

ОТЗЫВ

официального оппонента, доктора фармацевтических наук, генерального директора ООО «Центр Фармацевтической Аналитики» **Шохина Игоря Евгеньевича** на диссертационную работу **Мельник Елизаветы Валерьевны** на тему *«Разработка методики определения алкалоидов чемерицы в биологических объектах и лекарственных препаратах методом ВЭЖХ-МС/МС»*, представленной на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук по специальности 14.04.02 – Фармацевтическая химия, фармакогнозия.

Актуальность темы исследования

Лекарственное растительное сырье «Чемерицы Лобеля корневища с корнями» (*Veratri Lobeliani rhizomata cum radicibus*) вновь представлено в ГФ XIV издания (ФС.2.5.0104.18) взамен фармакопейной статьи ГФ IX издания (ст. 418). В настоящее время в России проводятся исследования по усовершенствованию методик, используемых для оценки качества как самого ЛРС, так и лекарственного препарата на его основе («Чемеричная вода»). Данный препарат включен в Государственный реестр лекарственных средств и используется наружно в качестве противопаразитарного средства. Однако на сегодняшний день отсутствуют специфические методики определения индивидуальных соединений в составе ЛРС и препарата на его основе инструментальными методами анализа, которые могли бы быть использованы при проведении контроля качества.

Лабораторное подтверждение отравлений алкалоидами чемерицы представляет трудность во всем мире вследствие их присутствия в биологических образцах пострадавших в пикограммовых количествах, а также различного алкалоидного состава представителей рода Чемерица. В России данная проблема стоит особенно остро, так как лекарственный препарат «Чемеричная вода» находится в свободном безрецептурном доступе и принимается внутрь как по неосторожности, так и намеренно с различными целями (употребление спиртосодержащей продукции, домашнее лечение алкоголизма, попытка суицида). При этом, постановка диагноза отравления

алкалоидами чемерицы основывается на анамнестических данных, что может затруднять оказание специализированной медицинской помощи пострадавшим.

В связи с изложенным выше, актуальность диссертационного исследования Мельник Елизаветы Валерьевны не вызывает сомнения.

Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации

Научные положения диссертационной работы Мельник Е.В. основаны на результатах проведенных экспериментов с использованием современных физико-химических методов анализа (ВЭЖХ с тандемным масс-спектрометрическим и диодно-матричным детектированием). Цель исследования полностью отражена в поставленных задачах. Научные выводы основаны на достаточном объеме диссертационного материала, являются достоверными и логически вытекают из результатов исследования.

Основные результаты диссертационной работы апробированы на международных научно-практических конференциях: 41 Конгресс Европейской Ассоциации Центров Острых Отравлений и Клинических Токсикологов (41st EAPCCT Congress, онлайн, 2021), III международная научная конференция «IPharmS Annual Conference» (Иран, онлайн, 2021), I Международный симпозиум «2020 China-Russia Young Scholars Symposium» (Москва, онлайн, 2020).

По теме диссертации опубликовано 5 научных работ, из них 4 статьи опубликованы в изданиях, индексируемых в международных базах данных (Scopus, Web of Science, Chemical Abstracts, в том числе 1 статья в издании квартиля Q1 (Scopus) и 2 статьи в журналах, включенных в перечень ВАК Министерства науки и высшего образования РФ.

Достоверность полученных результатов и научная новизна исследования

Достоверность полученных результатов обеспечена проведением требуемого количества экспериментальных исследований с применением современных инструментальных методов анализа (ВЭЖХ-МС/МС, ВЭЖХ-ДАД). Проведенные процедуры валидации доказали пригодность разработанных методик для идентификации и количественной оценки содержания алкалоидов чемерицы в биологических объектах и лекарственном препарате «Чемеричная вода».

В диссертационной работе впервые разработана методика обнаружения алкалоидов иервина, протовератринов А и В в лекарственном препарате «Чемеричная вода» и биологических объектах (плазма крови, моча) методом ВЭЖХ-МС/МС. Помимо этого, разработана и валидирована методика количественного определения иервина методом ВЭЖХ-ДАД в данном препарате. При помощи вышеуказанных методик изучен качественный и количественный состав алкалоидов чемерицы в лекарственном препарате «Чемеричная вода».

Представлены и систематизированы данные по числу острых отравлений алкалоидами чемерицы на территории 5 субъектов Российской Федерации (г. Москва, г. Санкт-Петербург, г. Омск, г. Чита, ХМАО-Югра). Разработана простая и быстрая методика пробоподготовки для выделения алкалоидов чемерицы из плазмы крови и мочи. Валидирована методика количественного определения иервина и протовератрина А в плазме крови и моче методом ВЭЖХ-МС/МС, использованная для описания элиминации этих алкалоидов в организме госпитализированных пациентов в процессе проводимого лечения. Определено содержание иервина и протовератрина А в плазме крови крыс при моделировании острого отравления лекарственным препаратом «Чемеричная вода».

Значимость полученных результатов для науки и практики

Разработанная и валидированная методика определения иервина в лекарственном препарате «Чемерицная вода» методом ВЭЖХ-ДАД может быть использована в контрольно-аналитических лабораториях для проведения контроля качества данного препарата. Данная методика также может быть применена для анализа лекарственного растительного сырья чемерицы Лобеля, а также фармацевтической субстанции «Настойка чемерицы» с целью осуществления принципа «сквозной» стандартизации.

Полученные результаты исследования используются в практическом здравоохранении: методика идентификации иервина, проточератринов А и В в плазме крови и моче внедрена в работу отделения острых отравлений и соматопсихиатрических расстройств ГБУЗ «НИИ скорой помощи им. Н.В. Склифосовского ДЗМ», а также Химико-токсикологической лаборатории Референс-центра по мониторингу потребления ПАВ (филиал) ГБУЗ «МНПЦ наркологии ДЗМ».

Структура и содержание диссертации

Диссертационная работа написана в соответствии с требованиями ВАК Российской Федерации ГОСТ Р 7.0.11-2011, изложена на 123 страницах машинописного текста и включает введение, 4 главы, общие выводы, список сокращений и список литературы (101 источник, из которых 78 иностранных).

Во введении обоснована актуальность темы диссертационной работы, научная новизна, теоретическая и практическая значимость, сформулированы цель и задачи исследования, описаны основные положения, выносимые на защиту, представлены сведения о внедрении результатов исследования, а также публикациях по теме работы и апробации полученных результатов.

В первой главе приводится обзор литературы. Автором подробно рассматривается актуальность разработки биоаналитической методики определения алкалоидов чемерицы для целей химико-токсикологического анализа, а также аналитической методики определения индивидуального

компонента в составе препарата «Чемерицная вода» для целей контроля качества. Проведен сравнительный анализ описанных в литературе методик определения алкалоидов чемерицы в биологических объектах и лекарственном растительном сырье.

Во второй главе представлены материалы и методы исследования с указанием реактивов и исследуемых образцов, основного и вспомогательного оборудования, методики приготовления исходных и рабочих стандартных растворов. Помимо этого, описан дизайн исследования по моделированию острого отравления лекарственным препаратом «Чемерицная вода», при котором были получены образцы плазмы крови, использовавшиеся в работе.

В третьей главе описан проведенный статистический анализ острых отравлений алкалоидами чемерицы в 5 субъектах Российской Федерации. Автором подробно представлен процесс выбора основных алкалоидов чемерицы как целевых соединений для разработки и валидации методик их обнаружения и количественного определения в лекарственных препаратах и биологических объектах. Предложены оптимизированные параметры хроматографического разделения и масс-спектрометрического детектирования трех основных алкалоидов чемерицы Лобеля, описаны условия определения иервина методом ВЭЖХ-ДАД, обоснован выбор способа пробоподготовки биологических образцов. Приведены валидационные данные для разработанных методик.

В четвертой главе автором подробно описано применение валидированной методики определения алкалоидов чемерицы в плазме крови и моче госпитализированных пациентов в г. Москва, что подтверждает ее практическую значимость.

Достоинства и недостатки в содержании и оформлении диссертации

В качестве достоинства диссертационной работы Мельник Е.В. следует отметить ее логичность и последовательность. Диссертантом проведена не

только разработка аналитических методик, но и их апробация на выбранных объектах исследования, в том числе и в клинической практике.

Задачи исследования выполнены полностью, общие выводы соответствуют поставленным задачам исследования. Принципиальных замечаний по структуре и содержанию диссертационной работы нет.

Несмотря на общее положительное впечатление от работы, при ее рассмотрении возникли следующие вопросы и замечания:

1. В разделе 2.6 не приведены такие детали исследования моделирования острого отравления как: используемый антикоагулянт для отбора крови, время центрифугирования, время между отбором крови и центрифугированием.

2. Пояснить несоответствие условий естественного хранения образцов после проведения исследования моделирования острого отравления (раздел 2.6, + 4 С) и валидации методики по показателю «стабильность» (раздел 3.4.2.8) в условиях естественного хранения (исследовалась краткосрочная стабильность аналитов в биологической матрице в условиях хранения в течение 6 часов при комнатной температуре и долгосрочная стабильность в условиях хранения при температуре -20°C в течение 4 недель).

3. Пояснить несоответствие и возможность использования интактной плазмы крови человека при валидации методики количественного определения иервина и протовератрина А в плазме крови крыс в расширенном диапазоне концентраций (раздел 3.4.3), хотя Руководства, на которые ссылается диссертант (FDA, 2018 и РЦСМЭ, 2014) не предусматривают возможность замены матрицы для валидации по сравнению с исследуемым образцами «вследствие недоступности достаточного объема».

4. Рекомендуется не использовать сленговый термин «бланковая плазма» для описания интактной плазмы.

5. Не приведена информация о каталожном номере коммерческих стандартных образцов, серии и сроке годности (раздел 2.2).

6. Пояснить несоответствие температурного режима морозильника, указанного в разделе 2.1 (Sanyo MDF-U2086S, - 86 °С) и условий изучения долгосрочной стабильности (- 20 °С).

Вышеперечисленные замечания и вопросы носят уточняющий характер, не снижают научно-практическую значимость и ценность проделанной работы и не влияют на общую положительную оценку работы.

Автореферат полностью соответствует содержанию диссертационного исследования.

Научные положения диссертации соответствуют паспорту специальности 14.04.02 – Фармацевтическая химия, фармакогнозия. Полученные результаты исследования соответствуют области исследования по данной специальности, конкретно пунктам 4 и 6 паспорта «Фармацевтическая химия, фармакогнозия».

Заключение

Таким образом, диссертация Мельник Елизаветы Валерьевны на тему «Разработка методики определения алкалоидов чемерицы в биологических объектах и лекарственных препаратах методом ВЭЖХ-МС/МС», представленная на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук, является законченной научно-квалификационной работой, в которой содержится решение задачи по инструментальному определению индивидуальных алкалоидов чемерицы как в лекарственном препарате «Чемеричная вода», так и в биологических объектах в случае острого отравления.

Диссертационная работа Мельник Е.В. полностью соответствует требованиям п. 16 Положения о присуждении ученых степеней в федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего образования Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет), утвержденного приказом ректора № 0094/Р от

31.01.2020, предъявляемым к кандидатским диссертациям, а ее автор, Мельник Елизавета Валерьевна, заслуживает присуждения искомой ученой степени кандидата фармацевтических наук по специальности 14.04.02 – Фармацевтическая химия, фармакогнозия.

Официальный оппонент

Доктор фармацевтических наук
(14.04.02 – Фармацевтическая химия, фармакогнозия),
генеральный директор ООО «Центр
Фармацевтической Аналитики»



Шохин Игорь Евгеньевич

«25» мая 2021 г.

Подпись д.фарм.н. Шохина И.Е. «Заверяю»
Уполномоченный по качеству ООО
«Центр Фармацевтической Аналитики»

Крылатова Анна Александровна

Общество с ограниченной ответственностью
«Центр Фармацевтической Аналитики»

Адрес: 117246, г. Москва, Научный проезд, д. 20, стр. 3, пом. 1, комн. 38, 39

Тел.: 8(499) 281-81-11

Электронная почта: info@cpha.ru