

ПРОЕКТ

«Оптимизация хроматографических систем с детонационными наноалмазами для выделения и очистки фармакологически активных веществ»

В рамках платформы: Инновационные фундаментальные технологии в медицине

- соответствие проекта тематике заявленной научной платформы;

Исследование направлено на изучение возможности применения поверхностно неоднородных частиц - наноалмазов детонационного синтеза для оптимизации селективного выделения, очистки и препаративного накопления, низкомолекулярных физиологически активных веществ.

Актуальность проблемы. Эффективность используемых технологий предназначенных для стандартизации и очистки оригинальных лекарственных препаратов и физиологически активных веществ, обусловлена уровнем развития используемых методов. Особую значимость приобретают подходы, которые позволяют выделять стереоизомеры лекарственных веществ, и присутствующих микропримесей, обладающие различной фармакологической активностью. Проблема очистки и доочистки лекарственных веществ от примесных компонентов междисциплинарна и характеризуется необходимостью решения фундаментальных и прикладных задач (Товбин Ю. К., 2013). Эффективным и экономически выгодным является разработка хроматографических способов очистки и препаративного накопления фармацевтических субстанций. В этой связи, конструирование оригинальных отечественных сорбентов с заданными характеристиками, а именно, высокой селективностью, является важным и перспективным направлением при создании новых синтетических лекарственных средств, а так же веществ с известной фармакологической активностью. Кроме того, достижения современной медицины все чаще обуславливают необходимость создания сорбентов на основе веществ с наноразмерами. Известно, что наноалмазы, полученные детонационным синтезом, обладают высокой адсорбционной эффективностью. Однако применение их в качестве самостоятельных сорбентов в практике является новаторским. В настоящее время уникальные сорбционные свойства детонационных алмазов были использованы только для выделения некоторых типов белков, регулирующих физиологические функции в организме человека (Бондарь В. С., Пузырь А. П., 2005).

В то же время, мало изучены следующие характеристики:

- свойства сорбентов с детонационными наноалмазами с различными поверхностными группами;
- эффективность их применения для разделения низкомолекулярных веществ;
- способность сорбентов обеспечивать адекватную степень очистки от примесных компонентов;
- возможность сохранения максимальной нативности очищаемых субстанций.

Цель проекта – разработка селективных способов очистки низкомолекулярных фармакологически активных веществ от примесных компонентов с использованием сорбентов с детонационными наноалмазами.

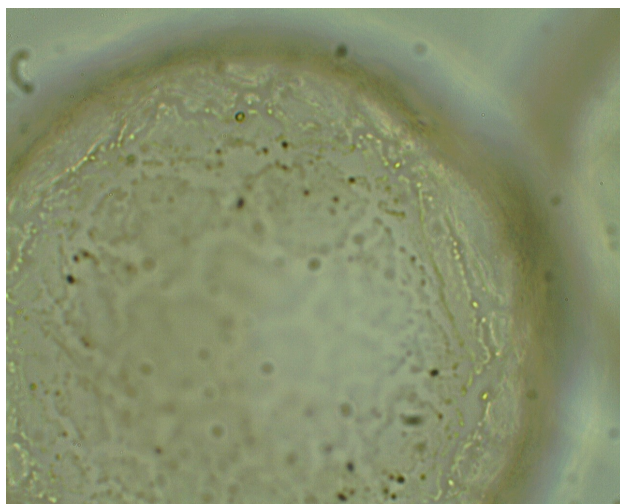
Краткая аннотация. Предлагаемый проект направлен на разработку хроматографических методов с использованием сорбентов с детонационными наноалмазами для селективной очистки фармакологически активных веществ. Преимуществами разрабатываемой системы являются:

- универсальность сорбентов применительно к различным классам фармакологически активных веществ;
- возможность минимизации использования дорогостоящих органических растворителей и сорбентов импортного производства;

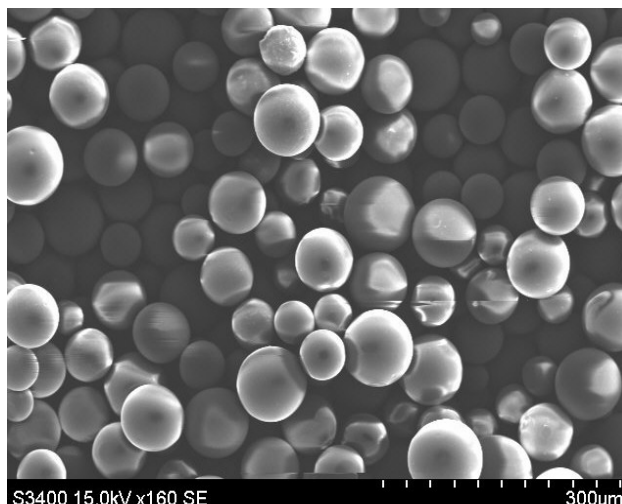
- возможность использования в аналитическом варианте при установлении параметров качества готовых лекарственных препаратов;
- возможность применения сорбентов в варианте препаративной и плупрепаративной хроматографии;
- многократность применения и возможность регенерации сорбентов;
- относительная простота решений и, как следствие, невысокая стоимость, по сравнению с существующими системами.

Научно-техническая новизна представляемого проекта. Впервые на основе матрицы-носителя по авторской технологии закреплены наноразмерные алмазные частицы, полученные детонационным синтезом. Высокая удельная поверхность которых, обуславливает уникальные сорбционные свойства применительно к различным классам фармакологически активных веществ. Разработанный вариант позволяет использовать сорбенты в аналитических и препаративных режимах. В активе этих исследований три патента на изобретение. Реализованные подходы позволяют получать адсорбенты с новыми качественными характеристиками с высокой селективностью и устойчивостью к разрушению. Значимым результатом проведенных исследований будет являться изучение хроматографических свойств и параметров сорбентов, обусловленных влиянием вида используемой матрицы (сверхсшитый полистирол, поливинилацетат, агароза (поперечносшитая), декстран), условий хроматографирования (состав подвижной фазы), влияние температурного режима на сорбцию и десорбцию хроматографируемых веществ. Оптимизированы хроматографические условия для выделения и разделения стереоизомеров, а так же микропримесей лекарственных веществ. Как результат, оптимизируются хроматографические условия для выделения и разделения стереоизомеров, а так же очистки лекарственных веществ от примесных компонентов.

Основные технологии реализации проекта. В проекте используются матрицы с закреплёнными наноалмазами, применение которых, оптимизирует хроматографические подходы для препаративного накопления, очистки и анализа лекарственных веществ различных фармакологических групп. Запатентованная методика закрепления на полимерном носителе наноструктур позволяет использовать поверхностные свойства наноразмерных частиц в хроматографическом процессе, повышая эффективность и селективность при очистке целевого продукта от сопутствующих примесей. Важной особенностью является многократность применения одного сорбента в технологическом процессе, а так же его универсальность. В процессе изготовления на поверхности матрицы фиксируется ассоциат наноалмаза (рис. 1а) с высокой удельной поверхностью, обеспечивая селективные хроматографические эффекты при разделении и очистки физиологически активных веществ. Хроматографическое разделение достигается при использовании жидкостной колоночной хроматографии, в режимах: аналитическом, препаративном и полумикропрепаративном.



а



б

Рис. 1. Микроскопия сорбентов с иммобилизованными наноалмазами на поверхности:

а) гранул сефадекса LH-20;

б) электронная микроскопия ассоциатов наночастиц детонационных наноалмазов

В рамках данного проекта разработана хроматографическая система с использованием детонационных наноалмазов, как универсальных селекторов для разделения, очистки и доочистки субстанций фармакологически активных веществ от примесных компонентов, а при необходимости – разделения рацемических смесей на отдельные стереоизмеры. Полученные в результате утилизации бризантных веществ (взрыв в специальной камере) - детонационные наноалмазы экономически выгодный объект. Собственно их применение в качестве хроматографического сорбента, оказалось не возможным из-за очень маленьких размеров частиц. Которые собранные в стохастические ассоциаты (размер отдельных самых крупных частиц не превышает 10мкм). Поэтому для обеспечения потока подвижной фазы требуется использовать величины давления, которые по ряду инженерно-технических причин выполнить крайне затруднительно. Одним из подходов реализованный зарубежными исследователями, является спекание порошка наноалмазов с последующей механической деструкцией и фракционным просеиванием через сита (с размером ячейки от 5 до 20 мкм) по необходимым размерам. Однако, при данном варианте получают частицы «неправильной» формы. Такие сорбенты, упакованные в хроматографические колонны, обладают неравномерной скоростью диффузии подвижной фазы. В результате, образуются участки с «затруднённым» продвижением, что снижает эффективность хроматографического процесса.

Использованный в предлагаемом проекте подход, основан на закреплении наночастиц на поверхности матрицы геометрически правильной формы (например, на гранулах сефадекса LH-20). Это позволило оптимизировать процесс хроматографического разделения и сохранить уникальные поверхностные свойства наночастиц.

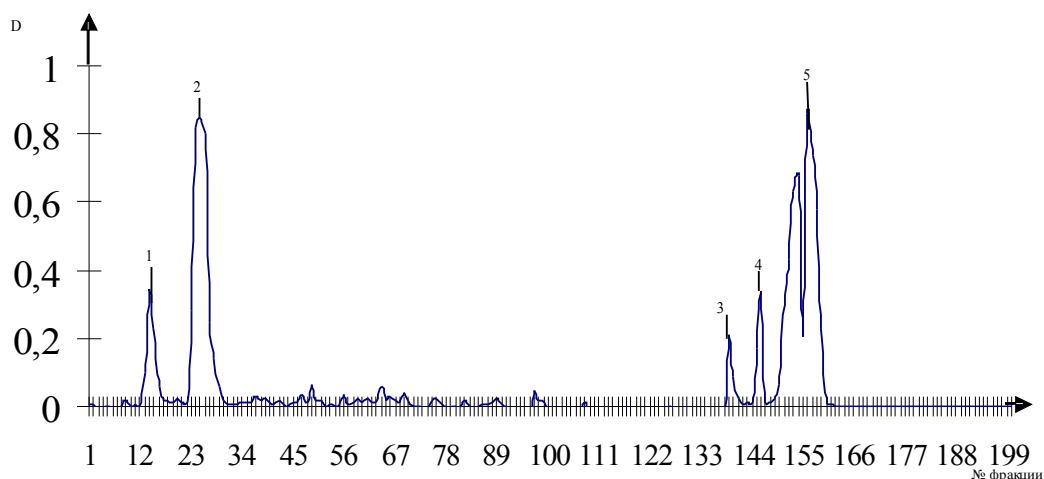


Рис. 2. Хроматограмма разделения модельной смеси на сорбенте LH-20 с ДНА; где: 1-дексаметазон, 2- изониазид, 3-фуросемид, 4-ортофен, 5 – рутин.

На рис. 2. представлена хроматограмма, отражающая разделение модельной смеси лекарственных веществ. В водной элюции (фракция 1-90) выделены дексаметазон, изониазид, а в режиме градиентного элюирования EtOH 10-50 % (фракции 90-200 с шагом повышения концентрации 20) последовательно выделены: фуросемид, ортофен, рутин.

Созданные сорбенты с наноалмазами осуществляют очистку и доочистку лекарственных веществ (фармацевтических субстанций). Это востребовано на предприятиях медико-фармацевтического комплекса, что позволяет заменить дорогостоящие импортные, а так же малоэффективные сорбенты (на основе активированного угля и/или ионообменных смол некоторого типа). возможность многократной регенерации, что способствует снижению стоимости целевого продукта и, собственно, оптимизации производства современных отечественных лекарственных препаратов.

Основное содержание проекта:

- конструирование и применение на практике новых отечественных адсорбентов с заданными свойствами;
- разработка оригинальных способов очистки и анализа фармакологически активных веществ с использованием синтезированных адсорбентов.
- Сравнительная характеристика качественных параметров веществ, полученных в процессе очистки.

Методы исследования Приготовление сорбента включает этапы: обработку матрицы (используются полисахаридные матрицы на основе агарозы (Sephарозе CL) или декстрана (sephadex LH-20) или полимерные матрицы на основе сверхсшитого полистерола или поливинилметакрилата) наноалмазным гидрозоле, последующей обработкой эпоксилирующим реагентом для сшивания пространственных ниш сорбента, присоединением по остаточным эпоксигруппам вещества вставки и лиганда. Полученный сорбент упаковывается в хроматографические колонки известной конструкции. Жидкостная колоночная хроматография нормального давления осуществляется на колонки стеклянных (тип Pharmacia). Вариант высокоэффективной жидкостной хроматографии на стальных ВЭЖХ колонках. Упаковку колонок осуществляем самостоятельно. Анализ ВЭЖХ выполняется на хроматографе ЦВЕТ-ЯУЗА-04 (с ультрафиолетовым и амперометрическим детекторами). Исследуются структурные свойства полученных сорбентов с применением

спектральных методов УФ на приборе СФ-2000 (Россия), ИК – на приборе ФСМ-1202 (Россия). Изучение хроматографических свойств сорбентов направлено на оптимизацию стандартизации и очистки лекарственных веществ и их препаратов для лечения социально значимых заболеваний (препараты с противотуберкулёзной, сердечно-сосудистой, гастроэнтерологической направленностью). В работе используется несколько моделей, в том числе – «ускоренного старения», с последующей хроматографической очисткой основного компонента от образовавшихся продуктов распада. Методом модельных смесей - оптимизацией хроматографического выделения модельных компонентов из биожидкостей. Степень очистки выделенных компонентов будет проанализирована комплексом спектральных: УФ- ИК- спектроскопия, а так же хроматографических методов: ТСХ, ВЭЖХ и газовой хроматографией с масс-спектрометрической детекцией.

Полученные результаты. Разработан способ закрепления детонационных наноалмазов на поверхности полисахаридной хроматографической матрицы (Патент № 2451544). Исследована возможность применения данных сорбентов для биотехнологических режимов связанных с выделением бифидогенного фактора (Заявка на патент № 2013123078). Разработана возможность применения сорбентов с детонационными наноалмазами от загрязнителей стохастической структуры (Патент № 2465593). Исследована возможность эффективной очистки препаратов – ингибиторов протонной помпы от сопутствующих примесных компонентов. Разработаны эффективные способы регенерации сорбентов. Рассчитана экономическая эффективность производства и применения сорбентов с детонационными наноалмазами.

Перспективы дальнейшего развития результатов НИР, возможности внедрения. Проводимая НИР по сорбентам с детонационными наноалмазами способствует решению важных фундаментальных вопросов связанных с адсорбционными свойствами наноструктур, а так же прикладных задач выделения и очистки фармакологически активных веществ. Данный хроматографический подход может быть востребован при проведении фармакологических исследований при анализе фармакокинетических и фармакодинамических показателей лекарственных веществ. Использование сорбентов с ДНА (детонационные наноаламазы) позволят минимизировать трудозатраты с пробоподготовкой образцов. С другой стороны, предприятия фармацевтического профиля заинтересованы в оптимизации процессов разделения, очистки (доочистки) лекарственных веществ и их субстанций, в том числе с использованием хроматографических подходов. Важным современно-значимым аспектом дальнейших НИР является возможность применения сорбентов с ДНА для обеспечения экологического благополучия. В качестве основных потенциальных покупателей будут предприятия и НИИ медико-фармацевтического профиля.

План практического воплощения проекта.

–	исследованы и обоснованы научные аспекты	60 %
–	исследованы и обоснованы технические аспекты	80 %
–	проведены теоретические и экспериментальные исследования	75 %
–	проведена подготовка и освоение производства	0 %
–	имеются необходимые права на интеллектуальную собственность, know-how	100 %
–	имеются разрешения экологического контроля	0 %
–	проведены социальные исследования	0 %
–	исследованы и обоснованы экологические аспекты проекта	0 %
–	проведены маркетинговые исследования	25 %
–	наличие материально-технической базы	85 %
–	наличие промышленных мощностей	0 %
–	наличие необходимого персонала	75 %
–	определено и согласовано финансирование проекта	50 %
–	определено и согласовано место выполнения проекта	50 %

Команда проекта.

Сухих А. С. к. фарм. н., доцент, старший научный сотрудник центральной научно-исследовательской лаборатории (ЦНИЛ) ГБОУ ВПО КемГМА Минздрава РФ. Участник реализации гранта Президента РФ «Поддержка молодых учёных кандидатов наук 2010-2011 гг»проект МК-971.2010.7. Победитель конкурса НИР, проводимого Кузбасским научным центром СО РАМН 2014г . Исполнитель гранта Губернатора Кемеровской области 2013 г. Принимал участие в выполнении государственных целевых программ. Прошел тематические курсы «Теория и практика хроматографии» при ФГБОУ ВПО «Санкт-Петербургский государственный университет» 2013 г. Suhih_as@list.ru

Котова Т. В. к. техн. н., доцент Кемеровского института (филиала) ФГБОУ ВПО «Российский экономический университет им. Г. В. Плеханова». Проводит научные исследования в области стандартизации и сертификации биологически активных компонентов. Прошла сертифицирование в НИИ биотехнологии и сертификации. Руководитель ежегодно проводимого круглого стола «Экспертиза, качество и безопасность» в рамках Международной научно-практической конференции «Торговля в XXI веке», организованной «Экспо-Сибирь».

t_kotova@inbox.ru

Вайц Е.В. Студентка 5-ого курса фармацевтического факультета ГБОУ ВПО КемГМА Минздрава РФ. katia-weiz@mail.ru

Основные публикации по проекту:

1. Патент на изобретение: Сорбент для хроматографии Пат. № 2451544. Рос. Федерация: Оpubл. 27.05.2012, Бюл. № 30.
2. Патент на изобретение: Способ очистки и фракционирования гуминовых кислот и гуминоподобных веществ Пат. № 2413564 Рос. Федерация: Оpubл. 10.03.2011 Бюл. № 7.
3. Патент на изобретение: Способ получения фитопрепаратов из некоторых видов копеечника (Копеечник чайный *Hedysarum theinum*, Копеечник забытый *Hedysarum neglectum* и др.). Пат. № 2402344 Рос. Федерация: Оpubл. 27.10.2010, Бюл. №3 0.
4. Получение методом жидкостной колоночной хроматографии стандарта мангиферина для исследований фитопрепаратов растений рода Копеечник / Федорова Ю. С., Сухих А. С., Кузнецов П. В. // Вестник Пермской государственной фармацевтической академии. – 2010. – № 7. – С. 210-214.
5. Сравнительный хроматографический анализ фракционного состава фитопрепаратов растений рода Копеечник / Федорова Ю. С., Сухих А. С., Кузнецов П. В. //Сорбционные и хроматографические процессы. –2011. – № 4. –С. 575-580.
6. Ключевые биологически активные вещества фитопрепаратов на основе растений рода Копеечник / Федорова Ю. С., Сухих А. С., Кузнецов П. В. // Сорбционные и хроматографические процессы. – 2011. –Т. 11. – № 5. – С. 708-713.
7. Эпоксиреагент Хуберта в конструировании адсорбентов аффинного типа / А. А. Дудин, П. В. Кузнецов, А. С. Сухих и др. // Сорбционные и хроматографические процессы. – 2012. – № 3. – С. 345-355.
8. Урсодезоксихолевая кислота вчера и сегодня / Плотникова Е. Ю., Сухих А.С.//Терапевт. –2012. – № 7. – С. 27-34.
9. Спектроскопическое изучение взаимосвязи колебаний карбонильных групп в кроконовой кислоте / Невзоров Б. П., Салтанова Е. В., Сухих А. С., Фадеев Ю. А.// Вестник КемГУ. – 2012. – № 4 (52) Т. 2. – С. 158-164.
10. Лечение кислотозависимых заболеваний: история вопроса и актуальные проблемы / Бородин Д. С., Плотникова Е. Ю., Сухих А. С. // [Consilium Medicum](#). – 2013. –Т. 15. – № 8. – С. 38-44.
11. Котова Т. В. Оценка соответствия маркировки энергетических напитков требованиям нормативных документов в области стандартизации // В мире научных открытий. Красноярск: 2012, № 2.3 (26), С. 149-162.
12. Котова Т. В., Черемичкина А. С. Анализа качества энергетических напитков на соответствие требованиям стандартов // Техника и технология пищевых производств. Кемерово: 2012, № 2'12, С. 148-154.

Финансовая модель

Календарный план реализации проекта или этапный механизм осуществления

№ этапа	Наименование работ по основным этапам НИОКР	Сроки выполнения работ (мес.)
1	Закупка реактивов и расходных материалов, синтез сорбентов	4
2	Исследование хроматографических свойств сорбентов	10
3	Анализ целевого продукта с привлечением физико-химических методов	6
4	Подготовка для сертификации и фармацевтических испытаний.	4

Затраты, необходимые для реализации проекта

Наименование работ по основным этапам НИОКР	Стоимость этапа, р.
Закупка реактивов комплектующих и расходных материалов	200 000
Исследование свойств сорбентов	200 000
Настройка и тестирование системы	200 000
Подготовка системы для сертификации фармацевтических испытаний	300000
Итого:	900000