

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

о диссертации Немихина Василия Васильевича на тему «Определение кодеина в лекарственных препаратах и биологических объектах методами молекулярной спектроскопии», представленной на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальности 02.00.02–аналитическая химия

Актуальность тематики исследования. Определение индивидуальных органических соединений в биообъектах и лекарственных препаратах - важное направление работы контрольно-аналитических лабораторий. Особое внимание привлекают сильнодействующие лекарственные и наркотические вещества. Актуальность исследований в этой области несомненна, и число соответствующих публикаций в последние годы неуклонно растет. К этому научному направлению относится и рецензируемая диссертационная работа.

Один из самых известных алкалоидов – кодеин (3-метилморфин) определяют в фармпрепаратах, биологических жидкостях, а также в органах и тканях (в ходе криминалистической экспертизы). Методики определения кодеина в лекарственных средствах хорошо отработаны и включены в Российскую Фармакопею. Гораздо труднее определять кодеин в биообъектах, так как делать это приходится на низком концентрационном уровне и в присутствии множества мешающих веществ. Некоторые из них связывают кодеин в устойчивые соединения, другие близки кодеину по химико-аналитическим свойствам, что ведет к наложению сигналов. Известные методики определения кодеина в биообъектах включают длительную и трудоемкую пробоподготовку и хроматографическое разделение опиатов. Нередко приходится проводить дериватизацию кодеина. По организационным и экономическим соображениям такие методики не отвечают требованиям и возможностям российских контрольно-аналитических лабораторий. Для экспрессного определения кодеина иногда используют методы молекулярной спектроскопии, в частности, флуориметрию, но для определения кодеина в биообъектах их не применяют, ввиду недостаточной чувствительности и неселективности сигналов. Систематические исследования в этой области ранее не проводились.

Таким образом, поставленная диссертантом цель - *разработка молекулярно-спектроскопических методик определения кодеина в биологических жидкостях, внутренних органах человека и лекарственных препаратах* - представляется весьма актуальной, прежде всего в практическом плане. Тематика исследования актуальна и в теоретическом отношении, так как для достижения намеченной цели диссертанту необходимо было изучить флуоресценцию кодеина и его ассоциатов, а также спектры диффузного отражения кодеина и его производных. Систематические исследования в этой области ранее не проводились. Но изучению спектроскопических и других химико-аналитических свойств кодеина диссертант уделил намного меньшее внимание, чем разработке и апробации новых методик. Это указывает на прикладную направленность данной диссертационной работы.

Цель и задачи исследования. Название диссертации отвечает ее реальному содержанию. Цель исследования хорошо обоснована, правильно сформулирована и не вызывает возражений. Цель и содержание работы соответствуют научной специальности 02.00.02 — аналитическая химия (химические науки), в частности пунктам 4, 15, 16 и 17 паспорта специальности. Намеченные задачи исследования диссертантом решены. Исключением, с моей точки зрения, является задача № 3. Чтобы предложить схемы пробоподготовки, минимизирующие влияние посторонних веществ, автор должен был выяснить, какие сопутствующие кодеину вещества в наибольшей степени мешают определять его выбранными методами, какие концентрации этих веществ допустимы, а какие ведут к значимым погрешностям. Сопутствовать кодеину в реальных объектах могут и флуоресцирующие аналоги, и вещества, гасящие флуоресценцию. Однако селективность определения кодеина автор не изучал. Не исследована им и селективность взаимодействия кодеина с реактивом Драгендорфа при определении кодеина методом спектрометрии диффузного отражения (СДО). Правда, автор приводит значения R_f , которые у кодеина и морфина различаются, однако это не доказывает, что предложенные схемы пробоподготовки минимизируют влияние мешающих веществ. В отличие от других намеченных задач, задачу № 3 нельзя считать решенной (**Замечание 1**).

Структура работы. Диссертация В.В. Немихина состоит из введения, четырех глав и заключения. Работа написана довольно лаконично (120 страниц вместе со списком литературы), содержит 28 таблицы и 41 рисунок. Список литературы включает 143 источника, в том числе более 80 англоязычных. Диссертация хорошо оформлена и логично структурирована, автор использует традиционную схему. А именно, первая глава представляет собой обзор методов определения кодеина. Цитируемые источники имеют прямое отношение к теме, опубликованы преимущественно в последние годы и квалифицированно сопоставлены. Замечаний по литобзору нет. Вторая глава посвящена объектам и методам исследования, третья — изучению спектроскопических свойств кодеина. Наибольший интерес представляет четвертая глава, в которой обоснованы и изложены новые методики определения кодеина в фармпрепаратах и биообъектах, приведены результаты анализов.

Достоверность результатов. Диссертантом проведен достаточный по объему, логично спланированный и тщательно выполненный эксперимент. Сигналы кодеина получали в видимой области спектра флуориметрическим методом, а также методом спектрометрии диффузного отражения. Широко использовались экстракция и тонкослойная хроматография. Результаты сопоставлены с результатами ВЭЖХ-анализа (табл.26) и ГХ-МС-анализа (табл.28) тех же объектов. Статистическая обработка данных проведена по общепринятым схемам. Средства измерений и программное обеспечение адекватны решаемым задачам.

По проведенному эксперименту есть лишь два замечания.

1. В ходе анализа биообъектов автор применял довольно жесткие воздействия на исследуемые пробы. Растворы выпаривали досуха, обрабатывали агрессивными реагентами и т.п. Но автор не обсудил возможность возникновения систематических погрешностей в ходе пробоподготовки. Они могли быть вызваны протолизом, комплексообразованием, изомеризацией, окислением, разложением и улетучиванием кодеина. Следовало проверить сохранность кодеина в ходе пробоподготовки; убедиться, что вышеперечисленные побочные процессы не ведут к статистически значимым потерям (**замечание 2**).

2. Результаты определения кодеина в лекарственных препаратах не сопоставлены с результатами анализа тех же препаратов по фармакопейным методикам. Совпадение же результатов анализа с надписью на упаковке лекарственного препарата, на которое ссылается диссертант (табл.21 и 23) – вовсе не доказательство правильности этих результатов. На упаковках нередко (по данным ВОЗ – в 30 % случаев) производители указывают сомнительную или заведомо неверную информацию. В отсутствие стандартных образцов доказательством правильности результатов анализа может быть только их совпадение с результатами применения стандартных методик, метрологически аттестованных и включенных в Российскую Фармакопею (**замечание 3**).

В целом достоверность представленных в диссертации экспериментальных данных не вызывает сомнений, как и правильность их интерпретации. Личный вклад и высокая квалификация диссертанта очевидны. Результаты эксперимента соответствуют общепринятым теоретическим представлениям и сопоставлены с литературными данными, на которые в тексте диссертации даны необходимые ссылки. По тематике диссертационного исследования В.В. Немихин и его соавторы получили два российских патента, опубликовали 4 статьи в журналах из списка ВАК. Одна из них включена в международную БД Scopus. Результаты работы обсуждались на нескольких научных конференциях.

Обоснованность положений, вынесенных на защиту. Вынесенные на защиту положения в целом отвечают содержанию работы. Однако одно из пяти положений неправильно сформулировано. Известно, что выносить на защиту можно только результаты работы самого диссертанта (впервые выявленные закономерности, впервые установленные научные факты, новые способы синтеза или анализа, разработанные приборы или алгоритмы, научные гипотезы и т.п.). Но нельзя выносить на защиту *спектроскопические свойства кодеина* (положение 1), так как они существуют независимо от проведенного диссертантом исследования. Выносить на защиту надо было не свойства кодеина, а результаты изучения этих свойств, в частности рекомендации по способам и условиям спектрометрического измерения аналитических сигналов кодеина (**замечание 4**).

На защиту также вынесены «*условия пробоподготовки исследуемых объектов*» (положение 3). Для пробоподготовки автор использовал три известные методики экстракционно-хроматографического выделения и разделения опиатов. В.В. Немихин дал на эти методики ссылки, описал их в разделе 2.2 и применил их – после некоторой адаптации к предложенным способам измерения аналитических сигналов (см. главу 4). Возникают естественные вопросы. Почему были выбраны именно эти методики? Обеспечивают ли указанные в них условия пробоподготовки отсутствие потерь кодеина? Обеспечивают ли эти условия полноту отделения мешающих веществ? Я убежден, что выносить на защиту положение 3 можно было бы в том случае, если бы диссертант провел всестороннюю проверку известных методик на модельных смесях известного состава и доказал бы отсутствие потерь кодеина и полноту отделения мешающих веществ. Но это не сделано, поэтому выносить на защиту положение 3, по-моему, не следовало (**замечание 5**).

Выводы не вызывают серьезных замечаний. Они соответствуют содержанию работы и имеют преимущественно аннотационный характер. Естественное, дополнение этих выводов впервые выявленными закономерностями позволило бы усилить теоретическую составляющую работы, подчеркнуть ее научную новизну. Несомненно, в рецензируемой диссертации имеется материал для таких обобщений. Необходимо отметить, что предложение рецензента усилить выводы не является замечанием. Скорее, это рекомендация, относящаяся не только к настоящему, но и к будущим исследованиям В.В. Немихина.

Практическая ценность и научная новизна результатов. *Практическую ценность* имеют, прежде всего, три новые методики определения микрограммовых количеств кодеина в лекарственных препаратах и биообъектах. Эти методики являются достаточно простыми и быстрыми, не требуют сложного оборудования и труднодоступных реагентов. Методики уже используются в Красноярском бюро судебно-медицинской экспертизы (к диссертации приложен акт внедрения). Правильность получаемых результатов подтверждена как методом «введено-найдено», так и сопоставлением с результатами, полученными иными методами. В тексте диссертации сделан ряд полезных рекомендаций, касающихся условий измерения аналитических сигналов (в отдельный раздел они не выделены). Следовало бы только дополнительно указать общие затраты времени на проведение единичного анализа, а также рассчитать метрологические характеристики новых методик (показатели сходимости, правильности и т.п.), как того требуют нормативные документы, регламентирующие процедуру метрологической аттестации новых методик химического анализа (**замечание 6**).

Разработанные В.В.Немихиным методики определения кодеина в биологических жидкостях, органах и тканях, с моей точки зрения, являются главным достижением диссертанта. После метрологической аттестации и внесения в Федеральный реестр эти методики

можно будет рекомендовать в качестве стандартных для использования в контрольно-аналитических лабораториях судебно-медицинского профиля, а также для проведения фармакокинетических и фармакодинамических исследований в соответствующих НИИ.

Для меня несомненна и *научная значимость* результатов, полученных В.В. Немихиным. С моей точки зрения, она заключается, прежде всего, в обосновании возможности применения метода СДО в биофармацевтическом анализе, а также в экспериментальном подтверждении такой возможности. СДО-методики определения алкалоидов в биообъектах мне не известны, специально проведенный поиск в Интернете их также не выявил. Естественно, простой, точный и очень чувствительный метод СДО пригоден не только для определения кодеина, он пригоден для определения многих органических микропримесей в различных биообъектах. Интерес для аналитической химии представляют также результаты изучения взаимодействия кодеина с эозином с образованием хорошо экстрагируемого и интенсивно флуоресцирующего комплекса. Впервые получены данные о влиянии pH, природы растворителя, избытка реагента и других факторов на флуоресценцию ассоциата кодеина с эозином. Можно указать и некоторые другие факты и закономерности, содержащиеся в диссертации В.В. Немихина и отвечающие критерию научной новизны.

К сожалению, во «Введении» диссертант охарактеризовал научную новизну своей работы не лучшим образом, вышеуказанные элементы новизны там не отмечены (**замечание 7**). А присутствующее в разделе «Научная новизна» утверждение «Впервые систематически изучены спектроскопические свойства кодеина...» ошибочно, поскольку диссертант изучал только флуоресценцию растворов кодеина и не занимался другими спектроскопическими свойствами этого вещества. Нельзя согласиться и с утверждением, что получение патентов подтверждает научную новизну проведенного исследования. Патенты указывает на другие достоинства работы, а именно на оригинальность и полезность предложенных технических решений. Известно, что многие крупные научные достижения (например, Периодический закон или теория относительности) не патентовались, и наоборот, запатентовано множество полезных технических решений, не обладающих научной новизной и научной значимостью.

Заключение. Изучение диссертационной работы позволяет сделать следующие выводы:

1. Рецензируемая работа выполнена по актуальной тематике и является завершенным научным исследованием. Содержание и результаты работы полностью соответствуют специальности 02.00.02 (химические науки). Работа имеет внутреннее единство, цель работы достигнута. Не вызывает сомнений личный вклад диссертанта в достижение цели. Положения, выносимые на защиту, выводы и рекомендации, сформулированные в диссертации, в целом оригинальны и обоснованы, хотя и содержат некоторые неточности. Однако соответствующие замечания рецензента не меняют общую высокую оценку работы В.В. Немихина.

2. Диссертация и автореферат оформлены согласно требованиям действующих нормативных документов и не включают данные, запрещенные к публикации в открытой печати. Основные результаты исследования опубликованы в виде 4 статей в рецензируемых научных журналах. Содержание автореферата отвечает содержанию диссертации.

3. Диссертантом проведен логично спланированный эксперимент, в ходе которого установлен целый ряд ранее не известных фактов и закономерностей, относящихся к флуориметрическим и спектрофотометрическим методам определения кодеина, а также их применению в количественном анализе лекарственных препаратов и биообъектов. Полученные данные представляются достоверными и правильно интерпретированными.

4. Результаты исследования имеют преимущественно прикладной характер. Разработанные методики определения кодеина могут найти широкое применение в контрольно-аналитических и научно-исследовательских лабораториях. Работа В.В. Немихина имеет несомненную научную новизну, которая, к сожалению, не полностью раскрыта диссертантом. Целесообразно развитие данного научного направления, в частности развитие метода СДО для определения микропримесей лекарственных и наркотических веществ в биообъектах.

Считаю, что диссертационная работа В.В.Немихина является научно-квалификационной работой, в которой содержится решение научной задачи, имеющей значение для развития соответствующей отрасли знаний. Диссертация В.В.Немихина полностью соответствует критериям, изложенным в пункте 9 "Положения о порядке присуждения ученых степеней", утвержденного постановлением № 842 правительства РФ от 24 сентября 2013 г., с учетом последующих официальных дополнений и изменений. Автор диссертации – Василий Васильевич Немихин – является высококвалифицированным специалистом, сложившимся исследователем-аналитиком. Ему может и должна быть присуждена ученая степень кандидата химических наук по специальности 02.00.02.

Доктор химических наук (специальность 02.00.02 - Аналитическая химия), заслуженный работник высшей школы РФ, профессор

В.И. ВЕРШИНИН

25 июля 2018 г.

Подпись В.И.Вершинина заверяю

Ректор ОмГУ, профессор

А.В. Якуб

Вершинин Вячеслав Исаакович. Почтовый адрес: 644077, г. Омск, проспект Мира, 57, корпус 1, кв.43. Электронный адрес: vyvershinin@yandex.ru. Телефон +7 3812 642485 (раб.), +7 3812 641101 (дом.) Место работы - ФГБОУ ВО «Омский государственный университет им. Ф.М. Достоевского», профессор кафедры аналитической химии.