

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

Низкомолекулярные вещества растительного происхождения – огромная, плохо исследованная и чрезвычайно структурно-разнообразная группа соединений, значительная часть которых проявляет активность практически ко всем физиологическим системам человека. В предлагаемой диссертационной работе соискателем изложена емкая и универсальная схема анализа растительных объектов, базирующаяся на методе жидкостной хроматомасс-спектрометрии и позволяющая получать надежные количественные оценки содержания множества веществ, представляющих безусловный интерес для повышения качества жизни.

Оценивая актуальность выбранной диссертантом темы, следует отметить постоянный интерес, проявляемый исследователями к соединениям, извлекаемым из природных объектов. Растущие возможности физико-химического анализа сложных смесей – в первую очередь, метода хроматомасс-спектрометрии – позволяют получать уточненное знание о содержании и структурах низкомолекулярных растительных компонентов, что дает возможность проводить выверенные корреляции с их биологической активностью, вычленять соединения с требуемыми фармакологическими свойствами, искать пути создания новых лекарств на основе базовых структур, идентифицированных в растительном сырье. Дополнительным – хотя крайне немаловажным – вкладом в развитие способов анализа природных объектов следует назвать повышение возможностей контроля состава пищевых продуктов и биологически активных добавок, распространяемых на рынке и импортируемых в РФ. Наконец, значительные

возможности хроматомасс-спектрометрического метода, развиваемого соискателем, позволяют уточнять (а в ряде случаев – и пересматривать) имеющуюся ранее информацию о составе растительного сырья. Как отмечено выше, актуальность темы базируется на получении как качественной информации (структурная идентификация), так и на количественной (содержание компонентов); в предлагаемой работе диссертант уделит внимание обоим направлениям.

Диссертационная работа составлена по традиционной схеме и имеет подробный литературный обзор (глава 1), описание экспериментальных схем, четыре главы изложения и обсуждения результатов эксперимента, список литературы и ряд дополнительных разделов.

Описание экспериментальных схем (глава 2) выполнено весьма детально и не вызывает дополнительных вопросов.

В первой экспериментальной главе (глава 3) соискателем описана разработка методики определения ряда растительных компонентов, преимущественно гликозидной структуры. Методика построена по стандартной схеме, включающей разделение компонентов в режиме обращенно-фазовой хроматографии и регистрацию двух ионных переходов для каждого соединения. Выбор определяемых соединений и их значительное число (около 50) позволяет использовать методику для оценки качества растительного сырья с возможностью идентификации видов растений в его составе. Апробирование разработки проведено соискателем на аутентичных объектах.

Вторая экспериментальная глава (глава 4) посвящена разработке способов пробоподготовки растительных объектов и оптимизации извлечения определяемых компонентов. Сложность данной задачи обусловлена различиями объектов и структурным разнообразием аналитов (от гликозидов со стероидными агликонами до сахаров и сахароспиртов) и необходимости построения унифицированных схем группового извлечения. Дополнительным усложнением задачи является химическая лабильность

некоторых аналитов в условиях пробоподготовки. При разработке способов извлечения гликозидов соискатель воспользовался характеристичными реперными соединениями, сравнивая эффективность экстракции при обработке проб ультразвуком и кипящим растворителем при нормальном и пониженном давлении. Дизайн эксперимента включал двухфакторную схему, позволяющую получать достоверный результат при минимизации необходимого времени. Для оптимизации способов извлечения сахаров соискателем дополнительно разработана методика определения 17-ти аналитов с разделением методом гидрофильной жидкостной хроматографии. Разработанные подходы были апробированы при анализе аутентичных объектов. Оценивая работу, проведенную соискателем по теме оптимизации извлечения аналитов, особенно следует отметить тщательность обоснования получаемых результатов, достигаемую путем проведения проверочных экспериментов.

Третья экспериментальная глава (глава 5) представляется наиболее интересной в плане разработки новых подходов к анализу сложных смесей, содержащих труднодоступные или неизвестные ранее вещества. В этом смысле обе предыдущие главы можно считать, скорее, подготовительными. Подход, предлагаемый автором, базируется на нестабильности растительных гликозидов в условиях положительной электрораспылительной ионизации, что позволяет наблюдать фрагментные ионы при регистрации спектров MS^1 . Выгодной стороной такого подхода следует считать возможность регистрации аналитов без потерь (ложноотрицательных результатов), как правило, получаемых при использовании информационно-зависимого режима с диссоциацией ионов-прекурсоров в соударительной ячейке. Хотя регистрация спектров MS^1 (и ионов-фрагментов, образующихся в источнике), более привычна для масс-спектрометров высокого разрешения, предложенный соискателем подход рационален ввиду (i) обычно значительного содержания аналитов в объектах, что снижает требования к шумам в режиме MS^1 и (ii) масс-спектрометрических свойств (лабильности в

условиях ионизации) тематических аналитов. Оптимизированный выбор ионов спектра МС¹, отражающих структуру агликона, позволил соискателю сформировать способ детектирования как известных, так и не описанных ранее соединений. Предложенный подход был с успехом применен при обнаружении новых соединений (группа тритерпеновых гликозидов) в составе женьшеневого чая, а также других объектов, содержащих сапониновые гликозиды. Сделанные находки были частично подтверждены методом ЯМР, а процедура подтверждения включала как гидролиз гликозида с идентификацией агликона, так и идентификацию одного из гликозидов. Важной частью главы являются математические способы обработки хроматограмм на основе корреляционного и факторного анализа. Разработанный подход был апробирован при анализе аутентичных объектов. Здесь, как и в предыдущих главах, соискатель проявляет тщательность при формировании заключений.

В четвертой экспериментальной главе (глава 6) соискатель описывает разработку универсальных способов определения разных групп гликозидов, основываясь на результатах, изложенных в предыдущих главах. Ввиду значительного числа возможных аналитов, стандарты которых труднодоступны, а также необходимости легкого воспроизведения методик на разном оборудовании и в разных лабораториях, для получения количественных результатов предложено использование метода относительных факторов откликов. Данное предложение количественно обосновано соискателем посредством измерения относительных откликов на различном оборудовании. Кроме того, в данной главе предложен способ суммарной оценки содержания гликозидов, имеющих одинаковые агликаны. Для этого соискателем были оптимизированы условия гидролиза гликозидов, позволяющие получить количественный результат.

Основываясь на обзоре отдельных глав, можно сделать вывод о том, что в представленной диссертации изложена четкая и очень последовательная работа с жесткими логическими связями между

отдельными ее частями: оптимизация пробоподготовки → достоверное определение известных соединений → обнаружение предполагаемых производных (структурных аналогов) → создание унифицированных методов анализа, позволяющих получить максимальный объем информации об объекте.

Представленная работа, безусловно, ориентирована на практический результат, который заключается в повышении достоверности и информативности получаемых результатов анализа растительного сырья, в унификации и упрощении подходов. Диссертация содержит ряд готовых способов определения множества растительных компонентов гликозидной и сахарной природы.

Наиболее существенным вкладом, определяющим научную новизну диссертационной работы, представляется разработка способов группового обнаружения многочисленных производных (гликозиды), содержащих одинаковые агликоновые остатки. Развитие данного направления, включая предложенные соискателем математические способы обработки и сравнения масс-хроматограмм безусловно, позволило бы повысить информативность результатов анализа в применении и к другим семействам биологически активных веществ. Результативность предложенных способов группового обнаружения выражается в значительном числе предположительно идентифицированных компонентов гликозидной природы.

Диссертация и реферат хорошо оформлены и содержат лишь незначительное число опечаток. Материал, изложенный в диссертации, в достаточной степени основывается на печатных работах, опубликованных в изданиях, индексируемых международными базами данных.

К предлагаемой работе есть ряд вопросов и замечаний.

1. Способ групповой идентификации (глава 5) предполагает обнаружение аналитов при регистрации в режиме SIM (MC^1) нескольких характеристических ионов, образующихся в источнике. Данный режим более пригоден для газовой, а не жидкостной хроматомасс-спектрометрии по

причинам: (i) большей эффективности газовых (капиллярных) колонок по сравнению с жидкостными (набивными) и (ii) меньшей «загрязненности» газовых масс-хроматограмм. Тем не менее, даже для ГХ-МС режим SIM может приводить к получению ложноположительных результатов для малых концентраций и при нередком соэлюировании. В случае ЖХ-МС эти затруднения частично компенсируются повышением разрешения, но и в этом случае рекомендуется получать дополнительную информацию из спектров высших порядков. Какова достоверность групповой идентификации при анализе сложных (и, возможно, сильно загрязненных) образцов? Планируются ли варианты повышения достоверности, например, за счет измерения относительных площадей пика аналита для разных ионов? Как может снижаться достоверность идентификации при уменьшении концентрации и следует ли вводить ограничения по концентрациям? Важно учесть, что при малом количестве информации, получаемой от детектора (в т.ч. при низком разрешении или при отсутствии ионов-фрагментов, полученных из отфильтрованного прекурсора) достоверность не удастся поднять даже с применением стандартного вещества.

2. Не понятно, почему соискатель не воспользовался методом внутреннего стандарта – даже в случае сложной пробоподготовки. Ведь выбор внутреннего стандарта не ограничивается дейтерированными производными, и особенно при определении большого числа аналитов. Тем более, внутренних стандартов может быть несколько, для компенсации различий между аналитами.

Приведенные замечания не снижают общей ценности исследования. В целом, я полагаю представленную работу весьма интересной, и особенно – в части структурной идентификации обнаруженных соединений.

Указанные недостатки не оказывают существенного влияния на оценку общего уровня научной и практической значимости представленного исследования. Диссертантом полностью решены поставленные задачи, и результаты этого решения имеют несомненную научную и практическую

ценность в области повышения надежности и информативности при определении компонентов растительного сырья и продуктах на его основе.

Содержание диссертации соответствует специальности 1.4.2 – "Аналитическая химия". По критериям актуальности темы, научной новизны, объему и практической значимости полученных результатов диссертация А.Н. Ставрианиди полностью соответствует требованиям, определенным Положением о присуждении ученых степеней в Московском государственном университете имени М.В.Ломоносова, предъявляемым к докторским диссертациям, а ее автор заслуживает присуждения ученой степени доктора химических наук по специальности 1.4.2 – Аналитическая химия (химические науки).

Официальный оппонент:

26.04.2023 г.

доктор химических наук,
старший научный сотрудник Федерального
государственного бюджетного учреждения
«27 Научный центр» Министерства обороны
Российской Федерации
Григорьев Андрей Михайлович

Контактные данные:

тел.: +7 (960) 629-94-61, e-mail: chrzond4250@yandex.ru

Специальность, по которой официальным оппонентом
защищена диссертация:

02.00.02 – Аналитическая химия

Адрес места работы:

111024, г. Москва, проезд Энтузиастов, д. 19, стр. 20

ФГБУ «27 Научный центр» МО РФ

Тел.: +7 (495) 693-44-44; e-mail: 27nc_1@mil.ru

Подпись А.М. Григорьева заверяю:

Секретарь научно-технического совета 27 НЦ МО РФ

кандидат химических наук

 М.А. Голышев