

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

на диссертационную работу
Прожогиной 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 исследований

В настоящее время предпринимаются большие усилия по разработке новых растворителей для извлечения биологически активных веществ (БАВ) из лекарственного растительного сырья, которые бы соответствовали принципам «зеленой химии» и обладали бы низкой токсичностью, способностью к биodeградации, стабилизации извлекаемых БАВ, экологичностью и простым способом получения, не образующим отходы. Недавно был разработан новый класс устойчивых растворителей, известных как глубокие эвтектические растворители (ГЭР). ГЭР изучаются с 2011 года, и все большее число работ освещает их применение в нескольких областях: химии, фармации и медицине. Среди опубликованных исследований, особое внимание уделялось применению ГЭР для извлечения БАВ растительного происхождения, их физико-химическим свойствам.

Преимущество этих растворителей связано с химическими свойствами, такими как низкие температуры плавления, низкая летучесть, негорючесть, низкое давление пара, полярность, химическая и термическая стабильность, а также смешиваемость и растворимость. Кроме того, экономичность и низкое воздействие на окружающую среду ГЭР связаны с их низкой стоимостью и высокими выходами извлекаемых БАВ. Получение ГЭР посредством взаимодействия межмолекулярных водородных связей не требует химической реакции, следовательно, не образуются побочные соединения, что снижает потребность в дальнейших стадиях очистки, и обычно не образуются отходы. В связи с этим изучение возможности извлечения БАВ различной природы из множества вариантов лекарственного растительного сырья с применением ГЭР является важной областью научных исследований в фармации.

Основываясь на вышесказанном, можно сказать, что работа Прожогиной Юлии Эдуардовны, нацеленная на теоретическое обоснование и экспериментальное исследование возможности экстракции флавоноидов из

определенной модельной растительной композиции с применением ГЭР является актуальной.

Диссертационная работа выполнена в соответствии с планом научно-исследовательских работ ФГБНУ «ВИЛАР».

Цель исследований

Целью работы являлось теоретическое обоснование и экспериментальное исследование возможности экстракции БАВ из модельной растительной композиции с применением глубоких эвтектических растворителей.

Научная новизна исследования

Научная новизна исследования заключается в следующем:

1. В ходе работы установлен и обоснован оптимальный с точки зрения экстрагирующей способности состав глубокого эвтектического растворителя как потенциального экстрагента флавоноидов из модельной растительной композиции.
2. Впервые определен качественный состав БАВ, извлекаемых с помощью выбранного состава глубокого эвтектического растворителя, с использованием современных физико-химических методов: дифференциальной спектрофотометрии и ультраэффективной жидкостной хроматографии с тандемной масс-спектрометрией.
3. На примере многокомпонентной модельной растительной композиции был проведен сравнительный анализ извлекающей способности водного раствора этилового спирта и выбранного ГЭР.
4. Новизна исследования подтверждена двумя патентами на изобретения – способы экстракции БАВ из растительного сырья с применением в качестве экстрагентов глубоких эвтектических растворителей.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Диссертационная работа Прожогиной 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».

Теоретическая и практическая значимость работы

Теоретическая значимость работы состоит в обосновании возможности извлечения с помощью глубоких эвтектических растворителей БАВ группы флавоноидов из модельной растительной композиции, состоящей из 4 частей травы пустырника обыкновенного, 2.5 частей травы зверобоя продырявленного, 2.5 частей травы Melissa лекарственной, 1 части травы тимьяна ползучего. На основании представленных экспериментальных данных выбран оптимальный по критерию экстрагирующей способности состав ГЭР из 25 комбинаций. Показано влияние температуры экстракции и содержания воды в составе экстрагента на эффективность процесса экстракции с помощью ГЭР.

В ходе исследования получены 25 составов экспериментальных образцов ГЭР, описаны их преимущества и недостатки. Была разработана и утверждена технологическая инструкция на получение извлечения из модельной растительной композиции с помощью ГЭР на основе холина хлорида, глюкозы и воды, предложена технологическая схема процесса экстракции БАВ из модельной растительной композиции с применением в качестве экстрагента вышеуказанного состава ГЭР.

Материалы диссертационного исследования включены в учебный процесс факультета фундаментальной медицины МГУ им. М. В. Ломоносова (утвержден Акт о внедрении в учебный процесс № 092/23/110-03 от 01.03.2023 г.).

Рекомендации по использованию результатов для науки и практики

Изложенные в работе положения и экспериментальные данные являются существенным вкладом в науку, дополняют теоретические сведения о свойствах и характеристиках легкоплавких комбинированных смесей, создают основу для дальнейших исследований ГЭР как нового класса «зеленых растворителей», расширяют научные знания в данной области.

Материалы диссертационной работы Прожогой Юлии Эдуардовны на тему «Глубокие эвтектические растворители как альтернативные экстрагенты БАВ из растительной композиции» целесообразно применять в учебном процессе в фармацевтических ВУЗах.

Личный вклад автора

Диссертант принимал личное участие во всех экспериментальных исследованиях, анализировал полученные результаты, совместно с соавторами научных публикаций осуществлял написание статей, готовил доклады для научных конференций. Доля личного участия в общем объеме работ составляет не менее 90%.

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

Научные положения, выводы и рекомендации, изложенные в работе, подтверждены и обоснованы полученными в ходе работы экспериментальными данными, использованием современных методов исследования, аттестованных и поверенных приборов и оборудования.

Обоснованность и достоверность полученных результатов обеспечивается однородной и представительной выборкой результатов экспериментов, позволяющей судить о сходимости и воспроизводимости представленных данных.

Публикации

На основе данных диссертационного исследования опубликовано 9 научных работ, из них 6 статей – в изданиях, рекомендованных ВАК при Министерстве науки и высшего образования Российской Федерации. Основные положения и результаты работы доложены и обсуждены на научных конференциях международного и регионального уровней.

Общая характеристика диссертационной работы

Диссертационная работа Прожогиной Юлии Эдуардовны включает в себя 202 печатные страницы и подразделяется на введение, обзор литературы, описание материалов и методов исследования, четыре главы исследовательской работы, заключение, список литературы, приложения. Диссертационная работа иллюстрирована рисунками и таблицами.

Введение содержит сведения об актуальности и степени разработанности темы исследования, научной новизне, теоретической и практической значимости работы, методологии и методах исследования. Описанные сведения позволяют оценить целесообразность поставленных цели и задач, а также научную и практическую значимость результатов работы для современной фармацевтической науки и практики.

В первой главе «Обзор литературы» представлен анализ научной литературы, посвященной теме исследования. Освещены вопросы, связанные с процессом экстракции БАВ из растительного сырья, его стадии, строение и структура растительной клетки, растворение компонентов растительной клетки, а также факторы, влияющие на экстрагирование. Отдельно рассмотрены аспекты выбора растворителя (экстрагента). Показано, что альтернативой органическим растворителям являются ГЭР, которые сегодня являются экстрагентами будущего. Подробно рассмотрены физико-химические свойства, классификация ГЭР, теоретические сведения о химическом взаимодействии между молекулами донора и акцептора водорода компонентов ГЭР. Диссертант уделяет внимание истории изучения ГЭР, способам получения, токсикологическому профилю. На основании опубликованных сведений автор выделяет факторы, влияющие на извлечение флавоноидов из растительной матрицы с использованием ГЭР. Диссертант также описывает известные из литературных источников методы удаления экстрагента – ГЭР – после процесса экстракции.

Во второй главе представлены материалы исследования, включая объекты исследования, используемое оборудование. Приведено описание объектов исследования, в том числе состав четырехкомпонентной растительной композиции, состоящей из следующих видов лекарственного растительного сырья: *Herba leonuri* - травы пустырника (ФС.2.5.0034.15 «Пустырника трава»), *Hyperici herba* - травы зверобоя (ФС.2.5.0015.15 «Зверобоя трава»), *Melissae officinalis herba* – травы Melissa лекарственной (ФС.2.5.0084.18 «Мелиссы лекарственной трава»), *Thymi serpylli herba* – травы чабреца (ФС.2.5.0047.15 «Чабреца трава»). Указаны методы исследования, включая метод ионометрии, метод поляриметрии, метод спектрометрии в инфракрасной области, метод ультраэффективной жидкостной хроматографии с тандемной масс-спектрометрией. Подробно изложены методики количественного определения суммы флавоноидов, извлекаемых 70 %-ым этиловым спиртом в качестве экстрагента в пересчете на рутин в экспериментальной растительной композиции, а также количественного определения суммы флавоноидов, извлекаемых 50 %-ым водным раствором ГЭР на основе холина хлорида, глюкозы и воды в мольном соотношении 2:1:1 в качестве экстрагента в пересчете на рутин в экспериментальной растительной композиции. 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 третьей главе представлены результаты оптимизации процесса экстрагирования БАВ из модельной растительной композиции с применением водного раствора этанола. В качестве независимых факторов, влияющих на извлечение флавоноидов из модельной композиции, были выбраны температура экстракции, содержание экстрагента по отношению к исходному сырью, концентрация растворов этанола с применением ортогонального планирования второго порядка. Используя композиционный план эксперимента, автор получил уравнение, характеризующее процесс экстракции. Анализ найденной функции позволил установить оптимальные параметры экстрагирования: сырье, измельченное до 2-3 мм, экстрагент 70 % этанол, температура 60 °С, время 1 час, соотношение сырья и экстрагента 1:12.

Четвертая глава посвящена разработке состава и технологии получения глубоких эвтектических растворителей, а также извлечению флавоноидов из модельной смеси. Диссертант использовал для получения различных комбинаций ГЭР тепловой метод. В результате были получены 21 ГЭР и оценена их способность извлекать флавоноиды из модельной смеси. В качестве акцептора водорода использовали холина битартрат или бетаина гидрохлорид, в качестве донора – органические кислоты, спирты и сахара. Количественное определение БАВ – суммы флавоноидов в пересчете на рутин – осуществлялось методом дифференциальной спектрофотометрии. На основании экстрагирующей способности из приготовленных экспериментальных ГЭР был выбран ГЭР-20 на основе бетаина гидрохлорида и пропиленгликоля в мольном соотношении 1:3, с помощью которого удалось извлечь 89% флавоноидов относительно этанольного извлечения, полученного в тех же условиях. Так же было изучено влияние содержания воды и температуры на извлечение флавоноидов из модельной смеси ГЭР-20. Показано, что как увеличение массового содержания воды, так и повышение температуры снижает вязкость растворителя и может способствовать увеличению выхода флавоноидов в растворитель в определенном диапазоне. Поскольку для ряда ГЭР были использованы компоненты, небезопасные для человека, такие, как ПЭГ-400, пропиленгликоль, возникла необходимость изучить способы удаления растворителя-экстрагента. С этой целью применяли вакуумную сушку и жидко-жидкостную экстракцию с использованием органических растворителей. Оценку эффективности удаления экстрагента осуществляли методом ИК-спектрометрии. Диссертант пришел к выводу, что указанные приемы не эффективны для удаления ГЭР.

Дальнейший ход исследования привел диссертанта к идее поиска новых составов ГЭР, для чего в качестве акцептора водорода в составе ГЭР был выбран холина хлорид, в качестве доноров водорода использовали вещества различной химической структуры. В результате эксперимента было получено дополнительно 4 ГЭР различного состава, которые были испытаны аналогично первым 21 ГЭР. В ходе экспериментов был выявлен экстрагент со статистически достоверной наилучшей извлекающей способностью, для последующего изучения - ГЭР на основе холина хлорида, глюкозы и воды в мольном соотношении 2:1:1 (ГЭР-23).

В связи с тем, что ГЭР обладают высокой вязкостью и для ее снижения и увеличения смачивания компонентов растительной клетки жидкостью, а также скорости диффузии применяют их водные растворы. Диссертантом были получены водные растворы нескольких концентраций выбранного экстрагента – ГЭР-23. При изучении способности ГЭР-23 к извлечению БАВ из растительной композиции было установлено, что оптимальное содержание воды в составе экстрагента составляет 50 %.

Для определения оптимального температурного режима экстракции диссертантом была осуществлена серия экспериментов при температурах 50, 60, 70 и 80 °С с использованием 50 %-ого водного раствора ГЭР -23 в качестве экстрагента. Установлено, что оптимальная температура, позволяющая извлечь из сырья наибольшее количество флавоноидов с использованием 50 %-ого водного раствора ГЭР-23 составляет 60 °С.

Полученное после экстрагирования извлечение было изучено методом поляриметрии. Показано, что оптические свойства извлечения отличаются от показателей чистого экстрагента. Продемонстрировано также влияние процесса экстракции на значения водородного показателя полученных извлечений. В ходе дальнейших исследований были разработаны и представлены в тексте диссертации процессуальная и технологическая схемы получения ГЭР-извлечения из модельной растительной композиции, а также проект спецификации показателей качества ГЭР-извлечения из модельной растительной композиции. Технологическая инструкция по получению полупродукта – эвтектического извлечения – представлена в Приложении Б.

Так как автор указал на важность дальнейшего удаления экстрагента из извлечения, в конце главы приводятся рекомендации по методам удаления ГЭР и выделения БАВ.

В пятой главе приводится валидация методики количественного определения суммы флавоноидов, извлекаемых 50 %-ым водным раствором ГЭР на основе холина хлорида, глюкозы и воды в мольном соотношении 2:1:1 в качестве экстрагента, в пересчете на рутин в экспериментальной

растительной композиции методом дифференциальной спектрофотометрии. Диссертант положительно оценил методику по критериям:

- специфичность методики (совпадение максимумов поглощения при длине волны 410 ± 2 нм);
- линейность методики (коэффициент корреляции 0,9916);
- правильность (точность) методики (диапазон процента восстановления – от 97,07% до 102,21%);
- внутрилабораторная прецизионность методики:
 - сходимость методики (коэффициент вариации 1,704%);
 - воспроизводимость методики (коэффициент вариации внутрилабораторной воспроизводимости не превышает 10 %).

В шестой главе представлена сравнительная характеристика экстрагирующей способности 50 %-ого водного раствора ГЭР-23 на основе холина хлорида, глюкозы и воды в мольном соотношении 2:1:1 и 70 %-ого этилового спирта при оптимальных условиях методом спектрофотометрии, а также методом ультраэффективной жидкостной хроматографии с тандемной масс-спектрометрией. Сравнительный анализ экстрагирующей способности изучаемых экстрагентов для модельной растительной композиции показал, что при условиях, оптимальных для каждого процесса, эффективность экстракции БАВ с применением 70% этанола и 50% ГЭР-23 эквивалентна. С помощью метода УЭЖХ-МС/МС продемонстрирован обширный спектр полифенольных соединений в составе извлечений. Показано, что хроматографический профиль извлечений, полученных с применением в 50 % ГЭР-23 и 70 % этанола, очень близки, что указывает на сопоставимый качественный состав извлекаемых БАВ.

В заключении представлены общие выводы к работе, которые соответствуют цели и задачам исследования.

В приложениях представлены результаты макро- и микроскопического анализа растительной композиции, титульный лист технологической инструкции по получению эвтектического извлечения из растительной композиции для производства лекарственных препаратов, протокол исследования острой токсичности на мышах растительной композиции, полученной эвтектическим растворителем, УЭЖХ-хроматограммы, масс-спектры соединений, извлекаемых этанолом и эвтектическим растворителем, акт апробации и внедрения результатов исследования, зарегистрированные патенты.

Автореферат написан кратко и отражает смысл и основные результаты работы.

Достоинства и недостатки по содержанию, оформлению, общая оценка диссертации

Диссертационная работа Прожогиной Юлии Эдуардовны в целом заслуживает высокой оценки, характеризуется логичностью и последовательностью подачи материала. Работа изложена в научном стиле, текст хорошо структурирован и проиллюстрирован графиками и рисунками.

Вместе с тем, при изучении автореферата и рукописи диссертации возникли следующие вопросы и замечания:

1. Обоснуйте, с чем связан выбор используемой в работе растительной композиции в качестве объекта исследования? Почему диссертант не остановился на монокомпонентном сырье?
2. Почему в качестве отклика при математическом планировании эксперимента была выбрана сумма флавоноидов в пересчете на рутин?
3. Как было определено, что степень измельчения сырья 2-3 мм для модельной смеси была оптимальной?
4. В работе указано, что при получении ГЭР-извлечений на стадии фильтрования применяли фильтр бумажный обеззоленный. Достаточно ли обоснован подобный подход, учитывая высокую вязкость ГЭР?
5. Методика определения общей суммы флавоноидов, представленная в материалах и методах, включает этап спектрофотометрического измерения исследуемого раствора и раствора сравнения, в состав которого входит уксусная кислота. С какой целью ее вводили?
6. Для валидации методики количественного определения суммы флавоноидов в ГЭР-извлечении (ГЭР на основе холина хлорида, глюкозы и воды в мольном соотношении 2:1:1) в качестве стандартного образца применяли раствор рутина в 70% этаноле. Обычно при разработке новых методик растворяют СО в том же растворителе, что и исследуемый образец. С чем связан выбор растворителя для СО рутина?
7. Диссертант указывает на вязкость эвтектических растворителей как один из определяющих их свойства факторов. Изучалась ли вязкость выбранных для исследования ГЭР?
8. Диссертант указывает, что разбавление водой может привести к разрушению ГЭР на надмолекулярном уровне. Не является ли выбранное как оптимальное 50%-ое содержание воды в составе экстрагента (ГЭР на основе холина хлорида, глюкозы и воды в мольном соотношении 2:1:1) критичным с точки зрения целостности структуры ГЭР?

9. С чем связано различие в экстрагирующей способности 50 %-ого водного раствора ГЭР на основе холина хлорида, глюкозы и воды в соотношении 2 моль : 1 моль : 1 моль (ГЭР-23) и 70 %-ого этилового спирта?
10. При изучении влияния растворителя на выход флавоноидов в табл. 9 представлено, что 70% этанол извлекает 10.6% флавоноидов. Однако ранее на стр. 54 было показано, что в оптимальных условиях 70% этанол извлекал 13.3%. С чем связано снижение выхода флавоноидов из растительной композиции при экстракции одним и тем же растворителем?
11. Является ли изучение острой токсичности ГЭР-извлечения, представленное в приложении, основанием для утверждения, что исследован токсикологический профиль этого растворителя?

Заданные вопросы призваны уточнить представленные в работе результаты и не влияют на общую положительную оценку исследования.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ:

Учитывая все вышеизложенное, можно сделать заключение, что диссертационная работа Прожогиной Юлии Эдуардовны на тему: «Глубокие эвтектические растворители как альтернативные экстрагенты биологически активных веществ из растительной композиции» является законченным научным исследованием, имеющим существенное значение для развития фармацевтической науки и практики. В работе решена важная научная задача по исследованию свойств некоторых глубоких эвтектических растворителей, изучению их экстрагирующей способности и возможности выделения с их помощью БАВ из многокомпонентной модельной растительной композиции.

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.

ОФИЦИАЛЬНЫЙ ОППОНЕНТ

Облучинская Екатерина Дмитриевна,
кандидат фармацевтических наук
(14.04.01 - технология получения лекарств),
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
«Мурманский морской биологический институт» Российской академии наук,
руководитель научно-исследовательской группы
биохимии и технологии (гидробионтов)
водорослей и беспозвоночных
лаборатории зообентоса,
ведущий научный сотрудник



Е.Д. Облучинская

«19» августа 2023 г.

Почтовый адрес: 183038, Российская Федерация, Мурманская область, г. Мурманск, ул. Владимирская, д.17
Телефон: +79211591909
e-mail: okaterine@yandex.ru

*Подпись Облучинской Е.Д. заверено
статистом по персоналу*

Е.В. Кривоша

