



УТВЕРЖДАЮ:

Ректор ФГБОУ ВПО

«Кубанский государственный университет»

М.Б. Астапов

"25" марта 2015 г.

О Т З Ы В

ведущей организации на диссертационную работу Осипова К. на тему «Исследование и устранение неспектральных помех при анализе биологических жидкостей и лекарственных средств методом масс-спектрометрии с индуктивно связанной плазмой», представленной на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальности 02.00.02 - аналитическая химия

Оценка актуальности темы диссертационной работы

Масс-спектрометрия с индуктивно связанной плазмой достаточно широко используется в современных клинических лабораториях, благодаря производительности современного оборудования, низких пределов обнаружения химических элементов и изотопов, возможности проведения многоэлементного анализа и др. С другой стороны, данный метод имеет и свои недостатки, важнейшими из которых являются так называемые матричные помехи – спектральные и неспектральные. При этом их влияние на результаты определения и методы борьбы с этим влиянием существенно зависят от типа образца и способа пробоподготовки, предшествующей анализу.

Диссертационная работа Осипова Константина посвящена актуальному, важному и необходимому направлению исследований в аналитической спектроскопии – разработке универсальных подходов по устранению неспектральных помех применительно к наиболее многочисленной группе масс-спектрометров с квадрупольным анализатором. В качестве объектов анализа соискателем выбраны очень сложные по степени проявления различного рода матричных влияний, спектральных и неспектральных помех - материалы биологического происхождения (цельная кровь, сыворотка, моча), специализированное питание, органические металлокомплексы и т.п. Конечная цель исследований – обеспечить в максимальной степени простоту массовых анализов проб сложного состава с использованием квадрупольных масс-

спектрометров. С этой точки зрения, представленная диссертационная работа выполнена на весьма актуальную, научно и практически значимую тему.

Новизна исследований и полученных результатов

Важным моментом проведенных исследований явилась систематизация особенностей формирования неспектральных помех при анализе биологических и лекарственных сред с использованием метода масс-спектрометрии с индуктивно связанной плазмой.

Соискателем детально изучены факторы, оказывающие наибольшее влияние на подавление аналитического сигнала при его измерении на приборе, процессы, протекающие при подаче пробы и происходящие непосредственно в плазме:

- изучены влияния операционных параметров работы масс-спектрометра и конструкции распылителя на устранение неспектральных помех;
- обоснованы критерии выбора внутреннего стандарта в исследуемых режимах работы прибора;
- обоснованы и реализованы оптимальные условия анализа биологических жидкостей при различных схемах пробоподготовки, пригодных для осуществления процедуры массового анализа;
- оценена применимость предлагаемых подходов к устранению неспектральных помех при анализе клинически значимых матриц без подбора их матрицы.

Соискателем установлена прямая взаимосвязь между различными режимами работы прибора и критериями выбора внутреннего стандарта и предложены равнозначные комбинированные подходы по полному устранению исследуемых неспектральных помех при использовании градуировочных растворов.

Несомненный научный интерес представляет разработанные соискателем универсальные подходы к устранению неспектральных помех, возникающих при определении элементов в подготовленных разными способами биологических жидкостях, обеспечивающие максимально простую процедуру массовых анализов образцов данного вида вне зависимости от их конкретного состава и происхождения.

Значение результатов диссертации для науки и производства

Соискателем проведены оригинальные исследования методом МС-ИСП очень

сложных объектов по степени проявления различного рода матричных влияний, спектральных и несектральных помех - материалы биологического происхождения (цельная кровь, сыворотка, моча), специализированное питание, органические металлокомплексы и т.п., с целью создания (с использованием квадрупольных масс-спектрометров) методик анализа проб сложного состава.

Установлены процессы, оказывающие наибольшее влияние на подавление аналитического сигнала при его измерении на приборе: процессы, протекающие при подаче пробы (поступление образца в распылитель, образование и транспортировка аэрозоля) и происходящие непосредственно в плазме (испарение, атомизация, ионизация), прямая взаимосвязь между различными режимами работы прибора и критериями выбора внутреннего стандарта.

Важным достижением диссертационного исследования является с научной и практической точки зрения разработка универсальных подходов к устранению несектральных помех, возникающих при определении элементов в подготовленных разными способами биологических жидкостях, обеспечивающие максимально простую процедуру массовых анализов образцов данного вида вне зависимости от их конкретного состава и происхождения.

Важным прикладным аспектом проведенных исследований является установление возможности и границы применимости предложенных подходов при анализе разных клинически значимых матриц (волос, специализированного лечебного питания, солянокислых и октанол-этанольных растворов платины), а также их практическая апробация.

Объем и структура диссертации

В аналитическом обзоре опубликованных данных (**глава 1**) приведены примеры использования метода МС-ИСП в анализе биологических жидкостей и лекарственных средств на основе органических комплексов. Оценены условия пробоподготовки, подходы к устранению несектральных матричных помех. Отмечено отсутствие систематики в существующих способах решения этой важной проблемы и четких рекомендаций по выбору внутреннего стандарта. Кроме того выделены три основных причины несектральных помех: влияния кислоты, сопутствующих элементов и органических веществ. Приведены данные о природе их возникновения, механизмах проявления и перечислены возможные варианты

минимизации этих помех преимущественно инструментальными способами. Подробно рассмотрен метод внутреннего стандарта (ВС) и показана противоречивость существующих рекомендаций его выбора и неоднозначность вывода о возможности применения одного единственного элемента в качестве ВС. Такое пристальное внимание этой аналитической процедуре обусловлено ее широкому использованию в качестве дополнительного способа снижения матричных влияний. В литературе не приведены рекомендации по выбору набора параметров, обеспечивающих полное устранение помех даже за счет применения так называемых «устойчивых» операционных параметров работы масс-спектрометра. Результатом проведенного обзора является формулировка задач исследований – изучение влияний различных механизмов несектральных помех на аналитический сигнал при анализе биологических проб методом МС-ИСП с квадрупольным масс-фильтром, разработка приемов снижения или полного устранения таких влияний.

В следующем разделе диссертации (**глава 2**) подробно перечислены применяемые реагенты, материалы, оборудование и методики экспериментов. Это касается объектов исследований: реальные образцы биологических жидкостей, стандартные образцы состава цельной крови, мочи, волос, лекарственных препаратов. Используемые стандартные образцы изготовлены и аттестованы в зарубежных специализированных научно-исследовательских учреждениях и это служит надежным подтверждением однозначности и корректности полученных в диссертационной работе результатов. Кроме того перечислены реагенты, используемые при изучении закономерностей пробоподготовки и исследования свойств лекарственных препаратов, моделирования состава биологических жидкостей. Для деструкции исследуемых материалов диссертант в своей работе использовал микроволновую систему и обработку ультразвуком. При проведении аналитических измерений использованы соответствующие современным требованиям масс-спектрометры: квадрупольный и высокого разрешения. Перечислены все необходимые принадлежности, способы ввода проб и регистрации аналитических сигналов.

Результаты предварительных экспериментальных исследований (**глава 3**) включают данные о характере спектральных помех, полученные в условиях

применения «стандартных», обеспечивающих максимальную чувствительность, режимов масс-спектрометров. Установлены затруднения при использовании некоторых изотопов меди, галлия и селена в присутствии матричных компонентов анализируемых биологических жидкостей. Даны рекомендации по их устранению и выбраны изотопы (всего 15 изотопов) наименее подверженные влиянию.

Было обнаружено заметное (до 25%) расхождение результатов определения ряда аналитов в образцах крови при разных способах пробоподготовки – разбавления различными составами растворителей и кислотная минерализация в МВ поле. Далее приведены результаты оптимизации этих двух методов разложения. Исследовано влияние состава разбавителей биологических жидкостей на аналитические сигналы определяемых элементов для восьми различных вариантов смесей Тритона X-100, 1-бутанола и ЭДТА в аммиачной или азотнокислой среде. Показана невозможность сделать однозначный выбор разбавителя из-за негативного влияния некоторых компонентов таких смесей на сигналы определяемых аналитов. Определены количественные параметры искажения аналитических сигналов. Сделан вывод о предпочтительном использовании в случае пробоподготовки образцов практически здоровых людей смеси Тритон X-100 – HNO_3 и Тритон X-100 – ЭДТА – HNO_3 (для всех биологических жидкостей) и 1 об.% HNO_3 (для мочи). Смеси Тритон X-100 – NH_3 и Тритон X-100 – ЭДТА – NH_3 подходят для разбавления проб пациентов, если платина не является аналитом.

Определены оптимальные режимы кислотной минерализации исследуемых биологических материалов, которые были в дальнейшем использованы при оптимизации и апробации разработанных условий МС-ИСП анализа.

По результатам предварительных экспериментов подбора и оптимизации аппаратных режимов и условий пробоподготовки диссертантом сформулирована проблема масс-спектрометрического с ИСП анализа образцов биологического происхождения: *...«В установленных автоматически программой масс-спектрометра условиях измерения с применением одного ВС даже при учете всех возможных спектральных интерференций, используя градуировку без подбора матрицы, после различной пробоподготовки биологических жидкостей невозможно правильное определение всего исследуемого набора элементов из*

одного раствора»....

В связи с этим последующие исследования соискателя были направлены на разработку подходов к устранению неспектральных помех. Она включала в себя исследование их минимизации за счет подбора инструментальных настроек прибора или замены распылителя и выработку четкой рекомендации, касающейся критерия выбора внутреннего стандарта исходя из близости его атомной массы и/или ПИ с изучением возможности применения одного единственного ВС.

По результатам проведенных экспериментов и подбора «устойчивых» значений операционных параметров Осиповым Константином сделано несколько выводов. В «стандартном» режиме работы прибора при использовании Rh в качестве ВС удалось полностью учесть влияние компонентов раствора только для аналитов с относительно низким, меньшим 9,0 эВ и близким к ПИ самого ВС, потенциалом ионизации (1). Переход к «устойчивым» значениям параметров в отсутствие ВС способствует лишь частичной минимизации неспектральных помех, но полному устранению влияния дифференциации аналитов по ПИ (2). И как следствие, вытекающее из вышеперечисленных проблем, выявлена необходимость разработки рекомендаций, касающихся критерия выбора внутреннего стандарта и выдвинута гипотеза о возможности применения одного единственного ВС при измерении в режиме «устойчивых» параметров.

Дальнейшие исследования на моноизотопных элементах во всем исследуемом диапазоне масс (от 9 до 209) с различными ПИ (Be, Co, As, Rh и Bi) показали, что при работе в «стандартном» режиме значение атомной массы ВС не является критерием выбора внутреннего стандарта. А полное устранение влияния компонентов матрицы осуществимо за счет подбора ВС, исходя из значений ПИ. При переходе же к режиму «устойчивых» параметров критерий выбора внутреннего стандарта совсем упрощается. В этом случае в качестве ВС может выступать один единственный элемент независимо от его атомной массы и ПИ. Данный подход универсален и прост в исполнении, что важно для клинической практики. Поэтому соискатель использовал этот подход для анализа реальных образцов. При этом им обосновано, для продления срока службы систем интерфейса без дополнительной их очистки, применение распылителя Бабингтона и введение 2% добавки кислорода в основной поток аргона в случае определения

элементов в разбавленных пробах.

Проверка правильности определения элементов с помощью предлагаемых подходов осуществлена на стандартных образцах состава цельной крови, мочи, волос и лечебного питания. Результаты определений удовлетворительно согласуются с аттестованными значениями содержаний всех элементов в рамках погрешности измерения, что показывает обоснованность и целесообразность использования разработанной методики анализа.

В **главе 4** представлены основные результаты применения разработанных подходов по устранению неспектральных помех для решения конкретных клинических задач. В частности, это касается определения элементов при ультрафильтрации лекарственных препаратов для получения правильных значений величины степени (**В**) и константы (**К**) связывания, когда концентрация элемента в фильтрате принимает значения, близкие к нулю или начальной введенной концентрации. Трудность такого анализа связана с уменьшением кратности разбавления растворов, а значит, и с более ярким проявлением неспектральных помех.

Кроме того, в ходе комплексного исследования биологических жидкостей пациентов с синдромом системной воспалительной реакции организма из всего набора изучаемых аналитов выбраны диагностически значимые элементы – Cu и Zn . При этом установлено, что степень понижения их содержания в цельной крови и повышенное выведение этих элементов с мочой зависит от тяжести воспалительного процесса.

Представленные в диссертационной работе аналитический обзор, результаты исследований, их обсуждение и обоснованность выводов выполнены на высоком научно-методическом уровне и не вызывают сомнений. Поставленная цель диссертационной работы достигнута, а задачи успешно решены. Разработанный комплекс применения «устойчивых» параметров работы квадрупольного масс-спектрометра с индуктивно связанной плазмой и подход к выбору элемента для внутреннего стандарта вполне работоспособен и будет способствовать его применению в клинических исследованиях, а также при анализе любых других материалов с высоким содержанием органической матрицы.

Вместе с тем, к диссертационной работе имеется ряд замечаний:

1. Одна из поставленных задач следующая: «... количественно оценить уровни неспектральных помех при разбавлении и окислительной минерализации биологических жидкостей...». В диссертационной работе приведены результаты таких исследований, но они касаются только оценки уровня неспектральных помех в зависимости от вида разбавителя (табл. 7, стр.66). Однако в работе отсутствуют данные по корреляции параметров кратности разбавления биологических проб (жидких и твердых) и эффективности «устойчивых» параметров работы МС-ИСП спектрометра, насколько они взаимосвязаны? Изменяются ли значения «устойчивых» параметров с кратностью разбавления или параметр кратности разбавления имеет пороговый характер? Ведь при каком-то уровне разбавления уже невозможно будет получить корректные результаты определений?

2. Соискатель в своей работе все время подчеркивает факт проведения исследований с использованием коммерческого прибора Agilent 7500с с учетом конструктивных особенностей ионной оптики данного масс-спектрометра. Хотелось бы получить разъяснения, насколько возможно использовать результаты полученных исследований при проведении измерений на приборах иных марок и других производителей?

3. Табл. 2 и 3 из текста диссертации можно было бы перенести в приложение, дабы не загромождать основной текст.

Рекомендации по использованию результатов диссертационной работы

Полученные диссертантом результаты могут быть использованы при разработке методик анализа и выполнении массовых измерений состава сложных объектов (испытательные центры, клинические лаборатории) и представляют научный интерес для специалистов в области аналитической химии (ГЕОХИ РАН, МГУ, ИОНХ РАН и др.).

Сделанные замечания носят частный характер и не отражаются на общей высокой оценке исследования. Все основные результаты, выводы и рекомендации рецензируемой работы Осипова К. обоснованы достаточно высоким теоретическим и экспериментальным уровнем проведенных исследований. Основные результаты диссертационной работы опубликованы в 8 публикациях, материалы исследований обсуждены на профильных научно-технических конференциях. Структура и объем

диссертационной работы, выводы и рекомендации, опубликованные соискателем, научные статьи, а также автореферат полностью отражают и подтверждают научные положения, рассматриваемые в данной диссертации.

Можно заключить, что диссертационная работа Осипова К. на тему «Исследование и устранение неспектральных помех при анализе биологических жидкостей и лекарственных средств методом масс-спектрометрии с индуктивно связанной плазмой», является законченной научно-квалификационной работой, выполненной на высоком научном уровне, и соответствует критериям, предъявляемым к кандидатским диссертациям, установленным п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013 г. № 842, а ее автор заслуживает присуждения ученой степени кандидата химических наук по специальности 02.00.02 - аналитическая химия.

Отзыв заслушан и обсужден на совместном заседании кафедры аналитической химии и УНПК «Аналит» ФГБОУ ВПО «Кубанский государственный университет» (протокол № 7 от 24 марта 2015г.).

Зав. кафедрой аналитической химии
ФГБОУ ВПО «Кубанский государственный университет»,
д-р хим.наук, профессор



З.А. Темердашев

350040 Краснодар, ул. Ставропольская, д. 149,
E-mail: analyt@chem.kubsu.ru

Профессор кафедры аналитической химии,
ФГБОУ ВПО «Кубанский государственный университет»,
д-р хим.наук



М.Ю. Бурылин

350040 Краснодар, ул. Ставропольская, д. 149,
E-mail: burylin@chem.kubsu.ru

