

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертацию Осипова Константина «Исследование и устранение неспектральных помех при анализе биологических жидкостей и лекарственных средств методом масс-спектрометрии с индуктивно связанной плазмой», представленную на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальности 02.00.02 – Аналитическая химия

Актуальность темы исследования. Масс-спектрометрия с индуктивно связанной плазмой (МС-ИСП) является одним из наиболее универсальных методов многоэлементного анализа, чрезвычайно эффективного и высокочувствительного. За последние годы метод занял ведущее положение среди инструментальных методов элементного анализа в различных областях химии, геологии, клинических исследованиях и фармации. В ведущие фармакопеи (США, Евросоюза) включена соответствующая фармакопейная статья, и метод применяется на всех этапах контроля качества лекарственных средств: определение подлинности, испытаниях на чистоту, количественном анализе.

С момента появления в 80-ые гг первого коммерчески доступного масс-спектрометра с индуктивно связанной плазмой метод претерпел множество усовершенствований. В то же время не потеряли актуальности задачи, связанные с поиском возможности снижения пределов количественного определения элементов. Препятствием остаются ограничения, связанные со спектральными интерференциями и матричными помехами. При анализе растворов, содержащих более 0,05 – 0,2 % матричного элемента, для получения правильных количественных результатов необходимо учитывать влияние концентрации основы на изменение кривой чувствительности масс-спектрометра. Разработка алгоритма процедуры устранения неспектральных помех, чему и посвящена диссертация, открывает перспективы анализа многокомпонентных проб биоматериалов с любым составом матрицы.

Актуальность исследования подтверждается постоянно растущим потоком научных публикаций, отражающих применение МС-ИСП для исследований биологической роли необходимых микро- и макроэлементов (metabolomics, metalomics) и токсических эффектов примесных элементов.

Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации. Обоснованность выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации, не вызывает сомнений, поскольку автор

использовал современные теоретические научные положения для обоснования многочисленных экспериментальных результатов, надежность которых подтверждена их метрологической оценкой.

Автором были выбраны не простые, с позиций аналитической процедуры, модельные системы. Это кровь, сыворотка крови и моча здоровых и больных людей, а также координационные соединения платины и галлия (находящиеся в разработке фармацевтические субстанции – «лекарства-претенденты»). Нативные органические соединения, присутствующие в исследуемых биоматериалах, неминуемо создают фоновые помехи, при самой тщательной пробоподготовке объекта для анализа. Тем не менее, автору удалось количественно оценить вклады основных неспектральных помех в искажение результатов анализа биологических жидкостей и найти пути их минимизации. Например, установлено, что влияние солевой, органической и кислотной матриц носит аддитивный характер. Доказано, что снижение неспектральных помех может осуществляться за счет настройки операционных параметров работы прибора (повышения мощности генератора, варьирование скорости потока аргона через распылитель, изменения потенциала на линзе-экстракторе). Использование найденных «устойчивых» параметров взамен «стандартного» режима и оригинальный подход к созданию модельных матричных растворов позволил перейти к варианту единственного внутреннего стандарта и упростить методики анализа.

Достоверность и новизна полученных результатов, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации. Диссертация представляет собой комплексное исследование. Диссертант осуществил систематический анализ неспектральных помех, нашел пути их минимизации и апробировал практически новые методики на различных биологических матрицах и разрабатываемых фармацевтических субстанциях.

Достоверность результатов подтверждается не только комплексным характером диссертационного исследования, но и числом экспериментов, проведенных на отдельных этапах исследования. Достаточно сказать, что только для выбора диагностически значимых элементов – маркеров синдрома системной воспалительной

реакции организма было проанализировано более 300 проб биологических жидкостей пациентов.

Значение полученных автором результатов для науки и практики. Результаты диссертационной работы вносят неоценимый вклад в развитие аналитической химии в плане совершенствования методик инструментальных методов анализа, а именно метода МС-ИСП.

В диссертации проведено систематическое изучение формирования неспектральных помех при анализе растворов биологических материалов с использованием квадрупольного масс-спектрометра в стандартной комплектации.

Доказано, что наибольшее влияние на подавление аналитического сигнала (прибор Agilent 7500с) оказывают процессы, протекающие при поступлении образца в распылитель, транспортировке аэрозоля, испарении, атомизации и ионизации. Определены основные операционные параметры (мощность генератора и скорость потока аргона через распылитель), ответственные за минимизацию исследуемых неспектральных помех.

Результаты диссертации являются основой для совершенствования биофармацевтического и биомедицинского анализа и могут быть использованы в клинической диагностике, судебно-химических, химико-токсикологических исследованиях и при разработке новых фармацевтических субстанций и готовых лекарственных форм на их основе.

Результаты диссертации могут найти применение при расшифровке метаболома (metabonomics) в целом, и металлома (metallomics), в частности, что позволит раскрыть детали биотрансформации соединений органической и неорганической природы.

Разработанные автором подходы для определения металлов, неметаллов и амфотерных элементов методом МС-ИСП имеют особое значение при оценке интервалов терапевтической безопасности и терапевтического индекса (ЛД50/ЕД50) лекарственных препаратов, в том числе противоопухолевых.

Полученные результаты по определению группы элементов из одной пробы могут быть рекомендованы разработчикам фармакопейных статей при формировании разделов «Оценка чистоты. Тяжелые металлы». Используемый в настоящее время эталонный метод оценки содержания тяжелых металлов в субстанциях и готовых

лекарственных формах по интенсивности окрашивания стандарта на основе PbS. Пионером включения МС-ИСП в перечень инструментальных методов контроля тяжелых металлов в лекарственных средствах явилась фармакопея США (2014). Это открывает широкие перспективы практического применения результатов исследования, что особенно важно в связи с реализацией программы правительства РФ «Фарма-2020» по созданию отечественных инновационных лекарственных средств.

Разработанные методики вносят неоценимый вклад в клиническую практику в связи с расширением информации, необходимой для проведения лечения гипер- и гипозэлементозов в эндомических провинциях и техногенных мегаполисах.

Результаты диссертационной работы внедрены в учебный процесс медицинского института РУДН (дисциплины «фармацевтическая химия», «стандартизация и контроль качества лекарственных средств», «физико-химические основы фармацевтического анализа»).

Общая оценка содержания диссертации, ее завершенность. Диссертационная работа изложена на 153 страницах машинописного текста, состоит из введения, обзора литературы (глава 1) и экспериментальной части (главы 2-4). Результаты проиллюстрированы 28 таблицами и 18 рисунками. Список литературы содержит 193 ссылки, из них 192 – на зарубежные издания.

Глава 1 диссертации посвящена критическому обзору литературы по теме диссертации. Градуировка с подбором матрицы, метода добавок, применение внутреннего стандарта – автор последовательно анализирует разные подходы нивелирования матричных помех. Он подчеркивает, что несмотря на обилие научных публикаций, отсутствует обоснованная систематизация причин возникновения и путей устранения матричных помех. Сложная природа матричных помех, их многообразие не позволяют добиться их полного устранения только инструментальными способами. Завершая литературный обзор, автор планирует выработать общую методологию получения правильных результатов определения элементов при анализе сложных биологических образцов.

Глава 2 диссертации посвящена характеристике объектов исследования, стандартных образцов, реагентов, оборудования для минерализации и основного инструмента исследования – квадрупольного масс-спектрометра с индуктивно

связанной плазмой (Agilent 7500с, Япония). Принимая во внимание, что качество получаемых результатов в значительной степени зависит от чистоты материалов, диссертантом в основном были использованы особо чистые реактивы и вспомогательные материалы ведущих зарубежных производителей. Описаны условия хранения и подготовка проб исследуемых образцов; методики приготовления растворов внутренних стандартов и градуировочных растворов, методики определения коэффициентов распределения и констант связывания с белками.

Глава 3 диссертации посвящена поиску способа устранения неспектральных помех для разработки методик анализа при массовых анализах биологических материалов. Была использована внешняя градуировка без подбора матрицы и любой внутренний стандарт при соответствующей настройке операционных параметров масс-спектрометра. Были исследованы разбавители биологических материалов и выбраны их комбинации в зависимости от анализируемого биоматериала. Установлено, что для элементов с относительно высокой энергией ионизации (P, Zn, As, Se, Pt) при окислительной минерализации результаты на 20-25% занижены по сравнению с прямым разбавлением. Для выяснения наблюдаемого несоответствия автор провел дополнительные исследования по влиянию кислотной, солевой и органической составляющих на величину сигнала, применяя набор модельных растворов. Было установлено, что влияние этих составляющих носит аддитивный характер. Был сделан вывод, что при установленных автоматически программой масс-спектрометра условиях измерения с применением одного ВС невозможно правильное определение набора элементов из одного раствора независимо от выбранного способа пробоподготовки. При измерениях в «стандартном» режиме (прибор настроен на максимальную чувствительность) правильное определение всех элементов из одного раствора возможно только в случае применения нескольких ВС, энергии ионизации которых близки к энергиям ионизации определяемых элементов.

В заключительной части главы автор доказывает, что в результате минимизации неспектральных помех с помощью инструментальных настроек прибора (достижение «устойчивых» параметров) в качестве внутреннего стандарта может быть использован любой элемент независимо от атомной массы и потенциала ионизации.

Глава 4 диссертации посвящена применению разработанных критериев и подходов к решению клинических и биофармацевтических задач. Автором выявлены диагностически значимые элементы – маркеры синдрома воспалительной реакции организма. Результаты этой главы вносят важный вклад в бионеорганическую химию. Автором исследованы разрабатываемые фармацевтические субстанции на основе координационных соединений галлия и платины, для которых проведена оценка степени связывания : 8-оксихинолината галлия (III) с альбумином и трансферрином, а также цис- и транс-[дигалогенобис(2-пропаноноксимов)]- платины(II) с альбумином.

Публикации и апробация. По материалам диссертации опубликовано 8 работ, из них 4 – в изданиях, рекомендованных ВАК РФ. Результаты работы прошли многократную апробацию в результате участия автора во всероссийских и зарубежных научных конференциях, а также научных семинарах МГУ и институтах РАН.

Достоинства и недостатки по содержанию и оформлению диссертационной работы. Поставленные задачи и использованные для их реализации подходы позволили автору получить новые результаты, которые являются важным вкладом в аналитическую химию. Решена задача одновременного определения 11 элементов с широким диапазоном содержания (0,2 – 9000 мкг/л) из одного раствора.

По работе имеются замечания:

1. Диапазоны содержаний элементов, определяемых с помощью МС-ИСП, в биологических жидкостях (Табл 1) приведены со ссылкой на сайт лаборатории ИНВИТРО, при этом не указано являются ли приведенные интервалы нормой или включают значения, характерные для патологических состояний. Более надежным справочным источником является, например, Всемирная организация здравоохранения (WHO).

2. Из диссертации не ясно, какие пробы мочи анализировались – суточные или разовые; для ряда элементов это значимый фактор.

Отмеченные недочеты не умаляют достоинств диссертационной работы и не снижают ее общей высокой оценки.

Результаты диссертации характеризуются актуальностью, новизной, оригинальностью, практическим значением для науки и практики, полностью соответствуют цели и задачам, поставленным перед аспирантом.

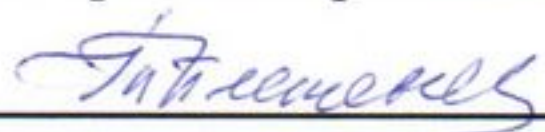
Автореферат в полной мере отражает содержание диссертации.

Заключение о соответствии диссертации критериям, установленным Положением о порядке присуждения ученых степеней. Диссертация Осипова Константина «Исследование и устранение неспектральных помех при анализе биологических жидкостей и лекарственных средств методом масс-спектрометрии с индуктивно связанной плазмой» представляет собой самостоятельную законченную научно-квалификационную работу, в которой решены задачи, актуальные для аналитической химии.

По объему выполненных исследований, актуальности, новизне, научной и практической ценности, уровню обсуждения результатов, надежности и достоверности основных выводов кандидатская диссертация Осипова Константина соответствует требованиям п.9 постановления Правительства Российской Федерации №842 от 24 сентября 2013 г. «О порядке присуждения ученых степеней», предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальности 02.00.02 – Аналитическая химия.

Официальный оппонент,

доктор химических наук, профессор,
заведующая кафедрой фармацевтической
и токсикологической химии Медицинского
института Российского университета дружбы народов (РУДН)
Министерства образования и науки РФ,



Плетенева Татьяна Вадимовна

117198, г.Москва, ул. Миклухо-Маклая, д.6
тел. 8-495-434 70 01; 8916-072 62 82
tvplet@mail.ru



27.04.2015

Директор Медицинского института РУДН

А.Ю. АБРАМОВ