

ОТЗЫВ

официального оппонента, кандидата фармацевтических наук, доцента кафедры фармакогнозии с курсом ботаники ГБОУ ВПО «Пермская государственная фармацевтическая академия» Минздрава России Галишевой Елены Евгеньевны на диссертационную работу Харлампович Татьяны Анатольевны «Фитохимическое изучение и стандартизация донника лекарственного травы, произрастающего на территории Алтайского края», представленную в диссертационный совет Д 208.068.01 при ГБОУ ВПО «Пермская государственная фармацевтическая академия Министерства здравоохранения РФ» на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук по специальности 14.04.02 – фармацевтическая химия, фармакогнозия

Актуальность проблемы. Диссертационная работа посвящена одной из актуальных проблем современной фармации – рациональному использованию лекарственного растительного сырья и созданию на его основе эффективных лекарственных средств. Донник лекарственный – широко распространенное по всему земному шару, в том числе и в нашей стране и часто встречающееся растение, представитель Бобовых – одного из крупных семейств мировой флоры и представляет большой интерес для науки. Обладает антикоагулянтным, мягким успокаивающим, кардиотоническим действием и способствует восстановлению эндотелия кровеносных сосудов. Несмотря на доступность лекарственного сырья и наличие ценных фармакологических свойств, на сегодняшний день на отечественном аптечном рынке отсутствуют лекарственные препараты на основе донника лекарственного травы. На данный момент недостаточно изучен фитохимический состав биологически активных соединений растительного сырья, имеющиеся сведения по количественному содержанию индивидуальных соединений требуют уточнения. Существует необходимость в оптимизации аналитических методов контроля и совершенствовании требований к качеству растительного сырья. Донник лекарственный не включен в отечественную фармакопею, в действующей нормативной документации – ГОСТ 14101-69 «Трава донника лекарственного» имеющиеся сведения недостаточны для полной диагностики сырья и не соответствуют современным требованиям, предъявляемым к нормативным документам. В связи с этим актуальность работы не вызывает сомнения.

Диссертационная работа выполнена в соответствии с планом научно-исследовательских работ ГБОУ ВПО «Алтайский государственный медицинский университет» Минздрава России (номер государственной регистрации 01200600351) как фрагмент комплексной НИР фармацевтического

факультета «Изучение природных ресурсов Алтая, пути их рационального использования и совершенствование лекарственного обеспечения населения».

Научная новизна работы. Соискателем впервые с использованием современных методов анализа (ТСХ, ВЭЖХ, ГЖХ) проведено комплексное фитохимическое исследование донника лекарственного травы, произрастающего на территории Алтайского края. Выделены и идентифицированы индивидуальные соединения: кумарин, *o*-кумаровая кислота, мелилотовая кислота, галловая кислота, мирицетин, кемпферол, кверцетин, изорамнетин, формонетин, биоханин А, витамин Е, лютеин, β -каротин, β -ситостерин, фруктоза, галактоза, арабиноза, глюкоза, рамноза, аспарагиновая кислота, глютамин, треонин, валин, аргинин, изолейцин, лейцин, линолевая, линоленовая, пальмитиновая кислоты. Обоснована целесообразность стандартизации донника лекарственного травы по содержанию суммы кумаринов методом ВЭЖХ, разработана и валидирована методика количественного определения.

В промышленных условиях получен и изучен донника лекарственного травы экстракт сухой, субстанция-порошок.

Проведен сравнительный анализ морфолого-анатомического строения травы, отмечены специфические признаки. Впервые получены результаты, доказывающие практическую безвредность донника лекарственного травы настоя и экстракта сухого, а также данные, свидетельствующие о том, что экстракт сухой может быть предложен для дальнейшего изучения как антикоагулянт непрямого действия. Установлены числовые показатели растительного сырья и экстракта сухого, установлены оптимальные сроки заготовки сырья, срок годности растительного сырья и экстракта сухого.

Степень обоснованности и достоверности научных положений, выводов и заключений, сформулированных в диссертационной работе. Обоснованность научных положений, выводов и заключений не вызывает сомнений, т.к. базируется на исследованиях, выполненных с помощью современных методов физико-химического анализа: спектрофотометрии, высокоэффективной тонкослойной хроматографии, высокоэффективной жидкостной хроматографии, газовой хроматографии с использованием большого набора стандартных образцов с последующей статистической обработкой полученных данных. Выводы по результатам исследования соответствуют поставленным задачам и логично вытекают из представленных экспериментальных данных.

Теоретическая и практическая значимость работы. Автором проведен комплексный фитохимический анализ донника лекарственного травы с

использованием современных методов анализа, подробно изучены основные группы биологически активных соединений, идентифицированы различные соединения первичного и вторичного обмена, проведен количественный анализ. Это очень важно для решения вопросов стандартизации растительного сырья и препаратов на его основе, а также для химии и таксономии исследуемого вида. Подготовлены к рассмотрению проекты ФСП «Донника лекарственного трава *Melilotus officinalis* цельная и измельченная «ангро», «Донника лекарственного травы экстракт сухой, субстанция-порошок». На основании проведенных исследований разработаны методики микроскопического анализа растительного сырья, ТСХ, СФМ, ВЭЖХ-методики качественного анализа органических соединений, внедренные в учебный процесс ГБОУ ВПО АГМУ Минздрава России, в производственный процесс фармацевтического предприятия ЗАО «Эвалар», (Акты внедрения).

Материалы диссертации достаточно апробированы на научно-практических конференциях различных уровней.

По материалам диссертации опубликовано 10 научных работ, 3 из которых в изданиях Перечня ВАК РФ.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности.

Диссертационная работа Харлампович Татьяны Анатольевны оформлена со всеми необходимыми стандартными разделами и фрагментами, соответствующими требованиям Комитета по надзору и аттестации в сфере образования и науки РФ, соответствует паспорту специальности 14.04.02 – фармацевтическая химия, фармакогнозия.

Объем и структура диссертации. Диссертационная работа Харлампович Татьяны Анатольевны изложена на 197 страницах машинописного текста, имеет традиционную структуру и состоит из введения, обзора литературы (1 глава), экспериментальной части (4 глав), общих выводов, списка литературы и приложения, иллюстрирована 53 рисунками и 38 таблицами. Список литературы включает 127 источников, из них 36 на иностранных языках.

Во введении обоснована актуальность выбранной темы, определены цели и задачи исследования, показана научная новизна и практическая значимость работы. В обзоре литературы приведено подробное морфологическое описание донника лекарственного, а также сравнительная морфологическая характеристика и практическая значимость других видов донника, произрастающих на территории Алтайского края. Автором приводятся данные о распространении и особенностях биологии вида, о введении в культуру и изучении его продуктивности, характеризуется химический состав донника

лекарственного, приводятся сведения о применении донника лекарственного травы в медицине и народном хозяйстве.

Во второй главе описаны материалы и методики исследования

В третьей главе приведены материалы по фитохимическому изучению донника лекарственного травы и экстракта сухого. В результате проведенного качественного анализа биологически активных соединений было доказано наличие в траве донника лекарственного и экстракте сухом кумаринов, флавоноидов группы флавона и флавонола, дубильных веществ, сапонинов, полисахаридов, аминокислот. Для изучения структуры, идентификации, и количественного определения БАС применяли хроматографические методы (ТСХ, ВЭЖХ) и дифференциальную спектрофотометрию. В результате исследований идентифицированы флавоноидные агликаны: мирицетин, кверцетин, кемпферол, изорамнетин, формонетин, биоханин А. Установлено, что флавоноиды содержатся в растительном сырье преимущественно в виде гликозидов кемпферола и кверцетина, установлена структура доминирующих флавоноидов: кемпферол-3-гликозид-7-биозид и кемпферол-3-биозид. Впервые в траве донника лекарственного обнаружены изофлавоноиды: формонетин и биоханин А. Содержание суммы флавоноидов в пересчете на рутин определенное методом дифференциальной спектрофотометрии в растительном сырье составило от 1,1 % до 1,9 %. Из кумаринов и их метаболитов идентифицированы кумарин, гликозид кумарина, о-кумаровая кислота, мелилотовая кислота. Общее содержание кумарина, определенное методом ВЭЖХ по разработанной автором методике составляет 0,84 % до 1,48 %. Сапонины донника лекарственного по результатам исследований были отнесены к группе тритерпеновых. Изучение качественного состава сапонинов проводили методом тонкослойной хроматографии, количественное содержание тритерпеновых сапонинов в пересчете на эсцин определяли спектрофотометрическим методом, их содержание составило от 0,3 % до 0,5 %. Проведен качественный анализ дубильных веществ и спектрофотометрическим методом определено их количественное содержание, а также содержание суммы фенольных соединений в пересчете на галловую кислоту. Приведены результаты исследований химического состава веществ первичного обмена. В составе водорастворимых полисахаридов и протопектина идентифицировано 5 моносахаридов – глюкоза, галактоза, фруктоза, арабиноза, рамноза и установлено их количественное содержание. Методом ТСХ идентифицировано 6 свободных аминокислот – треонин, валин, изолейцин, лейцин, глутамин, аргинин и методом ВЭЖХ определено их количественное содержание. Хроматографическими методами обнаружены эфиры стероидов, гликостерины, гликолипиды, аминокислоты, β -каротин, зеаксантин, лютеин, β -

ситостерин. Методом ГЖХ в липофильной фракции идентифицировано десять жирных кислот: каприловая, каприновая, лауриновая, миристиновая, пальмитиновая, стеариновая, олеиновая, α -линолевая, линоленовая, гондоиновая. Определено количественное содержание пигментных веществ в траве донника лекарственного – хлорофиллов, ксантофилов, каротиноидов. Идентифицированы δ -токоферол, γ -токоферол, α -токоферол. Определено количественное содержание α -токоферола. Определено содержание основных групп БАС в траве донника лекарственного экстракте сухом. Сделан подробный анализ полученных результатов, которые, несомненно, интересны и полезны в хемотаксономическом аспекте.

В четвертой главе приведены результаты изучения острой токсичности донника лекарственного травы и экстракта сухого. В результате проведенных экспериментов была доказана практическая безвредность настоя травы и экстракта сухого. Результаты исследования влияния на гемостаз свидетельствуют о том, что донника лекарственного травы экстракт сухой может быть предложен для дальнейшего изучения как антикоагулянт непрямого действия.

Пятая глава посвящена материалам по стандартизации донника лекарственного травы и экстракта сухого. Для установления подлинности были определены морфолого-диагностические признаки для цельного и измельченного растительного сырья, представляющего собой облиственные цветущие верхушки и веточки растений. В ходе микроскопического анализа был установлен ряд анатомических признаков, характеризующих строение листьев, стеблей и цветков. Для листьев отмечены характерные особенности строения клеток верхней и нижней эпидермы, наличие трихом и включений, определен тип устьичного аппарата. Подробно описано анатомическое строение стебля и частей цветка. Описание диагностических признаков иллюстрировано качественными микрофотографиями, в результате работа имеет большое практическое значение при установлении подлинности, особенно измельченного сырья. Товароведческий анализ проведен по методике ГФ XI издания. Определены некоторые числовые показатели донника лекарственного травы. Определены сроки заготовки и срок годности растительного сырья и экстракта сухого.

В приложении к диссертации представлены результаты изучения сроков годности сырья и экстракта сухого, проекты ФСП, основные документы, подтверждающие внедрение результатов диссертационной работы.

Диссертационная работа Харлампович Татьяны Анатольевны выполнена на современном научно-методическом уровне с использованием различных

методов исследования, адекватных поставленным задачам, таких как ТСХ, ГЖХ, ВЭЖХ, спектрофотометрия в видимом и УФ-диапазоне.

Автореферат и опубликованные работы полностью отражают ее содержание.

Диссертационная работа аккуратно оформлена в соответствии с требованиями ВАК РФ, написана четким и убедительным языком, хорошо иллюстрирована.

Замечания по оформлению и содержанию работы. Однако, необходимо отметить, что по изложенным в диссертации материалам имеются некоторые замечания.

В работе имеются отдельные неудачные выражения, опечатки (стр.9,10,20,112,118), при этом они не несут принципиального характера.

Ареал распространения донника лекарственного, показанный на рисунке 2 не соответствует данному в описании (в частности, северная граница ареала).

Морфологическое описание видов донника выполнено автором в соответствии с данными Суворова В.В., 1962г. В литературных ссылках и списке литературы отсутствуют такие труды, как Флора европейской части СССР. – Л.: Наука, 1974-1989; Флора Сибири. В 14т. – Новосибирск: Наука, 1987-2003; Флора СССР. – М., Л.: Изд. АН СССР, 1934-1960. – Т. 1-30; Флора северо-востока европейской части СССР. – Л.: Наука, 1974-1977.- Т. 1-4. В таблице 1 приведены не «видовые отличия» а сравнительная морфологическая характеристика четырех видов донника.

Какова сырьевая база донника лекарственного травы в Российской Федерации? В работе приводятся лишь сведения о семенной продуктивности растения (1962 г.).

В таблице 32 «Результаты количественного определения БАС донника лекарственного травы и экстракта сухого» отражено количественное содержание флавоноидов, кумарина и сапонинов в донника лекарственного траве и экстракте сухом. Однако, из данных таблицы не видно, что «травя и экстракт сухой содержат комплекс БАС, идентичный по качественному составу». Не ясно, что означают прочерки в таблице – количество ниже предела обнаружения, следовые количества или отсутствие в экстракте указанной группы веществ.

Имеющиеся отдельные опечатки и стилистические неточности, не снижают общей положительной оценки результатов диссертационного исследования.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Диссертационная работа Харлампович Татьяны Анатольевны на тему: «Фитохимическое изучение и стандартизация донника лекарственного травы,

произрастающего на территории Алтайского края», представленная на соискание учёной степени кандидата фармацевтических наук, является самостоятельной законченной научно-квалификационной работой по актуальной теме, результаты которой имеют существенное значение для современной фармации.

В исследовании Харлампович Т.А. решена важная современная задача – комплексное изучение биологически активных веществ, разработка воспроизводимых методов стандартизации лекарственного растительного сырья нового вида, а также обоснование необходимости его использования в медицине и фармации.

По актуальности, научной новизне, теоретической и практической значимости, достоверности полученных результатов и обоснованности выводов диссертационная работа Харлампович Татьяны Анатольевны соответствует требованиям п. 9 «Положения о порядке присуждения учёных степеней», утверждённого постановлением Правительства РФ № 842 от 24.09.2013 г., предъявляемым к кандидатским диссертациям, а ее автор – Харлампович Татьяна Анатольевна – заслуживает присуждения учёной степени кандидата фармацевтических наук по специальности 14.04.02 - фармацевтическая химия, фармакогнозия.

Оппонент:

Кандидат фармацевтических наук,
доцент кафедры фармакогнозии с
курсом ботаники ГБОУ ВПО
«Пермская государственная
фармацевтическая академия»
Министерства здравоохранения
Российской Федерации

Галишевская Елена
Евгеньевна

государственное бюджетное образовательное учреждение высшего
профессионального образования «Пермская государственная фармацевтическая
академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации
614990, г. Пермь, ул. Полевая, 2
телефон: 2335501
электронная почта: perm@pfa.ru

«10» ноября 2014 г.

Подпись
заверило: Галишевская Е.Е.
(нач. отдела кадров)



Смирнов Е.Е. Галишевская Е.Е.