

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

доктора фармацевтических наук Лякиной Марины Николаевны

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

Среди всего разнообразия лекарственных средств, представленных на рынке, препараты/активные фармацевтические субстанции растительного происхождения занимают весомое место – их доля в общем объеме товарооборота достигает 40 % и наблюдается тенденция к постепенному ее увеличению. Исходное сырье для производства таких препаратов может быть как культивируемым, так и дикорастущим. Однако независимо от происхождения качество исходного сырья должно быть таким, чтобы обеспечить соответствие качества фармацевтической субстанции до вовлечения в производственный процесс требованиям фармакопейных стандартов. Одним из важнейших параметров, определяющих качество фармацевтической субстанции, является количественное определение действующих веществ, безопасность - определение и нормирование экотоксикантов (тяжелых металлов, пестицидов и др.). Методики, которые при этом используются, как правило, характеризуются длительностью пробоподготовки, что обусловлено сложностью состава лекарственных растений. А в ряде случаев и разнообразием условий определения даже для одних и тех же основных групп биологически активных веществ. С точки зрения рутинного контроля на фармацевтических предприятиях более целесообразным было бы применение максимально унифицированных методик, базирующихся на общем алгоритме, который учитывал бы особенности современных инструментальных и теоретических методов, помогал бы максимально автоматизировать процедуру испытаний с целью сокращения времени. В настоящее время такой алгоритм отсутствует. В отечественной и зарубежной литературе этой проблеме также не уделяется

достаточного внимания.

Таким образом, необходимость исследований в области совершенствования стандартизации и контроля качества лекарственного растительного сырья и фармацевтических субстанций на его основе является чрезвычайно актуальной задачей.

В рецензируемой работе Никулина Александра Владимировича приведены результаты исследований по разработке унифицированных методик количественного определения на основе таких физико-химических методов, как: спектрофотометрия в ультрафиолетовой и видимой областях, атомно-абсорбционная спектрометрия с электрохимической атомизацией (ЭТААС), атомно-эмиссионная спектроскопия с индуктивно связанной плазмой (АЭС-ИСП), высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ) с ультрафиолетовым и масс-детекторами, ионометрия. Для теоретических исследований автор применяет квантово-механические методы, которые позволяют более глубоко раскрыть механизмы происходящих процессов – данные в работе также приведены. На примере ИК-спектроскопии продемонстрирована перспективность инструментальных методов для оценки подлинности по показателю «Определение основных групп биологически активных веществ» (в настоящее время в большинстве случаев для этой цели используется ТСХ и качественные реакции). Основываясь на принципе унификации и преимуществах инструментальных методов, автором были разработаны унифицированные методики определения элементов: кадмия, свинца и мышьяка, а также других элементов; суммы восстанавливающих сахаров, арбутина, суммы антоцианов; предложен унифицированный осадитель для определения полисахаридов гравиметрическим методом; исследованы возможности ионометрии для определения таких анионов, как: бромиды, нитраты. На основании экспериментальных данных предложен общий теоретический алгоритм, позволяющий разрабатывать и использовать в контроле качества унифицированные методики, основанные в ряде случаев на расчете с помощью квантово-механических методов наиболее вероятных структур анализируемых веществ, обуславливающих формирование аналитического сигнала.

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

Диссертация выполнена на хорошем научном уровне. Автор применяет современные физико-химические методы анализа, а также квантово-механические методы. Положения диссертации обоснованы наличием значительного количества экспериментальных и теоретических данных, достижением поставленной цели. Задачи, поставленные диссертантом, в результате проведенной работы были выполнены. Результаты исследований доложены на международных и всероссийских конференциях.

Достоверность и новизна исследования, полученных результатов

Впервые получены новые экспериментальные данные на большом количестве образцов лекарственных средств растительного происхождения с использованием современных инструментальных методов. Полученные данные явным образом показывают преимущества использования принципа унификации методик. Так, предложены условия пробоподготовки и определения элементов методами ЭТААС и АЭС-ИСП, что позволило добиться полной унификации методик при определении кадмия, свинца, мышьяка. Автором разработана спектрофотометрическая методика определения кремния в траве хвоща полевого, позволяющая получать воспроизводимые результаты анализа. Основываясь на возможностях ионометрического метода впервые предложено использовать методику полуколичественной оценки содержания бромидов и нитратов, а также неорганических и органических форм йода в слоевищах ламинарии.

Разработана унифицированная методика (метод спектрофотометрии в видимой области на основе фотометрической реакции с фенолом в кислой среде) определения суммы восстанавливающих сахаров; для определения полисахаридов методом гравиметрии предложен единый осадитель. Оценена возможность применения ИК-спектроскопии для подтверждения подлинности по показателю «Определение основных групп биологически активных веществ» (полисахариды). Разработана методика определения глюкозамина сульфата в геле для наружного применения методом ВЭЖХ/МС.

Впервые разработаны и рекомендованы к применению методики определения арбутина и суммы антоцианов методом ВЭЖХ, при этом для извлечения антоцианов предложено использовать обработку ультразвуком. Для антоцианов убедительно показана сочетаемость выбранных

хроматографических условий не только с разработанной процедурой пробоподготовки, но и с процедурами, рекомендованными в ГФ.

Квантово-механическими методами теоретически установлены наиболее вероятные пути масс - фрагментации при определении аналитов ВЭЖХ/МС; показана аналогичность реакции, протекающей в методе Dubois, и реакции Селиванова.

Предложен общий теоретический алгоритм разработки методик для стандартизации и контроля качества фармацевтических субстанций растительного происхождения, основанный на преимуществах современных инструментальных методов.

Достоверность результатов подтверждена многократными экспериментами, статистической обработкой результатов исследований. Приборы, использованные автором в исследованиях, прошли соответствующую метрологическую поверку, используемые реактивы и стандартные образцы являются надлежащего качества.

Теоретические результаты, полученные с использованием квантово-механических методов, а именно методов PM3 и B3LYP в базисе 6-311G(d,p), входящих в программный пакет Gaussian 09. Визуализация расчетов осуществлена с помощью редактора GaussView 5.0.8.

Значимость для науки и практики полученных автором результатов

Предлагаемые автором методики количественного определения элементов/биологически активных веществ в образцах лекарственных средств растительного происхождения научно обоснованы, характеризуются высокой селективностью по отношению к аналитам; унифицированность доказана анализом лекарственных средств, относящихся к различным морфологическим группам. Выполненные квантово-механические исследования позволили объяснить наблюдаемые экспериментальные данные, предсказывать возможные пути протекания химических процессов.

Предложенные автором унифицированные методики определения:

- кадмия, свинца и мышьяка в лекарственном растительном сырье с помощью метода атомно-абсорбционной спектроскопии с электрохимической атомизацией;

- антоцианов с помощью метода высокоэффективной жидкостной хроматографии

внедрены в практику работы Фармцентр «ВИЛАР».

Спектрофотометрическая методика определения кремния в лекарственном средстве Хвоща полевого трава, методика определения арбутина (метод ВЭЖХ), методика определения суммы восстанавливающих сахаров (в составе полисахаридов) на основе реакции с фенолом в кислой среде (метод спектрофотометрии в видимой области спектра) применяется в практике работы Испытательного центра ФГБНУ ВИЛАР.

Усовершенствованная методика определения элементов в лекарственном растительном сырье используется при химико-аналитических исследованиях, проводимых в Центре Коллективного пользования (ЦКП (НОЦ)) РУДН.

Материалы диссертационного исследования используются в учебном процессе Медицинского института Северо-Восточного федерального университета им. М.К. Аммосова (при изучении дисциплин «Фармакогнозия», «Фармацевтическая химия», «Использование биологически активных веществ растительного происхождения в фармации») и Пятигорского медико-фармацевтического института (кафедра ботаники, фармакогнозии и технологии фитопрепаратов).

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

Важнейшие результаты диссертационной работы Никулина А.В. представлены в 20 печатных работах, в том числе в научных статьях в журналах, включенных в перечень рецензируемых научных изданий Сеченовского Университета/Перечень ВАК при Минобрнауки России – 6; статьях в изданиях, индексируемых в МБД – 14.

Характеристика структуры и содержания диссертации

Диссертация изложена на 341 страницах компьютерного текста (с учетом Приложений – 386), традиционно (по ГОСТу) состоит из Введения, Обзора литературы (Глава 1), описания объектов исследования,

используемого оборудования, стандартных образцов, реактивов, методов квантово-химических исследований и статистической обработки результатов (Глава 2), обсуждения результатов (Главы 3, 4, 5, 6), теоретической главы (Глава 7), Общих выводов, Практических рекомендаций, списка литературы, включающий 343 источника, из которых 259 – публикации зарубежных исследователей.

Диссертация иллюстрирована 135 рисунками и 117 таблицами.

Во введении обоснована актуальность темы и новизна исследования, имеется информация о степени разработанности темы исследования, сформулированы: цель и задачи исследования, научная новизна, теоретическая и практическая значимость результатов исследования, а также 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, сведения о количестве публикаций.

Первая глава представляет собой обзор литературы, в котором автор подробно рассматривает достоинства и недостатки существующих методов анализа объектов исследования растительного происхождения, а также достоинства и недостатки теоретических методов квантовой химии. На основании исследования литературных источников Никулин А.В. формулирует проблему создания современного обобщенного методологического подхода для разработки унифицированных методик анализа фармацевтических объектов, исходя из возможностей конкретных экспериментальных (АЭС-ИСП, МС-ИСП, ЭТААС, ионометрии, спектрофотометрии, ВЭЖХ) и теоретических (полуэмпирические, неэмпирические, методы функционала плотности) методов.

Вторая глава представляет собой подробное описание объектов исследования, используемого оборудования, реактивов, стандартных образцов, методов экспериментальных и теоретических исследований.

Третья глава содержит результаты исследований по выбору мягких условий кислотной подготовки проб в закрытых МВ-системах, выбору условий АЭС-ИСП и ЭТААС определения элементов. Показано, что выбранные условия позволяют надежно определять элементы в исследуемых образцах. Эффективное сочетание стадии определения и стадии пробоподготовки позволило разработать полностью унифицированную

методику при определении макрокомпонентов (АЭС-ИСП) и следовых количеств кадмия, свинца, мышьяка (ЭТААС).

Использование государственных стандартных образцов (ГСО) нефелиновой руды и молибденовой сини (соединения, обуславливающего аналитический сигнал) позволило разработать методику количественного определения кремния в траве хвоща полевого методом спектрофотометрии. Разработанные автором методики были валидированы по соответствующим параметрам. Полученные автором результаты анализа лекарственных растительных средств не превышали для кадмия, свинца, мышьяка нормы, ГФ РФ действующего издания. Предложены нормы для содержания кремния в траве хвоща полевого.

Глава 4 содержит данные, показывающие ограниченные возможности ионометрии для количественного определения нитратов в извлечениях, полученных из лекарственных растительных средств. Тем не менее, при использовании буферных растворов, рекомендованных производителем электродов, можно получить воспроизводимые результаты определения нитрат - ионов. Показано, что содержание бромидов во всех исследованных видах лекарственных растительных средств находится ниже терапевтического уровня.

Ионометрия оказалась перспективным методом, с помощью которого была разработана и валидирована методика количественного определения йодидов в талломе ламинарии. Также был предложен подход для оценки содержания двух форм йода – неорганической и органической.

Пятая глава включает исследования по усовершенствованию методики определения полисахаридов, а именно поиску более полной очистки извлечений из лекарственных растительных средств и подходящего реактива для наиболее полного осаждения полисахаридов - ацетона с небольшой добавкой коагулянта. Для лучшей очистки извлечений рекомендовано применять последовательное пропускание полученных извлечений через аминсорбенты и силикагель.

Показано, что в определенных условиях ИК-спектроскопию можно рекомендовать как метод подтверждения подлинности по показателю «Определение основных групп биологически активных веществ» (полисахариды).

Разработана и валидирована спектрофотометрическая методика количественного определения суммы восстанавливающих моносахаридов на основе фотометрической реакции с фенолом в кислой среде. Показано, что

для развития окрашивания и, соответственно, получения удовлетворительных результатов не нужно длительное нагревание. Унифицированность методики подтверждена анализом лекарственных средств, относящихся к различным морфологическим группам. В зависимости от типа мономера, образующего полисахарид, в качестве СО предложено использовать стандартный образец глюкозы или фруктозы для получения адекватных результатов.

Квантово-механические расчеты на примере СО фруктозы показали схожесть процессов, которые протекают при развитии окрашивания по предлагаемому методу с фенолом в кислой среде (метод Дюбуа), с процессами, протекающими по реакции Селиванова. Установлено, что нормы, приведенные в ГФ для мать-и-мачехи листьев и липы цветков, могут остаться неизменными и в случае определения по предлагаемой методике.

Разработана и валидирована методика количественного определения глюкозамина сульфата в геле для наружного применения (ВЭЖХ/МС). Квантово-механическими методами оценены пути масс-фрагментации.

Глава 6 включает данные по применению ВЭЖХ/УФ/МС для разработки методик количественного определения арбутина и суммы антоцианов. Показано, что стабильно воспроизводимые результаты при определении арбутина могут быть получены при применении ВЭЖХ/УФ. Унифицированность и валидность методики доказана анализом значительного количества образцов лекарственных растительных средств. Подтверждено, что нормы по содержанию арбутина, рекомендованные в ГФ для толокнянки и брусники листьев, могут быть сохранены в случае определения по предлагаемой методике. Проведенные исследования по определению арбутина в лекарственном средстве Бадана толстолистного корневища и полученные результаты позволили обосновать норму его содержания.

При исследованиях возможностей комбинации методов ВЭЖХ/МС для определения арбутина проведено квантово-механическое изучение путей масс - фрагментации аналита, оценена возможная структура дочерних ионов.

Разработана методика мягкой пробоподготовки (с помощью обработки ультразвуком) и предложены хроматографические условия для разработки ВЭЖХ/УФ-методики определения суммы антоцианов. Продемонстрировано, что выбранные хроматографические условия удовлетворительно сочетаются и с пробоподготовкой, рекомендованной соответствующей фармакопейной статьей ГФ РФ действующего издания.

Седьмая глава (теоретическая) содержит описание общих процедур анализа и общий теоретический алгоритм, позволяющий разрабатывать максимально унифицированные методики с использованием возможностей современных инструментальных методов анализа с использованием потенциала теоретических методов квантовой химии.

Общие выводы диссертации полностью отражают полученные результаты и соответствуют поставленным задачам исследования.

Соответствие содержания автореферата основным положениям и выводам диссертации

Автореферат полностью соответствует структуре и основным положениям диссертации. Общие выводы в диссертационной работе и автореферате идентичны.

Достоинства и недостатки в содержании и оформлении диссертации

В тексте диссертационной работы имеются небольшое количество опечаток и стилистических неточностей, которые не влияют на общее положительное впечатление.

При анализе работы возникли некоторые вопросы и замечания:

1. какова целесообразность и необходимость разработки и включения в фармакопейный стандарт на лекарственный растительный препарат Хвоща полевого трава определения и нормирования содержания кремния, если не установлен вклад этого соединения в палитру спектра фармакологического действия препарата ?
2. ряд перечисленных объектов исследования: ортилия однобокая (матка боровая), зимолобка зонтичная, бадана толстолистного листья ферментированные не являются фармакопейными;
3. не совсем понятен используемый автором показатель «открываемости» в определениях, основанных на методе «добавок». Метод добавок предполагает к равным аликвотам испытуемого раствора (с уже установленным значением определяемого вещества/элемента) добавление кратно увеличивающихся количеств стандартного раствора с известной концентрацией того же определяемого

вещества/элемента с последующей регистрацией суммарного аналитического сигнала. Поэтому, оценивая данные таблиц 17-29 не совсем ясно, что автор демонстрирует: добавлено 0,5 мкг/мл – найдено 0,55 мкг/мл; добавлено 1,18 мкг/мл – найдено 1,08 мкг/мл; добавлено 2,21 мкг/мл – найдено 2,10 мкг/мл ??? Подобные результаты могут свидетельствовать о том, что в испытуемом растворе одного из изучаемых объектов (шиповника плоды) отсутствуют анализируемые элементы (Al, Ba, Ca, Co, Cr, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Ni, Sr, Zn) или их содержание ниже предела определения. Тогда возникает вопрос, по каким критериям был в качестве модели выбран испытуемый образец лекарственное растительное средство Шиповника плоды ? аналогичные вопросы по тексту на с. 139, с. 171-172 (табл. 70), с. 231, табл. 102 (с. 253) и табл. 111 (с. 266);

4. по тексту диссертации встречаются не совсем корректное использование терминов и отмечены не совсем удачные определения: «нормативная документация, входящая в импортные и отечественную фармакопеи» - в фармакопеи входят общие фармакопейные статьи/общие монографии и фармакопейные статьи/монографии; «результаты исследований по определению нитратов, бромидов, йодидов методом ионометрии; рекомендации по возможному использованию полученных результатов при стандартизации ЛРС по данным группам БАВ» (с. 14) - анионы не относятся к группам БАВ; «При дефиците йода очевидным решением является заместительная терапия, заключающаяся в применении лекарственных фитопрепаратов с высоким содержанием этого неметалла в доступной для усвоения форме. В отечественной медицинской практике таким сырьем являются слоевища ламинарии» (с. 29) – сырье не может быть лекарственным растительным препаратом; «Последовательно вводят в плазму раствор сравнения, стандартные растворы 1–7 и испытуемый раствор не менее 3 раз. По полученным калибровочным кривым определяют концентрацию каждого элемента в испытуемых растворах и растворе сравнения» (с. 117), а разве в растворе сравнения (5 мл кислоты азотной концентрированной, 0,5 мл водорода пероксид и вода) может что-то определяться ?
5. предлагаемые нормы содержания для кремния (в виде кремния оксида) на с. 148 составляет 2,0 %, на с. 129 и 294 – не менее 3,0 %;

6. «из представленных в Таблице 68 данных видно, что максимумы поглощения находятся при 487 ± 5 нм» (с. 170), хотя фактические результаты демонстрируют более узкий интервал ± 2 нм;
7. (с. 233): в табл. 94 в строках «Стандартный раствор» и «Испытуемый раствор» перепутаны местами начальные этапы приготовления;
8. (с. 234): при расшифровке символа расчетной формулы « a_0 » указано «навеска СО глюкозамина сульфата, г», что не соответствует тексту методики.

Перечисленные выше замечания и вопросы не носят принципиального характера, не снижают научной ценности и носят уточняющий характер.

Заключение

Диссертационная работа 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 осуществлено решение крупной научной проблемы, имеющей важное значение для современной фармакогнозии, которая состоит в построении общего алгоритма, позволяющего разрабатывать унифицированные методики анализа лекарственного растительного сырья с использованием наиболее современных инструментальных методов. Разработанные таким образом методики могут быть внедрены в контрольно-аналитические лаборатории, занимающихся контролем качества субстанций природного происхождения, что позволяют существенно уменьшить трудоемкость аналитических процедур.

По объему проведенных экспериментальных исследований, новизне, научной и практической значимости 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 по специальности 14.04.02 – Фармацевтическая химия, фармакогнозия.

Официальный оппонент

доктор фармацевтических наук, зам. директора
Института фармакопеи и стандартизации в сфере
обращения лекарственных средств Федерального
государственного бюджетного учреждения
«Научный центр экспертизы средств медицинского
применения» Минздрава России
(15.00.02 – Фармацевтическая химия, фармакогнозия,
15.00.01 – Технология лекарств и организация
фармацевтического дела)

127051, г. Москва, Петровский бульвар, д. 8, стр. 2.

Тел.: 8(499)190-18-18 доб. 63-26

e-mail: Ljakina@expmed.ru

«23» мая 2022 г.  Лякина Марина Николаевна

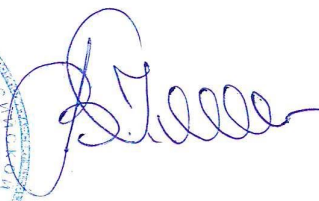
Подпись доктора фармацевтических наук
Лякиной Марины Николаевны удостоверяю:

Ученый секретарь

Федерального государственного
бюджетного учреждения «Научный центр
экспертизы средств медицинского
применения» Минздрава России,

кандидат медицинских наук

«23» мая 2022 г.



Климов В.И.