

Заключение комиссии Диссертационного совета 64.1.004.01 при Федеральном бюджетном учреждении науки «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека по кандидатской диссертации Колесниковой Оксаны Николаевны на тему «Оптимизация количественной оценки фенола и тиомерсала в иммунобиологических лекарственных препаратах» на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности: 1.5.6. – Биотехнология.

Научный руководитель:

Устинникова Ольга Борисовна – кандидат биологических наук (14 00 36 – аллергология и иммунология) начальник лаборатории биохимии медицинских иммунобиологических препаратов Федерального государственного бюджетного учреждения «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России).

Диссертационная работа Колесниковой О.Н. соответствует специальности: 1.5.6. – Биотехнология (биологические науки).

Работа посвящена разработке методик, позволяющих применять высокотехнологичные физико-химические методы для количественного химического анализа содержания консервантов, а именно фенола и тиомерсала, в иммунобиологических лекарственных препаратах.

В результате диссертационного исследования возможности применения метода газожидкостной хроматографии для определения фенола в составе иммунобиологических лекарственных препаратов, впервые разработана оригинальная методика с подбором типа неподвижной фазы - полиэтиленгликоль и размеров - 30 метров × 0,320 мкм, толщина пленки неподвижной фазы 0,25 микрон капиллярной хроматографической колонки, условий хроматографирования: скорости потока газа-носителя в колонке - 1,4 мл/мин, режима деления потока - 1:40, температурных условий узла ввода пробы - 250⁰С, детектора - 250⁰С, температурная программы термостата колонки: начальная температура - 160⁰С (3 мин), градиент 40⁰С/мин до температуры 200⁰С (0,6 мин), градиент 40⁰С/мин до температуры 220⁰С, хроматографируемый объем пробы - 0,5 мкл, была подобрана аналитическая область методики в концентрационном диапазоне фенола от 1,0 до 5,0 мг/мл, в качестве внутреннего стандарта выбран 2-феноксэтанол. Выбран способ расчета содержания фенола – относительно внутреннего стандарта. Методика позволяет определять фенол в присутствии компонентов матрицы иммунобиологических лекарственных препаратов и не требует проведения предварительной пробоподготовки испытуемых образцов.

В ходе исследования разработана методика, позволяющая количественно определять содержание фенола в иммунологических лекарственных препаратах с применением метода обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии. Для методики подобрана колонка с фазой С18 длиной 150 мм, диаметром 4,6 мкм, размером зерна 5 мкм, выбран способ детектирования – спектрофотометрический при длине волны 270 нм, подобран состав подвижной фазы: раствор ацетонитрила в 0,5% растворе уксусной кислоты в соотношении одна часть ацетонитрила на четыре части 0,5% раствора уксусной кислоты, скорость потока подвижной фазы 1,0 мл/мин, подобрана аналитическая область методики в диапазоне концентраций фенола от 0,05 до 0,15 мг/мл, выбран способ построения калибровочной характеристики путем изменения объемов инъекции стандартного раствора с концентрацией 0,1 мг/мл. Методика позволяет определять фенол в присутствии сложной матрицы иммунобиологических лекарственных препаратов, без предварительной пробоподготовки испытуемых образцов, при условии разведения испытуемого образца в 25 раз, объем инъекции испытуемого образца 20 мкл.

В ходе исследований разработана оригинальная методика, позволяющая количественно определять тиомерсал в иммунобиологических лекарственных препаратах по ионам ртути, методом атомно-абсорбционной спектрометрии холодного пара, методика разработана для анализаторов ртути с приточно-инжекционной системой, подобраны оригинальные условия

пробоподготовки испытуемых образцов, обеспечивающие минерализацию, органических компонентов иммунобиологических препаратов, включая ртутьорганическое соединение тиомерсал, и получение ртути в свободном состоянии, получен состав реакционной смеси для минерализации, включающий образец иммунобиологического лекарственного препарата – 25 мкл, 50% серной кислоты – 150 мкл, 5% раствора калия перманганата - 700 мкл, режим минерализации 1 час при комнатной температуре, после реакции остатки окислителя удаляются добавлением 20% раствора гидроксиламина сульфата.

Проведены валидационные исследования разработанных методик, в результате которых показано соответствие разработанных методик требованиям государственной фармакопеи РФ и ИСН к аналитическим методикам и возможность их использования в области контроля качества лекарственных препаратов.

В ходе диссертационных исследований впервые проведен статистический анализ сопоставимости результатов, полученных с использованием разработанных методик в сравнении с действующими фармакопейными методиками количественной оценки фенола. Показана сопоставимость результатов определения фенола, полученных фармакопейной спектрофотометрической методикой и разработанной методикой на основе высокоэффективной жидкостной хроматографии: среднее арифметическое значение содержания фенола составило 2,90 мг/мл – для разработанной методики на основе высокоэффективной жидкостной хроматографии и 2,94 мг/мл – для фармакопейной спектрофотометрической методики; дисперсия полученных значений составила: 0,0324 - для разработанной методики и 0,0361 – для фармакопейной; значение критерия Фишера при анализе полученных результатов составило 0,93, при критическом табличном значении 3,96, при доверительной вероятности 0,95. Сравнительный статистический анализ показал наличие статистически значимых различий результатов, полученных фармакопейной спектрофотометрической методикой и разработанной методикой на основе газожидкостной хроматографии, обусловленных более высокой прецизионностью разработанной методики: среднее арифметическое значение содержания фенола составило 3,10 мг/мл – для разработанной методики на основе газожидкостной хроматографии и 2,94 мг/мл – для фармакопейной спектрофотометрической методики; дисперсия полученных значений составила: 0,00839 - для разработанной методики и 0,0361 – для фармакопейной; значение критерия Фишера при анализе полученных результатов составило 23,01, при критическом табличном значении 3,96, при доверительной вероятности 0,95.

Впервые проведена оценка сопоставимости результатов определения тиомерсала в иммунобиологических лекарственных препаратах, полученных вновь разработанной методикой в сравнении с фармакопейной: среднее арифметическое значение содержания тиомерсала составило 89,06 мкг/мл – для разработанной методики на основе атомно-абсорбционной спектрометрии холодного пара, 87,80 мкг/мл – для фармакопейной колориметрической методики; дисперсия полученных значений составила: 23,9 - для разработанной методики и 25,6 – для фармакопейной; значение критерия Фишера при анализе полученных результатов составило 1,29, при критическом табличном значении 3,96, при доверительной вероятности 0,95.

В ходе исследований впервые разработаны и аттестованы фармакопейные стандартные образцы содержания фенола в иммунобиологических лекарственных препаратах, ФСО 3.1.00449 содержания фенола - для спектрометрии и высокоэффективной жидкостной хроматографии и ФСО 3.1.00451 содержания фенола - для газожидкостной хроматографии, предназначенные для контроля стабильности полученных результатов определения фенола при проведении испытаний иммунобиологических лекарственных препаратов с применением методик, основанных на спектрометрии, высокоэффективной жидкостной хроматографии и газожидкостной хроматографии.

Теоретическая значимость работы заключается в том, что наряду с действующими фармакопейными методиками определения консервантов фенола и тиомерсала в иммунобиологических лекарственных препаратах, основанных на спектрофотометрических и колориметрических методах количественного химического анализа, показана возможность применения методик, основанных на высокотехнологичных методах, таких как газожидкостная

хроматография, высокоэффективная жидкостная хроматография, атомно-абсорбционная спектрометрия, обеспечивающих более высокую специфичность и точность определения за счет уникальных технических возможностей методов и частичной автоматизации процесса, что повышает качество контроля иммунобиологических лекарственных препаратов на соответствие требованиям нормативных документов.

Практическая значимость работы заключается в том, что впервые разработаны новые методики, позволяющие определять фенол методами газожидкостной хроматографии и высокоэффективной жидкостной хроматографии и тиомерсал методом атомно-абсорбционной спектрометрии холодного пара, входящие в состав иммунобиологических лекарственных препаратов в качестве консервантов. Применение данных методик в практике контроля лекарственных средств будет способствовать улучшению качества контроля за счет возможностей высокотехнологических методов.

Разработанная методика определения фенола в иммунобиологических лекарственных препаратах методом высокоэффективной жидкостной хроматографии внесена в ОФС 1.7.2.0028.18 «Количественное определение фенола в биологических лекарственных препаратах» Государственной фармакопеи РФ (XIV, том 2).

Разработанная методика определения тиомерсала в иммунобиологических лекарственных препаратах методом атомно-абсорбционной внесена в ОФС 1.7.2.0025.15 «Количественное определение тиомерсала в биологических лекарственных препаратах» ГФ РФ (XIV, том 2).

Разработанные фармакопейные стандартные образцы ФСО 3.1.00449 содержания фенола - для спектрофотометрии и высокоэффективной жидкостной хроматографии и ФСО 3.1.00451 содержания фенола - для газожидкостной хроматографии, рекомендованы фармацевтическим предприятиям для контроля стабильности проведения испытаний количественного определения фенола в иммунобиологических лекарственных препаратах.

Результаты диссертационной работы внедрены в практическую деятельность фармацевтических производств. Разработанная методика количественного определения тиомерсала на основе метода атомно-абсорбционной спектрометрии холодного пара внедрена в практическую работу ФГУП Санкт-Петербургского научно-исследовательского института ФМБА России (акт внедрения от 13.03.2017). Разработанная методика количественного определения фенола в иммунобиологических лекарственных препаратах на основе метода газожидкостной хроматографии внедрена в практическую работу фармацевтической компании ООО «Гритвак» (акт внедрения от 01.11.2021).

Диссертационная работа выполнена с использованием совокупности современных и апробированных методов исследований. Достоверность полученных результатов основана на достаточном объеме выборки исследуемых образцов, применении современных и традиционных биохимических и физико-химических методов, логично сформулированными целями и задачами, корректно проведенным статистическим анализом результатов, обоснованными выводами, положениями, рекомендациями. Научные положения и выводы, сформулированные Колесниковой О.Н., логически вытекают из результатов, полученных в ходе диссертационной работы.

По объему проведенных исследований, их новизне и практической значимости работа соответствует всем требованиям, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности: 1.5.6. – Биотехнология.

Комиссия не установила в диссертации и автореферате фактов некорректного заимствования материалов без ссылок на первоисточники. Отчет о проверке на заимствования с помощью системы «Антиплагиат» на сайте www.antiplagiat.ru показал, что оригинальность текста составляет 97,16%, самоцитирование – 1,99%, цитирование 0,85%, совпадения – 0%.

Диссертация содержит достоверные сведения об опубликованных соискателем ученой степени работах, в которых изложены основные научные результаты диссертации. По материалам диссертации опубликовано 8 печатных работ, в том числе 3 - в рецензируемых

научных изданиях, 2 – в других изданиях, 2 - в материалах конференций (тезисы), 1 - патент на изобретение Российской Федерации.

Диссертация соответствует профилю Диссертационного совета 64.1.004.01.

В качестве **ведущей организации** предлагается утвердить Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт биологической промышленности» Министерства сельского хозяйства Российской Федерации (ФГБНУ «ВНИТИБП» Минсельхоза). Согласие ведущей организации имеется.

В качестве **официальных оппонентов** предлагаются:

- Шмаров Максим Михайлович - доктор биологических наук (14.03.09 – Клиническая иммунология, аллергология, 03.01.06 - Биотехнология (в том числе бионанотехнология)), руководитель лаборатории молекулярной биотехнологии федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения Российской Федерации.
- Красильников Игорь Викторович - доктор биологических наук (03.00.23 - Биотехнология), директор по науке Акционерного Общества «Развитие биотехнологий».

Согласия оппонентов имеются.

Заключение: комиссия Диссертационного совета 64.1.004.01. рекомендует диссертацию Колесниковой Оксаны Николаевны на тему «Оптимизация количественной оценки фенола и тиомерсала в иммунобиологических лекарственных препаратах» по специальности: 1.5.6 – биотехнология к приему к защите.

Заключение подготовили члены комиссии Диссертационного совета 64.1.004.01:

Председатель:

Заместитель директора по медицинской биотехнологии
ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора,
доктор биологических наук, профессор РАН,
член-корреспондент РАН

А.В. Алешкин

Члены комиссии:

Главный научный сотрудник лаборатории клинической
микробиологии и биотехнологии
ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора,
доктор медицинских наук, профессор, заслуженный деятель
науки РФ

С.С. Афанасьев

Главный научный сотрудник лаборатории диагностики и
профилактики инфекционных заболеваний
ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора,
доктор биологических наук

А.М. Затевалов

Главный научный сотрудник
лаборатории иммунобиологических препаратов
ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора,
доктор биологических наук, профессор

А.Г. Лютов