отражения света. Для обработки данных использовались программы Vidan® и Atrium, разработанные на кафедре фармацевтической и токсикологической химии РУДН им. Патриса Лумумбы (Syroeshkin A.V. *et al*, 2020).

Метод динамического лазерного светорассеяния (ДРС, DLS) применен для анализа размера и распределения интенсивности лазерного света (I, %) по размерам диспергированных или растворенных в жидкости молекул и частиц, размер которых, как правило, находится в субмикронном и нано- диапазоне. Броуновское движение таких частиц или молекул приводит к быстрой флуктуации интенсивности света, который они рассеивают. Анализ кратковременных флуктуаций интенсивности позволяет определить скорость броуновского движения и, как следствие, размер частиц в анализируемом образце по уравнению Стокса-Эйнштейна. Метод считается неразрушающим и позволяет измерять размер частиц и молекул в диапазоне от менее 1 нм до 10 мкм. Для проведения измерений был использован лазерный анализатор гидродинамического размера частиц серии ZetaSizer (Malvern Instruments, UK). Предварительно для каждого из растворов был определен коэффициент преломления методом рефрактометрии.

Рентгенофлуоресцентная спектрометрия с аппаратным определением концентрации элементов (РФА, рентгеновская флуоресценция), основанная на регистрации характеристического рентгеновского флуоресцентного излучения при облучении вещества жесткими рентгеновскими фотонами в результате выбивания электрона с внутренней орбитали атома, была применена для анализа химического состава серебросодержащих средств. В работе был использован энергодисперсионный рентгенофлуоресцентный спектрометр EDX-7000 Shimadzu (Япония). Диапазон измеряемых элементов - ^{11}Na - ^{92}U ; рентгеновский генератор - трубка с Rh-анодом, воздушное охлаждение; напряжение 4–50 кВ, ток 1–1000 мкА; облучаемая площадь – окружность диаметром 10 мм; кремниевый дрейфовый детектор (SDD), метод подсчета – цифровой счетный фильтр; содержание элементов по значению интенсивности; автоматическая смена фильтров, выделяющих длины волн соответствующих элементов; размер камеры 300 мм x 275 мм x 100 мм.

Глава 3 диссертации посвящена результатам исследования и их обсуждению.

3.1. Рентгенофлуоресцентный анализ препаратов серебра протеината отечественных производителей в присутствии различных стабилизаторов

Внедрение новой методики контроля качества серебра протеината с применением рентгенофлуоресцентного анализа (РФА) требует предварительной оценки его пригодности для различных лекарственных форм, таких как таблетки и растворы. Необходимо также убедиться,

что определение содержания серебра не будет искажено присутствующими в растворе вспомогательными веществами, например стабилизаторами.

По сравнению с традиционными методами, основанными на ряде химических реакций, предлагаемый метод значительно выигрывает во времени и простоте пробоподготовки. Для анализа достаточно поместить таблетку или готовый раствор в кювету на майларовой плёнке, после чего можно сразу приступить к измерению. Предложенный нами подход существенно сокращает время, затрачиваемое на подготовку и проведение анализа.

Присутствие серебра в исследуемых препаратах протаргола определяли по наличию характеристического флуоресцентного излучения на выбранной аналитической значимой энергии кванта $^{Ag}K_{\alpha} = 22,105$ кэВ (Рисунок 1).

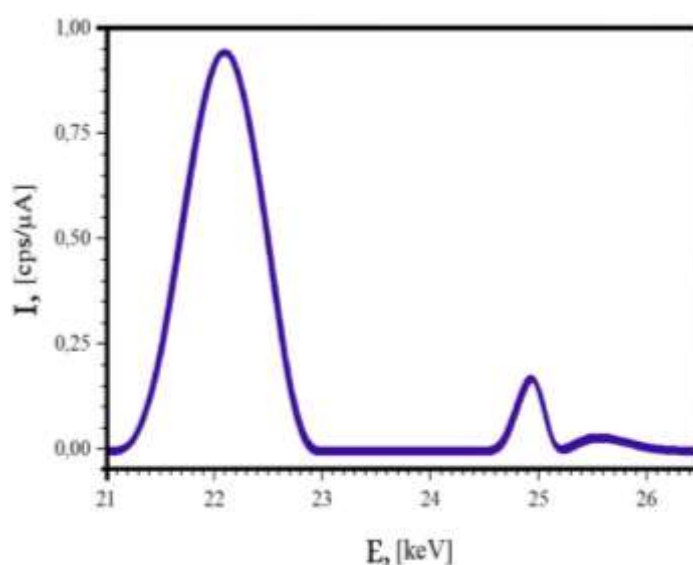


Рисунок 1. Спектр флуоресценции раствора серебра протеината, полученного путем растворения сухой таблетки в воде для инъекций (n=5).

Источник: составлен автором.

Интенсивность сигнала в образце сравнения (серебра протеинат 200 мг) составила $24,2 \pm 0,2$ имп/(с·мкА), усредненное значение интенсивности сигнала в таблетках протаргола разных производителей, которые помимо 200 мг серебра протеината, содержат стабилизатор и наполнитель: $23,8 \pm 0,4$ имп/(с·мкА) (Таблица 1).

Таблица 1. Метрологические характеристики методики обнаружения серебра в разных составах методом РФА (n=3, $\bar{x} \pm \Delta X$).

Образец	Состав образца	Интенсивность, имп/(с·мкА)	$\bar{X} \pm \Delta X$	SD	C _v
ПротарголЛор	Серебра протеинат 200,0 мг Гидроксипропилметил- целлюлоза 10,0 мг	23,5	23,8±0,6	0,25	0,01
		23,8			
		24,0			

Продолжение таблицы 1.

Сиалор	Серебра протеинат 200,0 мг Повидон К-30 20,0 мг	24,0	24,3±0,6	0,25	0,01
		24,4			
		24,5			
Простолор	Серебра протеинат 200,0 мг Повидон К-17 20,0 мг	23,2	23,4±0,7	0,26	0,01
		23,4			
		23,7			
Серебра протеинат (субстанция)	Серебра протеинат 200,0 мг (~8% Ag)	24,12	24,24±0,28	0,11	0,005
		24,25			
		24,34			
Серебра нитрат	Серебра нитрат 200,0 мг	104,8	104,0±2,1	0,85	0,008
		103,1			
		104,2			

Табличные результаты демонстрируют стабильность сигнала излучения и незначительность вклада органической матрицы.

Заключение к разделу 3.1: предложен метод обнаружения серебра в препаратах отечественных производителей на основе рентгеновской флуоресценции (с рентгенопрозрачной майларовой пленкой для жидкостной кюветы). Относительно устаревших химических вариантов контроля качества субстанций и растворов серебра протеината методика значительно выигрывает в простоте пробоподготовки. Мы можем утверждать, что новый подход является экспрессным, поскольку время измерения 1 пробы с использованием данного метода составляет 0,2 человека часов.

3.2. Экспресс-метод количественного определения серебра в препаратах со сложной органической и неорганической матрицей методом РФА

На основании измерения интенсивности вторичного рентгеновского излучения при анализе растворов исследуемых субстанций серебра протеината и нитрата построен калибровочный график в координатах «интенсивность сигнала (имп. / (с·мкА) – концентрация (%) серебра в растворе» с целью количественного определения.

Линейная зависимость была оценена в диапазоне аналитической методики от 0,01% до 0,8% (Рисунок 2).

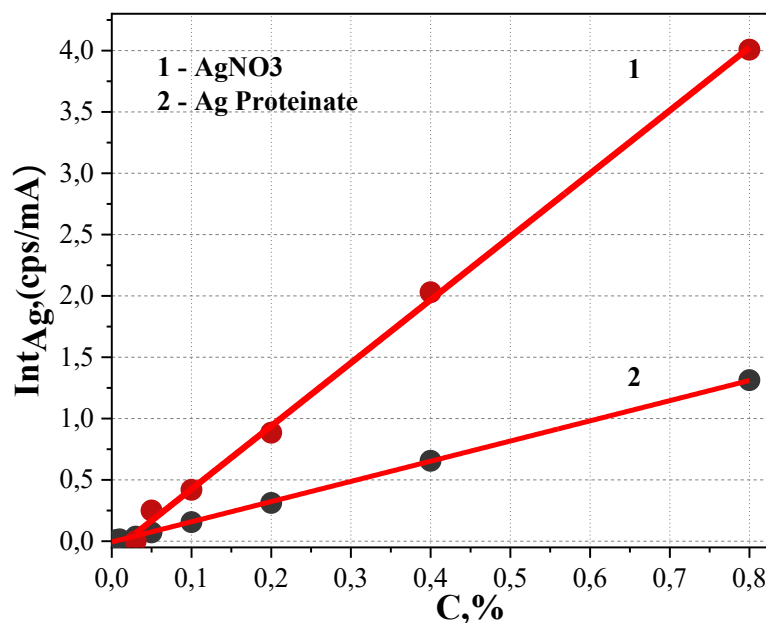


Рисунок 2. Зависимость интенсивности рентгеновской флуоресценции (I , cps/mA) от концентрации серебра (спектр РФА) для образцов водного раствора серебра нитрата и протеината ($n=5$).

Источник: составлен автором.

Установлено, что зависимость между интенсивностью флуоресценции и содержанием серебра в образце прямая, коэффициент корреляции Пирсона составляет 0,999. Интенсивность флуоресценции при $^{Ag}K_{\alpha} = 22,105$ кэВ линейно зависит от концентрации серебра (диапазон 0,01% - 0,8%). Для этого были использованы следующие расчетные формулы, коэффициенты пересчета в которых обусловлены эффектом смены матрицы (по причине изменения диэлектрической проницаемости раствора):

$$I = (5,1 \pm 0,1) \cdot C_{Ag}, \quad (1)$$

Где, I – интенсивность рентгеновской флуоресценции при выбранной аналитически значимой энергии кванта $^{Ag}K_{\alpha} = 22,105$ кэВ, $5,1$ – коэффициент пересчета, C_{Ag} – концентрация (%) серебра нитрата

$$I = (1,64 \pm 0,03) \cdot C_{Ag}, \quad (2)$$

Где, I – интенсивность рентгеновской флуоресценции при выбранной аналитически значимой энергии кванта $^{Ag}K_{\alpha} = 22,105$ кэВ, $1,64$ – коэффициент пересчета, C_{Ag} – концентрация (%) серебра протеината.

Заключение к разделу 3.2: разработана экспресс-методика количественного определения серебра на основании линейной зависимости интенсивности флуоресценции от концентрации серебра в водных растворах (%). Показаны варианты пересчета содержания серебра в образцах в зависимости от природы матрицы.

3.3. Комбинированная методика на основе методов ДЛС и РФА для определения размеров и дисперсности наночастиц в препаратах серебра протеината

Распределение наночастиц по размерам играет важнейшую роль в исследовании физико-химических и биологических свойств коллоидных растворов серебра, в то время как их фармакопейный анализ подразумевает под собой исключительно качественный и количественный анализ. Протаргол (серебра протеинат 7-8%) представляет собой золь оксида серебра (Ag_2O), стабилизированный гидролизатом желатина, механизм противомикробного действия которого заключается в везикулярном внутриклеточном транспорте. Для попадания внутрь клетки-мишени для молекул лекарственных веществ критичным параметром считается размер их частиц, поскольку размер эндосом при пиноцитозе не превышает 100 нм. Бактерицидные свойства наночастиц серебра размером 20–80 нм обусловлены величиной удельной площади поверхности, способствующей широкой области контакта наночастиц с бактериями или вирусами (Рисунок 3).

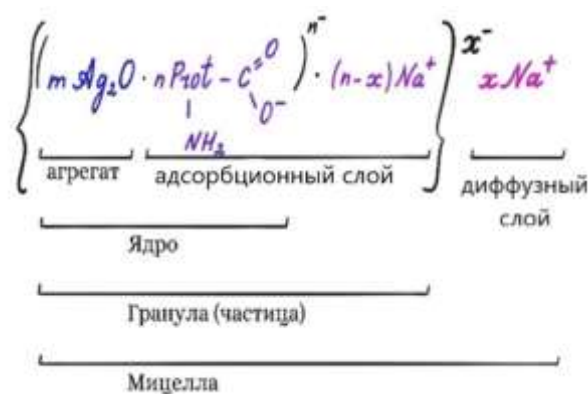


Рисунок 3. Структура мицеллы серебра протеината, образующаяся в водном растворе.

Источник: составлен автором.

Для раствора серебра протеината торгового наименования Протаргол-Лор, который представляет свой 10% раствор серебра протеината, полученный путем растворения таблетки массой 200 мг в воде для инъекций, проведен анализ размера частиц методом динамического рассеяния лазерного света (Рисунок 4).

Рисунки демонстрируют наличие трех фракций частиц диаметром $d=50$, 700 и 4500 нм. График объемного распределения по размерам показывает, что основная фракция частиц препарата (80%) позволяет отнести его к наноразмерным. Также была показана возможность удаления частиц микронного размера, которые с высокой долей вероятности образуются в результате коагуляции частиц лекарственного вещества при хранении, путем пропускания через субмикронный мембранный фильтр Millipore (Рисунок 4.2 и 4.4.).

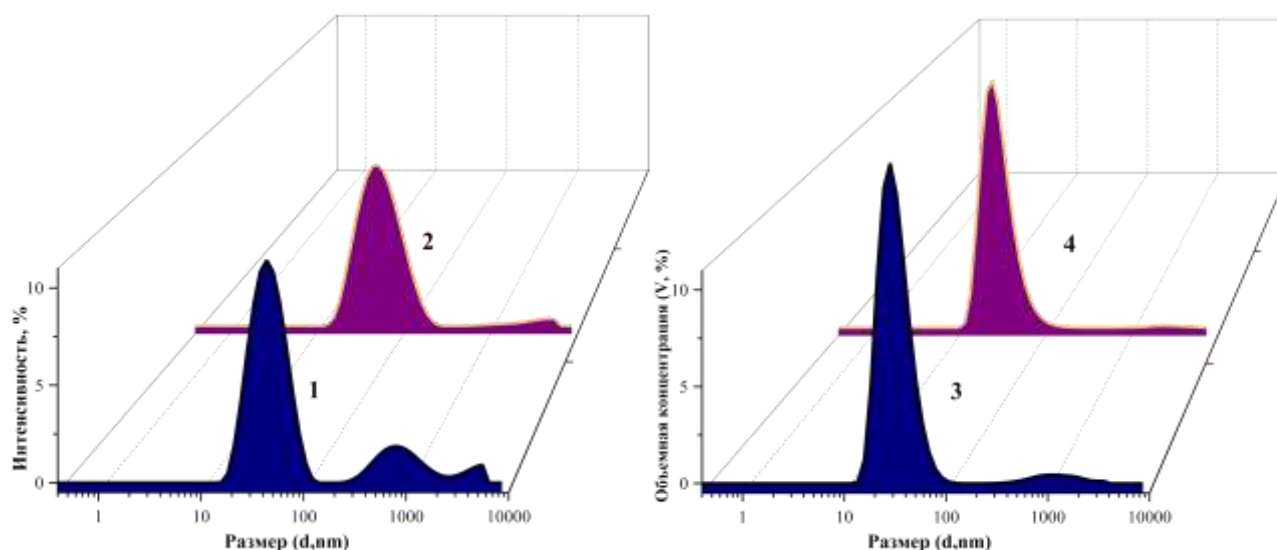


Рисунок 4. Распределение частиц по размерам в раствора Протаргола 10% (серебра протеината) в единицах интенсивности (I, %) и объемной концентрации (V, %): (1) и (3) в исходном 10% растворе; (2) и (4) в 10% растворе после пропускания через фильтрующую систему Millex 0,2 μm .

Источник: составлен автором.

Рисунок 4 демонстрируют унимодальные, узкие пики распределения коллоидных частиц в растворе серебра протеината 10% до и после пропускания через фильтрующую систему Millex 0,2 μm , как в единицах интенсивности (I, %), так и единицах объемной концентрации (V, %): $D_{I, \text{Mean}}=44$ нм и $D_{V, \text{Mean}}=28$ нм. Монодисперсность образца после пропускания через фильтрующую систему подтверждается индексом полидисперсности $PDI=0,345$, значения которого чувствительны к присутствию агрегатов в растворах: однородность частиц в популяции приводит к узкому результирующему распределению по размерам и небольшим значениям PDI, что определяет монодисперсность образца. Исключение составляет образец серебра протеината до пропускания через Millex – в коллоидном растворе присутствуют частицы суб- и микронного диапазона (Рисунок 4.1), а значение индекса полидисперсности увеличивается ($PDI=0,493$), что дает основание предположить меньшую однородность коллоидного раствора (Таблица 2).

Таблица 2. Характеристики дисперсности коллоидных образцов Протаргола 10% (серебра протеинат) по данным метода ДРС

Образец	Средний размер $\pm SD$, нм	Индекс полидисперсности, PDI	Скорость счета, kcps
Протаргол 10%	$d=48,4 \pm 4,6$	0,493	247
Протаргол 10% (после пропускания через Millex 0,2 μm)	$d=44,3 \pm 2,4$	0,345	237

Разработана комбинированная методика определения серебра в коллоидных растворах лекарственных средств, которая помимо элементного качественного и количественного анализа, учитывает дисперсные характеристики частиц в лекарственной форме с использованием рентгенофлуоресцентного метода, дополненного методом динамического лазерного светорассеяния. В качестве примера комплексирования данных методов были исследованы 4 серебросодержащих препарата: Протаргол ЛОР (Россия), Argitos – серебро коллоидное (Россия), Argent Colloidal (Франция), Granions d'ARGENT (Франция), в которых содержание серебра в процентах составило $0,33 \pm 0,07$; $0,16 \pm 0,07$; $<0,02$; $0,66 \pm 0,07$, а размер частиц в нанометрах – 30, 70, 40 и 120, соответственно (Рисунок 5). Полученные результаты позволили сделать вывод о том, что образцы французского производства коагулируют, содержание серебра в Argent Colloidal ниже предела обнаружения ($<0,02\%$), а фармакопейными методами обнаружения Ag^+ (хромогенными реакциями) выявить различия между растворами указанных серебросодержащих средств, невозможно.

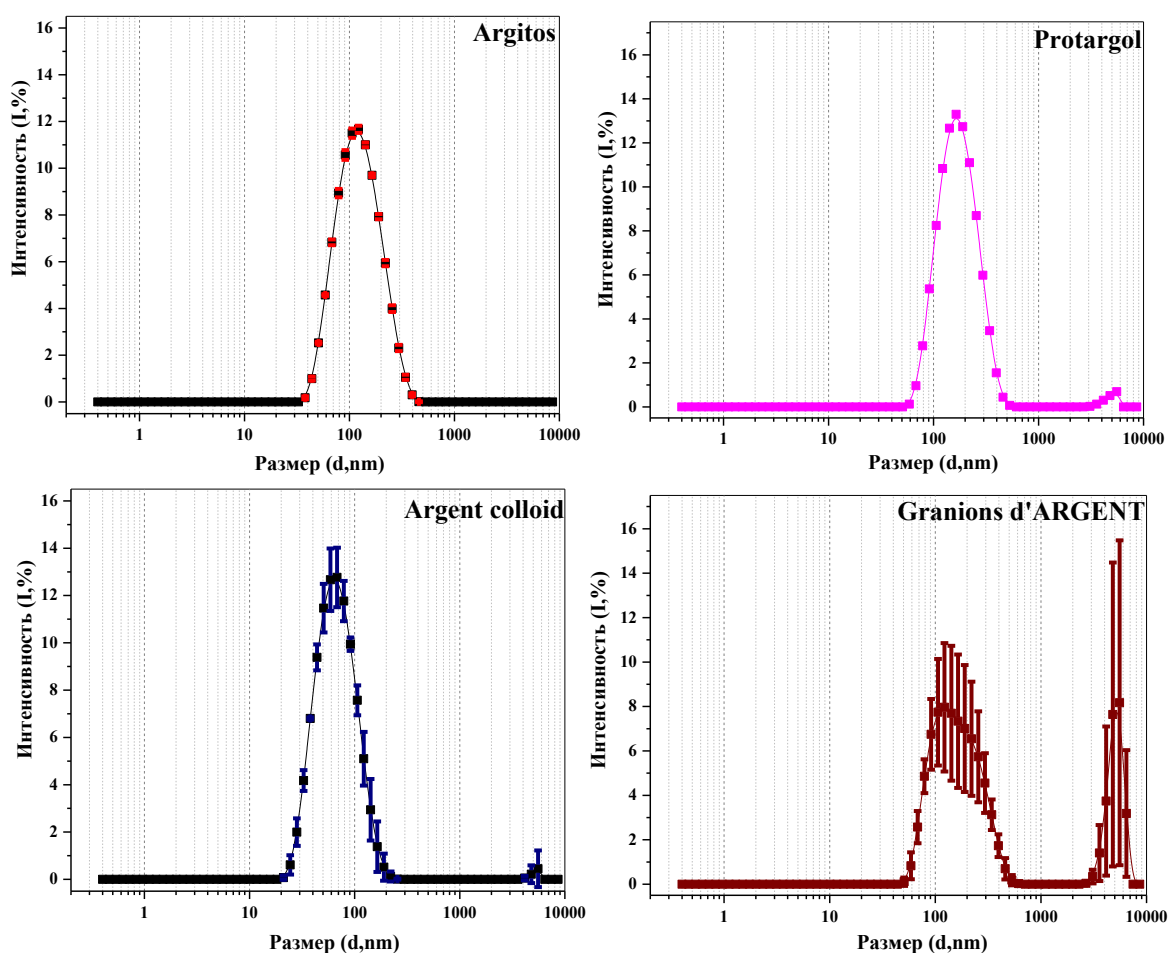


Рисунок 5. Измерение размера частиц в коллоидных растворах серебросодержащих лекарственных препаратов методом динамического рассеяния света.

Источник: составлен автором.

Заключение к разделу 3.3: стабильность дисперсных характеристик, с точки зрения показателей фармацевтической химии, может стать опорной точкой для контроля технологического процесса производства данной группы лекарственных препаратов. Так, появляется возможность выявления технологического брака, фальсификатов и нарушения методики производства.

3.4. Экспресс-методика определения размеров серебросодержащих наночастиц в гетерогенных непрозрачных средах

Разработан новый метод определения размера частиц серебросодержащих наноразмерных препаратов, которые находятся в непрозрачных гетерогенных средах, с использованием светорассеяния на плотностных неоднородностях (метод диффузного отражения) с обработкой картины светорассеяния по уравнениям вычисления топологических индексов. На основании латексных шарообразных частиц идеальной формы известного размера построена калибровочная 3D-модель (Рисунок 6), которая позволяет определять, в том числе, размеры комплексов надмолекулярной водно-лактозной природы в препарате, зарегистрированном в Государственном регистре лекарственных средств как ЛС (ЛП-N (000035) -(ПГ-RU).

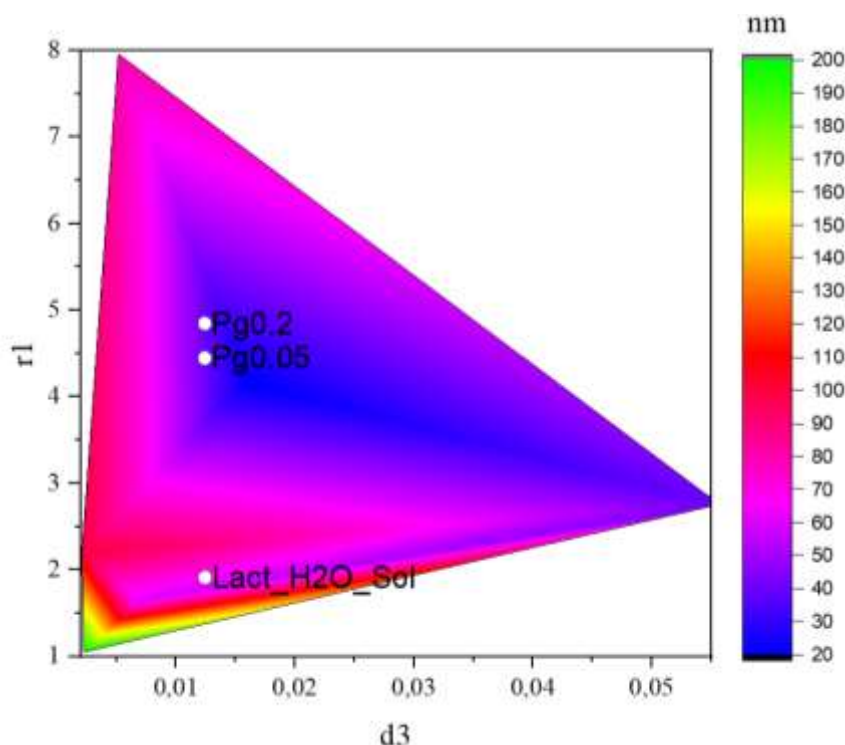


Рисунок 6. Калибровочная 3D модель определения размера частиц в диапазоне 20–200 нм: Pg0,2 – раствор серебра протеината в концентрации 0,2%, Pg0,05 – раствор серебра протеината в концентрации 0,05%, Lact_H₂O_Sol – размер надмолекулярного комплекса в препарате, зарегистрированном в Государственном регистре лекарственных средств как ЛС (ЛП-N (000035)-(ПГ-RU).

Источник: составлен автором

Выведен вариант калибровочного графика с использованием той пары дескрипторов, которая позволила наиболее удобным образом интерпретировать результаты измерений. Для веществ, используемых в качестве сверочных объектов (растворы протеината серебра), предварительно оценивали размер частиц на установке Zetasizer Nano ZS. Все точки, отмеченные на калибровочном графике, соответствовали значениям размеров частиц на размерных спектрах.

Для определения размеров серебросодержащих наночастиц в гетерогенных непрозрачных средах наночастицы серебра протеината были введены в полиакрилатную краску, используемую для обеззараживания поверхностей в медицинских учреждениях, а также в матрицу из высших алканов высокой степени очистки. Биологическая активность указанных подложек с содержанием AgNP подтверждена в ходе недавних экспериментальных работ, а также обоснован новый механизм воздействия на бактериальные и вирусные клетки без прямого контакта с ними. Предложен метод контроля качества Ag-содержащих поверхностей, который позволит качественно и количественно оценивать содержание серебра в них. Подтверждение присутствия серебра в исследуемых образцах определяли методом РФА по наличию характеристического флуоресцентного излучения на выбранной аналитической значимой энергии кванта $^{Ag}K_{\alpha} = 22,105$ кэВ, $^{Ag}K_{\beta} = 24,942$ кэВ. Подтверждено наличие прямой зависимости интенсивности рентгеновской флуоресценции от концентрации серебра в образце (Рисунок 7).

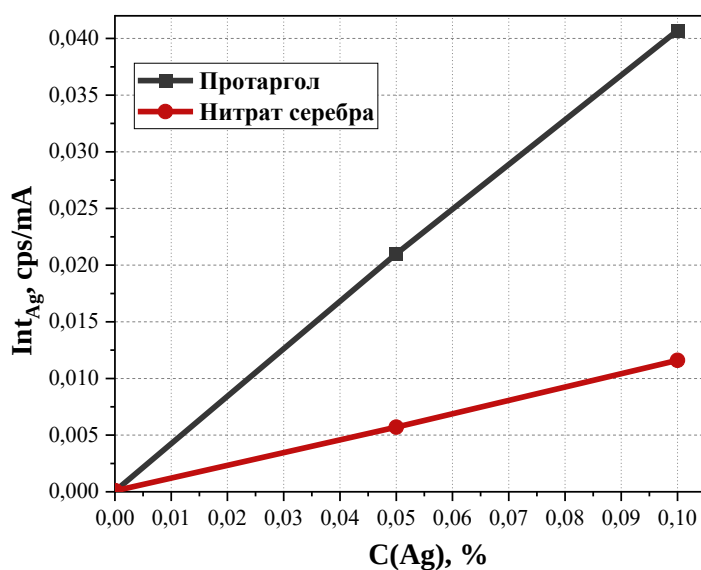


Рисунок 7. Зависимость интенсивности излучения серебра, полученная методом РФА, от содержания серебра в нитрате и протеинате серебра, введенных в красочное покрытие.

Источник: составлен автором.

Мы убедились, что использование набора математических дескрипторов, получаемых методом диффузного светоотражения, позволяет выделить уникальную описательную картину для каждой из групп исследуемых образцов (Рисунок 8). Для составления характеристических описательных групп, иначе именуемых нами как метод «finger-print», были выбраны

дескрипторы d1, sd1, d2, R1 и R3. Такой набор позволяет наиболее быстро и точно отнести образец к референтной группе. Видны значительные отличия между образцами «пустых» матриц (парафин, полиакрилат) и теми же материалами, в состав которых нами экспериментально был введен серебра протеинат.

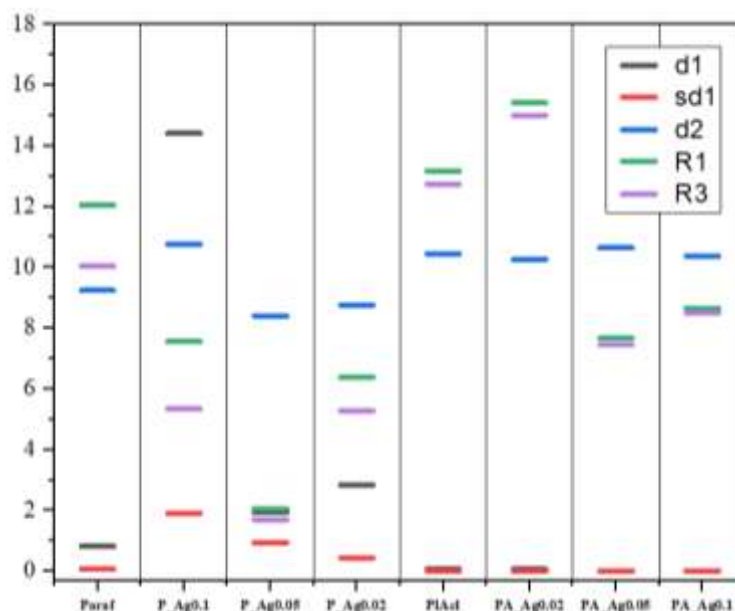


Рисунок 8. Идентификация образцов путем введения специфических вычисляемых математических дескрипторов – наночастицы серебра протеината (0,1%, 0,05% и 0,02%) в парафиновой и полиакрилатной матрице.

Источник: составлен автором.

Кинетические прямые колебания Ag-содержащих поверхностей во времени, описанные при помощи математического дескриптора d2 и отображенные на Рисунке 9 показывают, что частота колебаний поверхности значительно увеличивается после воздействия активирующих физических факторов (излучения). С высокой долей вероятности можно предположить, что аналогично будет работать и термическая активация. Наибольшие колебания регистрируются для покрытий, содержащих наночастицы серебра в сравнении с образцом покрытия, которое было активировано аналогичным образом, но не содержало в своем составе AgNP (образец краски до введения в нее наночастиц). С изменением спектральной мощности монохроматического облучения (переход от белого света к синему) увеличивается коэффициент активации поверхности. Таким образом, представлено описание нового дистантного механизма антибактериального действия без непосредственного контакта с клеткой: в результате активации (тепловой или световой) покрытий по причине усиления колебаний частиц поверхности – они начинают излучать в гигагерцовом диапазоне, на чем и основана инактивация микроорганизмов и вирусных клеток, попадающих в поле поверхности, на которую была нанесена краска.

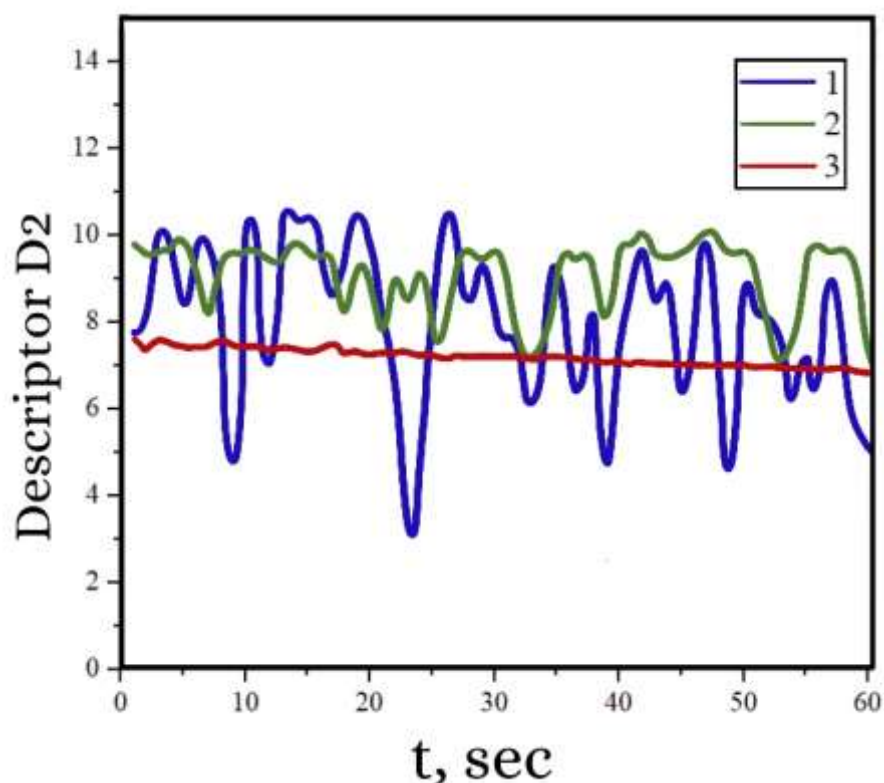


Рисунок 9. Световая активация полиакрилатных серебросодержащих поверхностей: 1 – облучение полиакрилатной поверхности красочного покрытия белым светом, 2 – облучение полиакрилатной поверхности синим светом ($\lambda=470$ нм), 3 – покрытие, в котором отсутствуют частицы серебра.

Источник: составлен автором.

Заключение к разделу 3.4: решена проблема экспрессности контроля качества наноразмерных препаратов при их разработке и производстве. Метод позволил снять все существующие ограничения по измерению размера частиц в растворе при помощи лазерных методов анализа, которые на сегодняшний день наиболее часто используются для выполнения этого ряда задач, с точки зрения среды, в которую помещены частицы действующего вещества.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результатом данной работы стала разработка метода с использованием анализа кинетики лазерного отражения света для контроля качества лекарственных средств по показателю «подлинность». Метод обеспечивает «безаликвотный» и неdestructивный контроль образца. Двумерные картины светорассеяния обрабатываются с помощью топологической модели, подобно применяемым в QSAR моделям загребской школы Тринайстича. Возможности нового метода были продемонстрированы на примерах различных фармацевтических субстанций и лекарственных средств. Разработанный новый метод ДСО позволяет выявить контрафакт или фальсификат и в таблетированных формах, и, следовательно, может быть применен для сквозного контроля лекарственных средств в логистических цепочках. **Практические рекомендации.** Стабильность дисперсных характеристик с точки зрения показателей фармацевтической химии может стать опорной точкой для контроля технологического процесса производства группы серебросодержащих наноразмерных лекарственных препаратов. Таким образом, мы рекомендуем внедрение вышеописанных аналитических методик (и их комбинаций) на разных стадиях жизненного цикла ЛП с целью выявления технологического брака, фальсификатов и нарушения методики производства. **Перспективы дальнейшей разработки темы.** По причине ежегодного роста практического интереса к применению в медицинской практике препаратов и материалов, включающих в свой состав металлические наночастицы, мы предлагаем рассмотреть возможность корректировки и адаптации описанных методов контроля качества для широкого ряда металлсодержащих препаратов, включающих в свой состав наночастицы золота, цинка, меди, железа и других металлов. Кроме того, стабильность дисперсных характеристик с точки зрения показателей фармацевтической химии может стать опорной точкой для контроля качества не только лекарственных препаратов, но и других продуктов и материалов смежных областей биологической, химической и агропромышленной областей.

ВЫВОДЫ

1. Разработан комплекс экспресс-методов контроля качества серебросодержащих лекарственных средств и парафармацевтической продукции, включающий в себя качественное и количественное определение серебра в гомогенных и гетерогенных растворах методами динамического рассеяния света (ДРС), диффузного светотражения от поверхности (ДСО) и РФА.
2. Предложен и оптимизирован метод обнаружения серебра в отечественных препаратах серебра протеината разных производителей на основании рентгеновской флуоресценции с закрытием кюветы майларовой плёнкой, отличающийся от существующих

фармакопейных стандартов простотой пробоподготовки: время измерения 1 пробы составляет 0,2 человеко-часов.

3. Разработан экспресс-метод количественного определения серебра в растворах на основании линейной зависимости интенсивности флуоресценции при $^{Ag}K_{\alpha} = 22,105$ кэВ при концентрации серебра в диапазоне 0,01% – 1% по результатам предложенных расчетов:

$I = (5,1 \pm 0,1) \cdot C_{Ag}$ для серебра нитрата и $I = (1,64 \pm 0,03) \cdot C_{Ag}$ для серебра протеината.

4. Предложена комбинированная методика неразрушающего анализа (КНА) серебросодержащих коллоидных лекарственных препаратов и парафармацевтических средств, сочетающая в себе элементный анализ ($\bar{C} \pm \Delta C, \%$) методом РФА и определение размеров наночастиц (d, nm) методом ДРС на примере препаратов серебра протеината разных производителей: $C=0,33 \pm 0,07\%$ и $d=30 nm$ (Протаргол ЛОР, РФ); $C=0,16 \pm 0,07\%$ и $d=70nm$ (Argitos, РФ); $C=0,66 \pm 0,07\%$ и $d=40 nm$ (Argent Colloidal, Франция); $C<0,02\%$ и $d=120nm$ (Granions d'ARGENT, Франция).

5. Экспресс-методика определения размеров серебросодержащих наночастиц в гетерогенных непрозрачных средах адаптирована на примере полиакрилатных красочных покрытий и высокоочищенного парафина методом диффузного отражения света (ДСО) от поверхности. Показано, что для построения новой калибровочной 3D-модели необходимо использование пары математических дескрипторов $R1$ и $d3$, которая позволила наиболее удобным образом интерпретировать результаты измерений.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

ГФ РФ – государственная фармакопея Российской Федерации	ФС – фармакопейная статья
БАВ – биологически активное вещество	AgNP – наночастицы серебра
БАД – биологически активная добавка	PDI (Polydispersity Index) – индекс полидисперсности частиц
ДСО – метод диффузного отражения света от поверхности	SDD (Silicon drift detector) – кремниевый дрейфовый детектор, используемый в рентгенофлуоресцентном анализе
ДРС – метод рассеяния света	QSAR / KKCA – quantitative structure – activity relationship / количественная корреляция структура-активность
ЛП – лекарственный препарат	
ЛС – лекарственное средство	
ОФС – общая фармакопейная статья	
РФА – рентгенофлуоресцентный анализ	
СО – стандартный образец	

Список научных работ, опубликованных по теме диссертации

Перечень RSCI:

1. **Колябина, Е.С.** Рентгенофлуоресцентное определение содержания серебра в коллоидных растворах / **Е.С. Колябина**, Т.В. Максимова, Т.В. Плетенёва, А.В. Сыроешкин // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. – 2023. – Т. 26. – N. 4 – С. 28–31. DOI: 10.29296/25877313-2023-04-05.
2. **Колябина, Е.С.** Комбинированная методика контроля качества лекарственных препаратов коллоидного серебра / **Е.С. Колябина**, Т.В. Максимова // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. – 2023. – Т. 26. – N. 9 – С. 48. DOI: 10.29296/25877313-2023-09-07.

Международные базы цитирования:

3. **Kolyabina, E.S.** Express method for particle size analysis in solid, liquid, and amorphous materials using 3D calibration curve and 2D-DLS dynamic light scattering / **E.S. Kolyabina**, T.V. Maximova, A.V. Syroeshkin // Journal of Drug Delivery and Therapeutics. – 2023. – V. 13. – N. 4 – P. 9–12. DOI: 10.22270/jddt.v13i4.6029.
4. Syroeshkin, A.V. Radiothermal Emission of Nanoparticles with a Complex Shape as a Tool for the Quality Control of Pharmaceuticals Containing Biologically Active Nanoparticles / A.V. Syroeshkin, G.V. Petrov, V.V. Taranov, T.V. Pleteneva, A.M. Koldina, I.A. Gaydashev, **E.S. Kolyabina**, D.A. Galkina, E.V. Sorokina, E.V. Uspenskaya et al // Pharmaceutics. – 2023. – V. 15. – N. 3 – P. 966. DOI: 10.3390/pharmaceutics15030966.

Другие журналы:

5. Uspenskaya E. Exploring the effects of cramped impact type mechanical action on Active Pharmaceutical Ingredient (Levofloxacin) – Prospects for Pharmaceutical Applications / Elena Uspenskaya, Anastasia Simutina, Ekaterina Kuzmina, Vasilisa Sukhanova, Timur Garaev, Tatiana Pleteneva, Alena Koldina, **Ekaterina Kolyabina**, Gleb Petrov, Anton Syroeshkin // Powders. – 2023. – V.2. – N. 2 – P. 464–483. DOI: 10.3390/powders2020028.

Колябина Екатерина Сергеевна

(Российская Федерация)

**РАЗРАБОТКА ЭКСПРЕСС-МЕТОДОВ КОНТРОЛЯ КАЧЕСТВА
ЛЕКАРСТВЕННЫХ И ПАРАФАРМАЦЕВТИЧЕСКИХ СРЕДСТВ, СОДЕРЖАЩИХ
НАНОЧАСТИЦЫ НА ОСНОВЕ СОЕДИНЕНИЙ СЕРЕБРА**

Диссертационная работа посвящена разработке комплекса качественных и количественных экспресс-методов контроля элементного и дисперсного состава серебросодержащих лекарственных и парафармацевтических средств по причине повышения научного интереса к биоцидным свойствам препаратов наноразмерного серебра. Для проведения качественной и количественной оценки содержания частиц серебра в растворах препаратов со сложной органической и неорганической матрицей предложено использование метода РФА. Показан вариант комбинации рентгенофлуоресцентного и лазерного методов, который помимо элементного анализа дает возможность выявления технологического брака, фальсификатов и нарушения методики производства. Разработан способ определения размера частиц по калибровочной 3D-модели методом диффузного светотражения, который имеет перспективы использования для контроля качества фармацевтических субстанций и препаратов, представляющих собой непрозрачные гетерогенные растворы и твердые поверхности.

Kolyabina Ekaterina Sergeevna

(Russian Federation)

**DEVELOPMENT OF RAPID QUALITY CONTROL METHODS FOR
PHARMACEUTICAL AND PARAPHARMACEUTICAL PRODUCTS CONTAINING
NANOPARTICLES BASED ON SILVER COMPOUNDS**

The dissertation work is devoted to the development of a set of qualitative and quantitative express-methods for the control of elemental and disperse composition of silver-containing drugs and parapharmaceuticals due to the increasing scientific interest in the biocidal properties of nanosized silver preparations. For qualitative and quantitative assessment of silver particles content in solutions of preparations with complex organic and inorganic matrix the use of XRD method is proposed. A variant of the combination of X-ray fluorescence and laser methods is presented, which, in addition to elemental analysis, allows to detect technological defects, counterfeits, and violations of production methods. The method of particle size determination by 3D-calibration model using the method of diffuse light reflection was developed, which has prospects of use in quality control of pharmaceutical substances and preparations representing opaque heterogeneous solutions and solid surfaces.