

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертационную работу Павловой Ларисы Викторовной «Экстракционно-хроматографическое определение физиологически активных компонентов цветков «ромашки аптечной» и листьев «эвкалипта прутовидного»», представленную на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальности 02.00.02 – аналитическая химия

Актуальность темы исследования

Работа посвящена решению важнейшей проблемы – разработке эффективных и эффективных подходов к оценке качества лекарственных растений. Эта проблема связана с последней тенденцией в мировой практике – со стремлением отказаться от синтетических и перейти на природные биологически активные соединения (БАС), которые имеют более высокую биологическую активность, они не содержат примеси неизвестного действия и т.д. Но любые изменения такого плана должны сопровождаться развитием соответствующих методов контроля качества сырья и получаемой на его основе продукции. Особенность растительного сырья - широкая изменчивость свойств, спонтанная и целенаправленная гибридизация, которые в дополнение к зависимости биосинтеза БАС от условий произрастания ставят трудную задачу по идентификации компонентов даже не очень сложных смесей, включая индивидуальные лекарственные растения. В этом плане одна из важнейших задач при определении качества и установлении подлинности исследуемого образца – получение (или выработка) представительного образца и установление диапазона изменчивости его состава в природе. Это чрезвычайно трудная задача, и она может и должна решаться благодаря выполнению работ типа представленный к защите диссертации.

Общая характеристика диссертации

Диссертация состоит из Введения, четырех глав, Выводов, списка опубликованной автором литературы и списка цитируемой литературы. Работа очень объемная - изложена на 176 страницах машинописного текста и содержит 47 рисунков, 44 таблиц, библиографию из 171 наименования.

Глава 1. Обзор литературы. В главе приводится обоснование значимости техники «фингерпринт» для идентификации и оценки качества растительного лекарственного сырья. Отмечается, что известно использование двух подходов, первый из которых предполагает контроль материала по маркерам – веществам из списка биологически активных веществ данного растения. Другой подход - анализ хроматографических и спектроскопических «фингерпринтов» – сравнение, например, хроматографического

профиля образца с предварительно полученными представительными профилями. Получение таких представительных профилей – один из важнейших этапов стандартизации, включающих создание базы данных. Приводится информация о применимости данного подхода в ряде развитых стран мира и требований для его валидации. Показано, что контроль по сумме различных (даже не идентифицированных веществ) может быть чувствительным не только к подлинности материала, но и к его сохранности даже при наличии основных активных ингредиентов. На основании проведенного анализа автор предлагает использование «фингерпринтного» подхода с включением в обязательный перечень исследований определение хотя бы одного вещества-маркера.

Далее анализируются методы получения хроматографических и спектроскопических профилей, среди которых ключевая роль отводится различным видам хроматографии: ТСХ, ВЭЖХ, в наиболее часто используемом обращенно-фазовом варианте, ГХ, и гибридные методы, использующие, например, аналитические возможности разнообразных вариантов детектирования. Приведены и систематизированы литературные данные по применению указанных методов. При этом подчеркивается принципиальная важность правильного выбора способа пробоподготовки, предназначенного для получения представительных образцов, либо набора нескольких типов фингерпринтов для одного и того же материала при различных способах пробоподготовки.

Далее автор анализирует методы оценки (или сопоставления) хроматографических профилей, включающих ряд методов распознавания образов, таких как метод главных компонент, факторный анализ и т.д. Отмечается, прежде всего, значимость правильного выбора пробоподготовки по ряду причин, среди которых неполнота экстракции целевых соединений, возможность их частичного разложения, извлечение сопутствующих веществ. Подчеркивается, что при различной пробоподготовке могут потребоваться различные методы получения «фингерпринтов».

В качестве первого способа пробоподготовки рассматриваются методы получения летучих органических соединений с последующей ГХ записью хроматографического профиля. В данном случае отмечается подобие качественных составов для растений, выращенных в различных регионах мира, при возможном заметном различии в их количественном соотношении. Далее приводится анализ методов гидродистилляции, двойной экстракции, экстракции парами органических растворителей, и методом парофазного анализа. Рассматриваются достоинства и возможные недостатки методов, и выбор автора останавливается на последнем методе. В парофазном анализе исследователь

меньше всего вмешивается в процесс, отбирая для анализа, то, что создано природой, при этом отпадает необходимость контроля целого ряда параметров. Но для увеличения чувствительности метод требует использование предварительного концентрирования. В качестве методов концентрирования автор анализирует твердофазную экстракцию (ТФЭ) и твердофазную микроэкстракцию (ТФМЭ) на кварцевых волокнах, покрытых жидкой фазой. Делая акцент на втором методе, и основываясь на литературных данных, автор приходит к выводу о том, что наиболее эффективным методом МТФЭ является использование нескольких типов волокон различной полярности. Капиллярные микроловушки с активным сорбционным слоем на внутренней поверхности капилляра рассматриваются автором как развитие техники ТФМЭ. Сорбция компонентов из 2-20 см³ газовой смеси на таких капиллярах после термодесорбции и криофокусирования позволяет снизить порог определения веществ до 0.2 ppb. Наконец, рассматривается еще одна техника – ТФЭ на сорбционные трубки в двух вариантах применения – в стационарном и в динамическом, - при использовании современных высокоэффективных синтетических сорбентов.

Пробоподготовка для определения нелетучих биологически активных соединений (БАС) наиболее часто предполагает использование экстракционных методов, в которых важными показателями являются степень извлечения, сохранность биологической функции при экстракции. В работе критически рассматриваются традиционные приемы: мацерация, ремацерация, перколяция. Рассматриваются также новые методы: экстракция в электромагнитном поле сверхвысокой частоты (обеспечивает объемный нагрев материала и более высокий выход целевых соединений); электроимпульсный способ экстракции (т.е. экстракция, ускоряемая микровзрывом); центробежная; ускоряемая ультразвуком. И наконец, основной акцент сделан на двух современных методах: на экстракции сверхкритическими флюидами и, с подробным анализом известных литературных данных, - на экстракции водой в субкритическом состоянии. Последний метод интересен тем, что в субкритических условиях вода приобретает свойства органических растворителей, что особенно важно для эффективных «зеленых» технологий экстракции. Данная глава заканчивается обстоятельным обзором известных данных по химическому составу летучих органических и нелетучих соединений эвкалипта прутовидного и ромашки аптечной - по видовому и количественному составам.

В целом этот раздел насыщен информативно, лаконичен, снабжен выводами.

Глава 2 посвящена описанию экспериментальных способов, использованных диссертантом. Представлены: объекты исследования (различного происхождения); план исследований; пробоподготовка при выполнении ПФА, включающая способ

приготовления концентрационных трубок; пробоподготовка для проведения ТФМЭ; способы экстракции, использованные в работе. Набор использованного в работе оборудования основателен, и включает газовый хроматограф с масс-селективным детектором (Agilent) и с библиотекой спектров Wiley8 и NIST8, хроматограф высокоэффективный жидкостной со спектрофотометрическим детектором (Biotronik), аналитическая сверхвысокоэффективная жидкостная хроматография с масс-спектрометрическим детектированием (Agilent), ИК-Фурье спектроскопия. Для нелетучих БАС применялась техника дериватизации. Для экстракции при повышенных температурах и давлении использовали собственную установку.

Глава 3 посвящена определению физиологически активных компонентов цветков «ромашки аптечной» и листьев «эвкалипта прутовидного». Вначале на примере растительного продукта «ромашка аптечная» производства Красногорсклексредства были оптимизированы способы ПФА и ТФМЭ, и методом газовой хроматографии с масс-селективным детектором определены основные компоненты, которые составили основу образа. Все основные компоненты были охарактеризованы индексами удерживания. На примере *n*-гептана оценены случайные и систематические составляющие погрешности определения индексов удерживания. Далее образ был уточнен анализом аналогичных препаратов других производителей по оценке соотношения площадей пиков на хроматограммах. Анализируя полученные данные, автор приходит к выводу о том, что нет единого соотношения между компонентами хроматографического профиля при ПФА продукции различных производителей. Аналогично был выполнен анализ ЛОС «эвкалипта прутовидного»: удалось идентифицировать 76 компонентов. Отметим, что данные, полученные автором по индексам удерживания ЛОС двух ЛР, представляют особую ценность, т.к. могут помочь другим исследователям в идентификации соединений без использования труднодоступного (дорогостоящего) оборудования. Поскольку индексы удерживания зависят от температурных режимов, использованных при их получении, существенно то, что в работе приведены результаты для двух различных режимов температурных градиентов в сравнении с литературными данными. Наконец, в работе использован также прием контроля изменения удерживания при смене полярности стационарной фазы, что позволило точнее выполнить идентификацию в ряде не инвариантных данных. При этом показана большая эффективность метода ТФМЭ по сравнению с ПФА. Но, тем не менее, на основании метода главных компонент был получен вывод о том, что хроматографический профиль, полученный методом ПФА применим в качестве воспроизводимого параметра - общего образа листьев.

Принципиально важной является та часть работы, при которой автор создает «образцы состава» ЛОС обоих ЛР. Строго говоря, этот термин не точен, и лучше было бы назвать – создание сорбированных образцов представительных составов ЛОС. Представительность образцов определялась использованием при сорбции объемов газовых смесей меньших по сравнению с объемами начала проскока наиболее слабо удерживаемых компонентов. Такой подход позволил определить наиболее эффективные сорбенты: MN-202 и Рогорак Q для «эвкалипта прутовидного», тогда как для «ромашки аптечной» наиболее эффективны Carborack B и MN-202, но по мере сорбции из газовой фазы проходимость сорбционного слоя сильно снижается, что автор объясняет полимеризацией непредельных соединений этого РС. Отметим, что все экспериментальные результаты получены с использованием статистической обработки достаточного количества результатов параллельных наблюдений (включая множество реальных хроматограмм, позволяющих оценить высокое качество хроматографического анализа), что свидетельствует об их надежности.

Поскольку разрабатываемые в работе нанотрубки (точнее состав сорбатов на них) предназначены для последующего использования в качестве СО, то, очень важна информация о сохранности и неизменности этого состава, приведенная в работе. В этом плане удивительна (и убедительна) сохранность показателей для «ромашки аптечной» для которой при повышенных концентрациях наблюдался эффект непроходимости вследствие полимеризации (по мнению автора).

Глава 4 посвящена определению физиологически активных компонентов жидких экстрактов исследуемых в работе лекарственных растений. Вначале описывается внешний вид экстрактов, полученных различными способами. Затем контролировали сухой остаток, при этом было установлено, что экстракция субкритической водой позволяет повысить степень извлечения сухих веществ до уровня более 50%, что было характерно для экстрактов «листьев эвкалипта» в 70%-ном этиловом спирте. То же самое было найдено и при экстракции ромашки аптечной, но при существенно меньшем выходе сухих веществ. При этом экстракция субкритической водой позволяет извлечь больше «сухих» веществ по сравнению с традиционным методом. Установлено, что в динамическом режиме наблюдается два максимума по концентрации извлеченных веществ при различном объеме пропущенного экстрагента, Проведенные исследования позволили определить соотношение «растительный материал – экстрагент» и наиболее эффективный вариант экстракции для дальнейших исследований. Далее приведены характерные УФ- и ИК- спектры экстрактов, широко используемые в фармацевтическом анализе, хотя их

значение при использовании современных хроматографических методов, мягко говоря, условно.

Затем приводятся данные по ВЭЖХ анализу экстрактов. Приведены хроматограммы экстрактов листьев эвкалипта прутовидного, записанные в условиях оптимизированного градиентного режима, но их качество не очень высокое. Это связано с непростой постановкой задачи автором – одновременного скрининга гидрофильных и липофильных соединений. Это, разумеется, будет требовать очень большого времени, поскольку целевые вещества – компоненты так называемого эвкалимина относятся к достаточно высоко липофильным. При этом определение в таком градиентном режиме эвкалиминов, начиная с сильногидрофильных условий, не может быть выполнено с высокой эффективностью, т.к. в начальных условиях эти вещества очень мало растворимы – форма пиков неизбежно будет носить нерегулярную структуру, в том числе и из-за выноса аналитов. Но, тем не менее, предложенный метод был успешно использован в ходе исследования процессов экстракции в динамическом режиме. При ВЭЖХ с масс-спектрометрическим детектированием использованы условия, позволившие получить более качественные хроматограммы и идентифицировать 23 компонента, включая некоторые типы эуглобалей. Отметим, что разделение соединений внутри данных типов весьма непростое и по литературным данным может быть достигнуто только при циклической ВЭЖХ. Для уточнения состава нелетучих соединений автор использовал метод дериватизации с последующим ГЖХ-МС анализом триметилсилильных производных, что позволило определить ряд соединений, детектирование которых спектрофотометрическим методом проблематично. Выполненный анализ позволил выявить не только новые компоненты в экстрактах, но и сопоставить экстракты, полученные при различных условиях (особенно при экстракции субкритической водой) и выявить наиболее эффективные способы проведения этого процесса, в том числе и для селективного извлечения определенных фракций и компонентов. В итоге разработан весьма нетривиальный метод получения общего образа экстракта листьев эвкалипта прутовидного в виде ГХ-МС хроматографического профиля по экстракции этанол-водным раствором в определенных условиях. Аналогичная работа проведена по экстракту другого ЛР: цветков ромашки аптечной. Экспериментально доказано, что экстракция физиологически активных соединений более эффективна при повышенных давлениях и температуре. Экспериментально определен способ получения достоверного образа объекта при динамической экстракции. Затем приведены результаты работы по ВЭЖХ анализу экстрактов цветков «ромашки аптечной». В данном случае приведенные хроматограммы имеют нормальный вид даже при желании автора охватить широкий

спектр компонентов экстракта по липофильности. Удивительно только то, что в экстрактах не обнаруживались рутин и кверцетин, что является некоторой особенностью использованных в работе образцов. Впрочем, традиционно (по литературным данным) в этом объекте определяют в первую очередь именно апигенин и его гликозид, хотя по другим данным в экстрактах 7-гликозид апигенина ацилирован уксусной кислотой и присутствует в виде нескольких изомеров (по положению ацилирования). Это может отражать разнообразие флавоноидного комплекса ромашки аптечной, выращенной в различных частях мира. В итоге исследования получен представительный экстракт и сделан вывод об эффективности метода ВЭЖХ для определения видовой принадлежности ЛР.

Приведенные многочисленные экспериментальные данные в таблицах и в рисунках свидетельствуют об обстоятельности проведенного исследования и обоснованности выводов.

Замечания по диссертационной работе:

1. Неудачные выражения:

- По всему тексту: вместо слова «цветов» следует использовать слово «цветки». Зачем-то использовано слово «фингерпринт» вместо привычного выражения «отпечатков пальцев».
- Также почему-то вводится термин концентрационных трубок – вместо казалось бы более верно названных - концентрирующих трубок.
- Стр.5 второй абзац в «Научной новизне»: «Впервые разработаны образцы состава терпеноидных и ароматических в виде сорбционных микротрубок....» (образцы составов в сорбированном виде на микротрубоках).
- Стр.142. Второе предложение второго абзаца: «Повышение температуры экстракции незначительно влияет на качественный состав, но модификация воды 50 и 70% этанола увеличивает число извлекаемых соединений.». Что значит «модификация воды»??? достаточно было бы сказать, что *при добавлении к воде....*

2. Погрешность определения индекса удерживания, определенная по отношению к н-гептану (стр.69), включающая случайную и систематическую составляющие (стр.69), связана, скорее всего, с нелинейностью в основных координатах (которые почему-то не указаны в работе) и не обязательно должна выполняться для всех веществ – для них она может быть ниже (примерно вдвое, но точно сказать трудно, поскольку не указан график и не определена кривизна участков градуировочной кривой), если шкала строилась по удерживанию всех n-алканов.

3. Не совсем логично применение автором метода главных компонент при составлении генерального образа. Основным итогом сопоставления хроматографических профилей должен быть выбор инвариантов, которые могут быть применены в качестве генерального профиля. В худшем случае такие инварианты могут иметь большие допустимые диапазоны по содержанию индивидуальных ЛОС, что не страшно, поскольку отражает реальную ситуацию. Более того, между отдельными веществами из использованного набора ЛОС может и не быть никакой корреляции. В этом отношении применение метода главных компонент контрпродуктивно, поскольку его методология предполагает поиск наиболее невоспроизводимых компонент из множества, приведенных в соответствующих таблицах (например, в таблице 25). Впрочем, для классификации отдельных строк (т.е. методов или сорбентов) матрицы, как это было применено автором, метод убедительно пригоден. Однако в любом случае необходимо знать «структуру» каждой из главных компонент (т.е. коэффициенты столбцов исходной матрицы, оптимизированной при понижении порядка), - тогда график нагрузок будет понятен. Впрочем, подробный анализ в таком случае требует больше исходных данных и может стать темой отдельной диссертации даже для одного образца ЛР. Наконец, в экспериментальной части приводится алгоритм расчета метрологических показателей, использованный в работе, это правильно, хотя этот алгоритм хорошо известен. А вот метод главных компонент, используемый крайне редко, никак не освещен в этой части. Поэтому, например, графики нагрузок (рис.22, и др.) появляются достаточно неожиданно и приведенный в работе анализ таких данных трудно оценить.

4. На стр.104 при обсуждении рис.22 используется аббревиатура, введенная не в тексте, а в подписи к рис.21. И как понимать то, что «График нагрузок (рис.22) показывает, что на группировку данных МЗ, М5 и ПФА большое влияние...» поскольку в подписи к рис.22 указывается использование только ТФМЭ?

5. Стр.116. Пределы интегрирования на рис.31 и рис.32 в лучшем случае нереальны – достаточно вспомнить, что в подобных случаях существенно точнее использовать режим «наездник», хотя лучше – вообще отказаться от интегрирования.

6. При обширной информации о пробоподготовке перед исследованием образцов ни в главе 2, ни в тексте нет ни слова о пробоподготовке – в каком виде вводили экстракты в хроматограф? При неправильном выборе растворителя пробы можно получить ложные пики (в качестве основных) на хроматограмме.

7. На стр.115 и далее приведены хроматограммы (рис.30 – рис.35) с нумерацией пиков, причем в легенде не указано, что эта нумерация обозначает и где имеется ее расшифровка.

Заключение

Сделанные замечания не снижают в целом высокую оценку содержательной части работы, насыщенной (или даже перенасыщенной) экспериментальными данными и представляющей собой актуальное исследование. Работа написана на хорошем научном языке, легко читается

Соответствие содержания диссертации указанной специальности

Диссертация Л.В. Павловой «Экстракционно-хроматографическое определение физиологически активных компонентов цветков «ромашки аптечной» и листьев «эвкалипта прутовидного»», соответствует заявленной специальности 02.00.02 – аналитическая химия.

Соответствие содержания автореферата содержанию диссертации

Автореферат Л.В. Павловой соответствует тексту диссертационной работы на тему «Экстракционно-хроматографическое определение физиологически активных компонентов цветков «ромашки аптечной» и листьев «эвкалипта прутовидного»».

Заключение о соответствии работы требованиям ВАК

Диссертационная работа Л.В. Павловой «Экстракционно-хроматографическое определение физиологически активных компонентов цветков «ромашки аптечной» и листьев «эвкалипта прутовидного»», полностью отвечает п.9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней» (утв. Постановлением Правительства Российской Федерации № 842 от 24 сентября 2013 г.), предъявляемым к диссертациям, представленным на соискание ученой степени кандидата химических наук, а ее автор, несомненно, заслуживает присуждения искомой степени по специальности 02.00.02 – аналитическая химия.

Официальный оппонент

Доктор химических наук, профессор,

профессор кафедры общей химии

ФГАОУ ВПО «Белгородский

государственный национальный

исследовательский университет»

Почтовый адрес:

308015, г. Белгород, ул. Победы, 85

E-mail: deineka@bsu.edu.ru

Тел.: (4722) 30-11-50

