

Минина и Пожарского пл., д.10/1
г. Нижний Новгород, 603950
Тел (831)439-09-43, 439-06-43
Тел /Факс (831) 439-01-84
email: rector@nizhgma.ru

И.о. ректора Ф. Минздрав
доктор ме

странах Европы и Америке является источником получения большого числа лекарственных препаратов. Растение на сегодняшний день привлекает к себе внимание ученых всего мира в плане дальнейшего изучения спектра биологической и фармакологической активности и разработки лекарственных средств, от желчегонных и антибактериальных до противораковых и нейропротекторных. Приоритет в изучении корневищ куркумы принадлежит ряду научных коллективов из Индии, Китая, Японии и Америки. В ряде зарубежных стран растение входит в государственные фармакопеи, в Российской Федерации сырье фармакопейным не является (ранее входило в 1-3 издания Российской фармакопеи). В нашей стране к рассмотрению куркумы длинной как перспективного вида для отечественной научной медицины и фармации до сих пор обращались только некоторые российские ученые; в этом плане в числе работ последних лет следует отметить исследования пятигорских коллег (Челомбитько В.А., Орловская Т.В. и др., 2008, 2011), которые заложили современные методологические подходы к изучению пищевых растений как потенциальных видов ЛРС, в т.ч. куркумы длинной. Основываясь на уже опубликованных данных (ссылки на источники автором корректно приведены, и некоторые из них являются интерактивными), критический анализ состояния изученности куркумы длинной российскими и зарубежными исследователями, особенно с фармакогностических позиций (что отражено обзоре литературы), показал неоднозначность или не достаточную глубину сведений по химическому составу, некоторым подходам в решении вопросов стандартизации, путям переработки сырья для получения лекарственных препаратов, установлению идентичности сырья растений природных ареалов произрастания и сырья культивируемых растений на территории Северного Кавказа (предоставлены для диссертационного исследования упомянутыми пятигорскими коллегами для дальнейших исследований). Эти и ряд других вопросов к моменту начала работ по теме диссертации не позволяли в полной мере обосновать целесообразность официального статуса ЛРС для изучаемого сырья, сформировать спектр представлений о сырье отечественных культивируемых образцов и разработать соответствующую нормативную документацию в соответствии с современными требованиями к фармацевтическому анализу. Обозначенный круг проблем и явился целевыми установками для проведенного исследования.

Научная новизна, полученных результатов и выводов.

Впервые проведено сравнительное фармакогностическое исследование корневищ куркумы длинной, заготовленных на территории Северного Кавказа в 2007-2014 гг. и ряда коммерческих образцов пряностей разных стран происхождения (Индия, Китай, Вьетнам) в части определения морфолого-

анатомических признаков, компонентного состава куркуминоидного комплекса, определения параметров качества, решения вопросов стандартизации и некоторых других.

По результатам морфолого-анатомических исследований образцов корневищ куркумы были выявлены дополнительные характерные диагностические признаки для цельного, измельченного и порошкованного сырья. Изучение микродиагностических признаков и получение микрофотографий было проведено с помощью цифрового микроскопа «Motic DM111» (Корея) и цифрового стереоскопического микроскопа «Motic DM-39C-N9GO-A» (Корея) при разных увеличениях. Показано по каким признакам можно судить о способах заготовки и приведения в стандартное состояние сырья (они разные для образцов различного происхождения).

В ходе фитохимических исследований корневищ куркумы длинной с акцентом на куркуминоидный комплекс БАС, как представляющий наибольшую ценность для получения лекарственных средств, с помощью сочетания экстракционных методов и колоночной адсорбционной хроматографии на силикагеле и полиамиде были выделены и идентифицированы три основных куркуминоида – куркумин, дезметоксикуркумин и бисдезметоксикуркумин. Для них с использованием данных ^1H -ЯМР-, ^{13}C -, масс-, ИК- и УФ- спектров установлены химические структуры и изучены физико-химические характеристики. Доминирующее из соединений – куркумин предложен автором в качестве отечественного стандартного образца (СО); для него разработана схема получения, изучены параметры качества и обосновано использование в методиках качественного и количественного определения куркуминоидов в сырье и экстракционных препаратах растения.

Выделенные индивидуальные куркуминоиды в качестве достоверно известных образцов веществ были использованы для изучения химического состава методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) и тонкослойной хроматографии (ТСХ) ряда образцов корневищ куркумы длинной, что имеет определяющее значение для подтверждения подлинности (таксономической принадлежности) производящего растения. В предложенных условиях хроматографического разделения оценено суммарное содержание куркуминоидов – не менее 2,0 % (что также было установлено и при спектрофотометрическом определении); подтверждено характерное для куркумы длинной соотношение доминирующих куркуминоидов: куркумин, дезметоксикуркумин и бисдезметоксикуркумин (63%:22%:15%) для образцов сырья культивируемых растений (аналогично растениям природных ареалов).

С целью совершенствования качественного сырья методом ТСХ (в ранее предложенных условиях пятигорскими коллегами) с использованием выделенных и охарактеризованных куркуминоидов дано соотнесение пятен веществ на хроматографической пластине с тремя доминирующими куркуминоидами, при этом автором уточнены показатели R_f и вычислены значения R_s . Дополнительным подтверждением подлинности ЛРС предложено считать характер электронного спектра спиртового извлечения - наличие единственного максимума светопоглощения при $425 \text{ нм} \pm 2 \text{ нм}$ (куркуминоиды).

С использованием предложенного отечественного СО куркумина, который в отличие от зарубежных аналогов заявлен как индивидуальное вещество (в зарубежных – сумма 3-х доминирующих куркуминоидов), для оценки содержания суммы куркуминоидов в образцах отечественного сырья и в экстракционных препаратах куркумы (на примере полученного густого экстракта) была апробирована разработанная пятигорскими учеными для корневищ растений природных ареалов произрастания методика количественного определения БАС (дифференциальная спектрофотометрия окрашенного комплекса куркуминоидов с борной и щавелевой кислотой при аналитической длине волны $545 \text{ нм} \pm 2 \text{ нм}$), при этом в методику внесены некоторые уточнения.

Предложен способ получения густого экстракта корневищ куркумы на 95 % спирте этиловом, подкисленном хлороводородной кислотой, методом циркуляционной экстракции и доказана его высокая антиоксидантная активность в опытах *in vitro* в 2-х модельных системах свободно-радикального окисления липидов и образования активных форм кислорода. С учетом известной крайне низкой биодоступности куркуминоидов предложена лекарственная форма – суппозитории с экстрактом куркумы, теоретически обосновано их использование для профилактики предраковых состояний и лечения колоректального рака в качестве противоопухолевого препарата. При этом экспериментально установлены максимально возможные количества вводимого экстракта в различные основы, что позволит в дальнейшем соблюсти терапевтический режим дозирования действующих веществ. На основании результатов определения фармацевтической доступности суппозиторий в качестве оптимальной предложена гидрофильная основа.

Диссертационная работа является комплексной, выполнена с использованием фармакогностических, аналитических, технологических и фармакологических методов исследования; при этом помимо использования возможностей Самарского государственного медицинского университета была задействована приборная база и компетенции еще нескольких организаций (Института органической химии РАН, Башкирского государственного

медицинского университета, Самарского национального исследовательского университета им. акад. С.П. Королева и некоторых других).

Достоверность полученных результатов, выводов и практических рекомендаций.

Объем полученных экспериментальных данных, а также применение адекватного набора современных методов анализа и статистической обработки результатов обеспечивает достоверность научных положений и выводов. Статистическая обработка экспериментальных данных исследований ($P=95\%$) проведена в соответствии с ГФ РФ XIII издания с применением программ «Excel 7.0» (MS Office, USA), «Statistica 6.0» (StatSoft, USA). Апробированные методики количественного определения отвечают параметрам валидации.

Установление структуры выделенных веществ осуществлялось с использованием ^1H -ЯМР- и ^{13}C -ЯМР- спектроскопии (ЯМР-спектрометр «Bruker AM 300», 300 МГц), масс-спектрометрии (Kratos MS-30 (UK) 70 eV $T=2000\text{C}$), ИК-спектроскопии (ИК-Фурье-спектрометр «Nikolet iS10» фирмы «Thermo Spectronic Company»). Изучение физико-химических характеристик соединений (а также изучение химического состава и решение аналитических вопросов по стандартизации) проводилось с использованием хроматографических и оптических методов анализа (высокоэффективная жидкостная хроматография («Biotronic»), газовая хроматография («МАЭСТРО 7820» с масс-спектрометром модели Agilent 5975), спектрофотометрия (спектрофотометры «Specord 40» фирмы «Analytik Jena» и «Heliosa» фирмы «Thermo Spectronic Company»), а также некоторых химических реакций.

Материалы диссертационного исследования обсуждены на 8 научно-практических конференциях, опубликованы в 12 печатных работах, из них 3 статьи - в рецензируемых журналах, рекомендуемых ВАК Минобрнауки РФ для опубликования результатов диссертационных исследований, получена приоритетная справка на патент РФ на изобретение «Антиоксидантное средство «Куркумы экстракт густой».

Автореферат диссертации полностью соответствует ее содержанию.

Значимость полученных результатов для науки и практики.

Обоснована целесообразность рассмотрения и использования в отечественной научной фармации корневищ куркумы длинной в качестве лекарственного растительного сырья. При этом сравнительный фитохимический анализ образцов сырья растений, культивируемых на территории Северного Кавказа, и коммерческих зарубежных образцов сырья показал их идентичность по компонентному составу куркуминоидов и количественному содержанию. Изученные показатели качества культивируемых растений с применением методов морфолого-анатомического

и фитохимического анализа и способы их оценки (в том числе с использованием куркумина в качестве СО) нашли отражение в проекте фармакопейной статьи «Куркумы длинной корневища».

Полученные в ходе исследования данные по химическому составу куркуминоидов и разработанные параметры качества сырья культивируемых растений позволяют решать проблемы стандартизации сырья в соответствии с современными требованиями к фармацевтическому анализу, проводить работы по созданию отечественных лекарственных препаратов с разноплановой фармакологической активностью. В данном направлении были проведены собственные исследования по созданию «Куркумы экстракта густого» и установлена его высокая антиоксидантная активность, а также предложены рациональные подходы к его дальнейшему использованию в медицинской практике в форме ректальных свечей (ввиду крайне низкой биодоступности куркуминоидов).

Рекомендации по использованию результатов и выводов.

Материалы исследования могут быть использованы в учебном процессе по курсам «Фармакогнозия» и «Фармацевтическая химия», а также на фармацевтических производствах и в контрольно-аналитических лабораториях, осуществляющих стандартизацию и анализ лекарственных средств.

Результаты диссертационной работы внедрены в учебный процесс и научно-исследовательскую работу кафедр фармацевтического факультета ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России, кафедры фармакогнозии с курсом ботаники и основ фитотерапии ФГБОУ ВО БГМУ Минздрава России, а также в работу предприятия ЗАО "Самаралектравы" и Института ботаники Академии наук Абхазии (где также проводятся исследования по введению в культуру куркумы длинной).

Таким образом, результаты диссертационного исследования М.Ю. Борисова имеют несомненное научно-практическое значение и могут быть использованы при разработке отечественных лекарственных средств на основе куркумы, и, в частности, для продолжения технологических и фармакологических исследований, а также работ по интродукции растения на территории Российской Федерации в зонах с субтропическим климатом.

В ходе прочтения диссертационной работы возникли некоторые замечания и вопросы:

1. Важное место при установлении подлинности и количественном определении куркумина и его производных (дезметоксикуркумина и бисдезметоксикуркумина) занимает электронная спектроскопия (прямой и дифференциальный варианты). Поскольку все куркуминоиды проявляют таутомерию и могут существовать как смесь кето- и енольных форм,

желательно было привести спектры поглощения этих соединений не только в 95% этаноле, но и в растворах в присутствии либо 0,1М соляной кислоты (доминирующие кето-формы), либо 0,1М гидроксида натрия (преобладающие енольные формы). Различия в спектрах (оптическая плотность, удельный коэффициент экстинкции) являются надежным ориентиром при идентификации и унифицируют методики количественного определения.

2. Желательно на градуировочном графике обозначить конкретные значения, например, $D(C)$ для руброкуркумина (рис. 27).

3. Следовало бы уделить большее внимание описанию методики обращенно-фазового ВЭЖХ-анализа (раздел 4.1; выводы 2 и 3, стр.122). Кроме описания условий хроматографирования желательно было рассчитать эффективность колонки (число теоретических тарелок), характеризующей величину размываемой зоны, робастность системы, указать пределы обнаружения и пределы количественного определения (куркумина).

4. Сесквитерпеновый кетон ар-турмерон является основным компонентом эфирного масла куркумы, что установлено методом газовой хроматографии с масс-детектором, и его количественное содержание соответствует примерно 25% (стр.71). Каково содержание этого компонента в исходном образце? Цифра 25%, вероятно, относится к его содержанию в эфирном масле, а поскольку суммарное содержание эфирного масла составляет 3,8 – 6,0%, то эта цифра соответствует 1,0-1,5%?

5. Чем аргументирован срок хранения образцов - 3 года?

В диссертационной работе имеются отдельные стилистические неточности и опечатки.

Данные замечания не снижают общей положительной оценки результатов, теоретической, научно-практической значимости и уровня работы в целом. Содержание диссертационной работы соответствует паспорту специальности 14.04.02 – «Фармацевтическая химия, фармакогнозия» (фармацевтические науки), в частности, пунктам 2, 3, 6 и 7.

Заключение

Диссертационная работа Борисова Михаила Юрьевича «Фармакогностическое исследование корневищ куркумы длинной (*Curcuma longa* L.)» является самостоятельной законченной научно-квалификационной работой, в рамках которой решена актуальная задача в области фармацевтической химии и фармакогнозии по обоснованию использования корневищ куркумы длинной в качестве лекарственного растительного сырья. В работе проведено фармакогностическое исследование указанного сырья, обоснованы параметры качества, разработан отечественный стандартный образец куркумина, предложены рациональные пути по созданию

отечественных лекарственных препаратов на основе куркуминоидного комплекса.

По актуальности, научной новизне, теоретической и практической значимости, достоверности научных результатов и обоснованности выводов, их достоверности и степени опубликованности диссертационная работа Борисова Михаила Юрьевича соответствует требованиям пп. 9-14 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного постановлением Правительством Российской Федерации № 842 от 24 сентября 2013 г. (в ред. постановления Правительства РФ от 21.04.2016 г. № 335), предъявляемым к кандидатским диссертациям, а ее автор, Борисов Михаил Юрьевич, заслуживает присуждения ученой степени кандидата фармацевтических наук по специальности 14.04.02 – фармацевтическая химия, фармакогнозия.

Отзыв обсужден на заседании кафедры фармацевтической химии и фармакогнозии федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Нижегородская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации (протокол № 3 от 03.10.17).

Заведующий кафедрой фармацевтической химии
и фармакогнозии федерального государственного
бюджетного образовательного учреждения
высшего образования «Нижегородская
государственная медицинская академия»
Министерства здравоохранения Российской Федерации,
доктор химических наук, профессор

(02.00.11–коллоидная химия)

603950, г. Нижний Новгород,
пл. Минина и Пожарского, д. 10/1
Тел.: 8 (831) 432-80-75
E-mail: pharmchem@nizhgma.ru

Н. Мельникова

Мельникова Нина Борисовна

« 9 » октябрь 2017 г.

