

ВІДГУК

офіційного опонента на дисертаційну роботу

КОСТІВ ОКСАНИ ІГОРІВНИ

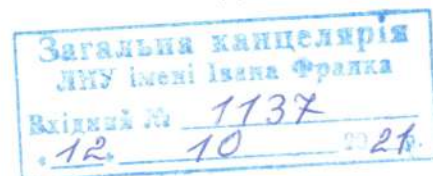
«Реакція азосполучення в аналізі β -лактамних та тетрациклінових антибіотиків»,
поданої на здобуття наукового ступеня доктора філософії у галузі 10 – Природничі
науки за спеціальністю 102 – Хімія.

1. Актуальність теми дисертації. Є декілька доказів того, що дисертаційна робота Костів О.І. має достатньо високу актуальність. По-перше, це велика необхідність того, щоб методи контролю вмісту антибіотиків у найрізноманітніших об'єктах аналізу постійно вдосконалювалися. Антибіотики належать до тих надзвичайно важливих органічних речовин, що виробляються у великих кількостях. Тільки в Україні їх виробляється щорічно біля 150 тон (50 млн пакувань). Є дані, що 42% фальсифікованих ліків це якраз антибіотики. Різноманіття видів антибіотиків є надзвичайно великим.

По-друге, спектрофотометричні (СФ) методи входять в число тих, що найширше використовуються при створенні методів визначення активних інгредієнтів лікарських препаратів. Матриця лікарських композицій є зазвичай нескладною, а інші переваги СФ методів вигідно виокремлюють їх серед інших методів. Спектрофотометрія – це найпростіший та найбільш доступний метод хімічного аналізу лікарських препаратів. Здається, що проблемою є велика існуюча кількість методик аналізу антибіотиків. Так, лише для спектрофотометричного визначення амоксициліну в базі даних Scopus міститься 101 стаття. Суттєво покращити хіміко-аналітичні властивості методик аналізу дуже важко. Але треба погодитися з автором дисертаційної роботи, що більшість цих методик має суттєві вади. Це, наприклад, необхідність нагрівати впродовж довгого часу до півгодини і більше аналізовані розчини, часто пропонуються реактиви, які є малодоступними та дорогими, умови визначення є інколи такими, що викликають питання щодо меж їх використання, рідко можна зустріти методики, які є повністю валідованими.

По-третє, в дисертаційній роботі запропоновані деякі нові підходи до розробки методик визначення антибіотиків. Це, найперше, вольтамперометричні методики, які ґрунтуються на електровідновленні азогрупи у продуктах азосполучення антибіотиків із діазосолями. Ці методики не поступаються за чутливістю спектрофотометричним, є в перспективі тими, що можуть бути автоматизованими з використанням проточних методів аналізу. Найбільшим їх недоліком є використання ртутного крапельного електроду як індикаторного, який в перспективі можна замінити на тверді електроди, враховуючи що пік відновлення азогрупи знаходиться в області робочих потенціалів таких електродів при $\sim -0,6$ В.

В роботі запропонований ряд нових реагентів для здійснення реакцій азосполучення, які вибрані серед широкодоступних, а отже й дешевих аналітичних реагентів.



Дисертаційна робота виконувалася на кафедрі аналітичної хімії Львівського національного університету імені Івана Франка відповідно до науково-тематичних планів і дербюджетних 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).

2. Загальні дані про структуру дисертації та аналіз її змісту

Дисертація Костів О.І. складається з рефератів українською та англійською мовами, вступу, п'яти розділів, загальних висновків, списку цитованої літератури, який налічує загалом 242 посилання, семи додатків, двох актів впровадження результатів роботи. Загальний об'єм роботи становить 283 сторінки. Сама робота викладена на 215 сторінках.

У вступі обґрунтовані актуальність та мета роботи, сформульовані положення наукової новизни, показано її практичне значення, розглянуто особистий внесок дисертанта в роботу.

В огляді літератури розглянуто головні відомості щодо антибіотиків пеніцилінового, цефалоспоринового та тетрациклінового рядів, зокрема щодо тих їх представників, для яких були розроблені методики визначення. Коротко розглянуті титриметричні, хроматографічні, люмінесцентні, електрохімічні методики. Більше уваги приділено спектрофотометричним методикам, але внаслідок величезної кількості таких методик частину опису виділено у додаток у таблиці Б4-Б7. Розглянуті умови перебігу та особливості механізму реакцій діазотування та азосполучення.

У другому розділі наведені відомості щодо приготування розчинів реагентів та антибіотиків, методик їх стандартизації, виконання вимірювань.

У третьому розділі докладно вивчені питання, які є центральними для дисертаційної роботи, тобто проведено дослідження реакцій отримання азосполук внаслідок взаємодії антибіотиків з рядом реагентів, оптимізовані умови визначення антибіотиків, з'ясовані деякі дані щодо механізму хімічних перетворень. Для дослідження були вибрані окремі представники пеніцилінового ряду – амоксицилін, тетрациклінового ряду – окситетрациклін, цефалоспоринового – цефтріаксон та цефтазидим. Дослідження реакцій відбувалося через класичну надійну методологію, яка включала вивчення спектрів поглинання й усіх факторів які впливали на утворення як проміжного продукту – діазосолей, так і кінцевого продукту – інтенсивно забарвленої азосполуки. Знайдені оптимальні умови можна вважати достовірними, оскільки вони враховують відомі літературні дані, є результатом систематичного дослідження всіх необхідних змінних в широкому інтервалі їх варіювання.

Як реагенти вибрані широкодоступні речовини сульфаніламід та

сульфатіазол для амоксициліну, 1-діазо-2-нафтол-4-сульфо кислота та фуксин для окситетрацикліну, 8-оксихінолін, резорцин та 2-метилфенол для цефтазидиму та цефтріаксону. Вибрані реагенти дозволили розробити методики, які не поступаються за характеристиками іншим спектрофотометричним методам визначення зазначених антибіотиків і переважають їх за окремими показниками. Розроблені методики включають проведення реакцій за кімнатної температури, більшість аналітичних форм є стабільною впродовж довгого часу, методики є високопрецизійними, відносне стандартне відхилення є біля 1% і краще, результати валідації вказують на високу робастність, нарешті вони є повністю валідованими за рекомендаціями української фармакопеї. Запронований новий прийом, який ґрунтується на вимірюванні світлопоглинання продукту власного азосполучення діазотованого цефтріаксону.

В четвертому розділі надані характеристики розроблених методик, оцінено їх селективність, наведені методики аналізу лікарських препаратів, результати валідації запропонованих методик.

В п'ятому розділі містяться результати дослідження вольтамперометричної поведінки амоксициліну та цефтріаксону. Як аналітичну форму було вибрано продукт власного азосполучення цефтріаксону, показано можливість високочутливого визначення за рахунок використання піку відновлення азогрупи. Для амоксициліну як аналітичну форму було вибрано азосполуку, яка утворюється при азосполученні з діазосіллю сульфаніламідів. Досліджено вплив кислотності, швидкості накладання напруги, порядку додавання реагентів на вигляд вольтамперограм. В вибраних умовах пік відновлення азогрупи лінійно залежить від концентрації аналіту у широкому діапазоні концентрацій.

Дисертаційна робота містить декілька додатків, які серед іншого містять відомості щодо існуючих хроматографічних, спектрофотометричних та електрохімічних методик визначення досліджених в роботі антибіотиків та валідації розроблених методик аналізу лікарських препаратів.

3. Наукова новизна дослідження та отриманих результатів

Серед найбільш вагомих наукових результатів, одержаних здобувачем, **головними вважаю такі:**

1. Значно розширено арсенал аналітичних реагентів для проведення реакцій азосполучення з антибіотиками, які містять первинну аміногрупу або фенільний гідроксил за рахунок сполук, які є широкодоступними та дешевими. Вперше запропоновані як реагенти для азосполучення сульфаніламід та сульфатіазол для амоксициліну, 1-діазо-2-нафтол-4-сульфо кислота та фуксин для окситетрацикліну, 8-оксихінолін, резорцин та 2-метилфенол для цефтазидиму та цефтріаксону. З'ясовані оптимальні умови отримання аналітичних форм, показані деякі особливості механізму реакцій діазотування та діазосполучення.

2. Вперше запропоноване використання в хімічному аналізі продуктів власного азосполучення діазотованих антибіотиків цефалоспоринового ряду.

3. Вперше досліджено і показано можливість розробки високочутливих вольтамперометричних методів визначення антибіотиків, які ґрунтуються на реакціях відновлення азогрупи у продуктах власного азосполучення цефалоспоринових антибіотиків та азосполуки, яка утворюється при азосполученні антибіотику пеніцилінового ряду з діазосіллу.

4. Практична цінність роботи

Запропоновані у роботі методики визначення антибіотиків є корисним доповненням методик спектрофотометричного визначення цих речовин, оскільки вони мають характеристики, які є на рівні кращих розроблених в літературі. Вони є високочутливими, ефективний молярний коефіцієнт є на рівні 1×10^4 моль⁻¹ л см⁻¹, не використовують нагрівання, є робастними, для них проведено повну процедуру валідації згідно з вимогами Державної фармакопеї України, що є важливим для використання в фармацевтичному аналізі. Запропоновані вперше реагенти є широкодоступними та дешевими. Вольтамперометричні методики запропоновані вперше, відрізняються високою чутливістю.

Новизна та оригінальність розробленої ВА методики визначення амоксициліну з сульфаниламідом підтверджено патентом України на винахід. Є два акти впровадження результатів, серед яких є впровадження в практику лабораторії ветеринарних та кормових добавок м. Львів.

5. Ступінь обґрунтованості наукових результатів та положень

Сформульовані в дисертаційній роботі висновки і узагальнення є коректними результатами досліджень, виконаних на високому теоретичному і експериментальному рівні. Достовірність отриманих оптимальних умов визначення антибіотиків, запропонованих схем перетворення забезпечувалася відповідністю отриманих результатів існуючим в літературі даним щодо хімізму протікання реакцій і впливу основних факторів на протікання реакції отримання діазосполук і азосполучення. Надзвичайно ретельно поставилася дисертантка до валідації методик аналізу і доказу правильності. В кожній із них проведений повний комплекс дій щодо валідації і доказу правильності та інших метрологічних характеристик: враховані вимоги основних фармакопей, у тому числі європейської, США, України та інших країн. Усі отримані результати аналізу лікарських препаратів надійно доказувалися порівнянням з якісними результатами, отриманими методом ВЕРХ та порівнянням з вмістом, гарантованим виробником.

Результати роботи пройшли значну апробацію на міжнародних конференціях і українських конференціях. За матеріалами дисертації надруковано 4 статті та патент України на винахід, з них 3 статті у журналах які реферуються базою даних Scopus, у тому числі вагома публікація в журналі Acta Chimica Slovenica (IF = 1,735). Надруковані праці у повній мірі відображають

отримані у роботі наукові результати.

Дисертаційна робота написана літературною науковою українською мовою, легко читається, логічно побудована. У роботі за дуже малим виключенням відсутні стилістичні та орфографічні помилки. При оформленні списку використаних джерел, рисунків, таблиць, решти тексту автор дотримувався існуючого ДСТУ.

Порушення академічної доброчесності у дисертації не виявлено.

6. Зауваження та загальна оцінка роботи

1. Поясніть, яким чином та за якими критеріями були підібрані аналітичні реагенти? Чи був проведений пошук серед інших сполук? Чому для визначення антибіотиків були вибрані різні реагенти?

2. У роботі стверджується, що розроблені методики переважають відомі спектрофотометричні методики за своєю простотою та селективністю. Також декларується, що запропоновані методики переважають відомі аналоги за експресністю (10-40 хв). Наведіть, будь ласка, приклади, які підтверджують це.

3. Чому вольтамперометричні вимірювання проводили тільки в режимі швидкісної розгортки потенціалу? Чи була можливість застосувати диференціально імпульсну полярографію або інші ефективні режими розгортки потенціалу? Чи є можливими вимірювання на твердих електродах? Чому не проводили вимірювання на краплі ртуті?

4. Є протиріччя між співвідношенням реагуючих речовин 1 : 1, яке було отриманим за методом Жоба-Остромисленського і схемою взаємодії між фуксином та окситетрацикліном на рис. 3.26, де приєднується три молекули антибіотику.

5. Для доказу імовірної схеми реакцій при утворенні діазосполук було б корисно використовувати фізико-хімічні методи дослідження (ІЧ, ПМР), але цього не було зроблено. Чому? Одних лише даних електрохімічного відновлення недостатньо для більш-менш точної ідентифікації продуктів реакції та проміжних речовин.

6. Чому визначенню окситетрацикліну не заважає 10-разовий надлишок норсульфазолу, хоча він має у своїй структурі ароматичну аміногрупу? Теж саме відноситься до сульгіну, триметоприму.

7. Чи можливо визначати амоксицилін та цефтриаксон електрохімічно з використанням відновлення самих препаратів без введення азогрупи? Можливо тоді клавуланова кислота не заважала б? Які переваги електрохімічного визначення за азогрупою у порівнянні з іншими можливими способами проведення такого аналізу? Якими є переваги вольтамперометричного методу у порівнянні зі СФ?

8. Чому права гілка кривої методу ізомолярних серій не перетинає ось абсцис при 0 при екстраполяції? (С. 117, рис. 3.42)?

9. В роботі зустрічаються окремі помилки. Деякі рисунки є замалими для того, щоб побачити на них особливості спектрів поглинання чи з'ясувати при якому рН краще проводити визначення.

Вказані зауваження і запитання відносяться тільки до уточнень тих чи інших положень та висновків, зроблених у дисертації і ні в якій мірі не зменшують наукової та практичної значущості дисертаційної роботи.

Дисертаційна робота Костів О.І. «Реакція азосполучення в аналізі β -лактамних та тетрациклінових антибіотиків» є завершеною науково-дослідною роботою. За актуальністю обраної теми, новизною, практичним значенням, обсягом експериментального матеріалу, рівнем його обговорення, за змістом і оформленням, ступенем опублікування та загальним науковим рівнем робота повністю відповідає всім вимогам Міністерства освіти і науки України щодо дисертацій доктора філософії, а автор дисертаційної роботи **КОСТІВ ОКСАНА ІГОРІВНА** заслуговує на присудження їй наукового ступеня доктора філософії у галузі 10 – Природничі науки за спеціальністю 102 – Хімія.

Офіційний опонент:

Завідувач кафедри аналітичної хімії Дніпровського національного університету імені Олеся Гончара, доктор хімічних наук, професор, академік Академії наук вищої школи України

А.Б. Вишнікін

8 жовтня 2021 року

Підпис проф. Вишнікіна А.Б. засвідчую,
вчений секретар ДНУ ім. О. Гончара



Т.В. Ходанен