

ОТЗЫВ

официального оппонента, доктора фармацевтических наук, профессора кафедры фармакогнозии, ботаники и технологии фитопрепаратов Пятигорского медико-фармацевтического института – филиала государственного бюджетного образовательного учреждения высшего профессионального образования «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации Дайронас Жанны Владимировны на диссертационную работу Никулина Александра Владимировича «Совершенствование стандартизации субстанций природного происхождения на основе современных инструментальных методов аналитической химии и теоретических методов квантовой химии», представленную в Диссертационный совет ДСУ 208.002.01 при ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет) на соискание ученой степени доктора фармацевтических наук по специальности 14.04.02 – Фармацевтическая химия, фармакогнозия.

Актуальность темы исследования

Лекарственные препараты, произведённые из природных субстанций, пользуются большой популярностью, как среди медицинских работников, так и у населения при ответственном самолечении. Источником большинства из них является лекарственное растительное сырьё (ЛРС), которое используется как самостоятельно в цельном, измельчённом виде, порошке, так и для производства экстракционных препаратов и выделения индивидуальных соединений.

Основной особенностью ЛРС является его многокомпонентность и достаточно значительная вариативность по содержанию действующих веществ, что требует применения все более селективных методов.

Требования к качеству как ЛРС, так и производимых из него лекарственных средств, в каждом новом издании Государственной фармакопеи Российской Федерации (ГФ РФ) становятся всё выше.

С точки зрения лабораторий, занимающихся рутинным контролем качества, наиболее удобным было бы применение унифицированных методик, в которых использовались бы одинаковые условия для определения одной группы веществ в различных видах ЛРС, а сами методики отличались бы деталями пробоподготовки. Такую возможность могут обеспечить современные инструментальные методы анализа. Однако, несмотря на достаточное количество методик, описанных в научной литературе и ГФ РФ, их нельзя считать достаточно унифицированными – авторы в большинстве

случаев ограничиваются разработкой методики с конкретными условиями, выбранными исключительно для данного вида ЛРС. Поэтому наиболее удобным было бы применение общего алгоритма, позволяющего (с помощью определенной последовательности действий) такие методики разрабатывать. Такой подход позволит разработчикам как общих, так и частных фармакопейных статей обеспечивать соблюдение принципа сквозной стандартизации в ряду «ЛРС – лекарственный препарат», предложенного членом-корреспондентом РАН профессором И.А. Самылиной в 1994 году.

Очевидно, что в этом случае необходимо использовать такие теоретические подходы, которые позволяли бы установить связь между строением определяемых веществ и аналитическим сигналом. Одним из наиболее современных разделов теоретической химии является квантовая химия, объясняющая химические процессы через призму квантовой механики. Создание такого обобщенного алгоритма на основе современных инструментальных методов аналитической химии и теоретических методов квантовой химии безусловно является актуальным для фармакогнозии.

Высокие требования к качеству ЛРС предъявляются не только по содержанию действующих веществ в анализируемом образце, но и по содержанию токсикантов, в частности тяжелых металлов. В имеющихся работах, особенно зарубежных, особенное внимание уделено применению масс-спектрометрии с индуктивно связанной плазмой (МС-ИСП). Однако данный метод мало доступен заводским лабораториям вследствие его чрезвычайной дороговизны. Более разумным (с учетом требований ГФ РФ) является применение метода атомно-абсорбционной спектрометрии с электротермической атомизацией (ЭТААС). Однако, условия, приведенные в ГФ РФ, не являются достаточно унифицированными, так как не учитывают в полном объеме физико-химические свойства элементов как на стадии пробоподготовки, так и на стадии определения. Применению метода ионометрии для определения форм элементов в ЛРС также не уделяется в литературе много внимания.

Таким образом, необходимость исследований в области разработки унифицированных методик определения действующих веществ, а также тяжелых металлов в ЛРС с использованием современных инструментальных методов анализа и подходов теоретической химии для целей контроля качества сырья очевидна.

Настоящая диссертационная работа содержит результаты исследований по разработке общего алгоритма, позволяющего максимально

унифицировать методики анализа на основе современных инструментальных методов аналитической химии (атомно-эмиссионной спектрометрии с индуктивно связанной плазмой (АЭС-ИСП), ЭТААС, высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим (ВЭЖХ/МС) или с ультрафиолетовым детектором (ВЭЖХ/УФ), ионометрии, спектрофотометрии) и теоретических методов квантовой химии на примере определения кадмия, свинца, мышьяка, йодидов, веществ углеводной природы, арбутина, суммы антоцианов.

Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации

Научные положения диссертационной работы Александра Владимировича Никулина базируются на результатах экспериментов с использованием современного поверенного оборудования и теоретических результатах, полученных в результате квантово-химических расчетов.

Научные выводы и рекомендации основаны на достаточном объеме экспериментального материала, логически вытекают из результатов исследования и непротиворечивы.

Достоверность и новизна исследования, полученных результатов

Новизна проведенных исследований очевидна и заключается в том, что автором были получены новые экспериментальные данные на основании анализа значительного числа образцов растительного материала, которые убедительно демонстрируют преимущества использования принципа унификации методик при условии применения инструментальных методов анализа. Были изучены и предложены условия пробоподготовки и определения элементов методами ЭТААС и АЭС-ИСП, позволившие полностью унифицировать методики и при этом избежать потерь элементов как на стадии пробоподготовки, так и на стадии определения. Впервые разработана и рекомендована к применению в фармакогнозии спектрофотометрическая методика определения кремния в кремнефильном ЛРС (траве хвоща полевого), которая характеризуется устойчивым аналитическим сигналом и, как следствие, воспроизводимыми результатами анализа. Впервые предложена методика полуколичественной оценки содержания бромидов и нитратов в ЛРС методом ионометрии. Данная методика позволила продемонстрировать, что содержание бромидов в исследованном фармакопейном сырье было ниже терапевтического уровня. Впервые, на примере слоевищ ламинарии, разработана и рекомендована к использованию ионометрическая методика определения йодидов.

Впервые на основе метода Дюбуа разработана и рекомендована к применению в фармакогностических исследованиях унифицированная спектрофотометрическая методика определения суммы восстанавливающих сахаров, а также предложены унифицированный осадитель и процедура более тщательной очистки полисахаридов перед их гравиметрическим определением. Продемонстрирована перспективность использования ИК-спектроскопии для подтверждения подлинности выделенных осадков полисахаридов.

Впервые разработаны и предложены к фармакогностическому применению методики определения арбутина и суммы антоцианов методом ВЭЖХ, причем инструментальные хроматографические условия разделения были унифицированы, что дало возможность определять указанные аналиты в ЛРС различных морфологических групп. Также предложены условия более мягкого выделения лабильных антоцианов с использованием ультразвуковой обработки без использования нагрева в присутствии кислот. Унифицированность разработанных инструментальных условий при определении антоцианов позволила также эффективно сочетать их с пробоподготовкой, рекомендованной в ГФ РФ.

Выявлены закономерности в формировании аналитического сигнала на основе зависимости «структура-свойство» при определении аналитов спектрофотометрическим и ВЭЖХ/МС методами.

На основании полученных результатов предложен обобщенный алгоритм разработки методик для стандартизации ЛРС с использованием инструментальных методов аналитической химии и теоретических методов квантовой химии.

Достоверность результатов подтверждена многократными экспериментами на современном поверенном оборудовании, сопоставлением с имеющимися литературными данными полученных и статистически обработанных результатов исследований.

Значимость для науки и практики полученных автором результатов

Значимость проведенных исследований заключается в научном обосновании проведенной разработки аналитических методик для контроля качества и стандартизации ЛРС на основе инструментальных методов анализа. При изучении физико-химических процессов, обуславливающих формирование аналитического сигнала, была предложена теоретическая процедура, основанная на аппарате квантовой механики, которая позволяет

проводить квантово-химические расчеты для объяснения экспериментальных данных. Выполненные экспериментальные и теоретические исследования, проведенные в диссертационной работе, позволили предложить теоретический алгоритм, дающий возможность осуществлять разработку унифицированных методик анализа на основе таких методов как спектрофотометрия, ВЭЖХ (с масс- и спектрометрическим детекторами), АЭС-ИСП, ЭТААС, ионометрия.

Никулиным А.В. разработаны новые для фармакогнозии методики, дающие возможность за счет своей унифицированности проводить определение аналитов по единой схеме в одних и тех же инструментальных условиях, отличающиеся только нюансами пробоподготовки.

Соответствие диссертации паспорту специальности

Диссертация А.В. Никулина соответствует паспорту специальности 14.04.02 «Фармацевтическая химия, фармакогнозия». Результаты исследования, приведенные в диссертации, соответствуют паспорту специальности, конкретно п. 2, 3, 6, 7.

Полнота освещения результатов диссертации в печати

Основные положения диссертационной работы апробированы на российских и международных научно-практических конференциях.

Особенно значимые результаты напечатаны в 20 научных работах, в том числе научных статей в журналах, включенных в перечень рецензируемых научных изданий Сеченовского Университета/Перечень ВАК при Минобрнауки России, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени доктора наук – 6; статей в изданиях, индексируемых в международных базах данных – 13, обзорная статья в международной базе данных Scopus – 1.

Структура и содержание диссертации

Диссертация изложена на 341 страницах машинописного текста (с учетом Приложений – 386), состоит из введения, обзора литературы (1 глава), экспериментальной части (2, 3, 4, 5, 6 главы), теоретической главы (7 глава), общих выводов, практических рекомендаций, списка литературы. В работе имеется 135 рисунков и 117 таблиц. Список литературы представлен 343 источниками.

Во введении обоснована актуальность темы исследования, присутствуют информация о степени разработанности темы исследования, цель и задачи исследования, научная новизна, теоретическая и практическая значимость результатов исследования, методология и методы исследования,

основные положения, выносимые на защиту, достоверность научных положений и выводов, апробация результатов исследования, личный вклад автора, внедрение результатов исследования, соответствие диссертации паспорту научной специальности, связь задач исследования с проблемным планом фармацевтической науки, данные о количестве публикаций.

В первой главе (обзор литературы) автором подробно рассматриваются инструментальные методы элементного анализа лекарственного растительного сырья, определения действующих веществ в субстанциях природного происхождения. Продемонстрированы основные достоинства и недостатки как самих методов, так и методик, в которых рассматриваемые инструментальные методы используются. Показана перспективность использования квантово-химических методов для исследования биологически активных молекул, выделенных из природного сырья.

По результатам литературного обзора сделан вывод о необходимости построения обобщенного теоретического алгоритма, позволяющего на основе современных инструментальных методов аналитической химии и теоретических методов квантовой химии, который давал бы возможность разрабатывать унифицированные методики анализа для целей контроля качества (в том числе и рутинном) и стандартизации природного сырья.

Вторая глава содержит описание объектов исследования, оборудования, реактивов, методов квантово-химического исследования и обработки экспериментальных результатов.

В третьей главе представлены результаты разработки полностью унифицированных методик определения элементов АЭС-ИСП и ЭТААС методами.

Представлены результаты по выбору условий кислотного разложения растительного материала в условиях микроволнового нагрева, обоснован состав смеси для разложения, соотношения образец : смесь для разложения, время и температура разложения. Показано, что выбранные условия пробоподготовки являются более «мягкими» по сравнению с условиями, приведенными в ГФ РФ, что позволяет использовать для разложения закрытые микроволновые системы, включающие только датчик температуры. Последнее очень важно по экономическим соображениям для лабораторий, занимающихся анализом фармакогностических объектов. Предложенные условия пробоподготовки позволили получить элементы в наиболее удобной для последующего инструментального определения форме.

Разработаны условия инструментального определения элементов, находящихся в ЛРС на макро- и микроуровне, методом АЭС-ИСП. При определении кадмия свинца, мышьяка, кадмия на нанограммовом уровне предложены условия ЭТААС-определения (температурно-временная программа, модификаторы). Сочетание разработанных способов пробоподготовки и определения позволило избежать потерь элементов, обеспечить устойчивый аналитический сигнал и, соответственно, достоверность получаемых данных. По результатам проведенных исследований предложено использовать нормы, рекомендованные в ГФ РФ для кадмия, свинца и мышьяка, при анализе ЛРС с помощью разработанной методики.

В данной главе представлена методика количественного определения кремния (в пересчете на кремния (IV) оксид) в кремнефильном ЛРС спектрофотометрическим методом. В отличие от уже существующих методик, разработанная методика в качестве стандартного образца используется стандартизованный геохимический объект постоянного химического состава (нефелиновая руда) и позволяет получить устойчивый аналитический сигнал кремния. По результатам проведенных исследований была установлена норма для содержания кремния (в пересчете на кремния (IV) оксид) для травы хвоща полевого. Разработанные методики были валидированы согласно современным требованиям.

В главе 4 исследуются возможности применения метода ионометрии для определения важных для фармакогнозии аналитов – нитратов, бромидов, йодидов. Показано, что применение буферов, рекомендованных производителями, позволяет провести полуколичественную оценку содержания бромидов и нитратов в ЛРС. Установлено, что содержание бромидов во всех исследованных видах фармакопейного и нефармакопейного ЛРС находится ниже терапевтического уровня.

Показано, что ионометрия перспективна для определения йодидов в слоевищах ламинарии. На основании проведенных исследований была разработана методика определения этого типа аналитов и предложена процедура оценки содержания неорганических и органических форм йода.

В пятой главе представлены результаты разработки унифицированной методики определения суммы восстанавливающих сахаров на основе метода Дюбуа, а также результаты по выбору унифицированного осадителя, способу дополнительной унифицированной очистки полисахаридов перед их определением методом гравиметрии. С целью максимальной автоматизации

предложено для отделения осадков от маточного раствора использовать центрифугирование. Показана перспективность использования ИК-спектроскопии для подтверждения подлинности осадков полисахаридов после их очистки.

При разработке методики определения суммы восстанавливающих сахаров были исследованы условия извлечения аналитов из сырья, подобрано оптимальное содержание фенола в окрашивающем растворе, а также предложено использовать определенный тип стандартного образца (глюкоза или фруктоза) в зависимости от типа анализируемого сырья (слизесодержащее, инулинсодержащее и т. д.). Унифицированность и удобство предлагаемой методики по сравнению с рекомендуемыми в ГФ РФ методиками очевидны. Установлено, что для фармакопейных видов ЛРС, где ведется определение суммы восстанавливающих сахаров (с пикриновой кислотой), нормы, рекомендованные ГФ РФ, могут быть сохранены и при определении аналитов по предлагаемой унифицированной методике. Методика валидирована согласно современным требованиям.

Представлены результаты квантово-химического исследования реакции, приводящей к формированию аналитического сигнала. Показано, что идущие реакции сходны с реакциями, протекающими в реакции Селиванова. Адекватность предложенного расчета подтверждается близостью расчетного и экспериментального УФ-спектров.

Представлены результаты по разработке методики количественного определения глюкозамина сульфата в геле для наружного применения методом ВЭЖХ/МС. Методами квантовой химии установлено, что из двух возможных путей масс-фрагментации преимущественно реализуется тот, который приводит к локализации заряда на аминном фрагменте молекулы глюкозамина. Методика валидирована согласно современным требованиям.

В главе 6 приведены результаты исследований по разработке унифицированных ВЭЖХ-методик количественного определения арбутина и суммы антоцианов в ЛРС. Показано, что вариант ВЭЖХ/МС в режиме мониторинга множественных реакций менее чувствителен по сравнению с ВЭЖХ/УФ и может быть использован для определения арбутина только в листьях толокнянки обыкновенной. Методами квантовой химии исследован процесс масс-фрагментации арбутина и оценены возможные структуры дочерних частиц.

Выбраны условия хроматографического разделения и УФ-детектирования арбутина при его определении методом ВЭЖХ/УФ.

Исследованы условия извлечения определяемого вещества из ЛРС. Унифицированность выбранных хроматографических условий и условий детектирования подтверждена анализом фармакопейного и нефармакопейного ЛРС. Показано, что нормы, рекомендованные в ГФ РФ, для арбутинсодержащего ЛРС (спектрофотометрический метод определения) может быть рекомендован и при определении аналита методом ВЭЖХ/УФ. Установлена норма содержания арбутина в корневищах бадана. Методика валидирована согласно современным требованиям.

Предложены унифицированные условия хроматографического разделения антоцианов, подобраны условия извлечения аналитов без использования нагрева и кислот с использованием ультразвуковой обработки. Показана сочетаемость выбранных хроматографических условий не только с разработанной пробоподготовкой, но и с пробоподготовкой, рекомендованной в ГФ РФ.

В седьмой главе приведены общие рекомендации по использованию разработанных методик в условиях заводских лабораторий; представлены принципиальные схемы определения элементов, суммы восстанавливающих сахаров, полисахаридов, арбутина и суммы антоцианов в ЛРС. На основании полученных экспериментальных данных предложен общий теоретический алгоритм по разработке унифицированных методик анализа с использованием современных экспериментальных и теоретических методов.

Общие выводы в полном объеме отражают полученные автором результаты и соответствуют задачам исследования, поставленным в работе.

Соответствие содержания автореферата основным положениям и выводам диссертации

Содержание автореферата полностью отражает текст и соответствует общим выводам диссертации.

Достоинства и недостатки в содержании и оформлении диссертации

Основным достоинством диссертационного исследования А.В. Никулина является разработка обобщенного теоретического алгоритма, позволяющего внедрять в целях контроля качества и стандартизации современные унифицированные методики определения как действующих веществ, так и опасных примесей, отличающиеся достаточно высокой степенью автоматизации и простотой выполнения. Последнее особенно удобно для лабораторий с высоким потоком анализов лекарственного растительного сырья. Результаты диссертационного исследования могут

быть также использованы для разработки методик определения других групп биологически активных соединений в субстанциях природного происхождения, предполагаемых к введению в медицинскую практику.

Работа основана на большом экспериментальном материале, полученном с использованием широкого набора современных инструментальных методов анализа – АЭС-ИСП, ЭТААС, спектрофотометрия в ультрафиолетовой, видимой и инфракрасной области, ионометрия, ВЭЖХ/МС/УФ. Автор активно использует преимущества указанных методов для достижения поставленных целей, применяет современный активно развивающийся раздел теоретической химии – квантовую химию для объяснения полученных результатов, что, несомненно, является еще одним достоинством представленной диссертационной работы.

Несомненным достоинством работы является также ее прикладной аспект – разработанные в диссертационной работе методики послужили основой для разработки новых проектов ОФС, актуальных для современной фармакогнозии.

Несмотря на общее положительное впечатление от работы, при ее рассмотрении возникли следующие вопросы и замечания:

1. Логика работы А.В. Никулина требует замены неинструментальных методов на инструментальные. Однако спектрофотометрия для определения кремния рекомендуется, а в случае анализа арбутина и антоцианов – критикуется, предлагается один инструментальный метод (спектрофотометрию) заменить на другой (ВЭЖХ). Сама возможность автоматизации процесса анализа не может служить доминирующим основанием для внедрения в лабораторно-аналитическую практику. Замена одного метода на другой должна основываться на более высокой точности либо воспроизводимости при прочих равных характеристиках. Кроме того, автоматизация нивелирует роль специалиста и требования к его квалификации.
2. Почему кремний рассматривается в литературном обзоре в разделе «Анализ металлов»? Переходит ли органический кремний в лекарственные формы, получаемые из травы хвоща полевого (например, настой, экстракт)?
3. Недостатком некоторых предлагаемых автором методик является длительность: при определении кремния в траве хвоща тигель с плавом и водой предлагается оставить на ночь, а оптическую плотность продукта реакции окрашивания измерять после ещё двухчасового выдерживания

смеси; при гравиметрическом анализе полисахаридов семян льна проводят отстаивание в течение суток; при анализе йодидов в слоевище ламинарии полученный фильтрат или надосадочную жидкость оставляли на сутки. С чем связана такая длительность и можно ли в перспективе модифицировать методики, сократить время анализа?

4. Требования по содержанию нитратов относятся к свежему пищевому сырью (не высушенному), применительно к ЛРС в настоящее время не используются. Насколько обосновано определение нитратов в высушенном ЛРС? Определялся ли переход нитратов в экстракционные лекарственных формы?
5. Почему предлагается определять именно йодиды, а не сумму йодидов и йодорганических соединений в слоевищах ламинарии? В каких случаях имеется необходимость такого достаточно трудоёмкого анализа?
6. Для анализа полисахаридов в ЛРС предлагаются методы спектрофотометрии в ультрафиолетовой, видимой и инфракрасной области, ВЭЖХ, а также оптимизированная гравиметрия. Какой из перечисленных методов предпочтительнее и может быть использован как унифицированный?
7. Почему при разработке методики анализа арбутина в ЛРС в качестве внутреннего стандарта выбран фенолфталеин? Рассматривались ли другие вещества для использования в этом качестве?
8. При разработке методики спектрофотометрического определения суммы антоцианов в плодах черники, учитывая нестабильность соединений и зависимость от рН окраски, а соответственно и длины волны, при которой наблюдается максимум светопоглощения, изучали ли влияние этого фактора на результат?
9. Почему квантово-химические методы в обзоре литературы рассматриваются только применительно к сахарам, а далее в эксперименте изучаются и другие биологически активные вещества? Квантовые расчёты подтверждают химизм реакций и представляют больше теоретический интерес или имеют практическое значение?

Недостатком оформления диссертации является использование устаревших названий веществ «железоаммонийные квасцы», «сернокислое железо», «соляная кислота», «окись алюминия».

Однако перечисленные выше замечания и вопросы носят дискуссионный характер и не снижают научной и практической ценности диссертационного исследования.

Заключение

Таким образом, диссертация Никулина Александра Владимировича на тему: «Совершенствование стандартизации субстанций природного происхождения на основе современных инструментальных методов аналитической химии и теоретических методов квантовой химии» на соискание ученой степени доктора фармацевтических наук является завершённой научно-квалификационной работой, в которой на основании выполненных автором исследований осуществлено решение крупной научной проблемы по разработке унифицированных методик оценки качества лекарственного растительного сырья, имеющей важное значение для народного хозяйства, что соответствует требованиям п. 15 Положения о присуждении ученых степеней в федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего образования Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет), утвержденным приказом ректора Сеченовского университета от 31.01.2020 г. №0094/Р, предъявляемым к докторским диссертациям, а её автор, Никулин Александр Владимирович, заслуживает присуждения искомой ученой степени по специальности 14.04.02 – Фармацевтическая химия, фармакогнозия.

Официальный оппонент

Доктор фармацевтических наук, профессор кафедры фармакогнозии, ботаники и технологии фитопрепаратов Пятигорского медико-фармацевтического института – филиала государственного бюджетного образовательного учреждения высшего профессионального образования «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (специальность 14.04.02 – Фармацевтическая химия, фармакогнозия)

357532, Ставропольский край, г. Пятигорск, пр. Калинина, 11

Телефон +7 (8793) 32-16-67, доб. 213

e-mail: daironas@mail.ru

16.05.2022



Дайронас Жанна Владимировна

Подпись Дайронас Жанны Владимировны заверяю:

Начальник отдела кадров Пятигорского медико-фармацевтического института – филиала ФГБОУ ВО ВолГМУ Минздрава России.



И.Б. Злобина