

Відгук

офіційного опонента на дисертаційну роботу *Костів Оксани Ігорівни* на тему «*Реакція азосполучення в аналізі β-лактамних та тетрациклінових антибіотиків*», яка представлена на здобуття наукового ступеня доктора філософії (спеціальність 102 – Хімія, галузь знань 10 – Природничі науки)

Дисертація Костів О.І. присвячена систематичному вивченню можливості спектрофотометричного і вольтамперометричного визначення азосполук β-лактамних та тетрациклінових антибіотиків, отриманих на основі реакції азосполучення: амоксициліну (АМ) та окситетрацикліну (ОТЦ) з діазотованими реагентами, які містять в своїй структурі первинну ароматичну аміногрупу; діазотованих цефалоспоринів з фенольними реагентами. У роботі оптимізовані умови по визначенню антибіотиків, встановлено склад утворюваних сполук, запропоновано ймовірні схеми реакцій азосполучення, розроблені та апробовані нові методики спектрофотометричного та вольтамперометричного визначення антибіотиків. Деякі розроблені методики валідовано згідно вимог Державної фармакопеї України.

1. Актуальність теми дисертаційної роботи та її зв'язок з державними або галузевими науковими програмами, пріоритетними напрямками розвитку науки і техніки. Загальна характеристика роботи

Антибіотики, зокрема β-лактамні та тетрациклінові, широко використовуються у медицині та ветеринарії, причому іноді використовується поєднання антибіотиків різного класу. Тому виникає необхідність контролю якості препаративних форм антибіотиків (у т.ч. для виявлення фальсифікації), а також визначення їх вмісту у біологічних рідинах, стічних водах фармацевтичних виробництв, тощо. Для визначення β-лактамних та тетрациклінових антибіотиків найширше застосовують ВЕРХ, яка потребує дуже дорогого обладнання, реактивів і стандартів високої чистоти. У зв'язку з цим однією з задач сучасної аналітичної хімії є пошук альтернативних методів і розробка методик визначення антибіотиків, які б могли бути широко використані лабораторіями. У значній мірі таким вимогам відповідають спектрофотометричні та вольтамперометричні методи, які дозволяють вирішувати конкретні аналітичні задачі.

Для отримання ефективних аналітичних форм органічних речовин, які містять у своїй структурі первинну ароматичну аміногрупу або фенольний гідроксил, і можуть виступати як діазоскладова чи азоскладова відповідно, широко використовують реакцію азосполучення. В той же час, систематичні дослідження по вивченню можливості використання реакції азосполучення в спектрофотометричному та вольтамперометричному аналізі β-лактамних та тетрациклінових антибіотиків раніше не проводилися. Саме вирішенню цих завдань присвячена дисертаційна робота Костів Оксани Ігорівни.

Дисертаційна робота є частиною досліджень, які виконувались на кафедрі аналітичної хімії Львівського національного університету імені Івана Франка в



межах науково-тематичних планів і державних бюджетних тем: ХА-32 Ф «Закарпатські цеоліти в аналітичній хімії розсіяних елементів, бактерицидних, протипухлинних засобів та інших біологічно активних речовин» (2016-2018 рр., державний реєстраційний номер 0116U001541) та ХА-87 Ф «Багатофункціональні матеріали клиноптилоліт – перехідні метали у хімічному аналізі та біології» (2019-2021 рр., державний реєстраційний номер (0119U002207).

Загальний обсяг дисертаційної роботи становить 300 сторінок друкованого тексту, що складається із вступу, п'яти розділів, висновків, списку використаних джерел, що налічує 242 найменування і 8 додатків. Дисертація містить 75 таблиць і 80 рисунків.

У **вступі** обґрунтовано актуальність теми дисертації, визначено мету і задачі роботи, сформульовано об'єкт та предмет дослідження, зазначено наукову новизну та практичне значення одержаних результатів.

У **першому розділі** проведено огляд літературних даних стосовно фізичних, хімічних та лікувальних властивостей антибіотиків (АН), розглянуто основні методи кількісного визначення амоксициліну (АМ), окситетрацикліну (ОТЦ), цефтріаксону (ЦЕФТР), цефтазидиму (ЦЕФТ) та детально проаналізовано відомі спектрофотометричні (СФ) та вольтамперометричні (ВА) методики. Також проаналізовано фізичні та хіміко-аналітичні характеристики реагентів: сульфаніламід (САМ), сульфатіазол (СТЗ), 1-діазо-2-нафтол-4-сульфо кислота (ДНСК), фуксин (Фукс), резорцин (Рез), 2-метилфенол (2-Мет) та 8-оксихінолін (8-Окс). Обґрунтовано переваги використання спектрофотометрії та вольтамперометрії для визначення АН.

У **другому розділі** описано методики виконання експериментальних досліджень, приготування та стандартизації вихідних і робочих розчинів, охарактеризовано обладнання, яке використовували в роботі.

У **третьому розділі** дисертаційної роботи обґрунтовано та експериментально доведено можливість застосування реакції азосполучення в аналізі β -лактамних (АМ, ЦЕФТ та ЦЕФТР) та тетрациклінових (ОТЦ) антибіотиків з метою отримання аналітичних форм для їх спектрофотометричного визначення.

Встановлено оптимальні умови проведення реакцій діазотування реагентів САМ, СТЗ та Фукс: природу та концентрацію кислоти – 0,6–1,0 М хлоридна кислота, концентрацію діазотуючого реагенту – 15-кратний надлишок натрій нітриту відносно концентрації САМ та СТЗ; 10-кратний надлишок відносно концентрації Фукс; тривалість реакції діазотування – 10–20 хв. Досліджено умови максимального виходу забарвлених азосполук діазосолей реагентів з досліджуваними антибіотиками АМ та ОТЦ: кислотність середовища для азосполук САМ–АМ, СТЗ–АМ, Фукс–ОТЦ – рН 10,5, ДНСК–ОТЦ – середовище 10,0 М NaOH; надлишок реагенту для отримання азосполук САМ–АМ та СТЗ–АМ – 5-кратний, ДНСК–ОТЦ – 2,5-кратний, для азосполуки Фукс–ОТЦ – 1,33-кратний надлишок ОТЦ стосовно Фукс. Вивчено стійкість

утворених азосполук сполук АМ–САМ (СТЗ) – 10 хв; ОТЦ–Фукус – 3 год, ОТЦ–ДНСК – 10 хв.

Вивчено оптимальні умови діазотування цефалоспоринових антибіотиків ЦЕФТ та ЦЕФТР: концентрація хлоридної кислоти – 12,0 М; концентрація діазотуючого реагенту – 10-кратний надлишок відносно концентрації АН. Досліджено умови максимального виходу забарвлених сполук діазосолей ЦА з реагентами: лужне середовище з кінцевою концентрацією NaOH 0,16 М; надлишок реагенту – 7-кратний для взаємодії ЦА з 8-Окс; 10-кратний у випадку азосполучення ЦА з 2-Мет та ЦЕФТ з Рез. Вивчено стійкість утворених азосполук ЦЕФТ–8-Окс (Рез, 2-Мет) та ЦЕФТР–8-Окс (2-Мет) – 1 год.

Четвертий розділ містить описи нових розроблених методик СФ визначення АМ, ОТЦ, ЦЕФТ, ЦЕФТР та їхні метрологічні характеристики. Найменша межа виявлення характерна для методик визначення: АМ з СТЗ, $C_{\min} = 6,0 \cdot 10^{-7}$ М; ОТЦ з фуксином, $C_{\min} = 3,17 \cdot 10^{-6}$ М; ЦЕФТ з 2-Мет, $C_{\min} = 5,7 \cdot 10^{-7}$ М; ЦЕФТР з 2-Мет, $C_{\min} = 4,3 \cdot 10^{-7}$ М. Запропоновані методики чутливі, селективні, доволі експресні, час проведення аналізу (10–30 хв). Усі розроблені СФ методики визначення АН успішно апробовані на модельних розчинах методом «уведено-знайдено», а методику визначення АМ із САМ під час аналізу водопровідної води.

На підставі одержаних результатів розроблено методики СФ визначення АМ за реакцією азосполучення із діазотованими сульфаніламидами у таблетках “Амоксил” та “Амоксиклав Квіктаб”, порошку для приготування оральної суспензії “Оспамокс”, суспензії для ін’єкцій “Амоксицилін 15% L.A.”; методики спектрофотометричного визначення ОТЦ за реакцією азосполучення із діазотованим фуксином та 1-діазо-2-нафтол-4-сульфо кислотою у порошках для перорального застосування “Окситетрациклін НСІ”, “Бровасептол” та розчині для ін’єкцій “Окси-100”; методики фотометричного визначення ЦЕФТР за реакцією азосполучення із 8-Окс та 2-Мет в порошках для приготування ін’єкційних розчинів “Цефтриаксон” і “ЕМСЕФ 1000” та ЦЕФТ за реакцією азосполучення із 8-оксихіноліном, резорцином та 2-метилфенолом – “Цефтазидим” та “Денізид”. Методики визначення АМ з САМ, СТЗ та ЦЕФТР з 8-Окс валідовано згідно вимог ДФУ.

У **п’ятому розділі** висвітлено можливість застосування азосполуки АМ з сіллю арендізонію САМ, а також азоіміносполуки на основі ЦЕФТР для розробки методик ВА визначення АМ та ЦЕФТР. Вивчено, що азоіміносполука ЦЕФТР відновлюється за $E_k^{n1} = -0,64$ В, а азосполука АМ–САМ за $E_k^{n2} = -0,55$. На основі проведених досліджень розроблено нові вольтамперометричні методики визначення АМ та ЦЕФТР та розраховано їх метрологічні характеристики, зокрема, для АМ, $C_{\min} = 2,4 \cdot 10^{-7}$ М, а для ЦЕФТР, $C_{\min} = 2,3 \cdot 10^{-6}$ М. Методику ВА визначення АМ за реакцією азосполучення із САМ успішно апробовано та валідовано під час аналізу таблеток “Амоксил” та порошку для приготування оральної суспензії “Оспамокс”. Також розроблено методику ВА

визначення ЦЕФТР за реакцією власного азосполучення та успішно апробовано під час аналізу порошку для приготування ін'єкційного розчину "Цефтриаксон".

2. Обґрунтованість наукових положень, висновків та рекомендацій, сформульованих в дисертації. Наукова новизна одержаних результатів

Дисертаційна робота добре продумана і спланована, експериментальна частина роботи виконана коректно, що у поєднанні із сучасними методами дослідження і сучасного лабораторного обладнання є запорукою достовірності одержаних результатів.

При апробації методик визначення відновників, автор проводить статистичну обробку результатів дослідження, правильність одержаних результатів підтверджується методом «введено-знайдено» та порівняння одержаних результатів із даними ВЕРХ. Порівнювалися результати визначення антибіотиків, які одержані з використанням спектрофотометрії та вольтамперометрії. Тому, обґрунтованість наукових положень і висновків дисертації не викликає сумніву.

Узагальнення одержаних результатів із урахуванням наукової новизни дозволяє стверджувати, що у дисертаційній роботі Костів О.І. вирішено актуальне аналітичне завдання – розширення аналітичних можливостей спектрофотометрії та вольтамперометрії для визначення β -лактамних та тетрациклінових антибіотиків із використанням реакції азосполучення. Це дозволило автору розробити конкурентоспроможні методики визначення антибіотиків, які мають достатню чутливість, прийнятну селективність і задовільні метрологічні характеристики.

У дисертаційній роботі Костів О.І. **вперше:**

- запропоновано використання реакції азосполучення АМ з діазотованим сульфатіазолом та сульфаніламідом, ОЦЗ з 1-діазо-2-нафтол-4-сульфо кислотою та діазотованим фуксином, діазотованого ЦЕФТ з резорцином, 8-оксихіноліном, 2-метилфенолом та діазотованого ЦЕФТР з 8-Окс і 2-Мет для розробки методик СФ визначення АН у одно- та багатокомпонентних лікарських засобах;

- вивчено оптимальні умови діазотування реагентів (САМ, СТЗ та Фукс) для подальшого азосполучення з АМ та ОЦТ відповідно та цефалоспоринових антибіотиків (ЦЕФТ та ЦЕФТР) для подальшої взаємодії з 8-Окс, 2-Мет і Рез, зокрема: природу та концентрацію кислоти як середовища діазотування, надлишок діазотуючого реагенту натрій нітриту та тривалість діазотування;

- вивчено оптимальні умови азосполучення ДНСК, діазосолей Фукс, САМ та СТЗ з АН, та діазосолей цефалоспоринових антибіотиків із фенольними реагентами, зокрема, кислотність середовища взаємодії, надлишок реагенту, вплив сторонніх електролітів для отримання максимального аналітичного сигналу, що в свою чергу, дало змогу одержати ефективні кольорові аналітичні форми антибіотиків з реагентами, розрахувати для них $\bar{\epsilon}_\lambda$ та розробити методики кількісного визначення цих АН;

- досліджено електрохімічну поведінку АМ та продукту його азосполучення з діазотованим САМ і запропоновано схему електродного процесу відновлення утвореної азосполуки та розроблено і валідовано ВА методику визначення АМ у лікарських засобах;

- вивчено електрохімічну поведінку продукту власного азосполучення діазотованого цефтріаксону та показано можливість його використання для ВА визначення ЦЕФТР.

Новизна та оригінальність розробленої ВА методики визначення АМ з сульфаніламідом підтверджена патентом України на винахід "Спосіб вольтамперометричного визначення амоксициліну у фармацевтичних препаратах".

3. Повнота викладених основних результатів дисертації у наукових виданнях з урахуванням встановлених вимог, апробація результатів роботи

Результати дисертаційної роботи Костів О.І. достатньо повно відображені у наукових публікаціях автора. За результатами роботи опубліковано 5 статей у наукових фахових виданнях, серед них 3 у журналах, які індексуються міжнародними наукометричними базами Scopus і Web of Science, один патент України на винахід.

Результати роботи апробовані на 14 наукових конференціях різного рівня.

4. Значущість висновків здобувача для науки та практики, можливі конкретні шляхи використання результатів досліджень

Дисертаційна робота має як теоретичне, так і практичне значення. На підставі проведених експериментальних досліджень розроблено прості, селективні спектрофотометричні методики визначення АМ з діазотованими сульфаніламидами (СА), ОТЦ з діазотованим Фукс та ДНСК, а також ЦЕФТР за допомогою 8-Окс та 2-Мет і ЦЕФТ з використанням Рез, 8-Окс та 2-Мет, що переважають відомі аналоги за експресністю (10–40 хв) та співмірні за чутливістю з найчутливішими методиками СФ визначення цих біологічно активних речовин. Також розроблені чутливі ВА методики визначення АМ за реакцією азосполучення із діазотованим САМ та ЦЕФТР за продуктом власного азосполучення.

Розроблені методики успішно апробовано під час аналізу одно- та багатокомпонентних лікарських форм (таблеток, пероральних та ін'єкційних порошоків і суспензій). Результати аналізу порівнювали з результатами наведеними у сертифікатах якості відповідних препаратів. Окремі методики було валідовано згідно вимог Державної фармакопеї України (ДФУ), зокрема СФ методики визначення амоксициліну з САМ і СТЗ, цефтріаксону з 8-Окс та ВА методику визначення амоксициліну із САМ. Окремі матеріали дисертаційної роботи впроваджено у практику аналітичних лабораторій. Розроблену методику СФ визначення АМ у таблетках "Амоксиклав квіктаб" за реакцією азосполучення із діазотованим САМ впроваджено у лабораторний практикум дисципліни "Аналіз лікарських засобів" для студентів освітнього

рівня “магістр” хімічного факультету Львівського національного університету імені Івана Франка. Методики спектрофотометричного визначення ОТЦ за реакцією азосполучення із діазотованим Фукс та ДНСК впроваджено у практику лабораторії високоефективної рідинної хроматографії ДНДКІ ветеринарних препаратів та кормових добавок, м. Львів.

5. Зауваження, питання та побажання до змісту дисертаційної роботи та її оформлення

1. На мою думку, мета роботи сформульована не коректно. Автор дисертації представляє мету роботи як розробка методик визначення антибіотиків, що є невірним. Метою роботи повинно бути вивчення процесів або явищ ..., а розробка методик – це є результат проведених досліджень.

2. При представленні хроматографічних методів визначення антибіотиків (додаток Б, таблиця Б 1), не наведено хіміко-аналітичних характеристик цих методик, тоді як при описі методик з використанням інших методів вони наведені.

3. Зауваження по метрології:

- табл. 3.2, 3.5, 3.7, 3.8, 3.10. Представляються деякі спектрофотометричні характеристики аналітичних форм (продуктів азосполучення), але при цьому не вказано кількість паралельних досліджень (*n*) при визначенні молярного коефіцієнту світлопоглинання;

- табл. 4.6-4.8. Представлені результати визначення антибіотиків одержані методом «введено-знайдено»? Не зазначено, також, як усували заважаючий вплив деяких речовин;

- при представленні результатів спектрофотометричного визначення антибіотиків у модельних розчинах (табл. 4.9) та водах (табл. 4.10) слід було навести «ступінь визначення (recovery)»;

- деякі дані щодо значень довірливих інтервалів і відносного стандартного відхилення (табл. 4.11-4.13, 5.7) не узгоджуються;

- вважаю не коректним порівнювати результати визначення амоксициліну у лікарських препаратах (табл. 5.7), адже і спектрофотометричний, і вольтамперометричний метод був запропонований автором.

4. Слід було обґрунтувати вибір методу ізомолярних серій (використовується виключно у випадках, коли утворюється лише сполука одного складу) для визначення складу утворених азосполук. Тим більше, що на рис. 3.22а для сульфатіазолу, склад є неоднозначним. Більше того, з даних рис. 3.22 видно, що утворені сполуки є нестійкими, про що автор не згадує. Аналогічно і для рис. 3.42б, адже склад сполуки системи ЦЕФТР-2-метилфенол також є неоднозначним.

5. Основний пункт висновків. У ньому слід було чітко зазначити, яка наукова задача (завдання) вирішена у дисертаційній роботі.

6. Зауваження по оформленню роботи:

- при представленні фізико-хімічних характеристик досліджуваних антибіотиків (табл. 1.1), молекулярна маса сполук представлена у г/моль. У г/моль представляють молярну (М) масу речовин;

- у схемі взаємодії фуксину з ОТЦ (рис. 3.26, с. 97) ймовірно пропущений коефіцієнт 3, який відноситься до окситетрацикліну;

- на деяких графіках (наприклад, рис. 3.31б, 3.32, тощо) зазначаються від'ємні значення оптичної густини, на рис. 3.36 – від'ємні значення часу, тощо;

- термін «специфічність спектрофотометричного визначення ...» (назва п. 4.2) є некоректним. Вважаю, що повинно бути «селективність спектрофотометричного визначення ...».

Виказані зауваження не є принциповими. Вони не стосуються основних положень дисертації і не зменшують наукової значимості дисертаційної роботи Костів Оксани Ігорівни.

6. Загальний висновок по дисертаційній роботі

В цілому, дисертаційна робота Костів О.І. «*Реакція азосполучення в аналізі β-лактамних та тетрациклінових антибіотиків*», яка представлена на здобуття наукового ступеня доктора філософії (спеціальність 102 – Хімія, галузь знань 10 – Природничі науки) є завершеним та цілісним науковим дослідженням. За актуальністю, науковою новизною, обсягом проведених досліджень, достовірністю отриманих висновків та практичною значимістю дисертаційна робота відповідає вимогам нормативних актів щодо дисертацій, зокрема Тимчасовому порядку присудження ступеня доктора філософії, затвердженого постановою Кабінету Міністрів України від 06.03.2019 року № 167 (із змінами від 21.10.2020 р., № 979 та від 09.06.2021 р., № 608), а її автор, Костів Оксана Ігорівна, заслуговує присудження їй наукового ступеня доктора філософії.

Офіційний опонент:

Завідувач кафедри екології та охорони
навколишнього середовища ДВНЗ
«Ужгородський національний університет»,
доктор хімічних наук, професор



Сухарев С.М.

30.09.2021 р.

Підпис д.х.н., проф. Сухарева С.М. засвідчую:

Вчений секретар ДВНЗ «УжНУ»




к.т.н., доц. Мельник О.О.