

ВІДГУК

офіційного опонента на дисертаційну роботу Соколової Ольги Олександрівни на тему «Фармакогностичне вивчення сировини соняшника однорічного (*Helianthus annuus* L.) та розробка лікарських рослинних засобів на її основі», представлену на офіційний захист до спеціалізованої Вченої ради Д 64.605.01 при Національному фармацевтичному університету на здобуття наукового ступеня кандидата фармацевтичних наук зі спеціальності 15.00.02 – фармацевтична хімія та фармакогнозія

Актуальність теми

Раціональне використання рослинної сировини, яка є цінною агрокультурою та має широку сировинну базу, при цьому виявляє певну фармакологічну активність, є важливим завданням сучасної фармації та медицини. Соняшник однорічний (*Helianthus annuus* L.) родини айстрові (*Asteraceae*) – введена в культуру рослина, має виражену жовчогінну та антимікробну дію, тому є перспективною сировиною для фармакогностичного дослідження. На сьогодні квітки, коріння, листки соняшника однорічного використовуються у народній медицині. Офіційних лікарських засобів із сировини соняшника в Україні не зареєстровано. У всьому світі не існує нормативної документації на сировину соняшника однорічного. Це обґрунтовує необхідність розробки проектів монографій «Соняшника квітки» та «Соняшника листя». Отже, фармакогностичне вивчення рослинної сировини соняшника однорічного та розробка ефективних лікарських засобів на її основі є актуальним і доцільним.

Зв'язок із науковими програмами, планами, темами

Дисертаційна робота виконана відповідно до плану Проблемної комісії «Фармація» МОЗ та НАМН України і є фрагментом комплексної науково-дослідної роботи Національного фармацевтичного університету за темами «Фармакогностичне вивчення біологічно активних речовин, створення лікарських засобів рослинного походження» (№ державної реєстрації

0103U000476) і «Фармакогностичне дослідження лікарської рослинної сировини та розробка фітотерапевтичних засобів на її основі» (№ державної реєстрації 0114U000946). Виконано комплексне фармакогностичне дослідження рослинної сировини соняшника однорічного та запропоновано лікарські засоби на її основі.

Наукова новизна отриманих результатів

Вперше дисертантом проведено комплексне порівняльне фармакогностичне вивчення вітчизняної рослинної сировини, а саме квіток, кошиків та листків. Встановлено якісний склад і кількісний вміст БАР: вуглеводів, компонентів ефірної олії, флавоноїдів, гідроксикоричних кислот, жирних та органічних кислот, вітамінів. Ідентифіковано 99 сполук різної природи.

Вперше проведено порівняльний аналіз кількісного вмісту ліпофільних фракцій у квітках (7,84 %), у листках (7,42 %), у кошиках (6,40 %). Визначено кількісний вміст суми каротиноїдів у листках (2,83мг%), вперше визначено вміст каротиноїдів у квітках (2,9мг%) й у кошиках (1,26мг%).

Вперше одержано водорозчинний полісахарид з кошиків (2,6 %), визначено його моносахаридний та амінокислотний склад і оптимальний час гідролізу. Вперше проведено порівняльний аналіз пектинів з кошиків соняшника однорічного за трьома методиками. Визначено їх вихід, молекулярну масу та якість за показниками згідно з вимогами ДСТУ ГОСТ 6088:2009. Обрана методика вилучення пектину сумішшю розчинів кислоти щавлевої та оксалату амонію з очищенням від ліпофільних речовин хлороформом та від ВРПС 96 % етанолом, яка дозволила отримати пектин з виходом 15,3 %, який відповідав вимогам нормативної документації до пектинів.

Вперше методом атомно-емісійної спектрофотометрії встановлено елементний склад сировини, доведено, що вміст важких металів був у межах норм ДФУ.

Вперше в процесі дослідження були виявлені та описані відповідно до вимог Ph. Eur. і ДФУ діагностичні ознаки сировини та визначені критерії стандартизації сировини й лікарських рослинних засобах на її основі.

Вперше розроблено ТШХ-методику ідентифікації фенольних речовин у сировині й лікарських рослинних засобах на її основі.

Вперше запропоновано на основі методик ДФУ спектрофотометричні методики кількісного визначення суми флавоноїдів й суми гідроксикоричних кислот у сировині та лікарських рослинних засобах на її основі.

Розроблено технологію одержання сухого екстракту з кошиків, ліпофільного екстракту з квіток та настоянки з листків, досліджений їх хімічний склад та запропоновано методи їх стандартизації.

Методом ВЕРХ в сухому екстракті з кошиків досліджено фенольні сполуки. Ідентифіковано хлорогенову, неохлорогенову, розмаринову (2,54 %), 4,5-дикофеїлхінну кислоти, кверциміртрин (4,14 %) та кверцетин, з яких 4,5-дикофеїлхінну кислоту та кверциміртрин виявлено вперше.

Методом ГХ-МС досліджені жирні кислоти та компоненти ефірної олії в ліпофільному екстракті з квіток. Загальний вміст жирних кислот становив 2,85 %, вміст ефірної олії – 3,12 %.

Методами ТШХ та ВЕРХ у настояці з листків виявлено розмаринову, хлорогенову, дикофеїлхінну кислоти, вперше – кофеїлферулхінну кислоту.

Новизну досліджень підтверджено патентом на корисну модель № 121462 від 11.12.2017 р. «Спосіб одержання сухого екстракту з кошиків соняшника однорічного».

Практичне значення отриманих результатів

Розроблено проекти монографій для ДФУ «Соняшника квітки» й «Соняшника листя», які рекомендовано ДП «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів» до введення у чергове видання ДФУ (акти впровадження № 11/982-5, № 11/983-5, № 11/984-5, № 11/985-5 від 10.04.2019 р.).

Розроблено інформаційний лист «Порівняльні макро- та мікроскопічні ознаки крайових квіток кошиків соняшника однорічного сортів Rapok, Moulin Rouge, Teddy Bear» (№ 128-2016 від 20.04.2016 р.)

За результатами досліджень розроблено проекти МКЯ на сировину – «Соняшника однорічного кошики» і на лікарські рослинні засоби «Соняшника однорічного кошиків екстракт сухий», «Соняшника однорічного квіток екстракт ліпофільний» і «Соняшника однорічного листків настойка».

Технологію способу отримання сухого екстракту з кошиків і настойки з листків соняшника однорічного апробовано в заводських умовах ПАТ ХФЗ «Червона зірка». Технологію отримання ліпофільного екстракту з квіток апробовано в заводських умовах ТОВ «КФК “ГРІН ФАРМ КОСМЕТИК”».

Результати досліджень впроваджено в навчальний процес та науково-дослідну роботу 6 ВНЗ України: кафедри фармакогнозії Національного фармацевтичного університету, кафедри якості, стандартизації та сертифікації ліків Інституту підвищення кваліфікації спеціалістів фармації, кафедри фармакогнозії та ботаніки Національного медичного університету ім. О. О. Богомольця, кафедри фармакогнозії, фармакології та ботаніки Запорізького державного медичного університету, кафедри фармацевтичної і біологічної хімії, фармакогнозії ПВНЗ «Київський медичний університет», кафедри фармації Івано-Франківського національного медичного університету.

Особистий внесок здобувача

Дисертаційна робота є повністю самостійно виконаним науковим дослідженням автора. Постановка мети, завдань дослідження, обговорення та узагальнення результатів здійснено за участю наукового керівника.

Дисертантом особисто проведено інформаційно-патентний пошук за темою дисертаційної роботи. Проведено порівняльне фармакогностичне дослідження серії зразків сировини за основними показниками якості, макро-

й мікроскопічними ознаками. Встановлено хімічний склад та кількісний вміст основних груп БАР у квітках, кошиках, листках соняшника однорічного, запропоновано підходи до стандартизації сировини соняшника; розроблено проекти монографій ДФУ «Соняшника квітки» й «Соняшника листя» і проект МКЯ «Соняшника однорічного кошики», підбрано умови для отримання екстрактів із квіток, кошиків та листків соняшника; екстракти досліджено за хімічним складом і показниками якості, розроблено проекти МКЯ «Соняшника однорічного кошиків екстракт сухий», «Соняшника однорічного квіток екстракт ліпофільний» і «Соняшника однорічного листків настойка»; проаналізовано і систематизовано результати дослідження жовчогінної активності сухого екстракту з кошиків соняшника та антимікробної активності сухого екстракту з кошиків, ліпофільного екстракту з квіток та настойки з листків; проведено статистичну обробку даних; написано розділи дисертації, сформульовано висновки.

Результати власних експериментальних досліджень висвітлені у опублікованих наукових працях. Співавторами наукових публікацій є науковий керівник та науковці, які брали участь у окремих фітохімічних, технологічних дослідження рослинної сировини та визначені фармакологічних властивостей екстрактів з неї.

Ступінь обґрунтованості наукових положень, висновків і рекомендацій дисертації, їх достовірність

Наукові положення, висновки і рекомендації, сформульовані в дисертаційній роботі є обґрунтованими і достовірними завдяки використаним сучасним методам аналізу хімічного складу об'єктів дослідження, статистичною обробкою отриманих результатів, підтвердження основних методів та рішень патентом України, апробацією та впровадженням результатів.

Повнота викладення матеріалів дослідження в опублікованих роботах і авторефераті, а також їх апробації

За матеріалами дисертації опубліковано 25 наукових праць, зокрема 9 статей у фахових виданнях, з них 2 – у наукових фахових виданнях Білорусі, 1 – у міжнародному науковому виданні, індексованому у базі Scopus, 1 інформаційний лист, 1 патент на корисну модель, 14 тез доповідей. Публікації та автореферат повністю відображають основний зміст роботи.

Аналіз основного змісту роботи, ступінь обґрунтованості наукових положень і висновків

Дисертаційна робота складається з анотації, вступу, огляду літератури, 5 розділів експериментальних досліджень, загальних висновків, списку літератури й 6 додатків. Основний зміст викладено на 168 сторінках. Робота ілюстрована 62 рисунками, 29 таблицями. Список використаної літератури становить 195 публікацій, з них кирилицею – 144 та латиницею – 51. Зміст автореферату повністю відповідає матеріалу дисертації.

У вступі автором обґрунтовано актуальність обраної теми, сформульовано мету і завдання, визначено об'єкти і предмет дослідження, відмічено наукову новизну, практичну значимість результатів досліджень, наведено відомості щодо впровадження і апробації результатів.

У першому розділі проаналізовано та систематизовано дані першоджерел щодо сучасного стану систематичного положення видів роду соняшник. За розповсюдженістю в Україні, наявністю сировинної бази та вивченістю хімічного складу найбільш перспективним видом для поглибленого вивчення і створення ефективних лікарських засобів є соняшник однорічний. Використання у народній медицині сировини соняшника вказують на доцільність проведення фармакогностичного дослідження та розробки на основі сировини соняшника лікарських рослинних засобів з жовчогінною та антимікробною дією.

У другому розділі наведено відомості про прилади, матеріали, методики і реактиви, використані при виконанні експериментальної частини. Об'єктами дослідження було обрано 37 зразків сировини (квіток, кошиків, листків), ліпофільних та спиртоводних екстрактів, ефірних олій та серій лікарських рослинних засобів з квіток, кошиків і листків соняшника однорічного. Для проведення експериментальних досліджень використано сучасні фізичні, фізико-хімічні, хімічні, фармакогностичні, технологічні, фармакологічні, математичні та статистичні методи.

У третьому розділі наведені результати дослідження діагностичних макро- й мікроскопічних ознак цільної сировини кошиків, квіток і листків соняшника. Виявлені діагностичні макро- та мікроскопічні ознаки сировини соняшника однорічного, а саме квіток (клітини внутрішньої епідерми з округлими сосочкоподібними виростами, колінчасті покривні волоски, гусеницеподібні залозисті волоски, ефіроолійні залозки з дворядною ніжкою та 3–4-рядною голівкою з 6–8 парних клітин), кошиків (клітини епідерми серединних квіток з призматичними кристалами кальцію оксалату й тупими сосочкоподібними виростами, конічні покривні волоски й багатоклітинні залозисті волоски приквіток, загнуті до епідерми, краплі жирної олії в клітинах паренхіми загального ложа, округлі шипуваті пилкові зерна), листків (дорсовентральна будова листкової пластинки, емергенці черешка та листка розташовані по 1–3 на загальній основі, схизогенні вмістища, кутово-пухка коленхіма черешка, членисті молочники, спіральні судини, друзи кальцію оксалату).

Четвертий розділ присвячений комплексному фітохімічному дослідженню квіток, кошиків та листків соняшника однорічного. Методами ПХ й ТШХ встановлено присутність гідроксикоричних кислот, а саме хлорогенової, неохлорогенової, кофейної, ферулової, розмаринової, флавоноїдів, а саме лютеолін-7-глюкозиду, хлорофілів, каротиноїдів.

Спектрофотометричним методом визначено вміст суми флавоноїдів, суми гідроксикоричних кислот та суми каротиноїдів у сировини соняшника.

Вміст флавоноїдів переважав у квітках (0,54 %), гідроксикоричних кислот у листках (3,23 %), каротиноїдів у квітках (2,93 мг%).

Методом ГХ-МС ідентифіковано та встановлено кількісний вміст 13 органічних та 14 жирних кислот, 37 компонентів ефірної олії, а саме ароматичних речовин, насичених вуглеводів та їх похідних, моно- й біциклічних монотерпеноїдів, ациклічних тритерпеноїдів, моно-, бі- й трициклічних сесквітерпеноїдів. Домінуючими компонентами були каларен, вербенол, сквален, гермакрен D. Методом перегонки з водяною парою був визначений сумарний вміст ефірних олій, який становив у кошиках 0,38 %, у квітках 0,51 % та у листках 0,05 %.

З кошиків соняшника одержано ВРПС (2,6 %), визначений оптимальний час гідролізу (1 год), ідентифіковано моносахариди (глюкоза й фруктоза) та амінокислоти (домінуючі амінокислоти – гліцин, аланін, аргінін, валін).

З кошиків соняшника одержано пектинові речовини з використанням різних екстрагентів і різних способів очищення від ліпофільних речовин і ВРПС. У результаті дослідження обраний метод вилучення пектину сумішшю розчинів кислоти щавлевої та оксалату амонію та очищення від ліпофільних речовин хлороформом, а від ВРПС 96% етанолом, який дозволяє отримати низькоестерифікований пектин з виходом 15,30 %, молекулярною масою, близькою до літературних даних, та який відповідає вимогам ДСТУ ГОСТ 6088:2009 на пектин.

Методом АЕС у кошиках, квітках та листках соняшника виявлено 18 макро- й мікроелементів. Серед макроелементів у найбільшій кількості в усіх видах сировини містився калій, серед мікроелементів – залізо та алюміній. Вміст важких металів у всіх видах сировини не перевищував допустимих меж за вимогами ДФУ (Mo, Co, Cd, As, Hg, Pb < 0,01 мг/100 г).

У п'ятому розділі наведено запропоновані методи стандартизації сировини соняшника однорічного. У результаті аналізу нормативної документації, виявлено, що на сьогодні не існує сучасної документації на

сировину соняшника. Досліджено по 7 серій сировини – квіток, листків, кошиків, виявлені макро- й мікроскопічні діагностичні ознаки порошкової сировини: для квіток – фрагменти внутрішньої епідерми віночка із сосочкоподібними виростами, кільчастих судин та паренхімної тканини з членистими молочниками; фрагменти багатоклітинних покривних колінчастих волосків з гострою верхівкою, 2–3-клітинні товстостінні покривні конічні волоски з мечеподібною апікальною клітиною відокремлені або на епідермі; 5–6-клітинні залозисті волоски з видовженими клітинами відокремлені або на епідермі; фрагменти епідерми з ефіроолійними залозками з дворядною ніжкою та 3–4-рядною голівкою з 6–8 парних клітин; численні кулясті пилкові зерна із шипуватою екзиною золотистого кольору; для листків – фрагменти епідерми з паренхімних клітин зі слабкозвивистими оболонками та продихами аномоцитного типу, фрагменти кільчастих судин, покривних конічних волосків, 2–3-клітинні верхівки емергенців з товстими клітинними оболонками з бородавчастою кутикулою, округлі базальні клітини основ емергенців з потовщеними оболонками, фрагменти багатоклітинних гусеницеподібних залозистих волосків.

Розроблено методику ідентифікації флавоноїдів і гідроксикоричних кислот методом ТШХ. Розроблено спектрофотометричні методики кількісного визначення суми флавоноїдів у перерахунку на гіперозид (регламентований вміст суми флавоноїдів у квітках – не менше 0,3 %, кошиках – не менше 0,25 %), суми гідроксикоричних кислот у листках у перерахунку на хлорогенову кислоту (не менше 2,5 %), суми каротиноїдів у квітках у перерахунку на лютеїн (не менше 2,5 мг%).

За результатами дослідження серій квіток, листків та кошиків соняшника однорічного згідно з вимогами ДФУ до ЛРС, розроблено проекти монографій «Соняшника квітки» й «Соняшника листя» та проект МКЯ «Соняшника однорічного кошики».

Шостий розділ присвячений технології одержання, стандартизації та дослідження фармакологічної активності екстрактів з квіток, кошиків та

листіків соняшника однорічного. Експериментально обґрунтовано оптимальні умови для отримання сухого екстракту з кошиків, ліпофільного екстракту з квіток та настойки з листків. Технологію отримання ліпофільного екстракту з квіток апробовано на обладнанні фармкомбінату «ГРІН ФАРМ КОСМЕТИК». Технологію отримання сухого екстракту з кошиків та настойки з листків апробовано на обладнанні ПАТ ХФЗ «Червона зірка». Серії екстрактів та настойки досліджено за показниками якості відповідно до вимог ДФУ.

Досліджено хімічний склад отриманих екстрактів: методом ВЕРХ фенольні сполуки у сухому екстракті з кошиків та у настойці з листків. У сухому екстракті та настойці ідентифіковано 6 речовин фенольної природи, з них у сухому екстракті виявлена вперше 4,5-дикофеїлхінна та флавоноїд кверцимірїтрин, у настойці – 3,4-дикофеїлхінна та кофеїлферулхінна кислоти. Методом ГХ-МС досліджено склад жирних кислот та компонентів ефірної олії у ліпофільному екстракті, у найбільшій кількості містилися пальмітинова та ліолева жирні кислоти, з компонентів ефірної олії – каларен, α -пінен, сабінен.

Розроблено 3 проекти МКЯ на сухий екстракт з кошиків, ліпофільний екстракт з квіток та настойку з листків. Визначено оптимальні методики їх стандартизації: сухий екстракт з кошиків – за вмістом суми флавоноїдів у перерахунку на гіперозид, ліпофільний екстракт з квіток – за вмістом суми каротиноїдів у перерахунку на лютеїн, настойка з листків – за вмістом гідроксикоричних кислот у перерахунку на хлорогенову кислоту.

Проведено дослідження жовчогінної активності сухого екстракта з кошиків на моделі субхронічного ушкодження печінки тетрахлоретаном у комбінації з алкоголем, визначено, що сухий екстракт у дозах 75 мг/кг та 100 мг/кг виявляють виражену жовчогінну активність.

Визначено антимікробну активність сухого екстракту з кошиків, ліпофільного екстракту з квіток та настойки з листків до тест-штамів тест-штами: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922,

Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853, *Basillus subtilis* ATCC 6633, *Proteus vulgaris* ATCC 4636, *Candida albicans* ATCC 885/653.

Зауваження і пропозиції

Характеризуючи роботу у цілому, слід зазначити, що вона виконана на високу науковому рівні, має позитивну оцінку, відрізняється сучасними підходами до проведення експериментальних досліджень. Проте треба відмітити деякі зауваження та пропозиції:

- у вступі в дисертацію та в авторефераті більш коректним є використання терміну «біологічна» або «фармакологічна активність» відносно жовчогінної дії сухого екстракту з кошиків соняшника однорічного, а не «лікувальна», як у роботі, оскільки лікувальна активність є тільки у дозволеного лікарського засобу;

- у четвертому розділі одиниці виміру молекулярні маси пектинів приведені як «атомні одиниці маси» (а.о.м.), на мій погляд більш звично молекулярні маси вимірювати у дальтонах (Да або Da);

- у вступі в дисертацію та в авторефераті слід вказати умови хроматографування ВЕРХ під час ідентифікації фенольних сполук у сухому екстракті з кошиків та у настойці з листків соняшника однорічного.

Наведені зауваження не знижують цінності роботи, яка оформлена згідно із існуючими вимогами, встановленими для кандидатських дисертацій і повністю відповідає профілю спеціалізованої вченої ради Д 64.605.01 за спеціальністю 15.00.02 – фармацевтична хімія та фармакогнозія. В ній вирішено актуальне завдання сучасної фармацевтичної науки в галузі фармакогностичного вивчення перспективної рослинної сировини і розробці ефективних лікарських засобів на її основі.

Рекомендації щодо використання результатів дисертаційного дослідження в практиці. Одержані дані фармакогностичного дослідження рослинної сировини соняшника однорічного і розробка рослинних засобів на її основі, можуть бути використані для виділення сухого екстракту з кошиків,

ліпофільного екстракту з квіток та настойки з листків з досліджуваної сировини, їх стандартизації та впровадження в практику профільних підприємств. Проекти МКЯ «Соняшника однорічного коники», «Соняшника однорічного коників екстракт сухий», «Соняшника однорічного екстракт ліпофільний», «Соняшника однорічного настойка» можуть бути запропоновані до відповідних фармакопейних статей ДФУ.

Відповідність дисертації вимогам п. 11 «Порядку присудження наукових ступенів»

На підставі вищевикладеного вважаю, що дисертаційна робота Соколової Ольги Олександрівни «Фармакогностичне вивчення сировини соняшника однорічного (*Helianthus annuus* L.) та розробка лікарських рослинних засобів на її основі» на здобуття наукового ступеня кандидата фармацевтичних наук являє собою закінчену працю, в якій отримані нові обґрунтовані результати, які мають наукову та практичну цінність.

За актуальністю обраної теми, новизною результатів досліджень та їх практичним значенням, обсягом виконаних експериментів, обґрунтованістю наукових положень і рекомендації, повнотою публікації результатів у фахових виданнях, дисертація відповідає вимогам п. 11 «Порядку присудження наукових ступенів» постанови Кабінету Міністрів України від 24 липня 2013 р. № 567, які пред'являються до кандидатських дисертацій, а її автор Соколова Ольга Олександрівна, заслуговує на присвоєння наукового ступеня кандидата фармацевтичних наук за спеціальністю 15.00.02 – фармацевтична хімія та фармакогнозія.

Офіційний опонент:

Завідувач лабораторії та клінічного відділу молекулярної імунофармакології ДУ «Інститут мікробіології та імунології імені І. І. Мечникова НАМН України», доктор фармацевтичних наук, професор

Підпис
ЗАСВІДЧУЮ:
Вчений секретар
ДУ "ІМІ НАМН"



[Handwritten signature]
17.08.2013

Мартинов А. В.