

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Пермская государственная фармацевтическая академия»
Министерства здравоохранения Российской Федерации
(ФГБОУ ВО ПГФА Минздрава России)

Юридический адрес: Россия, 614990, г. Пермь, ул. Екатерининская, д. 101
Почтовый адрес: Россия, 614990, г. Пермь, ул. Полевая, д. 2.
Тел/факс: (342) 233-55-01; 236-90-50; E-mail: perm@pfa.ru; http://www.pfa.ru
ИНН 5902291011; КПП 590201001; ОГРН 1025900536760

№ 053/724 от 15.08.2023

На № _____ от _____

УТВЕРЖДАЮ

Ректор ФГБОУ ВО ПГФА

Минздрава России

кандидат биологических наук,

доцент

В.Г. Лужанин

2023 г.



ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

о научно-практической значимости диссертационной работы

Прожигоиной Юлии Эдуардовны

«Глубокие эвтектические растворители как альтернативные экстрагенты биологически активных веществ из растительной композиции»,

представленной на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук по научной специальности 3.4.1. Промышленная фармация и технология получения лекарств (фармацевтические науки)

Актуальность темы исследования.

Лекарственные средства на основе растительного сырья постоянно находятся в зоне интереса ученых вследствие уникальности химического состава, высокой фармакологической активности и относительной легкодоступности сырьевой базы. Актуальным направлением исследований фитопрепаратов является разработка эффективных технологий и стандартизация новых препаратов на основе субстанций растительного происхождения.

Экстрагирование является основной лимитирующей технологической стадией производства фитопрепаратов, что делает необходимым проведение научных исследований, связанных с совершенствованием этого процесса. Установлено, что технологии экстракции с применением ультразвука и виброкавитации обладают высокой эффективностью за счет повышения выхода экстрактивных веществ и сокращения времени процесса. Для повышения избирательности широко используется двухфазная и сверхкритическая флюидная экстракции. При этом варьирование основных параметров как температура, давление, продолжительность, характер и степень измельчения сырья, позволяет проводить процесс так, чтобы получать комплекс биологически активных веществ (БАВ) как гидрофильного, так и гидрофобного характера.

В настоящее время активно изучается возможность использования в качестве альтернативных экстрагентов - глубоких эвтектических растворителей (ГЭР). Преимуществами ГЭР при технологическом применении, в сравнении с традиционными

органическими растворителями, являются низкие летучесть, стоимость и негорючесть. К тому же они обладают способностью извлекать различные БАВ из лекарственного растительного сырья. Вопросу изучения ГЭР и возможности их применения для выделения БАВ в последние годы уделяется много внимания, однако немногие работы посвящены изучению процессов экстракции из многокомпонентных растительных композиций с применением ГЭР, а также сравнению экстрагирующей способности ГЭР и традиционных извлекателей.

Исходя из вышеизложенного следует, что исследования, проведенные Прождиной Юлией Эдуардовной по изучению возможности экстракции БАВ из модельной растительной композиции с применением ГЭР, являются актуальными.

Диссертационная работа выполнена в соответствии с планом научно-исследовательских работ Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Всероссийский научно-исследовательский институт лекарственных и ароматических растений».

Соответствие диссертации паспорту научной специальности.

Диссертационная работа Прождиной Юлии Эдуардовны соответствует паспорту научной специальности 3.4.1. Промышленная фармация и технология получения лекарств (фармацевтические науки), а именно пункту 2 - проектирование и разработка технологий получения фармацевтических субстанций и лекарственных форм, утилизация производственных отходов с учетом экологической направленности. Стандартизация и валидация процессов и методик, продуктов и материалов. Оптимизация организационных и технологических процессов при разработке и получении лекарственных средств.

Научная новизна исследования, полученных результатов и выводов.

Научная новизна диссертации Прождиной Юлии Эдуардовны заключается в разработке способа экстракции фенольных соединений из многокомпонентной растительной композиции с использованием ГЭР.

При экспериментальном исследовании 25 составов композиций ГЭР выбран состав: холин хлорид-глюкоза- вода в мольном соотношении 2:1:1, обладающий наибольшей извлекающей способностью флавоноидов из композиции, содержащей лекарственное растительное сырье пустырника, зверобоя, Melissa и чабреца.

Разработана технология экстракции фенольных веществ предложенным составом ГЭР, обеспечивающая наибольший выход суммы флавоноидов, в пересчете на рутин.

С использованием ультра высокоэффективной жидкостной хроматографии с тандемной масс-спектрометрией (УЭЖХ-МС/МС) впервые установлен состав фенольных соединений, извлекаемых из экспериментальной растительной композиции с использованием в качестве экстрагентов 50 %-ого водного раствора ГЭР на основе холина хлорида, глюкозы и воды и 70 %-ого этилового спирта. Проведен сравнительный анализ полученных результатов.

Новизна исследования подтверждена патентами на изобретения на способы экстракции фенольных соединений из растительного сырья с применением в качестве экстрагентов ГЭР (Патент RU № 2782459 С1, Патент RU № 2794516 С1).

Теоретическая и практическая значимость работы.

Выявлены закономерности и разработаны рациональные режимы экстрагирования суммы флавоноидов, в пересчете на рутин, с использованием ГЭР из многокомпонентного растительного лекарственного сбора, содержащего пустырник, зверобой, Melissa и чабрец, и обеспечивающие максимальный выход БАВ.

Методом математического моделирования проведена оптимизация метода экстракции БАВ из модельной растительной композиции с применением этилового спирта в качестве экстрагента, используемого в качестве образца сравнения. Установлены оптимальные параметры экстракции: степень измельчения сырья - 2-3 мм, экстрагент - этиловый спирт 70 %, температура экстракции - 60 °С, время экстракции - 1 час, модуль экстракции сырья: экстрагент - 1:12.

С использованием современных методов хроматографического анализа в извлечениях из экспериментальной растительной композиции, полученных с использованием в качестве экстрагентов 50 %-ого водного раствора ГЭР на основе холина хлорида, глюкозы и воды идентифицировано 21 вещество, а с использованием 70 %-ого этилового спирта – 23 вещества фенольной природы, включающие гликозиды кверцетина, рутин, гиперозид, хлорогеновую кислоту, кофейную кислоту и ее производные. При сравнительном анализе установлена высокая избирательность используемого ГЭР в отношении хлорогеновой кислоты, рутина, лавандулифолиозида, вербаскозида и кемпферол-3-глюкуроида.

Разработаны технологическая и процессуальная схемы получения полупродукта – извлечения из растительной композиции, содержащей лекарственное растительное сырье пустырника, зверобоя, Melissa и чабреца с использованием ГЭР на основе холина хлорида, глюкозы и воды и утверждена технологическая инструкция на ее получение.

Предложены показатели качества и проект спецификации на полупродукт – извлечение из растительной композиции. Проведена валидация методики количественного определения суммы флавоноидов, извлекаемых 50%-водным раствором ГЭР на основе холина хлорида, глюкозы и воды, в пересчете на рутин.

Информационные материалы по разработке технологии экстрагирования фенольных соединений с использованием ГЭР используются в учебном процессе факультета фундаментальной медицины МГУ им. М. В. Ломоносова (акт о внедрении в учебный процесс № 092/23/110-03 от 01.03.2023 г.).

Степень обоснованности, достоверности научных результатов и выводов диссертации.

Диссертационная работа выполнена на современном научном уровне. При ее выполнении проведен значительный объем исследований с применением комплекса технологий, химических и физико-химических методов анализа. Степень обоснованности и достоверности научных результатов, выводов и заключений соискателя подтверждаются воспроизводимостью результатов, использованием адекватных методов исследования и корреляцией полученных экспериментальных данных с доступной научно-технической информацией.

Основные результаты работы представлены и обсуждены на IX и X Международных научных конференциях молодых ученых «Современные тенденции развития технологий здоровьесбережения», (Москва, ВИЛАР, 2021,2022) и на Международной научной конференции «От биохимии растений к биохимии человека» (Москва, ВИЛАР, 2022).

Публикации.

По теме диссертации опубликовано 9 научных работ, в том числе 6 статей – в периодических изданиях, рекомендованных ВАК при Министерстве науки и высшего образования Российской Федерации. Получено 2 патента Российской Федерации.

Оценка содержания диссертационной работы, ее завершенность.

Диссертационная работа построена традиционно и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, четырех глав экспериментальных исследований, выводов, списка сокращений и условных обозначений, списка литературы, включающего 93 источника, в том числе и 40 на иностранном языке. В состав работы также входят восемь приложений, отражающих ее научную и практическую значимость и включающих результаты макро- и микроскопического анализа растительной композиции, титульный лист технологической инструкции по получению эвтектического извлечения из растительной композиции для производства лекарственных препаратов, подписанный директором ФГБНУ ВИЛАР, академиком РАН Н.И. Сидельниковым, протокол исследования «острой» токсичности растительной композиции, полученной эвтектическим растворителем на мышах линии BALB/c, УЭЖХ-хроматограммы и масс-спектры соединений, экстрагируемых с применением 50%-ного водного раствора ГЭР на основе холина, глюкозы и воды в мольном соотношении 2:1:1, акт о внедрении результатов диссертационной работы в учебный процесс Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова от 01.03.2023 г. и 2 патента на изобретение. Диссертационная работа Прожогой Юлии Эдуардовны изложена на 202 печатных страницах и иллюстрирована 32 рисунками и 25 таблицами.

Во введении обоснована актуальность исследования, изложены цель и задачи, научная новизна, теоретическая и практическая значимость работы.

В обзоре литературы (**глава 1**) диссертант характеризует процесс экстракции с описанием стадий и факторов, оказывающих критическое влияние на выход действующих веществ из сырья: степень измельчения, разность концентраций, температура, вязкость экстрагента, время экстрагирования, характер и структура растительного сырья.

В обзоре достаточно полно представлен материал по ГЭР как современной альтернативе классическим экстрагентам, дано определение, предоставлена историческая справка их изучения, охарактеризована молекулярная структура и состав, физико-химические свойства, биохимическая роль в живых клетках и токсикологический профиль. Рассмотрены основные факторы, влияющие на извлечения БАВ, и методы удаления экстрагента на основе ГЭР из полупродуктов.

В **главе 2** описаны объекты, методики и приборы, использованные для анализа растительного сырья, получения и контроля качества извлечений. Для оценки суммарного содержания флавоноидов, в пересчете на рутин, в извлечениях использован метод дифференциальной спектрофотометрии при длине волны 410 ± 2 нм. В работе также использованы такие физико-химические методы анализа, как ИК-спектрометрия, ультраэффективная жидкостная хроматография с тандемной масс-спектрометрией, поляриметрия и ионометрия.

Статистическую обработку результатов экспериментов осуществляли согласно положениям ГФ XIV издания, ОФС 1.1.0013.15 «Статистическая обработка результатов химического эксперимента» с использованием программного пакета STATISTICA 10.0.

В **3 главе** приводятся результаты математического моделирования процесса экстрагирования БАВ из модельной растительной композиции раствором этилового спирта с использованием модели ортогонального планирования второго порядка.

Диссертантом получено уравнение, характеризующее процесс экстракции, и подобраны оптимальные параметры экстрагирования флавоноидов из модельной растительной композиции: степень измельчения сырья – 2-3 мм, экстрагент – этиловый спирт 70 %-ой концентрации, температура экстракции – 60°C, время экстракции – 1 час, модуль сырья : экстрагент – 1:12.

4 глава посвящена разработке состава и технологии экспериментальных образцов ГЭР. 25 составов протестированы на предмет извлекающей способности флавоноидов из модельной растительной композиции. На основании проведенной работы обоснован состав ГЭР: холин хлорид - глюкоза - вода в мольном соотношении 2:1:1 (ГЭР-23), обеспечивающий извлечение суммы флавоноидов, в пересчете на рутин, на 19% выше, чем в извлечениях с использованием 70% этилового спирта.

Представлены данные по установлению оптимальных количества воды и температуры в составе ГЭР. Извлечения изучены с использованием поляримерии и ионометрии. Разработаны процессуальная и технологическая схемы и составлен проект спецификации показателей качества полупродукта –извлечения из модельной растительной композиции, включающий такие показатели как описание, подлинность, рН, содержание суммы флавоноидов в пересчете на рутин, % (г/100мл), хранение.

С помощью метода ИК-спектроскопии доказана неэффективность удаления экстрагента ГЭР с помощью вакуумной сушки и методом жидкостной очистки и предложен перспективный способ отделения извлекаемых веществ от экстрагента: твердофазная экстракция с применением твердых мембран.

В 5 главе представлены материалы по валидации методики количественного определения суммы флавоноидов, в пересчете на рутин, извлекаемой 50 %-ым водным раствором ГЭР на основе холина хлорида, глюкозы и воды в мольном соотношении 2:1:1 из экспериментальной растительной композиции методом дифференциальной спектрофотометрии. Установлено, что методика является специфичной, правильной и воспроизводимой, установлена линейность и аналитическая область использования.

Глава 6 содержит результаты сравнительного изучения состава фенольных веществ, извлекаемых из экспериментальной растительной композиции с использованием в качестве экстрагента 50 %-ого раствора ГЭР и 70 %-ого этилового спирта, с помощью метода ультра эффективной жидкостной хроматографии с тандемной масс-спектрометрией (УЭЖХ-МС/МС). С помощью расчета относительного содержания БАВ, извлекаемых экстрагентами, показано, что ГЭР обладает избирательной эффективностью в отношении ряда полифенольных веществ.

Диссертация завершается заключением, в котором отражены основные результаты исследования, соответствующие поставленным задачам и целям. Содержание опубликованных работ и автореферата соответствует содержанию диссертации.

Личный вклад автора в проведенное исследование.

Автором выбрана актуальная тема исследований. Все этапы исследований по поиску, систематизации, обобщению и анализу литературных данных, осуществлению экспериментальной работы, анализу полученных результатов, проведены автором лично или при его непосредственном участии. Подтверждением этому служат работы, опубликованные в печати. Научные положения, выводы и рекомендации, сформулированные в диссертации Прожогой Юлии Эдуардовны, логически вытекают из результатов экспериментов.

Предложения, замечания и вопросы, возникшие при оценке работы и обсуждении отзыва.

Несмотря на то, что диссертация Прожогиной Юлии Эдуардовны оценивается нами положительно, однако при ее рассмотрении возникли некоторые вопросы и замечания:

1. В главе 1 (обзор литературы) не проанализированы конкретные примеры современных технологий с использованием ГЭР при экстракции БАВ из растительного сырья. В заключении главы не представлены преимущества и перспективы использования изучаемых альтернативных экстрагентов в виде ГЭР.

2. В главе 2, описывающие материалы и методики, не указано содержание суммы флавоноидов, в пересчете на рутин, в образцах растительного сбора.

3. Почему при оптимизации процесса экстрагирования БАВ с использованием этилового спирта использовано ортогональное планирование второго порядка? В работе не указано содержание флавоноидов в полученном извлечении и процент их извлечения из растительного сырья, что затрудняет оценку эффективности экстракции при применении оптимальных условий.

4. Определяющим параметром при выборе состава ГЭР является показатель извлекающей способности флавоноидов из модельной растительной композиции. В дальнейшем предлагаемый состав 23, содержащий холин хлорид - глюкозу и воду в мольном соотношении 2:1:1 оценивался по показателю рН, углу оптического вращения и токсичности. Почему не проведено изучение показателей вязкости, микробиологической чистоты и стабильности предлагаемого состава, которые, по моему мнению, являются критическими при использовании ГЭР в качестве экстрагента? На основании этого считаем, что предложенный проект спецификации показателей испытаний извлечения из модельной растительной композиции (с.86) не отражает в полной мере качество полученного полупродукта.

5. Экспериментальные материалы по валидации методики количественного определения суммы флавоноидов, в пересчете на рутин, извлекаемых 50 %-ым водным раствором ГЭР на основе холин хлорида, глюкозы и воды в мольном соотношении 2:1:1 целесообразно представить в главе 2 или в приложении.

6. С какой целью в работу включен патент на метод экстрагирования полифенольных соединений из змееголовника молдавского травы?

7. В виде какой лекарственной формы планируется использовать изучаемое в диссертации извлечение?

8. В тексте диссертации встречаются неудачные выражения, опечатки (с.106, 107 (название таблицы) и др.), однако их немного. В библиографическом списке приведены ссылки на учебные пособия и тезисы студенческих конференций (п. 4, 5, 14,17, 18).

Высказанные вопросы по работе и замечания не принципиальны и не снижают ценности диссертационной работы Прожогиной Юлии Эдуардовны

Рекомендации по использованию результатов и выводов диссертационного исследования.

Теоретические положения и экспериментальные подходы, сформулированные в диссертационном исследовании Прожогиной Юлии Эдуардовны, рекомендуется использовать в исследовательских лабораториях при разработке технологий извлечений с использованием ГЭР из лекарственного растительного сырья, содержащих БАВ, и в учебном процессе ВУЗов фармацевтического профиля.

Диссертанту следует продолжить исследования характеристик ГЭР, в частности реологических параметров, плотности, выполнить дисперсионный анализ, определить стабильность ГЭР в процессе хранения, а также осуществить поиск методов удаления экстрагента (ГЭР). Провести доклиническое изучение предлагаемого полупродукта с целью создания на его основе лекарственного средства.

Заключение

Диссертационная работа Прожогиной Юлии Эдуардовны «Глубокие эвтектические растворители как альтернативные экстрагенты биологически активных веществ из растительной композиции», представленная на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук, является законченным научным исследованием, имеющим существенное значение для развития фармацевтической науки и практики, в которой содержится решение важной научной задачи по изучению возможности экстракции БАВ из многокомпонентного растительного сырья с применением глубоких эвтектических растворителей в качестве экстрагентов.

По актуальности и важности темы, объему и глубине исследования, теоретической и практической значимости, обоснованности и достоверности результатов и выводов диссертационная работа Прожогиной Юлии Эдуардовны соответствует требованиям п. 9 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 г. № 842 (в редакции Постановлений Правительства Российской Федерации от 21.04.2016 г. № 335, от 02.08.2016 г. № 748, от 29.05.2017 г. № 650, от 28.08.2017 г. № 1024, от 01.10.2018 г. № 1168, от 26.05.2020 г. № 751, от 20.03.2021 г. № 426, от 11.09.2021 г. № 1539, от 26.09.2022 г. № 1690), предъявляемым к кандидатским диссертациям, а ее автор, Прожогина Юлия Эдуардовна, заслуживает присуждения ученой степени кандидата фармацевтических наук по научной специальности 3.4.1. Промышленная фармация и технология получения лекарств.

Отзыв обсужден и утвержден на заседании кафедры промышленной технологии лекарств с курсом биотехнологии ФГБОУ ВО «Пермская государственная фармацевтическая академия» Минздрава России (протокол № 6 от 10 июля 2023 г.).

Профессор кафедры промышленной технологии
лекарств с курсом биотехнологии
ФГБОУ ВО «Пермская государственная фармацевтическая
академия» Минздрава России,
доктор фармацевтических наук
(14.04.01 - технология получения лекарств),
профессор


Е.И. Молохова

ФГБОУ ВО ПГФА Минздрава России
614990, Российская Федерация, Пермский край
г. Пермь, ул. Полевая, д. 2.,
8(342) 2335501,

email: profmol17@gmail.com.

Дата: 15.08.2023

Подпись заверяю:

