

ОТЗЫВ

официального оппонента, доктора фармацевтических наук, профессора, директора Научно-исследовательского центра – президента Некоммерческой организации «Профессиональная ассоциация натуротерапевтов» Киселевой Татьяны Леонидовны 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

Разработка и производство современных и безопасных лекарственных препаратов природного происхождения требует использования качественного лекарственного растительного сырья, отвечающего новейшим требованиям нормативной документации (НД). Поэтому привлечение современных инструментальных методов анализа для разработки адекватных валидированных методик для сквозной стандартизации исходного сырья и готовой фармацевтической продукции, является актуальной задачей фармацевтической науки.

Создание и совершенствование методик, обладающих высокой селективностью и минимальными трудозатратами, особенно важно для заводских лабораторий предприятий, специализирующихся на производстве препаратов природного происхождения из растительного или животного сырья. При значительном потоке рутинных анализов в таких лабораториях наиболее удобным представляется применение максимально унифицированных методик, использующих одинаковые условия определения для одного и того же аналита в разных видах сырья (условия пробоподготовки должны учитывать особенности объекта исследования, поэтому могут отличаться).

На сегодняшний день в подавляющем большинстве НД и научных исследований при определении одного и того же аналита в различных морфологических группах сырья одного и того же производящего растения используются абсолютно разные условия пробоподготовки и последующего определения. К сожалению, даже последнее издание ГФ не лишено этого

недостатка.

Аналогичная ситуация наблюдается и при исследовании лекарственного растительного сырья на содержание тяжелых металлов, даже несмотря на то, что этом раздел ГФ уже содержит достаточно общие процедуры. Объективный анализ указанных фармакопейных процедур позволяет сделать заключение о целесообразности их корректировки, поскольку они не вполне учитывают свойства отдельных тяжелых металлов, обуславливают потери (как на стадии пробоподготовки, так и на стадии определения) и, в конечном счете, искажение результатов анализа.

Наиболее перспективным для целей контроля качества и сквозной стандартизации исходного сырья и лекарственных препаратов природного происхождения являлось бы применение максимально унифицированных методик с использованием современных инструментальных методов (спектрофотометрии, ВЭЖХ/УФ/МС, АЭС-ИСП, ЭТААС, ионометрии). Существенный прогресс при разработке таких методик на данном этапе может быть достигнут благодаря привлечению к решению фармацевтических задач современных достижений теоретической химии, например, новейшего и интенсивно развивающегося ее раздела – квантовой химии.

В связи с этим, актуальность и своевременность исследований, проведенных диссертантом, сомнений не вызывает.

Настоящая диссертационная работа выполнена в рамках плана и в соответствии с направлением научно-исследовательской работы кафедры фармацевтической химии и фармакогнозии Российского университета дружбы народов Министерства науки и высшего образования Российской Федерации.

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

Диссертационная работа Никулина Александра Владимировича выполнена на хорошем научно-методическом уровне. В работе используются современные физико-химические методы анализа, а также современные квантово-химические методы. Положения диссертации обоснованы наличием весьма значительного количества экспериментальных и теоретических данных, достижением поставленной цели, выполнением заявленных задач.

Экспериментальные результаты и теоретические выкладки подтверждены достаточным количеством данных, статистической обработкой полученных результатов согласно требованиям ГФ.

Апробация полученных результатов проведена на 15 международных и российских конференциях в период с 2015 по 2021 гг.

Достоверность и новизна исследования, полученных результатов

Достоверность результатов, представленных автором, подтверждена многократными экспериментами и статистической обработкой экспериментальных данных согласно требованиям ГФ. В диссертационной работе были использованы разнообразные современные инструментальные методы аналитической химии – АЭС-ИСП, ЭТААС, ионометрия, спектрофотометрия, ИК-спектроскопия, ВЭЖХ/УФ/МС, а также квантовой химии – полуэмперический метод РМЗ, метод функционала плотности – ВЗЛУР. Работы выполнены на поверенных приборах, информационно-аналитическое исследование базируется на большом объеме отечественных и зарубежных научных публикаций.

В ходе выполнения диссертационного исследования Никулиным А.В.

- получены новые экспериментальные данные, позволяющие явным образом выявить преимущества использования принципа унификации методик;

- предложены полностью унифицированные условия пробоподготовки и определения элементов методами ЭТААС (атомно-абсорбционной спектрометрии с электротермической атомизацией) и АЭС-ИСП (атомно-эмиссионной спектрометрии с индуктивно связанной плазмой);

- впервые разработана и рекомендована к применению в фармакогнозии спектрофотометрическая методика определения кремния в траве хвоща полевого, в которой воспроизводимость результатов обеспечивается применением стандартных образцов постоянного состава и использованием восстановленной комплексной формы, обуславливающих аналитический сигнал;

- впервые предложена методика полуколичественной оценки содержания бромидов и нитратов в извлечениях из субстанций природного происхождения методом ионометрии;

- впервые разработана ионометрическая методика определения йодидов в талломе ламинарии и предложен подход к определению неорганических и органических форм йода;

- впервые разработана и рекомендована к применению в фармакогнозии унифицированная методика определения суммы восстанавливающих сахаров на основе метода Дюбуа;

- впервые предложены унифицированный осадитель, а также порядок действий для более глубокой очистки полисахаридов (определение ведется методом гравиметрии); показано, что ИК-спектроскопия может быть использована для подтверждения подлинности полисахаридов;

- впервые разработаны и предложены к применению в фармакогнозии унифицированные ВЭЖХ-методики определения арбутина и суммы антоцианов;

- предложены унифицированные условия экстракции антоцианов с помощью ультразвуковых волн;

- продемонстрировано, что унифицированные хроматографические условия, сочетаются с пробоподготовкой, рекомендованной в ГФ.

Применение квантово-химического моделирования позволило установить закономерности, обуславливающие протекание химических реакций при определении восстанавливающей суммы сахаров, и закономерности распада глюкозамина сульфата и арбутина при их определении методом ВЭЖХ/МС.

Проведенные экспериментальные исследования позволили автору предложить научно обоснованный алгоритм, который позволяет в дальнейшем разрабатывать адекватные методики анализа для контроля качества лекарственного растительного сырья с учетом современных преимуществ инструментальных и теоретических методов.

Значимость для науки и практики полученных автором результатов

Результаты, полученные в работе, представляют как практический, так и научный интерес. Результаты экспериментальных и теоретических исследований целесообразно применять в научных лабораториях, специализирующихся на фармакогностических и фитохимических исследованиях, в лабораториях контроля качества на предприятиях, в частности для разработки методик количественного определения биологически активных веществ (БАВ) и экотоксикантов в многообразных фармацевтических объектах природного происхождения. На основании полученных данных были подготовлены проекты ОФС для включения в ГФ РФ.

Результаты работы используются в обучающем процессе отделения «Фармация» Северо-Восточного федерального университета им. М.К. Аммосова, на кафедре фармакогнозии, ботаники и технологии фитопрепаратов Пятигорского медико-фармацевтического института – филиала Волгоградского государственного медицинского университета.

Результаты разработки методик количественного определения кадмия, свинца, мышьяка, суммы антоцианов внедрены в контрольно-аналитическую лабораторию АО «Фармцентр ВИЛАР». Результаты разработки методик количественного определения кремния в траве хвоща полевого, восстанавливающей суммы сахаров, арбутина, внедрены в испытательном центре ФГБНУ ВИЛАР. Результаты разработки определения элементов методом АЭС-ИСП внедрены в деятельность ЦКП (НОЦ) РУДН.

Соответствие диссертации паспорту специальности

Научные положения диссертации соответствуют паспорту специальности 14.04.02 – Фармацевтическая химия, фармакогнозия, конкретно – п. 2, 3, 6, 7.

Полнота освещения результатов диссертации в печати

Основные научные результаты опубликованы в 20 работах, из них 6 статей журналах, включенных в Перечень рецензируемых научных изданий Сеченовского Университета/Перечень ВАК, 14 статей – в международные базы данных.

Характеристика структуры и содержания диссертации

Диссертация построена по классическому принципу и включает в себя: введение, обзор литературы (глава 1), пять экспериментальных глав (2, 3, 4, 5, 6), одну теоретическую главу (7), общие выводы, практические рекомендации, список литературы, четыре Приложения (А, Б, В, Г). В работе присутствует 135 рисунков и 117 таблиц. Список литературы включает 343 источника.

Во введении обоснована актуальность темы, сформулированы: цель и задачи исследования, продемонстрирована степень разработанности темы, научная новизна, теоретическая и практическая значимость результатов исследования, представлены: методология и методы исследования, основные положения, выносимые на защиту, имеется информация о достоверности научных положений и выводов, апробации результатов исследования,

личном вкладе автора, внедрении результатов исследования, соответствии диссертации паспорту научной специальности, связи задач исследования с проблемным планом фармацевтической науки, данные о структуре и объеме работы также представлены.

В первой главе представлен обзор литературы о методах и методиках определения элементов, сахаров, арбутина, антоцианов. Показаны возможности квантовой химии для исследования веществ природного происхождения. Приведено теоретическое обоснование необходимости развития такого направления как унификация методик, требующего создания общего теоретического алгоритма, который позволял бы использовать преимущества современных инструментальных методов анализа и квантовой химии для целей стандартизации и контроля качества лекарственного растительного сырья.

Во второй главе представлено описание объектов исследования, оборудования, реактивов, методов квантовой химии, использованных для теоретических исследований, программный пакет и формулы, использованные для статистической обработки экспериментальных данных.

Третья глава посвящена разработке полностью унифицированной методики определения элементов методами АЭС-ИСП и ЭТААС в растворах, полученных кислотным вскрытием растительного материала в условиях МВ-нагрева. В данной главе содержатся результаты разработки спектрофотометрической методики определения кремния в траве хвоща полевого. Выбраны условия пробоподготовки образцов в МВ-печах перед определением аналитов методом АЭС-ИСП и ЭТААС; выбраны условия инструментального определения элементов.

Четвертая глава посвящена исследованиям возможности использования метода ионOMETрии для решения задач фармакогностического анализа. В частности, продемонстрированы ограниченные возможности данного метода для определения нитратов в извлечениях из лекарственного растительного сырья. Показано, что содержание бромидов во всех исследованных образцах растительного материала было ниже терапевтических значений. Разработана методика определения йодов в талломе ламинарии и предложен новый подход для количественной оценки органической и неорганической форм йода.

Пятая глава включает данные по разработке унифицированной спектрофотометрической методики определения восстанавливающей суммы сахаров на основе метода Дюбуа, результаты по выбору унифицированного

осадителя и разработке способа дополнительной очистки полисахаридов перед их определением гравиметрическим методом. Продемонстрирована возможность применения ИК-спектроскопии для подтверждения подлинности полисахаридов.

Автором также приведены результаты квантово-химического моделирования пути протекания реакции, приводящий к образованию красителя, который и обуславливает наличие аналитического сигнала в методе Дюбуа. Установлена схожесть механизма протекающей реакции с механизмом реакции, протекающей при определении кетоз по Селиванову.

Диссертант в своей работе демонстрирует перспективность и целесообразность использования метода ВЭЖХ/МС для сахаров, содержащих аминогруппы (на примере глюкозамина сульфата). Разработана ВЭЖХ/МС-методика определения глюкозамина сульфата. При исследовании масс-фрагментации посредством квантово-химического моделирования установлено, что наиболее выгодным является образование дочерних ионов, несущих положительный заряд на NH_2 -заместителе.

Шестая глава содержит результаты исследований по разработке унифицированных методик определения арбутина и суммы антоцианов методом ВЭЖХ. Квантово-химическое моделирование позволило предположить возможные структуры родительских и дочерних ионов, показана выгодность протекания масс-фрагментации, представленной в работе. Полученные диссертантом данные показывают, что более перспективным (в случае определения арбутина) методом является ВЭЖХ/УФ.

Выбраны условия экстракции антоцианов посредством применения УЗ-обработки. Рекомендованы хроматографические условия для разделения аналитов. Убедительно продемонстрирована совместимость ВЭЖХ-условий как с УЗ-пробоподготовкой, так и с пробоподготовкой, приведенной в ГФ.

Седьмая глава является теоретической. Автором даются общие рекомендации по использованию разработанных методик, приводятся общие схемы анализа субстанций природного происхождения на содержание элементов, восстанавливающей суммы сахаров, полисахаридов, арбутина и суммы антоцианов, приводится общий теоретический алгоритм, разработанный на основе проведенных исследований.

В общих выводах отражены обобщенные результаты решения задач, представленных в диссертационной работе.

В приложениях приведены примеры использования таких методов как ЭТААС и МС-ИСП, ВЭЖХ/УФ для анализа лекарственного растительного сырья, проекты ОФС (Определение кадмия, свинца, мышьяка, ртути в лекарственном растительном сырье, Определение суммы восстанавливающих сахаров спектрофотометрическим методом, Определение арбутина в субстанциях растительного происхождения методом ВЭЖХ, Количественное определение суммы антоцианов в субстанциях растительного происхождения методом ВЭЖХ), проект изменений к ФС «Бадана толстолистного корневища», акты внедрений результатов исследований, дополнительная литература.

Соответствие содержания автореферата основным положениям и выводам диссертации

Структура, содержание автореферата отражают содержание, текст и выводы диссертации. Общие выводы, имеющиеся в диссертационной работе, и автореферате совпадают.

Достоинства и недостатки в содержании и оформлении диссертации

Работа Никулина Александра Владимировича выполнена в соответствии с требованиями, предъявляемыми к диссертациям, написана строгим научным языком, структура работы логична и отвечает задачам исследования. Все главы диссертационной работы заканчиваются обоснованными выводами, отражающими суть каждой из глав. Общие выводы соответствуют результатам исследований. Задачи, сформулированные автором, решены.

В целом, работа производит хорошее впечатление и заслуживает положительной оценки. Однако мы считали бы возможным и целесообразным сделать следующие замечания.

1. С нашей точки зрения, цель работы сформулирована не вполне корректно, поскольку исследования сами по себе никак не могут являться целью диссертационной работы, пусть даже это «комплексные экспериментальные и теоретические исследования...» (цит. по: автореферат - с. 6, диссертация - с. 9).
2. С нашей точки зрения, характеристика объектов исследования должна быть более точной. В частности, из текста диссертации и автореферата

не ясно, какое ЛРС использовали: цельное или резаное, фасованное или брикетированное.

3. При описании объектов исследования в число видов «фармакопейного ЛРС различных морфологических групп» (цит. по: автореф. – с. 13, диссерт. – с. 63) ошибочно включены неофициальные виды сырья, в частности, трава зимолюбки, чигирский чай, трава боровой матки.
4. В перечень задач исследования автор включает подготовку ФС и ОФС для ГФ РФ (задача 9). Более корректно было бы вести речь о разработке проектов этих нормативных документов, поскольку на момент защиты разработанные проекты еще не утверждены в установленном порядке и даже не поданы на рассмотрение в соответствующие инстанции.
5. В тексте диссертации и автореферата, а также в таблицах исследуемые биологически активные вещества зачастую безосновательно называются «действующими веществами» (дисс. – с. 6, 14, 62, 280, 287, 291, 292, 297), в то время как указаний на конкретный спектр фармакотерапевтического действия этих БАВ с позиций доказательной медицины не автором приводится.
6. В ряде таблиц, например, в табл. 3 (автореф.) и 32 (диссерт.), не указаны производители 35 видов лекарственного растительного сырья. В то же время из данных таблиц 4 (автореф.) и 40 (диссерт.) следует, что содержание, например, кремния в траве хвоща полевого существенно зависит от конкретного производителя сырья.
7. В тексте диссертации и автореферата отсутствует указание на использование в расчетах либо воздушно-сухого, либо абсолютно сухого сырья. В подавляющем большинстве таблиц также отсутствуют данные о влажности (потерях в массе при высушивании) исследуемого сырья, необходимые для расчетов. Исключением являются таблицы 6 (автореф.) и 74 (диссерт.), в которых эти данные представлены корректно.
8. С учетом того, что происхождение «нескольких серий образцов, предоставленных сотрудниками ВИЛАР» (цит. по: автореф. – с. 33) не указано, а количество исследуемых образцов всего 6, результаты анализа этих образцов нельзя считать достаточными для установления норм качества корневищ бадана толстолистного и внесения соответствующих изменений в проект ФС на сырье бадана.

9. В работе имеются неудачные выражения, в том числе имеющие отношение к фармакогностической терминологии. В частности:
- 9.1. Фармакопеи других стран следует называть зарубежными, но не «импортными» (автореф. - с. 9, диссерт. – с. 13), поскольку РФ их не импортирует.
 - 9.2. Также нельзя признать корректной формулировку «субстанции природного происхождения различных морфологических групп» (автореф. - с. 9, диссерт. – с. 13), поскольку терминологическая единица «субстанции» в фармацевтической практике является законодательно закрепленной (ФЗ-61 «Об обращении лекарственных средств», ОФС.1.1.0006.15 «Фармацевтические субстанции») и не соответствует понятийному аппарату, относящемуся к лекарственному растительному сырью и его морфологическим группам. В тексте диссертации и автореферата терминологическая единица «субстанции» не дифференцируется автором от лекарственного растительного сырья (также законодательно закрепленного термина в ФЗ-61, ГФ XIV), в подавляющем большинстве случаев употребления в работе неуместна и вносит путаницу в связи с подменой понятий. Например, в названии табл. 32, 51, 74 и мн. др. (диссертация), а также соответствующих таблиц в автореферате термин «субстанция» употребляется вместо «лекарственного растительного сырья».

Также хотелось бы задать автору следующие вопросы:

1. В сформулированные автором задачи исследования входило «предложить нормы для тяжелых металлов, содержащихся в ЛРС» (задача № 2, автореф. – с. 6, диссерт. – с. 9). Какие нормы содержания тяжелых металлов были Вами предложены и конкретно для каких видов лекарственного растительного сырья (ЛРС)?
2. Как можно установить нормы содержания БАВ в ЛРС без учета показателя влажности (потери в массе при высушивании)? (В настоящей работе отсутствуют указания на влажность исследуемых образцов).
3. Могут ли быть использованы разработанные Вами методики определения макро- и микроэлементов в сырье для параллельного определения количественного содержания подвижных форм этих же

элементов в почвенных образцах? (Такой анализ позволяет установить избирательное накопление определенных элементов в конкретных видах ЛРС).

4. Почему изучение и выбор оптимальных условий кислотного разложения образцов ЛРС в условиях МВ-нагрева проводили на примере мышьяка, в то время как свинец также относится к легко летучим элементам?
5. При определении элементов методом атомно-эмиссионной спектроскопии с индуктивно связанной плазмой (АЭС-ИСП), проводилось ли параллельное определение этих же макро- и микроэлементов фармакопейными методами? Если да, то как соотносятся результаты исследований разработанными методами и фармакопейными?
6. Как соотносятся результаты тайминга этих методик?
7. Почему, по Вашему мнению, на выбор экстрагента для извлечения арбутина из различных видов сырья влияют лишь «существенные различия в морфологическом строении органов растений различных видов» (цит. по: автореф. – с. 32), но не принимаются Вами во внимание сопутствующие биологически активные вещества?
8. Насколько коэффициент водопоглощения ламинарии отличается от коэффициента водопоглощения других видов ЛРС?
9. Проводилось ли определение йодидов (с помощью разработанной методики) в слоевищах ламинарии в сравнительном аспекте с другими видами ЛРС?

Отмеченные замечания не являются принципиальными и не влияют на общую положительную оценку работы, а вопросы носят уточняющий характер и не снижают ценности и актуальности работы. В качестве пожелания хотелось бы рекомендовать диссертанту продолжить работу в данном направлении и внедрить в фармацевтический анализ (в том числе фармакопейный) полученные интересные и важные для практики результаты.

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 завершенной научно-квалификационной работой, в которой на основании выполненных автором исследований осуществлено решение крупной научной проблемы, имеющей важное народохозяйственное значение.

По актуальности, научной новизне, теоретической и практической значимости, достоверности полученных результатов и обоснованности выводов диссертационная работа Никулина Александра Владимировича 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 ее автор, Никулин Александр Владимирович, заслуживает присуждения искомой ученой степени доктора фармацевтических наук по специальности 14.04.02 – Фармацевтическая химия, фармакогнозия.

Официальный оппонент

доктор фармацевтических наук, профессор,
директор Научно-исследовательского центра – президент
Некоммерческой организации «Профессиональная
ассоциация натуротерапевтов»



«16» мая 2022 г.

Киселева Татьяна Леонидовна

Подпись Киселевой Т.Л. заверяю: Исполнительный директор
Некоммерческой организации «Профессиональная ассоциация натуротерапевтов»



Луничкина Е.В.

Юридический адрес: г. Москва, 125412, ул. Талдомская, д. 17, к. 1.

Фактический адрес: г. Москва, 125315, Ленинградский проспект, д. 72, к. 2,
эт. 1, пом. 1, офис 55. Web-сайт: <https://www.naturoprof.ru>, тел. +7 (495) 507-23-15, e-mail: Naturoprof@Mail.ru