

УДК 547.945.1.07

**Фрактальный анализ лиофилизированных биологически активных субстанций**© 2020 Р.П. ТЕРЕХОВ<sup>1\*</sup>, И.А. СЕЛИВАНОВА<sup>1</sup><sup>1</sup> ФГАОУ ВО Первый Московский Государственный Медицинский университет им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский университет), Москва, 119991

\*e-mail: r.p.terekhov@yandex.ru

Поступила в редакцию 13.03.2020 г.

После доработки 03.06.2020 г.

Принята к публикации 19.09.2020 г.

В условиях роботизации производства актуальной задачей в области фармацевтического анализа является разработка эффективных методов контроля качества лекарственных средств на основе интеллектуальных технологий. Решение этого вопроса приобретает особое значение для лекарственных средств, полученных биотехнологическим путем, ввиду особенностей анализа этих объектов и ограниченного числа методов контроля качества. Фрактальная геометрия может послужить математической основой для создания такого метода. Цель работы заключалась в оценке возможности использования фрактальной геометрии для разработки методики экспресс-анализа лиофилизатов «Бифидумбактерина». В результате проведенного исследования установлена зависимость между фрактальной размерностью структуры твердой фазы лиофилизатов сухой смеси живых бактерий *Bifidobacterium bifidum* с сахарозо-желатино-молочной средой и нормируемыми показателями фармацевтических субстанций, такими как время восстановления препарата ( $R^2=0,97$ ) и значение pH ( $R^2=0,95$ ). Продемонстрирована перспективность использования разработанного метода в области фармацевтического производства для автоматизированного экспресс-анализа лиофилизированных субстанций биотехнологических препаратов без потери исследуемого образца.

*Ключевые слова:* фрактальный анализ, фармацевтический анализ, контроль качества, лиофилизаты, бифидумбактерин.

**doi:** 10.21519/0234-2758-2020-36-5-98-103

Контроль качества лекарственных препаратов является важной частью комплекса мер, направленных на обеспечение населения надлежащей фармацевтической помощью [1]. Согласно рекомендациям GMP, производство лекарств должно быть организовано таким образом, чтобы гарантировать оптимальные характеристики готового продукта [2].

В настоящее время нормативные показатели качества фармацевтических субстанций часто контролируются такими физико-химическими методами, как УФ-, ИК-спектроскопия и ВЭЖХ. Поскольку в процессе анализа этими методами происходит потеря образца, исследование осуществляют путем формирования отдельных выборок [3]. С одной

стороны, это сопряжено с экономическими затратами, а с другой — увеличивает вероятность ошибок антропогенного характера. Разработка универсальных методов мониторинга контроля качества без потери субстанции и внедрение их в область фарминдустрии способствует минимизации рисков. Базой для таких инновационных решений может послужить фрактальная геометрия. Установление взаимосвязи между структурой твердой фазы субстанции и ее физико-химическими параметрами позволяет создавать автоматизированные аналитические методики. Фрактальный анализ уже опробован на мониторинге процессов, используемых в пищевой промышленности: обжарке

*Список сокращений:* GMP — правила надлежащей производственной практики; УФ — ультрафиолетовая область спектра; ИК — инфракрасная область спектра; ВЭЖХ — высокоэффективная жидкостная хроматография;  $\bar{X}$  — среднее выборки;  $S^2$  — дисперсия;  $S$  — стандартное отклонение;  $\varepsilon$  — относительная ошибка.

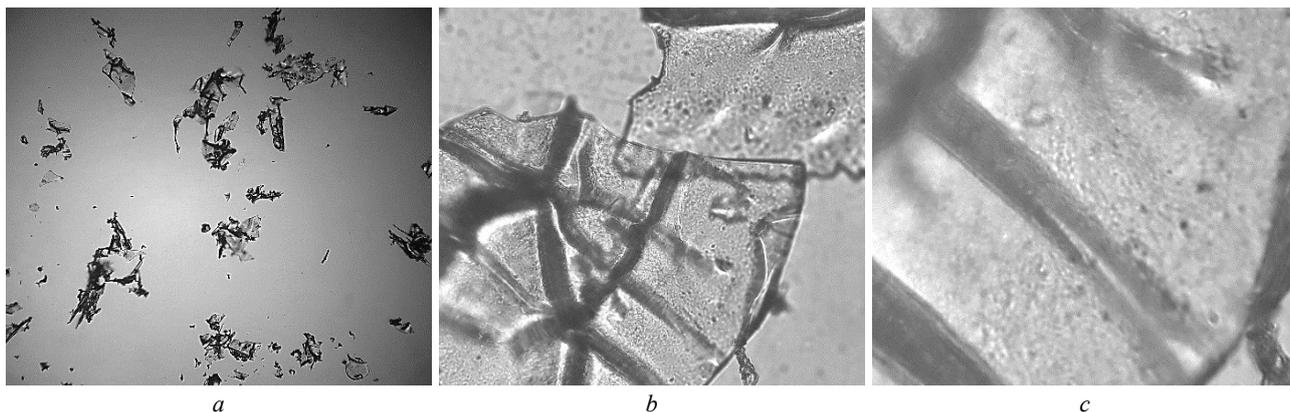


Рис. 1. Микрофотографии образца бифидумбактерина при 20 °С и увеличении: *a* — в 100, *b* — в 400, *c* — в 1000 раз.

Fig. 1. Photomicrography of the bifidumbacterin lyophilizates at 20 °C. *a* — 100x magnification, *b* — 400x magnification, *c* — 1000x magnification.

зерен кофе [4] и кристаллизации тростникового сахара [5]. В области фармацевтического анализа этот метод был применен для контроля технологического параметра субстанции — сыпучести порошков [6]. Нами была установлена взаимосвязь между фрактальной размерностью структуры твердой фазы лиофилизата и физико-химическими свойствами субстанции дигидрокверцетина [7].

Учитывая, что лиофилизация часто используется при биотехнологическом производстве лекарственных препаратов, таких как пробиотики [8, 9], представляло интерес проанализировать их с точки зрения фрактальной геометрии. Цель работы — оценка возможности использования фрактальной геометрии в качестве основы для разработки автоматизированной методики экспресс-анализа лиофилизированных форм фармацевтических субстанций на примере препарата «Бифидумбактерин».

## УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

Объектом исследования служил лиофилизат бифидумбактерина ( $10^7$  КОЕ/дозу, АО «Витафарма», Россия).

Испытания проводили с использованием метода ускоренного старения путем выдерживания образцов в термостате (ОАО «Смоленское СКТБ СПУ», Россия) при 50 °С в течение 5, 15, 30, 60, 120 и 240 мин.

Для каждого образца на инверторном оптическом микроскопе Axiovert S100 с микрокамерой AxioCam MRc («Zeiss AG», Германия) при увеличении в 100, 400 и 1000 раз было получено по 3 микрофотографии. Изображения монохроматизировали, их разрешение составило 72 пикселя на дюйм. Каждую микрофотографию подвергали фрактальному анализу в пятикратной повторности, используя программу FDim (Harvard Medical School, США) [10].

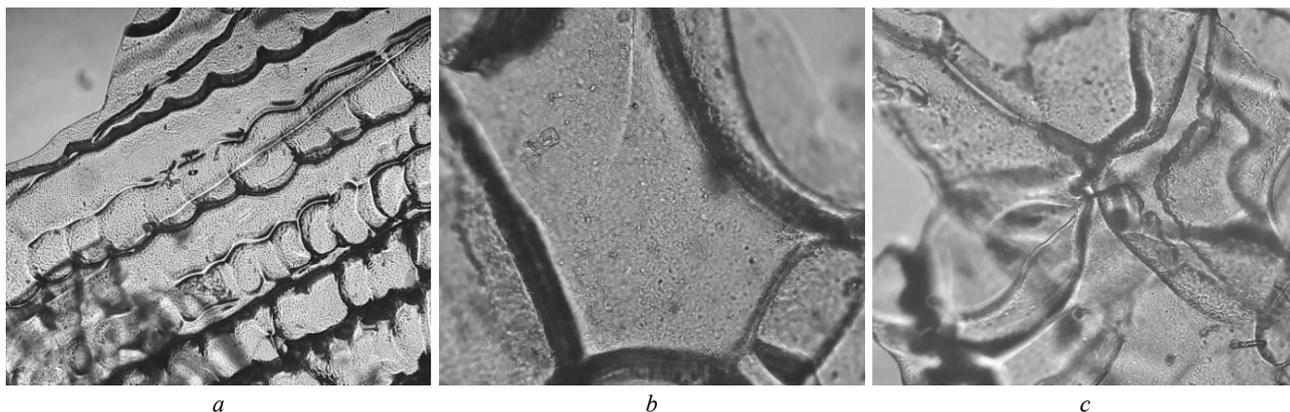
Нормируемые показатели определяли согласно ФС.3.3.1.0061.18 «Пробиотик бифидобактерий бифидум монокомпонентный, лиофилизат для приготовления суспензии для приема внутрь и местного применения» (Государственная фармакопея Российской Федерации, XIV издание, Том 3). Суспензию получали путем встряхивания 1 дозы бифидумбактерина в 1 мл 0,9%-ного раствора хлорида натрия до полного диспергирования субстанции, определяя таким образом показатель «время восстановления препарата». Полученные суспензии использовали для потенциометрического анализа на приборе рН 510 (Euthech instruments, Нидерланды).

Статистическую обработку данных осуществляли в виртуальном пространстве программы LibreOffice Calc (версия 6,2, The Document Foundation, Германия).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ

Морфологическая картина образцов при различной степени увеличения сухого препарата приведена на рис. 1. На основании графических характеристик микрофотографий, таких как размер изображения анализируемого образца и четкость визуализации, увеличение в 400 раз было признано оптимальным.

В результате анализа поверхности твердой фазы лиофилизатов было выявлено наличие хаотической складчатости (рис. 2). Существенных визуальных отличий между образцами, которые были подвергнуты термическому воздействию различной продолжительности, не установлено. Однако для всех образцов наблюдалась повторяемость отдельных элементов, характерная для фрактальных объектов. Следует отметить, что анализируемые текстуры не являются фрактальными в строгом значении



**Рис. 2.** Микрофотографии образцов бифидумбактерина, хранившиеся при 50 °С в течение: *a* — 0 мин, *b* — 60 мин, *c* — 240 мин.

**Fig. 2.** Photomicrography of the lyophilizates bifidumbacterin, stored at 50 °С. *a* — 0 min, *b* — 60 min, *c* — 240 min.

этого математического термина, но, как и в случае со многими другими природными объектами, здесь имеет место статистическое самоподобие [11]. Это позволяет подвергнуть данные изображения математическому анализу при помощи специализированного программного обеспечения.

Фрактальную размерность ( $D_c$ ) текстуры поверхности вычисляли по алгоритму box-counting, реализованному в программе FDim, по формуле:

$$D_c = \lim_{\lambda \rightarrow \infty} \frac{\log N(\lambda)}{-\log \lambda},$$

где  $\lambda$  — диаметр участка, подвергнутого анализу,  $N$  — число темных участков, помещенных внутрь анализируемой области. Данную формулу можно преобразовать в уравнение прямой зависимости логарифма количества элементов от логарифма диаметра участка:

$$D_c \cdot \log \frac{1}{\lambda} - \log N(\lambda) = 0.$$

В ходе расчета программа FDim постепенно уменьшает площадь выбранного участка, одновременно подсчитывая количество черных пикселей внутри анализируемой области. По результатам расчета строится график зависимости количества элементов от диаметра участка, после чего аппроксимируется в прямую линию с известными  $N(\lambda)$  и  $\lambda$ , что позволяет вычислить искомую фрактальную размерность  $D_c$ . Хотя анализируемая область выбиралась вручную, ее размер определялся возможностями программы. Максимальное значение ограничивалось рабочим полем программы и составляло  $950 \times 1900$  пикселей, а минимальное должно было в два раза превосходить количество черных пикселей внутри анализируемой области.

Результаты анализа микрофотографий приведены в табл. 1. Относительная ошибка среднего

результата составила  $0,95\% \pm 0,10\%$ , что является приемлемым для фармацевтического анализа. На фоне хранения лиофилизата бифидумбактерина при 50 °С наблюдается тенденция к увеличению значения фрактальной размерности. Геометрически это выражается в усложнении текстуры поверхности твердой фазы.

По результатам фармакопейного испытания на *время восстановления препарата* выявлена прямая зависимость между этим нормативным показателем и фрактальной размерностью текстуры поверхности твердой фазы лиофилизата (рис. 3). Коэффициент корреляции составил 0,97.

Кроме того, в результате потенциометрического анализа установлена логарифмическая зависимость между значением рН суспензии, полученной в ходе предыдущего испытания, и фрактальной размерностью (рис. 4). Коэффициент корреляции — 0,95.

Поскольку значение фрактальной размерности изменялось в логарифмической прогрессии, можно сделать вывод, что, по сравнению со значением рН, данный параметр является более чувствительным индикатором хранения бифидумбактерина в условиях, не соответствующих нормативной документации.

С химической точки зрения, наличие выявленных закономерностей можно объяснить природой препарата бифидумбактерин. Данный лиофилизат является сухой смесью живых бактерий *Bifidobacterium bifidum* и сахарозо-желатино-молочной среды. В результате нарушения режима хранения среда подвергалась биотрансформации под действием бактерий, что изменило способность твердой фазы к диспергированию. В то же самое время, бактерии выделяли продукты жизнедеятельности, в том числе кислотной природы, присутствие которых приводит к закислению суспензии. Очевидно, что сдвиг в химическом

Таблица 1

**Метрологические характеристики фрактального анализа выборок бифидумбактерина в условиях ускоренного хранения.**

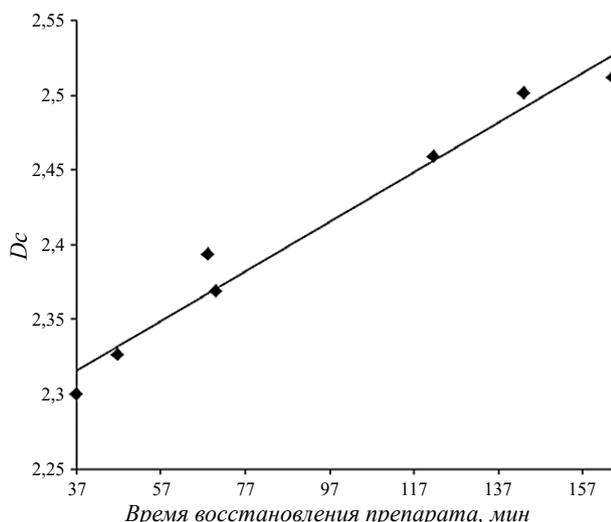
The metrological characteristics of the fractal analysis of the bifidumbacterin samples during the accelerated aging.

| Время выдерживания образца в термостате, мин | Dc   |      |      | Метрологические характеристики |        |        |                |
|--|------|------|------|--------------------------------|--------|--------|----------------|
|  | 1    | 2    | 3    | $\bar{X}$                      | $S^2$  | S      | $\epsilon, \%$ |
| 0  | 2,32 | 2,26 | 2,24 | 2,3001                         | 0,0015 | 0,0389 | 0,78           |
|  | 2,36 | 2,32 | 2,24 |                                |        |        |                |
|  | 2,30 | 2,28 | 2,35 |                                |        |        |                |
|  | 2,29 | 2,27 | 2,34 |                                |        |        |                |
|  | 2,33 | 2,27 | 2,33 |                                |        |        |                |
| 5  | 2,26 | 2,34 | 2,39 | 2,3263                         | 0,0021 | 0,0457 | 1,18           |
|  | 2,35 | 2,40 | 2,29 |                                |        |        |                |
|  | 2,25 | 2,35 | 2,32 |                                |        |        |                |
|  | 2,32 | 2,35 | 2,39 |                                |        |        |                |
|  | 2,28 | 2,30 | 2,32 |                                |        |        |                |
| 15   | 2,35 | 2,35 | 2,39 | 2,3686                         | 0,0013 | 0,0361 | 0,93           |
|  | 2,38 | 2,38 | 2,46 |                                |        |        |                |
|  | 2,39 | 2,34 | 2,40 |                                |        |        |                |
|  | 2,32 | 2,33 | 2,36 |                                |        |        |                |
|  | 2,39 | 2,35 | 2,34 |                                |        |        |                |
| 30   | 2,39 | 2,44 | 2,36 | 2,3935                         | 0,0014 | 0,0378 | 0,98           |
|  | 2,42 | 2,41 | 2,35 |                                |        |        |                |
|  | 2,41 | 2,35 | 2,36 |                                |        |        |                |
|  | 2,41 | 2,35 | 2,36 |                                |        |        |                |
|  | 2,46 | 2,39 | 2,44 |                                |        |        |                |
| 60   | 2,42 | 2,44 | 2,46 | 2,4590                         | 0,0012 | 0,0368 | 0,95           |
|  | 2,43 | 2,53 | 2,42 |                                |        |        |                |
|  | 2,50 | 2,46 | 2,47 |                                |        |        |                |
|  | 2,47 | 2,50 | 2,39 |                                |        |        |                |
|  | 2,47 | 2,49 | 2,44 |                                |        |        |                |
| 120  | 2,48 | 2,48 | 2,48 | 2,5015                         | 0,0010 | 0,0318 | 0,82           |
|  | 2,47 | 2,48 | 2,49 |                                |        |        |                |
|  | 2,48 | 2,49 | 2,56 |                                |        |        |                |
|  | 2,47 | 2,52 | 2,48 |                                |        |        |                |
|  | 2,56 | 2,54 | 2,54 |                                |        |        |                |
| 240  | 2,51 | 2,53 | 2,48 | 2,5124                         | 0,0015 | 0,0390 | 1,01           |
|  | 2,50 | 2,53 | 2,48 |                                |        |        |                |
|  | 2,53 | 2,55 | 2,46 |                                |        |        |                |
|  | 2,53 | 2,48 | 2,45 |                                |        |        |                |
|  | 2,51 | 2,54 | 2,60 |                                |        |        |                |

составе лиофилизата сказывается на его морфологии. Таким образом, изменения в текстуре твердой фазы установлены посредством интеллектуальных технологий и выражены в количественном эквиваленте. Следовательно, фрактальную размерность можно рассматривать как математический дескриптор физического и химического состояния бифидумбактерина, являющийся косвенным индикатором происходящих трансформаций в твердой

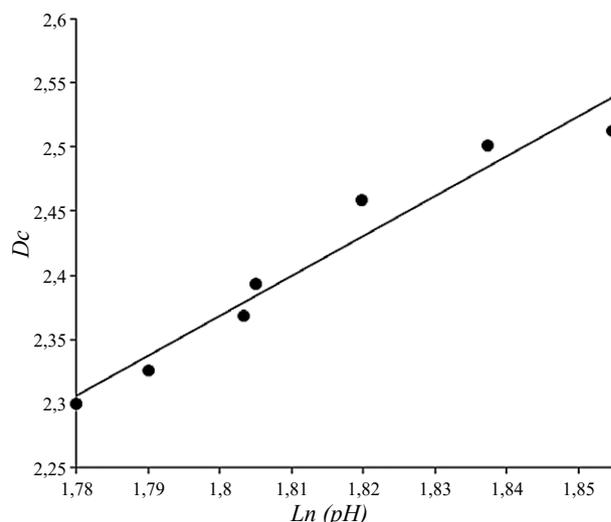
фазе, что позволяет использовать фрактальную геометрию в контроле качества субстанции.

Поскольку любой аналитический метод, рассматриваемый на возможность применения в фармацевтическом анализе, должен пройти соответствующее экспериментальное доказательство на пригодность, были получены валидационные характеристики фрактального анализа для бифидумбактерина (табл. 2).



**Рис. 3.** Линейная зависимость между временем восстановления препарата бифидумбактерина и фрактальной размерностью текстуры поверхности его лиофилизатов.

**Fig. 3.** Linear relationship between the reconstitution time of bifidumbacterin and the fractal dimension of its lyophilizates surface texture.



**Рис. 4.** Логарифмическая зависимость между значением pH суспензии бифидумбактерина и фрактальной размерностью текстуры поверхности его лиофилизатов

**Fig. 4.** Logarithmic relationship between the pH value of bifidumbacterin suspension and the fractal dimension of its lyophilizates surface texture.

Таблица 2

**Валидационные характеристики методики фрактального анализа для бифидумбактерина.**

**Table 2. The validation characteristics of the fractal analysis for the bifidumbacterin.**

| Валидационная характеристика                              | Фрактальный анализ | Нормы по ГФ РФ XIV (ОФС.1.1.0012.15) |
|---|--------------------|--------------------------------------|
| Специфичность   | +                  | +/-                                  |
| Линейность (квадрат линейного коэффициента аппроксимации) | 0,9599             | >0,9000                              |
| Предел обнаружения (время полного восстановления, мин)    | 0,1976             | n/a                                  |
| Правильность*   | 0,0384             | <0,0500                              |
| Сходимость (относительное стандартное отклонение)         | 0,0400             | <0,0500                              |

\* Согласно, ГФ РФ XIV, «Правильность методики характеризуется отклонением среднего результата определений, выполненных с ее использованием, от значения, принимаемого за истинное»

\* According to the Russian Pharmacopoeia XIV “The correctness of the methodology is characterized by deviation of average test result executed with its use from the value taken as true”

Полученный дескриптор, так же как и значение pH, можно причислить к показателям чистоты препарата. В фармакопейном анализе принято дифференцировать методики, предназначенные для качественной и количественной характеристики чистоты субстанции. Результаты валидации позволяют рассматривать методику фрактального анализа в качестве кандидата в группу количественных методик, поскольку для нее была не только установлена специфичность и рассчитан предел обнаружения, но и выявлены приемлемые значения линейности, правильности и сходимости.

Учитывая ранее полученные данные по возможностям фрактальной геометрии для контроля качества лиофилизированных субстанций малых

молекул (на примере дигидрохверцетина) [7], можно признать эту математическую концепцию перспективной основой для разработки универсального экспресс-анализа качества фармацевтических субстанций без разрушения исследуемого образца на базе интеллектуальных технологий.

В ходе проведенного исследования изучена возможность применения фрактального анализа для создания автоматизированной методики экспресс-анализа лиофилизированного бифидумбактерина. Выявлена корреляция между фрактальной размерностью и физико-химическими характеристиками исследуемой субстанции. Установлено, что использованный метод характеризуется приемлемыми валидационными показателями для количественной оценки чистоты

фармацевтической субстанции. На примере препарата «Бифидумбактерин» продемонстрировано, что фрактальная геометрия может выступать связующим звеном между искусственным интеллектом и материальным объектом в рамках фармацевтического анализа.

#### ФИНАНСИРОВАНИЕ

Исследование поддерживается «Проектом повышения конкурентоспособности ведущих российских университетов среди ведущих мировых научно-образовательных центров»

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Федеральный закон от 12.04.2010 № 61-ФЗ «Об обращении лекарственных средств». *Российская газета*, 2010, 78 (5157), 18.
2. ГОСТ Р 52249-2009 «Правила производства и контроля качества лекарственных средств». Москва, Россия: Стандартинформ, 2010, 133.
3. Государственная фармакопея Российской Федерации, XIV издание, Том 1. Москва, Россия: Министерство здравоохранения Российской Федерации, 2018, 1814.
4. Gabriel-Guzman M., Rivera V.M., Cocotle-Ronzon Y., Garcia-Diaz S. et al. Fractality in coffee bean surface for roasting process. *Chaos Solitons Fractals*, 2017, 99, 79–84. doi: 10.1016/j.chaos.2017.03.056
5. Campos-Dominguez A., Ceballos-Ceballos Y.I., Zamora-Castro S.A., Hernandez-Martinez E. et al. Indirect Monitoring Cane Sugar Crystallization via Image Fractal Analysis. *Comput. y Sist.*, 2018. 22 (4), 1147–1155. doi: 10.13053/cys-22-4-3100
6. Hurychova H., Kuentz M., Sklupalova Z. Fractal Aspects of Static and Dynamic Flow Properties of Pharmaceutical Excipients. *J. Pharm Innov.*, 2018, 13 (1), 15–26. doi: 10.1007/s12247-017-9302-0
7. Terekhov R., Selivanova I. Fractal Aggregation of Dihydroquercetin After Lyophilization. *J. Pharm Innov.*, 2018, 13 (4), 313–320. doi: 10.1007/s12247-018-9322-4
8. Ильин В.К., Кирюхина Н.В. Синдром нарушения колонизационной резистентности человека в искусственной среде обитания и его профилактика. *Acta Naturae*, 2014, 6 (2), 11–20.
9. Жученко М.А., Пашков М.А., Потапенко О.В. Лиофилизация биопрепаратов в двухкамерных шприцах. *Биотехнология*, 2015, (4), 79–84.
10. Reuter M. Fraktaldimension von Grauwertbildern: master degree dissertation, Leibniz University of Hannover, Hannover, 1999.
11. Feldman D.P. Chaos and fractals: an elementary introduction. Oxford, United Kingdom: Oxford University Press, 2012, 431 p.

## Fractal Analysis of Lyophilized Active Pharmaceutical Ingredients

R.P. TEREKHOV<sup>1\*</sup> and I.A. SELIVANOVA<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Department of Chemistry, Institute of Pharmacy, Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, 119991, Russia

\*e-mail: r.p.terekhov@yandex.ru

Received March 13, 2020;

Revised June 3, 2020;

Accepted September 19, 2020

**Abstract**—The development of effective drug quality control methods based on intelligent technologies is an urgent task for pharmaceutical analysis in the context of production robotization. This is particularly topical for biotechnology-derived pharmaceutical ingredients due to the peculiarities of the analysis of these compounds and limited number of quality control methods for drugs. Fractal geometry can be a mathematical background for the creation of such method. In this work we studied the possibility of fractal geometry using for the development of rapid tests for bifidumbacterin lyophilisates. A correlation was established between the fractal dimension of the structure of the *Bifidobacterium bifidum* dry mixture solids with sucrose-gelatin-milk medium and the specified pharmaceutical ingredient parameters, such as drug reconstitution time ( $R^2=0,97$ ) and pH ( $R^2=0,95$ ). This work demonstrated that fractal analysis is a promising tool for automated rapid tests of lyophilized biotechnology-derived active pharmaceutical ingredients without losing the analyzed sample.

**Key words:** fractal analysis, pharmaceutical analysis, quality control, lyophilisates, bifidumbacterin.

**Funding**—This work was supported by the Russian Academic Excellence Project 5-100

**doi:** 10.21519/0234-2758-2020-36-5-98-103