

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

на диссертацию на соискание ученой степени доктора химических наук
Ставрианиди Андрея Николаевича

на тему «РАЗВИТИЕ МЕТОДОЛОГИИ ХРОМАТОМАСС-
СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКОГО ОБНАРУЖЕНИЯ И ОПРЕДЕЛЕНИЯ
КОМПОНЕНТОВ ЛЕКАРСТВЕННЫХ РАСТЕНИЙ»

по специальности 1.4.2 – Аналитическая химия

Актуальность исследования

Контроль качества растительного сырья и изготавливаемых на его основе фитопрепаратов относится к области наиболее сложных аналитических задач, не имеющих в настоящее время не только стандартизованных процедур для исполнения, но и даже консенсусного подхода к стратегии анализа. Многие внешние факторы влияют на качественное и количественное содержание вторичных метаболитов в растительном материале. По этой причине анализ ДНК годится для установления видовой принадлежности растений, но не для оценки качества растительных материалов. Фармакопейные методы стандартизации растительных материалов не могут обеспечить достоверного контроля их качества, особенно в тех случаях, когда маркеры качества не установлены.

Каждая партия фитопрепарата должна обеспечивать заявленную биологическую эффективность. При этом проблема аннотирования химических соединений, обуславливающих определенный биологический эффект, в большинстве исследований не находит однозначного решения. В фитопрепаратах биологически активные компоненты представлены группой не всегда родственных и не всегда известных соединений, включенных в состав сложной матрицы. Исследования, направленные на разработку подходов к контролю качества растительных материалов, проводятся с использованием различных аналитических методов и их комбинаций. Несмотря на то, что данная работа выполнена на платформе единого аналитического метода – ВЭЖХ-МС, к его применению в отношении анализа растительного сырья ранее не было выработано оптимальной стратегии, что

можно рассматривать как **крупную научную проблему**, решению которой посвящена рецензируемая работа.

Цель исследования заключалась в разработке методических подходов к извлечению, обнаружению и определению компонентов растительного сырья из разных фитохимических групп с использованием метода высокоэффективной жидкостной хроматомасс-спектрометрии.

Структура и объем диссертации. Диссертационная работа изложена на 340 страницах, содержит 128 рисунков и 77 таблиц, 3 приложения и 372 ссылки на библиографические источники. Диссертация имеет традиционную структуру: состоит из обзора литературы, экспериментальной части, четырех глав, в которых суммированы результаты и их обсуждение, заключения и выводов.

Глава 1 далеко выходит за рамки традиционного обзора литературы и по существу является обоснованием концепции. На этом пути автор поддерживает интеллектуальный паритет с классическими работами в области фитохимии. Литературные источники полемически обсуждены, а выводы положены в основу собственной оригинальной концепции. В название классической статьи Хуберта (Hubert J. et al, ссылка № 14) вынесен вопрос: «Сколько методологий включает одна концепция?» Концепция А.Н. Ставрианиди включает более 20 методологий, как это следует из таблицы 1.7 (стр. 70 – 71). Автором принято справедливое решение: предложить систему классификации используемых в методе ВЭЖХ-МС аналитических процедур и оценить их применимость в трех направлениях анализа: целевом, групповом и ненаправленном (нецелевом). До выбора стратегии анализа необходимо определиться: представлены активные компоненты в виде конкретного перечня соединений, в виде исчерпывающим образом качественно и количественно не охарактеризованной группы родственных соединений или же активные компоненты предстоит еще идентифицировать. С гибким подходом к формированию стратегии анализа с учетом специфики и уровня неопределенности задачи, безусловно, следует согласиться и

поддержать основную часть формулировки цели работы как создание и развитие новых методологических подходов к извлечению, обнаружению и определению растительных компонентов из разных фитохимических групп.

В главе 2 суммированы сведения об оборудовании, материалах и технике эксперимента. В работе были использованы: различное вспомогательное оборудование для подготовки проб (5 позиций), ЯМР спектрометр Bruker, 6 ВЭЖХ-МС комплексов в различной комплектации от разных фирм-производителей, 8 типов колонок для ВЭЖХ обеспечивали различные режимы хроматографического разделения: от классического обращеннофазового до гидрофильного. Приведен исчерпывающий перечень использованных реактивов, а также более 30 образцов растительных материалов (таблица 2.1, стр. 80-81). Подробно описана техника экспериментов (раздел 2.2), включая пробоподготовку, инструментальный анализ и обработку данных.

Глава 3 содержит результаты исследований по определению биомаркеров для контроля состава растительного сырья и продуктов на его основе. В таблице 3.1 (стр. 106 -107) суммированы параметры, установленные для определения методом ВЭЖХ-МС биомаркеров исследуемого растительного материала. Выбранные условия ВЭЖХ-МС/МС определения 52 биомаркеров для 30 распространённых лекарственных растений удалось адаптировать применительно к быстрому скринингу. Предложенные процедуры анализа метрологически охарактеризованы и апробированы в анализе реальных объектов.

В главе 4 предложены методические подходы для группового извлечения маркерных компонентов из растительных материалов, а в **главе 5** – для групповой идентификации компонентов растительного сырья. В главах 4-5 автором предложено комплексное решение для скрининга не только известных компонентов растительного экстракта, но и других компонентов из той же фитохимической группы.

Особое внимание уделено разработке способов группового определения тритерпеновых и стероидных сапонинов, в том числе и с использованием методологии ВЭЖХ-МС-КАМС (глава 6).

Главы диссертации заканчиваются выводами, основные положения которых нашли отражение в заключении и общих выводах по итогам исследования. Положения, выносимые на защиту, соответствуют ходу изложения диссертации, что облегчает чтение работы. Содержание автореферата полностью отражает содержание диссертации.

Структурирование, изложение и оформление работы могут быть охарактеризованы как безупречные.

Научная новизна исследования

Автором разработана новая концепция анализа фитопрепаратов с использованием передовых метаболомных технологий. В частности, ранее не применявшийся в фитохимии подход, основанный на обработке «сырых» масс-спектрометрических данных, реализован в формате преобразования трехмерных массивов ВЭЖХ-МС данных низкого разрешения для выявления характеристичных групповых сигналов фрагментных ионов и кластеризации образцов с применением параллельного факторного анализа. Расширен состав маркерных компонентов ряда фитохимических групп, некоторые представители которых охарактеризованы впервые. Предложены новые комплексные высокоинформативные подходы для контроля качества растительных материалов, в частности, способ оценки группового состава сапонинов женьшеня на основе гидролиза с последующим ВЭЖХ-МС определением агликонов. Показано, щелочной гидролиз с метилатом натрия в среде ацетонитрила позволяет достичь количественного выхода агликонов разной структуры. В рамках техники «отпечатков пальцев» предложен новый способ построения, обработки и сопоставления масс-хроматограмм по сигналам выбранных характеристичных фрагментных ионов, образующихся в источнике ионизации.

Практическая значимость

Методология целевого ВЭЖХ-МС скрининга разработана и продемонстрирована на примере обнаружения 52-х маркеров качества, относящихся к разным фитохимическим группам. Автором предложена стратегия кластеризации образцов экстрактов из отдельных растительных материалов и их смесей, позволяющая выявлять сигналы, характеристичные для каждой группы образцов. Предложены и другие взаимодополняющие техники, позволяющие проводить рациональную обработку огромного массива масс-спектрометрических данных, проводить подготовку проб к анализу с разной степенью селективности, решать вопрос оценки количественного содержания маркерных компонентов в образцах в отсутствие образцов сравнения и др. Для определения сапонинов предложена методология ВЭЖХ-МС-КАМС, которая может быть распространена на определение других групп компонентов растений. В работе содержится много полезной справочной информации для безэталонного ВЭЖХ-МС скрининга компонентов фитопрепаратов. Разработанная методология может быть рекомендована к изучению и внедрению в практику лабораторий, специализирующихся не только в фитохимии, но и в других приложениях ВЭЖХ-МС/МС анализа.

Достоверность и обоснованность результатов, положений и выводов диссертации не вызывает сомнений.

По материалам работы опубликовано 27 статей в рецензируемых научных изданиях, индексируемых международными базами данных (Web of Science, Scopus, RSCI) и рекомендованных в диссертационном совете МГУ по специальности 1.4.2 – «Аналитическая химия». Результаты работы прошли апробацию на всероссийских и международных конференциях и симпозиумах.

По содержанию работы автору может быть адресовано несколько вопросов и замечаний:

1 В формулировке цели работы детализация «для повышения информативности и селективности процедур анализа за счет регистрации

сигналов выбранных диагностических ионов и ионных переходов» выглядит лишней, поскольку неоправданно сужает круг решаемых задач. В частности, задача «Разработать способ оптимизации условий группового извлечения фитокомпонентов из растительных материалов и клеточных культур» является ключевой в данном исследовании, поскольку инструментальный этап ВЭЖХ-МС определения группы соединений разной химической природы аналитиками в целом уже освоен, а вот их групповое количественное извлечение из матрицы остается проблемой, решению которой как раз и посвящена глава 4 диссертационной работы.

2 Попутно отметим, что в главе 4 (либо во 2-й) недостает характеристики анализируемых объектов. Для растительного материала полезно было бы установить содержание влаги, средний размер частиц, пористость. Эффективность экстракции зависит не только от состава экстрагента и режима обработки материала, но и от свойств самого материала

3 Аналиты или, как автор их называет, биомаркеры – «контролируемые соединения, отвечающие за качество и целебные свойства растительных материалов» (стр.98) скорее, наверное, следует считать маркерами подлинности и не более того, поскольку комплекс соединений, отвечающих за определенный физиологический эффект, для большинства фитопрепаратов до настоящего времени не установлен.

Вместе с тем, вышеприведенные замечания не носят принципиального характера и не умаляют значимости диссертационного исследования, выполненного А. Н. Ставрианиди. Автором внесен весомый вклад в теорию и практику аналитической химии как науки.

Диссертационная работа А. Н. Ставрианиди содержит решение крупной научной проблемы, имеющей важное практическое значение и безусловно заслуживает высокой оценки. Диссертация отвечает требованиям, установленным Московским государственным университетом имени М.В.Ломоносова к работам подобного рода. Содержание диссертации соответствует специальности 1.4.2 - "Аналитическая химия" (по химическим

наукам), а также критериям, определенным Положением о присуждении ученых степеней в Московском государственном университете имени М.В.Ломоносова.

Таким образом, соискатель Ставрианиди Андрей Николаевич заслуживает присуждения ученой степени доктора химических наук по специальности 1.4.2 - "Аналитическая химия"

Официальный оппонент:



11.04.2023 г.

доктор химических наук,
заведующая лабораторией аналитической
токсикологии ФГУП «Научно-исследовательский
институт гигиены, профпатологии и экологии
человека» Федерального медико-биологического
агентства
Савельева Елена Игоревна

Контактные данные:

тел.: +7 (812) 606-62-81 доб.240, e-mail: saveleva@gpech.ru

Специальность, по которой официальным оппонентом

защищена диссертация:

20.02.23 – Поражающее действие специальных видов оружия, средства и
способы защиты

Адрес места работы:

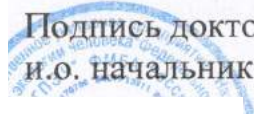
188663, Ленинградская область, Всеволожский м.р-н, Кузьмоловское г.п., ул.

Заводская, зд. 6/2, корп. 93

ФГУП «НИИ ГПЭЧ» ФМБА России

Тел.: +7 (812) 606-62-81 доб.240; e-mail: saveleva@gpech.ru

Подпись доктора химических наук Савельевой Елены Игоревны заверяю:
и.о. начальника отдела кадров ФГУП «НИИ ГПЭЧ» ФМБА России



Хитрова Маргарита Владимировна

11.04.2023 г.