

На правах рукописи

Турецкий Евгений Александрович

**СОЗДАНИЕ СТАНДАРТНОГО ОБРАЗЦА ВОДНОГО РАСТВОРА
ФУЛЛЕРЕНА**

14.04.02– Фармацевтическая химия, фармакогнозия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата фармацевтических наук

Москва - 2020

Диссертационная работа выполнена в федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего образования Первый Московский государственный медицинский университет имени И. М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет)

Научный руководитель:

Кандидат фармацевтических наук, доцент

Смирнов Валерий Валерьевич

Официальные оппоненты:

Саканян Елена Ивановна – доктор фармацевтических наук, профессор, акционерное общество «Научно-производственное объединение» «МИКРОГЕН», директор по науке

Грушевская Любовь Николаевна – доктор фармацевтических наук, ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фармакологии имени В.В. Закусова», химико-технологическая лаборатория опытно-технологического отдела, ведущий научный сотрудник

Ведущая организация:

Акционерное общество «Всесоюзный научный центр по безопасности биологически активных веществ»

Защита состоится «__» _____ 2020 г. в __ часов на заседании диссертационного совета Д 208.040.09 при ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет им. И. М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) по адресу: 119991, г. Москва, ул. Трубецкая, д. 8, строение 2.

С диссертацией можно ознакомиться в центральной научной медицинской библиотеке ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет им. И. М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) по адресу 119034 г. Москва, Зубовский бул., д. 37/1 и на сайте организации <http://sechenov.ru/>.

Автореферат разослан «__» _____ 2020 г.

Учёный секретарь

диссертационного совета Д **208.040.09**

доктор фармацевтических наук,
профессор

Демина Наталья Борисовна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Фуллерен C_{60} – это стабильная аллотропная модификация углерода, физико-химические свойства которой активно используются современными исследователями в области физики, электрохимии и медицинской и фармацевтической химии. Первый отчёт о его получении в искусственных условиях датируется 1985 годом, когда он был обнаружен и охарактеризован в опытах по возгонке графита лазерным излучением (Крото, 1985). В 1990 году вышла статья, описывающая способ получения твёрдых фуллеренов с существенным выходом (Кретшмер, 1990), и начали появляться работы по их реакционной способности. К настоящему времени эти работы сформировали отдельное направление «химии фуллеренов». Параллельно, исследования биологических свойств фуллеренов и их производных выявили их способность подавлять вирусные инфекции и аллергические воспалительные процессы, а также препятствовать развитию повреждений печени при интоксикациях. Было продемонстрировано отсутствие токсичности немодифицированных фуллеренов для млекопитающих. Тем не менее, на данный момент не существует общепринятых подходов к получению и стандартизации водных растворов фуллеренов. Переход от лабораторных испытаний к медицинскому применению препарата требует установки норм качества водного раствора фуллерена, а также разработки более эффективного способа его получения.

Степень разработанности темы исследования

В современной научной литературе описано несколько методов получения водных растворов фуллерена, предполагающих растворение фуллерена в органическом растворителе с последующим замещением растворителя на воду с использованием ультразвука, барботирования инертным газом или равновесного диализа через полупроницаемую мембрану. При этом

концентрация, размеры частиц фуллерена и содержание остаточных растворителей в полученных растворах могут иметь значительные отличия, что не позволяет получать этими методами стандартные препараты для медицинского применения. Использование водного раствора фуллерена в медицинских целях требует разработки нормативной документации, обеспечивающей качество препарата. Поскольку водный раствор фуллерена является дисперсией, содержащей наночастицы, предложенный метод стандартизации должен также включать определение размера частиц.

Цель исследования

Цель исследования – разработать способ получения водного раствора фуллерена, предназначенного для стандартизации и контроля качества лекарственных средств, а также для изучения его безопасности.

Задачи исследования

1. Изучить современное состояние проблемы получения и стандартизации водных растворов фуллерена.
2. Разработать метод получения устойчивого водного раствора фуллерена для медицинского применения.
3. Провести комплексные исследования по изучению физико-химических свойств и разработке методик анализа стандартного образца водного раствора фуллерена с помощью методов ИК-спектроскопии, УФ-спектроскопии и масс-спектрометрии.
4. Оценить возможность применения хроматографических методов в контроле качества водного раствора фуллерена
5. Разработать методы оценки размера и строения наночастиц в растворах для фармацевтического анализа водного раствора фуллерена.
6. Определить биологическую безопасность стандартного образца водного раствора фуллерена в опытах *in vivo* и *in vitro*

7. Обосновать показатели качества водного раствора фуллерена и провести определение этих показателей в стандартном образце водного раствора фуллерена.

Научная новизна исследования

Разработана новая методика получения водного раствора фуллерена (ВРФ) с использованием тангенциальной ультрафильтрации (ТУФ), позволяющая почти на порядок повысить концентрацию фуллерена в растворе по сравнению с имеющимися методами.

Изучено влияние неионогенных ПАВ на процесс ультрафильтрации и структурные особенности наночастиц фуллерена в растворе. Показано увеличение седиментационной и агрегационной устойчивости дисперсий, сопровождаемое увеличением размеров частиц в дисперсиях.

Разработаны методики качественного и количественного определения фуллерена в растворе с применением методов ИК-спектроскопии, спектроскопии в ультрафиолетовой и видимой области, масс-спектрометрии, динамического светорассеяния.

Впервые определены показатели качества стандартного образца водного раствора фуллерена с учётом его физико-химических свойств.

Исследована безопасность *in vivo* водного раствора фуллерена при хроническом введении, изучена дифференциальная токсичность для различных тканей млекопитающих. Получены не описанные ранее в научной литературе данные о гистологических изменениях в тканях млекопитающих, связанных с хроническим введением фуллерена. В частности, показано накопление фуллерена в тканевых макрофагах.

Теоретическая и практическая значимость работы

Анализ строения и состава частиц фуллерена в растворах позволяет объяснить механизм стабилизации частиц фуллерена в водных растворах.

Разработанный способ получения водного раствора фуллерена и создание методик анализа его качества позволяет с высокой воспроизводимостью получать раствор фуллерена для медицинского применения или включения в состав лекарственных средств.

Основные положения, выносимые на защиту

- Разработанный способ получения водного раствора фуллерена методом ультрафильтрации, включая результаты исследования взаимодействия частиц фуллерена с различными материалами мембран (полисульфон, регенерированная целлюлоза).
- Разработанные методики контроля качества водного раствора фуллерена методами спектроскопии в ультрафиолетовой и инфракрасной области.
- Результаты исследований размера и формы частиц фуллерена в водных растворах методами динамического светорассеяния, электронной микроскопии и малоуглового рассеяния нейтронов.
- Результаты исследований токсичности водного раствора фуллерена *in vivo* и *in vitro*.

Методология и методы исследования

Методология исследования включала подбор способа получения водного раствора фуллерена, методов его количественного и качественного анализа, протоколов изучения его токсичности. В ходе исследования использованы современные физико-химические методы исследования, включая элементный анализ, ИК-спектроскопию, УФ-спектроскопию, масс-спектрометрию, фотокорреляционную спектроскопию, малоугловое нейтронное рассеяние. Обработку первичных результатов проводили с использованием программного обеспечения Agilent Cary Win UV, Microsoft excel, STATISTICA 10.

Достоверность научных положений и выводов

Приведённые в диссертации данные являются достоверными и точными, получены с использованием современного оборудования, прошедшего своевременную поверку и зарегистрированного в Реестре средств измерения.

Апробация результатов исследования

Основные положения и результаты исследований доложены на: 7-ой международной научно-методической конференции «Фармобразование-2018» (Воронеж, 2018 гг.), школы-конференции молодых учёных с международным участием: «Ильинские чтения» (Москва, 2018 гг.), международном форуме «Биотехнология: состояние и перспективы развития» (Москва, 2018 гг.), международном конгрессе европейской академии аллергологов и клинических иммунологов ЕААСI (Мюнхен, 2018 гг.), 14-ой международной конференции “Advanced Carbon Nanostructures” (Санкт-Петербург, 2019 гг.). Апробация работы проведена на заседании кафедры фармацевтической и токсикологической химии им. А.П. Арзамасцева Первого МГМУ им. И.М. Сеченова (протокол №12 от 29.07.19).

Личный вклад автора

Автору работы принадлежит первостепенная роль в выборе объекта и направления исследования, проведении экспериментальной части, обобщении полученных результатов, статистической обработке и анализе данных. Вклад автора является определяющими на каждом этапе проводимого исследования: от постановки цели и задач до их практической реализации, включая обсуждение результатов в научных публикациях, выступления с докладами и непосредственным внедрением в практику.

Внедрение результатов исследования

Результаты исследований используются в учебном процессе на кафедре фармацевтической и токсикологической химии им. А. П. Арзамасцева ФГАОУ

ВО Первый МГМУ им. И.М.Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), и внедрены в работу лаборатории № 72 пептидных иммуногенов ФГБУ «ГНЦ Институт Иммунологии» ФМБА России.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Научные положения, изложенные в диссертационной работе, соответствуют формуле паспорта специальности 14.04.02 – «Фармацевтическая химия, фармакогнозия», а именно пунктам 1, 2, 3 областей исследования.

Связь исследования с проблемным планом фармацевтической науки

Выполнение диссертационной работы проводилось в рамках плана и в соответствии с тематикой научно-исследовательской работы на кафедре фармацевтической и токсикологической химии им. А. П. Арзамасцева ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М.Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), по теме: «Совершенствование образовательных технологий додипломного и последипломного медицинского и фармацевтического образования» (номер государственной регистрации 01.2.011.68237).

Объем и структура диссертации

Работа изложена на 94 страницах машинописного текста, содержит 3 таблицы и 30 рисунков. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, 2 экспериментальных глав, выводов, списка литературы (109 наименований, из них 109 на иностранных языках).

Полученные результаты работы были статистически обработаны, обобщены в таблицах, которые приведены в работе.

Публикации

По материалам диссертационной работы опубликовано 7 печатных работ, из них 1 патент, 1 статья в издании из перечня ВАК РФ, 1 - в издании, включённом в базу данных Scopus и Web of Science.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

Для проведения испытаний было использовано следующее оборудование: спектрофотометр Cary 100, Agilent Technologies, спектрометр Bruker Alpha IR/ATR, масс-спектрометр MicroflexTM LT MALDI-TOF, Bruker Daltonics, анализатор элементного состава Perkin Elmer 2400 series II, анализатор размера частиц photocor compact-z, электронный микроскоп MAIA3 Tescan, ридер MultiscanGO (Thermo Scientific). Для проведения испытаний по ультрафильтрации была использована ультрафильтрационная ячейка amicon CEC-1 с мембранами amicon PM 10, amicon PM 30, amicon XM 10, amicon XM 50, Millipore ultracel 30 kDa и Millipore ultracel 100 kDa, а также ячейки sartorius 200 с мембранами sartorius MWCO 30 кДа и sartorius MWCO 100 кДа. Были использованы следующие реактивы: фуллерен C₆₀ (неотек продакт, 99,95%), 1-метил-2-пирролидон (Panreac Applichem, 99,5%), полуксамер 407 (pluronic F-127, sigma, suitable for cell culture), толуол (sigma, 99,9%), ацетонитрил (Thermo Fisher, 99,9%) TCX-пластинки whatman DC-kieselgel 60 и whatman SC-5 Multi-K K5F KC18F.

Результаты исследования

Разработка способа получения водного раствора фуллерена

Известные на данный момент способы получения водного раствора фуллерена предполагают растворение фуллерена в органическом растворителе, таком как толуол или тетрагидрофуран, с последующим смешиванием с водой и удалением исходного растворителя посредством воздействия ультразвука, вызывающего его нагрев и испарение, или посредством вытеснения инертным газом. Данные способы имеют ряд недостатков, таких, как использование высокотоксичных растворителей, низкие выходы, большой размер частиц в

получившихся дисперсиях, возможность протекания побочных реакций из-за длительного контакта с кислородом воздуха и т. д.

Важным этапом представленной работы была разработка способа получения водного раствора фуллерена, лишённого этих недостатков. Этот способ заключается в растворении фуллерена в 1-метил-2-пирролидоне (МП) с получением насыщенного раствора с последующим смешением его в соотношении 1:1 с 0,01% водным раствором полоксамера 407 и удалением исходного растворителя методом тангенциальной ультрафильтрации. Раствор, содержащий наночастицы фуллерена в водно-органической смеси помещается в ёмкость с ретентатом, и подвергается циркуляции во внутреннем объёме ультрафильтрационной ячейки с помощью перистальтического насоса. Установленная в ячейке мембрана из регенерированной целлюлозы проницаема для растворителя, который удаляется в слив, но непроницаема для частиц фуллерена, которые возвращаются в ёмкость с ретентатом, куда, по мере снижения объёма рециркулирующей жидкости поступает вытесняющий раствор (0,01% раствор полоксамера 407) из резервуара. Для полного удаления 1-метил-2-пирролидона требуется приблизительно 20-кратный объём вытесняющей жидкости. В ходе ультрафильтрации на поверхности мембраны может образовываться осадок (т. н. кейк), который выступит в качестве центра коагуляции при попадании в ёмкость с ретентатом, приводя к выпадению фуллерена в осадок из раствора. Чтобы избежать попадания фуллерена в твёрдом виде в ёмкость с ретентатом, между ячейкой и ёмкостью устанавливают стекловолоконный фильтр. Концентрация полоксамера в воде должна быть значительно ниже критической концентрации мицеллообразования, чтобы предотвратить удерживание и накопление мицелл полоксамера в ретентате. Оптимальный размер пор мембраны составлял 100 кДа, что позволяет эффективно задерживать наночастицы фуллерена C_{60} , пропуская при

этом через поры мембраны молекулы полуксамера (4-6 кДа) и МП. Полноту протекания процесса определяли по исчезновению полосы поглощения МП в области 190-210 нм на спектрах пермеата. Полученный таким способом раствор предлагается для использования в качестве стандартного при его соответствии показателям качества, описанным в последующих главах.

Исследование физико-химических свойств водного раствора фуллерена

Фуллерены являются высоко химически лабильными соединениями, что создаёт риск протекания нежелательных побочных реакций в ходе получения водных растворов. Для контроля подлинности были предложены методы ИК-спектроскопии, спектроскопии в УФ и видимой области и масс-спектрометрии.

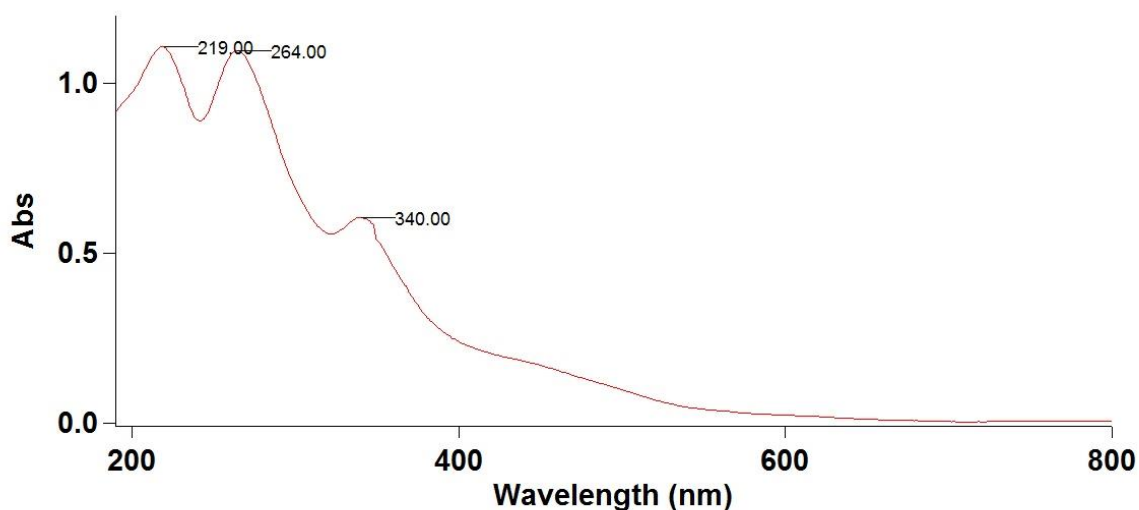


Рисунок 1. Спектр поглощения в УФ и видимой области водного раствора фуллерена (Концентрация 1 мг/мл, разведение в 1:100, длина светопоглощающего слоя – 1 см).

На спектре, представленном на рисунке 1, можно обозначить характерные полосы поглощения, в частности, наличие широкой полосы в области 400-550 нм, более узких полос с максимумами около 220, 260 и 340-345 нм. Было показано, что при длине волны 340 нм закон Бугера-Ламберта-Бера сохраняет линейность в диапазоне интервалов, от 0,1 до 10 мкг/мл, что позволяет

проводить количественное определение фуллерена в растворе методом УФ-спектрофотометрии. На основании калибровочного графика молярный коэффициент экстинкции был рассчитан как $\varepsilon_{340}=50200 \text{ Л/моль*см}^{-1}$.

Изучение высушенного в вакууме образца ВРФ методом ИК-Фурье-спектроскопии показало наличие характерных для скелета фуллерена полос 1427, 1181, 575 и 525 см^{-1} . Кроме того, имеются полосы, связанные с присутствием воды, 3500-3200 см^{-1} , (свободные и связанные валентные колебания О-Н) и МП (донорно-акцепторный комплекс с C_{60}) 2917 см^{-1} (валентные колебания С-Н), 1598 см^{-1} (валентные колебания С=О), и С-О связей (С-ОН) 1000-1180 см^{-1} . Количественное содержание этих воды и МП определяли методом элементного анализа. В высушенных дисперсиях содержание углерода составило 78,62%, содержание азота – 2,28%, содержание водорода – 1,11%. Содержание МП определили как 16,12 г на 100 г высушенной дисперсии, т. е., на 100 г фуллерена в дисперсии приходится порядка 23,4 г МП. При содержании фуллерена в растворе 1 мг/мл, содержание МП становится равным 230 мкг/мл.

Помимо возможных примесей остаточных растворителей, возможно также наличие примесей продуктов окисления фуллерена, которые сложно идентифицировать на спектрах абсорбции. Поэтому, наряду с перечисленными выше методами рекомендуется использовать лазерно-десорбционную масс-спектрометрию (MALDI-TOF MS). Такой спектр (рисунок 2) обнаруживает единственный пик, соответствующий 721 г/моль ($\text{M}+\text{H}^+$ фуллерена C_{60}).

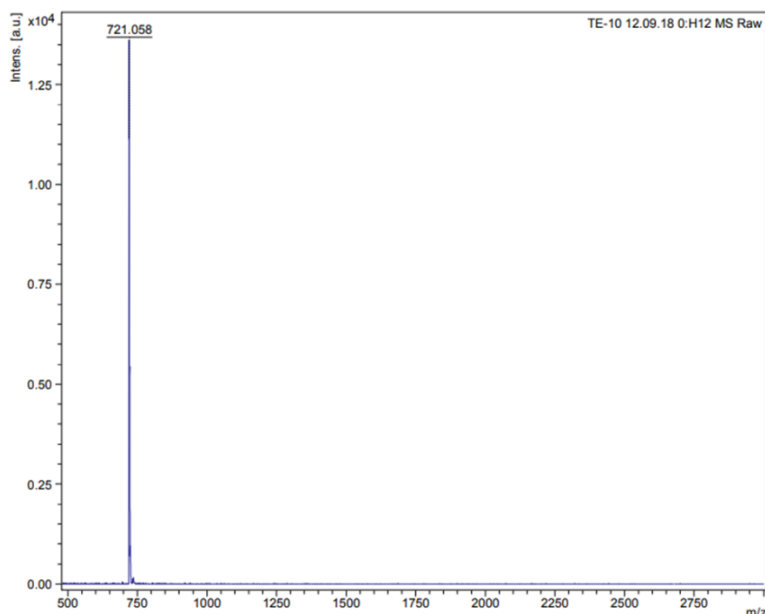


Рисунок 2. Пик молекулярного иона фуллерена, полученный методом MALDI-TOF.

Изучение размера и строения частиц фуллерена в водных растворах

Поскольку водные растворы фуллерена являются коллоидными, их важными характеристиками являются размер частиц и их поверхностный заряд. Размер частиц влияет на безопасность препарата при парентеральном применении и ограничен размерами кровеносных капилляров. В литературе, посвящённой медицинскому использованию наночастиц отмечают возможность возникновения эмболии при парентеральном введении частиц размером более 5мкм. При этом, в указаниях Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека МУ 1.2.2636-10 "Проведение санитарно-эпидемиологической экспертизы продукции, полученной с использованием нанотехнологий и наноматериалов" от 24.05.2010 регламентируется определение размера частиц в продукции, содержащей фуллерены. Однако, в этих указаниях не установлен способ анализа. В настоящей работе для исследования размера и формы частиц фуллерена в растворах были использованы методы динамического светорассеяния, электронной микроскопии и малоуглового рассеяния нейтронов.

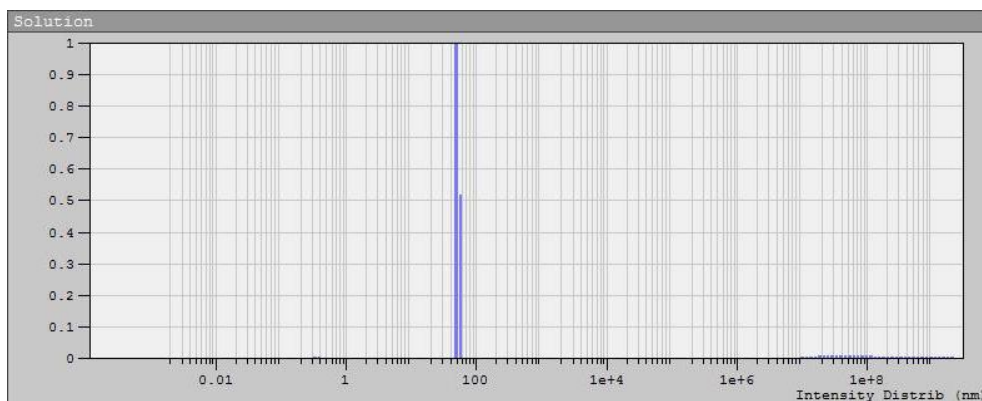


Рисунок 3. Распределение размеров частиц в водном растворе фуллерена, полученное методом динамического светорассеяния.

Наиболее распространённым способом анализа частиц в растворах является динамическое светорассеяние. Типичный результат анализа водного раствора фуллерена этим способом представлен на рисунке 3. Средний размер частиц, определённый этим способом, составил 95 нм в диаметре, что соответствует критериям безопасности нанодисперсий для медицинского применения. ζ -потенциал был определён как -17 мВ. Однако, результаты данного исследования достоверны только для сферических частиц. Для подтверждения сферической формы частиц в растворе и подтверждения их размеров, проведено исследование образцов методом сканирующей электронной микроскопии (рисунок 4, слева).

Методы динамического светорассеяния и сканирующей электронной микроскопии позволяют получить только поверхностную информацию о строении частиц. Для более детального анализа структуры частиц был использован метод малоуглового рассеяния нейтронов, результаты которого представлены на рисунке 4 (справа).

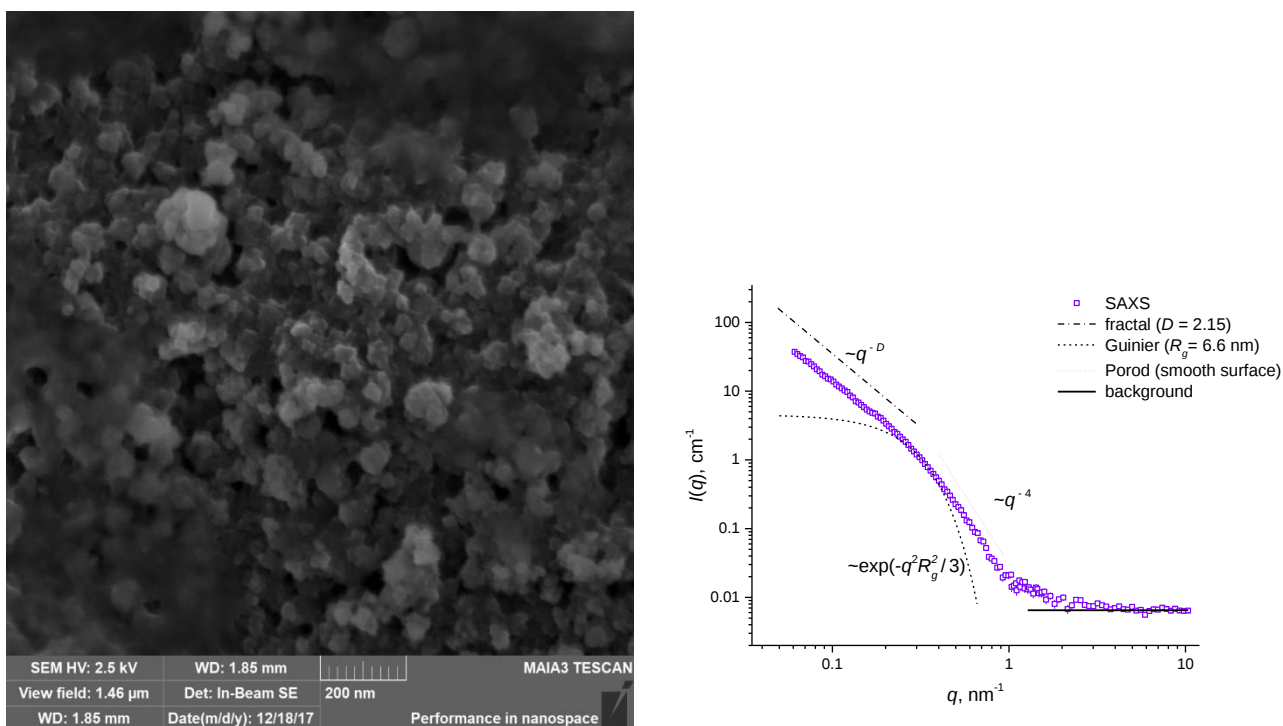


Рисунок 4. Микрофотография частиц фуллерена, полученная методом сканирующей электронной микроскопии (слева), результат малоуглового рассеяния нейтронов в водном растворе фуллерена (справа).

Наличие перелома в области $q=0,4$ между двумя кривыми с фрактальной размерностью $D=4$ и $D=2,15$ позволяет говорить о наличии двухуровневой агрегации: первичные плотноупакованные агрегаты размером 6-7 нм формируют вторичные фрактальные агрегаты, которые и были зафиксированы описанными ранее методами.

Исследование хроматографического поведения частиц фуллерена в водных растворах

Физико-химические свойства фуллеренов в органических и водных растворах значительно различаются. Использование высокоэффективной жидкостной хроматографии для разделения и анализа фуллеренов в неполярных растворах подробно описано в литературе, однако хроматографическое поведение частиц фуллерена в водных растворах изучено недостаточно. Чтобы оценить возможность использования хроматографических методов в контроле

качества водного раствора фуллерена, была проведена хроматография в тонком слое сорбента с использованием полярного (силикагель) и неполярного (октадецилсиликагель) сорбента.

В обоих случаях подвижность фуллерена, растворённого в толуоле ($R_f=1$ на пластинках с силикагелем, $R_f=0,6$ на пластинках с ОДС), оказывалась значительно выше, чем подвижность образцов фуллерена в водных растворах ($R_f=0$ в обоих случаях). Таким образом, наблюдаемые свойства частиц фуллерена в толуоле сильно отличается от свойств частиц фуллерена в водном растворе. Вероятно, в последнем случае, частицы фуллерена имеют полярный характер, поэтому лучше сорбируются на силикагеле. Возможно, это связано с наличием водной оболочки и молекул МП на поверхности частиц.

Исследование биологической безопасности водного раствора фуллерена

Использование наночастиц в медицине является сравнительно новым направлением, и для разрабатываемых препаратов особое внимание должно уделяться их токсическим свойствам. В данном исследовании были изучены токсические свойства водного раствора фуллерена *in vivo* при длительном многократном введении, а также была изучена дифференциальная токсичность водного раствора фуллерена для тканей млекопитающих *in vitro*.

Исследование хронической токсичности проводилось на мышах линии BALB/спри ежедневном внутрибрюшинном введении 500 мкл раствора фуллерена с концентрацией 400 мкг/мл в течение 30 дней. По окончании этого периода проводилось вскрытие, в ходе которого проводилось взвешивание, патоморфологический и гистопатологический анализ органов, проводился общий анализ крови. Показатели крови, масса и форма органов оказались в пределах нормы. При этом, отмечалось незначительное, но статистически достоверное увеличение массы селезёнки. При этом в некоторых органах в ходе

гистологического исследования были обнаружены гранулёмы, вероятно образованные макрофагами с включениями фуллерена.

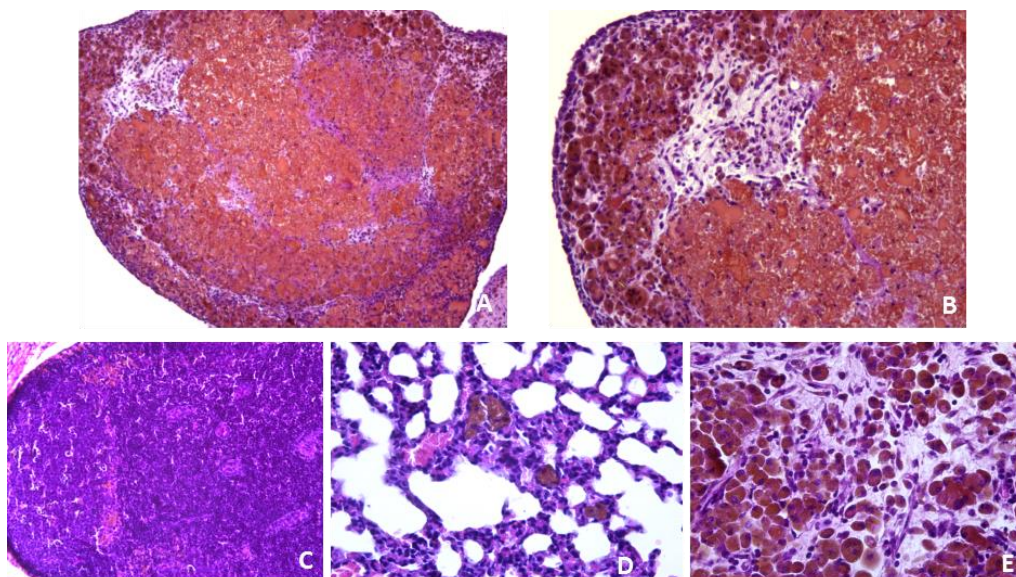


Рисунок 5. Микрофотографии тканей, окраска – гематоксилин-эозин. А – гранулёмоподобные образования, содержащие внутри-и внеклеточные включения инородного вещества, x100; В – то же, что А, x200; С – отложения инородного вещества у герминативного центра в паратимическом лимфатическом узле, x200; D – отложения ксенобиотика в макрофагах в альвеолах лёгких, x400; Е – отложения ксенобиотика в макрофагах внутри соединительной ткани, x400.

На рисунке 5 представлены микрофотографии тканей, в которых были обнаружены такие образования.

Важно отметить, что данное изменение нельзя назвать патологическим: в органах, где обнаруживались гранулёмы, не происходило некроза или скарификации тканей, увеличения размера или массы, компрессии прилегающих сосудов или признаков гипоксии. Таким образом, показано отсутствие хронической токсичности фуллерена при внутрибрюшинном введении.

Для получения более точных данных о токсичности фуллерена для различных тканей организма был проведён МТТ-тест. МТТ-тест является распространённой методикой определения жизнеспособности клеток и цитотоксичности различных веществ. Он основан на измерении

свотопоглощения формазана, образующегося в клетках в результате метаболизма из МТТ. Высокое свотопоглощение при длине волны 570 нм соответствует высокому содержанию формазана и указывает на высокую выживаемость клеток и низкую токсичность исследуемого соединения. Для проведения испытания были использованы клетки линий A549 (базальные эпителиальные клетки человеческой альвеолярной аденокарциномы), HepG2 (клетки рака печени человека) и HeLa (клетки рака шейки матки человека). В качестве положительного контроля (100% погибших клеток) использовалась вода дистиллированная, в качестве отрицательного – среда Dulbecco's modified eagle medium (DMEM) без добавления фуллерена. Результаты испытаний обобщены на рисунке 6.

В целом, выживаемость клеток во всех экспериментальных группах достоверно отличалась от положительного контроля. Отсутствие линейной зависимости цитотоксического эффекта от концентрации в изученном диапазоне (0,08 - 500 мкг/мл) говорит о невозможности установить цитотоксическую концентрацию (IC_{50}). При этом, максимальная концентрация фуллерена была значительно выше, чем в подобных исследованиях, описанных ранее в литературе, что подтверждает вывод о биологической безопасности водного раствора фуллерена.

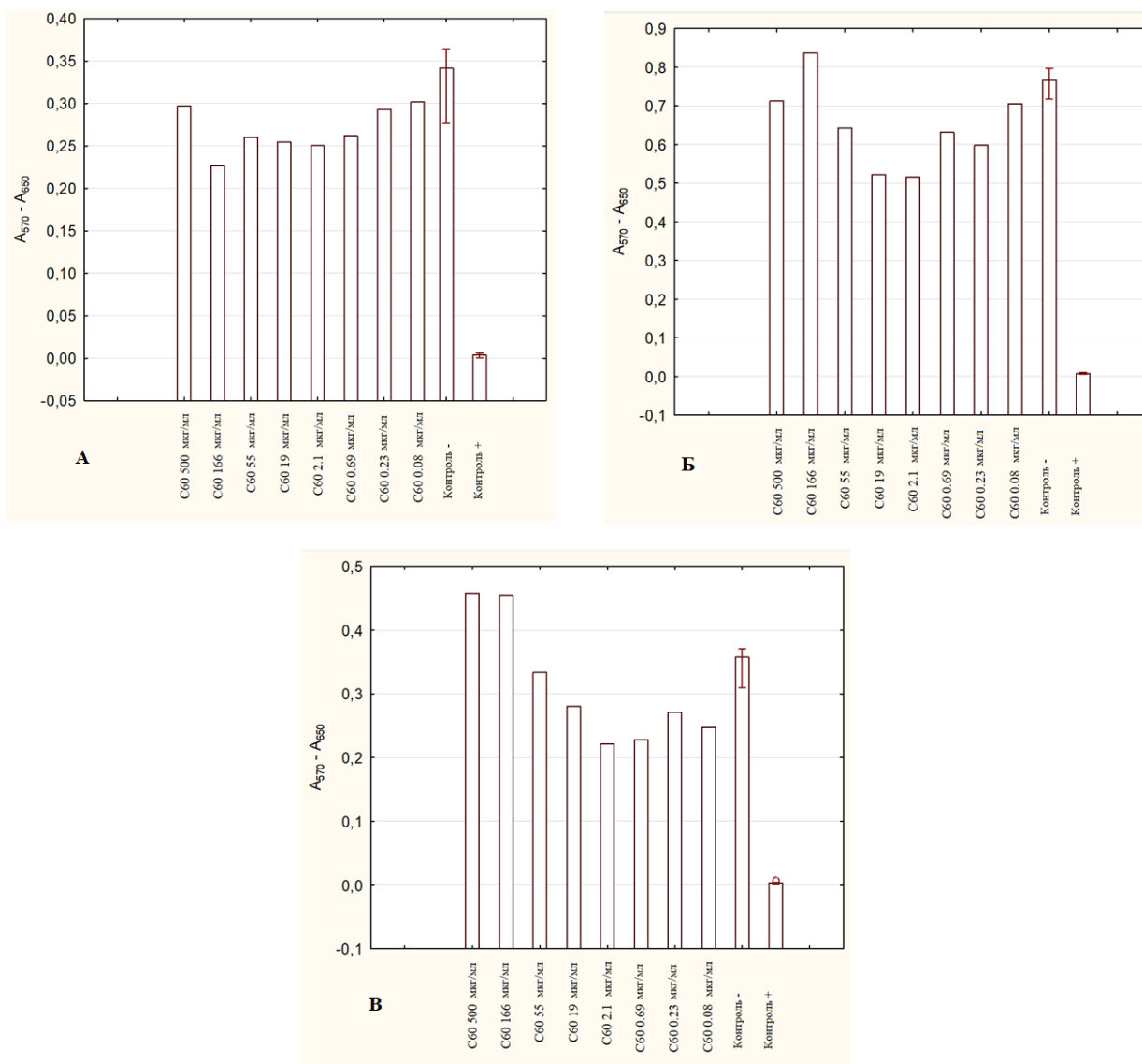


Рисунок 6. Результаты МТТ-теста на клетках линий А549 (А), HeLa (Б) и HepG2(В).

Показатели качества стандартного образца водного раствора фуллерена

На основании испытаний был составлен технологический регламент, описывающий схему получения и контроля качества водного раствора фуллерена. Показатели качества водного раствора фуллерена обобщены в таблице 1.

Таблица 1 Показатели качества для проекта нормативной документации на водный раствор фуллерена

Показатель качества	Метод определения	Результат			Установленные нормы качества
		I серия	II серия	III серия	
Описание	Визуально	Прозрачная коричневая жидкость			
Подлинность	Спектроскопия в УФ и видимой области	Соответствует (см. рисунок 2)			три полосы поглощения с максимумами при длинах волн 215, 260 и 340 нм
	Спектроскопия в ИК области	Соответствует			две полосы поглощения в области 1100-1500 см ⁻¹ (максимумы при 1427 и 1181 см ⁻¹) и две полосы поглощения в области 500-600 см ⁻¹ (максимумы при 575 и 525 см ⁻¹), полос поглощения в области 3500-3200 см ⁻¹ и 1000-1180 см ⁻¹
	Масс-спектрометрия	Соответствует (см. рисунок 3)			Единичный пик, с m/z 721
pH	Потенциометрия	6,81	6,92	7,07	6,5-7,5
Содержание примеси 1-метил-2-пирролидона, мкг/мл	Элементный анализ	230	190	210	Не более 0,5 мг/мл
Количественное содержание фуллерена, мг/мл	Спектроскопия в УФ и видимой области	1,001	0,975	0,990	0,97-1,03 мг/мл
Размер частиц, нм	Динамическое светорассеяние	178±16	94±28	246±40	Не более 300 нм
Хранение	В защищённом от света месте при температуре не выше 25°C в течение 2 лет				

Практические рекомендации

Разработанный стандартный образец водного раствора фуллерена может быть использован в контроле качества лекарственных средств. Предложенный способ получения водного раствора фуллерена подходит для применения в производстве лекарственных средств. Предложенные методы анализа размера частиц в растворе могут быть использованы в контроле качества других нанодисперсных систем для медицинского применения.

Перспективы дальнейшей разработки темы

Разработанный способ получения водного раствора фуллерена открывает возможность проведения исследований его биологических свойств. Изученные способы контроля качества препаратов на основе размеров и свойств наночастиц в растворах могут быть использованы для других нанодисперсных систем, в частности для систем транспортной доставки препаратов.

ВЫВОДЫ

1. Изучено современное состояние проблемы получения и стандартизации водных растворов фуллерена. На основании данных научной литературы сделан вывод о перспективности разработки способа получения водного раствора фуллерена для медицинского применения и обозначены основные подходы к его стандартизации.
2. Разработан метод получения водного раствора фуллерена, основанный на замене растворителя посредством ультрафильтрации. Концентрация фуллерена в полученных дисперсиях в 5-10 раз превышает концентрацию в дисперсиях, получаемых по описанным ранее методикам. Продемонстрирована низкая сорбция фуллерена на поверхности мембран из регенерированной целлюлозы, на основании данных о размере частиц в дисперсии полоксамер 407 был выбран в качестве оптимального стабилизатора.

3. Проведено исследование физико-химических свойств водного раствора фуллерена методами УФ-спектроскопии, ИК-спектроскопии и масс-спектрометрии. Для контроля качества раствора установлены следующие значения: в УФ-спектре наблюдаются три полосы поглощения с максимумами при длинах волн 215, 260 и 340 нм. ИК-спектре лиофилизата присутствуют две полосы поглощения в области 1100-1500 см^{-1} (максимумы при 1427 и 1181 см^{-1}) и две полосы поглощения в области 500-600 см^{-1} (максимумы при 575 и 525 см^{-1}). В масс-спектре присутствует единичный пик, с m/z 721.
4. Изучены хроматографические характеристики водного раствора фуллерена методом тонкослойной хроматографии. Зафиксировано отсутствие подвижности фуллерена в водных дисперсиях в системах с полярным и неполярным сорбентом.
5. Проведено исследование размера и строения наночастиц в растворах для фармацевтического анализа водного раствора фуллерена. Предложено использование динамического светорассеяния в контроле качества водного раствора фуллерена, результаты исследований этим методом подтверждены современными способами исследования наночастиц: малоугловым рассеянием нейтронов и электронной микроскопией. Размеры частиц в водной дисперсии фуллерена составили порядка 50 нм без использования стабилизатора и 100-350 нм с использованием неионогенных ПАВ в качестве стабилизатора.
6. Продемонстрирована биологическая безопасность водного раствора фуллерена при хроническом введении у мышей. Ежедневное внутрибрюшинное введение фуллерена в течение месяца не приводило к патоморфологическим изменениям в изученных органах. Изучена дифференциальная токсичность водного раствора фуллерена на клетках

линий A549, HeLa и HepG2. Увеличение гибели клеток после введения водного раствора фуллерена не наблюдали.

7. Контроль качества водного раствора фуллерена было предложено проводить по следующим показателям: описание, подлинность, pH, содержание примеси 1-метил-2-пирролидона, количественное содержание фуллерена, размер частиц. Обозначен диапазон допустимых значений по этим показателям. Был предложен проект нормативной документации для стандартного образца водного раствора фуллерена.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. **Турецкий Е.А.** Разработка эффективного способа получения водных дисперсий фуллерена C_{60} / **Турецкий Е.А.**, Андреев С.М., Шершакова Н.Н., Шатилов А.А., Смирнов В.В., Хаитов М.Р. // Сб. ст. по материалам 7-й междунар. науч.-методич. конф. «Фармобразование-2018». Воронежский государственный университет; Под общей редакцией А.С. Беленовой, А.А. Гудковой. – 2018. – С. 637-641.
2. **Турецкий Е.А.** Изучение хронической токсичности водной дисперсии фуллерена C_{60} / **Турецкий Е.А.**, Андреев С.М., Шершакова Н.Н., Камышников О.Ю., Кукс Е.И., Смирнов В.В., Хаитов М.Р. // В книге: Биотехнология: состояние и перспективы развития Материалы международного форума. – 2018. – С. 389-391.
3. Способ получения высококонцентрированного водного раствора фуллерена: пат. №2679257 РФ, МПК C01 B 32/156 / Андреев С.М., Шатилов А.А., **Турецкий Е.А.**, Шершакова Н.Н., Хаитов М.Р., Смирнов В.В.; заявитель и патентообладатель ООО «C60 Био». – №2018101687; заявл. 2018.01.17; опубл. 2019.02.18, **Патент** – 2019. Бюл. №20
4. **Турецкий Е.А.** Биологические свойства фуллерена C_{60} и его производных / **Турецкий Е.А.**, Андреев С.М., Шершакова Н.Н., Чадова Н.Н., Передеряев О.И., Смирнов В.В. // **Естественные и технические науки** – 2019 – Т. 17, №2.– С. 109-117.
5. **Turetskiy E.A.** Characterizing size and composition of fullerene nanoparticles in aqueous dispersions / **Turetskiy E. A.**, Andreev S. M., Shershakova N. N., Shatilov A. A., Timofeeva A. V., Kozhikhova K. V., Smirnov V. V., Khaitov M. R. // В книге: Book of Abstracts of 14th International Conference “Advanced Carbon Nanostructures” (ACNS'2019) – 2019. – С. 89.
6. **Turetskiy E.A.** Comparative thin-layer chromatographic profile of water dispersions of C_{60} / Andreev S.M., Stepanova E.A., **Turetskiy E.A.**, Shershakova N.N., Semekin A., Kozhikhova K.V. // В книге: Book of Abstracts of 14th International Conference “Advanced Carbon Nanostructures” (ACNS'2019) – 2019. – С. 94.
7. **Turetskiy E.A.** C_{60} and C_{60} -arginine aqueous solutions: In vitro toxicity and structural study/ Tomchuk A.A., Shershakova N.N., Andreev S.M., **Turetskiy E.A.**, Ivankov O.I., Kyzyma O.A., Tomchuk O.V., Avdeev M.V. // **Fullerenes, Nanotubes, Carbon Nanostructures**. – 2020. – Т. 28, № 1. – С. 939-944.